

تأثیر کلرید جیوه بر رشد و نمو لوله عصبی طناب نخاعی جنین موش صحرایی رت

مهدی مهدیزاده ^{Ph.D.}، طیبه رستگار ^{M.Sc.}، کاظم پریور ^{Ph.D.}**

ملیحه نوبخت ^{Ph.D.}، محمدتقی جفایی ^{Ph.D.}*

* گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی ایران

** گروه زیست‌شناسی دانشگاه تربیت معلم تهران

تاریخ وصول: مردادماه ۸۱، تاریخ پذیرش: خردادماه ۸۱

چکیده

هدف: کلرید جیوه به صورت پودر سفید رنگ، کریستالین و سمی است که از راه پوست و دستگاه گوارش جذب شده و از طریق کلیه و ادرار دفع می‌شود. این ماده در ترکیب داروهای مسهل، روشن کننده‌های پوست، مواد حاجب به کار می‌رود. مسمومیت مزمن با آن سبب اختلالات حسی و حرکتی، اختلال در رفتار و عاطفه می‌شود.

مواد و روشها: برای انجام تحقیق، ۴۲ سر موش صحرایی پس از مشاهده پلاک واژینال که به عنوان روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد، در هفت گروه تقسیم شدند. یک گروه دست نخورده (Intact)، سه گروه شاهد (Control) که محلول نرمالین سالین دریافت کردند و سه گروه آزمایشی (Experimental) که در روزهای ۸، ۹ و ۱۰ محلول کلرید جیوه ۲ mg/kg/ip دریافت کردند. سپس جنینها در روز ۱۵ بارداری از رحم خارج و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

یافته‌ها: در مطالعه میکروسکوپی نخاع، مرگ سلولی و تقسیم میتوز زیاد شده، فضای خارج سلولی افزایش یافته و تراکم سلولها کم شده است. ضخامت ناحیه ونتریکولار نخاع افزایش و ضخامت ناحیه پوشاننده و حاشیه‌ای و قطر داخلی و خارجی نخاع کم شده است. **نتیجه‌گیری:** از مطالعه حاضر چنین برمی‌آید که کلرید جیوه به عنوان یک آپاتوژنز، موجب مرگ سلولی و از بین رفتن نوروبلاست‌ها می‌شود که در نتیجه روند رشد و نمو لوله عصبی دچار اختلال می‌شود. بنابراین در دوران بارداری اثرهای تراتوژنیک دارد.

واژه‌های کلیدی: کلرید جیوه، عامل تراتوژنیک، طناب نخاعی، موش صحرایی

مقدمه

[۳] و در ترکیب محلول زنکر (Zenker's Fulid) در بافت‌شناسی [۴] کاربرد دارد.

کلرید جیوه از طریق اتصال به گروه سولفیدریل پروتئینها در بدن خاصیت سمی خود را اعمال می‌کند [۵]. ارگان مورد هدف کلرید جیوه دستگاههای اداری تناسلی، تنفس، گوارش و اندامهای مختلف جنینی است [۱ و ۵]. در مسمومیت مزمن با آسیب کلرید جیوه لرزش (tremor) اختلالات حسی و حرکتی، به کلیه و نکروز توبرلر مشاهده می‌شود [۱].

در سال ۱۹۶۹ در خانواده‌ای اهل نیومکزیکو که از گوشت

کلرید جیوه به صورت پودر سفید رنگ، کریستال، سنگین و سمی است که از طریق پوست و دستگاه گوارش جذب شده و از طریق کلیه دفع می‌شود. این ماده به عنوان ضد عفونی کننده اشیای بی جان، ضد انگل و ضد قارچ در پزشکی و [۱] و نیز در ترکیب مواد حاجب [۲]، داروهای مسهل، محافظ پوست، روشن کننده‌های پوست و نیز در ترکیب داروهای سنتی چینی

آدرس مکاتبه: بزرگراه همت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز علوم پایه،
گروه علوم تشریح
Email: maranaoo@iums.ac.ir

تقسیم شدند. برای تهیه محلول کلرید جیوه، پودر کلرید جیوه در محلول نرمال سالین با میزان مشخص حل شد [۹]. پس از خارج کردن جنینها تعداد و میزان جذب آنها ثبت شد و سپس مدت ۲۴-۶ ساعت در فیکساتیو بوئن قرار گرفته پس از طی مراحل پاساژ بافتی و تهیه بلوک پارافینی [۴ و ۱۰]، برشهایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و مقاطع به روش H&E رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند. بررسیها شامل آرایش سلولی دیواره لوله عصبی طناب نخاعی، ضخامت جدار لوله و نواحی مختلف آن، قطر داخلی و خارجی لوله عصبی است.

یافته‌ها

به دلیل تشابه نتایج در گروههای شاهد و دست نخورده و جلوگیری از تکرار مطالب، تنها یک گروه شاهد ذکر شده است.

آرایش سلولی جدار لوله عصبی

در گروههای شاهد در هر سه لایه نخاع هسته‌ها منظم و عمود بر لومن میانی قرار گرفته‌اند. تقسیم میتوز در لایه و نتریکولار مشاهده می‌شود، تراکم هسته‌ها طبیعی است

خوکهایی که برای تغذیه آنها از حبوبات اصلاح شده با کلرید جیوه استفاده می‌شد عوارض غیرطبیعی رفتاری و اختلال عصبی مشاهده و منجر به تولد جنینهایی با آسیب مغزی شد [۵].

کلرید جیوه سبب پلی‌نوروپاتی محیطی و از دست رفتن آکسون عصبی می‌شود [۶]. برای لنفوسیت‌های انسان، میتوز [۷] و برای بافتهای جنینی و نوزادی پستانداران تراتوژن است [۸]. دستگاه عصبی مرکزی از دستگاههای حساس و مهم است که اختلال در رشد و نمو آن می‌تواند حتی منجر به سقط جنین شود [۵]. بنابراین در تحقیق حاضر تغییرات سلولی ناشی از تزریق کلرید جیوه در نخاع برای بررسی اثرهای تراتوژنیک این ماده بررسی شده است.

مواد و روشها

تعداد ۴۲ سر موشهای صحرایی ماده پس از جفت‌گیری و مشاهده پلاک واژینال توزین و از هم جدا شدند. (در این تحقیق روز مشاهده پلاک به عنوان روز صفر بارداری در نظر گرفته شد). وزن موشها ۲۷۰-۲۰۰ گرم و سن آنها بالای ۹۰ روز است. سپس موشها به طور تصادفی به هفت گروه ۶ تایی طبق جدول ۱

جدول ۱. گروههای مورد بررسی

گروه	تعداد موش	روز تزریق	دوز تزریق کلرید جیوه	روز بررسی	تعداد جنینها	درصد جذب جنینها
تجربی ۱	۶	۸	۲mg/kg/ip	۱۵	۴۷	-
تجربی ۲	۶	۹	۲mg/kg/ip	۱۵	۴۷	-
تجربی ۳	۶	۱۰	۲mg/kg/ip	۱۵	۵۰	۱۹/۳
کنترل ۱	۶	۸	سالین نرمال	۱۵	۴۹	-
کنترل ۲	۶	۹	سالین نرمال	۱۵	۴۸	-
کنترل ۳	۶	۱۰	سالین نرمال	۱۵	۴۹	-
دست نخورده	۶	-	بدون تزریق	۱۵	۴۹	-

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار در گروههای مختلف

mean±SE گروهها	ضخامت جدار لوله	ضخامت ناحیه و نتریکولار	ضخامت ناحیه پوشاننده	ضخامت ناحیه حاشیه‌ای	قطر داخلی لوله عصبی	قطر خارجی لوله عصبی
تجربی ۱	۳۶۲/۷±۳/۷۹*	۷۸/۹±۱/۴۶*	۱۵۸/۱۶±۴/۵۳*	۳۷/۸±۰/۴۶*	۴۶/۵۸±۱/۲۷*	۷۷۲/۲۹±۱۵/۰۸*
تجربی ۲	۳۶۷/۵±۲/۷۲*	۷۳/۳۳±۰/۶۱*	۱۵۴/۹۳±۲/۲۳*	۴۱/۶±۰/۵۶*	۵۲/۰۷±۱/۴۳*	۷۸۳/۳۶±۳/۰۴*
تجربی ۳	۳۶۴/۷۹±۴/۶۵*	۷۱/۴۵±۱/۰۶*	۱۵۶/۳۶±۳/۸۵*	۴۳/۹۵±۱/۰۰*	۵۰/۴۱±۱/۵۵*	۷۷۴/۹۴±۸/۲۲*
کنترل	۳۹۷/۲۹±۴/۱۴	۳۷/۱۵±۰/۸۵	۱۸۸/۳۱±۶/۶۱	۶۵/۰۸±۱/۵۵	۵۸/۳۳±۱/۴۹	۸۵۰/۴±۱۶/۹

*: P<0.0001

برای تولید سلولهای جدید افزایش می‌یابد. و Shenker همکارانش در سلولهای T انسان و منوسیتها مرگ سلولی ناشی از کلرید جیوه را مشاهده کردند [۱۳ و ۱۴]. نظیر نتایج فوق در هیپاتوسیتهای کبد موش صحرایی [۱۵]، در سلولهای پروگزیمال کلیه [۱۶] در ماکروفاژهای کشت شده انسان [۱۷] به دنبال قرار گرفتن کلرید جیوه به دست آمده است.

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که کلرید جیوه به عنوان یک آپاپتوز در سلولهای مختلف در تعادل بین تکثیر سلولی و مرگ سلولی اختلال ایجاد کرده و موجب آسیب بافتی می‌شود [۱۸]. به دنبال وقوع مرگ سلولی، محصول کاتابولیسم سلولهای مرده در فضاهای خارج سلولی آزاد می‌شود [۱۹ و ۲۰]؛ بنابراین فضای خارج سلولی افزایش می‌یابد. Bret و همکارانش ثابت کردند که کلرید جیوه سبب افزایش DNA خارج سلولی می‌شود و در مرگ سلولی DNA خارج سلولی بالا می‌رود [۱۹ و ۲۰].

در اینجا افزایش ضخامت ناحیه و نتریکولار به دلیل وقوع مرگ سلولی و افزایش فضای خارج سلولی و همچنین افزایش میزان تقسیم میتوز است. از طرفی می‌دانیم که نوربلاستها پس از تولید در ناحیه و نتریکولار به ناحیه پوشاننده مهاجرت می‌کنند. چون به دنبال وقوع مرگ سلولی در لایه و نتریکولار، تعداد نوروبلاستها کم شده، پس تعداد مهاجرت نوروبلاستها و در نتیجه ضخامت ناحیه پوشاننده و حاشیه‌ای نیز کاهش می‌یابد. در نهایت به دنبال کاهش ضخامت ناحیه پوشاننده و حاشیه‌ای، ضخامت جدار لوله عصبی و قطر خارجی آن کاهش می‌یابد. کاهش قطر داخلی لوله عصبی را شاید بتوان این گونه توجیه کرد که افزایش فضای خارج سلولی و ضخامت ناحیه و نتریکولار سبب کاهش فضای داخلی لوله شده و بنابراین قطر داخلی لوله عصبی کاهش یافته است.

با توجه به مطالب فوق، کلرید جیوه با خاصیت القای آپاپتوز در سلولهای مختلف سبب وقوع مرگ سلولی می‌شود و شاید بتوان بدین وسیله بیماریهایی نظیر گلومرولونفریت، سندرم خود ایمنی، سمیت عصبی ناشی از کلرید جیوه را توجیه کرد [۲۱ و ۲۲].

(شکل‌های ۱، ۲ و ۳). ولی در گروههای آزمایشی نظم و جهت هسته‌ها به هم خورده است و هسته‌ها در جهات مختلف نسبت به لومن میانی قرار گرفته‌اند؛ مرگ سلولی مشاهده می‌شود؛ تراکم سلولها کم شده و فضای خارج سلولی افزایش یافته است و در لایه و نتریکولار تقسیم میتوز فراوان است (شکل‌های ۴، ۵ و ۶).

طبق جدول ۲ ضخامت جدار لوله عصبی در گروههای آزمایشی نسبت به گروه شاهد کاهش یافته و اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.0001$).

ضخامت جدار لوله عصبی و نواحی مختلف آن

جدول ۲ ضخامت ناحیه و نتریکولار در گروههای آزمایشی نسبت به گروه کنترل افزایش یافته و اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.0001$). ضخامت لایه پوشاننده و حاشیه‌ای نیز طبق جدول ۲ در گروههای آزمایشی نسبت به گروه شاهد کاهش یافته و اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود ($P < 0.0001$). اندازه قطر داخلی و قطر خارجی لوله عصبی نیز در گروههای آزمایشی نسبت به گروه شاهد کاهش یافته (جدول ۲) و اختلاف معنی‌دار مشاهده می‌شود ($P < 0.0001$).

بحث

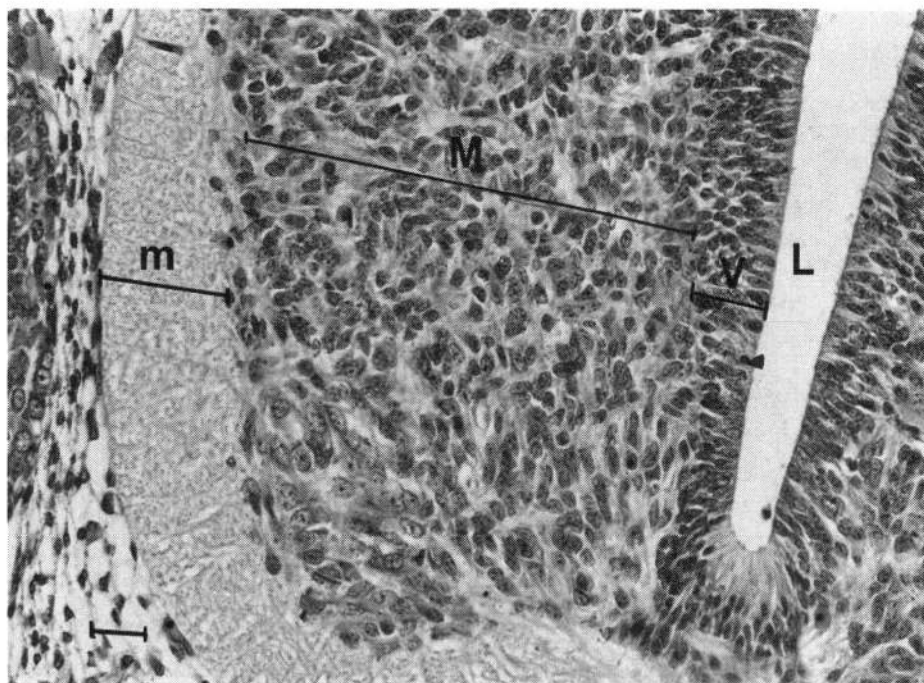
مرگ سلولی پدیده‌ای است که به طور گسترده در مسیر تجدید و ترمیم بافتی یا پاسخ به تنظیم‌کننده‌های فیزیولوژیک مشاهده شده است [۱۱]. آپاپتوز نوعی مرگ سلولی است که طی روند رشد و نمو به میزان فراوان رخ می‌دهد [۱۲] و از اهمیت خاصی برخوردار است.

ترکیبات جیوه در *in vitro* آپاپتوز هستند و مرگ سلولی کلرید جیوه آپاپتوز را آغاز می‌کند و با افزایش غلظت و زمان در معرض قرارگیری مخلوطی از سلولهای نکروتیک و آپاپتوتیک مشاهده می‌شود [۱۳ و ۱۴].

کلرید جیوه همچنین سبب مرگ سلولی در نوروبلاستهای ناحیه و نتریکولار شده، هسته‌ها هیپرکروماتینه و پیکنوز می‌شوند و ضمناً تقسیم میتوز نیز به صورت مکانیسم جبرانی

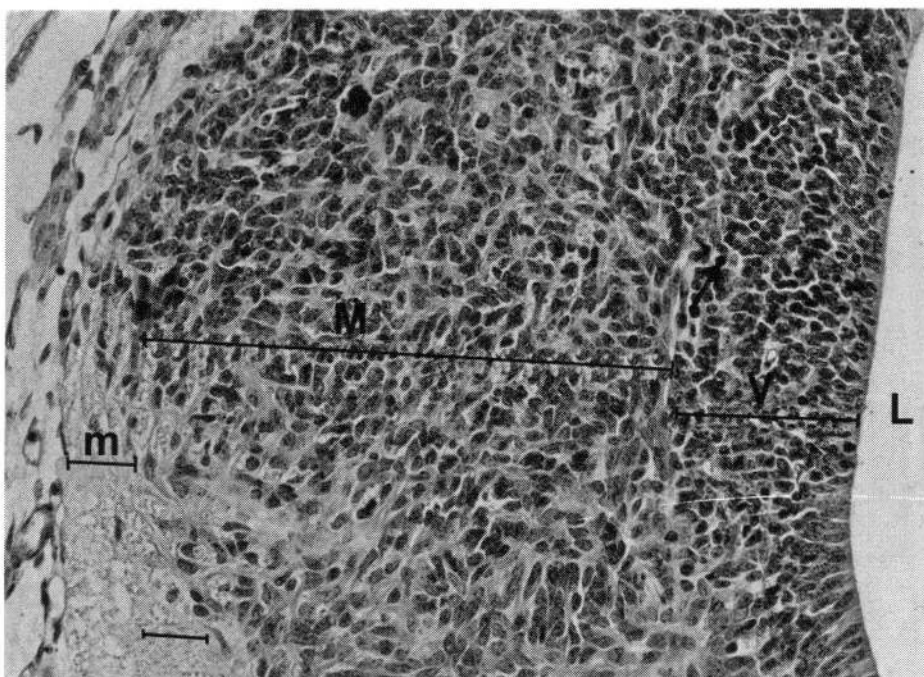
References

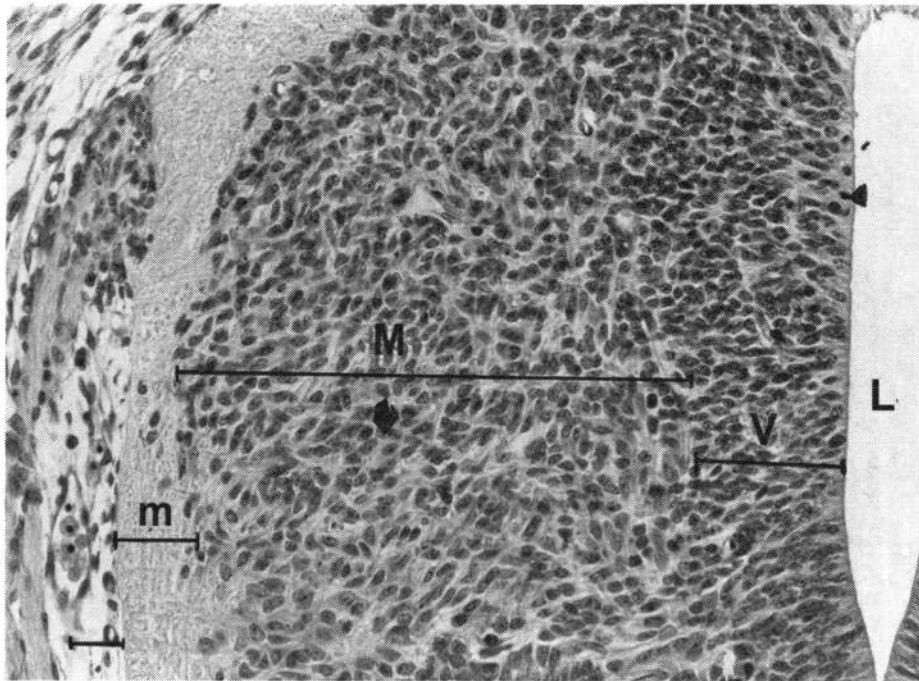
1. Reynolds JEF, Parfitt K, Parson SA. "Martindale the extra pharmacopoeia." 3rd edition, Williams & Wilkins Publisher. 1996, pp 1725-1727
۲. تیمبرل جان. مقدمه‌ای بر سم‌شناسی، تهران، اطلاعات ۱۳۷۶، صفحات ۵۲-۱۰
3. Federal. Register. Food and Drug Administration. 1998; 63(239): 68775-68777
۴. امید اشرافی، عباسعلی رضایی حسین. تکنیکهای هیستوپاتولوژی، جهاد دانشگاهی دانشگاه مشهد، ۱۳۶۸، صفحات ۸۰-۵۰
۵. کیت ال مور. تکامل جنینی انسان. ترجمه فاضل علی‌رضا، حبیبی هاله، فروغی مهنوش، کتابیران، ۱۳۷۱، صفحات ۶۰-۱۵
6. Deleu D, Hanssens Y, Salmy HS, Hastie I. Peripheral polyneuropathy due to chronic use of topical ammoniated mercury. J Toxicol Clin Toxicol. 1998; 36(3): 233-237
7. Loflenius A, Ekstrand J, Moller E. HgCl₂-induced human lymphocyte activation in vitro: a superantigenic mechanism. Int Arch Allergy Immunol. 1999; 120: 63-70
8. Bahia MDO, Demorium MI, Burbano RR, Vincent S, Dubeau H. Genotoxic effects of mercury on in vitro cultures of human cells. An Acad Bras Cienc. 1999; 71: 437-443
9. Hajime M, Masayuki Sh, Kazuko T, Yukio T. Rapid changes in concentration of essential elements in organs of rats exposed to methylmercury chloride and mercuric chloride as shown by simultaneous multielemental analysis. Brit J Indus Med 1991; 48: 382-388
۱۰. پریور کاظم، کوچصفهانی هما. روشهای تجربی بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، انتشارات الحسین، تهران ۱۳۷۴، صفحات ۲۳۴-۱۸۱
11. Duvall E, Myuie AH. Death and cell. Immunol Today 1986; 7: 115-116
12. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239-257
13. Skenker BJ, Datar S, Mansfield K, Shapiro IM. Induction of apoptosis in human T-cells by organomercuric compounds. A flow cytometric analysis. Toxicol Appl Pharmacol. 1997; 143: 397-406
14. Shenker BJ, Guo TL, Shapiro IM. Low-level methylmercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: Evidence of mitochondrial dysfunction. Environ Res. 1998; 77: 149-159
15. Nieminen AL, Gores GJ, Dawson TL, Herman B, Lemasters JJ. Toxic injury from mercuric chloride in rat hepatocytes. J Biol Chem 1990; 265(4): 2399-2408
16. Peter LG, Delma T, Jenifer R, AnneD. Mercuric chloride-induced apoptosis is dependent on protein synthesis. Toxicol Lett. 1999; 105: 183-195
17. Corcoran GB, Ray SD. The role of the nucleus and other compartments in toxic cell death produced by alkylating hepatotoxicants. Toxicol Appl Pharmacol 1992; 113: 167-183
18. Setton-Avruj CP. Is the increase in renal papillary phospholipid biosynthesis a protective mechanism against injury? Renal Failur. 1996; 19(1): 38-45
19. Bret L, Lule J, Alary C, Appolinaire-Pilipenko S, Pourrat JP, Fourine GJ. Quantitation of blood plasma DNA as an index of in vivo cytotoxicity. Toxicology. 1990; 61(3): 283-292
20. Bret L, Lule J, Pourrat JP, Fourine GJ. Extracellular DNA in blood and urine as a potential marker for cytotoxicity and nephrotoxicity in the mouse. Ren Fail 1990; 12(3): 133-139
21. Alison MR, Sarrap CE. Apoptosis: Regulation and relevance to toxicology. Hum Exp Toxicol. 1995; 14: 234-247
22. Pu M, Akhand AA, Kato M, Koike T, Hamaguchi M, Suzuki H, Nakashima I. Mercuric chloride mediates a protein sulfhydryl modification-based pathway of signal transduction for activation src kinase which is independent of the phosphorylation/dephosphorylation of a carboxyl terminal tyrosine. J Cell Biochem 1996; 63: 104-114



شکل ۱. لوله عصبی در گروه کنترل ۱. M: Mantle zone, m: marginal zone, V: Ventricular zone, L: Lumen. پیکان مرگ سلولی را نشان می‌دهد. رنگ آمیزی: H&E، بزرگنمایی: ۴۰۰×

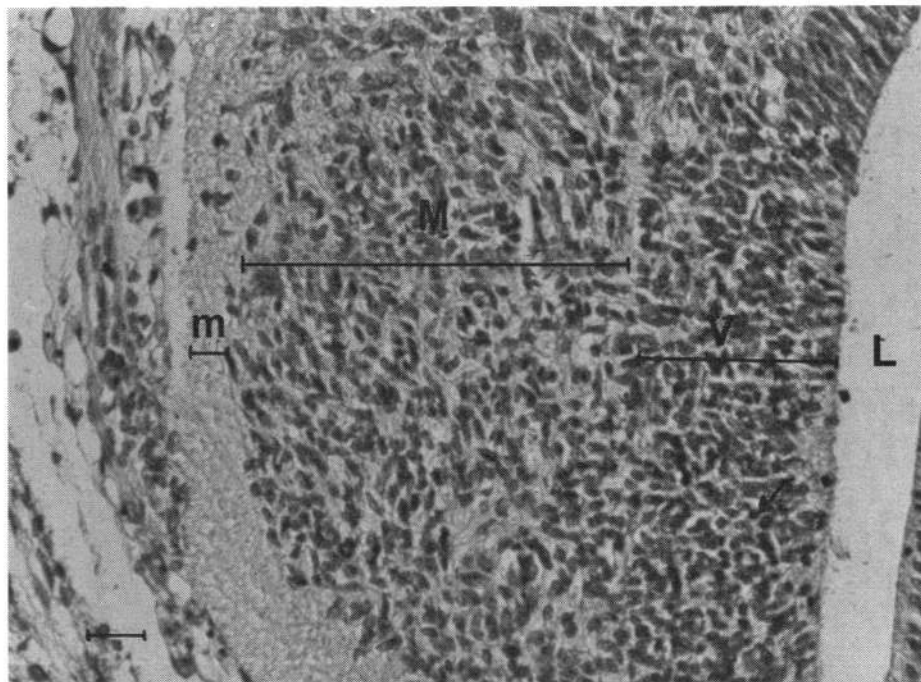
شکل ۲. لوله عصبی در گروه کنترل ۲. M: Mantle zone, m: marginal zone, V: Ventricular zone, L: Lumen. پیکان مرگ سلولی را نشان می‌دهد. رنگ آمیزی: H&E، بزرگنمایی: ۴۰۰×

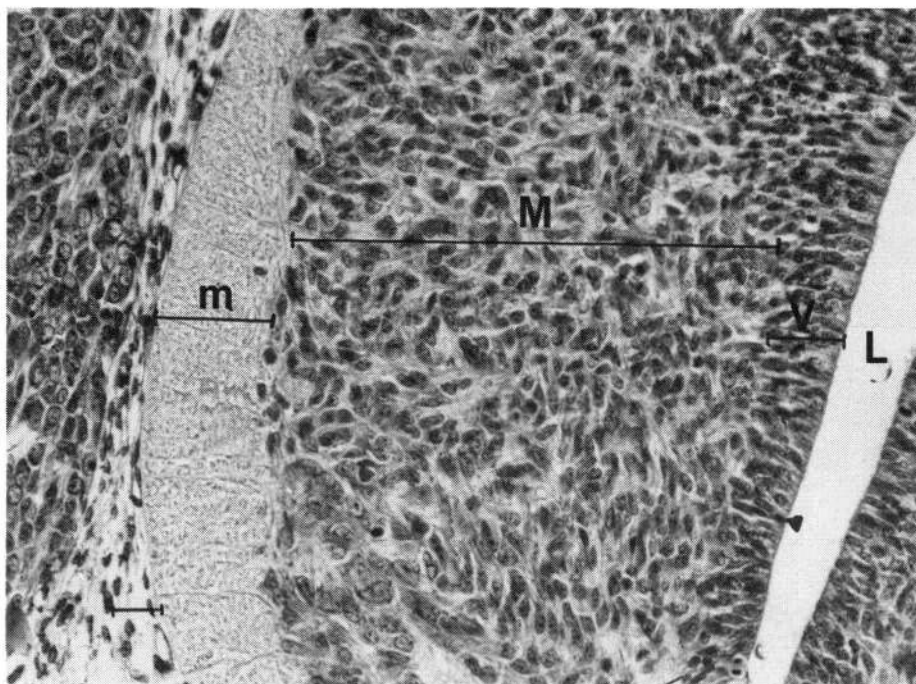




شکل ۳. لوله عصبی در گروه کنترل ۳. M: Mantle zone, m: marginal zone, V: Ventricular zone, L: Lumen. پیکان مرگ سلولی را نشان می‌دهد. رنگ آمیزی: H&E، بزرگنمایی: $\times 400$

شکل ۴. لوله عصبی در گروه تجربی ۱. M: Mantle zone, m: marginal zone, V: Ventricular zone, L: Lumen. پیکان مرگ سلولی را نشان می‌دهد. رنگ آمیزی: H&E، بزرگنمایی: $\times 400$





شکل ۵. لوله عصبی در گروه تجربی ۲. M: Mantle zone, m: marginal zone, V: Ventricular zone, L: Lumen. پیکان مرگ سلولی را نشان می‌دهد. رنگ آمیزی: H&E، بزرگنمایی: $\times 400$

شکل ۶. لوله عصبی در گروه تجربی ۳. M: Mantle zone, m: marginal zone, V: Ventricular zone, L: Lumen. پیکان مرگ سلولی را نشان می‌دهد. رنگ آمیزی: H&E، بزرگنمایی: $\times 400$

