

## بررسی تاثیر کلرید کادمیم بر روی رشد و نمو حلزون گوش داخلی جنین موش سوری

امراه روزی، محمدعلی اطلسی<sup>۱</sup>

## خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به میزان وسیع کادمیم در جوامع صنعتی و وجود آن در منابع غیرصنعتی همچون غذا و آب، نوشابه‌ها و سیگار و همچنین وجود گزارشاتی مبنی بر تاثیر تراژونیک آن، مطالعه‌ای جهت بررسی تاثیر کلرید کادمیم بر روی رشد و نمو حلزون گوش داخلی جنین موش سوری انجام گرفت.

مواد و روشها: پژوهش حاضر به روش تجربی بر روی ۳۰ موش سوری نژاد *balb/c* صورت گرفت. نمونه‌ها در سه گروه کنترل، آزمایشی I و آزمایشی II تقسیم گردیدند. به گروههای آزمایشی کلرید کادمیم محلول در آب مقطر به ترتیب با دوزهای  $2\text{mg/kg}$  و  $5\text{mg/kg}$  به صورت داخلی صفاقی در روز نهم بارداری تزریق گردید. گروه کنترل فقط آب مقطر دریافت کرد. در روز پانزدهم حاملگی ابتدا موشها را با اتر بیهوش کرده و بعد از خارج کردن جنینها در فیکسانو بون قرار داده شده و بعد از طی مراحل پاساژ بافت و تهیه قالبهای پارافینی از آنها مقاطع عرضی به صورت سریال تهیه گردید. نمونه‌ها با رنگ هماتوکسیلین و انورژین رنگ آمیزی شدند.

پس از بررسیهای مورفومتریک بخش های مختلف حلزون گوش داخلی، داده‌های خام به روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست شیف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: تراکم سطحی کل حلزون در گروه‌های آزمایشی I و II نسبت به گروه‌های کنترل کاهش معنی‌داری نشان دادند ( $P < 0.005$ ). تراکم سطحی عقده مارپیچی در گروه‌های آزمایشی I و II نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد (به ترتیب  $P < 0.01$  و  $P < 0.003$ ). اندازه عضو کورنی در گروه آزمایشی نسبت به گروه کنترل به میزان ۱۷/۸٪ کمتر از گروه مورد ( $P < 0.02$ ) بود. اختلاف اندازه‌های آن در گروه آزمایشی اول و کنترل به لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: کلرید کادمیم می‌تواند باعث ایجاد تغییرات دژنراتیو در حلزون گوش داخلی جنین موش سوری شود. پیشنهاد می‌گردد که ارتباط این نتایج با ناهنجاریهای لوله عصبی و نقص در شنوایی حیوان مورد مطالعه فرارگیرد.

واژگان کلیدی: کلرید کادمیم، حلزون، تراژون

۱-دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، گروه آناتومی

۲-دانشگاه علوم پزشکی کاشان، گروه آناتومی

## مقدمه

است که در صورت استفاده از کادمیم در زمان ارگانوژنز، تکامل لوله عصبی و اسکلت محوری تحت تاثیر قرار می‌گیرند (۱). در زمان ارگانوژنز از ضخیم شدن اکتودرم سطحی صفحه گوش و به دنبال آن وزیکول گوش شکل می‌گیرد. در ادامه این وزیکول بخشهای مختلف لایرنت غشایی از جمله حلزون گوش داخلی را شکل می‌دهد. مطالعات نشان می‌دهد که تبدیل شدن وزیکول گوش به لایرنت نرمال به القای لوله عصبی وابسته است، بنابراین در صورت آسیب به لوله عصبی می‌تواند وزیکول گوش تحت تاثیر قرار گیرد. اما مطالعات دیگری نشان داده است که با وجود نقص در لوله عصبی تکامل گوش طبیعی بوده است (۱). تاثیر کلرید کادمیم روی تکامل بخش سری لوله عصبی جنین موش بررسی گردید و نقش تراوتونیک آن در ایجاد تغییرات دژنراتیو گزارش گردید (۳). پژوهش کنونی در ادامه مطالعه مذکور، تاثیر تراوتونیک کلرید کادمیم را بر روی تکامل حلزون گوش داخلی به روش مورفومتریک مورد بررسی قرار می‌دهد.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق به روش تجربی بر روی ۳۰ سر موش نژاد (*balb/c*) صورت گرفت. موشهای نر و ماده به وزن ۲۴ تا ۳۵ گرم به نسبت یک موش نر با سه موش ماده در یک قفس و در شرایط مناسب (آب و غذای کافی، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) نگهداری شدند. مشاهده پلاک واژینال در صبح روز بعد نمایانگر عمل جفت‌گیری بود. روز مشاهده پلاک واژینال به عنوان روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد. در روز نهم حاملگی به موشهای حامله محلول کلرید کادمیم (۵۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ سانتیمتر مکعب آب

انسان در محیط اطراف خود در معرض فلزات سمی است. از جمله فلزات آلوده کننده محیط کادمیم است. استفاده گسترده از این فلز سنگین باعث تجمع آن در محیط شده است. انسانها از طریق غذا، آب، نوشابه‌ها و سیگار در معرض این فلز قرار می‌گیرند (۱). تاثیرات سمی آن بر روی ساختمانهای بدن در حیوانات آزمایشگاهی طی مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است. در سلولهای مختلف مغز، کلیه و کبد موش به عنوان یک ماده کارسینوژن باعث ایجاد نقایص ژنی شده است (۲). نشان داده شده است که ترکیب کلسیم - کالمودولین عامل آغازگر دوباره سازی *DNA* می‌باشد. در صورت وجود دوز بالای یون کادمیم، این فلز جانشین کلسیم گشته و ترکیب جدید کادمیم - کالمودولین باعث وقوع اشتباهاتی در دوباره سازی *DNA* می‌شود (۳). کادمیم در مقادیر زیادی می‌تواند باعث التهاب کبد (۴) و آسیب ساختمانی به آندوتلیوم قریه (۵) شده و از تکثیر و مهاجرت سلولهای آندوتلیال جلوگیری کرده و احتمالاً بدین طریق در پاتوژنز آتراسکلروز دخالت کند (۶). همچنین می‌تواند روند اسپرماتوژنیزس در مرد و وقایع قبل از لانه‌گزینی در زن را تحت تاثیر قرار دهد (۷). کادمیم به عنوان یک تراوتون نیز در مطالعات مختلفی گزارش شده است. در صورت وجود مقادیر زیاد کادمیم بخشی از آن با عبور از جفت در بدن جنین اثرات سمی خود را القا می‌کند. اثرات تراوتونیک کادمیم روی لوله عصبی، اندامها، عدسی، شبکیه و عصب بینایی، کلیه، سیستم اسکلتی و ناحیه جمجمه‌ای-صورتی گزارش شده است (۶،۳)، اما نقش تراوتونیک آن در انسان کاملاً روشن نیست. مطالعات روی موش نشان داده

## یافته‌ها

تعداد نمونه‌ها در هر کدام از گروه‌ها ۱۰ سر موش بود که متغیرهای مورد مطالعه عبارت بودند از: تراکم سطح کل حلزون، تراکم سطحی عقده ماریچی، قطر لایبرنت غشایی و اندازه عضو کورتی. در جدول ۱ نتایج پارامترهای مذکور در گروه‌های آزمایشی و کنترل ارائه گردیده است.

تراکم سطحی کل حلزون در گروه کنترل ۱۴۶/۹۵ بود و در گروه‌های آزمایشی این میزان کمتر شده بود به طوری که در گروه آزمایشی I، ۱۴۲ و در گروه آزمایشی II، ۱۴۱/۰۵ بود. با توجه به آنالیز آماری این کاهش در هر دو گروه نسبت به گروه کنترل معنی دار است ( $p < 0/05$ ).

تراکم سطحی عقده ماریچی در گروه کنترل ۱۰۲/۱ بود ولی در گروه آزمایشی اول، به ۹۴/۴ ( $p < 0/01$ ) و در گروه آزمایشی دوم به ۹۱ کاهش یافته بود ( $p < 0/003$ ).

قطر لایبرنت غشایی در گروه کنترل ۸/۸۵ است. این میزان در گروه آزمایشی I به ۸/۰۱ رسیده که این کاهش معنی دار نیست ( $p < 0/7$ ) همچنین در گروه آزمایشی II به ۷/۸۷ رسیده است که این میزان تفاوت، به لحاظ آماری معنی دار نبود (NS).

اندازه عضو کورتی در گروه کنترل ۶۷/۵۵ بود ولی در گروه آزمایشی I به ۶۳/۵۵ رسیده است که آنالیز آماری آن را معنی دار نشان نمی‌دهد ( $p < 0/2$ ). این عدد در گروه آزمایشی II به ۵۵/۴۵ رسیده است که به ۱۲/۱ واحد و یا حدود ۱۷/۸٪ کاهش نشان داد. آزمون آماری نشان داد که این میزان کاهش به لحاظ آماری معنی دار است ( $p < 0/02$ ).

مقطر) به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. گروه‌های مورد بررسی در این مطالعه شامل دو گروه آزمایشی I و II هر کدام با ۱۰ سر موش که به ترتیب ۳mg/kg و ۵ mg/kg محلول کلرید کادمیم دریافت کردند. موشهای گروه کنترل ۱۰ سر موش بودند که فقط ۱ mg/kg آب مقطر دریافت کردند.

در روز ۱۵ بارداری موشها ابتدا توسط اتر بیهوش شده و سپس با عمل سزارین جنینها همراه لوله رحمی از بدن موش خارج گردیدند و بلافاصله در سرم فیزیولوژی قرار داده شدند. در ادامه بعد از خارج کردن جنینها در فیکساتیو بونن قرار داده شدند. هفت جنین از هر گروه به صورت تصادفی انتخاب و بعد از طی مراحل پاساژ با استفاده از میکرونوم، مقاطع سه و پنج میکرونی به صورت سریال و عرضی از ناحیه سر به طرف دم تهیه گردید. بعد از چسباندن روی لام با رنگ‌آمیزی همتوکسیلین اتوزین نمونه‌ها رنگ شدند. جهت بررسیهای مورفومتری از قطعه چشمی مدرج (eye piece) استفاده گردید. به این صورت که ابتدا نواحی مربوط به حلزون روی لامهای تهیه شده از بخش سری جنین مشخص گردید، سپس برای اندازه‌گیری با استفاده از خطکش چشمی مدرج قطر لایبرنت غشایی و با استفاده از قطعه چشمی شطرنجی تراکم سطحی کل حلزون، عقده ماریچی و عضو کورتی (تراکم سطحی کل حلزون با بزرگنمایی ۱۰۰، تراکم سطحی عقده ماریچی، اندازه عضو کورتی و قطر لایبرنت غشایی با بزرگنمایی ۴۰۰) اندازه‌گیری شد. داده‌های خام با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست شیفت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**جدول ۱: میزان پارامترهای مورفومتریک حلزون گوش داخلی برحسب مقادیر مختلف محلول کلرید کادمیم.**

شاخص ها	تراکم سطحی کل حلزون	تراکم سطحی عقده ماریچی	قطر غشایی لایرنت	اندازه کورتی	عضو
محلول کلرید کادمیم نداشته (کنترل $n=10$ )	$146/9 \pm 6/1$	$102/1 \pm 5/2$	$8/85 \pm 1/35$	$67/5 \pm 18/2$	
$3 \text{ Mg/kg}$ (آزمایشی اول $n=10$ )	$142 \pm 5/1$	$94/4 \pm 5/3$	$8/01 \pm 0/74$	$63/6 \pm 17/4$	
$5 \text{ Mg/kg}$ (آزمایشی دوم $n=10$ )	$141/1 \pm 7/3$	$91 \pm 5/2$	$7/87 \pm 1/17$	$55/5 \pm 5/7$	

**بحث**

تحقیق نشان داد که کلرید کادمیم می‌تواند پارامترهای مورفومتریک حلزون گوش داخلی را تحت تاثیر قرار دهد. این کاهش با افزایش دوز بیشتر بوده و نمایانگر ایجاد تغییرات دژنراتیو در حلزون گوش داخلی است. نتایج بررسیهای مختلف نشان می‌دهد که در اثر تجویز کادمیم در زمان ارگانوژنز علاوه بر مغز، گوش خارجی، میانی و داخلی جنین موش دچار ناهنجاری شده‌اند. در مطالعه عربی، نشان داده شد که در اثر تجویز کادمیم با دوزهای  $3 \text{ mg/kg}$  و  $5 \text{ mg/kg}$  در روز نهم دوران بارداری در موش، نقص بخش سری لوله عصبی به همراه نقایص شدید اندامها، عدسی و شبکیه مشاهده شده است، اما گزارشی از درگیری گوش مطرح نگردید (۳). در مطالعه حاضر تکامل حلزون در جنین موش در اثر تجویز کلرید کادمیم با دوزهای  $3 \text{ mg/kg}$  و  $5 \text{ mg/kg}$  مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که به شکل معنی‌داری تغییرات مورفومتریک در آن دیده می‌شود. مطالعات تجربی در دوزستان و پرندگان نشان داده است که تمایز طبیعی وزیکول گوش و وابسته به تاثیر و تحریک لوله عصبی است. در بررسیهای دیگری که در سالهای بعد انجام گرفت. با ایجاد نقص در لوله عصبی جنین موش لایرنت غشایی گوش داخلی به طور غیرطبیعی تکامل پیدا کرد (۱). در مطالعه حاضر تزریق کادمیم در روز نهم

بارداری صورت گرفت، با توجه به اینکه انتهای سری لوله عصبی در جنین موش در همین روز بسته می‌شود و اوتریکول، ساکول، مجاری نیمدایره‌ای، جسم کورتی و بقیه اجزای گوش داخلی در روزهای یازدهم تا چهاردهم، رشد و تمایز قابل ملاحظه‌ای می‌یابند، بنابراین می‌توان انتظار داشت که کادمیم با دوز بالا بتواند بر شکل‌گیری اجزای گوش داخلی تاثیر گذاشته و ایجاد ناهنجاری نماید. ضمن اینکه نقص در لوله عصبی در این جنینها بسیار محتمل است. در گزارشی که با وجود عدم نقص در لوله عصبی ناهنجاریهای گوش، وجود داشته است، این ناهنجاریها با شدت کمتری گزارش شده است. در این مطالعات ناهنجاری در گوش اثر مستقیم کادمیم روی تکامل اجزای گوش اعلام گردیده است (۱،۲).

مطالعه حاضر نتایج تحقیق *Padmanabhan* را مورد تأیید قرار می‌دهد. در مطالعه مذکور با تجویز کلرید کادمیم حلزون و جسم کورتی جنین موش غیرمتمايز باقی ماندند و عقده ماریچی سلولهای کمتری را نسبت به گروه کنترل داشتند (۱).

در مطالعه ما شدت تغییرات پارامترها در حلزون گوش با دوز  $5 \text{ mg/kg}$  بیشتر از دوز  $3 \text{ mg/kg}$  بود و در مورد قطر لایرنت غشایی و اندازه عضو کورتی با دوز  $3 \text{ mg/kg}$  تغییرات نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود. در صورت پایین بودن میزان کادمیم، این یون با اتصال به پروتئینهایی به نام

تعمیر معنی‌دار پیدا کرده و بررسیهای میکروسکوپ الکترونی از دست رفتن گسترده سلولهای مویی حلزون را نشان داد (۵). این مطالعات نشان می‌دهد که کادمیم در شرایط ویژه‌ای باعث آسیب به سیستم شنوایی می‌شود. با توجه به اینکه در مطالعه ما تنها تغییرات مورفولوژی حلزون گوش داخلی مورد بررسی قرار گرفت و این تغییرات معنی‌دار بود، پیشنهاد می‌گردد در مطالعات دیگری همزمان تغییرات شنوایی حیوان نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین برای اثبات نقش کلرید کادمیم در ایجاد همزمان نقص در تکامل لوله عصبی و نقص در اجزای گوش از جمله حلزون گوش داخلی می‌توان این تغییرات را همزمان و در ارتباط با یکدیگر مورد بررسی قرار داد.

متالوتونین در سیتوزول محبوس شده و از اثرات سمی آن جلوگیری می‌شود اما در صورت حضور مقادیر زیاد کادمیم بخشی از آن با عبور از جفت در بدن جنین اثرات سمی خود را القا می‌کند (۳). *Padmanabhan* نشان داد کلرید کادمیم با دوز  $4-6 \text{ mg/kg}$  علاوه بر انسفال، عدم تمایز در حلزون، جسم کورتی و عقده ماریچی مشاهده می‌شود (۱). به نظر می‌رسد این دوز با نقص در لوله عصبی، حلزون را هم دچار ناهنجاری می‌کند. *Whitworth* و همکاران در ۱۹۹۹ تأثیر کادمیم را روی شنوایی رت مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که استفاده از کلرید کادمیم با دوز  $5 \text{ mg/kg}$  باعث تغییرات معنی‌داری در آستانه پاسخهای شنوایی ساقه مغز نمی‌شود، در حالی که با استفاده از ترکیب کلرید کادمیم و فوروزماید آستانه پاسخها

#### Reference:

1. *Padmanabhan R. Abnormalities of the ear associated with exencephaly in mouse fetuses induced by maternal exposure to cadmium. Teratology 1987; 35: 9-18.*
2. *Latimwo. LMB., Ikediobi. CO., Singh. NP., Spinholtz. G., Fasanya. C., Riley. L., Comparative studies of in vivo genotoxic effects of cadmium chloride in rat brain, Kidney and liver cell. Cell, Mol, Biol, Le, Grand 1997; 43(2): 203-210.*
3. عربی ذ. بررسی تأثیر کلرید کادمیم بر رشد و نمود ناحیه کراتیال لوله عصبی جنین موش کوچک آزمایشگاهی، پایان نامه کارشناسی ارشد. ۱۳۷۹.
4. *Sauer. JM., Waalk. MP., Hooser. SB., Kuester. RK., McQueen. CA., Sipex. IG. Suppression of kupffer cell function prevents cadmium induced hepatocellular necrosis in the male Sprague, Dawley rat. Toxicology. 1997; 15,121(2): 155-164.*
5. *Whitworth. CA., Hudson. TE., Rybak. LP. The effect of combined administration of cadmium and furosemide on auditory function in the rat. Hear-Res. 1999; 129(1-2): 61-70.*
6. *Hovland. DN Jr., Machado. AF., Scott. WJ Jr., Collins. Md. Differential sensitivity of the SWV and C57BL/6 mouse strains to the teratogenic action of*

*single administrations of cadmium-given throughout the period of anterior neuropore closure. Teratology. 1999; 60(1): 13-21.*

7. Dalton, T., FU, K., Enders, GC., Palmitr, RD., Andrews, GK., *Analysis of the drrects over expression of metallothionein, I in transgenic mice on the reproductive toxicology of cadmium. Environ. Health Perspect. 1996; 104(1): 68-78.*