دانشگاه فردوسی مشهد

گروه زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی گرایش سلولی تکوینی

عنوان:

مطالعه رادیوگرافیک و هیستومورفومتریک اثر سم دیازینون و مکمل ویتامین D بر بافت استخوان و پلاک رشد موش صحرایی

استادان راهنما

دکتر رویا لاری

دکتر ناصر مهدوی شهری

استاد مشاور

دکتر مرتضی بهنام رسولی

پژوهش و نگارش

مهدیه بزمی

زمستان ۱۳۹۲

سپاس و ستایش خداوندی را سزاست که کسوت هستی را بر اندام موزون آفرینش بپوشانید و تجلیات قدرت لایتزالی را در مظاهر و آثار طبیعت نمایان گردانید. بار الها ! من با یاد تو، به تو تقرّب می جویم و تو را به پیشگاه تو شفیع می آورم و از تو خواستارم به کرمت، مرا به خودت نزدیک گردانی و یاد خود را به من الهام کنی و بر من رحمت آوری و به آنچه بهره و نصیب من ساخته ای، خشنودم قرار دهی و در همه حال به فروتنی ام وا داری,

و با سپاس از اساتید محترم سرکار خانم دکتر رویا لاری و جناب آقای دکتر ناصر مهدوی شهری که زحمت راهنمایی این رساله را به عهده گرفتند.

و با تشکر از مساعدت جناب آقای دکتر مرتضی بهنام رسولی که زحمت مشاوره این رساله را متقبل شدند.

باشد که این خرد ترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

و

تقدیم به مادر مهربان و دلسوزم

به پاس بودنش

فهرست مطالب

چکیده X

علائم اختصاری IXI

مقدمه و اهداف II

فصل اول: کلیات

۱-۱ بافت‌شناسی و آناتومی غضروف ۲

۱-۱-۱سلول ها ۲

۱-۱-۲ ماده زمینه ۲

۱-۱-۳ رشته‌ها ۳

۱-۲ انواع غضروف‌ها ۳

۱-۳ بافت‌شناسی و آناتومی استخوان ۵

۱-۳-۱ سلول‌ها ۵

۱-۳-۱-۱ سلول‌های اجدادی استخوان ۵

۱-۳-۱-۲ استئوبلاست ها ٦

۱-۳-۱-۳ استئوسیت ها ٦

۱-۳-۱-٤ استئوکلاست ها ٦

۱-۳-۲ ماده زمینه‌ای ۸

۱-۳-۳ رشته‌ها ۹

۱-٤ تقسیم‌بندی انواع استخوان ۹

۱-٤-۱ استخوان اسفنجی ۱۰

۱-٤-۲ استخوان متراکم ۱۰

۱-٤-۲-۱ تیغه‌های محیطی خارجی ۱۲

۱-٤-۲-۲ تیغه‌های محیطی داخلی ۱۲

۱-٤-۲-۳ تیغه‌های بینابینی ۱۲

۱-۵ استخوان سازی ۱۳

۱-۵-۱ استخوانسازی درون غشایی ۱۳
۱-۵-۲ استخوان سازی درون غضروفی ۱٤
۱-۵-۳ استخوان ران ۱۵
۱-٦ پلاک رشد ۱۷
۱-٦-۱ ناحیه ذخیره ای یا رزرو ۱۸
۱-٦-۲ ناحیه تقسیم یا پرولیفراتیو ۱۹
۱-٦-۳ ناحیه بلوغ سلولی و هایپرتروفی ۱۹
۱-٦-٤ ناحیه دژنرسانس و کلسیفیکاسیون ۱۹
۱-٦-۵ ناحیه استخوانی شدن ۱۹
۱-۷ تراکم معدنی استخوان ۲۰
۱-۸ پوکی استخوان ۲۳
۱-۸-۱ علل ایجاد پوکی ۲۳
۱-۸-۲ درمان پوکی استخوان ۲٤
۱-۹ تکنیک رادیو گرافی ۲٤
۱-۱۰ دیازینون ۲۵
۱-۱۰-۱ راه‌های ورود به محیط ۲٦
۱-۱۰-۲ راه‌های ورود به بدن و دفع ۲٦
۱-۱۰-۳ متابولیسم ۲۷
۱-۱۰-٤ مکانیسم عمل ۲۸
۱-۱۰-٤-۱ آثار کولینرژیک ۲۸
۱-۱۰-٤-۲ دیازوکسون ۲۸
۱-۱۰-٤-۲-۱ نقش متابولیت اکسونی دیازینون (دیازوکسون) در ارگانیسم در حال رشد ۲۹
۱-۱۰-٤-۳ آثار غیرکولینرژیک ۲۹
۱-۱۰-۵ اثر دیازینون بر بافت‌های مختلف ۳۱
۱-۱۰-۵-۱ اثر دیازینون بر گنادها ۳۱
۱-۱۰-۵-۲ اثر دیازینون بر ارگانوژنز غضروف و استخوان ۳۲

۱-۱۰-۵-۳ اثر بر سیستم عصبی ۳۳
۱-۱۰-۵- ٤ اثر بر کلیه و کبد ۳۳
۱-۱۰-۵-۵ دیازینون و ابتلا به دیابت ۳٤
۱-۱۱ کلسیم ۳٤
۱-۱۲ ویتامین D (کلسیفرول) ۳۵
۱-۱۲-۱ جذب، انتقال، ذخیره ۳۷
۱-۱۲-۲ متابولیسم ۳۸
۱-۱۲-۳ نقش ٤۱
۱-۱۲-٤ اندازه گیری ٤۳
۱-۱۲-۵ مقدار مجاز خوراکی توصیه شده ٤٤
۱-۱۲-٦ منابع غذایی ٤۵
۱-۱۲-۷ کمبود ویتامین D ٤۵
۱-۱۲-۷-۱ راشیتیسم ٤٦
۱-۱۲-۷-۲ استئومالاسی ٤٦
۱-۱۲-۸ مسمومیت ٤۷
۱-۱۳ سوابق پژوهشی ٤۷
۱-۱٤ اهداف پژوهش ۵۲

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱ فهرست وسایل مورد استفاده در این پژوهش ۵٤
۲-۲ فهرست مواد مورد استفاده در این پژوهش ۵٤
۲-۳ انتخاب و گروه بندی حیوانات آزمایشگاهی (موش صحرایی) ۵۵
۲-٤ تهیه مواد و محلول های مورد استفاده ۵۵
۲-٤-۱تهیه محلول دیازینون ۵۵
۲-٤-۲ تهیه محلول ویتامین D ۵٦
۲-٤-۳ تهیه محلول کلسیم ۵٦
۲-٤-٤ تهیه محلول سولفات سدیم ۵٪ ۵۷

۲-۵ تزریق ها ۵۷
۲-٦ نمونه گیری ۵۷
۲-۷ بررسی های رادیوگرافی ۵۸
۲-۷-۱ بررسی توسط نرم افزار Image J ۵۸
۲-۸ مطالعات بافت شناسی ۵۹
۲-۸-۱ تثبیت بافت ۵۹
۲-۸-۲ تهیه محلول نرم کننده و دکلسیفیکاسیون ۵۹
۲-۸-۳ رفع اثر اسید نیتریک ٦۰
۲-۸-٤ رفع اثر سولفات سدیم ٦۰
۲-۸-۵ آب گیری ٦۰
۲-۸-٦ شفاف سازی ٦۰
۲-۸-۷ آغشتگی با پارافین ٦۱
۲-۸-۸ قالب گیری ٦۱
۲-۸-۹ تهیه مقاطع بافتی ٦۱
۲-۸-۹-۱ ژلاتینه کردن لام ها ٦۱
۲-۸-۹-۲ برش گیری ٦۱
۲-۸-۱۰ رنگ آمیزی ٦۲
۲-۸-۱۰-۱ رنگ آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین ٦۲
۲-۸-۱۰-۲ تهیه ائوزین الکلی ٦۲
۲-۹ روش بررسی آماری ٦۳
۲-۱۰ روش تحلیل آماری داده‌ها ٦۵

فصل سوم: نتایج

۳-۱ بررسی تغییرات تراکم معدنی استخوان با روش رادیوگرافی ٦۷
۳-۱-۱ بررسی تراکم معدنی استخوان جمجمه ٦۷
۳-۱-۲ بررسی تراکم معدنی استخوان ران ٦۸
۳-۱-۲-۱ بررسی تراکم معدنی ناحیه سر (Head) استخوان ران ٦۸

۳-۱-۲-۲ بررسی تراکم معدنی گردن (Neck) استخوان ران ۷۰
۳-۱-۲-۳ بررسی تراکم معدنی کل ران (Total) ۷۱
۳-۲ بررسی تغییرات مساحت و محیط تیغه های استخوانی با تکیه بر مطالعات هیستومورفومتریک ۷۲
۳-۲-۱ مطالعه هیستومورفومتریک تغییرات مساحت تیغه های استخوانی به کمک رنگآمیزی هماتوکسیلین - ائوزین و نرم افزار Image J ۷۳
۳-۲-۲ مطالعه هیستومورفومتریک تغییرات محیط تیغه های استخوانی به کمک رنگآمیزی هماتوکسیلین - ائوزین و نرم افزار Image J ۷۶
۳-۳ بررسی تغییرات غضروف پلاک رشد اپیفیزی با تکیه بر مطالعات هیستومورفومتری ۷۷
۳-۳-۱ بافت شناسی پلاک رشد ۷۷
۳-۳-۲ بررسی هیستومورفومتریک تغییرات پلاک رشد به کمک رنگآمیزی هماتوکسیلین - ائوزین و نرم افزار Image J ۷۸
۳-۳-۳ بررسی هیستومورفومتریک نواحی مختلف پلاک رشد ۸۱
۳-۳-۳-۱ بررسی هیستومورفومتریک پهنای ناحیه در حال تکثیر پلاک رشد ۸۱
۳-۲-۳-۱ بررسی هیستومورفومتریک پهنای ناحیه هایپرتروفی پلاک رشد ۸۱

فصل چهارم: نتیجه گیری

٤-۱ نتیجه گیری حاصل از داده های رادیوگرافی ۸٤
٤-۱-۱ اثر دیازینون بر تغییرات تراکم معدنی بافت استخوان ۸٤
٤-۱-۲ اثر ویتامین D بر بهبود و ممانعت از آسیب وارده ۸٦
٤-۲ نتیجه گیری حاصل از داده های بافت شناسی ۸۹
٤-۲-۱ اثر دیازینون بر تیغه های استخوانی ۸۹
٤-۲-۱-۱ اثر ویتامین D در بهبود و ممانعت از آسیب وارده ۹۰
٤-۳-۱ اثر دیازینون بر پهنای پلاک رشد و نواحی در حال تکثیر و هایپرتروفی پلاک رشد ۹۱
٤-۳-۱-۱ اثر ویتامین D در بهبود و ممانعت از آسیب وارده ۹۲
نتیجه گیری ۹۵
پیشنهادها ۹۵
منابع ۹۸

فهرست تصاویر

۱-۱. فتومیکروگراف غضروف شفاف ٤

۱-۲. فتومیکروگراف سلول های استخوانی ۷

۱-۳. فتومیکروگراف از استخوان اسفنجی ۱۰

۱-٤. فتومیکروگراف از استخوان متراکم ۱۱

۱-۵. یک استئون، با کانال مرکزی (C)، لاکونای اووسیتی (O) و پروسه های استئوسیتی درون کانالیکول ۱۱

۱-٦. (A) حفرات جذب شده در مراحل مختلف پر شدن در استخوان کورتیکال ۱۱

۱-۷. فتومیکروگراف استخوان سازی درون غشایی ۱٤

۱-۸. دیاگرام شماتیک از رشد طولی استخوان دراز طی استخوانی شدن اندوکوندرال ۱۵

۱-۹. ساختار استخوان فمور ۱٦

۱-۱۰. فتومیکروگراف از روند رشد طولی استخوان‌ها به واسطه غضروف رشد ۱۸

۱-۱۱. نواحی مختلف غضروف پلاک رشد و استخوانی شدن درون غضروفی ۲۰

۱-۱۲. ساختار مولکولی دیازینون ۲٦

۱-۱۳. مسیر بیوسنتز دیازینون. ۲۷

۱-۱٤. ساختار مولکولی دیازوکسون. ۲۹

۱-۱۵. متابولیسم ویتامین D ۳۰

۱-۱٦. متابولیت های ویتامین D ٤۱

۱-۱۷. محل‌های ممکن برای عمل آنابولیک و کاتابولیک ویتامینD ٤۳

۲-۱. گاواژ محلول های مورد نظر به حیوان. ۵۷

۲-۲. نمونه گیری از حیوانات ۵۸

۲-۳. رادیوگراف های تهیه شده ازاستخوانهای ران و جمجمه ۵۸

۲-٤. محل های انتخاابی برای سنجش تراکم استخوان ٦٤

۲-۵. سه ناحیه انتخابی برای سنجش میانگین پهنای پلاک رشد. ٦٤

۲-٦. بررسی مساحت و محیط تیغه های استخوانی. ٦۵

۳-۱. نمایش رادیوگراف استخوان جمجمه موش صحرایی ٦۷

۳-۲. نمایش رادیوگراف استخوان ران موش صحرایی ٦٩
۳-۳. نمایش رادیوگراف استخوان ران موش صحرایی ٦٩
۳-٤. نمایش رادیوگراف استخوان ران موش صحرایی ۷۱
۳-۵. نمایش تیغه های استخوانی ناحیه اپیفیز تحتانی با رنگآمیزی هماتوکسیلین – ائوزین ۷۳
۳-٦. مقاطع بافتی تیغه های استخوانی ناحیه اپیفیز ران ۵۷
۳-۷. نمایش پلاک رشد اپیفیز تحتانی ران موش صحرایی و نواحی مختلف آن، با رنگآمیزی H&E ۷٦
۳-۸. نمایش غضروف پلاک رشد اپیفیز ران موش صحرایی با رنگآمیزی H&E ۷۷
۳-۹. مقاطع بافتی پلاک رشد اپیفیزی و نواحی در حال تکثیر و هایپرتروفی ۷۸

فهرست نمودارها

۳-۱. میانگین تراکم معدنی استخوان جمجمه در گروه های مورد آزمایش ٦۸
۳-۲. میانگین تراکم معدنی ناحیه سر استخوان ران ٦۹
۳-۳. میانگین تراکم معدنی ناحیه گردن استخوان ران ۷۱
۳-٤ میانگین تراکم معدنی کل استخوان ران ۷۲
۳-۵. میانگین تغییرات مساحت تیغه های استخوانی در نمونه های مورد آزمایش ۷۵
۳-٦. میانگین تغییرات محیط تیغه های استخوانی در نمونه های مورد آزمایش ۶۷
۳-۷. میانگین پهنای پلاک رشد در گروه های مورد آزمایش ۷۷
۳-۸. میانگین پهنای ناحیه در حال تکثیر پلاک رشد در گروه های مورد آزمایش ۷۸
۳-۹. میانگین پهنای ناحیه هایپرتروفی پلاک رشد در گروه های مورد آزمایش ۸۰

چکیده

مطالعه رادیوگرافیک و هیستومورفومتریک اثر سم دیازینون و مکمل ویتامین D بر بافت استخوان و پلاک رشد موش صحرایی

مقدمه و اهداف: استخوان بافت سختی است که محتوی آن مرتباً در حال تغییر و تحول می‌باشد. رشد طولی استخوان بواسطه‌ی پلاک رشد صورت می‌گیردکه ساختاری غضروفی در انتهای استخوان‌های دراز بدن می‌باشد. هنگام بلوغ جنسی، ضمن بسته پلاک رشد، رشد طولی استخوان متوقف می‌گردد. دیازینون از سموم ارگانوفسفره است که ضمن ایجاد استرس اکسیداتیو می‌تواند به سلول‌ها و بافت‌های بدن آسیب برساند. با توجه به پویائی و فعال بودن، بافت استخوان و پلاک رشد مدل‌های مناسبی برای بررسی اثر سم دیازینون بر تکوین و رشد استخوان می‌باشند. هدف این مطالعه بررسی اثر سم دیازینون بر تغییرات تراکم معدنی استخوان، تغییرات محیط و مساحت تیغه‌های استخوانی و تغییرات پلاک رشد در موش صحرایی نابالغ می‌باشد، در ضمن اثر بهبود دهندگی مکمل ویتامین D بر تقلیل آسیب احتمالی ایجاد شده نیز بررسی می‌گردد.

مواد و روش‌ها: تحقیق بر روی ۳۰ سر موش صحرایی نر نابالغ از نژاد ویستار که به‌طور تصادفی در پنج گروه کنترل، دیازینون، ویتامین D، ویتامین D+ دیازینون، ویتامین D+ دیازینون+ کلسیم قرار گرفتند انجام شد. تیمارها به‌صورت گاواژ دهانی و طی ۲۸ روز انجام شد. در روز ۲۸، بعد از ترحم کشی حیوانات، جمجمه و استخوان ران برای بررسی‌های رادیوگرافیک و هیستومورفومتریک جدا شدند. بررسی‌ها توسط نرم‌افزار Image J و معنادار بودن نتایج توسط آنالیز واریانس ANOVA به‌همراه تست توکی انجام شد.

یافته‌ها: کاهش معنادار تراکم معدنی جمجمه ($P<۰/۰۰۱$)، بخش سر ($P<۰/۰۵$) و گردن ($P<۰/۰۱$) استخوان ران، همچنین کاهش معنادار مساحت ($P<۰/۰۱$) و محیط ($P<۰/۰۵$) تیغه‌های استخوانی در گروه دیازینون نسبت به کنترل مشاهده شد. پهنای پلاک رشد در گروه دیازینون نسبت به کنترل کاهش معنادار ($P<۰/۰۱$) داشت که به‌صورت کاهش پهنای ناحیه در حال تکثیر ($P<۰/۰۰۱$) و افزایش پهنای ناحیه هایپرتروفی ($P<۰/۰۵$) مشاهده شد. مصرف ویتامین D همراه دیازینون، توانست کاهش تراکم را در نواحی سر ($P<۰/۰۰۱$) و گردن اسنخوان ران ($P<۰/۰۵$) جبران کند و اثرش بر جمجمه ($P<۰/۰۰۰۱$) و کل استخوان ران ($P<۰/۰۱$) در مصرف همراه با کلسیم معنادار شد، همچنین مساحت ($P<۰/۰۵$) و محیط ($P<۰/۰۵$) تیغه‌ها را افزایش داد و پهنای ناحیه هایپرتروفی ($P<۰/۰۰۰۱$) پلاک رشد را بهبود بخشید اما بر کل پلاک رشد و ناحیه در حال تکثیر اثر معناداری نداشت.

نتیجه: دیازیون چگالی معدنی استخوان را کاهش داد وهمچنین آثار مخربی بر غضروف صفحه رشد اپیفیزی گذاشت. ویتامین D این نقص‌ها را بهبود بخشید و آثارش در مصرف همراه کلسیم بیشتر شد.

واژه‌های کلیدی: بافت استخوان، پلاک رشد، استئوژنز، دیازینون، استرس اکسیداتیو، ویتامین D، موش صحرایی.

علائم اختصاری

POC: Primary Ossification Center

SOC: Secondary Ossification center

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

DEXA: Dual Energy X-ray Absorptiometry

Vit D: Vitamin D

VDR: Vitamin D Receptor

D3: Cholecalciferol

1,25(OH)2D3: Calcitriol

24,25(OH)2D3: Ercalcitriol

DBP: D Binding Protein

CYP27B: 25-hydroxyvitaminD-1αhydroxylase

OPG: Osteoprotegerin

IU: International Unit

DRI: Dietary Reference Intake

ULs: Upper Intake Levels

TRAP: Tartarate-resistent acid phosphatase

OCT: Maxacalcitol

DZ: Diazinon

DZO: Diazoxon

ROS: Reactive Oxygen Species

PBM: Bone mineral density

LD: Lethal Dose

PON1: Paraoxonase

SOD: Superoxide dismutase

CAT: Catalase

GSH: Glutathione

TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances

NAD: Nicotin Amid adenine Dinucleotide

MDA: Malondialdehyde

PTH: Para Tiroeid Hormone

IGF- I: Insulin Like Growth Factor I

RANKL: Receptor for Activation of Nuclear factor Kappa-b

MCSF: Macrophag Colony Stimulating Factor

مقدمه و اهداف

بافت استخوانی بافتی فوق‌العاده فعال و دینامیک می‌باشد که ساختمان میکروسکوپیک درونی آن به‌طور مداوم در حال تغییر است. کاهش توده استخوانی[1] و از هم گسیختگی ریزساختار استخوان، به کاهش استقامت استخوان و افزایش خطر شکستگی منجر می‌گردد. کاهش تراکم استخوان که شامل ماتریکس و مواد معدنی می‌شود اساساً در نتیجه پیر شدن طبیعی ایجاد می‌شود اما می‌تواند در اثر عوامل مختلف، تسریع و یا شدت یابد (۱).کاهش تراکم معدنی استخوان، یک فاکتور خطر اصلی برای شکستگی‌ها شناخته شده است. گرچه طبق آنالیزهایی که روی دوقلوها صورت گرفته، یک اثر ژنتیکی غالب بر گوناگونی تراکم استخوانی وجود دارد، اما اثر و اهمیت محیط در کاهش تراکم و افزایش خطر شکستگی را نباید نادیده گرفت (۲).

رشد طولی استخوان نتیجه تکثیر و تمایز کندروسیتی در صفحات رشد اپیفیزی استخوان‌های دراز است که با فاکتورهای ژنتیکی، هورمونی، فاکتورهای رشد، محیط و تغذیه تنظیم می‌شود. همراه با بلوغ جنسی، صفحات رشد بسته شده و رشد طولی استخوان پایان می‌یابد (۳). اخیراً گزارش شده که در موش‌ها صفحات رشد برای یک دوره طولانی باز می‌ماند حتی بعد از بلوغ جنسی و شاید در سراسر طول عمر طبیعی حیوان (۴, ۵).

ترکیبات ارگانوفسفره ترکیبات سمی هستند که به‌طور وسیع به‌عنوان آفت‌کش و حشره‌کش در کشاورزی، صنعت و باغبانی استفاده می‌شوند (۶). دیازینون از رایج‌ترین این سموم است که برای کنترل حشرات و آفات در خاک، گیاهان زینتی، میوه‌ها و سبزیجات مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷). مکانیسم عمل این ترکیب به این صورت است که با فسفریلاسیون اسیدآمینه سرین در جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز باعث مهار آنزیم شده که تجمع استیل کولین در سیناپس‌های کولینرژیک و وقوع بحران کولینرژیک را به دنبال دارد (۸). این ترکیب پس از ورود به محیط، در تماس با بدن و عمدتاً از طریق پوست، چشم، تنفس و بلع می‌تواند وارد بدن شود. دیازینون در بدن علاوه بر ایجاد عوارض مختلف عصبی و هورمونی، با ورود به کبد و تحت تأثیر آنزیم‌های کبدی به متابولیت فعال‌تر خود یعنی دیازوکسون تبدیل می‌شود که آثار شدیدتری به جا می‌گذارد (۹). بسیاری از اثرات سم دیازینون ارتباطی به مهار آنزیم استیل کولین استراز نداشته، بلکه توسط مکانیسم‌های دیگر سلولی القاء می‌شود. یکی از مکانیسم‌هایی که بسیار مورد توجه قرارگرفته است، تولید رادیکال‌های آزاد توسط این ترکیب و به دنبال آن تغییر در سیستم آنتی اکسیدان سلول و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌باشد (۱۰). به‌طور طبیعی طی متابولیسم بدن، گونه‌های فعال اکسیژن[2] (ROS) تشکیل می‌گردد که قادرند با ماکرومولکول‌های مهم بدن نظیر

[1] Bone mineral density (PBM)
[2] Reactive Oxygen Species (ROS)

لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش دهند. در شرایط طبیعی بین تولید و حذف ROS تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرایندها منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو و تغییرات پاتولوژیکی در سلول‌های مختلف می‌شود (۱۱, ۱۲).

طبق تحقیقات انجام‌شده، دیازینون در انواع جانوران و بافت‌ها ایجاد سمیت کرده و طیف وسیعی از آثار بیوشیمیایی خود را در دوزهای غیر کشنده بر جای می‌گذارد و می‌تواند باعث صدمات سلولی، ژنتیکی و محیطی شود (۷). از جمله این آثار سمیت می‌توان به اثر تخریبی بر سیستم عصبی[1]، سلول‌های کبدی[2]، سلول‌های کلیوی[3]، سلول‌های جنسی[4] و غدد تناسلی[5] اشاره کرد (۱۰, ۱۳–۱۵). شدت اثر تخریبی ناشی از تماس با دیازینون، به میزان، دوز، نحوه تماس، چگونگی جذب، متابولیت، تجمع و پایداری آن در بدن بستگی دارد. در این رابطه تفاوت در نوع و گونه مورد بررسی، دوز و زمان مواجهه وجه تمایز مطالعات مختلف است (۱۰, ۱۲).

مطالعات روی اثر دیازینون بر بافت استخوان و سیستم اسکلتی بدن بسیار اندک است. طی بررسی اثر دیازینون بر جنین‌های جوجه و بلدرچین، آثار تراتوژنیک این سم بر رشد غضروف و استخوان گزارش شده است که شامل کاهش رشد عناصر اسکلتی پا و بال، زاویه‌دار شدن انتهای درشت‌نی و ابتدای استخوان کف پا، پنجه‌های پیچ خورده و کاهش میزان کلسیفه شدن در استخوان‌های پا مشاهده شد (۱۳, ۱۶). همچنین در بررسی خانواده‌ای که به اشتباه در منزل‌شان در معرض این سم قرارگرفته بودند، دیازینون علاوه بر سمیت عصبی و سمیت اندوکرین، آثار مخربی بر رشد سیستم اسکلتی کودکان این خانواده بر جای گذاشت که از آن جمله می‌توان به تأخیر رشد استخوان، تأخیر کلسیفه شدن، رشد کیست در استخوان‌ها، شکستگی‌های پاتولوژیک و عدم پاسخ به پیوند استخوان در فرزندان این خانواده اشاره کرد (۱۷).

کلسیم و فسفر نه‌تنها مهم‌ترین مواد معدنی تشکیل‌دهنده استخوان‌ها هستند بلکه در عملکرد سلول‌ها نیز وظایف متعدد و مهمی به عهده‌دارند از این رو مکانیسم‌های متعدد و پیچیده‌ای در تنظیم میزان دقیق کلسیم و فسفات در بدن نقش دارند. هورمون‌های مختلفی در تنظیم میزان کلسیم و فسفات خون (کاهش یا افزایش) دخالت دارند که بعضی از آن‌ها اثر مستقیم و تعدادی نیز اثر غیرمستقیم دارند (۱۸).

---

[1] Nerve system
[2] Hepatocyte
[3] Nephrocyte
[4] Germ cell
[5] Sex gland

ویتامین D در پوست در اثر پرتو فرابنفش[1] از پیش ساز (۷- دی هیدرو کلسترول[2]) ساخته می‌شود، همچنین از طریق غذاهای مختلف به بدن می‌رسد. ویتامین D در دو مرحله در بدن (کبد و کلیه) هیدروکسیله می‌شود و به ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D (کلسیتریول[3]) که فرم فعال ویتامین D است، تبدیل می‌شود (۱۹). این ترکیب یک نقش ضروری در تنظیم غلظت کلسیم پلاسما از طریق عملش بر جذب روده‌ای کلسیم، بازجذب کلسیم از استخوان و بازجذب کلیوی کلسیم به‌عهده دارد (۲۰). متابولیسم ویتامین D و کلسیم به هم وابسته و بسیار پیچیده است و در یک زمان و بسیار دقیق توسط واکنش‌های فیدبکی کنترل می‌شود تا هموستازی کلسیم و اسکلت بدن را در حد ثابت حفظ کند (۲۱). همچنین محققان دریافتند که ویتامین D اثرش را بر سلول‌های استخوانی و کندروسیت‌های پلاک رشد از طریق تعامل مستقیم با گیرنده هایش اعمال می‌کند که درون یا بر روی این سلول-ها واقع شده است (۲۲).

در مطالعه حاضر اثر سم دیازینون بر تراکم بافت استخوان جمجمه، بخش سر و گردن اپیفیز فوقانی استخوان ران و تراکم کلی استخوان ران به کمک بررسی‌های رادیوگرافیک، و تغییرات ساختاری پلاک رشد و همچنین تغییرات مساحت و محیط تیغه‌های استخوان اسفنجی اپیفیز تحتانی استخوان ران موش‌های صحرایی نابالغ، به‌کمک بررسی‌های هیستومورفومتریک مورد مطالعه قرار می‌گیرد. علاوه بر این اثر بهبود دهندگی مکمل ویتامین D بر آسیب احتمالی ایجاد شده نیز بررسی می‌گردد.

[1] Ultra Violet (UV)
[2] 7-Dihydro colsterol
[3] Calcitriol

فصل اول

کلیات

۱-۱ بافت‌شناسی و آناتومی غضروف

غضروف‌ها همراه استخوان‌ها نقش مهمی در تشکیل سیستم اسکلتی بدن دارند. غضروف‌ها نوعی از بافت همبند اختصاصی محسوب می‌شوند که بر اساس ماهیت ماتریکس خارج سلولی به سه نوع غضروف‌های شفاف، ارتجایی و غضروف‌های رشته‌ای تقسیم‌اندی می‌شوند. غضروف‌ها نیز مانند بافت همبندی از سه بخش تشکیل شده‌اند: الف) سلول‌ها ب) ماده زمینه‌ای ج) رشته‌ها (۲۳).

۱-۱-۱سلول‌ها

سلول‌های بافت غضروفی با نام اختصاصی کندروسیت[۱] یا کندروبلاست[۲] معرفی می‌شوند. این سلول‌ها مسئول سنتز و ترشح ماتریکس خارج سلولی (کندروبلاست‌ها) و یا حفظ آن (کندروسیت‌ها) می‌باشند. کندروبلاست‌ها سلول‌های جوان بافت غضروفی هستند که معمولاً بلافاصله زیر پری‌کندریوم وجود دارند. این سلول‌ها تمام ویژگی‌های سلول‌های فعال، مخصوصاً تولید و ترشح پروتئین‌ها را دارا هستند. وجود هسته‌ای یوکروماتینه، دستگاه گلژی فعال و شبکه اندوپلاسمی کاملاً توسعه یافته از این ویژگی‌ها می‌باشد. کندروبلاست‌ها پس از تولید و ترشح ماده زمینه‌ای و رشته‌ها در داخل آن محبوس می‌شوند که در این حالت به نام کندروسیت خوانده می‌شوند. کندروسیت‌ها سلول‌هایی زنده‌اند که نقش با اهمیتی در حفظ عناصر ماتریکس خارج سلولی دارند هرچند میزان فعالیت ترشحی آن‌ها نسبت به کندروبلاست‌ها بسیار کمتر است. سلول‌های کندروسیتی، سلول‌های کاملاً تمایز یافته‌ای اند که معمولاً در قسمت‌های مرکزی توده غضروفی دیده می‌شوند. این سلول‌ها قابلیت تقسیم خود را تا حدی حفظ کرده‌اند و بنابراین امکان تقسیم این سلول‌ها نیز وجود دارد (این تقسیمات سلولی مبنای رشد بینابینی در غضروف‌ها است) (۲۳).

۱-۱-۲ ماده زمینه

ماده زمینه در غضروف شامل دو بخش اصلی است که به نام گلیکوپروتئین[۳] و پروتئوگلیکان[۴] خوانده می‌شوند. گلیکوپروتئین ویژه بافت غضروفی کندرونکتین[۵] نامیده می‌شود. وظیفه‌ی این گلیکوپروتئین، اتصال سلول‌های غضروفی به ماده زمینه‌ای و رشته‌ها در غضروف می‌باشد. پروتئوگلیکان ویژه بافت غضروفی ماده‌ای به نام

[1] Chondrocyte
[2] Chondroblast
[3] Glycoprotein
[4] Proteoglycon
[5] Chondronectin

اگرکان[1] است. پروتئوگلیکان‌های بافت غضروفی سرشار از گلیکوزآمینوگلیکان‌هایی مانند کندروئیتین سولفات و کراتان سولفات هستند. تقریباً ۸۰-۷۰٪ وزن ماتریکس غضروفی را آب تشکیل می‌دهد. ماتریکس خارج سلولی در غضروف‌ها، ماده ای ژله مانند و سفت است که امکان تحمل فشار برای غضروف را فراهم می آورد. قسمتی از ماتریکس خارج سلولی که بلافاصله اطراف سلول‌های غضروفی را احاطه می‌کند و با رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی قابل رویت است، ناحیه ای بسیار ظریف در اطراف سلول[2] است. این ناحیه ظریف بلافاصله توسط حاشیه‌ای از ماتریکس خارج سلولی احاطه می‌شود که مملو از گلیکوزآمینوگلیکان‌های تازه تشکیل شده است و به همین دلیل پر رنگ تر به نظر می‌رسد. این ناحیه از ماتریکس به نام ماتریکس منطقه‌ای[3] خوانده می‌شود. سایر بخش‌های ماتریکس خارج سلولی که عمدتاً فضای میان سلول‌ها را به خود اختصاص می‌دهند و در رنگ‌آمیزی-ها نیز رنگ کمتری به خود می‌گیرند به نام ماتریکس بینابینی[4] خوانده می‌شوند. در برش‌های بافتی از غضروف‌ها، معمولاً سلول‌های غضروفی درون یک حفره کوچک از ماتریکس قرار می‌گیرند. این حفره به نام لاکونا یا آشیانه نامیده می‌شود. در بافت غضروفی زنده، سلول‌ها کاملاً به ماتریکس اطراف خود اتصال دارند. معمولاً درون هر حفره یا لاکونا یک سلول غضروفی وجود دارد، اما گاهی به این توده های سلولی، گروه های اگزوژن یا همزاد اطلاق می‌شود. گروه های همزاد، حاصل تقسیم یک سلول غضروفی درون حفره یا لاکونا می‌باشند. این موضوع نشان دهنده رشد بینابینی[5] غضروف نیز می‌باشد (۲۳).

۱-۱-۳ رشته‌ها

مجموعه‌ی متنابهی از انواع مولکول‌های کلاژن تیپ‌های (I,XI,X,IX) می‌باشند. فراوان‌ترین نوع کلاژن، مخصوصاً در غضروف‌های شفاف کلاژن تیپ II است (۲۳).

۱-۲ انواع غضروف‌ها

غضروف‌ها از لحاظ ساختاری به سه دسته تقسیم می‌شوند:

غضروف شفاف - غضروف ارتجایی - غضروف رشته‌ای

[1] Agrecan
[2] Pericellular matrix
[3] Territorial matrix
[4] Interstitial matrix
[5] Interstitial

غضروف شفاف به علت شفافیت ماتریکس و قابلیت محدود عبور نور از آن به این نام خوانده می‌شود. این نوع غضروف که فراوان ترین نوع غضروف در بدن انسان است، توزیع نسبتاً گسترده‌ای در سرتاسر بدن دارد. غضروف‌های نعل اسبی شکل جدار نای، بعضی از غضروف‌های حنجره، غضروف رشد، غضروف‌های بالی بینی، غضروف‌های مفصلی و غضروف‌های دنده‌ای، نمونه‌ای از انواع غضروف‌های شفاف اند. به‌علاوه غضروف‌های شفاف، اسکلت بدن جنین را تشکیل می‌دهند و به‌عنوان بستری برای استخوان‌سازی اندوکوندرال[1] در جنین مطرح می‌باشند. سطح خارجی غضروف‌های شفاف توسط غلافی از جنس بافت همبند رشته‌ای در بر گرفته می‌شود که به نام پرده پری‌کندریوم[2] یا غضروف پوش نامیده می‌شود. این غلاف همبندی متشکل از دو لایه است که لایه خارجی آن ماهیت رشته‌ای داشته و مملو از کلاژن تیپ I و عروق خونی می‌باشد. در حالی که لایه داخلی آن، ماهیت سلولی داشته و به نام لایه کندروژنیک[3] یا غضروف‌زا خوانده می‌شود (۲۳) (شکل ۱-۱).

شکل ۱-۱. فتومیکروگراف غضروف شفاف (۲٤).

محور طولی هسته سلول‌های کندروژنیک به موازات سطح غضروف قرار می‌گیرد. سلول‌های کندروژنیک، سلول‌هایی ریشه ای یا بنیادی هستند که قابلیت تقسیم و تمایز فراوانی دارند. تقسیم این سلول‌ها باعث افزایش لایه‌های سلولی از سطح غضروف به آن می‌شود. غضروف‌های شفاف فاقد عروق خونی می‌باشند و لذا فرایند ترمیم در آن‌ها به کندی صورت می‌گیرد (۲۵). البته به علت عدم وجود رگ‌های خونی در غضروف، معمولاً پیوندهای غضروفی یا گرافت‌های غضروفی از شانس موفقیت بیشتری برخوردار اند. غضروف‌های شفاف معمولاً

[1] Endochondral
[2] Peri chondrium
[3] Chondrogenic layer

با افزایش سن به علت رسوب املاح معدنی، قابلیت انعطاف خود را از دست می‌دهند که به این تغییرات، تغییرات فرساینده[1] می‌گویند (۲۶).

الگوی رشد در غضروف‌ها به دو نوع قابل تقسیم است: رشدی که علت آن تقسیم سلول‌های کندروژنیک پرده پری‌کندریوم است و رشدی که علت آن تقسیم سلول‌های کندروسیتی مرکز غضروف است (۲۳).

۱-۳ بافت‌شناسی و آناتومی استخوان

استخوان‌ها بخش اعظم اسکلت بدن را تشکیل می‌دهند و یکی از انواع بافت همبند اختصاصی محسوب می‌شوند که در آن‌ها ماتریکس خارج سلولی با رسوب املاح معدنی، بسیار سخت و متراکم شده است. استخوان‌ها علاوه بر اهمیت ساختمانی از نظر فیزیولوژیک نیز بافتی فوق‌العاده فعال و دینامیک می‌باشند. استخوان‌ها همچنین نقش بسیار مهمی در محافظت از اعضاء حیاتی و مهم (مغز، مغز استخوان، قلب، ریه و دستگاه تناسلی) دارند (۱). استخوان‌ها به علت دارا بودن میزان بالایی از املاح کلسیم، به‌عنوان ذخیره بسیار مهمی برای این یون در بدن محسوب می‌شوند. یون کلسیم برای فعالیت‌های آنزیماتیک سلولی، فعالیت سلول‌های عصبی، عضله قلبی و عضله اسکلتی فوق‌العاده حائز اهمیت است. استخوان‌ها به‌عنوان یک نوع بافت همبند اختصاصی دارای سه جزء می‌باشند: سلول‌ها، ماده زمینه‌ای و عناصر رشته‌ای (۲۶).

۱-۳-۱ سلول‌ها

سلول‌ها در بافت استخوانی شامل چهار نوع هستند: استئوبلاست‌ها، استئوسیت‌ها، استئوکلاست‌ها و سلول‌های اجدادی (۲۳).

۱-۳-۱-۱ سلول‌های اجدادی استخوان

سلول‌های اجدادی یا استئوپروجنیتور[2]، سلول‌هایی با ماهیت مزانشیمی‌اند که در لایه داخلی پرده ضریع (لایه استئوژنیک[3]) استقرار دارند. این سلول‌ها پس از تقسیم و تمایز به استئوبلاست‌ها، شروع به سنتز و ترشح ماتریکس استخوانی می‌نمایند و بدین ترتیب مسئول رشد محیطی[4] استخوان‌ها می‌باشند (۲۳).

---

[1] Degenerative
[2] Osteoprogenitor cell
[3] Osteogenic layer
[4] Appositional Growth

۱-۳-۱-۲ استئوبلاست‌ها

سلول‌های بازوفیلی، مکعبی شکل و فوق‌العاده فعالی‌اند که بر روی سطوح تیغه‌های استخوانی در حال تشکیل دیده می‌شوند. این سلول‌ها مسئول سنتز و ترشح ماده زمینه‌ای و رشته‌ها در استخوان می‌باشند. استئوبلاست‌ها دارای هسته یوکروماتینه، هستک واضح، دستگاه گلژی و شبکه اندوپلاسمی کاملاً توسعه یافته هستند. این سلول‌ها از نظر فعالیت آنزیمی، آلکالین فسفاتاز مثبت هستند و بر روی سطح خود گیرنده هایی برای هورمون پاراتیروئیدی[1] (PTH) و فاکتور رشد شبه انسولینی[2] (IGF-I) دارند. این سلول‌ها پس از ترشح مواد زمینه‌ای و رشته‌ها در داخل آن‌ها محبوس شده و به استئوسیت تبدیل می‌شوند. استئوبلاست‌ها در مسیر ساخت ماتریکس استخوانی ابتدا مواد آلی آن را سنتز و ترشح می‌کنند که به‌صورت لایه ظریفی به نام استئوئید، روی تیغه استخوانی و استئوبلاست‌ها را می پوشاند. استئوبلاست‌ها در مرحله بعد مواد معدنی را بر روی استئوئید رسوب می‌دهند (۲۳) (شکل ۱-۲).

۱-۳-۱-۳ استئوسیت‌ها

سلول‌هایی زنده و فعال اند که مسئول حفظ ماتریکس خارج سلولی اطراف خود می‌باشند. معمولاً در برش بافتی دکلسیفه از استخوان، این سلول‌ها در حجره یا حفره ای به نام لاکونا دیده می‌شود. استئوسیت‌ها دارای زواید پایی شکل به نام فیلوپودیا[3] هستند که این زواید درون مجاری بسیار ظریفی به نام کانالیکولی های استخوانی گسترش پیدا می‌کنند. زوائد سلولی درون این کانالیکول‌ها با زوائد سلول‌های مجاور از طریق اتصالات سلولی نوع باز یا نکسوسی[4] به هم اتصال دارند و به این ترتیب امکان تبادل مواد غذایی، متابولیت‌ها و مولکول‌های اطلاعاتی میان سلول‌های استئوسیتی فراهم می‌آید(۲۳) (شکل ۱-۲).

۱-۳-۱-٤ استئوکلاست‌ها

سلول‌هایی‌اند که قابلیت جذب استخوان را دارند. این سلول‌ها از سلول‌های استئوپروجنیتور منشأ نمی‌گیرند بلکه از منوسیت‌های خون می‌آیند. سلول‌های استئوکلاستی، سلول‌هایی فعال، اسیدوفیل و چند هسته‌ای اند که دارای دستگاه گلژی و لیزوزوم‌های کاملاً توسعه یافته‌ای هستند. در این سلول‌ها تعداد میتوکندری‌ها فوق‌العاده زیاد می‌باشد. استئوکلاست‌ها از نظر آنزیمی اسید فسفاتاز مثبت هستند. این سلول‌ها معمولاً در محل‌های جذب

---

[1] Para Tiroeid Hormone (PTH)
[2] Insulin Like Growth Factor I (IGF- I)
[3] phyllopodia
[4] Nexus