

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

۱۵۵۶۷

دانشگاه تربیت معلم تهران

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه :

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد - رشته علوم جانوری

(گرایش زیست شناسی تکوینی)

موضوع :

اثرات ترا توژنیک کربنات لیتیوم بزاندام زایی جنین های

موش کوچک آزمایشگاهی در روزهای ۹/۵، ۸/۵، ۷/۵ حاملگی

براهنمائی:

جناب آقای دکتر کاظم پریور

ومشاورت :

سرکار خانم دکتر پروین رستمی

نگارش :

بهمن زینلی

شهریور ۱۳۷۰

۱۵۵۶۷

تقديم به :

پدروما درفداكارم كه همواره مراد را علم و

ايمان را هنما و مشوق بوده اند . . .

تقديم به :

همسر دلسوزم که همواره پشتيبان و با صبر و
از خودگذشتگی اين راه را براي من هموار نمود ..

بسم ا... الرحمن الرحيم

شکرخداي متعال که قوه‌اي را در اين بنده خويش به ودیعه گذاشت تا بتواند آنرا به فعل تبديل نموده و گوشه‌اي از دين خود را به جامعه‌اش ادا نمايد .

تحقيق حاضر در مدت زمان یک سال صورت گرفت و از راهنمايي جناب آقاي دکتر کاظم پريور و از مساعدت‌هاي علمي تني چند از اساتيد و ديگر سروران برخوردار بود ، راهنمايي و مساعدتهايي که بي شک بدون برخورداري از آنها به پايان بردن اين مهم ميسر نمي‌گرديد . اميدوارم که سپاس و تشکرم بتواند پاسخ گوي اين زحمات باشد .

با تشکر از :

- استاد محترم جناب آقاي دکتر کاظم پريور ، استاد راهنما ، که در تمام طول دوران تحقيق ، دلسوزانه با راهنمايي و ارشادات خود مشکلات را سهل و با در اختيار گذاشتن تجارب ارزنده خويش اينجانب را در انجام اين طرح ياري نمودند .
- استاد گرامي سرکار خانم دکتر پروين رستمي ، استاد مشاور ، که هميشه از راهنمايي‌ها و مساعدتهاي ايشان استفاده کرده و با نهايت دقت نقاط ضعف اين پايان نامه را برطرف نمودند .
- استاد محترم سرکار خانم دکتر شهربا نوعريان و استاد گرامي جناب آقاي دکتر امير نظام الدين غفاري (استاد بخش آناتومي دانشکده پزشکي دانشگاه علوم پزشکي تهران) که با دقت خاص در برطرف نمودن نقاط ضعف پايان نامه حداکثر کوشش را مبذول داشته و قضاوت اين رساله را بعهده گرفتند .

- استادگرامی جناب آقای دکتر خاوری نژاد که در یافتن روشهای آنالیز آماری این تحقیق نهایت همکاری را نمودند .
- خانم هما محسنی کوچصفهانی ، مربی محترم آزمایشگاه جنین‌شناسی دانشگاه تربیت معلم ، بخاطر کمک‌های بیدریغشان در انجام مراحل مختلف آزمایش .
- خانم نجفی کارشناس آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی که در تحلیل‌های آماری مساعدت نمودند .
- مدیریت محترم گروه زیست‌شناسی سرکار خانم دکتر قربانلی و مدیریت محترم دانشگاه تربیت معلم که امکانات و وسایل لازم را تا حد امکان در اختیار قرار دادند .
- بخش آنالیز دستگامی دانشکده علوم زمین دانشگاه شهید بهشتی که امکان استفاده از دستگاه جذباتمی را فراهم نمودند .
- آقای کیان که در تهیه عکس مرا یاری نمودند .
- کلیه افراد گروه زیست‌شناسی از جمله دانشجویان کارشناسی ارشد علوم جانوری بخصوص همسرم خانم آرزیتا پروانه تفرشی بخاطر کمکهای بیدریغشان در تمام زمینه‌ها .
- موسسه تایپ آتنا بخاطر زحمات و کوشش فراوانی که در تایپ و صفحه‌آرایی این رساله داشتند .

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	فشرده فارسی مقدمه :
۴	- لیتیوم و کربن - لیتیوم بعنوان یک ماده تراژون در کلیه رده های جانوری
۶	۶ رده های جانوری
۱۱	- تجربیات انجام گرفته در پستانداران آزمایشگاهی
۱۴	- لیتیوم و بیولوژی سلول
۳۷	- لیتیوم و بیماری افسردگی
۳۹	- هدف از اجرای طرح ابزارها، مواد و روش اجرایی :
۴۱	- ابزارهای مورد استفاده
۴۳	- روشهای اجرایی کار نتایج :
۵۱	- تعیین مقدار LD_{50}
۵۵	- تعیین غلظت لیتیوم در سرم خون
۵۷	- بررسی نتایج تزریق در روزه ۷/۵ حاملگی
۹۲	- بررسی نتایج تزریق در روز ۸/۵ حاملگی
۱۰۸	- بررسی نتایج تزریق در روز ۹/۵ حاملگی
۱۱۷	بحث و تفسیر
۱۳۶	فشرده انگلیسی
۱۴۶	وفرانس

فشرده فارسی :

لیتیوم یک عنصر قلیایی با کوچکترین وزن اتمی در بین فلزات محسوب می‌شود. این عنصر با وجود سادگی اثرات قابل ملاحظه‌ای در مراحل رشد و نمو جنینی و همچنین رفتار مهره‌داران می‌گذارد، بطوریکه بعنوان عامل ترا توژن مهره‌داران شناخته شده است. سالهای متمادی است که کربنات لیتیوم را بعنوان دارویی موثر برای درمان افسردگی مانیک *Manic depression* بکار می‌برند. با توجه به اینکه لیتیوم از جفت عبور می‌کند و با غلظتی تقریباً " مساوی با غلظت سرمی مادر، در سرم جنین یافت می‌شود، لذا خطرات ناهنجاری زایی در جنین بوجود می‌آورد. گزارشات زیادی از نوزادان ناهنجاری که مادران آنها در طی دوره بارداری لیتیوم مصرف کرده‌اند، داده شده است. در این ارتباط جهت مشخص کردن پتانسیل ترا توژنیک این فلز اثرات ترا توژنیک کربنات لیتیوم در موشهای سوری نژاد *Balb/c* مورد آزمایش قرار گرفت. در این کار تحقیقاتی، کربنات لیتیوم پس از حل شدن در سرم فیزیولوژیک نمکی، بطور داخل صفاقی به موشهای ۲/۵ الی ۳ ماهه تزریق گردید. در اولین سری تجربیات میزان LD_{50} (Lethal Dose) 443 mg/kg B.W. تعیین شد. در سه سری دیگر از تجربیات با کاهش این دوز به مقدار 300 mg/kg دوز درمانی، کربنات لیتیوم به موشهای حامله در روزهای ۷/۵، ۸/۵ و ۹/۵ حاملگی (روزهای بعد از لانه‌گزینی) تزریق گردید.

هم زمان با تزریق به تعداد چهار موش تجربی ، در هر سری تعداد ۴ موش شاهد حامله نیز در نظر گرفته و به آنها تنها سرم فیزیولوژیک تزریق شد . حاملگی موشها با مشاهده درپوش واژنی مشخص می‌گردید ، که تاریخ مشاهده آن بعنوان روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد . جنین های موشهای حامله در روز ۱۵/۵ حاملگی از رحم مادران خارج گردید و از نظر مورفولوژیکی و هیستولوژیکی بطور دقیق مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت . لازم به ذکر است که هر سری از تجربیات سه بار تکرار گردید . جنین های بدست آمده از تزریق در روز ۷/۵ حاملگی ، کاهش معنوداری ($P < 0/001$) را در وزن جنین و CR (اندازه فرق سری نشیمنگاهی) نشان دادند ، در ۱۸٪ از کل جنین ها ناهنجاری در چشم مشاهده شد . این ناهنجاریها شامل : آنوفتالمی و طرفه (۴۲٪) ، آنوفتالمی یک طرفه (۳۷٪) و میکروفتالمی و نابجایی در رشد و نمو چشم (۲۱٪) بود . همچنین در بین جنین های ناهنجار ، یک مورد اگزسفالسی ، یک مورد اگزوهپاتیک ، یک مورد شکاف توام در لب و کام و یک مورد ناهنجاری کلی در سرو صورت و ۶ جنین آتروفیه (۶٪) مشاهده گردید . در مقاطع هیستولوژیکی ، به هم ریختگی ، سازماندهی سلولهای شبکیه و نابجایی در تشکیل چشم جنین های میکروفتالمی و چسبیدگی غیر عادی پلکها را به یکدیگر ، مشهود بود .

در بین جنینهای بدست آمده از تزریق در روز ۸/۵ ، ۸٪ اگزسفالسی ۱/۳٪ اگزوهپاتیک و بالاخره ۳۴٪ آتروفیه شده مشاهده شد . این جنین ها نیز کاهش معنوداری ($P < 0/001$) را در وزن و CR نشان

دادند . در مطالعه مقاطع میکروسکوپی جنین های اگرنسفال ، عدم تشکیل پرده مننژ در سطح خارجی مغز مشاهده گردید .

در جنین های بدست آمده از تزریق در روز ۹/۵ حاملگی ۵۰٪ آتروفیه شده ، و بقیه سالم بودند . با روش جذب اتمی ، میزان غلظت لیتیوم در سرم خون موشهای تجربی $1/19-1/98 \text{ meq/L}$ (۶ ساعت پس از تزریق) و $0/15-0/24 \text{ meq/L}$ (۲۴ ساعت پس از تزریق) و در موشهای شاهد $0/006-0/014 \text{ meq/L}$ تعیین شد این مقدار لیتیوم در سرم خون تقریباً " در محدوده غلظت درمانی آن در بیماران تحت معالجه با این دارو بدست آمد .

مقدّمه

لیتیوم و کاربرد آن :

لیتیوم با وزن اتمی ۶/۹۳۹ یکی از فلزات قلیا یی است که در گروه اول جدول تناوبی عناصر جای گرفته است . بعلاوه میل ترکیبی شدید، این فلزات به حالت آزاد در طبیعت وجود ندارند و بصورت ترکیباتی مانند کلریدها ، برمیدها و یدیدها در زمین ویا محلول در آب وجود دارد . علاوه بر این به مقدار کم بصورت کربنات سدیم در خاکستر بعضی از گیاهان یافت میشود .

لیتیوم در سال ۱۸۱۷ بوسیله *Arfwedson* کشف شد ، در سال ۱۸۴۸ توانایی کربنات لیتیوم در حل کردن کریستالهای اورات (*urate*) مشخص شد . حضور طبیعی آن در پوسته زمین در حدود $65 \text{ gram/metric ton}$ و در آب دریا حدود $2 \text{ gram/metric ton}$ تخمین زده میشود . (Bach 1990)

در بافتهای جانوری مقادیر بسیار کمی از لیتیوم یافت میشود و لذا این سؤال را بر میانگیزد که آیا لیتیوم را میتوان بعنوان یک عنصر ضروری طبقه بندی کرد ؟ در واقع اهمیت اصلی در این است که در یا بییم آیا برای اعمال متابولیکی بدن وجود آن الزامی است ؟

با اینکه شواهد قوی دال بر نقش لیتیوم در متابولیسم انسان وجود ندارد با این حال نشانه های قوی وجود دارد که لیتیوم در اندازه های $\text{nanoequivalent/Liter}$ یک عنصر ضروری محسوب میشود . (Bach 1990)

لیتیوم با تمام سادگی که در ساختن خود دارد میتواند اثرات

وسیع روی مراحل تکامل جنینی و همچنین رفتار انسان
 بگذارد، این کاتیون در جنین شناسی تجربی به میزان زیادی
 مورد استفاده قرار گرفته است بخصوص در قرن ۱۹ که مطالعات
 زیادی بر روی ترمیم (*Regeneration*)، حرکات مژه‌ها، تاژک‌ها و
 ارگان‌های تک سلولی انجام گرفته بود. (*Weinstein 1975*)
 محققین پزشکی معتقدند که نمک‌های لیتیوم اثرات مفیدی در
 بیماری‌های ناشی از رسوب نمک‌های غیر قابل حل اسیداوریک
 مثل روماتیسم، نقرس و آرتروز دارند، که این ویژگی به علت
 قابلیت حل زیاد اورات لیتیوم می‌باشد.

در سال ۱۸۹۷ *Lange* برای اولین بار پیشنهاد کرد که یونهای

لیتیوم باید در بیماری افسردگی *Mental depression*
 مفید باشند. با وجود این تا زمانی که لیتیوم توسط یک روانپزشک
 استرالیایی بنام *cade* بعنوان یک دارو تولید شد، بیش از نیم
 قرن از این موضوع گذشته بود. این روانپزشک مشاهده کرد که لیتیوم
 یک حالت بی‌حالی و سنگینی (مرگ کاذب) را درخوکچه‌های هنسی
 ایجاد میکند. در حدود ۲۰ سال بعد لیتیوم بعنوان یک دارو برای
 درمان افسردگی مانیک دو قطبی (*bipolar manic depressive*)
 بکار گرفته شد.

لیتیوم با درجات متفاوتی در درمان انواع بیماری‌ها

بصورت فرم‌های شیمیایی متفاوت استفاده شده است که عبارتند از:

۱- لیتیوم برماید *Lithium bromide*، بعنوان یک عامل

آرام بخش و خواب‌آور استفاده می‌شود.

۲- لیتیوم کلراید *Lithium chloride*، بعنوان جانشینی

برای سایر نمکها بکار میرود .

۳- لیتیوم کربنات *Lithium carbonate* ، جهت درمان بیماری افسردگی مانیک بکار میرود .

خصوصیات فیزیوشیمیایی یون لیتیوم شبیه به یونهای فلزات قلیایی می باشد و در بعضی از موارد شبیه به یون *Mg* عمل می کند . لیتیوم اگرچه بعنوان یک عنصر تشکیل دهنده طبیعی بافت های بدن (بجز در مقدار بسیار کم) نیست ، ولی به میزان قابل توجهی در سیستم های بیولوژیک تحمل میشود ، لذا حضور یون لیتیوم در بافتها ممکن است موجب تغییر یا تأثیر در عمل سایر کاتیونها شود . نحوه دخالت آن بدین صورت است که با سایر یونها یک عمل جانشینی ساده را انجام می دهد و به جهت اشغال موقعیتهای عمل بیولوژیکی آنها ، به رقابت می پردازد . (Bach 1990)

لیتیوم ، بعنوان ماده ترا توژن در کلیه رده های جانوری :

لیتیوم باعث انحراف در الگوی شکل گیری جنین (*Pattern* -

formation) در طی تکامل اولیه میشود و لذا منجر به ایجاد جنین های ناهنجار میگردد . این اثرات ترا توژنیک به طور گسترده ای در دوزیستان مطالعه شده است .

لیتیوم به علت سمی بودن با عث بروز بعضی اختلالات در جنین میشود . سالیان متمادی است که بعنوان یک ماده موثر در نکامل جنینی موجودات پست تر از پستاندار شناخته شده است . امروزه روی توتیای دریایی (*Sea urchin*) و کفک های لعابی

بعلت سادگی آنها کارهای زیادی صورت می‌گیرد. در سال ۱۹۲۹ *Von ubrich* گزارش داده بود که تیمار کردن نیمکره حیوانی جدا شده از جنین توتیا با کلراید لیتیوم موجب تشکیل روده و اسپیکول توسط این بلاستومرها میشود. علاوه بر این نشان داده شده که در نتیجه اضافه کردن کلراید لیتیوم حفره گوارشی در خارج بدن توتیا تشکیل می‌شود (*exogastrulated*). به این گونه جنین‌ها، گیاه‌ها (*Vegetalized*) گفته میشود. در واقع میتوان گفت که بلاستومرهای قطب‌جانوری توتیا، توانایی تکامل یافتن به ساختمانهای قطب‌گیاه‌ها را دارند ولی بطور طبیعی این ویژگی آنها مهار میشود و کلراید لیتیوم این استعداد خاموش و نهفته بلاستومرهای جانوری را بیدار میکند (*Livingston* 1989).

همچنین نشان داده شده است که کلرید لیتیوم در سرنوشت سلولی و الگوی تکاملی دوزیستان تاثیر می‌گذارد چنانکه گزارش‌هایی در مورد نقش احتمالی لیتیوم در طی القاء مزودرمی ارائه شده است (*Kao, 1989*).

سلولهای قطب‌گیاه‌ها، سلولهای قطب‌جانوری را جهت تشکیل مزودرم در مراحل اولیه بلاستولا بطور طبیعی القاء میکند. سلولهای ناحیه شکمی قطب‌گیاه‌ها مزودرم شکمی را القاء کرده و سلولهای ناحیه پشتی قطب‌گیاه‌ها، مزودرم سازمان‌دهنده (*Organizer*) را القاء میکند (*Neieuwkoop 1969*)، که بدین ترتیب مزودرم سازمان‌دهنده، سایر ساختمانهای مزودرمی را القاء میکند. لیتیوم احتمالاً از سه راه عمل میکند: