



۱۵۳۸۴

۱۵۳۸۴

دانشگاه تربیت معلم
دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان نامه :

جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته علوم جانوری
(گرایش زیست شناسی تکوینی)

موضوع :

بررسی اثرات تراژونیک کلریدکامپیوم بر اندامزایی جنین های موش سفید
کوچک آزمایشگاهی نژاد Balb/C در روزهای ۸، ۷ و ۹ حاملگی.

استاد راهنما :

آقای دکتر کاظم پیریور

استاد مشاور :

خانم دکتر شهریار نوعریان

نگارش :

فرهادمشایخی

۱۳۷۰

تایستان

بنا م خدا

خداوند اکنون که این مرحله از تحصیلاتم به پایان رسیده است تو را سپاس می گویم
و از تومی خواهم که همیشه در راه کسب علم و فضیلت راهنمایم باشی .
تحقیق حاضر نتیجه بیش از یک سال تلاش می باشد در طول این مدت همیشه از
راهنمایی های استاد ارجمندم جناب آقای دکتر کاظم پریور و همچنین راهنمایی
های علمی اساتید دیگر برخوردار بودم راهنمایی هایی که بدون آنها هیچگاه
موفق به انجام این تحقیق نمی شدم. در اینجا وظیفه خود می دانم که از زحمات
و تلاشهای جناب آقای دکتر کاظم پریور که راهنمایی این رساله را پذیرفتند و
همچنین از جناب آقای دکتر میرنظام الدین غفاری، خانم دکتر شهربا نوعریان
و خانم دکتر پروین رستمی که در برطرف کردن نقص های این رساله اینجا نسب را
راهنمایی نموده اند و قضاوت این رساله را پذیرفتند کمال تشکر را بنمایم .
ضمناً " از همسرم خانم دکتر مالحی که چندین مقاله مفید را در اختیار اینجانب
قرار دادند و در مرتب کردن مطالب این رساله اینجا نسب را یاری کردند تشکر نمایم.

فرها دمشا یخی

با تشکر از :

- استادا رجمندم جناب آقای دکتر کاظم پریور که راهنمایی این رساله را پذیرفته و در تمام مدت این تحقیق تجارب خویش را در اختیار اینجانب قرار دادند و با ا رشادات خود مشکلات و مباحث علمی را که نیاز به تحقیق و بحث داشتند آسان نمودند .

- سرکار خانم دکتر شهریا نوعریان که به عنوان مشاور اینجانب در این طرح تحقیقاتی بودند و همیشه از راهنمایی های ایشان برخوردار بودم و با نظرات سازنده خود در بر طرف کردن نقصهای رساله نهایت کوشش را بکار گرفته و قضاوت این رساله را بعهده گرفتند .

- سرکار خانم دکتر پروین رستمی که چند مقاله مفید را در اختیار اینجانب قرار دادند و با نظرات مفید خود در رفع نقص های این رساله تلاش زیادی نموده اند و قضاوت این رساله را پذیرفتند .

- جناب آقای دکتر امیر نظام الدین غفاری استاد گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران که با نظرات سازنده خود در رفع اشکالات این رساله اینجانب را یاری کرده و قضاوت این رساله را پذیرفتند .

- استادا رجمندم جناب آقای دکتر خاوری نژاد که در تحلیل های آماری این رساله نهایت همکاری را نمودند .

- سرکار خانم محسنی کوچصفهانی مربی محترم آزمایشگاه جنین شناسی بخاطر کمک و راهنمایی های فراوان در انجام مراحل مختلف تجربیات .

- سرکار خانم نجفی کارشناس آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی که در تحلیل های آماری مساعدت نمودند .

- مدیر محترم گروه زیست شناسی دانشگاه تربیت معلم خاتم که در مراسم لقا قریبانی و کلیه افراد گروه زیست شناسی و مدیریت محترم دانشگاه تربیت معلم که به نحوی در این امر یاری می کردند .

- آقای فتوکیان که در ظهور و چاپ عکس ها مرا یاری نمودند .

- موه سسه تایپ دانشجویان که در تایپ ، تکثیر و تصافی این رساله همکاری نمودند .

تقدیم:

به پدر و مادر عزیزم که همیشه مشوق من در امر کسب علم و ایمان
بوده‌اند.

و تقدیم به همسرگرامیم که با صبر و بردباری انجام این تحقیق
را برایم میسر ساخت.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	- فشرده فارسی
۳	- مقدمه :
۴	کاربرد کادمیوم در زندگی انسان
۵	راهها و چگونگی ورود کادمیوم به بدن جانوران
۷	جذب ، توزیع و دفع کادمیوم در بدن
۱۴	تأثیر متقابل کادمیوم با سایر فلزات
۱۴	اشارات کادمیوم بر اندامهای مختلف بدن
۲۵	آنتاگونیستهای فلزات سنگین
۲۷	درمان افراد در مسمومیت های حاد با فلزات سنگین
۲۹	- هدف از تحقیق
۳۱	- خلاصه ای از مراحل رشد و نمو جنین موش
۳۹	- ابزارها ، مواد و روشها
۴۳	- نتایج : الف) نتایج LD ₅₀
۴۵	ب) نتایج تزریق روز هفتم رشد و نمو جنین موش
۷۲	ج) نتایج تزریق روز هشتم رشد و نمو جنین موش
۹۲	د) نتایج تزریق روز نهم رشد و نمو جنین موش
۱۰۷	- بحث و تفسیر
۱۱۵	- پیشنهادات
۱۱۶	- فشرده انگلیسی
۱۱۸	- منابع

رشد روزافزون صنایع و آلودگی بی رویه محیط زیست به مواد شیمیایی و انواع موادمسمی سبب گردیده است که زندگی بشرو سایر موجودات زنده مورد تهدید قرار گیرد. یکی از مواد آلوده کننده محیط زیست فلزکادمیوم از گروه فلزات سنگین است به همین دلیل اثر کلرید کادمیوم بر اندامزایی جنین های موش سفید کوچک آزمایشگاهی نژاد Balb/C مورد بررسی قرار گرفت. در این تجربیات مجموعاً ۵ سری آزمایش صورت گرفت که یک سری جهت تعیین LD₅₀ و یک سری جهت تعیین زمان تحلیل رفتن جنین ها و سه سری نیز جهت بررسی اثرات کلرید کادمیوم در روزهای ۷، ۸ و ۹ حاملگی اختصاص یافت. در تمامی تجربیات برای گروه تجربی از کلرید کادمیوم حل شده در سرم نمکی و برای گروه کنترل فقط از سرم نمکی بصورت داخل صفاقی (Intrapertonealy = I.P.) تزریق گردیده، میزان LD₅₀ برای حیوانات موش سوری نژاد Balb/C، ۸ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن تعیین گردید. در سه سری تجربه برای روزهای ۷ و ۸ و ۹ حاملگی میزان ۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن کلرید کادمیوم برای موشهای گروه تجربی و در هر سری آزمایش محلول سرم نمکی به گروههای کنترل تزریق گردید. در این بررسی مجموعاً ۱۳۸ جنین و جفت در گروه تجربی روز هفتم، ۱۱۶ جنین و جفت از روز هشتم و ۱۲۸ جنین و جفت از روز نهم حاملگی بدست آمد. در تجربیات روز هفتم از ۱۳۸ جنین و جفت بدست آمده ۱۳۶ جنین تحلیل رفته بود این در حالی است که تعداد جنین های تحلیل رفته در گروههای تجربی روز ۸ و ۹ به ترتیب ۱۰ و ۶ می باشد نتایج تجربیات بدست آمده نشان می دهد که میزان وزن جفت و جنین و همچنین اندازه فرق سری-نشیمنگاهی (Crown - Rump = C-R) در جنین های تجربی که در معرض کادمیوم

قرار گرفته است کمتر از گروههای کنترل خودمی باشد. جهت تشخیص زمان آغاز و پایان تحلیل رفتن جنین ها به یک سری از موشها در روز هفتم حاملگی میزان ۵ میلی‌گرم برکیلوگرم از کلرید کادمیوم تزریق گردید و سپس از روز ۸ تا ۱۵ حاملگی بطور سریال نمونه برداری گردید و جنین ها به همراه جفت ها از رحم مادر خارج و از آنها مقاطع میکروسکوپی تهیه شد. بررسی نتایج نشان می دهد که تحلیل جنین ها از روز نهم حاملگی شروع شده و در روز دوازدهم حاملگی کامل تحلیل رفته و فقط جفت آنها باقی میماند. مشاهدات کلی در سه گروه تجربی در مقایسه با گروه شاهد شامل: نقص در تعداد انگشتان دست، انحنای بیش از حد ستون مهره ها، کاهش ضخامت شبکه، کاهش قطر عدسی چشم، اثر بر سلولهای کبدی و افزایش سلولهای مگا کایوسیت است. از مشاهدات فوق بررسی آماری بعمل آمده و برای هر تجربه هیستوگرافهای لازم تهیه شد.

رشد اقتصادی و پیشرفت و توسعه صنایع و افزایش جمعیت و آلودگی محیط زیست به مواد صنعتی و مواد شیمیایی خصوصاً " فلزات سنگین ، بسیاری از محققین علم جنین شناسی را بر آن داشته تا بررسی گسترده‌ای را در جهت بررسی اثرات آنها بر اندام‌های جنین در حال رشد انجام دهند. در میان مواد آلوده کننده و سمی که دارای خاصیت تراژونیک بر روی جنین می باشد کادمیوم (Cadmium = Cd) دارای جایگاه خاصی است (Saxena 1989) .

مطالعه اثرات عوامل فیزیکی و شیمیایی محیط و دارویی و هورمونی در ایجاد ناهنجاریهای جنینی در شاخه‌ای از علم جنین شناسی بنام هیولاشناسی یا غول شناسی (Teratology) مورد بررسی قرار می گیرد. کادمیوم یکی از فلزات سنگین و سمی از گروه IIB جدول تناوبی و با وزن اتمی ۱۱۲/۴۱ و عدد اتمی ۴۸ و وزن مخصوص ۸/۶۵ می باشد و فلزی است دوظرفیتی و نرم و سفید رنگ و هادی که در پوسته زمین به میزان ۰/۵-۱/۱ ppm وجود دارد. این فلز در سال ۱۸۱۷ توسط Stromeyer کشف گردید. کادمیوم به میزان کم به همراه ترکیبات روی نظیر ZnS یا اسفالریت (Sphalerite) یافت می شود که در این صورت کادمیوم به فرم CdS یا گرینوکایت (Greenokite) دیده می شود. این فلز دارای کاربرد زیادی در صنعت است و در بدن انسان به میزان کمی وجود دارد (Wormser 1988) و ضرورت وجود آن در انسان و پدیده‌های زیستی مشخص نشده است. غلظت کادمیوم به مرور زمان و با تجمع در آب ، بافت‌های گیاهی و جانوری و خاک افزایش می یابد (Wormser 1988) .

تحقیقات جدی بر روی این فلز بعد از جنگ جهانی دوم و با پیدایش بیماری Itai - Itai در ژاپن شروع گردید (در مورد این بیماری در بخش‌های بعدی صحبت خواهد شد) .

اندام اصلی ذخیره و تجمع این فلزکلیه‌هاست که تقریباً " $\frac{1}{3}$ از کل کادمیومی که فرد دریافت می‌کند در این اندام ذخیره می‌شود (Kirk 1989) .

کاربرد کادمیوم در زندگی انسان :

تقریباً " از ۵ سال قبل به اهمیت این فلز در صنایع متالورژی پی برده‌اند. مقدار کادمیوم در پوسته زمین بسیار کم است ولی بطور عملی تمام سنگهای معدنی که واجد فلز روی هستند دارای مقادیر اندکی کادمیوم می‌باشند. در استخراج فلز روی همیشه مقادیری کادمیوم نیز به همراه آن استخراج می‌شود. در دهه‌های اخیر میزان استفاده از این فلز در صنعت به حد اکثر خود رسیده است. چهار کشور بزرگ تولیدکننده کادمیوم در جهان شوروی، ژاپن، آمریکا، آلمان می‌باشند. بطور کلی کاربرد کادمیوم در کشاورزی و صنایع است این فلز در آلیاژهای صنعتی و لحیم‌سازی، تهیه رنگهای صنعتی، تولیدات پلاستیکی پلی‌وینیل بکا رگرفته می‌شود و بدلیل دارا بودن خصوصیات الکتروشیمیایی مطلوب، در صنعت روکش فلزات (Electroplating)، صنایع پلاستیک سازی، سرامیک و گالوانیزاسیون و صنایع رنگ سازی بصورت (Cadmium yellow) و باطریهای کادمیوم- نیکل و بالاخره در ساختن قطعات یدکی ماشین‌ها و هواپیماهای نظامی دارای کاربرد وسیعی است. در کشاورزی نیز در ساختن انواع کودهای شیمیایی و سموم از این فلز استفاده می‌شود (Harrison 1987) .

در مجموع ۹۵٪ از مصرف کادمیوم در تهیه پنج ماده اصلی زیر یعنی : رنگ، روکش فلزات، باطری‌سازی، آلیاژسازی و ساختن مواد مقاومست. دهنده پلاستیکها بکا رگرفته می‌شود. در آبهای نواحی آلوده، غلظت با لایسی از این ماده در صدف نرم تنان دیده می‌شود، زغال سنگ و دیگر سوخته‌های

فسیلی دارای مقا دیرزیادی کا دمیوم هستند و احتراق آنها باعث آزادشدن کا دمیوم در محیط می شود (Gilek 1988) .

راهها و چگونگی ورود کا دمیوم به بدن جانوران :

هما نگونه که گفته شد کا دمیوم به همراه فلزروی وجود دارد و نسبت کا دمیوم به فلزروی در سنگهای معدنی و خاک از $\frac{1}{100}$ تا $\frac{1}{1000}$ متغیر است و هم اکنون - حدس زده می شود که کا دمیوم به همراه تمام فلزات دیگر در سنگ معادن یافت می شود این امر، جدا کردن کا دمیوم را از فلزروی بسیار مشکل می سازد و همیشه مقادیری از کا دمیوم در هنگام خالص سازی فلزات به همراه آنها باقی میماند و در نتیجه کارگرانی که در مراحل تصفیه و گداختن فلزات کار می کنند در معرض مقا دیرزیادی از کا دمیوم هستند که به هوا متعادل می شود چون کا دمیوم بعنوان یک فلز جانبی به همراه فلزات دیگر استخراج می شود، حتی مقادیری از کا دمیوم را می توان در ترکیبات تجاری روی نیز مشاهده کرد. انتشار کا دمیوم در هوا باعث ورود سریع آن به بدن انسان و حیوان از طریق تنفس می شود ولی آب یا خاک بیش از هوا این فلز را در خود ذخیره می کند. تجمع کا دمیوم در آب سبب افزایش غلظت آن در بدن ماهیان و سایر آبزیان می شود. سبب جات و صیفی جات که با استفاده از کودهای شیمیایی رشد می کنند و یا در مزارعی که توسط آبهای آلوده آبیاری می شوند، مقا دیرزیادی از کا دمیوم را در خود ذخیره کرده که در نهایت طی چرخه ای وارد بدن انسان می شود. اگرچه مهمترین راه ورود کا دمیوم به بدن انسان از طریق خوراکی است لیکن خواروبارومواد غذایی بطور طبیعی حاوی کمتر از ۵/۰ میکروگرم به ازای هر گرم وزن است و متوسط میزان دریافت روزانه آن در شرایط طبیعی حدود ۵۰ میکروگرم است. هر سیگار حاوی ۱-۲ میکروگرم کا دمیوم می باشد و میزان ۱۰٪ از آن از طریق

ریه‌ها جذب می‌شود، کشیدن یک بسته سیگار در هر روز به تنهایی سبب تجمع حدود یک میلی گرم کادمیوم در سال می‌شود. در شرایط نرمال صدف نرم‌تنان، کلیه، کید حیوانات حاوی مقادیر بیشتر از ۰/۰۵ میکروگرم به ازای هر گرم وزن می‌باشد. (Klaassen 1977) گاهی رودخانه‌هایی که از مناطق صنعتی عبور می‌کنند ملاح کادمیوم را با خود به کشتزارها و شالیزارها برده و در نتیجه میزان این فلز در گندم و برنج تا یک میکروگرم به ازای هر گرم می‌رسد که این مقدار بسیار خطرناک است. (Ole Andersen 1984)

اولین گزارش درباره خواص سمی کادمیوم مربوط به کشور ژاپن است. در منطقه‌ای بنام Fuch رودخانه جنتسو (Jintsu) آب آلوده به کادمیوم را به کشتزارها برده بود، در اطراف این رودخانه که رخنات ذوب روی وجود داشت که فضولات و ته‌مانده‌های شیمیایی ایجاد شده به رودخانه وارد می‌گشت و به مرور میزان کادمیوم در برنج و گندم‌های این منطقه تجمع پیدا کرده بود. مصرف محصولات این کشتزارها توسط افراد سبب ایجاد بیماری همراه با دردهای استخوانی شدید همراه بود که این بیماری در ژاپن بنام Itai-Itai یا Ouch - Ouch (به معنی درد-درد) موسوم گشت.

علاوه بر آن در سال ۱۹۸۳ در یک مدرسه ابتدایی واقع در میسوری (Missouri) آمریکا ۲۷ دانش‌آموز یک مدرسه در مدت ۲ تا ۵ ساعت بعد از خوردن کمپوت گلابی دچار علائم تهوع، خستگی عضلانی، ضعف و اسهال شدند. در ابتدا حدس زده می‌شد که این مسمومیت ممکن است ناشی از افزایش روی باشد ولی تحقیقات نشان داد که میزان روی در این کمپوت‌ها در حد طبیعی است ولی میزان کادمیوم کمی بالاتر از حد طبیعی است. کادمیوم در حلال‌های اسیدی حل می‌شود به همین جهت در مواد غذایی که حاوی اسیدهای آلی هستند وجود دارد. گیاهان نیز میزان جذب این فلز بستگی به PH محیط دارد و هر چه خاک وضعیت

اسیدی بیشتری داشته باشد میزان جذب آن توسط گیاه بیشتر خواهد بود .
(Gilek 1988) .

جذب ، توزیع و دفع کادمیوم در بدن :

همانگونه که اشاره شد مهمترین راه ورود کادمیوم به بدن از طریق تنفس و خوراکی می باشد . مطالعات روی حیوانات آزمایشگاهی نشان می دهد که میزان جذب این فلز از طریق خوراکی ممکن است $1/5$ درصد باشد (Klaassen and Kotsonis 1987) این میزان در مورد انسان به 5% میرسد (Rahola 1972) . ولی میزان کادمیوم از طریق تنفس حدود 10% تا 40% درصد می باشد (Fribery 1974) . در مورد متابولیسم و جذب این فلز از طریق تنفس با خوراکی عوامل متعددی دخالت دارند . جذب کادمیوم از طریق خوراکی به فاکتورهای زیر بستگی دارد که شامل سن ، میزان یون کلسیم ، میزان یون آهن و روی در رژیم غذایی و ترکیب شیمیایی کادمیوم خورده شده می باشد . مطالعات نشان می دهد که هرچه یونهای آهن و کلسیم و پروتئین در رژیم غذایی کمتر باشد میزان جذب روده ای کادمیوم تا 20% درصد افزایش می یابد . (Nielsen 1989) .

میزان جذب این فلز از طریق تنفس بستگی به اندازه ذراتی دارد که کادمیوم در آن وجود دارد و هرچه این ذرات ریزتر باشد میزان جذب آن نیز بیشتر خواهد بود . حدود 40% از کادمیومی که از طریق دود سیگار وارد ریه می شود جذب می گردد . بعد از جذب ، این فلز وارد خون می شود . فلزات در داخل پلاسما ی خون به میزان زیادی بصورت متصل به پروتئین منتقل می شود . جدول (۱) نحوه انتقال کادمیوم را در پلاسما ی خون نشان می دهد .

CADMIUM UPTAKE INTO CELLS

Table 1 Complexes of Cadmium in blood plasma

1. Protein complexes = Cd-albumin	
2. Aquo-complex = $Cd^{2+} \cdot aq$	
3. Low molecular weight complexes:	
Cd-cysteinate ⁰	41.7%
Cd-cysteinate (OH) ⁻	39.7%
Cd-(cysteinate) ₂ H ⁻	5.1%
Cd-(cysteinate) ₂ ²⁻	1.3%
Cd-cystinate ⁰	11.4%
(May et al. 1981)	

جدول (۱) نحوه انتقال و نوع ترکیبی که کادمیوم در داخل پلاسما ی خون منتقل می شود را نشان می دهد. (اخذ شده از :

(Toxicol. and Environmental Chemistry Vol.18, pp. 239-248, 1988)

پروتئینی که در پلاسما ی خون کادمیوم به آن متصل می شود آللبومین (Albumin) نام دارد و بیشترین مقدار را بین فلز بصورت متصل به آللبومین در پلاسما ی خون منتقل می شود. مقداری از آن نیز به کمپلکسهای با وزن - ملکولی پائین که دارای گروههای -SH هستند متصل می شود و فقط مقدار کمی از آن بصورت محلول در پلاسما منتقل می گردد (Klug 1988) .

کادمیوم به گروههای -SH (-SH groups) سیستمین متصل شده و با تداخل عمل با گروههای سولفیدریل پروتئین ها اثرات خود را اعمال میکند (Lag 1987) . بطور کلی ، همه ما کروماتوکولهای موجود در سلولهای زنده که واجد تمهای الکترون دهنده هستند می توانند با کادمیوم یجا دپیوند کووالانسی یا یونی بنمایند به همین دلیل این فلزقا دراست با اسیدهای نوکلئیک و پروتئین ها و فسفولیپیدها پیوند برقرار نماید (Scheuhammer 1990) . مکانیسم و چگونگی ورود کادمیوم به سلولها ، بر حسب نوع و دودمان سلولی (Cell Line) متفاوت است :

در اربیتروسیتها : کا دمیوم به کمک انتقال غیرفعال (Passive transport) وانتشار وادسلول می شود چون تجمع این فلز در گلبولهای قرمز بسیار پائین است (Planas-Bohn 1988)

درهپا توسیتها : کا دمیوم به گروههای SH- غشاء متصل می شود و بعلمت تجمع زیاد این فلز در این سلولها بنظر میرسد که عمل انتقال در سلولهای کبدی بوسیله سیستم انتقال فعال (Active transport) باشد .

در سلولهای تخمدان ها مسترچینی (Chinese Hamster overy cells = CHO cells) : نتایج نشان می دهد که دریافت کا دمیوم در این سلولها بصورت یک پروسه پیچیده است که در آن فلز به رسپتور و آدگروه SH- در غشاء سلول متصل شده و سپس بوسیله یک مکانیسم انتقال فعال و یا احتمالاً آندوسیتوز داخل سلول منتقل می شود (Katoh 1984) .

حدود ۵۰٪ از کل کا دمیوم جذب شده در کبد و کلیهها تجمع می یابد ، در گلبولهای قرمز ، کلیهها و کبد ، کا دمیوم به پروتئینی با وزن ملکولی پائین بنام متالوتیونئین (Metallothionein=MT) که حاوی تعداد زیادی از باندهای سولفیدریل است متصل می شود . این پروتئین یک ماده حفاظتی است و تمایل زیادی به اتصال با فلزاتی نظیر کا دمیوم و روی دارد . در مواردی که فرد بطور حا در معرض مقادیر زیاد کا دمیوم قرار می گیرد بعلمت اشباع شدن متالوتیونئین با این فلز ، اثر حفاظتی آن از بین می رود . متالوتیونئین بدلیل ترکیبی زیادی که با کا دمیوم دارد به آن متصل می شود و در نتیجه از اتصال این فلز با سایر ماکرومولکولها جلوگیری می کند (Klaassen 1983)

نیمه عمر کا دمیوم ۱۰-۳۰ سال است به همین دلیل تمایل این ماده برای تجمع در محیط زیاد است میزان کا دمیوم در بدن یک فرد ۵ ساله در آمریکا بطور