مجلهٔ علوم دانشگاه تهران جلد ۱۷ شماره‌های ۱ و ۲ سال ۱۳۶۷ ازصفحهٔ ٤٥ تا ٥٢

مطالعهٔ تأثیر سمی میوفر (آهن) روی ماهی

دکتر غلامرضا نورزاد

گروه زیست شناسی دانشکدهٔ علوم دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

تأثیر سمی میوفر روی اعضاء ماهی و رشد اووسیت‌ها و جنین بررسی گردیده است. نتایج بدست‌آمده نشان می‌دهد، که میوفر رشد جنینی را در این جانور کند کرده ، تغییراتی نیز در غشاء سیتوپلاسمی سلولها ایجاد مینماید . از جمله محدودیت میکروویلی را در سلول های پلاتی پوسیلوس‌ماکولاتوس باعث شده ، و در غلظت‌های بالا سبب مرگ حیوان می‌گردد.

اختلالات بوجود آمده در رشد جنین ،احتمالا مربوط به اثرات بازدارندهٔ میوفر روی فعالیت پروتئین های حامل آهن نظیر : آپوفریتین،هموزیدرین، بتاوگاماگلوبولین، و نیز تداخل در متابولیسم‌آهن است.

J. of Science, Univ. of Tehran (1988) **17**, 45 - 52.

Studies on the toxic effects of Iron - bond Myofer

Dr. G. Noorzad

Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University, Mashad

Abstract

The toxic effects of myofer on the organs of fish and development of oocytes and embryos were investigated. The results indicate that myofer delays the embryonic development, cause changes in the cytoplasmic membrane of the cells and limits the microvilin the cells of the platipoecilus maculatus, and at the higher doses results death in the animal.

The disturbances in the development of embryos are probably due to the inhibitory effects of myofer on the activity of iron - bound proteins such as apoferritin, hemosiderin, B_1 and γ globulin, causing interference with iron metabolism .

مقدمه

استفاده از مواد مشخص و علامت‌گزاری‌شده از سالهاقبل در بافت‌شناسی‌وسیتولوژی معمول‌بوده است. آنچه‌ارائه میگردد بخشی از یک‌سری تحقیقات مفصل در زمینه هیستوشیمی و سیتولوژی با کمک میکروسکپ الکترونی‌است که درباره نحوه جذب و انتقال‌این ماده بین مادر و جنین در این نوع ماهی‌صورت‌گرفته است. هدف از این تحقیقات مطالعه پدیده Ovipari و Ovovivipari ، همراه آن کیفیت ومکانیسم جذب و انتقال و بالاخره سرنوشت این ماده در سلول تخم و سایر بافتهای بدن جانور بوده‌است. تأثیر سمی میوفر در حاشیه این مطالعات جلب توجه کرد.

سمیت ترکیبات آهن پیش ازاین نیز بوسیله دیگران مثل (Gedigk, ۱۹۰۳)و(Propst, ۱۹۰۳ و Schmidt, ۱۹۶۲)مطالعه گردیده است.

ماده شیمیائی که‌غالباً در این تحقیقات‌مورد استفاده قرارگرفته

میوفر* می‌باشد. این ماده دارای وزن ملکولی برابر/۷۰۰۰۰ واندازه ذرات آن تقریباً ۷۰ آنگستروم می‌باشد.

همانطوریکه آزمایشات انجام‌شده پیشین نشان میدهند، این ماده بخاطر کیفیت تحمل پذیری مخصوصش بوسیله موجود تحمل میگردد واز این نظر بارها برای آزمایشات میکروسکپی مورد استفاده قرارگرفته‌است (Wegmann &Gotting, ۱۹۷۱- Schmidt, ۱۹۶۲ Eichelberg & Wessing, ۱۹۷۱ (Nourzad, ۱۹۸۲). با وجود این میوفر مخصوصاً چنانچه در دوز بالا به‌جانور تزریق گردد روی ماهی تأثیر سمی باقی‌میگذارد ورشدجنینی را بطور منفی تحت تأثیر قرار میدهد.

مواد و روش

مواد: جانوران مورد آزمایش افراد ماده زنده‌زای ماهی Platypoecilus maculatus (Poecilidae) به‌بزرگی ٤-۳ سانتی‌متر درآکواریوم درآب معمولی ودرجه‌حرارت تقریباً ۲٤C° نگاهداشته میشدند. برحسب‌سن و اندازه جانور به هرکدام بین ۰٫۰ تا ۱٫۰ میلی‌لیتر میوفر که بامحلول فیزیولوژیکی نمک طعام (PH=٦/٥) به‌نسبت‌های ۱:۱ و ۲:۱ و ۳:۱ رقیق‌شده ویامیوفررقیق نشده درون حفره شکمی تزریق گردید.

برای کنترل بهتر نوزادان، جانوران مورد آزمایش جداگانه نگهداری و ماهیانیکه بامیوفر رقیق تزریق‌شده بودند بعداز ۱٤، ۲۰ و ۳۰ روز به‌منظور انجام‌مشاهدات سیتولوژیکی کشته‌میشدند.

روش مطالعه با میکروسکپ الکترونی

برای تحقیقات سیتولوژیکی، نمونه‌ها بعداز جداشدن مستقیماً داخل محلول بافر سرد وارد شده و داخل آن قطعه‌قطعه میگردند. محلول فیکساتور طبق روش (Sjostrand, ۱۹۵٦) و یا مخلوط ٥٪ گلوتارآلدئید و فسفات بافر (pH=۷٫۳-۷٫٤) و مرحله دوم ثبوت به‌کمک تترا اکسیداسمیوم (OSO_4) ٤٪ صورت می‌پذیرد.

بعد از عمل ثبوت، قطعات بافت در محلول بافر شسته‌شده ودر استون آبگیری میشوند. در مرحله استون ۷۰٪، مخلوط کنتر است دهنده شامل اورانیل استات ۱٪ و فسفورولفرام اسید ۱٪ (۱۹۵۷ Wohlfarth & Bottermann) در استون ۷۰٪ ساخته شده، و بافت‌ها به مدت ۲ ساعت درحرارت معمولی آزمایشگاهی درآن قرار میگیرند. عمل خواباندن بافت در وستوپال انجام و برای مشاهده مقاطع اولترا میکروتوم از یک میکرسکپ الکترونی EM9 استفاده میشود.

نتایج

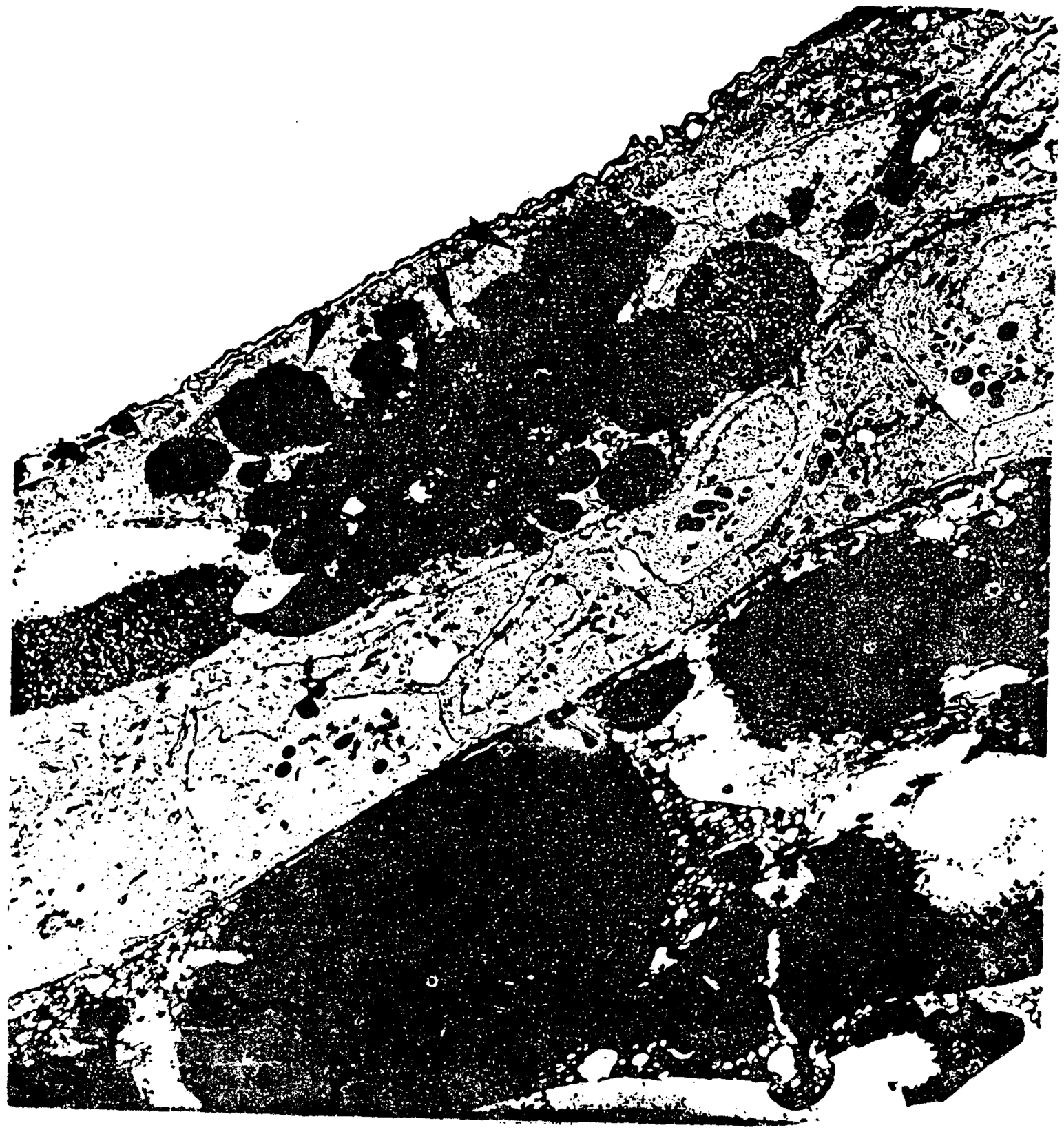
ضمن انجام آزمایشات بعداز تزریق میوفر جانوران بطورانفرادی عکس‌العمل متفاوتی ازخودنشان میدهند. تزریق میوفر غلیظ مرگ بیشتر جانوران را بدنبال دارد. از عکس‌العمل های ظاهری حیوان پس‌از تزریق عدم تمایل به‌غذا، گاه عدم‌تحرک، و بالاخره‌طولانی شدن دوران بارداری درحدود ٥ تا ۱۰ روز می‌باشد.

درجنس های‌ماده‌ایکه ۲۰ روزبعداز تزریق‌میوفر کشته‌شده‌اند، فقط قسمتی از ذخیرهٔ زرده مورد استفاده قرار گرفته و رشد جنینی کامل نشده و اووسیت‌ها (Oocytes) درمراحل مختلف رشد دیده میشدند. از این مشاهدات نتیجه میشود، که ادامه رشد اووسیت‌ها وجنین‌ها با تزریق میوفر کند یاحتی متوقف شده‌اند، و بهمین دلیل حتی‌بعدازگذشت چندهفته پس‌ازتزریق تولد جدیدی صورت نمی‌گیرد.

بررسی سیتولوژیکی اووسیت‌ها و جنین‌ها باکمک میکروسکپ الکترونی جذب و انباشته‌شدن ذرات آهن یا ملکولهای میوفر را در اووسیت و اندامهای جنین نشان میدهد. تراکم ذرات آهن در زمانهای کوتاه (۱٤-۸ ساعت) درلایه‌های خارجی و Ooplasma تقریباً یکنواخت ولی‌بعداز ۱٤ و ۲۰ روزکه‌ازجذب میوفرمیگذرد، تراکم آن در لایه‌های اووسیتها از خارج (Theca folliculi) به‌داخل کم میگردد به نحویکه در این‌زمانها جذب ذخیره‌ای در داخل سلول تخم انجام‌نگرفته وفقط درخارج‌از اووسیت‌جذب میوفر ادامه می‌یابد (شکل ۱ و ۲).

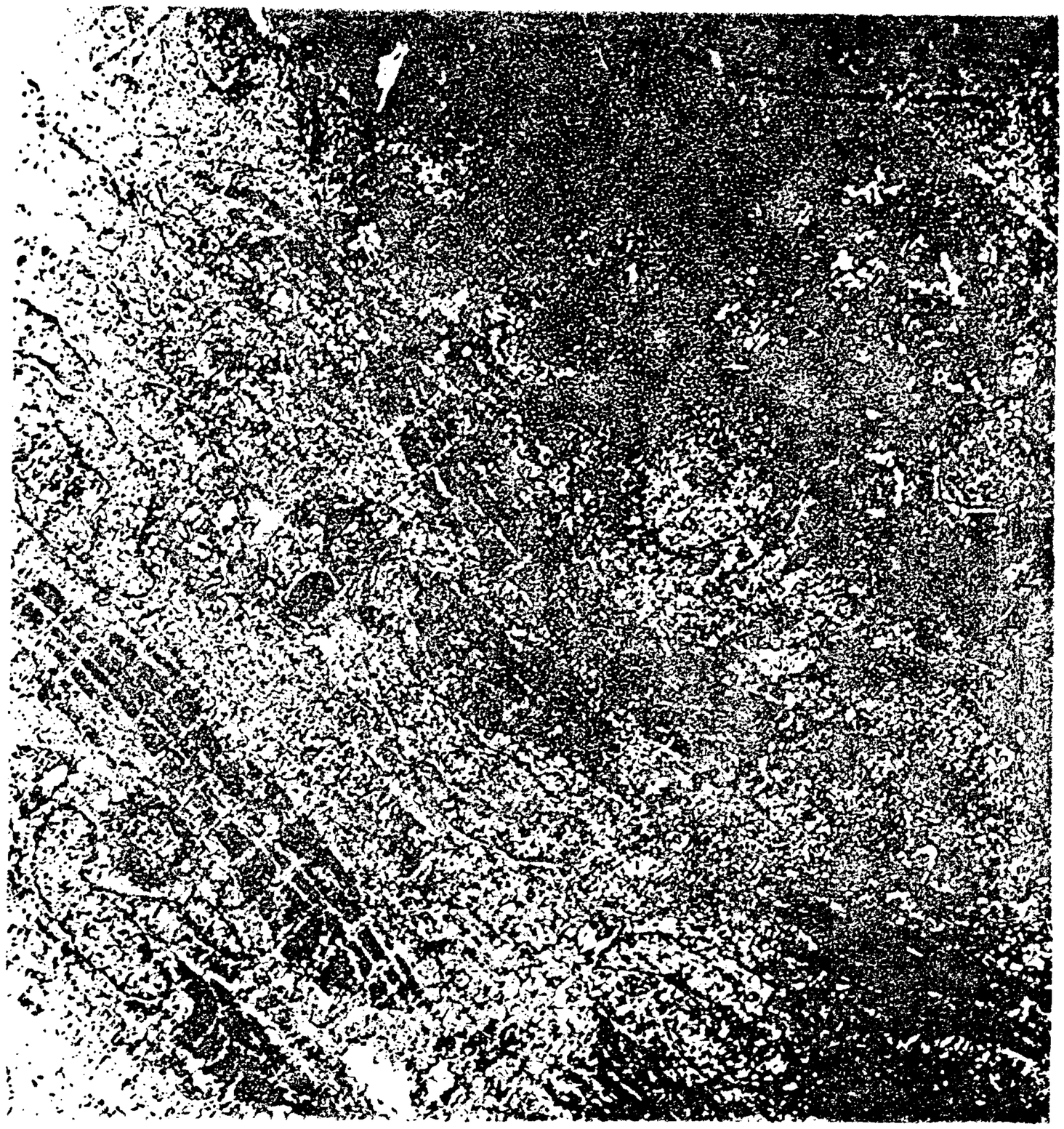
پخش میوفر در جنین در اعضاء مختلف‌متفاوت است و بخش اعظم آن در اندامهای خونسازذخیره میگردد. ۸ روز بعداز تزریق، ارگانلهای ذخیره‌ای حتی در سلولهای همراه سلولهای عضلانی در حال رشد جنین‌از ذرات متراکم آهن انباشته شده‌اند (شکل ۳). بعداز ۲۰ روز ذخایر میوفر در اووسیت بدون تغییر به‌نظر میرسند، در حالیکه ضمن آن سلولهای تخمدان (Ovary) و جنین به‌ذخیره‌آهن ادامه میدهند، این ذخایر در سلولهای تخمدان بصورت واحد های مدور با تراکم متفاوت مشاهده میگردند. میوفر تقریباً بیشتر فضای سلولی را بشکل سیتوزومهائی به اندازه‌های تقریبی ۰٫۳ تا ۷ میکرون پر می‌کند. درکبد قسمت اعظم فضای درون سلولی انباشته از میوفر می‌باشد. تغییرات‌سیتولوژیکی درمادربصورت کوتاه شدن میکرو ویلی‌ها در سلولهای کبدی و نیز افزایش فضای بین سلولها که در بعضی نقاط از بین رفتن اتصالات بین سلولی را به دنبال‌دارد مشاهده می‌گردد (شکل ٦-٤). سیستم رتیکولواندوتلیال درطحال به مقدار قابل توجهی از آن ذخیره کرده‌اند (شکل ۷).

* ترکیبی از قند دکستران و اتم آهن که با اتصالی محکم به یکدیگر مربوط شده و محصولی از کارخانهٔ هوخست آلمان غربی می‌باشد. این ماده در پزشکی و دامپزشکی برضد کمبود آهن مورد استفاده قرار می‌گیرد.



تصویر شماره ۱
تخمدان، ۱٤ روز پس‌از
تزریق میوفر(فلش ها).
درشتنمائی × ۲۸۰۰

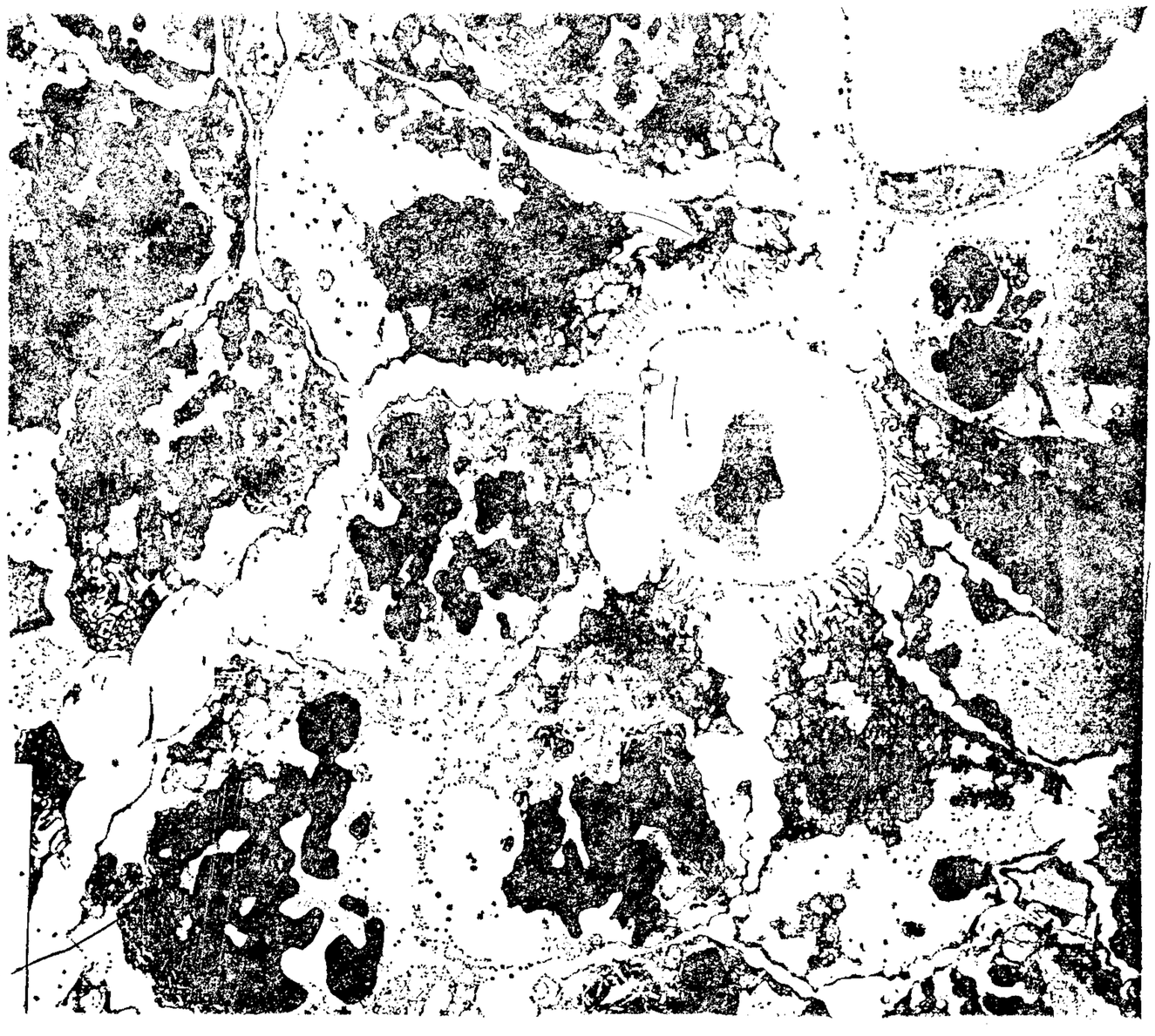
تصویر شماره ۲
میوفر در بافتهای جنینی
۲۰ روز پس از تزریق
(فلش ها).
درشتنمائی ×۱۹۰۰



تصویر شماره ۳
بخشی از بافت عضلانی با میوفیبریلهای در حال رشد از جنین ماهی. سلولهای همراه این سلولها ۸ روز پس از تزریق، مقادیر نسبتاً زیادی میوفر ذخیره کرده‌اند که با فلش مشخص شده‌اند.
درشتنمائی × ۱۱۸۰۰

تصویر شماره ٤-
برش عرضی از یک سینوزوئید کبدی با دوگلبول قرمز درون آن. تراکم میکرو ویلی ها در اطراف سینوزوئید دیده میشود. این میکرو - ویلی‌ها موجب ازدیاد سطح جذب در سلولهای کبدی مجاور سینوزوئید می‌گردند.
درشتنمائی × ۱۹۰۰۰

تصویر شماره ٥ ـ
با درشت‌نمائی بیشترشدت
فعالیت پینوسیتوزی در
قاعده میکرو ویلی‌ها
مشاهده می‌شود (فلش).
درشتنمائی × ۲۹۰۰۰



تصویر شماره ٦ـ
سلولهای کبدی در اطراف
یک سینوزوئید، ۲۵ روز
پس از تزریق میوفر کوتاهی
میکرو ویلی ها ، افزایش
غیرعادی فضای بین‌سلولی
سلولها، ونیزترا کم‌فراوان
میوفر به شکل توده های
تیره، درون‌سلولهای کبدی
جلب توجه می کنند.
درشتنمائی × ۱۱۸۰۰

تصویر شماره ۷-
بخشی از طحال ۶ ۲ساعت
پس از تزریق. سلولهای
شبکه رتیکولر مقادیر
زیادی میوفرذخیره کرده‌اند
(فلش ها). ذرات میوفر در
پلاسمای خون نیز جلب
توجه می کنند.
در شتنمائی × ۱۹۵۰۰

درجنین پس‌از ۲۰ روز بزرگی ذخایر میوفر در مقایسه با تخمدان کمتراست(شکل ۵).

بحث وبررسی نتایج

مطالعات نشان‌میدهند که استفاده از مقادیر نسبتاً زیاد میوفر ماهی را مسموم می‌نماید و موجب بروز سمپتومهٔ ئی میگردد که یکی از آنها طولانی‌شدن‌دوران بارداری یا کندتر شدن‌رشد وتکامل جنینی در نزد این جانور است.

(Gedigk, ۱۹۵۳) به‌این مطلب اشاره نمود که قدرت سنتز سلولهٔ ی آسیب دیده کاهش یافته و توانائی کمتری در ساختن آپوفریتین نشان می‌دهند و در نتیجه راندمان کمتر در اتصال آهن دریافتی و جذب آهن و ذخیره آن دارند . (Propst, ۱۹۵۳) بطور تجربی نشان داد که فعالیت تقریباً تمام سلولهای متحرك سیستم‌رتیکولوم اندوتلیال (RES) در اثر جذب آهن بلوکه به‌نظر میرسد و درطحال کاهش فولیکول‌هارادلیل تأثیرسمی‌آهن‌دانست.

در این آزمایشات تغییراتی در جانوران ملاحظه‌گردید که غالباً منجر به مرگ آنها گشته است. Clement, Finch و همکارا نشان(۱۹۵۰.)نشان دادندکه آهن به مقدارزیاد روی بافت‌تأثیر سمی میگذارد و عکس‌العمل بافت در مقابل آن بصورت فیبروز عضوی که درآن آهن انباشته شده است ظاهر میگردد . (۱۹۶۰. Bautzmann & Schmidt,) بعد از تزریق میوفر در Sauropsida (پرندگان‌وعده‌ای‌ازخزندگان) و Theropsida(عده‌ای ازخزندگان شبه پستاندار و پستانداران) تغییراتی در سیتوپلاسم سلولهای آمینون به‌نظرشان رسید که موجب عدم یکنواختی‌معمول سیتو پلاسم این سلولها بود که بعنوان تأثیر آهن توصیف‌گردید.

(Korfsmeier, ۱۹۶۶) ثابت نمود که تأثیر مواد سمی روی‌سلولهای‌بافعالیت‌پینوسیتوزی باکم‌شدن فضای‌بین میکرو ویلی ها همراه است که نتیجه‌اش کاهش انتقال موادبوسیله این‌ضمائم است (مشابه آن Schmidt, ۱۹۶۲). چنین تأثیری در میکرو- ویلی‌های سلولهای کبدی در این آزمایشات نیزبچشم می‌خورد و نتایج برای آزمایشات انجام شده در مورد ماهی نیز معتبر است.

آزمایشات انجام‌شده بر روی پلاتی پوسیلوس ماکولاتوس بعداز

یکبار تزریق ۰.۰ر. تا ۱ر. میلی لیتر میوفر نشان میدهند که تأثیر سمی آهن جذب شده رشد اووسیت ها را متوقف می‌نماید.

چنانچه دوران بارداری این حیوان را کـه ۲۲ روز طول می‌کشد (Andela ۱۹۷۶)، و اینکـه اولین لقاح ۷ روز - بعداز آخرین تولد صورت میگیرد درنظر بگیریم، میتوان قبول کرد که سیر منظم رشد جنین بعد از تزریق میوفر مختل گردیده است. زیرا ۲۵ روز بعداز جدائی ماده‌ها هنوز وضع حملی انجام نگرفته بود. اووسیت‌ها در مراحل مختلف رشد مشاهده شده و جنین‌ها ضمن اعمال پاراسیون برخلاف معمول ازخود واکنشی نشان نمی‌دادند. این عمل احتمالا در نتیجه تضعیف و یا توقف سوخت وساز آهن در اثر تراکم بیش ازاندازه آهن در ارگانلها پیش میاید. به این ترتیب عمل اتصال آهن بوسیله پروتئین های ناقل آهن مثل Transferrin (۱۹۵۷ & Globulin ، (Laurell, ۱۹۵۸) β_1 Globulin (Poche, Haemosiderin,Apoferritin, (Kuff & Delton, ۱۹۵۷) صورت نمی‌گیرد. باتوجه به تحقیقات انجام گرفته در مورد نوع انتقال فلزات سنگین میتوان نتیجه گیری مشابهی در باره آهن میوفرنمود؛ (۱۹۶۰ Staubesand,)و(Kuff&Dalton, ۱۹۵۷) گزارش میدهند که محلول کریستال طلا(Sol) و ذرات آهن هیچگاه بطورآزاد انتقال نمی یابند. (Schulz ۱۹۵۶) مینویسد، که ترکیبات آلی آهن هیچوقت آزاد در سلول وجود ندارند.

(Granik, ۱۹۴۶) و (Greenberg, ۱۹۵۵) نشان دادند که آهن به‌محض ورود به‌سلول به‌آپوفریتین متصل میگردد (۱۹۵۳ Gedigk و Strauss ملکول هموزیدرین را از جنبه هیستوشیمی مورد آزمایش قرار دادند و نشان دادند کـه پیگمان هموزیدرین علاوه بر جزء آهن محتوی پلی‌ساکارید، پروتئین و چربی می‌باشد. در این رابطه آنها متوجه تفاوتهای ساختمانی بین پیگمان هموزیدرین در سلولهای مختلف گردیدند، که درهربافت تمایل متفاوتی رانسبت به ترکیب آهن و بالانتیجه ذخیره آهن دربافت موردنظر بوجود میآورند. واین خود علت اختلاف مقدارآهن ذخیره‌ای را دربافت‌های مختلف در این آزمایشات توجیه می‌نماید.

باتوجه به تحقیقات صورت گرفته در باره نقش مؤثر آهن در خونسازی و اعمال عضلات وگلبولهای سفید، مخصوصاً اثرات رفتاری کـــه کمبود آن حتی در انسان (Addy, ۱۹۸۶) ایجاد می‌نماید، می‌توان تغییرات رفتاری حیوان را نیز به اختلالات ناشی از سوخت‌وساز ناقص آهن مربوط دانست.

بدلیل تحقیقات فوق و نتایج حاصل از آزمایش با میوفر در مورد پلاتی پوسیلوس ماکولاتوس به نظر میرسد که ورود آهن با دوز بالا به ارگانیسم باعث تغییرات سیتولوژیکی میشود که درنهایت منجر به اختلال در واکنش های حیاتی درون سلولی میگردد.

افزایش طول زمان بارداری ، کندی رشد جنین، کاهش اندازه میکروویلی ها در سلولهای جذب کننده که احتمالا می‌تواند نتیجه مصرف غشاء در جریان پینوسیتوز و عدم ترمیم آن باشد به‌همین اختلالات مربوط می‌گردد.

References

Addy, D.P. (1986) Brit. Med. J. **292**, 969

Andela, H. H. (1976) in Vitro - Kultur und Aufzucht Von Embryonen Lebendgebärender Zahnkar - Pfen der Gattung Xiphophours. *Zool. Anz.* (*Jena*). **197 (1/2)**, 1 - 5

Bautzmann, H. & Schmidt, W. (1960) Vergleichende elektronenmikroskopische untersuchugen am amnion von sauropsidenu. Mamalien. *Z. Zellforsch.* **51**, 571 - 588.

Clement, A. Finch, et al. (1950) Blood. J. Hemat. 5 (2)

Eichelberg, D. & A. Wessing (1971) Elektronenmikros - Kopische untersuchungen an den Nierentubuli. (Malpighische gefässe) von Drosophila melanog - aster. *Z. Zellforsch.* **121**, 127-152 .

Gedigk, P. (1953) Die funktionelle Bedeutung des Eisenpigmentes . *Ergeb. allg. Path. Anat.* **38**, 1 - 45.

Gedigk. P & G. Strauss (1953) Zur Histochemie des Hamosiderins *Verh. Dtsch. Gs . Path* **37**, 24

Granick, S. (1946) Ferritin IX. Increase of protein apoferritin in the gastrointestinal mucosa as a direkt response to the iron feeding. the function of ferritin in the regulation of iron absorption . *J. biol. chem.* **164**, 737

Greenberg, D. M. (1955) Zitat in : Kuff, E.L. & Dalton, A. G. (1957) : Identification of molecular ferritin in homogenates and sections of rat Liver . *J. Ultrastruc : Res.* **1**, 62 - 73.

Korfsmeier, K. H. (1966) Zur genese der Dottersynthese inder oocyte von Brachydanio rerio . *Z. Zellforsch.* **61**, 634 - 485.

Kuff; E. L. & A. J. Dalton (1957) identification of molecular ferritin in homogenates and sections of rat Liver *J. ultrastruc.* Res. **1**. 62 - 73 .

Laurell. C.B. (1958) Zitat in Eisenstoffwechsel, S. 82-92. in : Keiderling, W. 1959 Stuttgart, George Thime.

Linder, E : (1958) Der elektronenmikroskopische Nachweis von Eisen im Gewebe. *Ergeb. Aalg. path. Anat.* **38**, 46 - 91 .

Linder, E. & W. Gusek. (1960) Elektronenmikrosko - pische Untersuchungen an lymphknoten nach Dextranzufuhr . *Frankfurter Z. path* **V**. 367 - 388.

Poche, R. (1957) Zitat in : Linder, E. (1958) Der elek - tronenmikroskopische Nachweis von Eisen im Gewebe . *Ergeb. allg. Path. Anat.* **38**, 46 - 96

Propst, A. (1953) über die Ablagerung intravenos zugefuhrten Eisens . Tierexperimentelle untersuchungen . *Schweiz. Z. Allg. Path.* **17**, 147.

Schmidt. W. (1961) Elektronenmiroskopiche Unter - suchungen des interzellularen stofftransportes inder Dünndarmepithelzelle nach Markierung mit Myofer . *Z. Zellforsch.* **54**, 803 - 806 .

Schmidt, W. (1962) Elektronenmikroskopische Untersuchungen der strukturellen Veränderungen im rindenbreich des Amphibieneies im ovar und nach der Befruchtung. *Z. Zellforsch.* **54**, 118 - 146 .

Schulz, H.(1956)Elektronenmikroskopische Untersuchungen der normalen Lunge und der Lunge bei Mineralstonese. Virchows Arch. Path. Anat. 328 , 582

Staubsand, J. (1960) Experimentelle elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Phanomen der Membranvesikulation (Pinocytose) *Klin. Wsch.* **38**, 1284 .

Wegmann, I. & K, J. Götting (1971) Untersuchungen Zur Dotterbildung in den oozyten Von Xiphophorus helleri . *Z. Zellforsch.* **119**, 405 - 433

Wohlfarth - Bottermann. K. E. (1963) Grundelemente Der Zellstruktur . *Naturwiss.* V. S. 77 - 90.

Nourzad, G. (1982) Licht - und elektronenmikroskopische untersuchungen über den stofftransport zwischen Mütter und Ei bzw. Embryo bei Platypoecilus maculatus . 1. zool. Unstitut. Giessen W. Germany.