

بررسی اثر مزمن کلرور روی ($ZnCl_2$) بر محور هیپوفیز - گناد (P-G) در موش Rat ماده

دکتر شهربانو عریان^(۱)، مهدی راهنما^(۲)

خلاصه

در مقاله حاضر اثر مزمن کلرور روی بر سطوح هورمونی محور هیپوفیز - گناد مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق موشهای Rat ماده بالغ مورد استفاده قرار گرفتند. محلول کلرور روی به مدت ۳۶ روز (یک روز در میان) به صورت داخل صفاقی به مقدار $4/66 \text{ mg/kg}$ تزریق گردید. نمونه‌های خونی به روش خونگیری از قلب و در مرحله Proestrus تهیه گردیدند و سنجش هورمونهای استرادیول، پروژسترون، پرولاکتین و گونادوتروپین‌های سرم خون به روش رادیوایمنونواسی (RIA) انجام گرفت.

نتایج نشان داد که مقدار استرادیول گروه تجربی (Experimental) نسبت به گروههای کنترل و Sham به میزان قابل ملاحظه‌ای ($P < 0/05$) کاهش داشته است. بر خلاف استرادیول، پروژسترون سرم چندان تحت تأثیر قرار نگرفته است که احتمالاً علت آن جمع‌آوری نمونه‌های خونی در مرحله Proestrus بود که در این مرحله ترشح هورمون پروژسترون به مینیم مقدار خود می‌رسد.

مقدار LH گروه تجربی در مقایسه با گروههای Sham و کنترل، کاهش قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد ($P < 0.05$) در حالی که میزان FSH گروه تجربی نسبت به گروههای Sham و کنترل تغییری نشان نمی‌دهد.

اندازه‌گیری مقدار پرولاکتین گروه تجربی نشان می‌دهد که میزان پرولاکتین گروه تجربی نسبت به گروه کنترل و Sham تغییرات معنی‌داری ندارد ($P < 0.05$).

اطلاعات بدست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که تماس مزمن با روی (Zn) ممکن است باعث آسیب و تضعیف عمل غدد داخلی و سیستم تولید مثل در جنس ماده شود و احتمالاً آسیب تخمدانها ناشی از این اثرات هستند.

واژه‌های کلیدی

ایران، زنجان، دانشگاه علوم پزشکی، کلرور روی، هیپوفیز - گناد، Rat

مقدمه

خاصیت قابض و خشک‌کننده می‌باشد. مقدار روی (Zn) تام بدن در یک فرد ۷۰ کیلوگی حدود ۲/۲ گرم بدست آمده است. در پستانداران غلظت روی (Zn) در نوزادان کمتر از بزرگسالان است و در شیرخوارگی این میزان افزایش می‌یابد و پستانداران جوان، روی (Zn) مورد نیاز خود را از شیرمادر بدست می‌آورند. در

«کلرور روی» به فرمول $ZnCl_2$ با وزن مولکولی ۱۳۶/۲۹، نمکی است سفید رنگ و بسیار محلول در آب با خاصیت اسیدی که خیلی جاذب الرطوبه بوده و ظاهرش مانند اجسام چرب می‌باشد و در ۲۵۰ درجه سانتیگراد ذوب می‌شود. بطوریکه موضعی آنتی‌سپتیک (ضد عفونی کننده) و قابض است. محلول ۲-۱۰ درصد آن دارای

۱- عضو هیئت علمی دانشگاه تربیت معلم

۲- عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی زنجان

نشانه‌های بالینی کمبود روی (Zn) شامل کوچکی جثه، کمی رشد غدد جنسی، بزرگی کبد و طحال و کم خونی ناشی از کمبود آهن می‌باشد.

بررسی‌ها نشان داده که روی (Zn) یکی از مواد متشکله متالوآنزیم‌ها است. تعداد زیادی از متالوآنزیم‌ها که روی (Zn) یک عامل ساختاری در آنها می‌باشد عبارتند از: پانکراتیک کربوکسی پپتیداز، آلکالین فسفاتاز، الکل (مالیک، لاکتیک، گلوتامیک)، دی‌هیدروژناز و تریپتوفان دزمولاز. در اثر کمبود روی (Zn) تغییراتی در آنزیم‌های حاوی روی (Zn) ظاهر می‌گردد مثلاً در بیضه باعث کاهش لاکتیک دهیدروژناز (LDH)، مالیک دهیدروژناز (MDH) و الکل دهیدروژناز می‌شود. در استخوانها کاهش فعالیت (LDH) و (MDH) و (ADH) و آلکالین فسفاتاز دیده می‌شود. در مری، مالیک دهیدروژناز (MDH) و الکل دهیدروژناز (ADH) و در کلیه‌ها فعالیت (MDH) و آلکالین فسفاتاز کاهش می‌یابد.

مواد و روش کار:

حیوانات مورد آزمایش در این تحقیق، موش صحرایی (RAT) با میانگین سنی ۲-۲/۵ ماه بودند، وزن متوسط آنها ۲۰-۲۵ gr و درجه حرارت محیط پرورش در ۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد حفظ گردیده و حیوانات در پرید نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در مرحله اول حیوانات در سه گروه بیست تایی بطور تصادفی قرار داده شدند، شامل گروه تجربی، شاهد و Sham. در مدت زمانی بالغ بر ۳۶ روز بطور یک روز درمیان حدود (LD_{50}) $\frac{1}{3}$ کلرید روی به مقدار ($4/66 mg/kg$) به صورت داخل صفاقی تزریق گردید تا میزان تغییرات سطح هورمون‌های هیپوفیزی شامل LH و FSH، پرولاکتین و سطوح هورمونهای گونادی شامل استروژن و پروژسترون در موش RAT ماده مورد بررسی

استخوانها و دندانها، روی (Zn) به میزان زیادی حدود ($150-250 ppm$) دیده می‌شود.

همچنین روی (Zn) عامل مهمی در پلاسما، سرم و گویچه‌های سرخ و سفید است و غلظت آن در گویچه‌های سرخ می‌تواند سرچشمه‌ای برای بررسی غلظت آنزیم ایندر از کربنیک در مراحل مختلف تنفسی باشد. در حالت عادی غلظت روی (Zn) $5/6$ میکروگرم در هر میلی‌لیتر خون است.

ارتباط بین روی (Zn) و قابلیت باروری منی (Semen) کاملاً روشن نیست با این حال در جریان کمبود روی، تکامل رشد بیضه‌ها به تعویق می‌افتد و آتروفی توبول‌ها، اپی‌تلیوم، کاهش در DNA و RNA، پروتئین ملاحظه می‌گردد و همچنین به نظر می‌رسد که کاهش تعداد اسپرم‌ها (Oligospermia) نیز در اثر کمبود روی (Zn) باشد.

مطالعات نشان می‌دهد که قرصهای ضدبارداری خوارکی سطوح فیزیولوژیک روی (Zn) را کاهش می‌دهند ضمناً وجود مقدار کافی روی (Zn) در اسپرم هنگام مراحل آخری تکامل اسپرم، جهت اسپرماتوزن و زنده نگهداشتن اپیتلیوم ژرمینال ضروری به نظر می‌رسد.

جذب روی (Zn) به صورت اصلی در روده کوچک صورت می‌گیرد که قسمت عمده این جذب در دئودنوم می‌باشد. با افزایش سن، جذب روی (Zn) نیز افزایش می‌یابد. این عنصر چه از راه خوراکی و چه از راه تزریقی، معمولاً توسط مدفوع دفع می‌شود و اندازه دفع روی (Zn) از راه ادرار نسبت به مقدار دریافتی آن بسیار کم است این مقدار $0/9-0/1 mg/day$ می‌باشد. در ضمن مقدار قابل ملاحظه‌ای از روی (Zn) بوسیله عرق از بدن دفع می‌گردد. کمبود روی (Zn) در موش باعث توقف نمو، ریزش مو، درماتیت، دگرگونی اشتهای و تأخیر در رشد بیضه‌ها می‌شود.

هیپوتالاموسی هیپوفیزی به غده هیپوفیز قدامی حمل می‌گردند. فاکتورهای آزادکننده و مهارکننده در هیپوفیز قدامی بر روی سلولهای هدف خود عمل کرده و ترشح آنها را کنترل می‌کنند. هیپوتالاموس تقریباً سیگنالها را از کلیه قسمت‌های سیستم عصبی دریافت می‌کند و نورونهای خاصی در هیپوتالاموس فاکتورهای موسوم به فاکتورهای آزادکننده (Releasing factors) و مهارکننده (Inhibitory factors) هیپوتالاموسی را تولید و ترشح می‌کنند که ترشح هورمونهای هیپوفیز قدامی را کنترل می‌نمایند. GnRh موجب آزاد شدن هورمونهای LH و FSH شده و فاکتور مهارکننده پرولاکتین PIF موجب مهار ترشح پرولاکتین می‌گردد.

محور هیپوفیز - گنادی

آدنوهیپوفیز دو هورمون گنادی به نامهای، هورمون محرک فولیکول (FSH) و هورمون محرک جسم زرد (LH) یا هورمون محرک یاخته‌های بینابینی (ICSH) که هورمون تشکیل دهنده جسم زرد در تخمدان جنس مؤنث و بوجود آوردنده بافت فضای داخل بیضه در جنس مذکر است، را ترشح می‌کند.

در جنس ماده، FSH موجبات رشد فولیکول گراف را در تخمدان فراهم کرده، LH بر رشد جسم زرد نظارت می‌کند و جسم مزبور به نوبه خود هورمون جنسی دیگری به نام پروژسترون را ترشح می‌کند که برای حفظ و برقراری بارداری اهمیت دارد. در جنس نر LH با اثر بر یاخته‌های لایدیگ باعث ستر تستوسترون می‌شود که این امر باعث بقاء اسپرماتوزن و رشد و تکامل اعضاء ثانویه جنسی می‌شود.

نتایج

نتایج بدست آمده در بررسی اثرات کلرور روی بر میزان هورمون‌های مترشحه از بخش قدامی هیپوفیز نشان

قرار گیرد. نحوه تزریقات بدین صورت بودند که گروه تجربی دوز مناسب از کلرید روی را که در ۵ml / ۰/۰۱ سرم فیزیولوژیک حل شده دریافت نموده و به گروه Sham فقط ۵ml / ۰/۰۱ سرم فیزیولوژیک تزریق می‌گردید تا استرس تزریق در نظر گرفته شود. و بعد از اتمام تزریقات با گرفتن اسمیرواژنی از موشهای که تحت بیهوشی قرار می‌گرفتند تا دچار حاملگی کاذب نشوند، موشهایی که در مرحله Proestrus قرار داشتند مشخص و سپس تمام این موشها بین ساعت ۵/۸-۷/۵ صبح تحت بیهوشی خفیف اتر قرار گرفته و با استفاده از سرنگ به سرعت خونگیری از قلب به عمل می‌آمد. پس از خونگیری سرلوله‌ها با پارافین پوشانیده شده و بوسیله سائتریفوژ، سرم به دقت جدا و تا زمان سنجش هورمونی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به صورت منجمد نگهداری می‌شدند.

در زمان سنجش با استفاده از روش Radio(RIA) Immuno Assay با فاز جامد، نمونه‌ها به دمای درجه حرارت اتاق رسانیده می‌شدند و در هر مورد طبق دستورالعمل خاص کیت مربوطه عمل می‌شد. و در مرحله آخر از هر مورد میزان تشعشع به مدت ۱ دقیقه توسط دستگاه شمارشگر اندازه‌گیری می‌شد و هر نمونه دو بار مورد سنجش قرار می‌گرفت. میانگین مقادیر بدست آمده جهت انجام محاسبات و تحلیل‌های آماری به کار گرفته می‌شد. در این پژوهش از آزمون X^2 جهت مقایسه اختلاف میانگین گروههای موجود استفاده نمودیم.

محور هیپوتالاموس - هیپوفیز:

تقریباً تمام ترشحات هیپوفیز توسط سیگنالهای هورمونی یا عصبی هیپوتالاموس کنترل می‌شود. ترشح هورمونهای هیپوفیز قدامی بوسیله هورمونهای موسوم به فاکتورهای آزادکننده هیپوتالاموس کنترل می‌شود و سپس از طریق رگهای خونی کوچک موسوم به رگهای باب

مخاطره انداخته باشد.

ثانیاً از آنجایی که سلولهای تکا در پاسخ به LH، استروئیدها بخصوص آندروژن‌ها را می‌سازند و سپس این آندروژن‌ها در لایه گرانولوزا به استروژن تبدیل می‌شوند لذا با توجه به کاهش معنی دار LH احتمالاً از سنتز آندروژن‌ها در سلولهای تکا نیز کاسته شده و در نتیجه، کاهش معنی داری را در میزان استرادیول ملاحظه می‌نماییم.

نتایج حاصل از سنجش هورمون پروژسترون مؤید این مطلب است که تحت تأثیر دوز مزمن کلرو روی؛ تغییرات معنی داری در سطح سرمی پروژسترون هیچ یک از گروه‌ها ملاحظه نمی‌گردد. این مسأله بعلت آن است که چون در تحقیق حاضر تمام نمونه‌های سرمی خون را در مرحله Proestrus تهیه نموده‌ایم یعنی مرحله‌ای که کمترین تغییرات سطوح هورمونی از نظر سیکل منس را در این ناحیه داریم لذا با توجه به این مطلب که ترشح پروژسترون توسط جسم زرد و در مرحله لوتئال صورت می‌پذیرد و در مرحله قبل از تخمک‌گذاری ترشح قابل توجهی را از پروژسترون نداریم، بنابراین طبیعی است که تغییراتی را بین سطوح پروژسترون در گروه‌ها مشاهده ننماییم.

نتایج بدست آمده از بررسی اثرات دراز مدت کلرو روی بر میزان سطوح هورمون پرولاکتین، تغییرات معنی داری را در مقایسه بین گروه‌ها نشان نمی‌دهد. بنابراین با توجه به عدم این تغییرات می‌توان نتیجه گرفت که کلرو روی در سطح هیپوتالاموسی و سطوح بالاتر تأثیر نکرده و تنها عمل خود را در مختل نمودن سیستم آندوکرینی با تأثیر بر گنادها و سیستم‌های فیدبکی اعمال نموده است. (۱۹۶۸) Rasmussen - D.O.

بررسی سطوح سرمی گونادوتروپین‌ها در اثر تزریق کلرو روی در مقام مقایسه با گروه‌های Sham و Control ($P < 0.05$) نشان دهنده تغییر معنی دار LH و عدم تغییر

می‌دهد که پس از تزریق بیش از ۳۶ روز، تغییرات بین سطوح هورمون‌های LH گروه‌های Sham و Experimental در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بوده و در مقایسه بین گروه Sham و گروه کنترل اختلاف معنی داری ملاحظه نمی‌گردد. (شکل ۱). ضمناً تغییرات معنی داری بین سطوح هورمون‌های FSH گروه‌های Sham و Experimental در مقایسه با گروه کنترل ملاحظه نمی‌گردد. (شکل ۲)

نتایج بدست آمده در ارتباط با پرولاکتین نشان می‌دهد که اختلاف معنی داری از نظر آماری بین گروه‌های تجربی و Sham با کنترل وجود ندارد. (شکل ۳). نتایج حاصل از بررسی اثرات کلرو روی بر میزان هورمون‌های مترشحه در گنادها نشان می‌دهد که میزان پروژسترون گروه‌های تجربی و Sham نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری را نشان نمی‌دهد. در ارتباط با استرادیول بررسی‌های آماری نشان می‌دهد که کاهش در میزان استرادیول گروه تجربی نسبت به گروه شاهد معنی دار بوده و نسبت به گروه شاهد و گروه کنترل اختلاف معنی داری ملاحظه نمی‌شود. (شکل ۴).

بحث

نتایج بدست آمده در بررسی اثرات مزمن کلرو روی بر میزان ترشح هورمون‌های گنادی نشان می‌دهد که کاهش در میزان استرادیول سرم بعد از ۳۶ روز تزریق کلرو روی به صورت یک روز در میان نسبت به گروه‌های Sham و Control معنی دار می‌باشد.

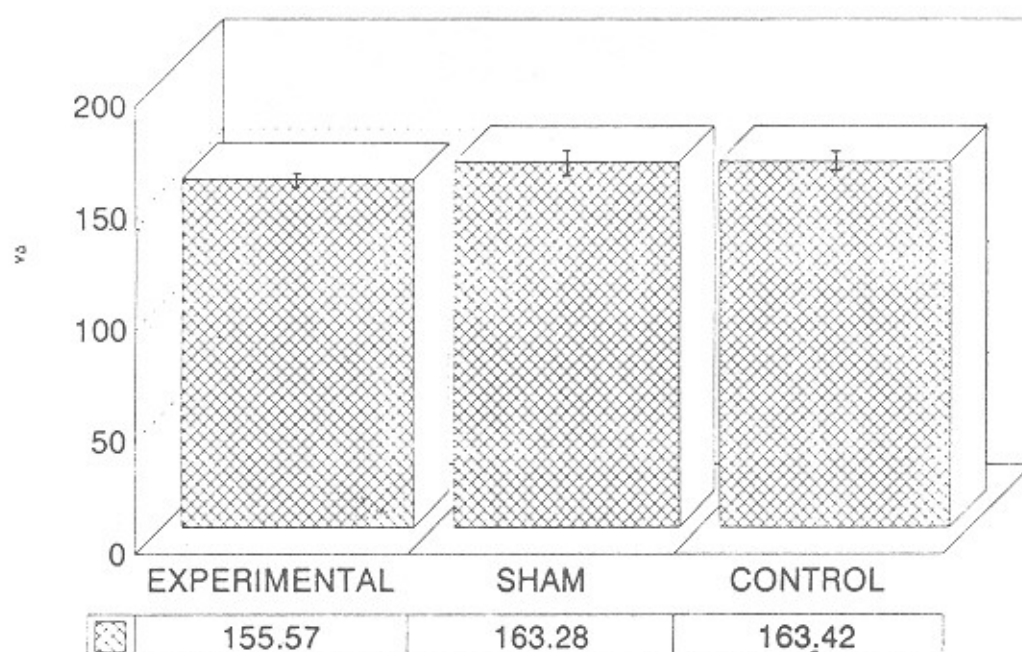
از آنجائی که ما از تمام موشهای Rat مورد آزمایش در مرحله Proestrus (قبل از تخمک‌گذاری) خونگیری بعمل آوردیم لذا این احتمال وجود دارد که کلرو روی با اثر مهارى بر مسیر آنزیمی آروماتیزاسیون (فعالیت آنزیم آروماتاز در سلول گرانولوزا) روند تولید استرادیول را به

کاهش در میزان استرادیول در تخمدانها و با تأثیر بر مرکز سیکلیک (هیپوتالامیکی) از طریق فیدبک مثبت، استرادیول باعث کاهش مقدار LH گردیده است.

نتایج این بررسی نشان می‌دهد که اختلالات در فرایندهای تولید مثلی ناشی از در معرض قرار گرفتن با روی (Zn)، ممکن است باعث عدم تعادل ایجاد شده‌ای باشد که روی (Zn) در تولید یا ترشح هورمونهای جنسی و گونادوتروپین‌ها بوجود می‌آورد و این اثر ممکن است موجب آسیب و تضعیف عمل غدد داخلی و سیستم تولید مثلی در جنس ماده شود و احتمالاً آسیب تخمدانها مستول این اثرات است.

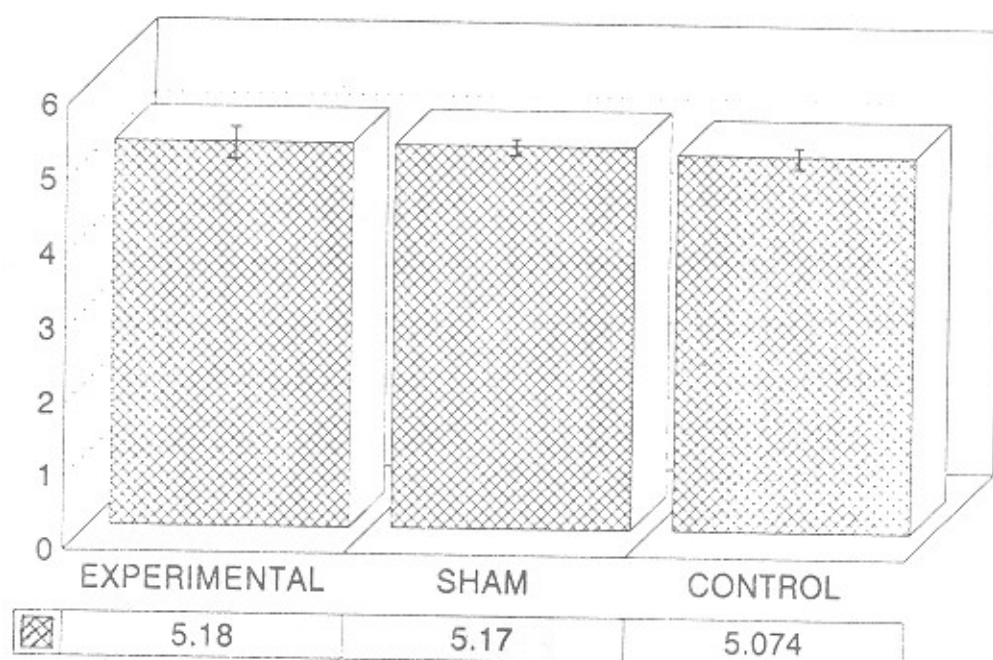
معنی دار FSH می‌باشد که علت آن را چنین می‌توان تفسیر نمود که احتمالاً کلروروی (Zncl₂) بوسیله تأثیری که بر تخمدان گذاشته باعث کاهش میزان استرادیول گردیده است، و از این طریق با ممانعت از افزایش گیرنده‌های GnRH در هیپوفیز قدامی از ترشح زیاد LH در مراحل اولیه سیکل قاعدگی نیز جلوگیری می‌نماید.

میزان FSH توسط فیدبک منفی مهاری استرادیول تنظیم می‌شود و با نتیجه تحقیق ما که به واسطه پایین آمدن مقدار استرادیول میزان FSH تغییری ننموده است و حتی به مقدار بسیار جزئی بالا نیز رفته است هماهنگی دارد. به نظر می‌رسد که تزریق مزمن کلرور روی به واسطه



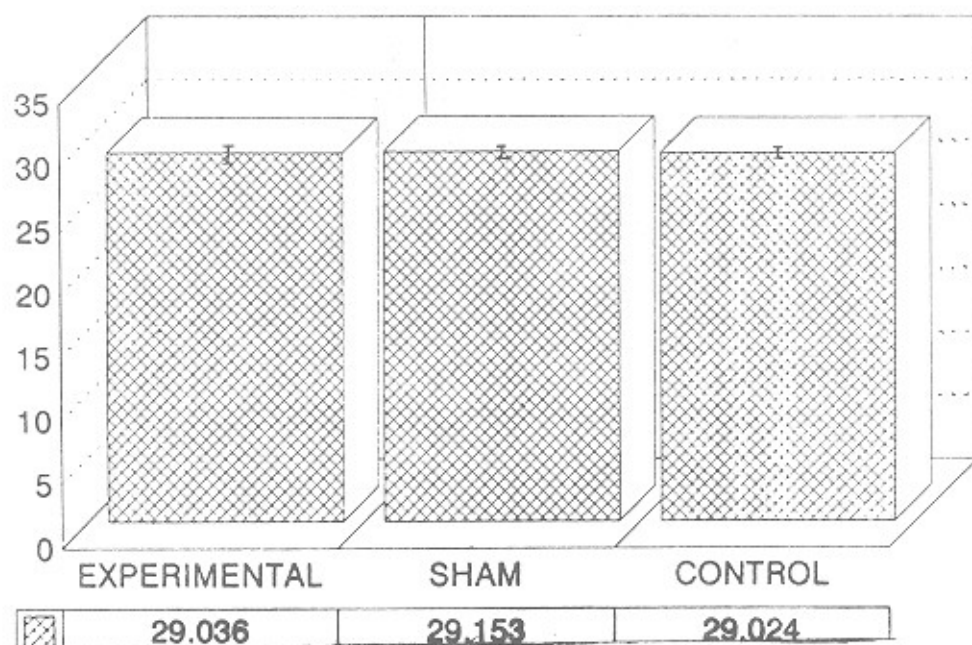
هیستوگرام a) (۲-۱)

FSH



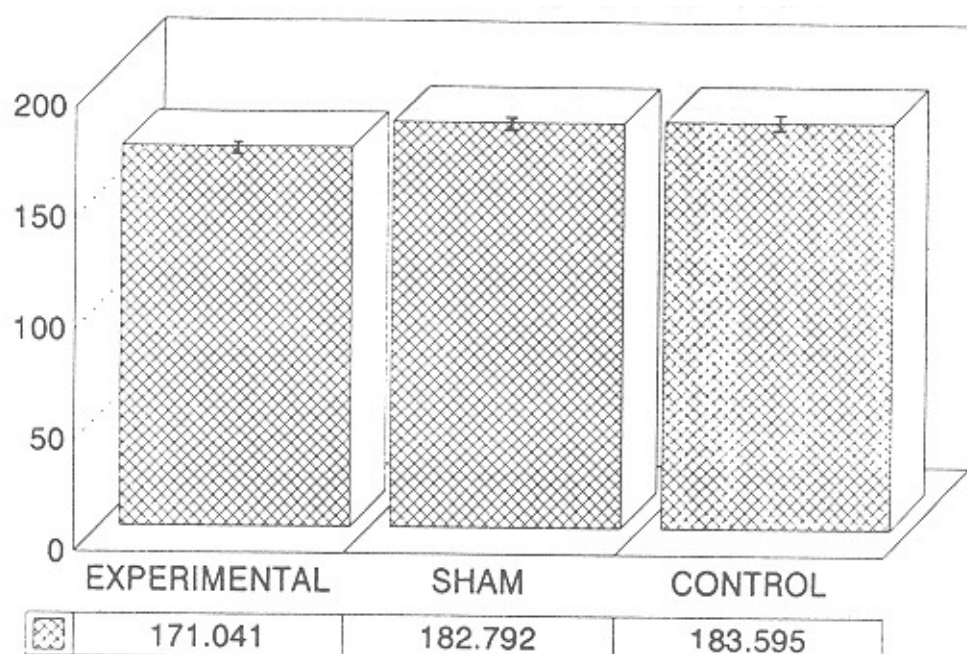
هستونوگرام (۳-۲)

PROLACTIN



هستونوگرام (۳-۲)

ESTRADIOL



هیستوگرام (a-3)

جدول ۳-۱: نتایج آزمون χ^2 در بررسی اثرات توزیع "کلور روی" بر تغییرات هورمون FSH در Rat ماده.

($P < 0.05$) FSH IU/L $\bar{X} \pm \text{SEM}$

	Experimental	Sham	Control
$\bar{X}$	۵/۱۸	۵/۱۷۸	۵/۰۷۲
SEM	$\pm ۰/۲۰۷$	$\pm ۰/۰۹۹$	$\pm ۰/۱۲۵$

جدول مربوط به آنالیز آماری (Statistical Analysis) تغییرات هورمون FSH

S.A.	Experimental	sham
Control	N.S**	N.S**

* Significant

** Non significant

جدول ۳-۲: نتایج آزمون χ^2 در بررسی اثرات "کلرو روی" بر تغییرات هورمون LH در Rat ماده.

	LR	U/L	X $\pm$ SEM	(P < 0.05)
	Experimental	Sham	Control	
$\bar{X}$	۱۵۵/۵۷	۱۶۳/۲۸	۱۶۳/۲۲	
SEM	$\pm ۲/۹۴۲$	$\pm ۲/۸۹۹$	$\pm ۳/۸۸۶$	

جدول مربوط به آنالیز آماری (Statistical Analysis) تغییرات هورمون LH

S.A.	Experimental	Sham
Control	S *	N.S. **

* Significant

** Non significant

جدول ۳-۳: نتایج آزمون χ^2 در بررسی اثرات تزریق "کلور روی" بر تغییرات هورمون پرولاکتین در Rat ماده.

	پرولاکتین	mIU/L	X $\pm$ SEM	(P < 0.05)
	Experimental	Sham	Control	
$\bar{X}$	۲۹/۰۳۶	۲۹/۱۵۳	۲۹/۰۲۴	
SEM	$\pm ۰/۵۸۲$	$\pm ۰/۴۶۳$	$\pm ۰/۳۲۷$	

جدول مربوط به آنالیز آماری (Statistical Analysis) تغییرات هورمون پرولاکتین.

S.A.	Experimental	Sham
Control	N.S. **	N.S. **

* Significant

** Non significant

جدول ۳-۴ نتایج آزمون χ^2 در بررسی اثرات تزریق " کلرور روی " بر تغییرات هورمون پروژسترون در Rat ماده .

	پروژسترون	nmol/L	x $\pm$ SEM	(P < 0.05)
	Experimental	sham	Control	
$\bar{X}$	۶۵/۷۷	۶۶/۵۴	۶۶/۴۶۹	
SEM	$\pm 4/16$	$\pm 3/75$	$\pm 3/95$	

جدول مربوط به آنالیز آماری Statistical Analysis تغییرات هورمون پروژسترون .

S. A	Experimental	sham
Control	N.S**	N.S**

* Significant

** Non significant

کتابنامه

1. Abbasi - AA, Prasad - As, Experimental Zinc deficiency in man : effect on testicular function, J-Lab - clin-Med, Sep 96(3): 544-50(1988).
2. Hidioglou - M, Knipfel - Je , Zinc in mamalian sperm, J - Duiry - Sci, Jun; 67(6): 1147-56(1984).
3. Macapinlac - M. P, Pearson W.N, and Darby - W. J, Zinc Metabolism, edited by prasad A.S.Spring field, III: Thomas P: 142(1966).
4. Underwood - E. J., Trace Element in human and animal Nutrition, Chapter of Zinc.(1962).
5. Webb - J.L., Nutrition effects of oral contraceptive use, J - Repor. - Med: Oct, 25(4): 150-6(1980).
6. Rasmusson - D.D., Liu - J.H , Gonadotropin releasing hormone neurosecretion in the human hypothalamus; J.clin Endocrinol. Meta. 62; 479.(1986).
7. Erickson - G.F., An analysis of follicle development and ovum maturation, Seminars Reprod Endocrinol 4 : 233(1986).
8. Fletcher - wh, Greenan - JRT, Receptor mediated action without receptor occupancy, Endocrinology 166:1660(1985).
9. patton - H.D. Textbook of physiology pub: w.saunders company(1989).