

بررسی اختلالات تکاملی ناشی از تجویز استرادیول در اندامهای حرکتی جنین موش صحرایی

دکتر محمدرضا نیکروش*، دکتر مرتضی بهنام رسولی**

چکیده:

ترکیبات استروژنی و پروژسترونی از مهمترین هورمونهای جنسی زنانه هستند که علاوه بر کاربرد آنها در تهیه قرصهای ضدحاملگی، در درمان بعضی از بیماریهای زنان نیز مورد استفاده قرار می گیرند. در عین حال این احتمال نیز وجود دارد که مصرف هورمونهای جنسی ماده در طول دوره حاملگی و بویژه در طول دوره بحرانی رشد و تکامل، موجب بروز ناهنجاریهایی در جنین شوند. این مطالعه در فاصله بین سالهای ۷۸-۱۳۷۷ در بخش زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد و با هدف مطالعه تجویز استرادیول و تأثیر احتمالی آن بر روی تکامل جنینی موش صحرایی انجام گرفت.

اثرات یک نوبت تزریق عضلانی ۰/۱۵ mg/kg استرادیول والریت در یکی از روزهای ۱۲، ۱۴، ۱۶ حاملگی بترتیب در گروههای تجربی ۱ و ۳ و معادل آن تزریق سرم فیزیولوژی در گروه ۴ (گروه کنترل)، در موش صحرایی از نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفت. پس از قطع نخاع موشهای حامله در آخرین روز حاملگی، جنینهای متعلق به هر مادر شمارش و پس از فیکس شدن در فرمالین ۱۰٪ از نظر رشد و تکامل اندامها مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج حاصل نشان می دهند که الگوهای متنوعی از نقایص اندامهای حرکتی شامل سین داکتیلی، تتراداکتیلی، فوکوملیا و همچنین عدم تقارن در موقعیت و کاهش طول اندامهای حرکتی دیده می شود که میزان وقوع آن در مقایسه بین گروهی در میان جنین های متعلق به گروههای تجربی بویژه در گروه ۱ افزایش یافته است.

از آنجایی که در موش صحرایی پیدایش جوانه اندامهای حرکتی و دوره بحرانی رشد و تکامل جنینی مربوط به آنها در محدوده زمانی روزهای یازدهم تا سیزدهم حاملگی است، نتایج حاصل براین نکته دلالت می کنند که تجویز استرادیول در محدوده دوره بحرانی فوق احتمالاً با مداخله در پدیده مرگ از پیش برنامه ریزی شده سلولی (Programed cell death) و یا بلوک نمودن گیرنده های پیک های شیمیایی در سطح سلولهای جوانه اندام، ممکن است بتواند روند شکل گیری و تکامل اندامهای حرکتی را تحت تأثیر قرار دهد و به نقایصی از آنچه که دیده شد منجر شود.

کلید واژه ها: استرادیول / اندامهای حرکتی - ناهنجاریها / موش صحرایی

* استادیار گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

** دانشیار گروه زیست شناسی دانشگاه فردوسی مشهد

مقدمه:

یکی از منابع اصلی تأمین استروژنها، استرادیول تخمدانی است که در خارج از زمان حاملگی بطور عمده از پیش سازهای آندروژنیک در سلولهای گرانولوزای فولیکول های تخمدانی در حال رشد ساخته می شود (۱،۲). امروزه از ترکیبات استروژنیک و منجمله استرادیول علاوه بر درمان بیماریهای ناشی از نقص تولید استروژن، در تولید قرصهای خوراکی ضدحاملگی نیز استفاده می شود (۳). اگرچه در بسیاری از مواقع تجویز صحیح و استفاده بجا از این ترکیبات از سوی بسیاری از محققین امری مجاز شمرده شده است ولی در عین حال پاره ای از گزارشات تحقیقی به بعضی از اثرات نامطلوب تجویز استروژنها در دوران غیرحاملگی اشاره دارند (۴). بعد دیگر موضوع استفاده از استروژنها و پی آمدهای احتمالی سوء آن در رابطه با سلامت جنین در طی دوران بارداری است که از نظر دور نمانده است (۵). در این رابطه گزارشات آماری نشانگر این مدعا است که همه ساله از میان میلیونها زن حامله ای که در سراسر جهان از ترکیبات استروژنی بازدارنده حاملگی استفاده می نمایند مواردی از نقایص متفاوت جنینی در بعضی از دستگاههای بدن از جمله دستگاه عصبی مرکزی و نقص هیپوسپادیاس (بازماندن بخشی از پیشابراه جنس نر) در فرزندان آنها گزارش گردیده است (۶-۹). علاوه بر این عوارض دیگری از قبیل سقط و مرگ جنینی و کاهش وزن جنین های باقیمانده از اثرات نامطلوب دیگری است که به استروژن ها و متابولیت های حاصل از آنها نسبت داده شده است (۱۰، ۱۱). گزارشات مشابهی نیز وجود دارند مبنی بر اینکه در میان دخترانیکه مادرانشان در اوایل حاملگی با دوز بالایی از این نوع ترکیبات مورد درمان قرار گرفته اند مواردی از آدنوکارسینومای واژن و سرطان گردن رحم دیده شده است (۱۲).

موضوع این گزارشات و مدنظر قرار دادن ارتباط احتمالی آن با مصرف این ترکیبات، زمینه ساز این مسئله است که مادران بارداری که در زمانهای بحرانی رشد و تکامل جنین هایشان، به گونه ای در معرض دریافت ترکیبات استروژنیک قرار گرفته باشند، احتمال بروز نقایص جنینی دیگری نیز برای فرزندان آنها ممکن است وجود داشته باشد (۱۳) که اختلال در تکامل

اندامهای حرکتی می تواند از آن جمله به شمار آید. بنابراین با توجه به اهمیت مواردی که ذکر آن گذشت این مطالعه با هدف تعیین اختلالات تکاملی احتمالی ناشی از تجویز استرادیول در اندامهای حرکتی جنین های موش صحرایی که مادرانشان در معرض این تجویز قرار گرفته اند، در سال ۷۸-۷۷ دربخش زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفته است.

روش کار:

۲۸ موش صحرایی سفید باکره از نژاد ویستار (تهیه شده از موسسه سرم سازی حصارک کرج)، با سن تقریبی ۳ ماه و با وزن متوسط ۱۵۰-۱۲۰ گرم، که در شرایط استاندارد حیوانخانه (۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی، آب و غذای کافی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد) نگهداری می شدند، مورد استفاده قرار گرفتند. پس از آمیزش در قفسهای مخصوص جفتگیری و مشاهده واژینال پلاگ روز صفر حاملگی مشخص گردید.

پس از آن، موش های حامله به طور تصادفی به سه گروه تجربی ۲، ۱ و ۳ و یک گروه کنترل تقسیم شدند.

موش های گروههای تجربی فوق به ترتیب در روزهای ۱۴، ۱۲ و ۱۶ حاملگی بکمک یک سرنگ مخصوص (مدرج با میکرولیتر)، تحت تأثیر یک نوبت تزریق عضلاتی ۰/۱۵mg/kg استرادیول والریت (ساخت کارخانه داروسازی ابوریحان) قرار گرفتند. به موشهای گروه کنترل، در روز دوازدهم حاملگی، بطور مشابه حجم برابری از سرم فیزیولوژی تزریق شد، سپس ضمن مواظبت و نگهداری در شرایط استاندارد حیوانخانه، موشهای همه گروهها در آخرین روز حاملگی (روز بیستم) تحت بیهوشی، قطع نخاع گردیده و ضمن معاینه و باز نمودن شاخه های رحم، جنین های مربوط به هر مورد شمارش گردید. پس از فیکس در محلول فرمالین ۱۰٪، جنینها ابتدا به صورت ماکروسکوپی و سپس با استفاده از استروئومیکروسکوپ مورد معاینه دقیق قرار گرفته و هرگونه تغییر شکل ظاهری در اندامها ثبت و بررسی شد. براین اساس ابتدا



شکل ۲: فوکوملیا و عدم تقارن اندامهای حرکتی قدامی در یک جنین متعلق به روز بیست حاملگی از گروه تجربی ۱

ب: سین داکتیلی (شکل ۳) که در این حالت تا حدود زیادی انگشتان به هم چسبیده اند و شکاف بین آنها به خوبی تمایز نیافته است.



شکل ۳: سین داکتیلی در اندامهای حرکتی قدامی و خلفی یک جنین متعلق به روز بیست حاملگی از گروه تجربی ۱

ج: تتراداکتیلی (شکل ۴) که معمولاً یکی از انگشتان تحلیل رفته و بیشتر از چهار انگشت در اندام مربوطه دیده نمی شود.

اندامهای حرکتی قدامی و خلفی در جنین های متعلق به هر یک از گروههای یاد شده از نظر ظاهری و موقعیت محور اندامها، اندازه و وضعیت تقارن آنها و همچنین خصوصیات و تعداد انگشتان و شکاف بین آنها، در مقایسه با نمونه های طبیعی ملاک ارزیابی قرار گرفته و نمونه های غیر طبیعی مربوط به هر گروه ثبت گردیدند. سپس نتایج به دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و t-test با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج:

نتایج بدست آمده از بررسی های ماکروسکوپی و استریومیکروسکوپی در جنین های تجربی مشخص کرد که در ارتباط با نقایص اندامهای حرکتی قدامی و خلفی، ناهنجاریهایی در میان جنین های متعلق به گروههای تجربی به چشم می خورد که از آن جمله می توان به موارد ذیل اشاره کرد.

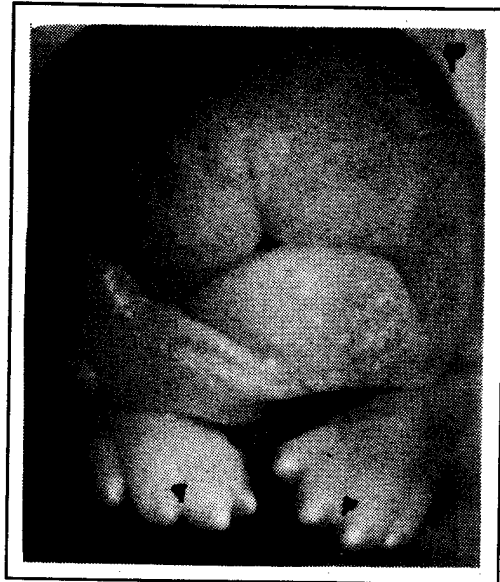
الف: نمونه های متفاوتی از فوکوملیا (شکلهای ۱ و ۲) در بعضی از گروهها دیده شد که به صورت نوعی نقص اندامهای حرکتی با حالت کوتاه تر از حد طبیعی به چشم می خورد و بیشتر به دست و پای فک شبیه است.



شکل ۴: فوکوملیا (نوک پیکان) در یک جنین روز بیست حاملگی از گروه تجربی ۱

ترشحه نیز محسوب می شوند. به این لحاظ اثرات ناشی از افزایش سطح هورمون در پلازما (چه به صورت ترشحات داخلی و چه از طریق تجویز صورت گرفته باشد)، بر روی فعالیت این سلولها اثر گذاشته و با مخالفت با ترشح بیشتر هورمون موجب کاهش سطح پلاسمایی هورمون می شود. این وضعیت در ارتباط با هورمونهای جنسی نیز صادق است زیرا سطح پلاسمایی هورمونهای جنسی ماده (استروژن و پروژسترون) موجب اعمال پدیده بازتاب منفی و تأثیرگذاری بر میزان تولید هورمونهای آزاد کننده هیپوتالاموسی (GnRH) و گنادوتروپین های هیپوفیزی (LH و FSH) می گردد که نتیجه آن کاهش سطح هورمونهای جنسی است (۱۴). در این رابطه نتایج حاصل از تجربیات مشابه بعمل آمده نشان می دهند که تجویز مداوم آگونیست GnRH، می تواند موجب پایین آوردن سطح پروژسترون گردیده و در نتیجه به اختلال در حاملگی و حتی سقط نیز منجر شود (۱۵). بنابراین نه فقط مداخله در تغییر سطح هورمونهای جنسی ماده می تواند به تأثیرگذاری بر تکامل آندومتر و اختلال در لانه گزینی جنین منجر شود و از تعداد جنین ها بکاهد، بلکه همچنانکه در میمون های ماکاک (macaques) و بابون ها نشان داده شده است، نوسانات سطح هورمونی که پس از لانه گزینی به وقوع می پیوندد می تواند از طریق مرگ جنینی به کاهش تعداد آن منجر شود (۱۵). در رابطه با تمایز اندامها که در انسان از حدود اوایل هفته ششم جنینی صورت می گیرد نیز گزارش شده است که در مادرانیکه که از هفته چهارم تا هفتم بارداری در معرض ترکیبات استروژنیک واقع شده اند، در نوزادان آنها نقایص چندگانه ای از قبیل شکاف کام، نقص تکاملی قلب، نقص و جابجایی مفصل هیپ، فقدان استخوان تیپیا و پلی داکتیلی دیده شده است (۱۶-۱۹).

یکی از نقائص عمده ای که در ارتباط با ناهنجاریهای اندامهای حرکتی در این مطالعه به چشم می خورد غیرطبیعی بودن آنها به شکل تحلیل رفته، کوتاه و نامتقارن است که مشابه چنین مواردی نیز در انسان و در رابطه با مادرانیکه در اوایل حاملگی از اینگونه ترکیبات استفاده کرده اند مردود دانسته نشده است (۲۰). بر اساس این مطالعه و با عطف به اینکه از نظر علم جنین شناسی، جوانه های اندام در موش



شکل ۴: تتراداکتیلی، شکاف لب فوقانی و تکامل غیرطبیعی پوزه در یک جنین روز بیست حاملگی از گروه تجربی ۱

د- نامتقارن بودن محل پیدایش و موقعیت محور اندامها نسبت به همدیگر که در بعضی از نمونه ها دیده شد. نتایج بدست آمده از گروههای تجربی و کنترل در رابطه با تعداد کل جنین های هر گروه و میانگین آنان و همچنین فراوانی بروز نقایص اندامهای حرکتی و مقایسه آنها نسبت به همدیگر در جدول ۱ ارائه گردیده است.

جدول ۱: فراوانی نقایص اندامهای حرکتی در جنین های گروههای مختلف

گروه	تعداد مادران هر گروه	روز دریافت هورمون	تعداد جنین های هر گروه		جنین های ناهنجار
			ماده	نر	
تجربی ۱	۸	۱۲	۳۰	۲۷	۷*
تجربی ۲	۷	۱۴	۲۸	۲۸	۴
تجربی ۳	۷	۱۶	۲۸	۲۹	۵
کنترل	۶	۱۲	۳۵	۳۲	-

* مقایسه فراوانی نقایص اندامهای حرکتی در گروههای تجربی با گروه کنترل (t-test): $P < 0.01$

بحث:

مطالعات حاصل از مکانیسم عمل غدد درون ریز بیانگر این موضوع است که ترشحات هورمونی این نوع غدد توسط نوعی بازتاب منفی تحت کنترل قرار می گیرد زیرا علاوه بر اینکه سلولهای این غدد خاصیت ترشحي هورمونی دارند، به دلیل دارا بودن گیرنده های هورمونی، خود به عنوان سلولهای هدف هورمونهای

منابع:

1. Hadley ME. *Endocrinology*. 2 nd ed. New Jersey: Prentic-Hall, 1988: 435.
2. Kreiner D, Muasher SJ, Acosta GS, et al. Monitoring gonadotropin-stimulated cycles for invitro fertilization and embryo transfer. *J Invitro Fert Embryo Trans*. 1988; 5(4): 230-233.
3. Sridaran R. Ovarian esteroid production in rats treated with gonadotropin-releasing hormone during early pregnancy. *J Steroid Biochem*. 1987; 26: 1-6.
4. Katsung BG. *Basic and clinical pharmacology*, 5 th ed. Norwalk : Appleton and Lange , 1998: 655-660.
5. Briggs GG, Freeman RK, Yaffe SJ. *Drugs in pregnancy and lactation* , 4 th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994: 338-340.
6. Behnam-Rasouli M , Nikravesh MR. Estrogen-induced congenital hypospadias in developing rat embryos, *UAE Iranian Hospital Journal* 2000; 2(2): 21-23.
7. Gray LE, Ostby JS, Kelce WR. Development effects of an environmental antiandrogen: the fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 129(1): 46-52.
8. Jensen TK, Toppari J, Keiding N, et al. Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health. *Clin Chem* 1995; 41: 1986-1901.
9. Mendonca BB, Inacio M, Costa EM, et al. Male pseudohermaphroditism due to steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency diagnosis , psychological evaluation and management. *Med Baltimore* 1996; 64-76.
10. Behnam-Rasouli M , Nikravesh MR. The abortional and the teratogenical effects of 17-beta estradiol valerate administration during embryonic development in rats. *Iranian Biomedical Journal* 1997; 1(1): 53-57.
11. Hendrickx AG, Korte R, Leuschner F, et al. Embryotoxicity of sex steroid hormones combinations in non human primates I-Norethisterone acetate+ ethinylestradiol and

صحرائی در محدوده زمانی روزهای یازدهم شروع به پیدایش نموده و تا حدود روز سیزدهم به تمایز انگشتان می انجامد (۲۱). بررسی نتایج حاصل ، بازگو کننده این واقعیت است که مکانیسم عمل تأثیر گذاری استروژن های تجویزی و منجمله استرادیول اگرچه دقیقاً مشخص نیست ولی علت هرچه که باشد، یک احتمال قوی وجود دارد، به این معنی که چنانچه در اواخر نیمه اول تا اوایل نیمه دوم حاملگی که دوره بحرانی تکامل و تمایز در جنین موش صحرائی به حساب می آید (۲۱)، تجویز استرادیول ، ولو با دوز پایین تر از دوز درمانی معادل انسانی صورت گیرد، می تواند اثرات نامطلوبی بر اندام زایی جنینی از خود باقی گذاشته و احتمالاً به اختلالات تکاملی در اندامهای حرکتی منجر شود. در چنین شرایطی با توجه به سایر یافته ها و شواهد حاصل از این تحقیق بنظر می رسد که مداخله هرگونه عامل مزاحمتی که بتواند بر روند القاء و میانکنش های سلولی مرتبط با این تمایزات تأثیر بگذارد ، احتمالاً خواهد توانست به گونه ای ، پدیده های منتهی به تکامل از قبیل تکثیر ، تمایز ، مهاجرت و مرگ از پیش برنامه ریزی شده سلولی را در جنین تحت تأثیر قرار داده و به اختلالات تکاملی اندامهای حرکتی منجر شود. با این توصیف می توان انتظار داشت که با شکسته شدن ترکیبات استروژنی (و منجمله استرادیول) در کبد و پیوند شدن متابولیت های حاصل از آن ها با پروتئین های موجود در پلاسما، در شرایطی که در هریک از سلول های هدف بین ۵ تا ۱۰ هزار گیرنده پیک های شیمیایی وجود دارد (۲۲)، این مولکول ها بتوانند جذب آنها شوند و از طریق بلوک کردن آنها مسیر صحیح علائمی را که باید به این گیرنده ها برسد، سد نمایند. بنابراین ، یک احتمال دیگر اینکه در این برهه زمانی حساس که مهمترین مرحله تکاملی اندامهای حرکتی محسوب می شود، ممکن است بلوک شدن گیرنده های سلولی ، خود مانعی برای دریافت صحیح پیام های القایی از جانب سایر سلولها و بافت ها باشد که از این راه بر فعالیت سلول های در حال تمایز اثر گذاشته (۲۲) و به نقایصی از قبیل فوکومیلیا، سین داکتیلی ، تتراداکتیلی و بی نظمی در اندازه و موقعیت و تقارن اندامها که در این مطالعه دیده شد منجر گردد

- progesterone+ estradiol. *Teratology* 1987; 35: 119-127.
12. Hajec RA, Robertson AD, Johnson DA, et al. During development , 17 alpha-estradiol is a potent estrogen and carcinogen. *Environ Health Perspect* 1997; 3: 577-581.
 13. Janerich DT, Piper JM, Glebatis DM. Oral contraceptives and birth defects. *Am J Epidemiol* 1980; 112: 73-79.
 14. Astmerdam JD, Maislin G, Rosenzweig M, et al. Gonadotropin (LH and FSH) response after submaximal GnRH stimulation in depress premenopausal women and healthy controls. *Psychoneuroendocrinology* 1995; 20(3): 311-321.
 15. Sridaran R. Inhibitory effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on the luteal synthesis of progesteron, estradiol receptors and prolactin surges during early pregnancy. *Endocrinology* 1988; 123(4): 1740-6.
 16. Ho CK, Kaufman RL, McAlister WH. Congenital malformations. *Am J Dis Child* 1975; 129: 714-716.
 17. Wiseman RA, Dodds-Smith IC. Cardiovascular birth and antenatal exposure to female sex hormones: a reevaluation of some base data. *Teratology* 1984; 30: 359-370.
 18. Correv JF, Newman NM, Collins JA, et al. Use of prescription drugs in the first trimester and congenital malformations. *Australian New Zealand, J Obstet Gynaecol* 1991; 31: 340-344.
 19. Kalen B. A prospective study of some aetiological factors in limb reduction defects in Sweden. *J Epidemiol Common Health* 1989; 43: 86-91.
 20. Kricker A, Elliot JW, Forrest JM, et al. Congenital limb reduction deformities and use of oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155: 1072-1078.
 21. Bernard FS, Stata N. Equivalent ages in rat, mouse and chick embryos. *Tratology* 1979; 19: 273-287.
 22. Greenspan FS, Baxter JD. Basic and clinical endocrinology. 4 th ed. New Jersey : Prentice Hall ,1994:424-426.