بررسی هیستولوژیکی و ایمونوهیستوشیمیایی اثرات نیترات مازاد در آب آشامیدنی بر روند تکوین کبد جنین موش سوری نژاد NMRI

مریم قریشی[۱]، محمد نبیونی[۲*]، عبدالحسین شیروی[۱]، مهسا رستمی[۳] و لطیفه کریم زاده باردیی[۳]

[۱] دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، گروه زیست‌شناسی

[۲] تهران، دانشگاه خوارزمی (تربیت‌معلم)، دانشکده علوم زیستی، گروه سلولی و مولکولی

[۳] تهران، دانشگاه خوارزمی (تربیت‌معلم)، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۲۶

چکیده

امروزه نیترات موجود در کودهای شیمیایی و سوخت‌های فسیلی از طریق آب‌های زیرزمینی وارد آب آشامیدنی می‌شوند. با توجه به اینکه نیترات از طریق سد خونی جفتی عبور کرده و مستقیماً وارد کبد جنین می‌شود، هدف از این مطالعه اثرات نیترات مازاد در آب آشامیدنی بر سلول‌های کبدی و اثرات مخرب آن بر روند تکوین بود. در این مطالعه تجربی در روز صفر بارداری موش‌ها را به سه گروه کنترل، تجربی اول و تجربی دوم (به ترتیب ۴۵۰ و ۹۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نیترات در هرروز) تقسیم شدند. در روز ۱۷ بارداری حیوانات بوسیله استنشاق کلروفرم بیهوش کرده و کبد جنین‌ها جدا و در فرمالین۱۰٪ فیکس شد و سپس مورد بررسی ایمونوهیستوشیمی و هیستوپاتولوژی قرارگرفته است. در این تحقیق از نرم‌افزار IMAGE J 1.47 جهت شمارش سلولی و از نرم‌افزار SPSS22 و با آزمون ANOVA یک‌طرفه جهت آنالیز آماری استفاده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد نیترات مازاد در آب تغییرات معناداری در کاهش تعداد و وزن جنین‌ها، نیز تغییرات هیستوپاتولوژی در سلول‌های کبدی جنین ایجاد کرده و طبق بررسی ایمونوهیستوشیمی، میزان بیان فاکتور آپوپتوزی BCL_2 در بافت کبد در دوره جنینی با افزایش نیترات آب آشامیدنی تغییرات معنی‌داری نشان داد. **نتیجه‌گیری**: نیترات مازاد در آب آشامیدنی سبب اختلالاتی در تکوین کبد جنین در طول دوره بارداری می‌شود.

واژه های کلیدی: نیترات، آب آشامیدنی، جنین، کبد، ایمونوهیستوشیمی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۱۵۸۳۳۱۴، پست الکترونیکی: devbiokharazmi@gmail.com

مقدمه

یکی از عوامل عمده افزایش نیترات در محیط، کاربرد آن به عنوان حاصلخیز کننده در بخش کشاورزی است و هم‌چنین در طی بارندگی یا تخلیه مواد ناشی از فعالیت انسان به‌خصوص فاضلاب می‌توانند به آب‌های سطحی و از طریق نشت آب‌های زیرزمینی راه پیدا کند (۱۴). غلظت بالای نیترات در محیط‌های آبی به‌خصوص آب‌های آشامیدنی منجر به مسئله مهمی شده است که مهمترین دلایل آن اثرات سو کوتاه‌مدت و بلندمدت نیترات در بدن می‌باشد که می‌تواند بیماری مت هموگلوبینما و اثر سو بر جنین و سرطان ایجاد کند (۲۷). به‌طور طبیعی نیترات در بدن انسان در حدود ۶۲ میلی‌گرم در روز تولید می‌شود اما رژیم غذایی منبع مهم ورود نیترات به بدن است (۴) و تماس انسان با نیترات و نیتریت عمدتاً ناشی از مصرف مواد غذایی به‌خصوص سبزیجات، گوشت و آب آلوده می‌باشد (۱۲, ۶). نیترات یکی از آنیون‌های معدنی است که از یک اتم نیتروژن و ۳ اتم اکسیژن تشکیل‌شده و از طریق

غدد بزاقی وارد جریان مایع دهانی می‌شود (۴). با ورود نیترات به بدن در دستگاه گوارش توسط باکتری‌ها به نیتریت احیاشده و نیتریت نیز توسط باکتری‌های دستگاه گوارش به آمین‌های نوع II و III ترکیب‌شده و تشکیل نیتروز آمین‌ها را داده که سرطان‌زا می‌باشد (۲۷). در بیماری مت هموگلوبین یا سندروم کودک آبی نیتریت شکل نرمال هموگلوبین (که اکسیژن را به دیگر بخش‌های بدن حمل می‌کند) را به مت هموگلوبین تبدیل کرده و توانایی پیوند با اکسیژن را از دست می‌دهد (۲ و ۹). هم‌چنین محققان دریافتند که نیترات، نیتریت و N-nitroso می‌توانند از جداره رحم عبور کرده و به جنین برسد (۱۳).

کبد نقش مهمی در مسمومیت زدایی بدن داشته و چون در دوران جنینی هر ماده‌ای که از جفت عبور کند مستقیماً وارد کبد می‌شود و در صورت سمی بودن ماده موجب اختلال در تکوین و عملکرد کبد می‌شود. آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر آسیب‌دیده اضافی و مضر می‌شود و برای تکامل و هموستازی بافتی ضروری است. آپوپتوز در ترمیم و نوسازی بافتی و نیز حذف سلول‌های T خود واکنش‌گر نقش دارد (۱۹, ۱۱). هرگونه اختلال در روند آپوپتوز منجر به ایجاد و رشد سلول‌های سرطانی و یا اختلالات خود ایمنی می‌گردد و بالعکس افزایش غیرطبیعی مرگ سلولی در بیماری‌های نظیر اختلالات نورودژنراتیو و ایدز دیده می‌شود. داروهای شیمی‌درمانی سبب القا اپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۱). اولین بار ژن Bcl2(-B cell lymphoma) در محل جابجایی کروموزومی کروموزوم‌های ۱۴و ۱۸ (۱۴:۱۸t) در لنفوم های FCC (Lymphoma Follicular center cell) پیدا شد اما بعدها در غیاب این جابه‌جایی در تومورهای FCC نیز دیده شد (۱۷).

در تعدادی از بافت‌های طبیعی بدن ازجمله در ریشه موهای رویانی که شباهت‌های ریخت‌شناسی با بازال سل کارسینوما دارد Bcl2 تظاهر پیدا می‌کند. انکوژن Bcl2 روی کروموزوم ۱۸ قرارگرفته و یک پروتئین ۲۴ کیلودالتونی را کد می‌کند که این پروتئین در غشای هسته، رتیکولوم اندوپلاسمیک و غشای میتوکندری‌ها تظاهر پیدا می‌کند (۱۵). ژن Bcl2 یک پروتئین ۲۶ کیلودالتونی را رمزگذاری می‌کند که می‌تواند مسیر آپوپتوز را تنظیم کند. Bcl2 با افزایش عمر سلول‌های اپیتلیالی که دارای پتانسیل تمایز هستند موجب پرولیفراسیون، تمایز و درنهایت مورفوژنز می‌شود. پروتئین Bcl2 نیز مهم‌ترین دسته از پروتئین‌های تنظیم‌کننده آپوپتوزی هستند که درآن‌ها پروتئین‌های Bad و Bax نقش تحریک‌کنندگی و پروتئین Bcl2 نقش بازدارندگی بر پدیده آپوپتوز دارند. پروتئین Bcl2 یک پروتئین میتوکندریال را رمزگذاری می‌کند که از مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول‌های طبیعی جلوگیری می‌کند (۱۶).

تغییرات قابل‌توجه در کبد، در کبدهای تحریک‌شده و در سطح بیان پروتئین‌های اعم از مقاوم و یا حساس به آپوپتوز به نام BclX، Bax، Bad، P۵۳ می‌باشد، آسیب هپاتوسیت‌ها نقص عملکرد کبد را به دنبال خواهد داشت. در بیشتر آسیب‌های کبدی آپوپتوز نقش اصلی را بازی می‌کند که معمولاً با التهاب و فیبروز همراه است. در سرطان‌های کبد نیز هپاتوسیت‌ها آسیب می‌بینند که در این صورت حذف سلولی به‌وسیله آپوپتوز، موجب تحریک میتوژنز هپاتوسیت‌ها می‌شود، البته حذف پروتئین کلیدی پیش آپوپتوزی مانند MCL-1 (Myeloid Cell Leukemial) فقط منجر به آپوپتوز نشده بلکه موجب بروز کارسینوژنز نیز می‌شود. تغییر سلولی به علت آپوپتوز، محرک‌های دایمی پیش آپوپتوز و ماتریکس خارج سلولی از عوامل سرطان کبد می‌باشد (۱۶, ۳). لذا این مطالعه براساس اهمیت رابطه مادر و جنین و به‌منظور بررسی اثرات احتمالی نیترات بر روی خصوصیات ظاهری جنین موش سوری و بررسی هیستومورفیک و آپوپتوزی بافت کبد جنین‌های در معرض نیترات مازاد انجام‌شده است.

مواد و روشها

دراین مطالعه تجربی، به‌منظور بررسی اثر نیترات سدیم محلول در آب بر کبد موش سوری، از ۱۰۸موش بالغ ماده سوری با میانگین سنی ۸ هفته استفاده شد، موش‌های سوری در اتاق پرورش حیوانات دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی تهران تکثیر و در طول انجام آزمایش در قفس‌های استاندارد با سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعت بدون محدودیت آب و غذا در درجه حرارت ۲۰-۲۴ سانتی گراد نگه‌داری شدند. در این آزمایش ۳۶ سر موش بعد از تعیین استروس و جفت‌گیری و مشاهده پلاک واژینال به سه گروه ۱۲تایی تقسیم شدند. این آزمایش سه بار و هر بار بر روی ۳۶ موش سوری مورد بررسی قرارگرفته شد. گروه کنترل هیچ نیتراتی دریافت نکرد و در گروه‌های اول و دوم در هریک نیم لیتر آب‌معدنی، به ترتیب ۴۵۰ و۹۰۰ میلی‌گرم نیترات سدیم در لیتر در روز دریافت کردند. سپس در روز ۱۷ بارداری موش وزن شده و سپس با استفاده از کلرفورم بیهوش شده و جنین‌ها را از رحم موش خارج نموده و وزن آنها اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌های کبد از جنین جدا و با سرم فیزیولوژی شسته شد و با استفاده از فیکساتیو فرمالین ۱۰٪ فیکس شدند. نمونه‌های فیکس شده به الکل‌های ۳۰ تا ۱۰۰٪ در هرکدام یک ساعت به جهت آب‌گیری منتقل‌شده و سپس نمونه‌ها را در تولوئن شفاف‌سازی کرده و در پارافین قالب‌گیری انجام شد. از نمونه‌ها با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌های چهارمیکرونی تهیه شد و به روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین برش‌های حاصله رنگ‌آمیزی شدند و مطالعه میکروسکوپی صورت گرفت. جهت تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از آزمون آماری ANOVA و نرم‌افزار SPSS استفاده شد. هم‌چنین از نمونه‌های داخل فرمالین ۱۰٪ عمل ایمونوهیستوشیمی انجام شد در ابتدا با میکرومتر از بافت کبد برش‌گیری انجام شد. به‌منظور جلوگیری از ریزش نمونه بافتی بر روی لام‌ها چسب پلی‌ال لایزین ریخته شد تا برش بافتی از روی لام جدا نگردد، سپس برش‌های بافتی بر روی لام‌ها را به مدت ۲۴ ساعت داخل فور با دمای ۳۷ درجه قرارداده شد.

سپس لام‌ها را سه بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه درون گزیلول قرار گرفتند. این دوره برای متانول نیز تکرار گردید. در مرحله بعد لام‌ها را با آب شستشو داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه لام‌ها را در داخل آب‌اکسیژنه قرار داده شد و رقت آب‌اکسیژنه به متانول به‌صورت ۱/۲۰ درصد صورت گرفت. لام‌های تهیه شده را با pH= 6 به داخل ماکروفر قرار داده شد و پس از جوش آمدن محلول‌ها، به مدت ۲۰ دقیقه به آرامی خنک شدند. عمل شستشو با PBS ساده صورت گرفت. سپس آنتی‌بادی Bcl2 را به مدت ۶۰ دقیقه بر روی بافت گذاشته شد. محلول Envision را بر روی بافت قرارداده شد. Envision یک نوع کونژوگه است که باعث اتصال آنتی‌بادی به سلول‌های کبدی خواهد شد. در آخرین شستشو نمونه‌ها را با TBPS Twin ۰٫۰۵٪ به مدت ۵ دقیقه شستشو شدند.

بر روی بافت موردنظر محلول DAB ریخته شد، که شامل cc ۱ بافر به همراه λ ۲۵ کروموژن می‌باشد. سپس عمل شستشو به همراه آب، به مدت ۵ دقیقه هماتوکسیلین قرار داده شد و سپس روی آن کربنات لیتیم به مدت ۱ دقیقه صورت گرفت و لام‌ها را ۳ بار در الکل به مدت ۱۰ دقیقه و سپس این عمل توسط گزیلول صورت گرفت. در نهایت عمل مونت انجام گیری شد و لامل‌ها بر روی لام‌ها قرارگرفت. بعد از خشک شدن لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرارداده شد.

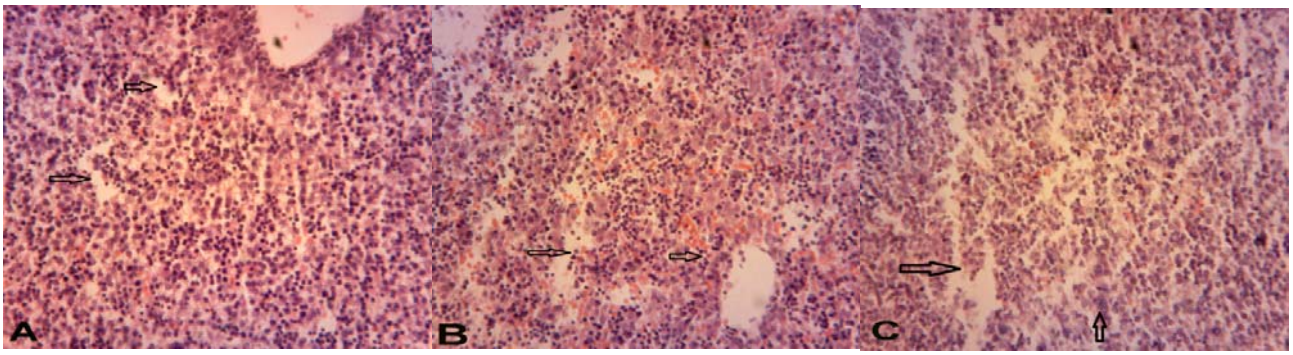
برای تحلیل و مقایسه نتایج داده‌های مربوط به کبد جنین، از آزمون آنالیز ANOVA یک‌طرفه مقایسه وجود اختلاف معنی‌دار بین مشخصه‌های مختلف استفاده شد. داده‌ها به‌صورت میانگین و آزمون (Tukey) خطای معیار نشان داده‌شده و سطح معنی‌دار آنها در حد P< ۰٫۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

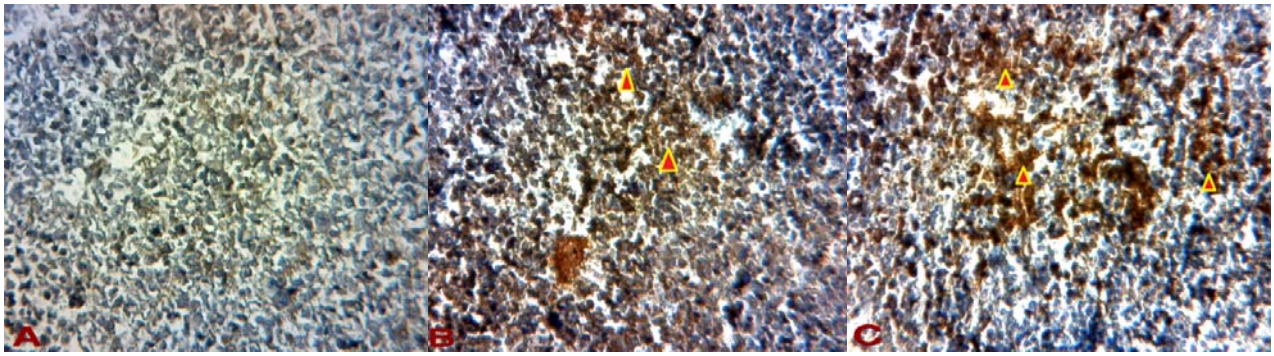
در بررسی مورفولوژی وزن جنین‌ها نسبت به گروه شاهد کاهش نشان داد که این تغییرات در گروه‌هایی که دوز نیترات بالاتری دریافت کرده بودند تفاوت بیشتری نشان دادند ولی این تفاوت معنی‌دار نبود. چنانچه میانگین وزن جنین مادرانی که دریافت‌کننده ۴۵۰ و۹۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات سدیم بودند به ترتیب ۱/۱۲۹ و۰/۸۹۷ میلی‌گرم و میانگین وزن جنین مادران گروه کنترل ۱/۳۷۸ میلی‌گرم بود.

در بررسی میکروسکوپی موش‌هایی که در گروه‌های اول و دوم بودند تغییرات بافتی شدیدی در ساختار هپاتوسیت‌ها ایجاد شد و هم‌چنین سلول‌های کوپفر در موش‌های دریافت‌کننده دوز بالای نیترات افزایش یافت (تصویر ۱).

در بررسی ایمونوهیستوشیمی مشاهده شد که در گروه کنترل، بیان پروتئین Bcl2 منفی و در گروه‌های تجربی اول و دوم افزایش نیترات منجر به افزایش بیان پروتئین Bcl2 شده و درنتیجه واکنش مثبت می‌شود (تصویر۲).



تصویر۱- تصویر کبد جنین موش سوری با رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین و بزرگنمایی ۴۰×. فلش ها نشان دهنده سلول های خونی و افزایش فضای سینوزوییدی است. A) مقایسه کبد جنین ۱۷ روزه در گروه های مختلف. گروه کنترلکه موش در طی بارداری آب بدون نیترات دریافت کرده بود. B) گروه اول دریافت کننده نیترات ۴۵۰ میلی گرم در لیتر. C) گروه دوم دریافت کننده نیترات ۹۰۰ میلی گرم در لیتر.



تصویر ۲ - نمایی از سلول های کبدی در بررسی ایمونوهیستوشیمی با بزرگنمایی۱۰۰×. A: نمایی از کبد گروه کنترل که با آنتی بادی bcl2 رنگ آمیزی شده است. B: نمایی از کبد گروه تجربی اول که تعداد بیشتری سلول های کبدی در گیر شده اند و سیتوپلاسم واکنش مثبت نشان داده است. C: نمایی از کبد گروه تجربی دوم (برش بافتی از گروهی که ۹۰۰ میلی گرم در لیتر نیترات سدیم دریافت کرده است) . نوک پیکان: تراکم پروتئین BCL 2 را در سیتوپلاسم (به رنگ قهوه ای) نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

نیترات ترکیبی است که به‌طور طبیعی در محیط‌زیست وجود دارد و بدون بو، مزه و طعم محلول در آب وارد بدن شده و در دستگاه گوارش به نیتریت احیاشده و نیتریت نیز می‌تواند به عوامل مختلف نظیر نیتریک اکساید، نیتروز آمین، دی نیتروتری اکساید تبدیل شود (۱۸، ۲۴). نیتروز آمین ترکیبی سرطان‌زا می‌باشد و بر سلامتی افراد اثر می‌گذارد. نیتریک اکساید یک مولکول سیگنالینگ می‌باشد که در پیام‌رسانی‌های سلولی در بافت‌های مختلف نقش مهمی را ایفا کرده، که این تغییرات بر روی رشد و نمو اندام‌ها را ایجاد می‌کند. دی نیتروتری اکساید (N_2O_3) در صورت واکنش با سوپراکسیدها در داخل بدن منجر به تولید پراکسی نیتریت‌ها شده که موجب شکست رشته DNA و اختلال در تقسیم سلولی و در نهایت موجب آسیب به بافت می‌شود (۱۸).

دوران بارداری حساسترین زمان دوره رویانی می‌باشد که نیترات می‌تواند تأثیرات تراتوژنیک داشته باشد (۲۱, ۲۶). رویان در این فاز حساسیت زیادی به داروهای مختلف دارد. دورچ و همکاران در سال ۱۹۸۴ در مطالعه‌ای که انجام داد نیز خطر ناهنجاری‌های مادرزادی در کودکانی را که غلظت نیترات آب آشامیدنی مصرفی مادرانشان در دوران بارداری بیش از پنج میلی‌گرم در لیتر بوده است نشان داده شد (۸). در سال ۱۹۸۷ روث و همکاران با تحقیقی بر روی آب آشامیدنی که حاوی ۱,۳ گرم بر لیتر نیترات سدیم دارد دریافتند که این ترکیب در دوران بارداری و شیردهی باعث کاهش پیشرفت اریتروپویتیک می‌شود که سبب کندی رشد و در نتیجه عقب‌ماندگی و مرگ‌ومیر می‌شود (۲۵).

در طی بررسی که توسط کوک و همکاران در سال ۱۹۹۳ انجام شد وزن نوزادان موش مورد آزمایش کمتر از نوزادان موش گروه کنترل بود (۷). کاهش وزن موشها و جنین‌ها می‌تواند به علت ترکیب نیتریت با آهن هموگلوبین و کاهش انتقال اکسیژن و در نتیجه کاهش غذا رسانی به سلول‌ها می‌باشد (۱۸).

مطالعات حیوانی برخی از آنها نشان می‌دهد که ترکیبات نیترات، نیتریت و N-nitrous که از جفت عبور و به جنین در رحم مادر رسیده است (۱۳،۱۰). پیشنهاد شده است که غشای جفت در جداسازی گردش خون بین مادر و جنین ماه چهارم بارداری مؤثر است بنابراین از عبور مولکول مت هموگلوبین جلوگیری می‌کند (۱). مطالعاتی که توسط ماناسارام در سال ۲۰۰۷ انجام‌شده نشان داد که نیترات یا فرم کاهش‌یافته نیتریت ممکن است از میان سیستم انتقال فعال مشابه با یدید عبور کند و ممکن است سطح نیترات در پلاسمای خون در نوزاد بیشتر شود (۲۰). کبد با داشتن سلول‌های کوپفر عضو دستگاه دفاعی بوده و بعضی از مواد را از خون‌گرفته و تصفیه می‌کند در این مطالعه مشاهده شد که با افزایش نیترات تعداد سلول‌های کوپفر افزایش‌یافته و این امر احتمالاً به دلیل التهاب ایجادشده ناشی از اثرات نیترات و فعال شدن سیستم ایمنی است که پیامد آن افزایش سلول‌های کوپفر به‌عنوان جزئی از این سیستم می‌باشد.

پرخونی بافت کبد یکی دیگر از نتایج هیستوپاتولوژی مطالعه انجام‌شده بود که با گزارش الورنگا و همکاران در سال ۲۰۱۱ که علت آن را افزایش فعالیت کبدی می‌دانند، مطابقت داشت. در این مطالعه نیز با افزایش مقدار نیترات تعداد سلولهای خونی در کبد افزوده گردید چون کبد با افزایشی که در تعداد میتوکندری‌های اتفاق می‌افتد و با فعالیت زیاد خود، به‌طور مداوم اکسیژن خون را مصرف کرده و سبب بروز هیپوکسی در خود بافت کبد می‌گردد (۱). هم‌چنین به دلیل اینکه کبد محل اصلی متابولیسم مواد مختلف در بدن بوده و وظیفه آن سم‌زدایی می‌باشد، مصرف MDMA سبب القای مسمومیت کبدی می‌شود و متعاقباً از پرخونی کبد چنین استنباط می‌شود که افزایش میزان خون کمک می‌کند تا مواد متابولیتی راحت‌تر از بدن

خارج شوند (۵). ازجمله تغییراتی که در بافت موردنظر ایجادشده افزایش سلول‌های هپاتوسیت با افزایش مقدار هپاتوسیت‌ها می‌باشد. طبق مطالعه رات و همکاران ۲۰۰۹ نشان داده‌شده که مصرف آب حاوی نیترات و نیتریت سدیم باعث افزایش غلظت نیترات و نیتریت در معده و پلاسما می‌گردد و گزارش‌شده که مصرف آب حاوی نیترات و نیتریت سدیم باعث کاهش غلظت نیتریت در بافت کبد و قلب می‌شود (۲۳).

پروتئین Bcl_2 به‌طور عمده در بافتهای لنفوئیدی مطالعه شده است و Bcl_2 هم‌چنین گه گاهی در چندین بافت غیرلنفوئیدی نوزاد مشخص بالغ دیده می‌شود که برخی از آنها توسط سلولهای آپوپتوزیس سازماندهی می‌شوند. پروتئین Bcl_2 در نوسازی سریع اپیلیال کثیر توسط سلول‌های بنیادی و سلول‌های زایا بیان می‌شود. نظر به اینکه کبد یک انسان بالغ عادی بافتی با قدرت تکثیر سلولی هسته است ولی ممکن است از سلول‌های مهم با عمر طولانی را نگه‌داری کند.اوزن و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که در روش ایمونوهیستوشیمی در کبدی که در معرض نیتریت سدیم قرارگرفته است سطح سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها واکنش نشان داده‌شده است. ما در این مطالعه نیز تغییرات بافتی در کبد ازجمله دژنره شدن سلول‌های کبدی جنین دیده شد (۲۲).

در مجموع نیترات می‌تواند باعث بروز آپوپتوز در کبد جنین موش سوری می‌شود که با افزایش مقدار آن رابطه مستقیم دارد. بروز آپوپتوز در سلول‌های کبدی مشاهده شد و در نتیجه می‌توان نتیجه گرفت که نیترات باعث ایجاد آپوپتوز می‌شود. در واقع سلول‌های کبدی در روش ایمونوهیستوشیمی در سلول‌های هپاتوسیتی واکنش مثبت نشان داده است.

این تحقیق نشان می‌دهد که مصرف نیترات سدیم محلول در آب به میزان ۴۵۰ و۹۰۰ میلی‌گرم در لیتر در طول دوره بارداری سبب تغییرات مورفولوژیکی و هیستوپاتولوژیکی کبد ازجمله کاهش وزن و آسیب بافتی می‌شود و در این تغییرات وابسته به میزان نیترات سدیم دریافتی می‌باشد و ازآنجایی که کبد نقش حیاتی در مسمومیت زدایی دارد، این ماده سبب اختلال در تکامل بافت کبد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در آزمایشگاه تکوین جانوری دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی در تهران انجام‌شده است. لذا کمال تشکر را از آقای دکتر سیامک یاری و آقای کیوان حاجی آقاپور به جهت زحمات بی دریغشان داریم و همچنین از زحمات جناب آقای حمید رضا هاشمی رئیس آزمایشگاه بیمارستان میلاد جهت حمایت و تهیه مواد و لوازم مورد نیاز در این تحقیق تشکر می‌نماییم.

منابع

1. Alvarenga, T., Ribeiro, D., Araujo, P., Hirotsu, C., Mazaro-Costa, R., Costa, J., and et al., 2011. Sleep loss and acute drug abuse can induce DNA damage in multiple organs of mice. Human & experimental toxicology. 30(9). PP:1275-81.
2. Aulakh, N.S., and Kaler, R.S., 2008. Fiber optic interrogator based on colorimetry technique for in-situ nitrate detection in groundwater. Optica Applicata.38(4). p:727.
3. Awad, A S., Al Haleem, E.N.A., El-Bakly, W.M., and Sherief, M.A., 2016. Thymoquinone alleviates nonalcoholic fatty liver disease in rats via suppression of oxidative stress, inflammation, apoptosis. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. PP:1-11.
4. Brody, J.G., Aschengrau, A., McKelvey, W., Swartz, C.H., Kennedy, T., and Rudel, R.A., 2006. Breast cancer risk and drinking water contaminated by wastewater: a case control study. Environmental Health. 5(1). p:28.
5. Carvalho, M., Pontes, H., Remiao, F,L., Bastos, M., and Carvalho, F., 2010. Mechanisms underlying the hepatotoxic effects of ecstasy. Current pharmaceutical biotechnology. 11(5). PP:476-95.

6. Cockburn, A., Brambilla, G., Fernández, M.L., Arcella, D., Bordajandi, L.R., Cottrill, B., and et al., 2013. Nitrite in feed: From Animal health to human health. Toxicology and applied pharmacology. 270(3). PP:209-17.

7. Cooke, P., Kirby, J., and Porcelli, J., 1993. Increased testis growth and sperm production in adult rats following transient neonatal goitrogen treatment: optimization of the propylthiouracil dose and effects of methimazole. Journal of reproduction and fertility. 97(2). PP:493-9.

8. Dorsch, M.M., Scragg, R.K., Mcmichael, A.J., Baghurst, P.A., and Dyer, K.f., 1984. Congenital malformations and maternal drinking water supply in rural South Australia: a case-control study. American Journal of Epidemiology. 119(4). PP:473-86.

9. Fewtrell, L., 2004. Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: a discussion. Environmental health perspectives. PP: 1371-4.

10. Gruener, N., Shuval, H.I., Behroozi, K., Cohen, S., and Shechter, H., 1973. Methemoglobinemia induced by transplacental passage of nitrites in rats. Bulletin of environmental contamination and toxicology. 9(1). PP:44-8.

11. Hajirahimi, A., Farokhi, F., and Tukmechi, A., 2015. Effects of Iron oxide and zinc nanoparticles on the liver and muscles in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Journal of Animal Researches. 28(3). PP: 293-306.

12. Halliwell, B., 2007. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? Cardiovascular research. 73(2). PP:341-7.

13. Hord, N.G., Tang, Y., and Bryan, N.S., 2009. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. The American Journal of clinical nutrition. 90(1). PP:1-10.

14. Jensen, F.B., Gerber, L., Hansen, M.N., and Madsen, S.S., 2015. Metabolic fates and effects of nitrite in brown trout under normoxic and hypoxic conditions: blood and tissue nitrite metabolism and interactions with branchial NOS, Na+/K+-ATPase and hsp70 expression. Journal of Experimental Biology. 218(13).

15. Kaufmann, T., Strasser, A., and Jost, P., 2012. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. Cell Death and Differentiation. 19(1) PP: 42-50.

16. Kröger, N., Milde-Langosch, K., Riethdorf, S., Schmoor, C., Schumacher, M., Zander, A.R., and et al., 2006. Prognostic and predictive effects of immunohistochemical factors in high-risk primary breast cancer patients. Clinical cancer research. 12(1) PP:159-68.

17. Lu, L., Zhang, C., Zhu, G., Irwin, M., Risch, H., Menato, G., and et al., 2011. Telomerase expression and telomere length in breast cancer and their associations with adjuvant treatment and disease outcome. Breast Cancer Research. 13(3). PP:1-8.

18. Lundberg, J.O., Weitzberg, E., and Gladwin, M.T., 2008. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. Nature reviews Drug discovery. 7(2). PP: 156-67.

19. Madani, H., Asgari, S., Naderi, G.H.A., Taleb, A.l., and Hosseinni, M., 2006. Hepatoprotective effects of silybum marianum and callendula officinalis polyphenolic extracts in rat. Iranian Journal of biology, 19(2). PP: 157-163.

20. Manassaram, D.M., Backer, L.C., and Moll, D.M., 2007. A review of nitrates in drinking water: maternal exposure and adverse reproductive and developmental outcomes. Ciencia and saude coletiva. 12(1), PP: 153-63.

21. Moon, H.K., Yang, E.S., and Park, J.W., 2006. Protection of peroxynitrite-induced DNA damage by dietary antioxidants. Archives of pharmacal research. 29(3). PP: 213-7.

22. Özen, H., Kamber, U., Karaman, M., Gül, S., Atakişi, E., Özcan, K., and et al., 2014. Histopathologic, biochemical and genotoxic investigations on chronic sodium nitrite toxicity in mice. Experimental and Toxicologic Pathology. 66(8). PP: 367-75.

23. Raat, N.J., Noguchi, A.C., Liu, V.B., Raghavachari, N., Liu, D., Xu, X., and et al., 2009. Dietary nitrate and nitrite modulate blood and organ nitrite and the cellular ischemic stress response. Free Radical Biology and Medicine. 47(5). PP: 510-7.

24. Rocha, B.S., Gago, B., Barbosa, R.M., Cavaleiro, C., and Laranjinha, J., 2015. Ethyl nitrite is produced in the human stomach from dietary nitrate and ethanol, releasing nitric oxide at physiological pH: potential impact on gastric motility. Free Radical Biology and Medicine. 82, PP: 160-166.

25. Roth, A.C., Herkert, G.E., Bercz, J.P., and Smith, M.K., 1987. Evaluation of the developmental toxicity of sodium nitrite in Long-Evans rats. Fundamental and Applied Toxicology. 9(4). PP:668-77.

26. Mary H. Ward, Theo M. deKok, Patrick Levallois, Jean Brender, Gabriel Gulis, Bernard

T. Nolan and James VanDerslice. 2005. Workgroup Report: Drinking-Water Nitrate and Health-Recent Findings and Research Needs. Environmental Health Perspectives. 113(11). PP. 1607-1614

27. Van Grinsven, H.J., Rabl, A., and De Kok, T.M., 2010. Estimation of incidence and social cost of colon cancer due to nitrate in drinking water in the EU: a tentative cost-benefit assessment. Environmental health. 9(1). p: 58.

The Effects of the water nitrate on the histology and immunohistology of the liver development in NMRI Mice Fetus

Ghoreishi M.[1], Nabiuni M.[2], Shiravi A.H.[1], Rostami M.[3] and Karimzadeh-Bardei L.[3]

[1] Biology Dept., Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, I.R. of Iran

[2] Cell and Molecular Biology Dept., Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R. of Iran

[3] Animal Biology Dept., Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Nowadays nitrate enters to the groundwater through of chemical fertilizers and fossil fuels. With entering nitrate to the body and converting into other substances it can have detrimental effects on the body and the fetus, and because nitrate passes straight through the barrier placental blood into the liver. The purposes of this study the effects of excess nitrate in drinking water on fetal liver cells of mice were studied. For this purpose, the effects of the Sodium Nitrate (doses 450, 900 mg / liter/day in drinking water) during pregnancy of female mice were investigated. On 17th day of pregnancy, all groups were killed via chloroform and fetal liver were fixed in 10% formalin for immunohistochemistry and histology analysis. The one–way ANOVA and SPSS software were used to determine the statistical significance of differences between the values for the experimental and control groups and also Image-J software were used to cell count. The results obtained showed a significant decrease in weight of pregnant mice, fetal weight, number of fetuses, and also histological changes in liver cells. According to the immunohistochemical study, seems an increase of nitrate in drinking water after entering the liver can be causes bcl_2 protein changes in the fetus liver. **Conclusion**: excess nitrate in drinking water causes disturbances in liver development of the fetus during pregnancy.

Key words: Nitrate, Water, Fetal Liver, Immunohistochemistry, Pregnancy.