

## Effects of Acrylamide and Vitamin C on Histological Changes and Stereological Parameters of Cerebellum in Rat Offsprings

Hengameh Dortaj, Maryam Yadegari, Mohammad Hosseini Sharif Abad, Abolghasem Abbasi Sarcheshmeh, Morteza Anvari\*

Department of Biology & Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

### Article Info:

Received: 22 Jun 2014

Accepted: 6 Aug 2014

## ABSTRACT

**Introduction:** Acrylamide (ACR) is a substance chemical used in industrial and laboratory procedures. Acrylamide according to the method of cooking foods are increasingly used and its adverse effects on multiple organ systems have been described sporadically in the literature. The aim of this study was to investigate the effects of prenatal (maternal) ACR consumption on the physical development and the changes of cerebellar volume in the rat embryo. **Materials and Methods:** Female pregnant Wistar rats were orally administered 10 mg/kg ACR and/or 200 mg/kg vitamin C (vit C) solution. Pregnant rats were sacrificed on the 15<sup>th</sup> day of gestation and mother's weight was measured. After that, their fetuses were taken out and were evaluated for fetus number and weight, crown-rump length (CRL) and cerebellar development. A total of 100 sections were cut through the entire cerebellum. From these sections, approximately 10 equidistant sections were systematic uniformly random sampled with an initial random start and stained with hematoxylin-eosin for volume estimation. The cerebellar volume was estimated by micro-projection and cavaliers' method. **Results:** The results showed that ACR caused a significant reduction in mother's weight and volume of cerebellum as well as in the number of fetus. Histological and stereological examinations revealed that the cerebellar volume was decreased in ACR and ACR+vit C groups vs control animals. **Conclusion:** ACR exhibits a harmful effect on the development of the brain, which may be prevented by administration of vit C.

### Key words:

1. Cerebellar Diseases
2. Acrylamide
3. Histology
4. Embryonic Structures
5. Rats

\* **Corresponding Author:** Morteza Anvari

E-mail: moanvari@yahoo.com

## اثرات آکريل آميد و ويتامين C بر تغييرات بافتي و شاخص هاي استريولوژي مخچه در جنين هاي موش صحرابي

هنگامه در تاج، مريم بادگاري، محمد حسيني شريف آباد، ابوالقاسم عباسي سرچشمه، مرتضي انوري\*

گروه علوم تشریح و بیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

## اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۱۵ مرداد ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱ تیر ۱۳۹۳

## چکیده

**مقدمه:** آکريل آميد یک ماده شيميايي است که در صنعت و فرايندهاي آزمائشگهي کاربرد دارد. آکريل آميد امروزه با توجه به روش پخت غذاها به صورت روزافزون مورد استفاده قرار مي گيرد و اثرات سوء آن بر دستگاه هاي مختلف بدن به صورت پراکنده در مطالعات بيان شده است. هدف از اين مطالعه بررسي اثرات مصرف آکريل آميد در دوره جنيني (دوران بارداري) بر تکامل فيزيکي و تغييرات حجم مخچه در جنين موش صحرابي است. **مواد و روش ها:** موش هاي صحرابي ماده آبستن نژاد ويستار، آکريل آميد به ميزان ۱۰ ميلي گرم/کيلوگرم و محلول ويتامين C به ميزان ۲۰۰ ميلي گرم/کيلوگرم به صورت خوراكي دريافت کردند. در روز ۱۵ بارداري، ابتدا وزن مادر اندازه گيري گرديد و سپس موش هاي صحرابي آبستن کشته شدند. سپس جنين ها خارج گرديد و از نظر تعداد، وزن، طول فرق سري -نشيمنگاهي و تکامل مخچه بررسي شدند. در مجموع ۱۰۰ برش بافتي از کل مخچه تهيه شد. از بين اين برش ها، ۱۰ برش به صورت تصادفي با فاصله يکنواخت و شروع تصادفي يکنواخت انتخاب شد و با روش رنگ آميزي همتوکسيلين -انوزين براي محاسبه حجم رنگ آميزي شد. حجم مخچه توسط روش ميکروپروجکشن و کواليري اندازه گيري شد. **يافته ها:** نتايج نشان داد که آکريل آميد سبب کاهش چشمگيري در وزن مادر و حجم مخچه و نيز تعداد جنين ها مي شود. بررسي هاي بافت شناسي و استريولوژي نشان دادند که حجم مخچه در گروه هاي آکريل آميد و آکريل آميد + ويتامين C نسبت به گروه کنترل کاهش مي يابد. **نتيجه گيري:** آکريل آميد یک اثر مضر بر تکامل مغز دارد که ممکن است با تجويز ويتامين C بتوان از اين اثرات پيشگيري نمود.

## کلید واژه ها:

۱. بيماري هاي مخچه
۲. آکريل آميد
۳. بافت شناسي
۴. ساختارهاي جنيني
۵. موش صحرابي

\* نویسنده مسئول: مرتضي انوري

آدرس الکترونيکي: moanvari@yahoo.com

## مقدمه

سلول ایفاء می‌کند (۱۴).

حجم کلی کورتکس، ماده سفید، مساحت سطح مخچه، تراکم و تعداد کلی سلول‌های پورکنز<sup>۴</sup> و گرانولار<sup>۵</sup>، میانگین حجم سلول‌های پورکنز و هسته‌های آن‌ها در این ۵ ناحیه با استفاده از روش‌های استریولوژی اندازه‌گیری می‌شود.

استریولوژی در سال ۱۹۶۱ توسط اعضای منشور جامعه بین المللی استریولوژی ابداع گردیده که به معنی تفسیر سه بعدی تصاویر دو بعدی، همچون مقاطع و پروجکشن‌ها می‌باشد (۱۵). استریولوژی برای برون‌یابی کمیت‌های سه بعدی (مانند حجم واقعی، مساحت، طول و تعداد) از محاسبات ساده‌ای که بر اساس برش‌های تصویری دو بعدی انجام می‌شود ایده‌آل است. تصاویر را می‌توان به صورت‌های مختلف گرفت (مقاطع فیزیکی یا نوری، برش‌های تصویربرداری امواج مغناطیسی<sup>۶</sup> و توموگرافی کامپیوتری<sup>۷</sup>) اما نمونه‌گیری‌ها باید به صورت تصادفی در جهات و وضعیت‌های مختلف انتخاب شوند تا برآوردهای معتبری به دست آید. مزیت آن نسبت به سایر روش‌های کمی، به خاطر دقت زیاد، در دسترس بودن و ثبات نتایج آن است و به این دلیل است که به صورت وسیعی در مقالات علمی از این روش استفاده می‌شود (۱۶، ۱۵).

از آنجایی که آسیب مخچه می‌تواند منجر به اختلالات حرکتی در روند تکامل نوزاد شود و با توجه به اینکه تاکنون بررسی‌هایی بر روی مغز، پیرامون اثر آکریل‌آمید انجام شده است، اما تحقیقات پیرامون مخچه و به خصوص بررسی تغییرات آن در دوره جنینی و بارداری محدود بوده و مطالعه جامعی که نشان دهنده تغییرات ایجاد شده در شاخص‌های بافتی و استریولوژی مخچه باشد انجام نگرفته است. بنابراین هدف این مطالعه بررسی اثر آکریل‌آمید در دوره بارداری بر روی تعداد جنین‌ها، تغییرات وزن مادر و جنین، طول فرق سری-نشیمنگاهی جنین، حجم مخچه و بررسی تغییرات بافت‌شناسی مخچه می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۲۰ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با میانگین سن ۶۰ تا ۷۰ روز و وزن ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات تحت شرایط معمول آزمایشگاه شامل دوره طبیعی شبانه روز (۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی)، دمای ۲۳-۲۱ درجه و رطوبت نسبی ۱۰ ± ۵۰٪ نگهداری شدند و آب و خوراک به صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار داده شد. آب آشامیدنی از طریق بطری‌های شیشه‌ای در اختیار آن‌ها قرار گرفت و خوراک نیز به صورت پلت‌های آماده مخصوص حیوانات آزمایشگاهی تأمین شد.

به ازای هر ۲ سر موش صحرایی ماده ۱ سر موش صحرایی نر بالغ در هر قفس قرار داده شد. صبح روز بعد جهت کنترل لقاح، اسمیر واژینال<sup>۸</sup> گرفته شد و مثبت شدن اسمیر به عنوان روز صفر بارداری در نظر گرفته شده و موش‌های صحرایی ماده در ۴ گروه پنج تایی به صورت زیر تقسیم‌بندی شدند.

آکریل‌آمید<sup>۱</sup> (پروپانامید یا آکرلیک اسیدآمید) یک آمید غیراشباع دارای فرمول شیمیایی (CH<sub>2</sub>=CH-CONH<sub>2</sub>) می‌باشد (۱). این ماده به صورت کریستال‌های جامد بی بو و سفید رنگ محلول در آب است که در صنایع مختلفی مانند صنایع چسب، پارچه، کاغذ و تحقیقات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲) و یکی از اجزای تشکیل‌دهنده دود سیگار نیز می‌باشد (۳). آکریل‌آمید در غذاهای سرخ شده با درجه حرارت بالا تشکیل می‌شود و غلظت آن در غذاها به نوع غذا، روش پخت، درجه حرارت و مدت زمان گرم‌شدن غذاها بستگی دارد (۴). این ماده وارد جریان خون می‌شود و با DNA درون هسته سلول‌های عصبی، هموگلوبین و آنزیم‌های ضروری واکنش می‌دهد (۵).

آکریل‌آمید به دو شکل مونومری و پلیمری وجود دارد، شکل مونومری آن برای سیستم عصبی سمی است و در حیوانات آزمایشگاهی و احتمالاً در انسان سرطان‌زا می‌باشد اما هنوز اثرات سمی فرم پلیمری آن شناخته نشده است (۲). آکریل‌آمید در غذاهایی که در سرتاسر جهان سالیانه مصرف می‌شود مانند چیپس، نان، بیسکویت و کلوچه یافت می‌شود و این مسأله باعث نگرانی عمومی در جوامعی که به طور شایع و به مقدار زیاد از غذاهای غنی از آکریل‌آمید استفاده می‌نمایند، شده است. تحقیقات اخیر نشان داده است که آکریل‌آمید می‌تواند در شرایط فیزیولوژی (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH=۷/۴) موقعی که اسید آمینه اسپاراژین در حضور هیدروژن پراکسید<sup>۲</sup> انکوبه می‌شود، تشکیل گردد. خصوصیات ساختار شیمیایی آکریل‌آمید و توانایی تبدیل متابولیکی آن این امکان را فراهم کرده که با سلول به منظور اهدافی متفاوت واکنش نشان دهد (۶).

اثرات سوء آکریل‌آمید بر دستگاه‌های مختلف بدن به صورت پراکنده در مطالعات بیان شده است. یکی از اثرات آکریل‌آمید، اثر بر روی سیستم عصبی است و بسته به نوع حیوان به سلول‌های عصبی دوپامینرژیک و سروتونرژیک آسیب می‌زند (۸، ۷). به رغم طیف وسیع عصب‌دهی سلول‌های عصبی مونوآمینینی در مخچه و نقش اصلی این اندام در کنترل حرکات، که مخچه را یک هدف بالقوه برای آکریل‌آمید قرار می‌دهد، تنها تعداد اندکی مطالعه در مورد اثر آکریل‌آمید بر مخچه جنین انجام شده است (۹).

ویتامین C<sup>۲</sup> یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که بافت را از صدمات اکسیداتیو محافظت می‌کند (۱۰) و دارای آثار محافظت از سلول‌های عصبی است که از مرگ سلول‌های عصبی در مغز جلوگیری می‌کند (۱۱). غلظت ویتامین C در مغز نسبت به سایر اندام‌های دیگر بیشتر است (۱۲) که این امر نشان‌دهنده نقش مهم آن در فیزیولوژی طبیعی سلول‌های عصبی به عنوان یک آنتی‌اکسیدان است (۱۳).

ویتامین C قادر است از سد خونی-مغزی عبور کند و نقش خود را با از بین بردن رادیکال‌های آزاد چه در داخل و چه در خارج

<sup>1</sup> Acrylamide

<sup>2</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

<sup>3</sup> Ascorbic acid

<sup>4</sup> Purkinje cell

<sup>5</sup> Granular cell

<sup>6</sup> Magnetic Resonance Imaging (MRI)

<sup>7</sup> Computed Tomography (CT)

<sup>8</sup> Vaginal smear

• گروه الف: کنترل (مصرف آب معمولی).

• گروه ب: روزانه ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم آکریل آمید محلول در آب (۱۷).

• گروه ج: روزانه ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم ویتامین C محلول در آب (۱۴).

• گروه د: روزانه ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم آکریل آمید + ۲۰۰ میلی گرم ویتامین C دریافت کردند.

برش و  $a(p)$ : مساحت اطراف هر نقطه می باشد (۱۸).

برای به دست آوردن مساحت اطراف هر نقطه ابتدا طول شبکه بر اساس سانتی متر محاسبه شده، سپس بر تعداد فواصل موجود بین نقاط در طول شبکه تقسیم شد (X)، به طریقی مشابه عرض شبکه محاسبه شده بر تعداد فواصل موجود بین نقاط در عرض تقسیم گردید (Y). با حاصل ضرب X و Y در هم  $a(p)$  بر حسب سانتی متر مربع به دست می آید. با ضرب نمودن عدد حاصل در ۱۰۰ مساحت اطراف هر نقطه به میلی متر مربع تبدیل شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

اطلاعات به دست آمده در این پژوهش با استفاده از نرم افزار SPSS version 15 و با به کارگیری روش ANOVA و سپس آزمون LSD مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و  $P < 0.05$ ، معنی دار در نظر گرفته شد.

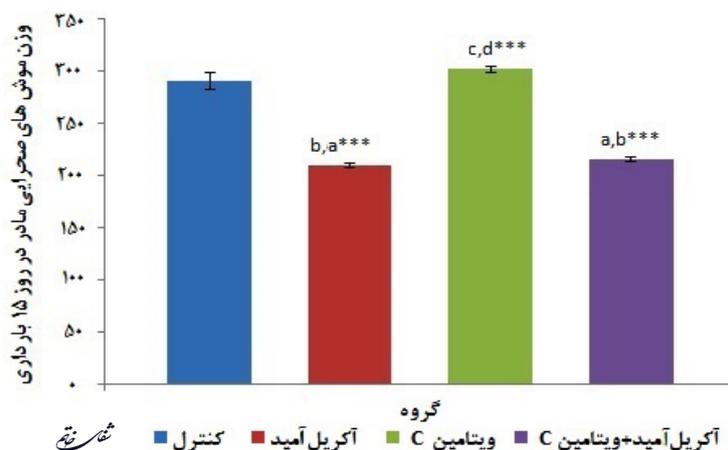
### یافته‌ها

نتایج، اختلاف معناداری را بین گروه‌های کنترل و آزمایش در خصوص میزان آب و غذای مصرفی موش‌های صحرایی باردار نشان داد. برای تعریف سطح معناداری  $P < 0.05$  با یک ستاره و  $P < 0.001$  با دو ستاره و  $P < 0.0001$  با سه ستاره نشان داده شده است.

همان گونه که نمودار ۱ نشان می دهد وزن موش‌های صحرایی مادر در گروهی که آکریل آمید ( $1/89 \pm 209/6$  گرم) و آکریل آمید + ویتامین C ( $2/31 \pm 215/8$  گرم) مصرف کرده بودند نسبت به گروه کنترل ( $8/41 \pm 290/8$  گرم) کاهش داشت ( $P < 0.0001$ ) و وزن جنین‌ها در گروهی که تنها آکریل آمید مصرف کرده بودند نسبت به گروه کنترل تغییر چشمگیری نداشت. استفاده از ویتامین C ( $0.79 \pm 0.02$  گرم) موجب افزایش وزن جنین نسبت به گروه کنترل ( $0.1 \pm 0.51$  گرم) شده بود ( $P < 0.0001$ ) - (نمودار ۱، ۲).

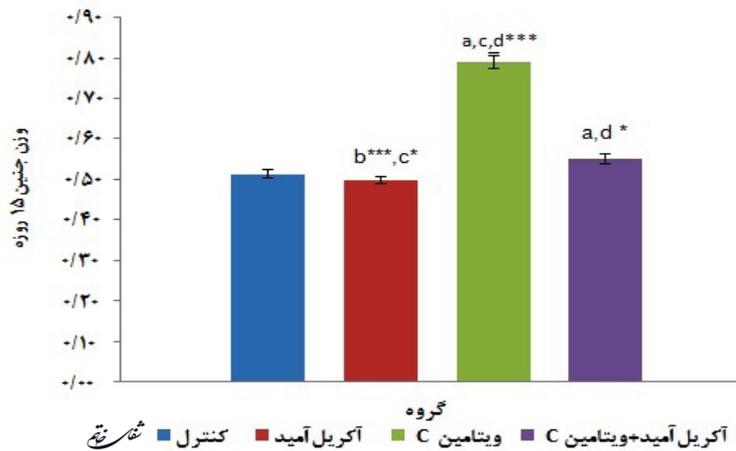
بعد از گذشت ۱۵ روز از شروع بارداری، موش‌های صحرایی ماده تحت بیهوشی استنشاقی با اتر قرار گرفتند. سپس رحم، جفت و جنین‌های آن‌ها خارج شد. وزن موش‌های صحرایی باردار قبل از خارج کردن جنین‌ها اندازه‌گیری و ثبت گردید. تعداد پنج جنین از میان تمام جنین‌های هر موش صحرایی به صورت تصادفی انتخاب شده و سپس وزن و طول فرق سری -نشیمناهی (CRL)<sup>۹</sup> آن‌ها اندازه‌گیری شد.

تمام جنین‌ها برای فیکس شدن به مدت سه هفته در محلول فرمالدئید ۴٪ قرار داده شدند. سپس با یک برش، مخچه را جدا نموده، آن را دو نیم کرده و یکی از نیمکره‌ها برای بررسی حجم مخچه مورد استفاده قرار گرفت. سپس توسط غلظت‌های افزایشی اتانول آبگیری شده و قالب‌های پارافینی تهیه گردید. به منظور انجام بررسی‌های بافت‌شناسی و استریولوژی از قالب‌های بافتی مخچه، برش‌های متوالی با ضخامت ۵ میکرون تهیه و برای هر ناحیه ۱۰ مقطع به صورت تصادفی و منظم انتخاب و پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین با استفاده از میکروپروچکشن و روش کاوالیری محاسبه حجم صورت گرفت. برای محاسبه حجم، تعداد نقاطی که با لایه قشر مخچه برخورد کرده را شمرده و با قرار دادن در فرمول کاوالیری  $(\sum V = a(P) \times t \times \sum P)$  متغیرها محاسبه می‌شوند. در این فرمول  $\sum P$ ؛ مجموع نقاط برخورد شبکه با ناحیه مورد نظر،  $t$ ؛ ضخامت



نمودار ۱- مقایسه تغییرات وزن موش‌های صحرایی مادر بر حسب گرم در روز ۱۵ بارداری در گروه‌های مورد مطالعه. وزن موش‌های صحرایی ماده در گروه آکریل‌آمید و آکریل‌آمید + ویتامین C نسبت به گروه کنترل کاهش داشت ( $P < 0.0001$ ) ولی در گروه ویتامین C موجب افزایش وزن نسبت به گروه کنترل شد اما این افزایش معنی‌دار نبود. نتایج به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  گزارش شده است. در نمودار، (a) برای مقایسه گروه کنترل با سایر گروه‌ها، (b) برای مقایسه گروه ویتامین C با سایر گروه‌ها، (c) برای مقایسه گروه آکریل‌آمید + ویتامین C با سایر گروه‌ها و (d) برای مقایسه گروه آکریل‌آمید با سایر گروه‌ها استفاده شده است. \*، \*\* و \*\*\* به ترتیب نشان دهنده  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$  و  $P < 0.0001$  می‌باشد.

<sup>9</sup> Crown-Rump Length

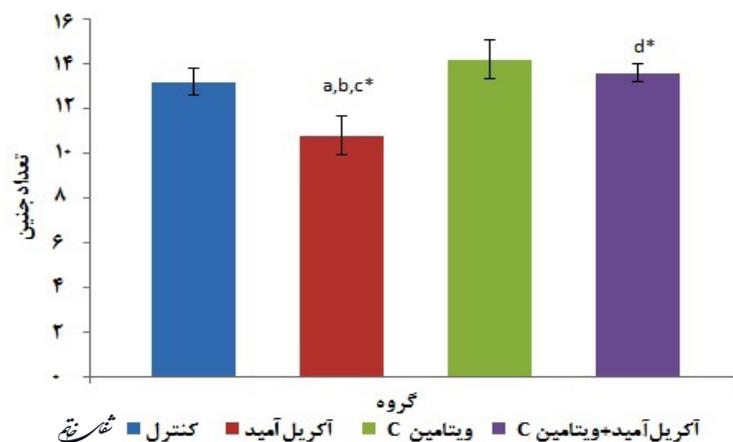


نمودار ۲- مقایسه تغییرات وزن جنین‌های ۱۵ روزه بر حسب گرم در گروه‌های مورد مطالعه. وزن جنین‌ها در گروه آکریل‌آمید نسبت به گروه کنترل تغییر چندانی نداشت اما وزن جنین‌ها در گروه ویتامین C نسبت به گروه کنترل افزایش داشت ( $P < 0.001$ ) در گروهی که آکریل‌آمید + ویتامین C مصرف کرده بودند افزایش وزن دیده شد ( $P < 0.05$ ). نتایج به صورت Mean  $\pm$  SEM گزارش شده است. در نمودار، (a) برای مقایسه گروه کنترل با سایر گروه‌ها، (b) برای مقایسه گروه ویتامین C با سایر گروه‌ها، (c) برای مقایسه گروه آکریل‌آمید + ویتامین C با سایر گروه‌ها و (d) برای مقایسه گروه آکریل‌آمید با سایر گروه‌ها استفاده شده است. \*، \*\* و \*\*\* به ترتیب نشان دهنده  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$  می‌باشد.

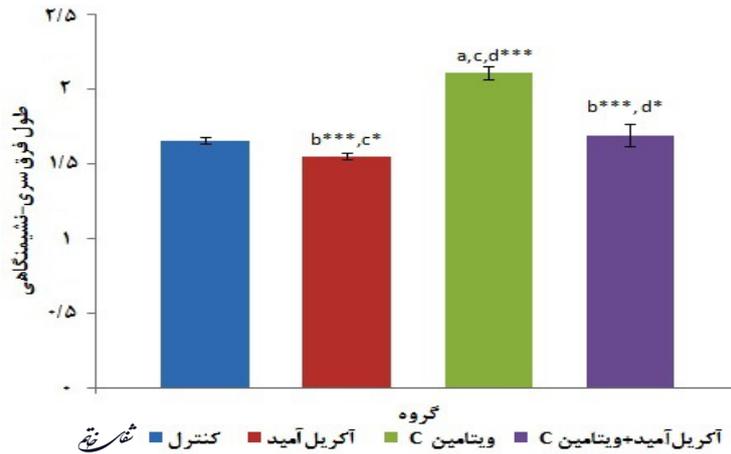
تعداد جنین‌ها در گروه آکریل‌آمید ( $10/8 \pm 0/86$ ) نسبت به گروه کنترل ( $13/2 \pm 0/58$ ) کاهش داشت ( $P < 0/05$ ). همچنین تعداد جنین‌ها در گروه آکریل‌آمید ( $10/8 \pm 0/86$ ) نسبت به گروه ویتامین C ( $14/2 \pm 0/86$ ) کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ). یعنی استفاده از ویتامین C موجب افزایش تعداد جنین‌ها نسبت به گروه آکریل‌آمید شده بود اما تعداد جنین‌ها در گروه ویتامین C نسبت به گروه کنترل تغییر چندانی نداشت (نمودار ۳).

طول فرق سری -نشیمنگاهی جنین‌ها در گروه آکریل‌آمید نسبت به گروه کنترل تغییر چشمگیری نداشت. اما طول فرق سری -نشیمنگاهی جنین‌ها در گروه ویتامین C ( $2/11 \pm 0/04$ ) نسبت به دو گروه آکریل‌آمید ( $1/55 \pm 0/02$ )

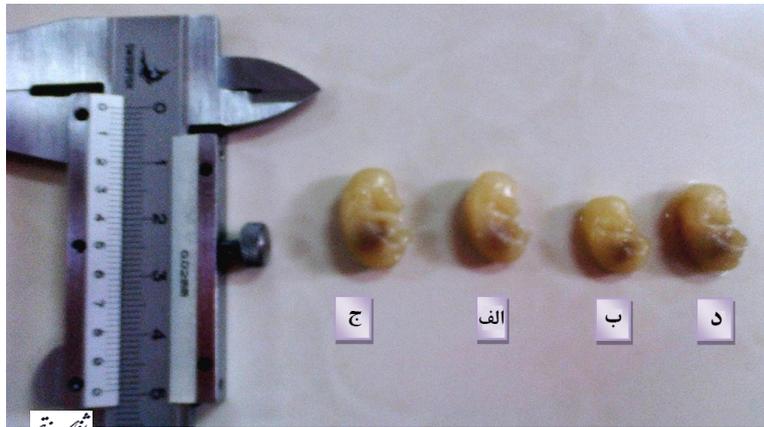
مطالعه استریولوژی نشان داد که حجم مخچه جنین‌ها در گروه آکریل‌آمید ( $1/34 \pm 0/03$  میلی‌متر مربع) و در گروه آکریل‌آمید + ویتامین C ( $1/64 \pm 0/06$  میلی‌متر مربع) نسبت به گروه کنترل ( $2/11 \pm 0/03$  میلی‌متر مربع) کاهش معنی‌داری داشت ( $P < 0/001$ ). اما حجم مخچه جنین‌ها در گروه ویتامین C ( $2/33 \pm 0/07$  میلی‌متر مربع) نسبت به گروه کنترل ( $2/11 \pm 0/03$  میلی‌متر مربع) افزایش معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ )، نمودار ۵).



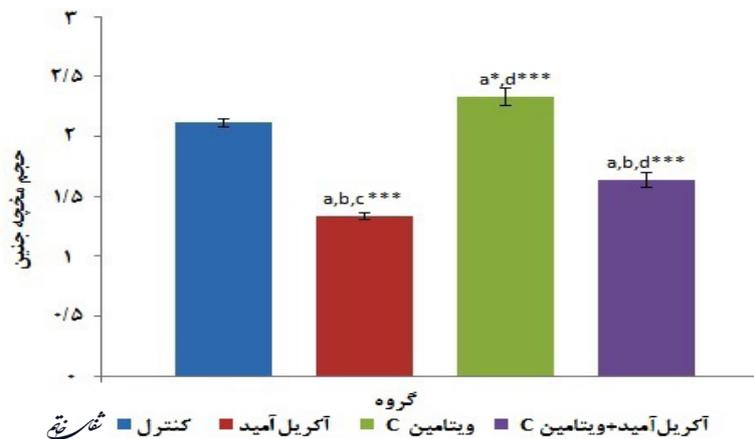
نمودار ۳- مقایسه تغییرات تعداد جنین‌ها در گروه‌های مورد مطالعه. تعداد جنین‌ها در گروه آکریل‌آمید نسبت به گروه کنترل کاهش داشت ( $P < 0/05$ ) ولی در گروه‌های دیگر نسبت به گروه کنترل تغییرات معنادار نبود. نتایج به صورت Mean  $\pm$  SEM گزارش شده است. در نمودار، (a) برای مقایسه گروه کنترل با سایر گروه‌ها، (b) برای مقایسه گروه ویتامین C با سایر گروه‌ها، (c) برای مقایسه گروه آکریل‌آمید + ویتامین C با سایر گروه‌ها و (d) برای مقایسه گروه آکریل‌آمید با سایر گروه‌ها استفاده شده است. \*، \*\* و \*\*\* به ترتیب نشان دهنده  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$  می‌باشد.



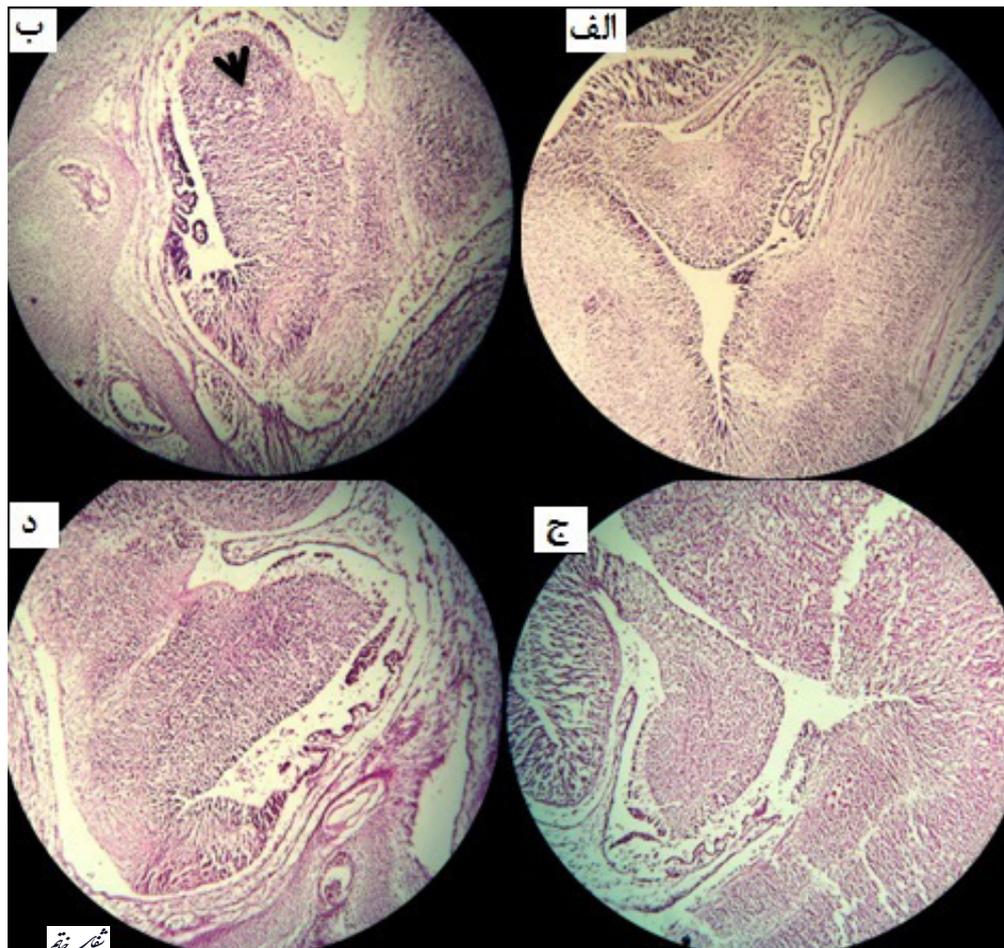
**نمودار ۴-** مقایسه تغییرات طول فرق سری -نشیمنگاهی جنین‌ها بر حسب سانتی‌متر در گروه‌های مورد مطالعه. طول فرق سری -نشیمنگاهی جنین‌ها در گروه آکریل‌آمید و آکریل‌آمید + ویتامین C نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود. این عامل در گروه ویتامین C نسبت به دو گروه آکریل‌آمید + ویتامین C و آکریل‌آمید + ویتامین C (P<0/001) افزایش داشت. نتایج به صورت Mean ± SEM گزارش شده است. در نمودار، (a) برای مقایسه گروه کنترل با سایر گروه‌ها، (b) برای مقایسه گروه ویتامین C با سایر گروه‌ها، (c) برای مقایسه گروه آکریل‌آمید + ویتامین C با سایر گروه‌ها و (d) برای مقایسه گروه آکریل‌آمید با سایر گروه‌ها استفاده شده است. \*، \*\* و \*\*\* به ترتیب نشان دهنده P<0/05، P<0/01 و P<0/001 می‌باشد.



**تصویر ۱-** تغییرات طول فرق سری -نشیمنگاهی جنین‌ها در گروه‌های مورد مطالعه بر حسب سانتی‌متر. (الف) گروه کنترل (ب) گروه آکریل‌آمید (ج) گروه ویتامین C (د) گروه آکریل‌آمید + ویتامین C. طول فرق سری -نشیمنگاهی جنین‌ها در گروه آکریل‌آمید نسبت به گروه کنترل کاهش چشمگیری نداشت اما در گروه ویتامین C نسبت به گروه کنترل و گروه آکریل‌آمید و گروه آکریل‌آمید + ویتامین C افزایش داشت.



**نمودار ۵-** مقایسه تغییرات حجم مخچه جنین‌ها بر حسب میلی‌مترمربع در گروه‌های مورد مطالعه. حجم مخچه جنین‌ها در گروه آکریل‌آمید و در گروه آکریل‌آمید + ویتامین C نسبت به گروه کنترل کاهش داشت (P<0/001) اما در گروه ویتامین C نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد (P<0/05). نتایج به صورت Mean ± SEM گزارش شده است. در نمودار، (a) برای مقایسه گروه کنترل با سایر گروه‌ها، (b) برای مقایسه گروه ویتامین C با سایر گروه‌ها، (c) برای مقایسه گروه آکریل‌آمید + ویتامین C با سایر گروه‌ها و (d) برای مقایسه گروه آکریل‌آمید با سایر گروه‌ها استفاده شده است. \*، \*\* و \*\*\* به ترتیب نشان دهنده P<0/05، P<0/01 و P<0/001 می‌باشد.



تصویر ۲- فتومیکروگراف مخچه در گروه‌های مختلف، الف) گروه کنترل ب) گروه آکریل‌آمید ج) گروه ویتامین C د) گروه آکریل‌آمید + ویتامین C. حجم مخچه جنین‌ها در گروه آکریل‌آمید و گروه آکریل‌آمید + ویتامین C نسبت به گروه کنترل کمتر شده بود اما در گروه ویتامین C افزایش داشت. در گروه آکریل‌آمید واکنش شدن بافت مخچه در مقایسه با گروه کنترل و سایر گروه‌ها دیده شد. این واکنش‌ها تنها در گروه آکریل‌آمید مشاهده شدند. واکنش با سر پیکان مشخص شده است. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین (بزرگنمایی ۱۰X).

مصرف موجب مرگ، کاهش وزن و عقب ماندگی رشد جنین‌ها می‌گردد. همچنین در تحقیق دیگری استفاده از آکریل‌آمید در مادران به صورت خوراکی در جریان رشد و نمو جوندگان موجب کاهش وزن نوزادان آن‌ها شد (۲۰). استفاده از ویتامین C در مطالعه فعلی به عنوان آنتی‌اکسیدان این تغییرات را تعدیل کرده و کاهش می‌دهد.

مخچه نقش عمده‌ای را در زمان بندی فعالیت‌های حرکتی برعهده دارد، همچنین به کنترل واکنش‌های متقابل عضلات کمک می‌کند. بر اساس مطالعات اکثر سلول‌های عصبی در اواسط دوره بارداری ساخته شده (۲۱) و سپس شروع به مهاجرت کرده و به مکان‌های نهایی خود می‌رسند. رشد سلول‌های عصبی در طی مدت زمان قبل از تولد رخ می‌دهد اما در مخچه حتی بعد از تولد هم اتفاق می‌افتد (۲۲).

در این مطالعه از روش استریولوژی و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین برای بررسی تغییرات مخچه استفاده شد. کمبود اطلاعات در مورد اثرات تخریب بافتی که ممکن است در اثر تغذیه با مواد نشاسته‌ای سرخ شده حاوی آکریل‌آمید در طی بارداری بر روی سیستم عصبی جنین ایجاد شود، هدف این مطالعه قرار گرفت.

همچنین در بررسی‌های بافت‌شناسی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین واکنش شدن بافت مخچه در گروه آکریل‌آمید در مقایسه با گروه کنترل دیده شد این واکنش‌ها در گروه‌های دیگر دیده نشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که آکریل‌آمید باعث ایجاد واکنش شدن، شده است (تصویر ۲).

### بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد تجویز آکریل‌آمید به موش‌های صحرایی باردار موجب کاهش وزن و طول فرق سری-نشیمگاهی جنین‌ها نسبت به گروه کنترل شده است اما این کاهش تنها در مورد وزن مادر، تعداد جنین‌ها و حجم مخچه معنی‌دار بود. تجویز آکریل‌آمید به موش‌های صحرایی باردار، منجر به کاهش میانگین وزن موش‌های صحرایی مادر و کاهش تعداد جنین‌ها می‌شود. این نتایج با یافته‌های مطالعات قبلی مطابقت دارد که نشان دادند مقدار آکریل‌آمید مصرفی در این مطالعه قادر است سبب القای اثرات سمی در رشد ظاهری جنین شود (۱۹).

تحقیقات نشان می‌دهد در معرض قرارگرفتن داخل رحمی موش‌های صحرایی با آکریل‌آمید بسته به مقدار و مدت زمان

صحرائی نابالغ نر و ماده بررسی شده بود (۲۹) و واکنش‌ها شدن مغز بعد از ۲۸ روز مصرف آکریل‌آمید با بررسی انجام شده در این مطالعه بر روی مخچه مطابقت دارد. این بررسی همخوان با مطالعات قبلی وی بار<sup>۱۵</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۲ می‌باشد که نشان‌دهنده تأخیر در تکوین قشر مخ، لوله عصبی و هیپوکامپ در نوزادان موش‌هایی است که مادرانشان در دوران بارداری آکریل‌آمید خوراکی یا تزریقی دریافت کرده‌اند (۳۰).

در بررسی‌های اسکات<sup>۱۶</sup> و ویلسون<sup>۱۷</sup> در سال ۱۹۷۱ نکروز سلول‌ها نیز در اثر مصرف آکریل‌آمید در موش‌های صحرائی نوزاد مشاهده شده بود. این نکروز ممکن است به علت مهار سنتز DNA مورد نیاز برای رشد و بلوغ سلول‌ها باشد (۳۱، ۳۲). آلام<sup>۱۸</sup> و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که آکریل‌آمید در دوران قبل از تولد موجب اختلالات بیوشیمی، استرس اکسیداتیو و القای تغییرات ساختار مخچه می‌شود (۳۳).

آنتی‌اکسیدان‌ها مانند ویتامین C می‌توانند اثرات سودمند خود را از طریق واکنش با رادیکال‌های آزاد بازی کنند (۳۴، ۳۵). در مطالعات بافت‌شناسی مغز موش‌های صحرائی نر بالغ مشاهده شد که در حضور ویتامین C، تخریب، آپوپتوز و واکنش شدن سلول‌های عصبی کاهش یافته بود (۳۶).

استفاده از ویتامین C در این مطالعه نیز اثرات تخریبی و کاهشی آکریل‌آمید را کاهش داد. به دلیل اهمیت زیاد مخچه در فرایندهای مرتبط با تعادل، تحقیق در مورد روند تأثیرپذیری مخچه در جریان زندگی جنینی از یک محرک خوراکی و محیطی، می‌تواند به فهم بهتر در مورد سرنوشت کودکانی که در دوران جنینی در معرض آکریل‌آمید قرار گرفته‌اند کمک کند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد و خانم‌ها اقدس میرجلیلی و راضیه کمالی اعلام می‌دارند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تجویز آکریل‌آمید به موش‌های صحرائی باردار منجر به کاهش معنادار میانگین حجم مخچه جنین‌ها نسبت به گروه کنترل می‌شود.

یافته‌های قبلی نشان دهنده حساسیت بالای مغز نوزادان در تغذیه سلول‌های مغز در طی بارداری و شیردهی توسط آکریل‌آمید می‌باشد (۱۷). تحقیقات نشان‌دهنده است که ۱۵-۱۰٪ از آکریل‌آمید موجود در رژیم غذایی مادران باردار از طریق جفت به جنین منتقل می‌شود و در شیر مادر نیز بیش از ۱۸/۸ میلی‌گرم/لیتر آکریل‌آمید وجود دارد (۲۳). از آنجایی که میزان تکثیر سلول‌ها در طی رشد جنین زیاد است قرار گرفتن در معرض آکریل‌آمید در مادران چه در محیط و چه به صورت خوراکی مورد نگرانی است (۲۱). علاوه بر این در حیواناتی که آکریل‌آمید به صورت خوراکی به آن‌ها داده شده بود سطوح بالایی از هموگلوبین متصل شده با آکریل‌آمید وجود داشت (۱۹).

شواهد نشان می‌دهد که اتصال پروتئین‌های سیستم عصبی مرکزی (CNS) به آکریل‌آمید به دلیل اینکه جلوی تولید آنزیم‌ها و ترکیبات ضروری را می‌گیرد نقش مهمی در سمیت عصبی آکریل‌آمید ایفاء می‌کند (۲۴). مطالعات اخیر باربر<sup>۱۱</sup> و لاپاچین<sup>۱۲</sup> بر روی سیستم عصبی موش‌های صحرائی بالغ نشان داده است که سمیت پیش سیناپسی در اثر شکل‌گیری ترکیبات سولفیدریل در سیستم‌های باقی مانده در پروتئین‌ها ایجاد می‌شود (۲۵، ۲۶). مسمومیت با آکریل‌آمید در انسان مشابه حیوانات آزمایشگاهی بوده و به صورت تورم آکسون یا کاهش در تعداد و قطر آکسون‌ها مشاهده می‌شود (۲۷).

نتایج حاصل از بررسی استریولوژی در مطالعه حاضر نشان داد که اثر آکریل‌آمید در دوره بارداری بر مخچه موش صحرائی موجب کاهش حجم مخچه در گروه‌های تیمار شده با آکریل‌آمید در مقایسه با گروه کنترل می‌شود و این مطالعه با نتایج حاصل از بررسی‌هایی که توسط موترام<sup>۱۳</sup> و همکاران ایشان در سال ۲۰۰۲ انجام داده‌اند، مشابهت دارد (۲۸). همچنین در مطالعه سید<sup>۱۴</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثرات آکریل‌آمید بر روی مغز موش‌های

### منابع

- Namjoo A, Rafieian KM, Heidarian E. The Effect of acryl amide on tissue changes, blood and enzymatic parameters in male rats. J Shahrekord Univ Med Sc. 2013; 14(6): 27-37.
- Thonning Olesen P, Olsen A, Frandsen H, Frederiksen K, Overvad K, Tjønneland A. Acrylamide exposure and incidence of breast cancer among postmenopausal women in the Danish Diet, Cancer and Health Study. Int J Cancer. 2008; 122(9): 2094-100.
- Commission JFWCA, Programme JFWFS, Organization WH. Codex Alimentarius: Food hygiene, basic

- texts. 3rd ed. Food & Agriculture Org. 2003; p. 57-63.
- Lineback DR, Coughlin JR, Stadler RH. Acrylamide in foods: a review of the science and future considerations. Annu Rev Food Sci Technol. 2012; 3: 15-35.
- Sabik L. Acrylamide-induced genotoxic, biochemical and pathological perturbations in male rats liver. J Am Sci. 2011; 7(1): 1092-6.
- Alimentarius C. Joint FAO/WHO food standards programme. Codex committee on methods of analysis and sampling: 19th session, Budapest, Hungary, Criteria

<sup>10</sup> Central Nervous System

<sup>11</sup> Barber

<sup>12</sup> Lopachin

<sup>13</sup> Mottram

<sup>14</sup> Sayed

<sup>15</sup> Wei Bhaar

<sup>16</sup> Scott

<sup>17</sup> Wilson

<sup>18</sup> Allam

- for evaluating acceptable methods for codex purposes. 1994; p. 342-68.
7. Ricaurte GA, Guillery R, Seiden L, Schuster C, Moore R. Dopamine nerve terminal degeneration produced by high doses of methylamphetamine in the rat brain. *Brain Res.* 1982; 235(1): 93-103.
  8. Silva C, Prediger RD, Rego AC, Ali SF, Ribeiro CAF. Disruption of striatal glutamatergic/GABAergic homeostasis following acute 2 methamphetamine in mice. *Neurotoxicol Teratol.* 2012; 34(5): 522-5.
  9. Allam A, Abdul-Hamid M, Zohair K, Ajarem J, Allam G, El-Ghareeb A. Prenatal and perinatal acrylamide disrupts the development of cerebrum and medulla oblongata in albino rats. *AFR J Biotechnol.* 2012; 11(29): 7570-8.
  10. Kim EJ, Won R, Sohn JH, Chung M, Nam TS, Lee HJ, et al. Anti-oxidant effect of ascorbic and dehydroascorbic acids in hippocampal slice culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 366(1): 8-14.
  11. Rice ME. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.* 2000; 23(5): 209-16.
  12. Grünwald R. Ascorbic acid in the brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 1993; 18(1): 123-33.
  13. Agus DB, Vera JC, Golde DW. Stromal cell oxidation a mechanism by which tumors obtain vitamin C. *Cancer Res.* 1999; 59(18): 4555-8.
  14. Soujanya S, Lakshman M, Anand Kumar A. Histopathological and ultrastructural changes induced by imidacloprid in brain and protective role of vitamin C in rats. *J Chem Pharma Res.* 2012; 4(9): 4307-18.
  15. Mayhew T. A review of recent advances in stereology for quantifying neural structure. *J Neurocytol.* 1992; 21(5): 313-28.
  16. Schmitz C, Hof P. Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience.* 2005; 130(4): 813-31.
  17. Garey J, Ferguson SA, Paule MG. Developmental and behavioral effects of acrylamide in Fischer 344 rats. *Neurotoxicol Teratol.* 2005; 27(4): 553-63.
  18. Korbo L, Pakkenberg B, Ladefoged O, Gundersen HJ, Arlien-Søborg P, Pakkenberg H. An efficient method for estimating the total number of neurons in rat brain cortex. *J Neurosci Methods.* 1990; 31(2): 93-100.
  19. Yaylayan VA, Stadler RH. Acrylamide formation in food: A mechanistic perspective. *J AOAC Int.* 2005; 88(1): 262-7.
  20. Wang H, Huang P, Lie T, Li J, Hutz RJ, Li K, et al. Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats. *Reprod Toxicol.* 2010; 29(2): 225-30.
  21. Schettgen T, Kütting B, Hornig M, Beckmann M, Weiss T, Drexler H, et al. Trans-placental exposure of neonates to acrylamide-a pilot study. *Int Arch Occup Environ Health.* 2004; 77(3): 213-6.
  22. Waggas AM, Balawi E. Neurophysiological study on possible protective effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves extract in male albino rats treated with acrylamide. *AEJSR.* 2008; 3(2): 163-71.
  23. Sörgel F, Weissenbacher R, Kinzig-Schippers M, Hofmann A, Illauer M, Skott A, et al. Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy.* 2003; 48(6): 267-74.
  24. Sakr SA, Badawy GM, El-Sayyad HI, Afify HS. Adverse effects of acrylamide on the developing retina of albino rats. *J Basic Appl Sci Res.* 2010; 1(7): 706-12.
  25. Allam A, El-Ghareeb A, Abdul-Hamid M, Baikry A, Sabri M. Prenatal and perinatal acrylamide disrupts the development of cerebellum in rat: biochemical and morphological studies. *Toxicol Ind Health.* 2011; 10(3): 1814-25.
  26. LoPachin RM, Gavin T, Geohagen BC, Das S. Neurotoxic mechanisms of electrophilic type-2 alkenes: soft-soft interactions described by quantum mechanical parameters. *Toxicol Sci.* 2007; 98(2): 561-70.
  27. Edwards P, Gispén W. Peripheral pain fiber function is relatively insensitive to the neurotoxic actions of acrylamide in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991; 111(1): 43-8.
  28. Millard JT, White MM. Diepoxybutane cross-links DNA at 5'-GNC sequences. *Biochemistry.* 1993; 32(8): 2120-4.
  29. Sayed MR, Mohamed-Assem SM, Sohair RF, Salma AE-A. Hazardous effects of acrylamide on immature male and female rats. *AJPP.* 2012; 6(18): 1367-86.
  30. Weisshaar R, Gutsche B. Formation of acrylamide in heated potato products-model experiments pointing to asparagine as precursor. *DLR.* 2002; 98(11): 397-400.
  31. Krinke G, Classen W, Vidotto N, Suter E, Würmlin C. Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain.

Exp Toxicol Pathol. 2001; 53(5): 365-72.

32. Beiswanger C, Mandella R, Graessle T, Reuhl K, Lowndes H. Synergistic neurotoxic effects of styrene oxide and acrylamide: glutathione-independent necrosis of cerebellar granule cells. Toxicol Appl Pharmacol. 1993; 118(2): 233-44.

33. Barber DS, LoPachin RM. Proteomic analysis of acrylamide-protein adduct formation in rat brain synaptosomes. Toxicol Appl Pharmacol. 2004; 201(2): 120-36.

34. Friedman M, Levin CE. Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. J Agric Food Chem. 2008; 56(15): 6113-40.

35. Anese M, Suman M, Nicoli MC. Acrylamide removal from heated foods. Food Chem. 2010; 119(2): 791-4.

36. Zama D, Meraihi Z, Tebibel S, Benayssa W, Benayache F, Benayache S, et al. Chlorpyrifos-induced oxidative stress and tissue damage in the liver, kidney, brain and fetus in pregnant rats: The protective role of the butanolic extract of *Paronychia argentea* L. Indian J Pharmacol. 2007; 39(3): 145-50.