DOI: 10.22122/jims.v39i620.13866 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و نهم/شماره‌ی ۶۲۰/هفته‌ی چهارم خرداد ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۷ تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۳/۲۸

اثر مواجهه با پرفلوئورواکتانوئیک اسید در دوران بارداری بر بیان نشانگرهای الیگودندروسیتی

جمال چناری[۱]، فرهاد گلشن ایرانپور[۲]، ناظم قاسمی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: مواجهه با پرفلوئورواکتانوئیک اسید (Perfluorooctanoic acid یا PFOA) در دوران بارداری، می‌تواند با مرگ سلول‌های الیگودندروسیتی همراه باشد. در پژوهش حاضر، اثرات مواجهه با PFOA در دوران بارداری بر بیان نشانگرهای سلول‌های الیگودندروسیتی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: در این مطالعه، موش‌های صحرایی نژاد ویستار بارور شدند و سپس در پنج گروه «شاهد، شم و سه گروه دریافت‌کننده‌ی PFOA با دزهای ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن» قرار گرفتند. ۲۰ روز پس از تولد، موش‌ها قربانی شدند و نمونه‌های مغز آن‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بررسی گردید. در نهایت، داده‌ها در نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: درصد سلول‌های Olig2 و Myelin basic protein (MBP) مثبت در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی PFOA با دزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها کاهش یافت ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: قرار گرفتن در معرض PFOA در زمان بارداری، می‌تواند منجر به مرگ سلول‌های الیگودندروسیتی شود. بنابراین، توصیه می‌شود در این دوران از مواجهه با عوامل توکسیک مانند PFOA اجتناب گردد.

واژگان کلیدی: مرگ سلول؛ پروتئین MBP؛ پروتئین Olig2

ارجاع: چناری جمال، گلشن ایرانپور فرهاد، قاسمی ناظم. **اثر مواجهه با پرفلوئورواکتانوئیک اسید در دوران بارداری بر بیان نشانگرهای الیگودندروسیتی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۲۰): ۲۴۴-۲۴۰.

مقدمه

بیماری‌های ناشی از تخریب میلین، از جمله شایع‌ترین بیماری‌های نورودژنراتیو به شمار می‌روند که اغلب در بالغین جوان، باعث ناتوانی‌های شناختی و فیزیکی می‌شود. از مکانیسم‌های اصلی ایجادکننده‌ی این ناتوانی‌ها، می‌توان به تخریب پیش‌رونده‌ی میلین به دلیل آپوپتوز سلول‌های الیگودندروسیتی و نفوذ مواد سمی به بافت عصبی اشاره کرد. سوابق ژنتیکی فرد به همراه عوامل پاتولوژیک محیطی همچون مواجهه با مواد سمی، در ایجاد این بیماری‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند (۱). پرفلوئورواکتانوئیک اسید (Perfluorooctanoic acid یا PFOA)، عضوی از خانواده‌ی پروفلوئوروالکیل اسید است که به دلیل داشتن گروه‌های هیدروفیل و هیدروفوب، یک ترکیب سورفکتانت می‌باشد و به طور گسترده‌ای در محصولات مصرفی از جمله ظروف بسته‌بندی غذا، آب، محصولات خوراکی، ظروف تفلون و محصولات ضد آب وجود دارد (۳-۲).

با توجه به افزایش مصرف مواد سنتتیک در مصارف روزانه و نامشخص بودن اثر این مواد بر روی دستگاه عصبی، لازم است که تحقیقات گسترده‌ای در این زمینه انجام شود. روش‌های موجود برای حذف این ترکیب تاکنون ناکارامد بوده است. بنابراین، این ترکیب به آسانی می‌تواند وارد بدن شود. PFOA پس از جذب، به راحتی در بدن متابولیزه نمی‌شود و نیمه عمر طولانی بین ۳ تا ۵ سال دارد. آزمایش‌های تجربی بر روی حیوانات نشان می‌دهد که ترکیب مذکور بیشتر در کبد، کلیه و سرم تجمع می‌یابد (۴). علت نیمه عمر بالای این ترکیب در بدن می‌تواند به علت تجمع این ترکیب در کلیه باشد (۵). مطالعات صورت گرفته بر روی بافت عصبی نشان می‌دهد که PFOA تأثیر مخربی بر سیستم عصبی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: ناظم قاسمی؛ دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: n_ghasemi@med.mui.ac.ir

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

می‌گذارد و به طور قابل ملاحظه‌ای می‌تواند باعث افزایش سطح بیان پروتئین‌های Tau و Synaptophysin شود (۶). افزایش پروتئین Tau در نورون، می‌تواند منجر به فعال کردن آپوپتوز در این سلول‌ها شود (۷). در پژوهش دیگری مشخص شد که این ترکیب می‌تواند سبب افزایش غلظت کلسیم در سلول‌های عصبی شود و فرایند آپوپتوز را القا کند (۸). نتایج مطالعه‌ی Kawabata و همکاران نشان داد که بعد از گاواژ PFOA، این ماده در بافت مغزی قابل شناسایی است و بیانگر عبور آن از سد خونی مغزی (Blood–brain barrier یا BBB) می‌باشد (۹). به دلیل عدم تجزیه‌ی PFOA و خاصیت ماندگاری بالای آن در محیط و بدن انسان و از آن‌جایی که تاکنون هیچ تحقیقی در زمینه‌ی بررسی اثرات PFOA بر بیان نشانگرهای الیگودندروسیتی صورت نگرفته است، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات مواجهه با PFOA در دوره‌ی بارداری بر بیان نشانگرهای الیگودندروسیتی در مغز نوزادان موش ۲۰ روزه انجام گردید.

روش‌ها

این مطالعه بر روی ۳۵ موش صحرایی نژاد ویستار، در دانشکده‌ی پزشکی و مطابق با اصول کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان با کد اخلاق IR.MUI.MED.REC.1397.256 انجام شد. بعد از ایجاد باروری به کمک سیستم تریوس و چک کردن پلاک واژینال، موش‌های باردار به صورت تصادفی در پنج گروه هفت‌تایی شامل گروه‌های «شاهد، شم و PFOA (دزهای ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. PFOA از روز اول بارداری تا پایان دوره به صورت روزانه گاواژ شد. لازم به ذکر است که در گروه شم، روزانه ۲ سی‌سی آب مقطر گاواژ گردید. ۲۰ روز پس از تولد، به نوزادان بیهوشی عمیق داده شد و مغز آن‌ها خارج گردید و در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. در ادامه، مقاطع پارافینی با ضخامت ۶ میکرومتر تهیه شد و جهت بررسی‌های سلولی مورد استفاده قرار گرفت.

تکنیک ایمونوهیستوشیمی: به منظور بررسی الیگودندروسیت‌ها، بعد از پارافین‌زدایی، تعدادی از مقاطع طبق پروتکل تحقیق قاسمی و همکاران (۱۰)، درون بشر محتوی بافر سیترات قرار گرفت و سپس به مدت ۱۱ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از شستشوی نمونه‌ها با Phosphate-buffered saline (PBS)، نمونه‌ها با استفاده از آنتی‌بادی‌های اولیه شامل Anti Olig2 و Anti-Myelin basic protein (Anti MBP) به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد اینکوبه شد. سپس آنتی‌بادی ثانویه‌ی متصل به Fluorescein isothiocyanate (FITC) با حجم ۲۰۰ میکرولیتر به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید. بعد از سپری شدن این زمان، جهت رنگ‌آمیزی هسته‌ها از 4′,6-Diamidino-2- phenylindole (DAPI) به مدت ۱ دقیقه استفاده شد. در نهایت، نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفت. ۵ فیلد از هر اسلاید انتخاب و پس از عکس‌برداری و تحلیل در نرم‌افزار ImageJ، ۲۰۰ سلول شمارش و میانگین درصد سلول‌های Olig2 و MBP مثبت گزارش گردید. لازم به ذکر است که تمامی مراحل ایمونوهیستولوژی سه بار تکرار شد.

داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون One-way ANOVA در نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش گردید. $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری داده‌ها در نظر گرفته شد.

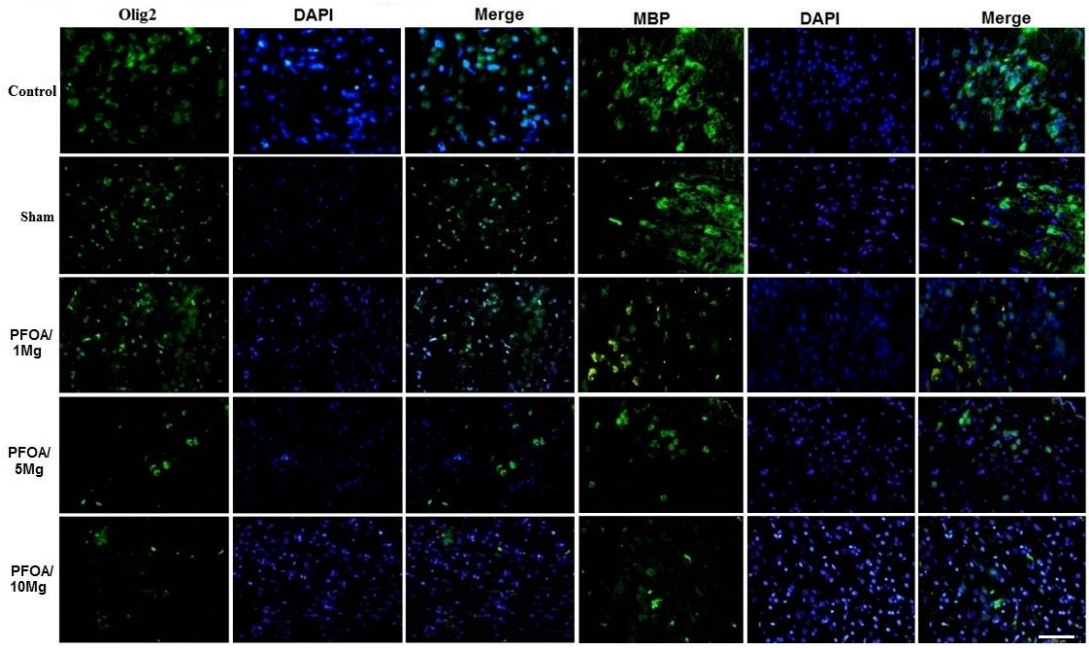
یافته‌ها

بررسی نشانگرهای سلول‌های الیگودندروسیتی: شمارش سلول‌های نشانگر Olig2 و MBP مثبت در ۵ مقطع از کورتکس فرونتال انجام شد. سلول‌هایی که دارای هسته‌های آبی و هاله‌ی سبز بودند، با استفاده از نرم‌افزار ImageJ شمارش شدند و میانگین درصد آن‌ها مشخص گردید. بر این اساس، جمعیت سلول‌های Olig2 و MBP مثبت در گروه‌های PFOA نسبت به گروه‌های شاهد و شم کمتر بود (شکل ۱).

همچنین، مقایسه‌ی میانگین درصد سلول‌های نشانگر مثبت نشان داد که در گروه‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم PFOA، میانگین درصد سلول‌های Olig2 و MBP مثبت به طور معنی‌داری در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش پیدا کرده بود ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل ۲).

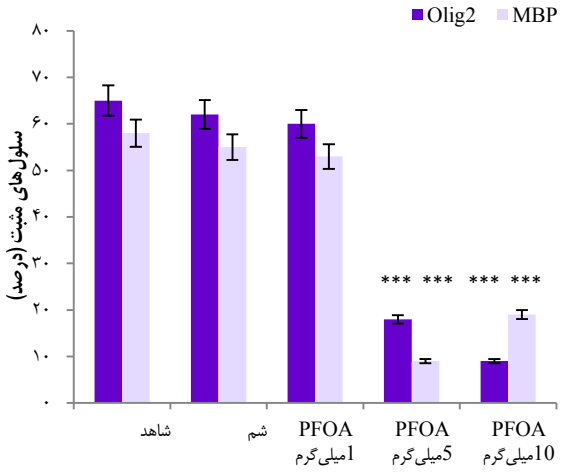
بحث

PFOA به عنوان یک تراتوژن، در مایعات بدن انسان مانند شیر و خون بند ناف قابل تشخیص است. گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض PFOA قبل از تولد، با بروز مشکلات عصبی و تغییر در رشد مغز همراه می‌باشد. نتایج پژوهشی نشان داد که دریافت ۱ میلی‌گرم PFOA به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در دوران بارداری، می‌تواند تأثیر مخربی بر عملکرهای رفتاری داشته باشد (۱۱). Johansson و همکاران با انجام مطالعه‌ای به این نتیجه رسیدند که قرار گرفتن در معرض PFOA در موش‌های تازه متولد شده، اثرات نامطلوبی بر سیستم کولینرژیک دارد (۶). علاوه بر این، تحقیقی گزارش کرد که قرار گرفتن در معرض این ماده در دوره‌ی نوزادی، موجب تغییرات پروتئین‌های Tau و Synaptophysin در هیپوکامپ و قشر مغز می‌شود (۱۱).



شکل ۱. بیان نشانگر Myelin basic protein (MBP) و Olig2 در گروه‌های مختلف

در گروه‌های Perfluorooctanoic acid (PFOA) (۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، **مقدار بیان نشانگر MBP و Olig2 نسبت به سایر گروه‌ها کاهش داشت (Scale bar = ۲۰۰ میکرومتر).**



شکل ۲. مقایسه‌ی اثرات Perfluorooctanoic acid (PFOA) در بیان نشانگرهای Olig2 و Myelin basic protein (MBP)

در گروه‌های PFOA (۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، درصد سلول‌های MBP و Olig2 مثبت نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری داشت ($P^{***} < ۰/۰۰۱$)، اختلاف معنی‌دار با گروه‌های شاهد، شم و ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم PFOA).

PFOA می‌تواند موجب تغییر در میزان لنفوسیت‌های T و افزایش بیان سایتوکاین‌های پیش‌التهابی [Tumor necrosis factor-α (TNF-α)، Interleukin-6 (IL-6) و IL-1β] شود. بنابراین، نقش مهمی در پاتوژنز تخریب میلین دارد. ترشح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند TNF-α، موجب تحریک سلول‌های B ترشح‌کننده‌ی آنتی‌بادی اختصاصی میلین و تخریب الیگودندروسیت و آسیب آکسونی می‌شود (۱۲).

در پژوهش حاضر، نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی در مقاطع بافتی مغز نشان داد که درصد سلول‌های الیگودندروسیتی Olig2 و MBP مثبت در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی دزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم PFOA نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری داشته است (شکل‌های ۱ و ۲). در توجیه نتایج مطالعه‌ی حاضر، می‌توان گفت که شاید PFOA با اثرات اکسیدانی، باعث القای آپوپتوز سلول‌های الیگودندروسیتی شده است. در راستای بررسی حاضر، نتایج تحقیق Steenland و همکاران نشان داد که بین غلظت سرمی PFOA و ابتلا به بیماری‌های تخریب‌کننده‌ی میلین ارتباط وجود دارد، اما این ارتباط معنی‌دار نمی‌باشد (۱۳). از طرف دیگر، Ammitzboll و همکاران دریافتند که قرارگیری در معرض Perfluorinated alkylated substances (PFAS) که نوعی تنظیم‌کننده‌ی سیستم ایمنی است، عامل خطرزایی برای ابتلا به بیماری‌های تخریب‌کننده‌ی میلین محسوب نمی‌شود (۱۴). بنابراین، انجام پژوهش‌های بیشتر در زمینه‌ی بررسی اثرات PFOA بر روی بافت عصبی ضروری به نظر می‌رسد.

به تازگی خاصیت اکسیدانی PFOA در سایر مطالعات به اثبات رسیده است. از جمله این موارد می‌توان به تحقیق Tang و همکاران (۱۵) اشاره کرد. آن‌ها به این نتیجه دست یافتند که PFOA سطح Reactive oxygen species (ROS) را در سلول افزایش می‌دهد.

همچنین، سطح آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase یا SOD)، میلوپراکسیداز (Myeloperoxidase یا MPO) و گلوتامات دهیدروژناز (Glutamate Dehydrogenase یا GDH) در مواجهه با این ماده کاهش می‌یابد (۱۵). از آن‌جایی که در پژوهش‌های گذشته اثبات شده است که PFOA می‌تواند از جفت عبور کند و عملکرد لنفوسیت‌های T و سطح سرمی سایتوکاین‌های پیش‌التهابی را تحت تأثیر قرار دهد و با توجه به این که در مطالعه‌ی حاضر، PFOA باعث کاهش درصد سلول‌های الیگودندروسیتی شد، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که شاید PFOA به عنوان نوعی عامل محیطی و خطرزا در ابتلا به بیماری‌های تخریب‌کننده‌ی بافت میلین مطرح باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که قرار گرفتن در معرض PFOA در زمان بارداری، می‌تواند باعث مرگ سلول‌های الیگودندروسیتی شود. بنابراین، توصیه می‌شود در این دوران، از مواجهه با عوامل توکسیک مانند PFOA اجتناب گردد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۹۷۳۸۴، مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. بدین وسیله از معاونت مذکور تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Ghasemi N. Therapeutic effects of adipose derived mesenchymal stem cells on remyelination process in inflammatory demyelinating diseases. J Histol Histopathol 2015; 2: 8.
2. Johnson JD, Gibson SJ and Ober, RE. Absorption of FC-95-14C in rats after a single oral dose. Riker Laboratories, Inc; 1979.
3. Goosey E, Harrad S. Perfluoroalkyl compounds in dust from Asian, Australian, European, and North American homes and UK cars, classrooms, and offices. Environ Int 2011; 37(1): 86-92.
4. Vanden Heuvel JP, Kuslikis BI, Van Rafelghem MJ, Peterson RE. Tissue distribution, metabolism, and elimination of perfluorooctanoic acid in male and female rats. J Biochem Toxicol 1991; 6(2): 83-92.
5. Loccisano AE, Longnecker MP, Campbell JL, Andersen ME, Clewell HJ 3rd. Development of PBPK models for PFOA and PFOS for human pregnancy and lactation life stages. J Toxicol Environ Health A 2013; 76(1): 25-57.
6. Johansson N, Fredriksson A, Eriksson P. Neonatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) causes neurobehavioural defects in adult mice. Neurotoxicology 2008; 29(1): 160-9.
7. Fath T, Eidenmuller J, Brandt R. Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. J Neurosci 2002; 22(22): 9733-41.
8. Jiang Z, Hu Z, Zeng L, Lu W, Zhang H, Li T, et al. The role of the Golgi apparatus in oxidative stress: is this organelle less significant than mitochondria? Free Radic Biol Med 2011; 50(8): 907-17.
9. Kawabata K, Matsuzaki H, Nukui S, Okazaki M, Sakai A, Kawashima Y, et al. Perfluorododecanoic acid induces cognitive deficit in adult Rats. Toxicol Sci 2017; 157(2): 421-8.
10. Ghasemi N, Razavi S, Mardani M, Esfandiari E, Salehi H, Zarkesh Esfahani SH. Transplantation of human adipose-derived stem cells enhances remyelination in lysolecithin-induced focal demyelination of rat spinal cord. Mol Biotechnol 2014; 56(5): 470-8.
11. Goulding DR, White SS, McBride SJ, Fenton SE, Harry GJ. Gestational exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA): Alterations in motor related behaviors. Neurotoxicology 2017; 58: 110-9.
12. Jafarzadeh A, Mahdavi R, Jamali M, Hajghani H, Nemati M, Ebrahimi HA. Increased concentrations of interleukin-33 in the serum and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. Oman Med J 2016; 31(1): 40-5.
13. Steenland K, Zhao L, Winquist A, Parks C. Ulcerative colitis and perfluorooctanoic acid (PFOA) in a highly exposed population of community residents and workers in the mid-Ohio valley. Environ Health Perspect 2013; 121(8): 900-5.
14. Ammitzboll C, Bornsen L, Petersen ER, Oturai AB, Sondergaard HB, Grandjean P, et al. Perfluorinated substances, risk factors for multiple sclerosis and cellular immune activation. J Neuroimmunol 2019; 330: 90-5.
15. Tang J, Lu X, Chen F, Ye X, Zhou D, Yuan J, et al. Effects of perfluorooctanoic acid on the associated genes expression of autophagy signaling pathway of carassius auratus lymphocytes in vitro. Front Physiol 2018; 9: 1748.

DOI: *10.22122/jims.v39i620.13866* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 39, No. 620, 4th Week, June 2021**

Received: 27.01.2021 Accepted: 27.04.2021 Published: 26.06.2021

The Effect of Perfluorooctanoic Acid Exposure during Pregnancy on the Expression of Oligodendrocytes Markers

Jamal Chenari[1], Farhad Golshan Iranpour[2], Nazem Ghasemi[2]

Original Article

Abstract

Background: During pregnancy, the exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) can accompany with oligodendrocyte death. In current study, the effect of exposure to PFOA during pregnancy on the expression of oligodendrocyte markers was investigated.

Methods: After Wistar rats' fertilization, the rats were randomly divided into five groups of control, sham, and three other groups, which received PFOA as 1, 5, and 10 mg/kg body weight. 20-day-old rats were sacrificed, and brain samples were examined using immunohistochemical staining. Finally, the data were analyzed using SPSS software.

Findings: In the groups receiving PFOA at doses of 5 and 10 mg/kg, the percentage of Olig2- and myelin-basic-protein (MBP)-positive cells significantly reduced compared to the other groups ($P < 0.001$).

Conclusion: The findings of this study showed that exposure to PFOA during pregnancy can induce oligodendrocyte death; so it is recommended to avoid exposure to toxic agents such as PFOA during pregnancy.

Keywords: Cell death; Myelin basic protein; Oligodendrocytes

Citation: Chenari J, Golshan-Iranpour F, Ghasemi N. **The Effect of Perfluorooctanoic Acid Exposure during Pregnancy on the Expression of Oligodendrocytes Markers.** J Isfahan Med Sch 2021; 39(620): 240-4.

1- MSc Students, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Nazem Ghasemi, Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: n_ghasemi@med.mui.ac.ir