

تأثیر قرار گرفتن در معرض PM_{2/5} بر بافت مخ نوزاد موش صحرایی

مریم ممیزصفت^۱، سعید متصدی زرنندی^{۲*}، پژمان مرتضوی^۳، اکرم عیدی^۴

چکیده

در مطالعه حاضر، اثر قرار گرفتن بافت مخ نوزاد موش‌های صحرایی در معرض PM_{2/5} بررسی شد. ۲۴ موش صحرایی ماده نژاد ویستار پس از جفت‌گیری و بارداری، به سه گروه "شاهد (Control)"، "مواجهه ۱ (Exposure 1)" و "مواجهه ۲ (Exposure 2)" تقسیم شدند. گروه شاهد از هوای پاک با شرایط استاندارد استفاده کردند و دو گروه دیگر به ترتیب به مدت ۴۰ روز در معرض آلاینده‌های گازی و آلاینده‌های گازی به اضافه PM_{2/5} قرار گرفتند. سپس بافت مخ برداشته شد. تجزیه و تحلیل بیان ژن برای ژن S100 با استفاده از Real-Time PCR و همچنین سنجش MS-HRM برای این ژن در گروه‌های شاهد، مواجهه ۱ و مواجهه ۲ انجام شد. مقدار مالون دی‌آلدئید درگیر در فرآیند استرس اکسیداتیو (OS) برای همه گروه‌ها ارزیابی شد. نتایج بیانگر بیان معنی‌دار ژن S100 در گروه‌های مواجهه ۱ و مواجهه ۲ نسبت به گروه شاهد بود. در بررسی متیلاسیون ژن S100 تنها گروه مواجهه ۱ تغییرات آماری معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. بر اساس تجزیه و تحلیل آنزیم-های درگیر در استرس اکسیداتیو (OS)، سطح مالون دی‌آلدئید در گروه مواجهه ۲ نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. این یافته‌ها ممکن است به ارائه بینشی در شناسایی اهداف درمانی برای کاهش اختلالات مغزی انسان ناشی از قرار گرفتن در معرض PM_{2/5} یا سایر آلاینده‌های هوا کمک کند.

واژگان کلیدی: S100، PM_{2/5}، مخ

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۷/۷

مقدمه

آلودگی هوا ترکیبی از گازها، فلزات، ترکیبات آلی و ذرات معلق (particulate matter) (PM) است (۱) که به دلیل اثرات منفی که بر سلامت دارد همواره یکی از موضوعات مهم جهانی می‌باشد (۲). طبق گزارشات سازمان بهداشت جهانی یا WHO (The World Health Organization) سالانه حدوداً ۴/۲ میلیون مرگ نابهنگام ناشی از آلودگی هوا در سرتاسر جهان رخ می‌دهد که اکثر این مرگ و میرها

در کشورهایی با درآمد سالانه کم یا متوسط اتفاق می‌افتد (۳). آلودگی هوا شامل ترکیبات مختلفی با منابع انسانی و طبیعی است. صنعت، حمل و نقل، تولید برق، سوختن زیست توده، گرمایش و پخت‌وپز خانگی در اکثر نقاط جهان از منابع اصلی انسانی هستند (۴). آژانس حفاظت از محیط زیست ایالات متحده The United State Environmental Protection Agency (USEPA) ذرات معلق (PM) را به صورت مخلوطی از مواد شیمیایی آلی، ذرات بسیار کوچک، گازهای حاوی اسیدها، فلزات، خاک و گردوغبار توصیف می‌کند (۵). این ذرات دارای سه گروه با اندازه‌های متفاوت هستند: گروه اول ذرات معلق بسیار ریز (The ultrafine particulate matter) که قطر کمتر از ۰/۱ میکرومتر دارند. گروه دوم یا ذرات معلق ریز (The fine particulate matter) که قطر این ذرات کمتر از ۲/۵ میکرومتر است. گروه سوم یا ذرات معلق درشت (The coarse particulate matter) که قطر آنها کمتر از ۱۰ میکرومتر است (۵). گروه دوم یا PM_{2/5} به دلیل اندازه کوچکی که دارد و زمان طولانی‌تری که می‌تواند در هوا باقی بماند و همچنین به دلیل توانایی نفوذ بالاتر به دستگاه تنفس انسان بیش از سه گروه دیگر موجب نگرانی است (۱). مطالعات مختلف نشان دهنده همراهی PM_{2/5} با انواع آلاینده‌های شیمیایی مثل فلزات سنگین، ترکیبات آلی، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)، ویروسها و کربن آلی است (۶) که این همراهی باعث افزایش اثرات مضر آن بر سلامتی انسان می‌شود (۱). مطالعات و بررسی‌های متعدد نشان می‌دهند که آلودگی هوا خصوصاً PM_{2/5} دارای اثرات مخرب بسیاری بر دستگاه عصبی

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت و ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
smotesaddi@sbsmu.ac.ir

۳- گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

اتاقهای مواجهه

سه اتاقک در پایلوت دانشکده بهداشت دانشگاه شهید بهشتی به ابعاد $1 \text{ m} \times 1 \text{ m} \times 1.5 \text{ m}$ ساخته شد و هر اتاقک برای یک گروه متفاوت در نظر گرفته شد: (نگاره شماره ۱)

گروه مواجهه ۱: در این گروه هوای محیط از طریق یک پمپ خلا یا vacuum pump (مدل LFS-113 ؛ Gilian Instrument Corp) با دبی ۱۲ لیتر در دقیقه وارد این اتاقک شد. برای محدود کردن آلاینده PM، در ورودی پمپ خلا فیلتر HEPA مدل (Camfil-FARR) Switzerland H13 نصب شد. (فیلتر HEPA مدل H13 باعث حذف ۹۷/۹۹٪ آلاینده PM می شود) در نتیجه گروه مواجهه اول فقط شامل آلاینده های گازی بود.

گروه مواجهه ۲: در این اتاقک هوای محیط با دبی ۱۲ لیتر در دقیقه (بر اساس روزانه ۱۰۳ لیتر هوا برای تنفس موش بزرگسال) (۱۱) از طریق نمونه گیر کم حجم یا low volume sampler (LVS) (TCR Tecora) PM (LVS) (ایتالیا) وارد اتاقک شد. LVS ابزاری است که برای جمع آوری نمونه PM_{2/5} و PM₁₀ استفاده می شود. برداشتن فیلتر نمونه برداری دستگاه باعث شد که هوای محیطی که وارد اتاقک می شد، حاوی آلاینده PM باشد. (۱۲) با استفاده از کلاهک PM_{2/5}، هوای محیط شامل PM_{2/5} و آلاینده های گازی بود.

گروه شاهد: در این گروه هوای محیط با دبی ۱۲ لیتر در دقیقه از طریق پمپ خلا با فیلتر HEPA مدل SungJin H13 (Co., Ltd., Korea) وارد اتاقک شد. فیلتر HEPA مدل H13 آلاینده PM را حذف کرده و از ورود آن به اتاقک جلوگیری میکند. همچنین برای حذف آلاینده های گازی از فیلتر هوای کربن فعال (active carbon air filter) استفاده شد تا آلاینده های هیدروکربنی علی الخصوص ترکیبات آلی فرار

مرکزی (CNS) میباشد و باعث بیماریهای متعددی چون آلزایمر (۷)، التهاب عصبی (۸)، اختلالات اوتیسم یا autism spectrum disorders (ASD) (۹) و اختلالات عصبی رفتاری (۱۰) می گردد.

مواد و روش کار

محل و مراحل رشد و نمونه برداری موشها
مراقبت و مراحل عملی نگهداری موش صحرایی ویستار مطابق با معیارهای مراقبت و استفاده از حیوانات نهادی انجام شد و کلیه مراحل توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران (کد اخلاقی: IR.IAU.SRB.REC.1398.057) مورد تایید قرار گرفته است. جهت این عملیات از اتاق پایلوت حیوانات واقع در بام دانشکده بهداشت (SPH) دانشگاه شهید بهشتی (۳۵,۷۹۹۱_N_51.3947_E) و در ارتفاع ۲۰ متری از سطح زمین استفاده شده است. در این مطالعه، ۲۴ موش صحرایی ماده نژاد ویستار (با وزن 85 ± 10 گرم، چهار هفته) از انستیتو پاستور، تهران، ایران خریداری شد. موش ها به طور جداگانه در قفس نگهداری شدند و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. آنها همچنین در چرخه نور/تاریکی (۱۲/۱۲ ساعت)، دمای ثابت (۲۳ درجه سانتیگراد) و رطوبت (۵۵٪) نگهداری شدند. پس از هفت روز سازگاری، حیوانات به طور تصادفی به سه گروه (۷ موش در هر گروه) تقسیم شدند. برای بارداری موشها، ۰/۵ میکروگرم کلوپروستنونل صفاقی به اضافه ۳ میکروگرم پروژسترون به صورت زیر جلدی تزریق شد و ۰/۵ میکروگرم کلوپروستنونل مجدداً سه روز بعد تزریق شد. سه روز پس از آخرین تزریق، یک نر بالغ برای جفت گیری در هر گروه قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت خارج شد. در صورت مشاهده پلاگ واژن، موش حامله به اتاقک مواجهه منتقل شد.

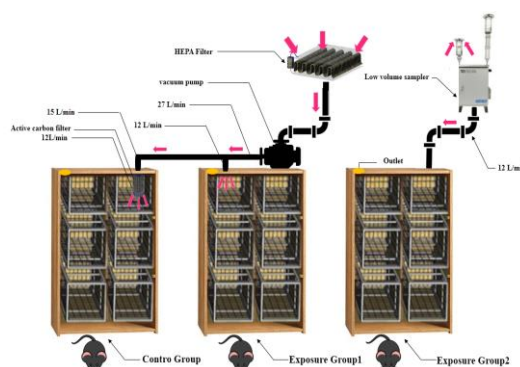
سنجش MS-HRM

تقویت PCR و تجزیه و تحلیل HRM به طور متوالی بوسیله دستگاه Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, Mortlake, استرالیا) انجام شد. PCR در حجم کل ۲۰ میکرولیتر انجام شد که حاوی: ۱× بافر، ۴ mM Mg²⁺، ۲۰۰ μM از هر یک از چهار dNTP، ۲۵۰ nM از پرایمر، ۵ μM رنگ Syto9 (Invitrogen, Carlsbad, CA) بود. ۱U پلیمرز HotStarTaq (Qiagen) و ۱ μl الگوی اصلاح شده بی سولفیت (غلظت نظری ۲۰ نانوگرم بر میکرولیتر). تقویت شامل ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، به دنبال آن ۵۰ چرخه ۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد، ۵ ثانیه در دمای بازپخت پرایمر (The primer annealing temperature (Ta) و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بود. آنالیزهای ذوب با وضوح بالا (HRM) در تنظیمات افزایش دما و جذب فلورسانس توصیه شده توسط سازنده انجام شد، یعنی افزایش دما از ۷۰ تا ۹۵ درجه سانتیگراد، افزایش ۰/۱ درجه سانتیگراد در ۲ ثانیه (۰/۱°C/2s). تمام واکنش ها در سه تکرار انجام شد. نمودارهای ذوب با محاسبه «خط بهترین تناسب» یا (line of best fit) در بین دو ناحیه نرمال سازی قبل و بعد از کاهش عمده فلورسانس که نشان دهنده ذوب محصول PCR با استفاده از نرم افزار ارائه شده با Rotor-Gene™ 6000 است، نرمال شد. این الگوریتم اجازه مقایسه مستقیم نمونه هایی که در سطوح فلورسانس شروع متفاوتی دارند را میدهد.

سنجش استرس اکسیداتیو

فعالیت مالون دی آلدئید (MDA) در نمونه های لیزات و سرم بافت طبق دستورالعمل کیت الیزا مالون دی آلدئید موش صحرائی (MBS738685؛ MyBioSource، USA) انجام شد.

حذف شوند. در ارتباط با سایر آلاینده های گازی با بررسی های انجام شده و آنالیز بر خط هوای ورودی به اتاقک، کلیه آلاینده های گازی پارامتریک ورودی به اتاقک زیر استاندارد سازمان جهانی بهداشت بوده، در نتیجه هوا فاقد هر دو آلاینده PM2/5 و گازی بود و دارای شرایط استاندارد بوده است.



نگاره شماره ۱: گروه شاهد که هوا با شرایط استاندارد دریافت کردند. گروه مواجهه ۱ که فقط در معرض آلاینده های گازی قرار گرفتند. گروه مواجهه ۲ که در معرض PM2/5 به علاوه آلاینده های گازی قرار گرفتند.

طراحی پرایمر برای تجزیه و تحلیل ذوب با وضوح بالا (HRM)

پرایمر مطابق MS-HRM the PCR bias compensate for برای تقویت هر دو قالب متیله و غیر متیله طراحی شد. ارزیابی متیلاسیون توسط نرم افزار Methyl Primer Express® نسخه v1/0 انجام شد. (جدول ۱).

جدول ۱. توالی پرایمر برای ارزیابی HRM

G		
e	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')
n		
e		
S	GGAAGTTGGTAG	ATTCTATCCCTAT
l	ATAAGTAAGATG	CACCCCTCAC
0	TT	
0		

تجزیه و تحلیل بیان ژن توسط Real-Time PCR

استخراج RNA

بدین منظور ۳۰ میلی گرم از نمونه های بافت مغزی با استفاده از هموژنایزر همگن شدند. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از بافر lysis و ۶۰۰ میکرولیتر محلول پروتئیناز K اضافه شد و سپس ورتکس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵-۱۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس نمونه ها با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی به یک میکروتیوب جدید منتقل شد. سپس ۴۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد و ۶۰۰ میکرولیتر بافر شستشو به نمونه اضافه شد و به ترتیب با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از افزودن ۲۵۰ میکرولیتر بافر شستشو، نمونه ها دوباره در ۱۲۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول به دست آمده به یک میکروتیوب بدون RNase دیگر منتقل شد و ۵۰ میکرولیتر آب بدون RNase به آن اضافه شد و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شد. RNA استخراج شده با آب بدون RNAase، بافر و آنزیم DNAase مخلوط شد و سپس با تکان دادن ملایم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای حذف احتمالی انکوبه شد. RNA حاصل در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد. کیت خالص سازی GeneJET™#K0731 RNA (Fermentas, لتونی) استفاده شد.

ستز cDNA

کیت مورد استفاده خاصیت RNaseH خود را با جهش در انتهای کربوکسیل آنزیم رونوشت معکوس Molony murine leukemia virus (M-MuLV) از دست داد. واکنش The real-time (RT) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در میکروتیوب های بدون RNase و DNase انجام شد. علاوه بر این، ۱ میکروگرم از RNA کل با pmol

۳۰ از پرایمر معکوس تصادفی Hexamer و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر بدون RNase مخلوط شد. مخلوط به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد و بلافاصله روی یخ قرار گرفت. سایر مواد واکنش RT شامل ۴ میکرولیتر بافرهای (RT × 5)، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۴۰ U RNase بازدارنده، ۴۰ U M-MuLV آنزیم، و آب مقطر بدون RNase به حجم ۲۰ میکرولیتر اضافه شدند. پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد، پنج دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد برای غیرفعال کردن آنزیم اعمال شد. محصول RT تا زمان انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. (کیت Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR Kit#K1642, Fermentas, Latvia) استفاده شد.

طراحی پرایمر و RT-PCR

پرایمر خاص برای S100 و GAPDH از طریق وب سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) طراحی شد. ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع یا housekeeping gene استفاده شد. (جدول ۲)

جدول ۲. توالی پرایمر مورد استفاده در واکنش RT-PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')
S100	GCTGGAGAT GGCTATGGA GA	CCCCTTGTTGA GCTTGAACC
GAPDH	TCATCGTCAC TGCACCTTCC	TTGCTGACAA CGGTCATGGA

در مطالعه حاضر، عملکرد و ویژگی پرایمرها بررسی شد و واکنش به صورت جفت با یک واکنش الگوی بدون DNA (بدون کنترل الگو) برای هر ژن در نوار انجام شد. سپس رقت های متوالی برای پرایمرها برای تعیین غلظت بهینه (۱۲/۵) میکرولیتر SYBR Green Master Mix، ۱ میکرولیتر

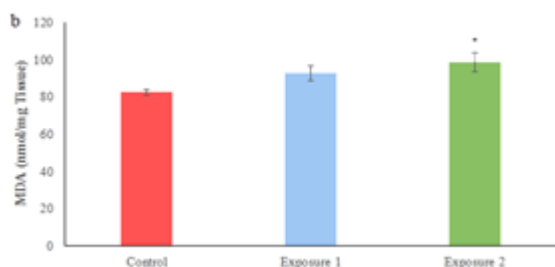
در بررسی متیلاسیون ژن‌ها پس از چهل روز مواجهه تنها گروه مواجهه ۱ تغییرات آماری معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد برای ژن S100 نشان داد. با مقایسه نتایج متیلاسیون دو گروه با یکدیگر، تنها گروه مواجهه ۱ تغییرات آماری معنی‌دار نشان داد (جدول ۴)

جدول ۴: مقایسه سطح متیلاسیون پروموتور ژن S100 بین گروه‌ها پس از ۴۰ روز دوره مواجهه

گروه مواجهه	p-value S100
گروه مواجهه ۱ و گروه کنترل	0.012
گروه مواجهه ۲ و گروه کنترل	0.331
گروه مواجهه ۱ و گروه مواجهه ۲	0.046

استرس اکسیداتیو

مقدار آنزیم MDA درگیر در استرس اکسیداتیو پس از پایان دوره مواجهه مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، سطح MDA در گروه مواجهه ۱ نسبت به گروه شاهد از نظر آماری تغییر معنی‌داری نشان نداد، در حالی که در گروه مواجهه ۲ افزایش آماری $P < 0.05$ مشاهده شد. کیت الایزا مالون دی آلدئید موش صحرایی (MBS738685؛ MyBioSource، USA) برای نمونه‌های سرم استفاده شد. (نگاره ۲).



نگاره ۲: مقایسه پارامترهای استرس اکسیداتیو در گروه‌های مواجهه ۱ و ۲ و گروه شاهد. میانگین و انحراف معیار (میانگین \pm SD) فعالیت آنزیم MDA در بافت مخ نوزادان در سه گروه پس از پایان دوره ۴۰ روزه مواجهه مورد بررسی قرار گرفت. $P < 0.001$ *** و $P < 0.01$ ** و $P < 0.05$ * نشان دهنده تفاوت معنی‌داری در مقایسه

پرایمر فرورارد و ۱ میکرولیتر پرایمر معکوس برای هر ژن و همچنین ۵ میکرولیتر DNA با غلظت انجام شد. ۱۰۰ نانوگرم در لیتر و آب). بنابراین از برنامه دمایی RT-PCR بر اساس پروتکل کیت سازنده استفاده شد که مطابق جدول ۳ ارائه شد. (SYBR سبز (Thermo Scientific Maxima) SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) #K0222, (Fermentas, Latvia) (۱۳)

جدول ۳. برنامه دمایی و زمانی واکنش RT-PCR برای ژن مورد بررسی

مرحله	دما	زمان	تعداد سیکل
اختیاری: UDG پیش فناوری	۵۰	۲ دقیقه	۱
دنا تورا سیون اولیه	۹۵	۱۰ دقیقه	۱
دنا تورا سیون	۹۵	۱۵ ثانیه	۴۰
اتصال	۶۰	۳۰ ثانیه	۴۰
گسترش	۷۲	۳۰ ثانیه	۴۰

تحلیل آماری

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد و نمودارها با استفاده از نسخه ۲۱ نرم افزار SPSS رسم شد. داده‌ها با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس‌های آماری (ANOVA) به همراه آزمون تعقیبی توکی (post-Tukey) (post hoc test) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقدار p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان یک تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

سنجش MS-HRM

(NO)، ازون(O3) و ذرات معلق در هوا (PM) است. در بسیاری از شهرهای بزرگ در سراسر جهان، میانگین نرخ آلودگی هوا بالاتر از دستورالعمل‌های محدودیت‌های سالانه و کوتاه مدت قرار گرفتن در معرض سازمان بهداشت جهانی (WHO) است. در دهه‌های گذشته مطالعات زیادی در مورد اثرات آلودگی هوا بر سلامتی انجام شده است. (۱۴) بارندگی و باد دو منبعی هستند که می‌توانند از آلودگی هوا جلوگیری کنند اما در مناطقی که توسط رشته کوه‌ها احاطه شده‌اند اثر باد کمتر است. (۱۴) مطالعات متعدد اثرات مضر آلودگی هوا بر سلامت را نه تنها پس از تولد بلکه در دوران بارداری مادر نشان می‌دهد (۱۵). ذرات PM2/5 به عنوان یکی از اجزای اصلی آلودگی هوا، معرفی شده که با چندین سمیت عصبی و بیماری‌های عصبی جدی همراه است (۱۶). در مطالعه حاضر، اثر ذرات PM2/5 بر بافت مخچه نوزاد موش صحرائی مورد بررسی قرار گرفت.

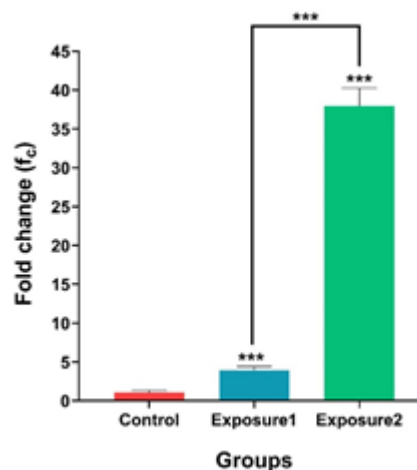
S100 یک پروتئین سیتوپلاسمی از خانواده پروتئین‌های اتصال دهنده کلسیم است و دارای اثرات نوروتروفیک خارجی است و به دلیل دخالت در هموستاز کلسیم داخل سلولی، می‌تواند بر عملکرد نورون مغز تأثیر بگذارد. سطح S100 β در بیماری‌های عصبی و التهابی افزایش می‌یابد (۱۷). بررسی سطح سرمی پروتئین S100 β به عنوان شاخص آسیب مغزی در مطالعات آزمایشگاهی یا بالینی می‌تواند بازتاب خوبی از وضعیت سلامت سیستم عصبی باشد (۱۸). افزایش بیان پروتئین S100 β توسط آستروسیت‌های فعال در بیماران مبتلا به آلزایمر و اختلالات مغزی مشاهده شده است (۱۹). PM2/5 می‌تواند با تعادل طبیعی ژن S100 تداخل ایجاد کند (۲۰). نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد. بیان ژن S100 در گروه مواجهه ۲ افزایش داشت در حالی که این میزان در گروه مواجهه ۱ بسیار کمتر بود.

با گروه شاهد سالم است. بر اساس نتایج سطح MDA در گروه مواجهه ۲ نسبت به دو گروه دیگر از نظر آماری تغییر معنی داری نشان داد.

Real-time PCR

اثرات آلودگی هوا بر بافت مغز ممکن است باعث تداخل در تنظیم بیان ژن‌های مختلف در سلول‌ها شود. بنابراین، بیان ژن S100 در بافت مغزی نوزادان موش گروه‌های مواجهه ۱ و مواجهه ۲ و گروه شاهد اندازه‌گیری شد.

با توجه به نتایج نگاره ۳، بیان ژن S100 در گروه مواجهه ۱ و مواجهه ۲ نسبت به گروه شاهد افزایش آماری معنی داری نشان داد ($P < 0.001$). سطح بیان ژن S100 در گروه مواجهه ۲ بیشتر از گروه مواجهه ۱ بود ($P < 0.001$).



نگاره ۳. سطح بیان ژن S100 در مواجهه ۱ و مواجهه ۲. داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM نشان داده شد. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ و * $P < 0.05$ تفاوت معنی داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان می‌دهد. بیان ژن S100 در دو گروه مواجهه ۱ و مواجهه ۲ نسبت به گروه شاهد افزایش آماری معنی داری نشان داد. سطح بیان ژن S100 در گروه مواجهه ۲ بیشتر از گروه مواجهه ۱ بود ($P < 0.001$).

بحث

آلودگی هوا ترکیبی از آلاینده‌های موجود در هوا از جمله مونوکسید کربن (CO)، اکسید گوگرد (SO₂)، اکسید نیتروژن

به ترکیب آلودگی هوا در آن منطقه متکی باشد، اگرچه این اثرات مخرب در بسیاری از کلان‌شهرها در سراسر جهان گزارش شده است.

فهرست منابع

1. Zarandi SM, Shahsavani A, Khodaghali F, Fakhri Y. Co-exposure to ambient PM_{2.5} plus gaseous pollutants increases amyloid β ₁₋₄₂ accumulation in the hippocampus of male and female rats. *Toxin reviews*. 2019.
2. Motesaddi Zarandi S, Shahsavani A, Khodaghali F, Fakhri Y. Alzheimer and depressive cognitive-like behaviors in male and female rats: A new method for exposure to ambient air pollution. *MethodsX*. 2019;6:690-703.
3. WHO. Ambient (Outdoor) Air Quality and Health. Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheet/fs313/en/> (accessed on 25 February 2016). 2016.
4. Loomis D, Huang W, Chen G. The International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution: focus on China. *Chinese journal of cancer*. 2014;33(4):189.
5. Morakinyo OM, Mokgobu MI, Mukhola MS, Hunter RP. Health outcomes of exposure to biological and chemical components of inhalable and respirable particulate matter. *International journal of environmental research and public health*. 2016;13(6):592.
6. Zeng Z, Huo X, Wang Q, Wang C, Hylkema MN, Xu X. PM_{2.5}-bound PAHs exposure linked with low plasma insulin-like growth factor 1 levels and reduced child height. *Environment international*. 2020;138:105660.
7. Calderón-Garcidueñas L, González-Maciél A, Kulesza RJ, González-González LO, Reynoso-Robles R, Mukherjee PS, et al. Air

یافته‌های مطالعات قبلی نشان داد که قرار گرفتن موش در معرض PM_{2.5} (چهار ساعت و پنج روز در هفته به مدت دو هفته) نشانگرهای التهابی را در مغز موش‌های BALB/c افزایش می‌دهد. قرار گرفتن در معرض PM ممکن است یک پاسخ آنزیمی پیش التهابی و استرس اکسیداتیو در بافت عصبی ایجاد کند که میتواند با بوجود آمدن بیماریهای نورودژنراتیو همراه باشد (۲۱). یافته‌های یک مطالعه دیگر نشان داد که قرار گرفتن کوتاه مدت در معرض PM_{2.5} التهاب هیپوتالاموس را افزایش می‌دهد. قرار گرفتن طولانی مدت در معرض PM_{2.5} حتی بدتر است و منجر به مقاومت به لپتین، هیپرفازی و کاهش مصرف انرژی نیز می‌گردد (۲۲). برخی تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض PM_{2.5} می‌تواند باعث کاهش آنزیم‌های SOD، GPX و CAT و افزایش آنزیم MDA شود و تغییر این آنزیم‌ها نشان دهنده آسیب جدی به مغز است (۲۳). در این مطالعه، فعالیت آنزیم MDA که به عنوان یکی از آنزیمهای مرتبط با استرس اکسیداتیو شناخته می‌شوند، در بافت مغز موش‌های آزمایشگاهی گروه‌های مواجهه ۱ و مواجهه ۲ و گروه شاهد پس از پایان دوره مواجهه ۴۰ روزه در تهران مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دهنده افزایش آنزیم MDA در گروه‌های مواجهه ۱ و مواجهه ۲ نسبت به گروه شاهد بود ولی افزایش میزان این آنزیم در گروه مواجهه ۲ بیشتر بود که همسو با دیگر مطالعات بود.

در مطالعه حاضر نشان داده شد که چگونه PM_{2.5} در کلان‌شهر تهران به عنوان پایتخت کشور ایران می‌تواند باعث التهاب سیستم عصبی همراه با آسیب بافتی در مخ نوزادان شود. داده‌های ما نشان می‌دهد که سمیت ناشی از PM به دلیل همراه بودن آن با فلزات و سمومی است که متصل به PM هستند. یافته‌های ما ممکن است منحصر به حوضه مشخصی در تهران باشد و ممکن است به شدت و

- pollution, combustion and friction derived nanoparticles, and Alzheimer's disease in urban children and young adults. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2019;70(2):343-60.
8. Levesque S, Surace MJ, McDonald J, Block ML. Air pollution & the brain: Subchronic diesel exhaust exposure causes neuroinflammation and elevates early markers of neurodegenerative disease. *Journal of neuroinflammation*. 2011;8(1):1-10.
 9. Costa LG, Chang Y-C, Cole TB. Developmental neurotoxicity of traffic-related air pollution: focus on autism. *Current environmental health reports*. 2017;4(2):156-65.
 10. Cui J, Fu Y, Lu R, Bi Y, Zhang L, Zhang C, et al. Metabolomics analysis explores the rescue to neurobehavioral disorder induced by maternal PM2.5 exposure in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019;169:687-95.
 11. EPA. 2018. "Calculation of Rat Breathing Rate Based on Bodyweight – OEHHA. Available from: <https://oehha.ca.gov/media/downloads/crn/calcuratbreathingrate092818.pdf>". 2018.
 12. TCR, Echo TCR Tecora Sampler Low Volume Sampler for PM10 and PM2.5, (2014) . (Accessed 3 Jan 2014) <http://www.tecora.com/en/echo-pm/1114-echo-pm.html>. 2014.
 13. Haghightafard A, Andalib S, Amini Faskhodi M, Sadeghi S, Ghaderi AH, Moradkhani S, et al. Gene expression study of mitochondrial complex I in schizophrenia and paranoid personality disorder. *The World Journal of Biological Psychiatry*. 2018;19(sup3):S133-S46.
 14. Martins NR, Da Graca GC. Impact of PM2.5 in indoor urban environments: A review. *Sustainable Cities and Society*. 2018;42:259-75.
 15. Yokota S, Oshio S, Moriya N, Takeda K. Social isolation-induced territorial aggression in male offspring is enhanced by exposure to diesel exhaust during pregnancy. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149737.
 16. Costa LG, Cole TB, Dao K, Chang Y-C, Garrick JM. Developmental impact of air pollution on brain function. *Neurochemistry international*. 2019;131:104580.
 17. JHM RMPMP, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microscopy Research and Technique*. 2003;60:614632.
 18. Solfrizzi V, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso C, Todarello O, Pellicani V, et al. Circulating biomarkers of cognitive decline and dementia. *Clinica Chimica Acta*. 2006;364(1-2):91-112.
 19. Li Y, Wang J, Sheng JG, Liu L, Barger SW, Jones RA, et al. S100 β increases levels of β -amyloid precursor protein and its encoding mRNA in rat neuronal cultures. *Journal of neurochemistry*. 1998;71(4):1421-8.
 20. Zhang C, Meng Q, Zhang X, Wu S, Wang S, Chen R, et al. Role of astrocyte activation in fine particulate matter-enhancement of existing ischemic stroke in Sprague-Dawley male rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2016;79(9-10):393-401.
 21. Campbell A, Oldham M, Becaria A, Bondy S, Meacher D, Sioutas C, et al. Particulate matter in polluted air may increase biomarkers of inflammation in mouse brain. *Neurotoxicology*. 2005;26(1):133-40.
 22. Campolim CM, Weissmann L, Ferreira CKdO, Zordão OP, Dornellas APS, de Castro G, et al. Short-term exposure to air pollution (PM2.5) induces hypothalamic inflammation, and long-term leads to leptin resistance and obesity via Tlr4/Ikbke in mice. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1-14.
 23. Zhang Q, Li Q, Ma J, Zhao Y. PM2.5 impairs neurobehavior by oxidative stress and myelin sheaths injury of brain in the rat. *Environmental Pollution*. 2018;242:994-100