



ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

دگرگونی رشد قشر مخ پس از مواجهه پیش زادی با سیپرمتترین و دلتامترین

چکیده

پایرتروئیدها، گروهی از حشره کشهای با راندمان بالا، سمیت پایین و طیف وسیع هستند که برای کنترل آفات در کشاورزی بکار میروند. اینجا، دو پایرتروئید نماینده (سیپرمتترین و دلتامترین) و یک حجم برابر ناقل (روغن غلات) را برای موشهای ICR باردار بکار میبریم. این مطالعه، اثرات سیپرمتترین و دلتامترین بر رشد قشر مخ در موشها، هم چنین مکانیسمهای ممکن در تکثیر و تفکیک را مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد دگرگونی مربوط به امراض بافتی در قشر مخ با استفاده از رنگ هماتوکسیلین و انوزین روی نداد، با این حال، مشاهده جنینهای مواجه شده با سیپرمتترین و دلتامترین، کاهش تکثیر، بلوغ و تفکیک نورونی را آشکار ساخت. به علاوه، مرگ سلولی تحریک شده سیپرمتترین / دلتامترین سلول عصبی به طور قابل توجهی در گروه های تحت درمان نسبت به گروه کنترل با استفاده از فلوسایتومتري، وسترن بلات و تونل بالاتر بود. لازم به ذکر است، نوزادان مواجه شده با سیپرمتترین و دلتامترین، توزیع نورونی نابهنجاری را نشان ندادند. این یافته ها حاکی از این است که مواجهه سیپرمتترین و دلتامترین سبب آسیب به کورتیکوژنز شد.

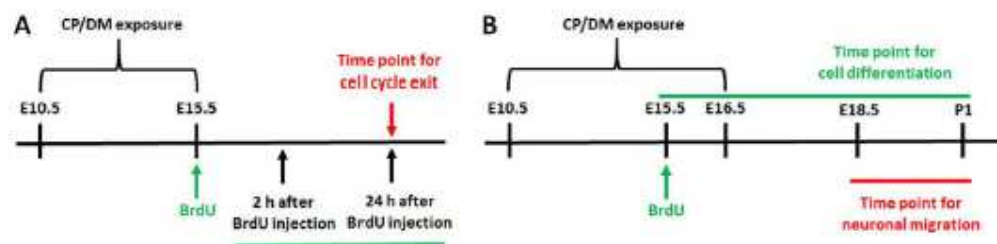
کلمات کلیدی: پایرتروئیدها، قشر مخ، پیش زادی، چرخه سلولی، پیش ساز

1. مقدمه

پایرتروئیدهای ترکیب شده شیمیایی، شبیه به پایرتروئیدهای طبیعی به خاطر ساختار شیمیایی خود میتوانند بر کارکرد اندامها از طریق سمی شدن بافت عصبی، وقفه در غدد درون ریز، گسترش نابهنجار و سمیت تناسلی در حیوانات اثر بگذارند. اکنون به طور وسیعی در کنترل آفات کشاورزی و پاکسازی آفات خانگی بکار میروند. پایرتروئیدها میتوانند به نوع 1 و 2 دسته بندی شوند و سیپرمتترین (CP) و دلتامترین (DM) آفت کشهای پایرتروئیدی نوع دو رایج هستند که در سرتاسر دنیا در کشاورزی، کنترل آفات خانگی و کنترل ناقل بیماری بکار میروند. به علاوه، به صورت حشره کش در رابطه نزدیک با سلامت انسانها و ایمنی غذا قلمداد میشود.

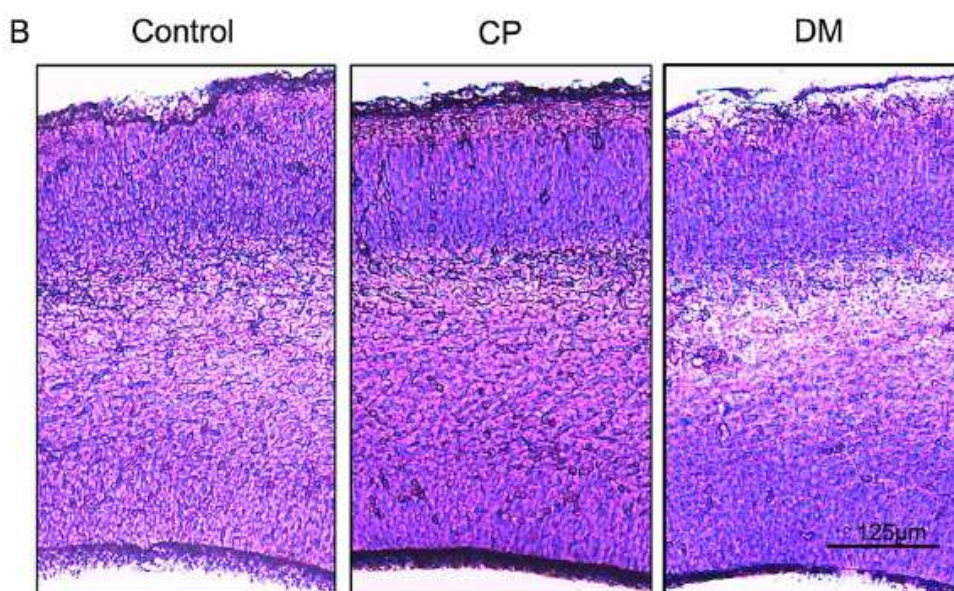
سیپرمتترین و دلتامترین تجمع یافته در خاک و اثراتشان ممکن است در سبزیجات، چای، میوه ها و سایر غذاها ظاهر شود. از این گذشته سیپرمتترین و دلتامترین دارای سمیت معده ای و مغزی هستند. گرچه مواجهه دراز مدت با دوز پایین سیپرمتترین، برای ایجاد علائم آشکار مسمومیت کافی نیست، آسیب احتمالی برای تولید مثل نمیتواند به خاطر انباشتگی نادیده گرفته شود. سیپرمتترین و دلتامترین با کاهش تعداد سلولهای فولیکولی، اوسیتها کورپورالوتیا از طریق اثرات وابسته به دوز، سبب تغییرات مورفومتری و ساختاری در اندامهای تناسلی میشود. مطالعات قبلی نشان داد توان سمیت نسبی شش پرتروئید انفرادی برای نورونهای مغزی با بتا سیفلوترین، لامبدا-سیهالوترین، دلتامترین، سیپرمتترین، بایفنترین و پرمترین با وقفه در کانال سدیمی دروازه ای-ولتاژی و تغییر تحریک پذیری سلول دنبال شد. به علاوه، پیرتروئیدها به متابولیسم کربوکسیل استراز در کبد همبسته بودند و زنجیره نسل بعدی برای شناسایی ژنهای بیان شده برای مکانیسمهای مولکولی دقیق بکار رفت. گرچه دلتامترین و سیپرمتترین به طور وسیعی در فعالیتهای انسانی بکار میروند، اما مکانیسم آنها بر روی تشکیل بافت عصب مغزی، نامعلوم باقی می ماند، بنابراین میخواهیم اثر سیپرمتترین و دلتامترین بر تکثیر پیش ساز نورونی، بلوغ سلولی، تفکیک عصبی، مرگ سلولی و کوچ نورونی را در پستانداران بررسی نماییم.

نتایج ما نشان داد مواجهه سیپرمتترین /دلتامترین مانع تکثیر سلولهای پیش ماده ای عصبی و سلولهای ساقه عصبی شد و مرگ سلولی را در محیط طبیعی و آزمایشگاهی ارتقا بخشید. تصمیم در مورد سرنوشت سلولی نورونهای تازه متولد به ترتیب تحت تاثیر سیپرمتترین و دلتامترین قرار دارد. این یافته ها ممکن است برای شناخت مکانیسمهای سمیت بافت عصبی پرتروئیدها کمک کننده باشد.



شکل 1. نمودار شماتیک پروتکل آزمایشی. الف) برنامه زمانی آزمایشی برای بررسی اثر سیپرمتترین /دلتامترین بر تکثیر سلولی سلولهای تازه تولید شده در قشر مخ. ب) برنامه زمانی برای مطالعه اثر سیپرمتترین /دلتامترین بر مهاجرت نورونی.

نوزاد P1				جنین E16.5				گروه
نسبی (%b/a)	وزن مغز (g.B)	وزن بدن (g.A)	تعداد جنینهای زنده به ازای هر بند	نسبی (%b/a)	وزن مغز (g.b)	وزن بدن (g.a)	تعداد جنینهای زنده به ازای هر بند	کنترل
				7.216 ± 0.5210	0.0520 ± 0.0283	0.7254 ± 0.1779	16.0 ± 0.73	سیپرمترین
				7.505 ± 0.4908	0.0435 ± 0.0033	$0.5831 \pm 0.3464^{**}$	$11.0 \pm 0.73^{***}$	دلتامترین
				7.219 ± 0.6228	0.0442 ± 0.0047	$0.6094 \pm 0.0189^{##}$	$11.2 \pm 1.30^{\#}$	



شکل 2. اثرات مربوط به امراض بافتی سیپرمترین /دلتامترین بر جنینها و گسترش قشری آن. الف. تعداد وزن بندهای زنده و فرزندان در E16.5 و P1 شمرده شدند. سیپرمترین /دلتامترین میزان ماندگاری جنینهای زنده را کاهش دادند و تفاوت معناداری در وزن بدن زنده بندها بین موشهای تحت کنترل و موشهای تحت درمان با سیپرمترین /دلتامترین در E16.5 وجود داشت. ب) تفاوت معناداری بین گروه های تحت درمان و گروه کنترل از طریق تغییر شکل HE وجود نداشت. ستون مقیاس، 125µm.

2. منابع و روشها

2.1 موشهای ICR

موشها بکار رفتند و کلیه راه کارها طبق رهنمودهای رسمی برای آزمایشات حیوانی انجام گرفت. روز تشخیص پلاگین واژینال به عنوان بارداری (E0.5) 0.5 قلمداد شد و روز تولد به عنوان روز (P0) 0 پس از تولد تعیین شد. ساختار شماتیک و راه کار موجود در این مطالعه در شکل 1 نشان داده شد، بویژه هدف بخش الف، تعیین تکثیر سلولی و بخش ب، تعیین مهاجرت نورونی و مرگ سلولی بود. کلیه آزمایشات حیوانی طبق رهنمودهای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشی بیمارستان هوآیپه دانشگاه هنان انجام شد.

2.2 درمان دارویی

برای ارزیابی اثر سیپرمترین /دلتامترین بر تکثیر سلولی در VZ (ناحیه بطنی) و SVZ (ناحیه زیر بطنی) قشر مخ، موشها به صورت گروههای سیپرمترین /دلتامترین و کنترل به شکل تصادفی در آمدند (6 موش به ازای هر گروه). آنگاه موشها در هر گروه، بکارگیری درون شکمی سیپرمترین /دلتامترین (1.2 mg/kg) یا ناقل حجمی معادل (روغن غلات) را از E10.5 تا E15.5 دریافت کردند و دوز پس از مشاهده علائم سمیت بدون مرگ انتخاب شدند که به مطالعات قبلی اشاره دارد. کلیه حیوانات، درون صفاقی (i.p) بودند که در E15.5 به آنها 5-Bromo-2-Deoxyuridine (BrdU, 50 mg/kg) تزریق شد (شکل 1) و دو ساعت پس از تزریق کشته شدند. کل نمونه های هر گروه کشته شدند و برای تحلیل مرگ چرخه سلولی جمع اوری شدند. برای مشخص کردن اینکه آیا سیپرمترین /دلتامترین میتواند بر مهاجرت نورونی در این دوز اثر بگذارد یا خیر، موشها به طور تصادفی به گروه های کنترل و سیپرمترین /دلتامترین تقسیم شدند. موشها استعمال درون شکمی ناقل یا سیپرمترین /دلتامترین را از E10.5 تا E16.5 دریافت کردند. موشهای باردار زمانبندی شده در E15.5، یکبار تزریق درون صفاقی BrdU (50 mg/kg) را دریافت کردند و در E18.5 یا P1 پس از تزریق BrdU کشته شدند.

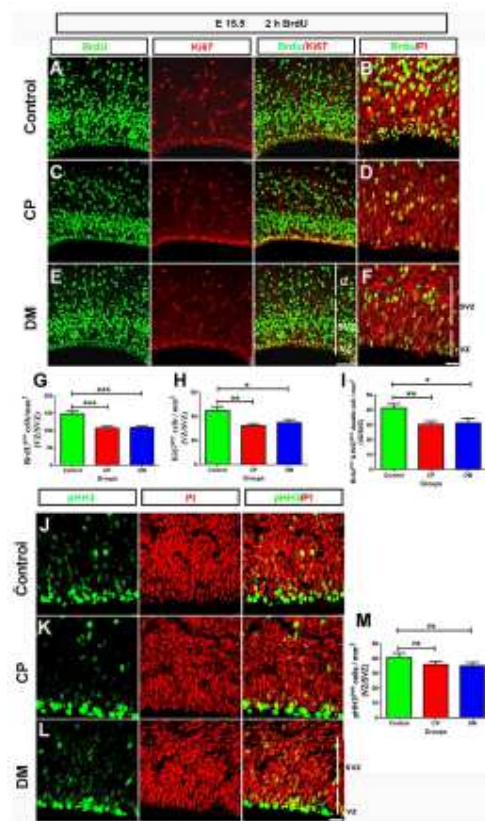
2.3 آماده سازی بافت

موشها پس از تولد به طور عمیق با داروی مسکن سدیم بیهوش شدند و پارافورم آلدهید 4٪ (PFA) در محلول بافر فسفات 0.1 M در PH 7.2-7.4 به داخل قلب شان تزریق شد. مغزها خارج شد و بخشهای آنها به صورت قطعات کرونال 50 میلیمتری برش خورد. کل مغزها در طول شب در PFA چهار درصد در دمای 4 درجه

سانتیگراد برای مدت حداقل 24 ساعت تثبیت شدند، در O.C.T بر روی یخ خشک و دوغاب اتانول خوابانده شدند.

2.4 مواد شیمیایی و پادتنها

دلتامترین (DM, CAS: 52918-63-5) و سیپرمتترین (CP, CAS:52315-07-8) از شرکت مواد شیمیایی جی اند کی چین خریداری شده اند. BrdU (CAS:59-14-3, Sigma) و پروپیدیم یدید (CAS: P4170, Sigma) از سیگما آلدریج (ایالات متحده امریکا) خریداری شده اند.



شکل 3. اثر سیپرمتترین /دلتامترین بر تکثیر سلولی با رنگ کردن BrdU و pHH3 مشاهده شد. رنگ آمیزی ایمونولوژیک BrdU مواد سلولی نوروئهای تازه تولید شده را در E15.5 پس از دو ساعت با تزریق BrdU برچسب گذاری میکند. برچسب گذاری دوگانه برای Ki67 (قرمز) و BrdU (سبز) در بخش قشری (ستون مقیاس، 50 μ m) و سایر نمونه ها با PI (قرمز، ستون مقیاس، 20 μ m) به صورت مرجع استاندارد (D,B) و (F) مجددا رنگ شد. ستاره ها، تفاوت‌های معناداری را در مقایسه با گروه کنترل در (G), BrdU (H), Ki67 (I) و Ki67 (L) با BrdU (J), Ki67 (K), Ki67 (M) و Ki67 (L) با PI (M) مقایسه با گروه کنترل در (*), $p < .05$, سلول / میلی‌متر مربع در VZ/SVZ, $p < .05$ (*), $p < .05$ (*).

(**) $0.01 < p < 0.001$ (***) یا $p < 0.001$ ، ستون مقیاس، $50\mu\text{m}$ نشان دادند. در بخش pHH3 (ستون مقیاس، $20\mu\text{m}$)، سلولها در طول مهاجرت نورونی در سیپرمترین شاخه ها را عمل آوردند و مخروط رشد در عوض با شاخه ها محو شد. از سلولهای مثبت pHH3 (J-L)، ما هیچ تفاوت معناداری را در مقایسه با گروه کنترل (M) شناسایی نکردیم (برای تفسیر مراجع رنگ کردن در این راهنمای تصویری، خواننده به نسخه وب این مقاله ارجاع داده میشود).

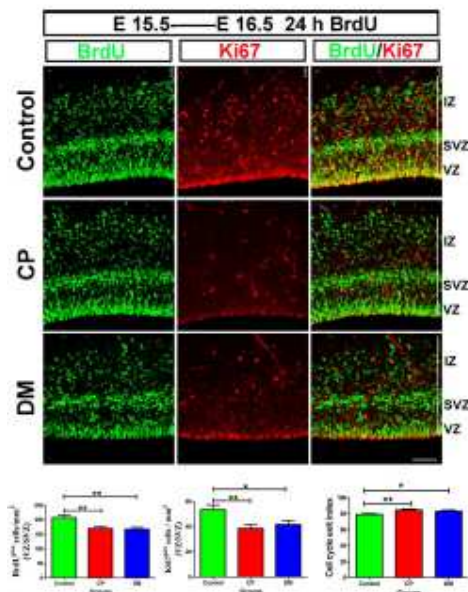
کشت F12K، کشت Opti-MEM و سرم گاوی جنینی (FBS) از گیپکو (ایالات متحده امریکا) خریداری شد؛ آنتی Ki67 مونوکلونال موش (556003, 1:1000) از بی دی فرمینگن (ایالات متحده امریکا) خریداری شد؛ آنتی NeuN مونوکلونال موش (1:500) از مرک میلیپور (MAB377؛ ایالات متحده امریکا) خریداری شد؛ آنتی Pax6 مونوکلونال خرگوش (1:1200) از (ایالات متحده امریکا؛ PD022) MBL خریداری شد. آنتی Tbr1 مونوکلونال خرگوش (ab23345) از آبکام (ایالات متحده امریکا) خریداری شد. آنتی Tbr1 مونوکلونال خرگوش (ab23345) از آبکام (ایالات متحده امریکا) خریداری شد. آنتی الکسا فلور موش بز 488 (1:300)؛ آنتی الکسا فلور خرگوش بز (1:300) و آنتی الکسا فلور موش بز 568 (1:300) از انویترنژن (ایالات متحده امریکا) خریداری شد.

2.5 ایمونوهیستوشیمی

آماده سازی قطعات کرونال قشر مخ و ایمونوهیستوشیمی به صورتی که قبلا شرح داده شد انجام گرفت. به طور خلاصه، مغز موشها در آورده شد و در پارافورمالدهید چهار درصد (PFA) قرار داده شد، سپس مغزها در بخشهای کروویستات کرونال برش خوردند. بخشها برای رنگ شدن ایمنی با یک پروتکل شناوری آزاد فراوری شدند. این بخشها در پادتن اصلی رقیق شده، یک شب در محلول 1 (1% BSA) در 0.1 M PB حاوی 0.1% تریتون X-100 در دمای 4 درجه سانتیگراد خوابانده شدند؛ پس از شستشو در 0.1M PB برای 30 دقیقه، این بخشها با پادتن ثانویه رقیق شده در محلول 2 (0.1M PB حاوی 0.1% NaN3) به مدت سه ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند؛ در نهایت پروپیدیوم یدید (PI) برای رنگ کردن هسته ای بکار رفت.

هماتوکسیلین و ائوزین (HE) برای بررسی تغییرات ساختار پاتولوژیکی در این مطالعه بکار رفت. به طور خلاصه، مغزها در پارافورمالدهید چهار درصد به مدت شش ساعت غوطه ور شدند و به اتانول هفتاد درصد منتقل شدند.

نمونه های انفرادی در جعبه های پردازش قرار داده شد، از طریق یک شیب الکل پشت سر هم پسابیده شد و در قالبهای موم پارافین قرار گرفت. پیش از رنگ زدن، بخشهای بافتی در زیلین موم زدایی شدند و از طریق غلظتهای در حال کاهش اتانول دوباره آبپوشیده شدند. پس از رنگ زدن، نمونه ها از طریق غلظتهای در حال افزایش اتانول و زیلین پسابیده شدند.



شکل 4. شاخص خروج از چرخه سلولی ارتقا یافته سیپرمتین /دلتامترین از طریق برچسب گذاری دوگانه BrdU و Ki67. رنگ زدن ایمنی رنگ آمیزی ایمونولوژیک برای BrdU مواد سلولی نورونهای تازه تولید شده را از E15.5 تا E16.5 پس از 24 ساعت با تزریق BrdU برچسب گذاری میکند. برچسب گذاری دوگانه برای Ki67 (قرمز) و BrdU (سبز) در یک بخش غشایی، رنگ شد. ستاره ها تفاوت‌های معناداری را در مقایسه با گروه کنترل در BrdU, Ki67 و شاخص خروج از چرخه سلولی، سلول/ میلیمتر مربع در (*), $p < .05$ VZ/SVZ و (**), $p < .01$ را نشان دادند. فرمول محاسبه شاخص خروج از چرخه سلولی به انتهای شکل پیوست شده است. ستون مقیاس، $50 \mu\text{m}$. (برای تفسیر مراجع برای رنگ کردن در این راهنمای تصویری، خواننده به نسخه وب این مقاله ارجاع داده میشود).

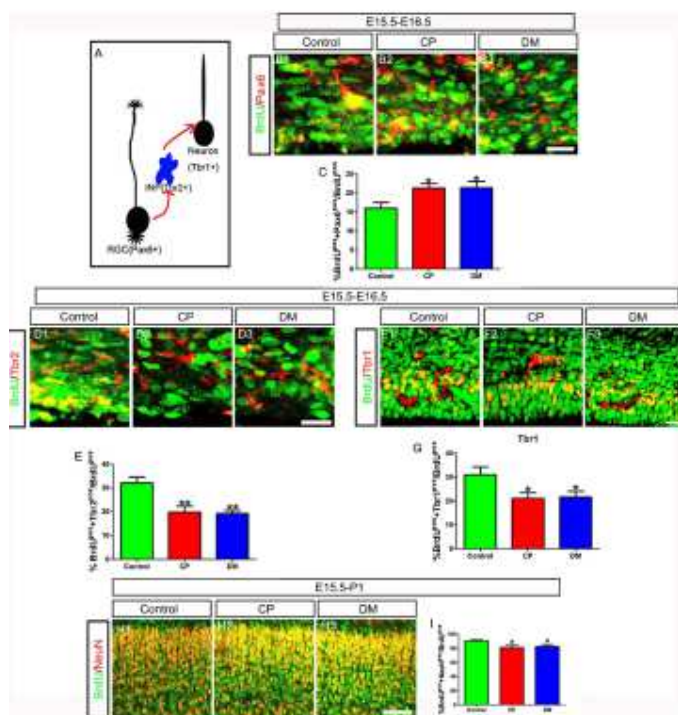
$$\text{شاخص خروج از چرخه سلولی} = \frac{\text{BrdU}^+ / \text{Ki67}^+}{\text{Total BrdU}^+}$$

2.6 تحلیل چرخه سلولی

تحلیل چرخه سلولی قشر مخ و ایمونوهیستوشیمی به صورتی که قبلا شرح داده شد انجام گرفت. BrdU تیمیدین مانند، سلولها را در فاز S چرخه سلولی در زمان تزریق برچسب گذاری میکند. هم چنین pHH3 اجازه میدهد سلولهای میتوز از مرگ سلولی متمایز باشند. Ki67 در سلولهای ساکن (G0) وجود ندارد بلکه در فازهای فعال چرخه سلولی (G1، G2 و S) وجود دارد.

2.7 خطوط سلولی

سلولهای PC12 را در آزمایشگاه به ترتیب با $1 \mu\text{M}$ DM و $100 \mu\text{M}$ CP عمل آوردیم. سلولهای PC12 در DMEM (گیبوکو، ایالات متحده امریکا) حاوی 10٪ (v/v) سرم گوساله غیر فعال شده 5٪ و سرم اسب غیر فعال شده (هیکلون، ایالات متحده امریکا)، 100 U/mL پنیسیلین، 100 U/mL استرپتومایسین در دمای 37 در دمای CO2 5٪ مرطوب کشت شدند. محیط کشت هر دو تا سه روز تغییر پیدا کرد و مرگ سلولی سلولهای PC12 با آنکسین V-FITC / کیت کشف مرگ سلولی PI طبق دستورالعملهای سازنده ارزیابی میشد. با استفاده از فلوسایتومتری، داده ها برای فاز اولیه (LR) و فاز آخر (UR) تحلیل شد.



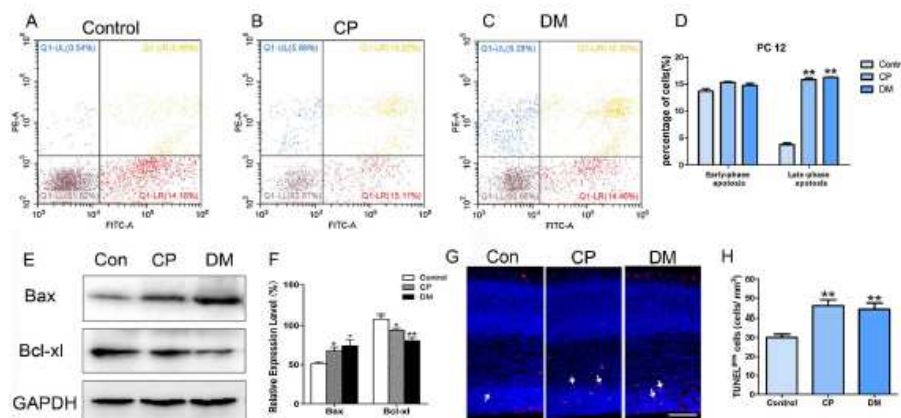
شکل 5. بلوغ سلولی پیش ساز به تاخیر افتاده سیپرمتترین / دلتامترین و تفکیک نورورنی. الف) الگوی رشد از سلولهای ساقه عصبی به سلولهای بالغ بر روی نشانه ها (باخته گلیایی، RGC، Pax6؛ سلولهای پیش ساز میانی،

Tbr2, INP و نورون پس از تقسیم سلولی، Tbr1). (ب-1-ب3) رنگ آمیزی ایمونولوژیک برای Pax6 مواد سلولی نورونهای تازه تولید شده را در E15.5 پس از 24 ساعت با تزریق BrdU برچسب گذاری میکند. ستون مقیاس، 25 μm . ث) ستاره ها تفاوت‌های معناداری در مقایسه با گروه کنترل بر حسب درصد نسبی Pax6 در VZ/SVZ از E15.5 تا E16.5 (*) $p < .05$ را نشان داد. ستون مقیاس، 25 μm . (د-1-د3) برچسب گذاری دوگانه برای Tbr2 (قرمز) و BrdU (سبز) در یک بخش غشایی و درصد نسبی Tbr2 در VZ/SVZ از E15.5 به E16.5 (E) (***) $p < .01$ ستون مقیاس، 25 μm . (د-1-د3) برچسب گذاری دوگانه برای Tbr2 (قرمز) و BrdU (سبز) در یک بخش غشایی و درصد نسبی Tbr2 در VZ/SVZ از E15.5 به E16.5 (E) $p < .01$ (***) ستون مقیاس، 25 μm . (ف-1-ف3) برچسب گذاری دوگانه برای Tbr2 (قرمز) و BrdU (سبز) در یک بخش غشایی و درصد نسبی Tbr1 در VZ/SVZ (*) $p < .05$ ستون مقیاس 25 μm . (اچ-1-اچ3) برچسب گذاری دوگانه برای NeuN (قرمز) و BrdU (سبز) در یک بخش قشری و درصد نسبی NeuN در سیپرمتترین از E15.5 تا P1 (I) ستون مقیاس، 50 μm . (برای تفسیر مراجع برای رنگ کردن در این راهنمای تصویری، خواننده به نسخه وب این مقاله ارجاع داده میشود).

2.8 رنگ کردن تونلی و وسترن بلات

قطعه قطعه شدن دی ان ای در سلولهای آپوپتوزی میتواند با دی اکسی نوکلئوتیدیل ترانس فراز (TdT) با واسطه برچسب گذاری انتهایی شکاف dUTP کشف شود (تونل). عیارگری تونل بر وجود شکاف ها در دی ان ای متکی است که میتواند با TdT شناسایی شود، آنزیمی که افزایش dUTPها را کاتالیز میکند که به طور ثانویه با یک نشانه برچسب گذاری میشود. به طور مختصر، پس از تثبیت، نفوذ پذیری، قطعات با پارافورمالدهید چهار درصد برای 20-30 دقیقه در RT تثبیت میشود و سپس با موارد 2-3 PBS عمل آوری میشود. تونل با کیت عیارگری مرگ سلولی تونل یک مرحله ای طبق دستور العملهای سازنده انجام شد.

حاصل تجزیه سلولی پروتئین مغزی موشها برای بررسی پروتئین نسبی، Bax و Bcl-xl بکار رفت. پروتئین سلولی در بافر لیز (150mM Tris-HCl, 50mM, 0.5% Triton X-100, 2mM EDTA, NaCl;pH 7) با 1mM phenylmethanesulfonyl fluoride استخراج شد. Bax و Bcl-xl و GAPDH وسترن بلات همانطور که قبلا شرح داده شد انجام میشود.



شکل 6. مرگ سلولی القا شده سیپرمتترین /دلتامترین در محیط آزمایشگاهی و طبیعی. الف. نرخهای مرگ سلولی در گروه کنترل؛ نرخ مرگ سلولی فاز آخر 3.46٪ و نرخ مرگ سلولی اولیه 14.18٪. ب) در گروه سیپرمتترین ، نرخ مرگ سلولی فاز آخر 16.22٪ و نرخ مرگ سلولی فاز اولیه، 15.11٪. در گروه دلتامترین ، نرخ مرگ سلولی فاز آخر، 16.32٪ و مرگ سلولی فاز اولیه 14.45٪ بود. د) درصد نسبی سلولها در گروه های کنترل، سیپرمتترین و دلتامترین . ستاره ها، تفاوتهای معنادار در مقایسه با گروه کنترل (**), $p < .01$ را نشان داد. ای) وسترن بلات نمایانگر از سلولهای عمل آوری شده با سیپرمتترین و دلتامترین برای Bax, Bcl-x1 و GAPDH. ف) تحلیل دنسیتومتری Bax و Bcl-x1. نتایج حاصل سه آزمایش مستقل هستند. ستاره ها تفاوتهای معناداری را در مقایسه با گروه کنترل، (**), $p < .01$, (*) $p < .05$ نشان داد. جی) ریزنگارهای نمایانگر نتایج رنگ TUNEL. ستون مقیاس، $150 \mu\text{m}$. اچ) تحلیل سلولهای مرگ سلولی در قشر با استفاده از تونل (سلولها/ میلیمتر مربع). ستاره ها تفاوتهای معناداری را در مقایسه با گروه کنترل (**), $p < .01$ نشان داد.

2.9 تحلیل آماری

کل داده ها به صورت $\pm \text{SEM}$ میانگین ارائه میشود. آزمونهای تی دو طرفه دانش آموز برای مقایسه های آماری بین دو گروه بکار رفت و آنالیز واریانس یک طرفه با آزمون نیومن کیولز پس از آن برای مقایسه های بین بیش از دو گروه بکار رفت. آزمونها با استفاده از نرم افزار منشور گراف پد 5.0 انجام شد. تفاوتهای معنادار از نظر آماری مورد بررسی قرار گرفت اگر (**/##), $p < .01$, (*/#), $p < .05$ یا (***/###), $p < .001$.

2.10 تجهیزات

کل تصاویر رنگ کردن ایمونوفلورسانس ارائه شده با استفاده از سیستم میکروسکوپ هم کانون FV1000 الیمپوس (ژاپن) بدست آمد. تصاویر هم کانون با استفاده از نرم افزار V10-ASW بازسازی شد، چیده شد، تنظیم شد و در فوتوشاپ CS5 بهینه سازی شد. جریان سیاتومتري BD FACSVerse (ایالات متحده امریکا) و اسلایسر لیکا CM1950 (آلمان) برای این مطالعه بکار رفت.

3. نتایج

3.1 تغییر هیستومورفولوژی در بندها و توله های درمان شده با سیپرمتین /دلتامترین

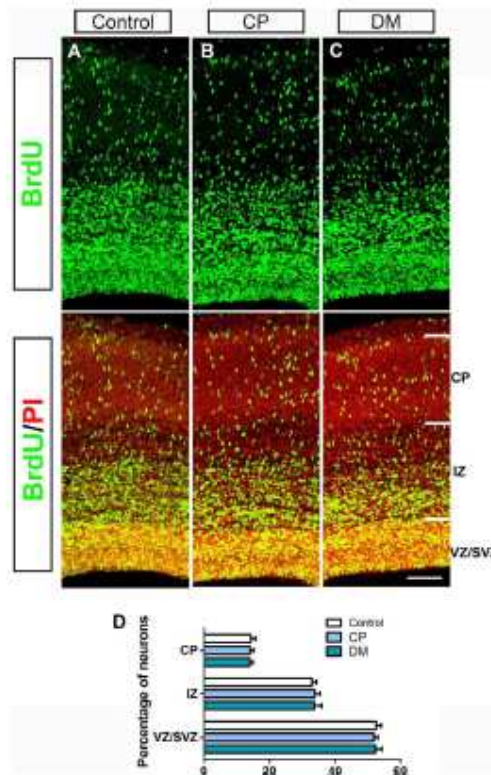
در این مطالعه، نمودار شماتیک پروتکل آزمایشی به صورت شکل 1 نشان داده شد. برنامه زمانی آزمایشی، بررسی اثر سیپرمتین /دلتامترین بر تکثیر سلولی سلولهای تازه متولد شده در قشر مخ و مهاجرت نورونی میباشد. اولاً، تعداد و وزن بندهای زنده و فرزند در E16.5 و P1 شمرده شد، سپس توانستیم نسبت (B/A و b/a) بدن (g.b در E16.5 و g.B در P1) و مغز (g.a در E16.5 و g.A در P1) را بدست آوریم. هدف اصلی این بخش مشخص کردن این مساله است که آیا سیپرمتین /دلتامترین بر رشد فرزند در طول گسترش قشر مخ تاثیر دارد یا خیر. تفاوت معناداری در وزن بدن زنده بندها بین موشهای تحت کنترل و موشهای درمان شده با سیپرمتین ($p < .01$) یا دلتامترین ($p < .01$) وجود داشت اما در P1 معنادار نبود.

به علاوه، تعداد جنینهای زنده به ازای هر بند، تفاوت معناداری را بین گروه کنترل و گروه تحت درمان با سیپرمتین ($p < .001$) و دلتامترین ($p < .05$) نشان داد. نتایج مشابه به ترتیب در CP ($p < 0.05$) و DM ($p < .05$) در P1 روی داد (شکل 2الف). با این حال، هیچ تفاوت معناداری در نسبت بدن/مغز بین موشهای تحت کنترل و موشهای تحت درمان با سیپرمتین /دلتامترین در E16.5 و P1 یافت شد. به علاوه، تحلیل رنگهای HE هیچ تفاوت معناداری بین گروه های تحت درمان و گروه کنترل نشان نداد (شکل 2ب). یافته های مربوط به امراض بافتی حاکی از این است سیپرمتین /دلتامترین سبب تغییرات آشکاری در ساختار پاتولوژیکی در طول رشد قشری نمیشوند، بلکه نتایج ما بیانگر این است که موشهای باردار دارای علائم سمی بودند (که نشان داده نشده است).

3.2 تکثیر پیش ساز نورونی کاهش یافته سیپرمتین /دلتامترین و خروج از چرخه سلولی ارتقا یافته

برای مشخص کردن اینکه آیا نورونهای تحت درمان با سیپرمترین /دلتامترین میتوانند بر تکثیر سلولی تشکیل بافت سلولی در ناحیه زیر بطنی (SVZ) اثر بگذارد یا خیر، آنالیز هم کانون به صورت شکل 3 انجام شد. Ki67 یک نشانه سلولی برای تکثیر است و پیشرفت سلولی در فاز S چرخه سلولی افزایش می یابد. اینجا، اثر سیپرمترین /دلتامترین بر تکثیر پیش ساز در گسترش قشر مخ با استفاده از Ki67 و pHH3 پس از دو ساعت بعد از تزریق BrdU مطالعه شد. تعداد میانگین، تفاوت قابل توجهی ($p < .001$ ، ***، شکل 3ج) در سلولهای مثبت BrdU بین گروه کنترل (کنترل $n=14$, 148.09) و گروه های تحت درمان (CP, 106.58, $n=14$; DM, 108.76, $n=14$) بود. به علاوه، تعداد متوسط سلولهای مثبت Ki67 در VZ/SVZ، اختلاف (CP, $p < .05$ and DM, $p < .01$ ، ***، شکل 3چ) بین گروه کنترل (کنترل، $n=13$, 41.14) و گروه های تحت درمان (CP, 30.20, $n=13$; DM, 31.19, $n=13$) بود که بیانگر کاهش سلولهای برچسب گذاری +Ki67 و برچسب گذاری دوگانه BrdU+ در صفحه غشایی بین گروه کنترل (کنترل، $n=12$, 44.78) و گروه های تحت درمان (CP, 32.23, $n=12$ ، $p < .01$ ، $n=12$ ، $p < .05$ ، DM, 34.78، شکل 3 آی) است. به طور جالبی، اکثر سلولهای برچسب گذاری شده pHH3 در گروه های تحت درمان با سیپرمترین /دلتامترین (ns)، بین گروه کنترل و گروه های تحت درمان، (شکل 3 ام) تحت تاثیر قرار نگرفت.

از آنجاییکه تکثیر سلولی با مواجهه با سیپرمترین /دلتامترین کاهش نیافت، شاخص خروج چرخه سلولی را ارزیابی کردیم. نسبت سلولهای مثبت BrdU و منفی Ki67 بر تعداد کل سلولهای مثبت BrdU پس از 24 ساعت بعد از تزریق BrdU ارزیابی شد. همانطور که شکل 4 نشان داد، تعداد میانگین، تفاوت معنادار ($p < .01$) در سلولهای مثبت BrdU بین گروه کنترل (کنترل، $n=14$, 206.93) و گروه های تحت درمان (CP, 169.85, $n=14$; DM, 168.05, $n=14$) بود. به علاوه، تعداد متوسط سلولهای مثبت Ki67 در VZ/SVZ اختلاف ($p < .05$ ، $p < .01$ ؛ CP, $p < .01$ ؛ DM, $p < .05$) بین گروه کنترل (کنترل، $n=13$, 53.48) و گروه های تحت درمان (CP, 38.59, $n=13$; DM, 41.60, $n=13$) بود، که بیانگر افزایش شاخص خروج چرخه سلولی (سلولهای برچسب گذاری شده دوگانه +Ki67 و BrdU+) در صفحه غشایی بین گروه کنترل (کنترل، $n=13$, 78.94) و گروه های تحت درمان (CP, 84.70, $n=13$ ، $p < .01$ ، $n=13$ ، $p < .05$ ، DM, 83.25، شکل 3 ب) بود.



شکل 7. سیپرمتترین /دلتامترین بر مهاجرت نورونی اثر نداشت. الف. تصاویر نمایانگر بخشهای هم کانون قشر مخ در E18.5 با گروه BrdU (سبز) و PI (قرمز) هم رنگ شد؛ ب) تصاویر نمایانگر بخشهای هم کانون قشر مخی در E18.5 رنگ شده با BrdU (سبز) و PI (قرمز) در حیوانات مواجه شده با CP. ث. تصاویر نمایانگر بخشهای هم کانون قشر مخ در E18.5 هم رنگ با گروه BrdU (سبز) و PI (قرمز) در گروه دلتامترین هم رنگ شد؛ د) درصد نسبی نورونها در CP و VZ/SVZ, IZ (معنادار نیست). ستون مقیاس، 150 μm . (برای تفسیر مراجع برای رنگها در این راهنمای تصویر، خواننده به نسخه وب این مقاله ارجاع داده میشود).

3.3 بلوغ سلولی پیش ساز موخر سیپرمتترین /دلتامترین و تفکیک نورونی

برای بررسی اثرات مخدر اعصاب پیرتروئیدها بر روی بلوغ و تفکیک سلولی، ایمونوهیستوشیمی با استفاده از Pax6, Tbr1, NeuN, Tbr2 و انجام شد. به عنوان یک مستطیل، Pax6 برای تفکیک و تکثیر در سلول پیش ماده لازم است و سلول مثبت Tbr2، Tbr2 را نشان میدهد که در مرحله پیش ساز میانی قشر در حال گسترش بیان میشود (شکل 5الف). Tbr1 به طور ویژه ای در لایه VI در گسترش قشری واقع میشود. نتایج ما نشان داد درصد نسبی Pax6، از گروه کنترل به طور مشهود بالاتر بود (شکل 5ب-1-3 و ث) که تکثیر نورونی

موخر سیپرمتترین /دلتامترین سلول ریشه و سلول پیش ساز را بیان کرد (کنترل، 15.96%; CP, 21.26%; DM, 21.35%; *p < .05). به علاوه، نشانه Tbr1 و Tbr2 برای تفکیک سلولی آنالیز بکار رفت و درصد نسبی Tbr2 (شکل 1د5-3د و E) معنادار بود که کاهش پیدا کرد و از هیچ گروه کنترلی تشکیل نمیشد (کنترل ، .01 < *p; DM, 19.12%; CP, 19.75%; 32.07%). در این حین، سازگار با Tbr2، درصد نسبی Tbr1 (شکل 5اف-1اف 3 و جی) کاهش یافت که از گروه کنترلی تشکیل میشود (کنترل، 30.98%; CP, 21.16%; DM, 21.76%; *p < .05). این نتایج، بلوغ با تاخیر سیپرمتترین /دلتامترین و تفکیک نورونی سلول ریشه و سلول پیش ساز را نشان داد. برای بررسی رخ مانه سلولهای بالغ، رنگ کردن ایمونوهیستوشیمی دوگانه برای BrdU و NeuN انجام شد (شکل 5 اچ 1 تا اچ 3 و آی). در موشهای تحت کنترل، در حدود 90.91٪ سلولهای مثبت BrdU در صفحه غشایی با NeuN برچسب گذاری شد (یک نشانه نوروئید بالغ)، در مقابل، فقط 81.15٪ سلولهای مثبت BrdU، در گروه سیپرمتترین، NeuN مثبت بودند و 82.47٪ سلولهای مثبت BrdU، در گروه دلتامترین، NeuN مثبت بودند. به طور جالبی، درصد سلولهای مثبت دوگانه BrdU و NeuN در موشهای سیپرمتترین /دلتامترین از گروه کنترل پایین تر بود (شکل 5آی) که بیانگر این است که پیرتروئیدها در واقع بلوغ نورونها در پستانداران را به تاخیر انداختند و پیرتروئیدها، تصمیم گیری در مورد سرنوشت سلولهای تازه متولد شده در طول تشکیل بافت عصبی را دچار نقص کردند.

3.4 مرگ سلولی القا شده سیپرمتترین و دلتامترین در محیط آزمایشگاهی و طبیعی

خطوط سلولی PC12 (یک خط سلول عصبی رایج) با سیپرمتترین /دلتامترین برای بررسی اثر مرگ سلولی تحت درمان قرار گرفتند. انکسین V یکی از حساسترین شاخصها برای کشف مرگ سلولی اولیه است، در حالیکه PI میتواند هسته آپوپتوزی را در مراحل میانی و آخر رنگ کند. همانطور که شکل 6 نشان داد میزان مرگ سلولی PC12 در گروه درمان سیپرمتترین /دلتامترین در مقایسه با گروه کنترل در طول فاز اولیه به حد معناداری (CP, Q1-LR=15.11%; DM, Q1-LR=14.45% and Control, Q1-LR=14.18%) افزایش پیدا کرد. در عین حال، در طول فاز آخر، میزان مرگ سلولی گروه درمان سیپرمتترین و دلتامترین افزایش یافت و تفاوت بین گروه درمان (CP, Q1-UR=16.22%) در شکل 6 ب و دلتامترین (Q1-UR=16.32%) در شکل 6ث و گروه کنترل (Q1-UR=3.46% شکل 6الف) به شدت معنادار بود (p < .01، شکل 6د). تحلیل

وسترن بلات نشان داد سیپرمتترین / دلتامترین بیان ($p < .05$) Bax را افزایش داد اما بیان Bcl-xl ($p < .05$) در سیپرمتترین و ($p < .01$) در دلتامترین) را در مقایسه با کنترل ($n=6$) کاهش داد. به علاوه، مرگ سلولی القا شده سیپرمتترین / دلتامترین با استفاده از تونل کشف شد. پیکانها، سلولهای مرگ سلولی را در گروه کنترل، گروه سیپرمتترین و گروه دلتامترین نشان داد. با تحلیل سلولهای مرگ سلولی در محیط طبیعی همانطور که شکل 6 اچ نشان داده شده (سلولها/ $01 < p < **$, mm^2) نتایج نشان داد مرگ سلولی تحت تاثیر مواجهه پیش زادی با سیپرمتترین / دلتامترین در محیط طبیعی و آزمایشگاهی قرار داشت.

3.5 مهاجرت نورونی تحت تاثیر سیپرمتترین و دلتامترین قرار نگرفت

در طول مهاجرت نورونی، نورونهای پس از تقسیم سلولی تازه ایجاد شده دارای توانایی ورود به صفحه غشایی (سیپرمتترین) از ناحیه بطنی (VZ) در ناحیه میانی است، که به یک مورفولوژی چند قطبی تبدیل میشود. برای مشخص کردن اینکه آیا نورونهای تحت درمان با سیپرمتترین / دلتامترین، میتوانند بر مهاجرت نورونی اثر بگذارند، تحلیل هم کانون در E18.5 با استفاده از نشانه BrdU انجام شد. در هر گروه، ما درصد نورونها در سیپرمتترین، IZ و Z/SVZ را در قشر تازه مخ به طور انفرادی مقایسه کردیم. تعداد سلول مهاجر در VZ/SVZ ($n=15$) و در سه روز پس از تزریق BrdU (E15.5) با نشانه های مثبت دوگانه PI/BrdU تعیین کمیت شد. در مقایسه با گروه کنترل ($IZ, 32.89\%$; $VZ/SVZ, 52.60\%$) و ($CP, 14.31\%$)، هیچ اثری از مواجهه با گروه های سیپرمتترین ($IZ, 33.89\%$; $VZ/SVZ, 51.86\%$) و ($CP, 14.04\%$) و دلتامترین ($IZ, 33.68\%$; $VZ/SVZ, 52.30\%$) و ($CP, 13.94\%$) مشاهده نکردیم، که نشان داد مهاجرت نورونی تحت تاثیر مواجهه پیش زادی با سیپرمتترین / دلتامترین قرار نداشت (شکل 7).

4. بحث

بیشترین محدودیت های بقایا برای پیرتروئیدها مختلف در چین صورت گرفته است، گرچه هم سازمان غذا و کشاورزی ملل متحد و هم سازمان سلامت جهانی، محدودیتهای سختی را در زمینه سبزیجات و میوه ها ایجاد کرده اند. مواجهه پیرتروئیدها، به صورت یک مساله سلامت عمومی مهمی باقی می ماند به ویژه برای سمیت مزمن. مطالعات قبلی نشان داد مواجهه با پیرتروئیدها میتواند علائم مخدر اعصاب مختلف را بر روی سیستم عصبی مرکزی تحریک کند، همانند بی حسی، حمله و اختلال حافظه. گرچه برخی موارد مخدر اعصاب پس از

مسمومیت حاد یا مزمن پیرتروئیدها گزارش شده است، هیچ گزارشی از تغییر سلول ساقه عصبی و گسترش غشایی پس از مواجهه با پیرتروئیدها، برای نمونه، سیپرمتترین و دلتامترین وجود ندارد. در اینجا، بررسی کردیم چطور سیپرمتترین و دلتامترین بر تشکیل بافت عصبی در سلول ساقه عصبی هم چنین اثرات آنها بر مرگ سلولی و تفکیک اثر میگذارد.

پیرتروئیدها همچنین به کندی بر روی اختلال نورون حرکتی (MND) از طریق تطویل سینتیک کانال سدیمی دروازه ای-ولتاژی سمیت بافتی ایجاد میکند، برای نمونه، مطالعات فیزیولوژیکی اعصاب بالینی بیانگر این بود که هم علائم نورون حرکتی فوقانی و هم تحتانی در مناطق پیازی، گردنی و کمری خاجی شامل مسمومیت پیرتروئیدی مزمن بود که منجر به ALS، اسپاسمهای زبانی و MND شد. در مطالعه کنونی، وزنه‌های بدن بندها و فرزندان پس از مواجهه با سیپرمتترین /دلتامترین دچار زیان شد، نتایج ما اثبات کرد سیپرمتترین /دلتامترین میتواند میزان ماندگاری بچه‌ها را به طور معناداری کاهش دهد در حالیکه تغییر پاتولوژیکی با نشانه‌های سمی خفیف آشکار نبود.

تشکیل بافت عصبی در قشر مخ، شامل تقسیم پیش ساز نورونی، تکثیر و خروج چرخه سلولی میشود. مطالعات قبلی پی برد مواجهه دلتامترین، مرگ سلولی را در پیش ماده هیپوکامب، بدکاری شناختی و انحطاط عصبی تحریک کرد. به طور مشابه، دلتامترین هم چنین به سلول دانه ای و مهاجرت سلولی پورکینجه آسیب وارد کرد و باعث نقصهای هماهنگی حرکتی شد. بنابراین، خواستیم اثبات کنیم آیا بدکاری تشکیل بافت عصبی از طریق سیپرمتترین و دلتامترین ایجاد شده است یا خیر. برچسب گذاری دوگانه BrdU و Ki67 برای شناسایی شاخص خروج چرخه سلولی بکار رفت و شاخص خروج به صورت مطالعه قبلی انجام شد. به عنوان یک نشانه عالی از طریق چرخه سلولی و تکثیر، BrdU میتواند با سلولها در طول تقسیم سلولی ادغام شود. از مرحله اولیه تقسیم سلولی از طریق متافاز، آنافاز و تلوفاز، pHH3 هم چنین سبب میشود سلولهای میتوزی با مرگ سلولی فرق داشته باشند. Ki67 در سلولهای ساکن وجود ندارد (G0) اما در فازهای فعال چرخه سلولی وجود دارد (S, G1, G2). بنابراین نتایج ما نشان داد سیپرمتترین /دلتامترین، شاخص خروج چرخه سلولی را بر روی سلولهای ریشه و سلولهای پیش ساز در قشر مخی در حال گسترش افزایش داد، که بیانگر بدکاری تشکیل بافت عصبی است.

تشکیل بافت عصبی در مغز پستانداران در کل چرخه حیات در موشها روی میدهد و به طور آشکار در دو منطقه تعریف شده در مغز نشان داده شده است: ناحیه زیردانه ای (SGZ) شکنج دندانه ای (DG) در بطنهای جانبی قدامی. در مطالعه کنونی، NeuN نشانه نورونی به طور بالغ برای شناسایی تفکیک نورونی بکار رفت. درصد نسبی سلولهای بالغ BrdU+/NeuN+ در سیپرمتین تغییر یافت، این نتایج احتمالا، بلوغ غیرعادی سیپرمتین را بازتاب کرد. به علاوه، هم چنین پی بردیم تعداد نورونها در Tbr1+ و Tbr2+ در VZ/SVZ کاهش یافت در حالیکه تعداد Pax6+ و BrdU+ در SVZ/VZ افزایش یافت. گزارش شده است نورونهای Pax6 تازه متولد شده، ترجیحا در سلول بافت حافظ عصب شعاعی در سطح وابسته به شکم ایجاد شد. Tbr2 با زیر جامعه پیش سازهای نورونی در VZ/SVZ بیان شد و Tbr1 در نورونهای طرح پس از تقسیم سلولی کشف شد. نتایج نشان داد سلولهای پیش ساز در قشر تازه مخ در واکنش به سمیت بافت عصبی القا شده از طریق سیپرمتین /دلتامترین از Pax6, Tbr2 به Tbr1 حساس تر بود. کاهش بافت حافظ عصب شعاعی، IPC و نورونهای پس از تقسیم سلولی مشاهده شده در این مطالعه بیانگر این است که مواجهه سیپرمتین /دلتامترین میتواند به بدکاری قشر مخ منجر شود. در یک کلمه، این نتایج بلوغ سلولی پیش ساز موخر سیپرمتین /دلتامترین و تفکیک نورونی را نشان داد.

انکسین V میتواند برای کشف مرگ سلولی اولیه از طریق پیوند فسفاتیدیلسرین بکار رود و PI میتواند در سلولهای آپوپتوزی آخر نفوذ کند اما نمیتواند در سلولهای آپوپتوزی اولیه نفوذ کند. ترکیب انکسین V و PI میتواند دوره های آپوپتوزی مختلف را تفکیک کند. مطالعات قبلی در زمینه حیوانات آبی نشان داد سیپرمتین برای اندامهای دارای التهاب، آسیب دی ان ای و مرگ سلولی مضر است. چندین ژن کاندید شامل مرگ سلولی به طور قابل توجهی تغییر یافت، برای نمونه caspase 3, Bax, Bcl, p53 و سنتتاز اکسید نیتریک القا پذیر (iNOS). سمیت کبدی کلیدی تحریک شده دلتامترین با مطالعاتی در زمینه تغییرات بیان bcl-2 تایید شد و سمیت از طریق وضعیت اکسایشی و التهاب شناسایی شد. با پذیرش نتایج قبلی، میزان مرگ سلولی گروه درمان سیپرمتین در طول فاز آخر به جای فاز اول در سلولهای PC12 افزایش یافت، یافته ها با سلولهای تحت درمان با دلتامترین سازگار هستند. نتایج در زمینه سیپرمتین و دلتامترین بیانگر این است که پیرتروئیدها مرگ سلولی را با سمیت بافت عصبی در طول فاز آخر تحریک کرد. به علاوه، نتایج وسترن بلات و

TUNEL ، مرگ سلولی را آشکار میکند. نتایج ما نشان داد بیان Bax به طور معناداری پس از درمان با سیپرمتترین /دلتامترین افزایش یافت، در حالیکه میزان بیان Bcl-xl کاهش یافت. هم چنین نتایج TUNEL و WB حاکی از این است که سیپرمتترین /دلتامترین مرگ سلولی را تحریک نمودند. این نتایج با تحقیقات قبلی در محیط آزمایشگاهی سازگار بود.

قشر مخ پستانداران یک ساختار شش لایه است. نورونها پس از تقسیم سلولی تازه ایجاد شده صفحه غشایی VZ به مقاصد نهایی (MZ) در طول رشد وارد میشوند. مشاهده کردیم مهاجرت نورونی تحت درمان سیپرمتترین یا دلتامترین تغییر نیافت. این پدیده ممکن است مکانیسمی باشد که از طریق آن پیرتروئیدها، تکثیر نورونی، بلوغ و تفکیک را کاهش میدهد. به علاوه، تکنیکهای بیشتری مانند ترتیب دهی RNA، مراحل بعدی ما برای شناسایی ژنهای سببی و مکانیسمهای ممکن خواهد بود.

5. نتیجه گیری

نتایج ما نشان داد مواجهه سیپرمتترین و دلتامترین مانع تشکیل بافت عصبی سلولهای پیش ماده عصبی میشود و مرگ سلولی را ترویج میدهد. این یافته ها ممکن است برای شناخت سمیت بافت عصبی پیرتروئیدها کمک کننده باشد و از سمیت آن بر روی کودکان در پستانداران پیشگیری نماید.



این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

لیست مقالات ترجمه شده ✓

لیست مقالات ترجمه شده رایگان ✓

لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI ✓

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی