

تأثیر آلودگی صوتی در انتشار گلیکوکانژوگه‌های سطح سلول در گانگلیون مارپیچی نوزاد موش

چکیده

طاهره طلایی خوزانی^{۱*}

ملیحه منصفی^۲

زهرا وجدانی^۱

فرزانه دهقانی^۱

محمد رضا عرب^۳

۱- گروه علوم تشریحی، بخش آناتومی دانشگاه

علوم پزشکی شیراز

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه

شیراز

۳- گروه علوم تشریحی، بخش آناتومی دانشگاه

علوم پزشکی زاهدان

*نویسنده مسئول، شیراز، خیابان زند، دانشکده پزشکی،

بخش علوم تشریح، تلفن: ۰۷۱۱۲۳۰۴۳۷۲

email: talaeit@sums.ac.ir

کلمات کلیدی: اصوات ناهنجار، گانگلیون مارپیچی، گلیکوکانژوگه‌ها

مقدمه

یکی از معضلات جوامع صنعتی امروز وجود اصوات ناهنجار در محیط زندگی و کار فرد است. در پستانداران، اصوات شدید می‌توانند به بخش‌های مختلف گوش داخلی آسیب جدی وارد سازند به طوری که منجر به از دست دادن شنوایی گردد.^۱ مطالعات مختلف نشان داده است که صوت‌های با شدت بالا می‌توانند منجر به از بین رفتن و یا تغییرات سلولی در اجزاء مختلف گوش بالغین شوند.^{۲-۴} تغییر در بیان ژنی از عوارض در معرض قرارگیری با منبع آلوده‌کننده صوتی است.^۵ مکانیسم مولکولی این تغییرات دقیقاً مشخص نشده است هر چند

مطالعات مختلف نشان داده است که صوت‌های شدید می‌توانند با ایجاد استرس‌های اکسیداتیو و تشکیل رادیکال‌های آزاد،^۶ تولید ایسکمی در بافت^۷ و یا تولید نیتریک اکسید^۸ اثرات خود را بر جای گذارند. یکی از آسیب‌پذیرترین افراد جامعه که به صورت ناخواسته در معرض اصوات شدید قرار دارند جنین مادران حامله هستند. مادران حامله به سبب موقعیت شغلی خود در معرض این آلوده‌کننده‌های محیطی قرار دارند. دستگاه شنوایی نابالغ بیشتر در معرض صدمات ناشی از اصوات شدید قرار می‌گیرد.^۹ هر چند محیط رحم از شدت صوتی که به جنین می‌رسد می‌کاهد، اما اصوات

به مدت یک شب با موش نر مجاور شده و صبح روز بعد با رویت پلاک واژنی روز صفر حاملگی مشخص گردید. موش‌های حامله تحت شرایط استاندارد و دسترسی آزاد به غذا و آب نگهداری شدند. سه گروه از موش‌های حامله از روز شش حاملگی در معرض صوت قرار گرفتند. نوزادان موش‌ها تا یک هفته پس از تولد نیز صوت دریافت نمودند. شدت صوت ۱۰۰ دسی‌بل و مدت آن روزانه دو و نیم ساعت بود.^{۱۸} شدت صوت در مرکز قفس‌های نگهداری موش‌ها با استفاده از دستگاه Soundmeter تعیین شد. سه گروه دیگر از موش‌ها به عنوان گروه کنترل هیچگونه صوتی در یافت نمودند.

نوزادان موش گروه‌های آزمایش و کنترل به ترتیب در روز اول پس از تولد، روز هفتم پس از تولد و روز چهاردهم پس از تولد تحت بیهوشی عمیق منجر به مرگ کشته شده و سرهای آنها در فرمالین فیکس گردیدند. نمونه‌های چهارده روزه با کمک EDTA دکلسیفیه شدند. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی بافتی به طور سریال مقطع زده شدند.

لکتین هیستوشیمی: پس از پارافین زدایی و آب‌دهی مجدد، مقاطع در بافر فسفات ۰/۱ مولار که حاوی ۱/۰ میلی مولار از $CaCl_2$ و $MgCl_2$ بود شستشو داده شد. سپس جهت خنثی‌سازی پراکسیداز اندوژن، نمونه‌ها در متانول حاوی ۱٪ H_2O_2 برای مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. پس از شستشوی مجدد در بافر فسفات، نمونه‌ها در معرض لکتین‌های کانژوگه به پراکسیداز (سیگما) با غلظت ده میکروگرم در هر میلی‌لیتر به مدت دو ساعت در درجه حرارت اتاق قرار داده شدند. لکتین‌های مورد استفاده، WGA, PNA, DBA و BSAI-4 بود که به ترتیب قندهای گالاکتوز آمین (Gal/Nac)، گالاکتوز/گالاکتوز آمین (Gal/GalNac)، سیالیک اسید و گالاکتوز (Gal) را ردیابی می‌نمودند. WGA به جزء سیالیک اسید قند انتهایی آن استیل گلوکوز آمین (GluNac) را نیز ردیابی می‌نماید. نمونه‌ها سپس در معرض کروموژن (دی‌آمینوبنزیلیدین ۰/۰۳٪ در بافر فسفات که حاوی ۲۰۰ میکرولیتر H_2O_2 است) به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. واکنش کروموژن با کمک آب جاری خنثی شد. نمونه‌ها پس از مانته کردن با کمک میکروسکوپ نوری مطالعه شدند و شدت رنگها بر اساس یک روش قراردادی از منفی تا شدت زیاد (صفر تا چهار) ارزیابی گردید. شدت رنگها با کمک نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۳ با تست Mann-Whitney با $p < 0.05$ تجزیه و تحلیل آماری گردیدند.

ناهنجار می‌تواند باعث تغییرات شنوایی و آسیب به دستگاه شنوایی جنین گردد.^{۱۱، ۱۰} یکی از بخش‌هایی که ممکن است توسط اصوات ناهنجار متأثر شود، گانگلیون ماریچی در گوش داخلی جنین است. برخی از تحقیقات نشان دادند که نورونهای گانگلیون ماریچی در اثر در معرض قرارگیری با شدت‌های بالای صوت تغییر پاتولوژیکی نشان ندادند.^{۱۲} اما در عین حال گزارشاتی در دست است که نشان می‌دهد در نورون‌های گانگلیون ماریچی پس از در معرض قرارگیری با اصوات شدید موادی نظیر نیتریک اکسید بیشتر تولید می‌شود.^{۱۳} با القای بافت به تولید موادی نظیر این، صوت ممکن است نورون‌های گانگلیون ماریچی را نیز در سطح ملکولی متأثر نماید و از این طریق بر تکامل این بخش از گوش داخلی مداخله نموده و منجر به از دست دادن یا ضعف شنوایی گردد. یکی از مولکول‌های مهم در تکامل گوش داخلی گلیکوکانژوگه‌ها هستند.^{۱۴} تمایز و تکامل نورون‌ها توسط میان‌کنش بین مولکولهای سطح سلول و ماتریکس خارج سلولی کنترل می‌شود. این گلیکوکانژوگه‌ها بسیاری از میان‌کنش‌ها را کنترل می‌نمایند.^{۱۵} گزارشاتی در دست است که موادی نظیر نیتریک اکسید می‌تواند بر تولید و ترشح گلیکوکانژوگه‌ها در بافت‌های دیگر اثر گذارد.^{۱۶} تغییرات گلیکوکانژوگه‌های سطح سلول پس از در معرض قرارگیری با منبع آلوده‌کننده صوتی در بافت‌های دیگر جنین نظیر قلب نیز گزارش شده است.^{۱۷} در مکانهای صنعتی مادران در معرض اصواتی با شدت ۱۰۰ تا ۱۰۵ دسی‌بل هستند^{۱۸} که این شدت صوت می‌تواند در گوش بالغین تغییرات غیر قابل برگشتی را ایجاد نماید. با توجه به حساس‌تر بودن جنین این شدت صوت نیز میتواند اختلالاتی را ایجاد کند. بنابراین هدف از این تحقیق بررسی تغییرات انتشار گلیکوکانژوگه‌ها در نورونهای گانگلیون ماریچی نوزادانی است که مادران آنها در معرض صوت ناهنجار با شدت بالا قرار گرفته‌اند. فهم عواملی که باعث صدمه به گوش و در نتیجه آن ضعف شنوایی مادرزادی می‌شود، نظیر نوع کار مادران و مکانیسم اثر این عوامل می‌تواند جامعه را به سمت بکارگیری روش‌های جلوگیری از آسیب‌های پیش از تولد هدایت نماید.

روش بررسی

چهل و دو سر موش ماده از نژاد BALB/c در سنین بین ۲ تا ۴ ماه و وزن ۲۵ تا ۳۰ گرم به شش گروه تقسیم شدند. موش‌های ماده

یافته‌ها

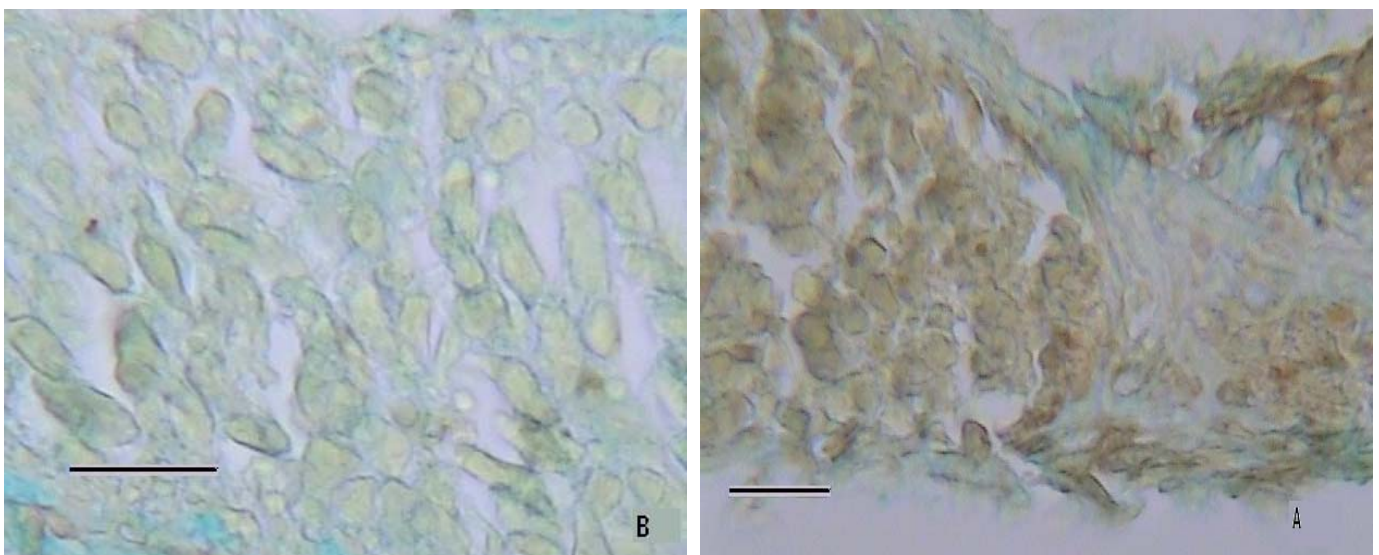
شدت واکنش به "بسیار ضعیف" تقلیل یافت هر چند این تغییر از نظر آماری معنی‌دار نبود. نورونها به طور طبیعی قند انتهایی Gal را در روزهای اول با شدت "ضعیف" بیان نمودند اما در روزهای هفتم و چهاردهم پس از تولد، واکنش برای این قند کاهش یافت و "بسیار ضعیف" شدند. مواجهه با منبع آلودگی صوتی شدت واکنش را تغییر نداد. نورونهای گانگلیون ماریچی در واکنش به لکتین BSAI-B4 در گروه کنترل در روز اول و هفتم پس از تولد با شدت "بسیار ضعیف" پاسخ دادند. بیان قند انتهایی گالاکتوز در روز چهاردهم افزایش نشان داد و شدت واکنش به "ضعیف" افزوده شد. آنالیز آماری نشان داد که کاربرد اصوات ناهنجار در محیط جنین و نوزاد در پایان هفته دوم پس از تولد سبب کاهش شدت واکنش به طور معنی‌دار شد و به صورت "بسیار ضعیف" ارزیابی گردید (شکل ۱ و جدول ۱).

مطالعه بافتی ساختمان گانگلیون ماریچی با میکروسکوپ نوری هیچ تغییر ساختمانی را نشان نداد. طرح واکنش نورونهای گانگلیون ماریچی به لکتین WGA در تمام روزهای مورد مطالعه در گروه کنترل با شدت "بسیار ضعیف" ارزیابی شد و صوت ناهنجار نتوانست در واکنش به این لکتین تغییری ایجاد نماید. در گروه کنترل بیان قند انتهایی Gal/GalNac که با لکتین PNA ردیابی می‌شود، در روز اول پس از تولد با شدت "ضعیف" ارزیابی شدند اما شدت واکنش در روز هفتم و چهاردهم پس از تولد کاهش نشان داد و به صورت "بسیار ضعیف" ارزیابی شد. کاربرد صوت بیان این ترکیب را در پایان هفته اول و دوم پس از تولد تغییر نداد اما در روز اول پس از تولد

جدول ۱: میانه شدت رنگ ارزیابی شده پس از رنگ‌آمیزی با لکتینهای مختلف در روزهای مورد مطالعه

WGA		PNA		DBA		BSAI-B4		روزهای مورد مطالعه
میانه شدت رنگ در گروه کنترل	میانه شدت رنگ در گروه آزمایش	میانه شدت رنگ در گروه کنترل	میانه شدت رنگ در گروه آزمایش	میانه شدت رنگ در گروه کنترل	میانه شدت رنگ در گروه آزمایش	میانه شدت رنگ در گروه کنترل	میانه شدت رنگ در گروه آزمایش	
۱	۱	۲	۱	۲	۲	۱/۵	۱	روز اول (پس از تولد)
۱	۲	۱	۱	۱	۱	۰/۵	۱	روز هفتم (پس از تولد)
۰/۵	۱	۱	۱	۱	۱	۲	*۱	روز چهاردهم (پس از تولد)

شدت واکنش ۰ به صورت "منفی"، شدت واکنش ۱ به صورت "بسیار ضعیف"، شدت واکنش ۲ به صورت "ضعیف"، شدت واکنش ۳ به صورت "متوسط" و شدت واکنش ۴ به صورت "زیاد" ارزیابی شد. * اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل.



شکل ۱: واکنش نورونهای گانگلیون ماریچی به لکتین BSAI-B4 در گروه کنترل (A) و گروه در یافت کننده صوت (B). Scale Bar مطابق ۲۰ میکرومتر است.

بحث

یکسانی با سلولهای گانگلیونی ماریچی دارند، احتمال دارد که کاهش آن در نورونهای حسی این گانگلیون نیز باعث تداخل با فرایند تکامل طبیعی گردد. از طرفی نوزادان مورد مطالعه از روز هفتم پس از تولد صوتی دریافت نکردند. بنابراین، تغییر محتوای ترکیباتی با قند انتهایی گالاکتوز ممکن است ناشی از فرایند ترمیم صدمات ناشی از اثر صوت باشد. صوت می‌تواند به سلولهای موئی موش صدمه وارد نماید.^{۲۵} همانطور که جدول ۱ نشان می‌دهد، میانه شدت رنگ نورونها طبیعی (گروه کنترل) برای لکتین BSAI-B4 در روز ۱۴ نسبت به روز هفت تغییر یافته است. در حالی که در گروه دریافت‌کننده صوت این تغییرات در طول تکامل مشاهده نمی‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد بیان ترکیباتی با قند انتهایی حاوی گالاکتوز در ایجاد ارتباط با سلولهای موئی نقش داشته و یا در آغاز و یا ایجاد پاسخ‌های شنوایی اهمیت دارد. تکامل پاسخ‌های شنوایی و ایجاد پتانسیل در مسیر شنوایی در موش صحرائی در ابتدا در روزهای ۱۲ و یا ۱۳ پس از تولد ظاهر می‌شود. مشابه این تغییرات در موش نیز گزارش شده است.^{۲۵} این روزها تقریباً هم زمان با افزایش بیان گالاکتوز در مطالعه حاضر است. به طور کلی می‌توان عنوان نمود که با وجود این که صوت ناهنجار ساختمان میکروسکوپی نورونهای گانگلیون ماریچی را تغییر نمی‌دهند اما در سطح مولکولی تغییراتی را از جمله تغییر در بیان ترکیبات حاوی گالاکتوز ایجاد می‌نمایند. این تغییرات می‌توانند علت برخی از ناهنجاری‌های مادرزادی در گوش و کم شدن شنوایی باشند، هرچند جهت اظهار نظر دقیق‌تر تحقیقات بیشتری لازم است.

سپاسگزاری: نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز جهت تأمین بودجه و خانم فاطمه پیرسلامی جهت تهیه مقاطع بافتی تشکر نمایند.

مطالعات بر روی ساختمان میکروسکوپی گانگلیون ماریچی پس از مواجهه با اصوات ناهنجار هیچ تغییر هیستوپاتولوژیکی را نشان نمی‌دهد.^{۱۲} نتایج مطالعه حاضر نیز این یافته‌ها را تأیید می‌کند. تغییرات کربوهیدراتهای سطح سلول در حین بلوغ طبیعی نورونهای حسی جنین مطالعه شده است.^{۱۹} هر کدام از گلیکوکائز و گه‌ها در حین تکامل و در فیزیولوژی طبیعی عمل خاصی را دارند. برای مثال گلیکوکائز و گه‌های با قند انتهایی واکنش دهنده به WGA می‌توانند گیرنده فاکتور رشد عصبی باشند.^{۲۰} گلیکوکائز و گه‌های حاوی قند انتهایی Gal/GalNac در حین عصب‌گیری مجدد عضلات توسط اعصاب حرکتی بیان می‌شوند.^{۲۱} از آنجایی که ترمیم و تکامل جنینی از جنبه‌های متعدد شبیه به هم می‌باشند لذا ممکن است این قند در تکامل جنینی نیز درگیر باشد. واکنش به لکتین‌هایی نظیر DBA و WGA در سطح نورونهای حسی و زوائد آن مشاهده شده است.^{۲۲، ۲۳} نتایج این تحقیق نیز واکنش به این دو نوع لکتین را نشان داد که تحقیقات قبلی را تأیید می‌کند. در مطالعات قبلی نشان داده شد که نورونهای اعصاب حسی دیگر نظیر گانگلیون چهره‌ای (Facial) و سه قلو در موش تمایلی به اتصال به لکتین PNA ندارند.^{۲۳} هرچند داده‌های حاضر نشان داد که نورونهای گانگلیون ماریچی قند انتهایی Gal/GalNac را که با لکتین PNA واکنش می‌کند، در سطح خود بیان می‌نماید و از این نظر ظاهراً با نورونهای دیگر گانگلیونهای متفاوت می‌باشد. همانطور که نتایج نشان می‌دهد صوت تنها واکنش به BSAI-B4 را در روز چهاردهم تغییر می‌دهد. تحقیقات دیگر نشان داده است که واکنش به BSAI-B4 در طی دوران جنینی و ترمیم سلولهای موئی اتریکل افزایش می‌یابد.^{۲۴} از آنجایی که سلولهای موئی نیز منشا جنینی

References

- Pierson LL. Hazards of noise exposure on fetal hearing. *Semin Perinatol* 1996; 20: 21-9.
- Fredelius L, Wersall J. Hair cell damage after continuous and interrupted pure tone overstimulation: a scanning electron microscopic study in the guinea pig. *Hear Res* 1992; 62: 194-8.
- Gao WY, Ding DL, Zheng XY, Ruan FM, Liu YJ. A comparison of changes in the stereocilia between temporary and permanent hearing losses in acoustic trauma. *Hear Res* 1992; 62: 27-41.
- Adler HJ, Kenealy JF, Dedio RM, Saunders JC. Threshold shift, hair cell loss, and hair bundle stiffness following exposure to 120 and 125 dB pure tones in the neonatal chick. *Acta Otolaryngol* 1992; 112: 444-54.
- Cho Y, Gong TW, Kanicki A, Altschuler RA, Lomax MI. Noise overstimulation induces immediate early genes in the rat cochlea. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; 130: 134-48.
- Ohlemiller KK, Wright JS, Dugan LL. Early elevation of cochlear reactive oxygen species following noise exposure. *Audiol Neurootol* 1999; 4: 229-36.
- Chung JW, Kang HH, Shin JE, Kim JU. Accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha in mouse inner ear by noise stimulation. *Neuroreport* 2004; 15: 2353-6.

8. Chen YS, Tseng FY, Liu TC, Lin-Shiau SY, Hsu CJ. Involvement of nitric oxide generation in noise-induced temporary threshold shift in guinea pigs. *Hear Res* 2005; 203: 94-100.
9. Gerhardt KJ, Otto R, Abrams RM, Colle JJ, Burchfield DJ, Peters AJ. Cochlear microphonics recorded from fetal and newborn sheep. *Am J Otolaryngol* 1992; 13: 226-33.
10. Gerhardt KJ, Abrams RM. Fetal exposures to sound and vibroacoustic stimulation. *J Perinatol* 2000; 20: 21-30.
11. Gerhardt KJ, Pierson LL, Huang X, Abrams RM, Rarey KE. Effects of intense noise exposure on fetal sheep auditory brain stem response and inner ear histology. *Ear Hear* 1999; 20: 21-32.
12. Rask-Andersen H, Ekvall L, Scholtz A, Schrott-Fischer A. Structural/audiometric correlations in a human inner ear with noise-induced hearing loss. *Hear Res* 2000; 141: 129-39.
13. Sun DY, Li XP. The effect of noise exposure on the expression of NOSmRNA in the cochlea. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2000; 14: 373-4.
14. Pfenninger KH, Maylie-Pfenninger MF, Friedman LB, Simkowitz P. Lectin labeling of sprouting neurons. III. Type-specific glycoconjugates on growth cones of different origin. *Dev Biol* 1984; 106: 97-108.
15. Hynes MA, Buck LB, Gitt M, Barondes S, Dodd J, Jessell TM. Carbohydrate recognition in neuronal development: structure and expression of surface oligosaccharides and beta-galactoside-binding lectins. *Ciba Found Symp* 1989; 145: 189-210.
16. Nagaki M, Shimura MN, Irokawa T, Sasaki T, Shirato K. Nitric oxide regulation of glycoconjugate secretion from feline and human airways in vitro. *Respir Physiol* 1995; 102: 89-95.
17. Monsefi M, Talaei T. The changes in heart glycoconjugates by noise stress in mouse as an experimental model. *J Appl Anim Res* 2005; 27: 121-4.
18. Emmerich E, Richter F, Reinhold U, Linss V, Linss W. Effects of industrial noise exposure on distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) and hair cell loss of the cochlea: long term experiments in awake guinea pigs. *Hear Res* 2000; 148: 9-17.
19. Denis-Donini S, Estenoz M, Augusti-Tocco G. Cell surface modifications in neuronal maturation. *Cell Differ* 1978; 7: 193-201.
20. Costrini NV, Kogan M. Lectin-induced inhibition of nerve growth factor binding by receptors of sympathetic ganglia. *J Neurochem* 1981; 36: 1175-80.
21. Zhou CJ, Kawabuchi M, He JW, Kuraoka A, Hirata K, Wang S, Nada O. Changes in the distribution of peanut agglutinin (PNA) binding molecules during muscle reinnervation following nerve crush injury. *Arch Histol Cytol* 1999; 62: 261-72.
22. Scott SA, Patel N, Levine JM. Lectin binding identifies a subpopulation of neurons in chick dorsal root ganglia. *J Neurosci* 1990; 10: 336-45.
23. Nennesmo I, Kristensson K. Somatopetal axonal transport of fluorescent lectins: distribution pattern and cytophotometric quantification in mouse peripheral neurons. *Neurosci Lett* 1981; 27: 243-8.
24. Warchol ME. Lectin from *Griffonia simplicifolia* identifies an immature-appearing subpopulation of sensory hair cells in the avian utricle. *J Neurocytol* 2001; 30: 253-64.
25. Henley CM, Rybak LP. Ototoxicity in developing mammals. *Brain Res Brain Res Rev* 1995; 20: 68-90.

Effects of noise on the distribution of the cell surface glycoconjugates in the developing mouse spiral ganglion

Talaei T^{1*}
Monsefi M²
Vojdani Z¹
Dehghani F¹
Arab M R³

1- Department of Anatomy.
2- Department of Biology

Shiraz University of Medical
Sciences.

3- Department of Anatomy, Zahedan
University of Medical Sciences.

Abstract

Background: Some pregnant women are exposed to occupational noise, a risk factor for the development of the auditory system. The auditory system is one of the areas in embryonic development in which noise might induce aberrant development. Noise can change the gene expression pattern of an embryo and thereby modify the physiology of the auditory system. Therefore, noise can change the molecular structure of the developing ear. One of the critical molecules involved in development of auditory system is glycoconjugate. The aim of this study was to investigate the molecular changes of the developing spiral ganglion after exposure to industrial levels of noise.

Methods: A total of 42 pregnant mice were divided into control and experimental groups. Each group was further divided into three subgroups. The three experimental subgroups were exposed to daily noise with an intensity of 100 db for 2.5 hours until sacrifice (for the first group to be sacrificed) or day seven of postnatal life (for the other two groups). The mice offspring were sacrificed at the first, seventh and 14th days of postnatal life. The inner ears were prepared histologically. The specimens were stained with the lectins wheat germ antigen (WGA), peanut agglutinin (PNA), *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) and BSAI-B4.

Results: The results indicated that, although there were no histological changes at the light-microscopic level in the ear development, statistical analysis showed that there was a significant decrease in the uptake of the BSAI-B4 lectin by neurons of spiral ganglion in 14th day of postnatal life in the experimental group compared to that of the control group ($p < 0.05$).

Conclusions: After noise exposure, in spite of normal neuronal structure, these cells were modified at the molecular level, especially in glycoconjugate expression, influencing the normal physiology of neurons and causing auditory disorders.

Keywords: Noise, spiral ganglion, glycoconjugate.

* Corresponding author: School of
Medicine, Zand St, Shiraz, Iran
Tel: +98-711-2304372
email: talaeit@sums.ac.ir