

# مطالعه ایمونوتوکسیسیته ناشی از آلاینده‌های گازی نفت خام در تکوین جنین و نوزادان موش صحرایی

حسن صالح‌وند<sup>۱</sup>، محمد خسروی<sup>۲\*</sup>، کاوه خزائیل<sup>۳</sup>، محمدرضا تابنده<sup>۴</sup> و زهرا بصیر<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری آناتومی و جنین‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

<sup>۳</sup> دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

<sup>۴</sup> دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

دریافت: ۱۴۰۱/۳/۱۰

پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۱۳

## چکیده

آلودگی محیط زیست و به خصوص آلاینده‌های نفت و گاز در سلامت مادر و جنین دارای تأثیری مخرب است. در این تحقیق اثرات مستقیم گازهای نفتی بر تکوین و عملکرد اجزای سیستم ایمنی در دوران قبل از تولد جنین و ابتدای نوزادی در موش صحرایی بررسی شده است. ۳۶ سر موش‌های صحرایی باردار در ۲ گروه آلاینده و کنترل تقسیم بندی شدند. از روز نخست بارداری گروه آلاینده به مدت ۵ ساعت در روز در معرض بخارات نفتی در محفظه ویاریوم قرار گرفتند. برداشت نمونه طحال جنین جهت بررسی بیان ژن‌های فاکتور نکروز توموری الفا (TNF $\alpha$ )، اینترفرون بتا-۱، لنفوتوکسین آلفا (LT $\alpha$ ) و فاکتور تغییر دهنده رشد بتا (TGF $\beta$ 1) در روز ۲۰ جنینی انجام شد. میزان تام ایمونوگلوبولین و پاسخ نسبت به گلبول‌های قرمز گوسفند در نوزادان بررسی شدند. همچنین، ایمنی ذاتی از نظر فعالیت باکتری‌کشی سرم، لیزوزیم، مایلوپراکسیداز، آنتی‌تریپسینی و کمپلمان ارزیابی شد. بیان ژن‌های ذکر شده در سنین ۱۵ و ۳۰ روزگی نوزادان نیز نسبت به گروه کنترل مقایسه شد. نتایج حاصل شده بیانگر کاهش معنی‌دار فعالیت لیزوزیم، سیستم کمپلمان و مایلوپراکسیداز و کاهش غیر معنی‌دار فعالیت باکتری‌کشی سرم و پاسخ ایمنی هومورال گروه آلاینده نسبت به گروه کنترل است. کاهش سطح بیان لنفوتوکسین و اینترفرون یک بتا و افزایش سطح بیان فاکتور نکروز توموری آلفا و اینترلوکین ۱ و ۱۰ جنین‌های گروه آلاینده مشاهده شد. همچنین، افزایش نسبی فاکتور نکروز توموری و فاکتور رشد تغییر دهنده بتا وابسته به سن در زاده‌های گروه آلاینده مشاهده شد. در مجموع، بخار ناشی از آلاینده‌های نفتی دارای اثر مخرب و چشم‌گیری بر پاسخ‌های سیستم ایمنی ذاتی، هومورال و سلولی زاده‌های مادران مجاور شده با این ترکیبات هستند. مکانیسم دخیل بر این تأثیرات و بررسی راه‌های کاهش این تأثیرات مخرب می‌تواند در مطالعات آینده بررسی گردد.

**کلمات کلیدی:** آلاینده‌های نفت خام، ایمونوتوکسیک، جنین، نوزاد، تکوین

## مقدمه

آلودگی‌های زیست محیطی به ویژه آلاینده‌های هوا، یکی از نگرانی‌های اولیه جوامع امروزی است که اثرات مضر بر سلامت موجودات زنده و محیط زیست دارند (Wu et al, 2019a; Maione et al, 2021b). بخشی از مکانیسم‌های شناخته شده تأثیر آلاینده‌ها بر موجودات زنده، رخداد التهاب و استرس اکسیداتیو ناشی از آلاینده‌های هوا

\* نویسنده مسئول: محمد خسروی، دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

E-mail: m.khosravi@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

گاز امکان ایجاد اثرات نامطلوب بیولوژیکی را دارند، اما این موضوع به طور کامل ارزیابی نشده است؛ یک شکاف علمی قابل توجه مابین تأثیر آن‌ها بر رشد و عملکرد سیستم ایمنی وجود دارد (Boulé et al, 2018). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که قرار گرفتن مادران به طور مستقیم یا غیر مستقیم در معرض ریزگردها باعث تغییر مکانیسم‌های بیولوژیکی شامل تغییرات اپی‌ژنتیک (Epigenetics)، استرس اکسیداتیو جفت مادر، التهاب، پاسخ نامناسب سیستم ایمنی و عمل کرد نابجای غدد درون-ریز می‌شود (Johnson et al, 2021). در مطالعات طراحی شده ابتدایی برای ارزیابی پتانسیل تراژونیک (Teratogenic)، از مدل حیوانی باردار (موش صحرائی، موش سوری، خرگوش، سگ و میمون) در معرض عوامل محیطی، استفاده می‌کردند و جنین‌ها را تنها از نظر ناهنجاری‌های احشایی و اسکلتی بررسی می‌کردند؛ اما امروزه در حوزه تراژولوژی (Teratology)، دیدگاه عمقی‌تر سبب بررسی تغییرات مولکولی و مکانیسم‌های عملکردی شده است (Cerrizuela et al, 2020). سمیت برای تکوین ایمنی (Developmental immunotoxicity = DIT)، اصطلاحی است که پیامدهای ناشی از آلاینده‌ها با توجه به تکوین سیستم ایمنی را بیان می‌کند. یکی از موارد مهم آن تغییرات اپی‌ژنتیکی مرتبط با دوره جنینی است که علاوه بر این که ریشه رخداد بسیاری بیماری‌ها در دوران بزرگسالی است می‌تواند به نسل‌های بعدی نیز منتقل شود (Dietert et al, 2014). لذا با گسترش فزاینده تکوین سیستم ایمنی در دروان جنینی و بدو تولد، می‌توان بسیاری از بیماری‌های مزمن دوران بزرگسالی را به رویدادهای قبل از تولد ارتباط داد؛ برای مثال اثرات سمی (toxic) فلزات سنگین بلوغ سیستم ایمنی را مختل می‌کند. این امر بیان‌گر اهمیت بررسی سیستم ایمنی دوران نوزادی برای حفاظت از سلامت جامعه است (Dietert et al, 2009). سیتوکین‌ها با تأثیر بر بیان ژن و پاسخ به استرس سلولی، تأثیر بر اپی‌ژنتیک، رشد جفت و رشد جنین، سبب تأثیر بر فنوتیپ متابولیک و سلامت نوزادان می‌شوند (Robertson et al,

می‌باشد (Hahad et al, 2020). تحریک التهاب به دلیل آلاینده‌های متنوع محیطی، می‌تواند سیستم ایمنی موجودات را متأثر نماید و به تبع آن سبب بروز اختلال در عملکرد سیستم ایمنی و بیماری‌های خود ایمن شوند (Puett et al, 2019). سن موجود زنده در هنگام مواجهه شدن با آلاینده‌های استنشاقی نقش مهمی در تعیین میزان تأثیر مخرب آن و ترمیم آسیب ناشی از آن دارد. دوران جنینی ماقبل توسعه کامل دستگاه تنفسی، از جمله زمان‌های تأثیرپذیر ذکر شده است (Dezateux et al, 2004). همچنین، زیان آلاینده‌های موجود در هوا در جنین‌هایی که مادران آن‌ها در معرض آلاینده بوده‌اند، اثبات شده است (Dezateux et al, 1999). در روند استخراج نفت و گاز، ترکیبات آلی فرار و ذرات معلق در هوا منتشر می‌شوند؛ بررسی اطلاعات اپیدمیولوژیک و گردآوری شده حاصل از تحقیق بر حیوانات آزمایشگاهی، شواهدی دال بر ارتباط مستقیم مابین قرار گرفتن مادران باردار در معرض ریزگردها و ناهنجاری‌های تکاملی نوزادان را نشان می‌دهد (World Health Organization, 2005). قابل ذکر است، انتشار زیاده‌های خطرناک مربوط به فرآیندهای استخراج، پالایش و حمل و نقل نفت و گاز، تأسیسات نفتی و خطوط لوله اجتناب‌ناپذیر است (McMullin et al, 2017). ترکیبات غیرمعمول نفت و گاز، به ویژه بنزن و استایرن، بر عملکرد سیستم ایمنی پستانداران تأثیر می‌گذارند (Veraldi et al, 2006). آلاینده‌های نفت و گاز بر رشد سلول‌های سیستم ایمنی تأثیرگذار هستند (Hanson et al, 2012a; Boule et al, 2015b; Esser et al, 2016c; Yamane et al, 2013d). مواد شیمیایی حاصل از نفت و گاز تکامل پاسخ‌های سیستم ایمنی را مختل می‌کنند (McMullin et al, 2017a; Chapman et al, 2016b). پاسخ سیستم ایمنی تحت تأثیر بسیاری از عوامل درون‌زا و برون‌زا، تعدیل‌کننده‌ها و چالش‌ها قرار می‌گیرد (Ng et al, 2006). قرار گرفتن در معرض آلاینده‌های محیطی ممکن است شامل قرار گرفتن مستقیم مادران در زمان بارداری یا پس از تولد نوزادان باشد (Boverhof et al, 2014). مواد شیمیایی حاصل از نفت و

جنوب و با ارائه آنالیز آلاینده‌ها از سوی این شرکت تأمین شد. میزان و درصد ترکیبات موجود در نفت خام از جمله PAHs با ارجاع نمونه به آزمایشگاه‌های مرجع نفت و به روش GC MASS اندازه‌گیری شد. در این ارزیابی از Hewlett Packard 5972A quadruples mass spectrometer و HP5890 gas chromatograph استفاده شد. از ستون کاپیلاری سلیکا و گاز هلیوم به عنوان گاز حامل استفاده شد. میزان لازم نفت جهت تبخیر برای هر دوره، طی مطالعه پایلوت مشخص گردید. همچنین، نفت مورد استفاده برای گروه‌های تیمار در تمام طول پروژه از یک منبع تأمین شده است. میزان بخار ورودی به محفظه با سرعت ۱۲/۵ تا ۱۳ لیتر در دقیقه و فشار ورودی ۲۰ psi تنظیم شد (Cho et al, 2008). از روز اول تشخیص آبستنی روزانه ۵ ساعت موش‌ها در معرض بخار نفت خام قرار گرفتند.

2018). با توجه به نکات ذکر شده، تأثیر مخرب آلودگی محیط زیست و تغییرات جغراسیاست (Geopolitics)، به خصوص آلاینده‌های نفت و گاز در سلامت مادر و جنین آشکار شده است. با این حال، پیامدهای آلودگی محیط زیست بر سلامت جنین و نوزان تازه متولد شده قابل پیش‌بینی نمی‌باشد. در این تحقیق اثرات مستقیم گازهای نفتی بر تکوین و عمل‌کرد اجزای سیستم ایمنی در دوران قبل از تولد جنین و ابتدای نوزادی در رت بررسی شده است.

### مواد و روش کار

جهت قرار دادن حیوانات در معرض آلاینده، یک ویویاریوم (محفظه آلاینده‌گی) طراحی و ساخته شد. این محفظه دارای ورودی بخارات نفت خام، هواکش خروجی و تنظیم کننده میزان رطوبت و دمای محفظه می‌باشد (Figure 1). نفت خام از طریق شرکت ملی مناطق نفت‌خیز



**Figure 1: The vivarium that designed to expose laboratory animals to petroleum vapors. Different parts are marked with numbers, 1) heater with timer, set specified temperature 2) erlen to evaporate crude oil 3) rat cage 4) Entrance door of vivarium chamber 5) Tube for removing of pollutants 6) thermometer 7) Pollutant output fan 8) Output fan timer**

خون‌گیری از سینوس زیر کاسه چشمی، با استفاده از جا به جایی مهره‌های گردنی آسان‌کشی شدند. سپس با ایجاد برش در ناحیه شکم حیوان، شاخ‌های رحم را خارج کرده و بعد از برش آن‌ها، جنین‌ها خارج گردیده و از نظر ناهنجاری‌های ظاهری بررسی شدند. بعد از اندازه‌گیری وزن و CRL، حفره شکمی جنین‌ها باز شده، طحال خارج شد و پس از اندازه‌گیری طول و عرض آن با کولیس دیجیتال، وزن این اندام نیز ثبت شد. نیمی از نمونه‌ها جهت

در این مطالعه از ۳۶ سر موش صحرایی نژاد ویستار در دو گروه کنترل و آلاینده استفاده شد. کلیه مراحل کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی با رعایت حقوق حیوانات زیر نظر کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز با کد EE/99.3.02.69102/scu.ac.ir انجام شده است. نیمی از موش‌های صحرایی آبستن در انتهای آبستنی (روز ۲۰ تا ۲۱)، به وسیله کتامین (۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند و پس از

محیط کشت TSB استریل به تمامی گوده‌ها اضافه شد. چهار گوده به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند؛ به یک گوده ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB و ۵۰ میکرولیتر باکتری *اشریشیا کولی* و به گوده دیگر ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB و ۵۰ میکرولیتر باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* اضافه گردید. به گوده سوم کنترل، ۱۰۰ میکرولیتر PBS و ۵۰ میکرولیتر محیط کشت TSB و در گوده چهارم کنترل ۱۵۰ میکرولیتر از محیط کشت TSB ریخته شد. جذب نوری گوده‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر در زمان صفر اندازه‌گیری شد و پلیت در انکوباتور دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و سپس جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد (Markey et al, 2013). تفاضل جذب نوری هر نمونه در زمان صفر و پس از ۲۴ ساعت انکوبه شدن محاسبه شد. عدد نهایی به عنوان میزان ممانعت از رشد باکتری‌ها در شرایط مذکور در نظر گرفته شد و ما بین گروه‌های مورد آزمون با هم مقایسه شد.

#### ارزیابی فعالیت کمپلمان سرم

برای بررسی مسیر فرعی کمپلمان ۵۰ میکرولیتر از سرم‌های فعال و غیرفعال شده زمان‌های مختلف در میکروتیوب استریل به صورت جداگانه ریخته شدند، سپس ۳۵۰ میکرولیتر از ترکیب PBS محتوی 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> و 0.15 mM CaCl<sub>2</sub> در هر میکروتیوب ریخته شد و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از گلوبول قرمز ۵ درصد (در حجم نهایی یک درصد) شسته شده خرگوش به هر میکروتیوب اضافه گردید و میکروتیوب‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفتند. در ادامه میکروتیوب‌ها با ۳۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند و ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی هر میکروتیوب برداشت شد و در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد به نحوی که در یک ستون سرم فعال یک زمان خاص و در ستون کناری آن سرم غیرفعال همان زمان در گوده‌ها ریخته شد. جهت ارزیابی نیمه کمی میزان تخریب گلوبول‌های قرمز، ۱۰۰ میکرولیتر از گلوبول‌های قرمز ۵ درصد با ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر تخریب شد و به عنوان

انجام مطالعه بافتی در محلول تثبیت کننده بوئن قرار گرفت و نیمه دیگر جهت آزمایشات مولکولی در ویال‌های انجمادی قرار گرفت و بعد از ۲۴ ساعت انجماد در تانک ازت، به فریزر منهای هفتاد درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در تمامی گروه‌ها، زاده‌ها در شرایط طبیعی نگهداری شدند. نوزادان تازه متولد در ۱۵ روزگی، ۳۰ روزگی و ۴۵ روزگی پس از تولد، وزن شدند و پس از بی‌هوشی به روش اشاره شده خون‌گیری از آن‌ها انجام شد. حفره شکمی حیوان باز شد و طحال خارج گردید؛ قسمتی از این طحال‌ها، جهت آزمایشات مولکولی در ویال‌های انجمادی قرار گرفتند و بعد از ۲۴ ساعت انجماد در تانک ازت، به فریزر منهای هفتاد درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

در روز ۱۴ پس از تولد، تزریق ۲۵۰ میکرو لیتر از گلوبول قرمز گوسفند ۱۰ درصد در محلول استریل ۰/۱۵ mol/L NaCl به صورت داخل صفاقی به زاده‌ها انجام شد و در روزهای ۷ و ۱۴ روز پس از تزریق، خون‌گیری جهت ارزیابی عیار آنتی‌بادی‌های ایجاد شده نسبت به آنتی‌ژن‌های تزریقی با روش هم‌آگلوتیناسیون انجام شد (Rasne et al, 2018).

#### ارزیابی ایمنی ذاتی در نوزادان

##### باکتری کشی سرم

ابتدا باکتری‌های *اشریشیا کولی* و *استافیلوکوکوس ارئوس* در محیط TSA به صورت ۴ منطقه‌ای کشت داده شدند و پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ °C قرار داده شدند. پس از مشاهده باکتری‌های رشد کرده، از کلونی‌های هر پلیت با آنس استریل برداشت شد و با PBS استریل مخلوط و کدورت آن به ۱ مک فارلند رسانده شد. در ادامه در پلیت ۹۶ خانه‌ای استریل، ۲۵ میکرولیتر PBS استریل در تمامی گوده‌ها ریخته شد و در ادامه از سرم‌های مورد آزمون ۲۵ میکرولیتر به هر گوده اضافه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر باکتری‌های *اشریشیا کولی* و *استافیلوکوکوس ارئوس* به صورت جداگانه به همه گوده‌ها اضافه شد. پلیت به مدت ۹۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت و ۵۰ میکرولیتر

۰/۱ مولار (pH=۶) به گوده‌ها اضافه شد و در گوده‌های یک ستون هم به عنوان کنترل فقط ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط باکتری و بافر استات سدیم اضافه گردید و در انتها جذب نوری نمونه‌ها در زمان ۱۵ دقیقه و در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد (Saidana et al, 2008). میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم موجود در یک میلی‌لیتر از سرم در هر دقیقه با روش زیر محاسبه گردید. در این فرمول تفاضل میزان جذب نوری اندازه‌گیری شده در زمان صفر از جذب نوری ۱۵ دقیقه پس از واکنش محاسبه شد و میزان سرم مورد استفاده (۲۰ میکرولیتر) با ضرب در ۵۰ به واحد میلی-لیتر تبدیل شده است. حاصل محاسبه در عدد ۱۰۰۰ ضرب می‌شود و جهت تبدیل به واحد فعالیت در دقیقه بر زمان واکنش (۱۵ دقیقه) تقسیم می‌گردد.

$$۱۵ \times ۱۰۰۰ \times ۵۰ \times (\text{میزان جذب نوری در ۱۵ دقیقه} - \text{میزان جذب نوری در زمان صفر}) / ۱۵$$

#### ارزیابی میزان فعالیت میلوپراکسیداز

مقدار ۱۵ میکرولیتر سرم به ۱۳۵ میکرولیتر بافر HBSS اضافه گردید؛ ۲۵ میکرولیتر ۲۰ TMB میلی‌مولار + ۲۵ میکرولیتر  $H_2O_2$  ۲۰ میلی‌مولار به گوده‌های میکروپلیت استریل اضافه شد و بعد از ۲ دقیقه ۵۰ میکرولیتر  $H_2SO_4$  (۴ مولار) به محتویات اضافه گردید. جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد (Malle et al, 2007).

#### ارزیابی فعالیت آنتی‌تریپسینی سرم

میزان ۱۰ میکرولیتر از سرم به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول Tris-HCl (۱۰۰ میکرولیتر از ۵۰ میلی‌مولار pH 8.2) محتوی ۲۰ گرم تریپسین اضافه شد. در نمونه کنترل سرم ۱۰ میکرولیتر از سرم به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول Tris-HCl اضافه شد و در نمونه کنترل مثبت محلول Tris-HCl محتوی ۲۰ گرم تریپسین فاقد سرم بود. نمونه‌ها یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند و پس از آن ۲۰ میکرولیتر از سوبسترای (Na-benzoyl-DL-arginine-p-) BAPNA و nitroanilide HCl با غلظت ۱۰ میلی‌مولار در Tris-HCl

تخریب ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. جهت تهیه استانداردهای تخریب ۰.۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد به ترتیب ۳۷۵، ۲۵۰، ۱۲۵ میکرولیتر از تخریب ۱۰۰ درصد در میکروتیوب ریخته شد و حجم نهایی به ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. در نهایت در طول موج ۴۰۵ نانومتر جذب نوری نمونه‌ها قرائت شد (Inglis et al, 2008).

#### بررسی فعالیت مسیر کلاسیک کمپلمان

آنتی‌بادی واکنش دهنده با گلبول قرمز خرگوش ( $300 \mu\text{g/mL}$ ) در حجم ۵۰۰ میکرولیتر با ۱ mL از گلبول قرمز ۱۰ درصد خرگوش مجاور شد و یک ساعت در دمای آزمایشگاه بر روی شیکر و مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. گلبول‌های قرمز حساس شده، بعد از خارج کردن از یخچال، با PBS شستشو داده شد و محلول رویی آن دور ریخته شد. ۲۵ میکرولیتر از سرم‌های فعال به اضافه ۳۷۵ میکرو لیتر بافر کمپلمان و همچنین ۱۰۰ میکرولیتر گلبول قرمز حساس شده خرگوش ۵ درصد در میکروتیوب ریخته شد و ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. در ادامه میکروتیوب‌ها با ۳۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند و ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی هر میکروتیوب برداشت شد و در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد به نحوی که در یک ستون سرم فعال یک زمان خاص و در ستون کناری آن سرم غیرفعال همان زمان در گوده‌ها ریخته شد و در نهایت جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد. نمودار استاندارد و محاسبه درصد تخریب گلبول‌های قرمز برای هر نمونه مشابه مورد قبل تهیه شد (Inglis et al, 2008).

#### اندازه‌گیری فعالیت لیزوزیم سرم

از سرم‌های مورد آزمون، ۲۰ میکرولیتر در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد به این صورت که سرم‌های فعال هر زمان در یک ستون و در ستون کناری، سرم‌های غیرفعال همان زمان قرار گرفتند. سپس ۸۰ میکرولیتر از مخلوط باکتری میکروکوکوس لایزودیکتیکوس + بافر استات سدیم

**Real-time PCR**

جهت بررسی تأثیر آلاینده‌های نفتی بر تکوین سیستم ایمنی، بیان ژن‌های TNF $\alpha$ ، ایترفرن بتا-1، لفتوتوکسین آلفا (LT $\alpha$ ) و TGF $\beta$  با استفاده از روش Real-time PCR ارزیابی گردید. از ژن بتا-2 میکروگلوبولین به عنوان کالیبراتور استفاده شد. بدین منظور، استخراج RNA با استفاده از روش فنول-کلروفرم-گوانیدین ایزوتیوسیانات و کیت تجاری RNXTM انجام شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت YTA DNA synthesis kit (یکتا تجهیز آزما) و پرایمر oligodt انجام گرفت. نمونه‌های cDNA به منظور انجام واکنش Real Time PCR با استفاده از کیت YTA qPCR master mix kit (یکتا تجهیز آزما) و روش مقایسه‌ای  $\Delta\Delta Ct$  با حداقل 2 تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج براساس فرمول میزان تغییر بیان ژن  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  گزارش شد. نمونه‌های کنترل منفی فاقد cDNA و نمونه کنترل RNA در هر واکنش در نظر گرفته شد. در Table 1 توالی پرایمرهای استفاده شده ذکر شده است.

**نتایج****ترکیبات نفت خام**

در بررسی ترکیبات نفت خام درصد کلی نفتالن 47/56 و درصد هیدروکربن‌های حلقوی آروماتیک 3/98 مشخص شد. نتایج حاصل از این آنالیز در Table 2 ذکر شده است.

محتوی 20 میلی مولار کلرید کلسیم به همه نمونه‌ها اضافه شد. پس از پانزده دقیقه با اضافه نمودن 30 میکرولیتر از اسید استیک 30 درصد واکنش متوقف شد و جذب نوری در طول موج 405 نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد ممانعت از تریپسین با محاسبه تفاضل طول موج نمونه کنترل مثبت فاقد سرم از هر نمونه، تقسیم بر نمونه کنترل مثبت فاقد سرم گزارش شد (Altshuler et al, 2012).

**اندازه‌گیری میزان کلی ایمونوگلوبولین سرم**

جهت ارزیابی میزان کلی ایمونوگلوبولین سرم از روش رسوب با سولفات روی استفاده شد؛ ابتدا بافر 0/7 میلی-مولار سولفات روی تهیه شد و pH آن به 5/8 رسانده شد. سپس در میکروتیوب‌های استریل 12/5 میکرولیتر از سرم-های زمان‌های 15 و 30 و 45 به صورت جداگانه ریخته شد و 850 میکرولیتر از سولفات روی به هر میکروتیوب اضافه و به خوبی مخلوط شدند؛ بعد از 2 ساعت قرار گرفتن در دمای اتاق، 100 میکرولیتر از محلول فوق در میکروپلیت 96 خانه ریخته شد و در طول موج 600 نانومتر جذب نوری قرائت شد (Pompermyer et al, 2019). جهت تهیه نمودار استاندارد میزان کلی ایمونوگلوبولین پس از تهیه رقت‌های دو برابر و به صورت هم‌زمان از سرم استاندارد، مطابق با روش فوق بررسی شدند.

**Table 1: The primer sequences of rat genes for Real Time PCR analysis**

mRNA Target	Forward Primer Sequences 5'→3' Reverse Primer Sequences 5'→3'	
TNF $\alpha$	F: TGCCTCAGCCTCTTCTCATTC R: GCTCCTCCGCTTGGTGGTTT	Sun et al., 2020
IL1b	F:TCCAGGATGAGGACCCAAGC R:TCGTCATCATCCCACGAGTCA	Sun et al., 2020
TGF $\beta$	F: CTTCAGCTCCACAGAGAAGAAGTGC R: CACGATCATGTTGGACAAGTCTCC	Nakagawa et al., 2021
IL10	F: GCAGGACTTTAAGGGTTACTTGG R: GGGGAGAAATCGATGACAGC	O'Bryan et al., 2005
$\beta$ 2M	F: CGAGACCGATGTATATGCTTGC R: GTCCAGATGATTCAGAGCTCCA	Al-Dasooqi et al., 2011
LT $\alpha$	F: CCCAGCCTTATCTGGTTCTCC R: CCTGGAAGCTGAGAAGCGAA	NM_080769.2
IFN $\beta$	F: TGCTGTGCTTCTCCACCCT R: TAGTCTCATTCCACCCAGTGCT	Hubert et al., 2004

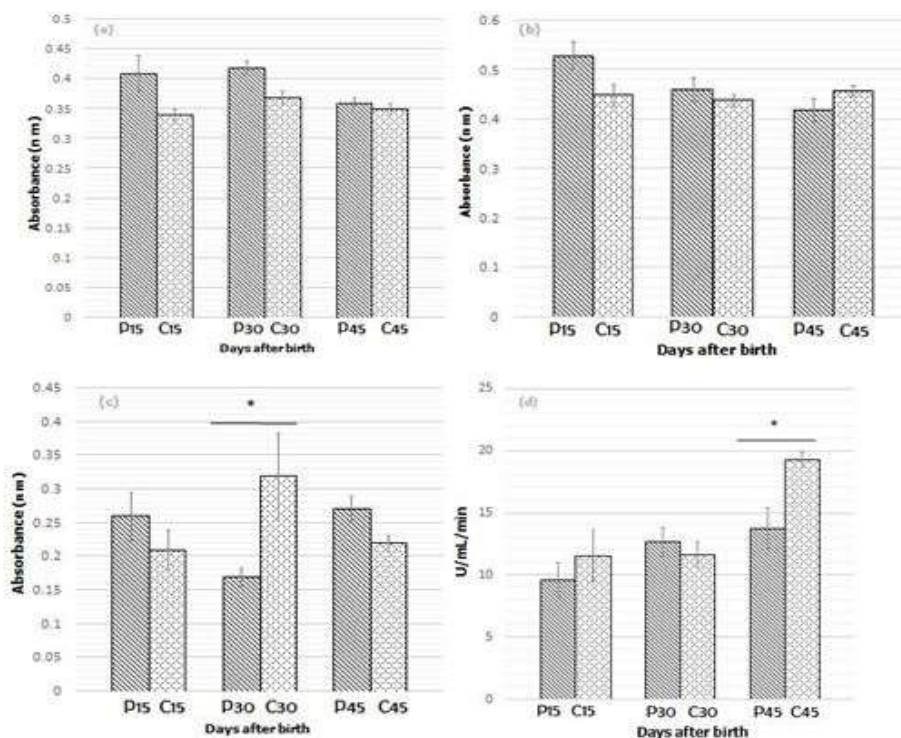
ارزیابی فعالیت ایمنی ذاتی

حدی مشاهده می‌شود. سطح لیزوزیم در هر دو گروه در ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روزگی در شکل Figure 2-c ذکر شده است که در روزهای ۱۵ و ۳۰، تفاوتی مشاهده نشد، ولی در روز ۴۵ با تکوین سیستم ایمنی، کاهش معنی داری در گروه آلاینده نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در بررسی سطح میلوپراکسیداز سرم در تصویر Figure 2-d در روز ۳۰، سطح میلوپراکسیداز به طور معنی داری کاهش یافته است.

فعالیت باکتری کشی سرم بر باکتری استافیلوکوکوس ارئوس در Figure 2-a ذکر شده است. نتایج حاصل حاکی بر این است که در روزهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ تفاوت غیر معنی دار است، اما در روز ۴۵ پس از تولد تفاوت بیش تری مشاهده می‌شود. همچنین فعالیت باکتری کشی باکتری اشریشیاکولی در نمودار Figure 2-b نشان می‌دهد که باکتری کشی سرم، غیر معنی دار است اما در گروه‌های آلوده کاهش پاسخ تا

**Table 2: Analysis of crude oil by gas chromatographic method. The sample entered the column of Selica with a pressure of 60 kg/cm<sup>2</sup> and an injection temperature of 300°C. The ionization power was 70 eV and the multiplier voltage was 1200 eV.**

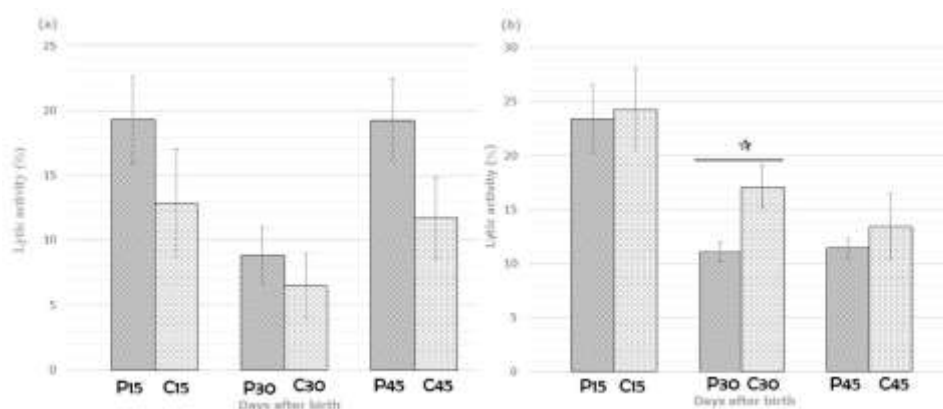
Compound	Concentration (ppm)	Abundant %
Naphthalene	485	3.989816
1-Methyl-Naphthalene	572	4.705515
Biphenyl	97	0.797963
2,6-Dimethyl-Naphthalene	764	6.284988
AcenaphthyJene	11	0.090491
Acenaphthene	9	0.074038
2,3,5-Trimethyl-Naphthalene	528	4.343552
Fluorene	42	0.34551
Phenanthrene	197	1.620606
Anthracene	6	0.049359
1-Methyl-Phenanthrene	145	1.192831
Fluoranthene	3.8	0.03126
Pyrene	12.5	0.10283
Benzo(a)anthracene	6.8	0.05594
Chrysene	29	0.238566
Benzo(k)fluoranthene	2.2	0.018098
Benzo(e)pvrene	3.8	0.03126
Benzo(a)pvrene	1.5	0.01234
Perylene	78	0.641661
Indeno(1,2,3-c,d)pyrene	0.65	0.005347
Dibenzo(a,h)anthracene	1.2	0.009872
Benzo(g,h,i)pervlene	1.5	0.01234
C1-Naphthalenes	1478	12.15865
C2-Naphthalenes	521	4.285967
C3-Naphthalenes	2178	17.91715
C4-Naphthalenes	1141	9.38635
C1-Fluorenes	198	1.628832
C2-Fluorenes	396	3.257664
C3-Fluorenes	451	3.710117
C1-Phenanthrenes	882	7.255706
C2-Phenanthrenes	596	4.902949
C3-Phenanthrenes	218	1.79336
C4-Phenanthrenes	378	3.109588
C1-Fluoranthenes	59	0.485359
C1-Chrysenes	63	0.518265
C2-Chrysenes	221	1.81804
C3-Chrysenes	237	1.949663
C4-Chrysenes	142	1.168152
Total PAHs	2996.95	3.989816



**Figure 2:** The serum bactericidal activity against *Escherichia coli* (a) and *Staphylococcus aureus* (b), as well as the activity of lysozyme (c) and serum myeloperoxidase (d) in neonatal rats exposed to petroleum gas pollutants (p) or in the control group (c) during the fetal period of 15, 30, and 45 Days. The asterisk (\*) sign indicates the statistically significant difference between groups.

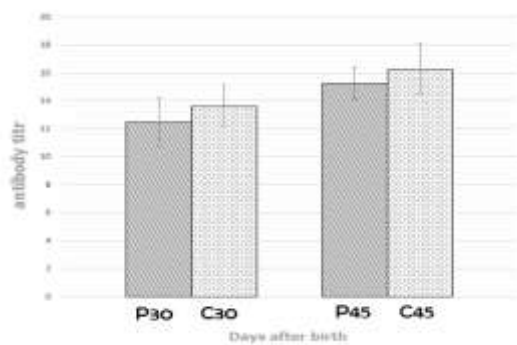
روزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ نوزادی نشان داد که گروه در معرض آلاینده نسبت به گروه کنترل کاهش سطح نشان داد اما در روز ۳۰ این کاهش به صورت معنی دار است. کاهش غیرمعنی دار در فعالیت آنتی‌تریپسینی گروه آلاینده در مقایسه با گروه کنترل در کلیه زمان‌های مورد بررسی مشاهده شد (Figure 4).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر با توجه به نمودار Figure 3-a بیان‌گر کاهش مشخص و غیرمعنی دار مسیر کمپلمان کلاسیک در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ پس از تولد در گروه‌های در معرض آلاینده به نسبت گروه کنترل است. نتایج حاصل از بررسی مسیر کمپلمان فرعی نمودار Figure 3-b در دو گروه مورد مطالعه در معرض آلاینده و گروه کنترل، در



**Figure 3:** The activity of the classic (a) and alternative (b) pathways of the complement system in neonatal rats exposed to petroleum gas pollutants during the fetal period. The letter P represents the pollutant group, and the letter C represents the control group. The results of the evaluation are presented at different time points, including 15, 30, and 45 days. The asterisk (\*) sign indicates the statistically significant difference between groups.

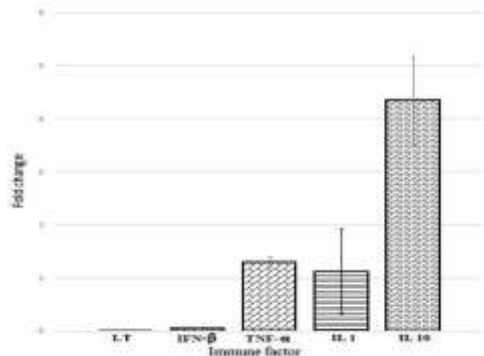




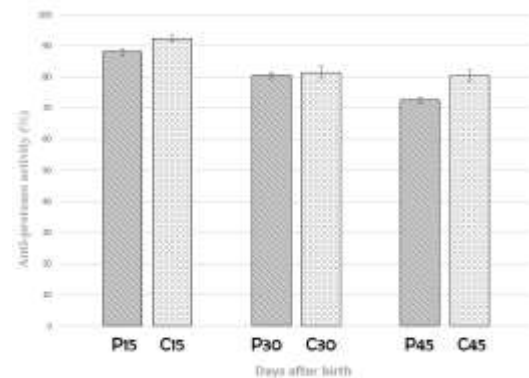
**Figure 6: The anti-sheep red blood cells antibody titer of the neonate rats which exposed to petroleum gas pollutant during fetus period. The letter P represents the pollutant group and the letter C represents the control group. The results of evaluation are presented in different ages including 30 and 45 days.**

#### بیان ژن‌های سیستم ایمنی

سنجش بیان فاکتورهای مرتبط با تکوین و فعالیت سیستم ایمنی در طحال جنین ۲۰ روزه در Figure 7 مشاهده می‌شود. اما سطح بیان لنفوتوکسین و ایترفرون بسیار پایین است. اما میانگین سطح بیان فاکتور نکروز توموری آلفا و ایترلوکین ۱ نسبتاً افزایش نشان داده است. افزایش زیاد سطح ایترلوکین ۱۰ نسبت به گروه کنترل گویای سرکوب فعالیت سیستم ایمنی جنین‌های تحت تأثیر آلاینده گازی نفت است. در تصویر Figure 8 میانگین بیان فاکتورهای سیستم ایمنی در زاده‌های ۱۵ و ۳۰ روزه سنجش شده است. افزایش نسبی فاکتور نکروز توموری و ایترلوکین ۱ و ۱۰ نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود. فاکتور نکروزی تومور الفا و فاکتور رشد تغییر دهنده بتا نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌داری مابین روزهای ۱۵ و ۳۰ نوزادی افزایش یافته‌اند.



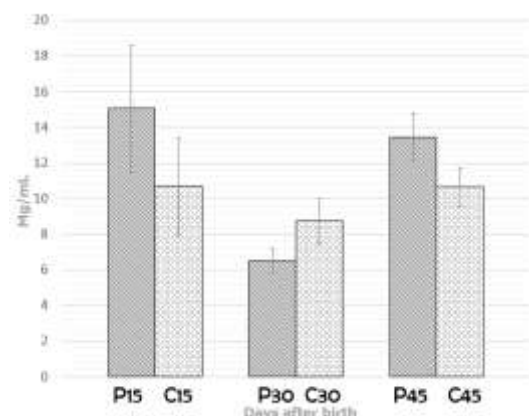
**Figure 7: The fold expression changes of the genes related to activity and development of the immune system in fetus rats which exposed to petroleum gas pollutant.**



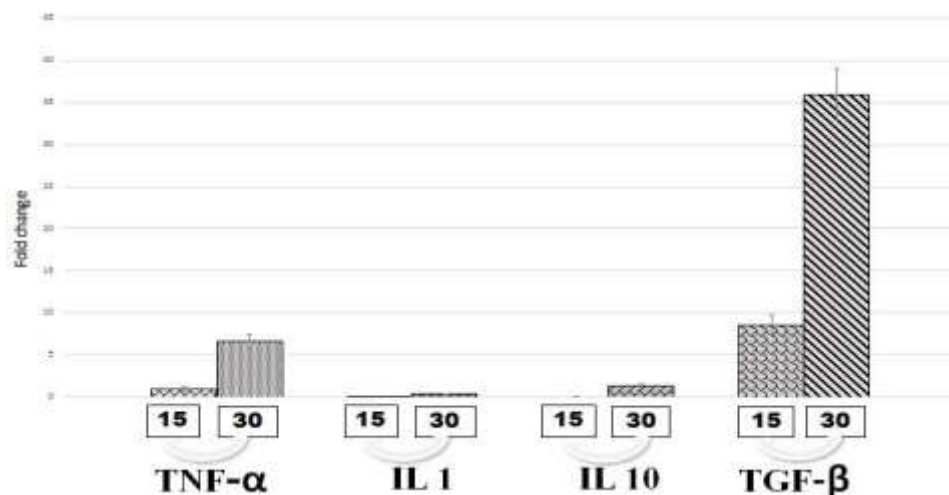
**Figure 4: The serum anti-trypsin activity in neonate rats which exposed to petroleum gas pollutant during fetus period. The letter P represents the pollutant group and the letter C represents the control group. The results of evaluation are presented in different ages including 15, 30 and 45 days.**

#### ارزیابی ایمنی هومورال

میزان تام ایمنوگلوبولین‌های سنجش شده در ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روزگی پس از تولد غیرمعنی‌دار است؛ اما تفاوت در ۱۵ روزگی مشهودتر است. در روزهای ۱۵ و ۴۵ افزایش نسبی ایمنوگلوبولین‌ها در گروه آلاینده به نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (Figure 5). نتایج به دست آمده در Figure 6 بیان‌گر کاهش عیار آنتی‌بادی گروه در معرض آلاینده نسبت به گروه کنترل است.



**Figure 5: Serum total immunoglobulin levels of the neonate rats which exposed to petroleum gas pollutant during fetus period. The letter P represents the pollutant group and the letter C represents the control group. The results of evaluation are presented in different ages including 15, 30 and 45 days.**



**Figure 8: The fold expression changes of the genes related to activity and development of the immune system in neonate rats which exposed to petroleum gas pollutant during fetus period.**

### بحث

و افزایش حساسیت به عفونت، لوسمی، افزایش انواع سرطان می‌شوند. نتایج کنونی در بررسی بر روی نوزاد مادران مواجه شده با آلاینده‌های نفتی در مطابقت با مطالعات ذکر شده می‌باشد. مکانیسم اثرات آلاینده‌های نفت خام بر سیستم ایمنی به طور کامل شناخته نشده است، اما مکانیسم‌هایی پیشنهاد شده است که در برگیرنده تأثیر هیدروکربن‌های آروماتیک نفت بر تحریک گیرنده‌های آریل هیدروکربن می‌باشند. در اثر این تحریک، فاکتورهای رونویسی سیتوزولی فعال می‌شوند و سبب تغییر در الگوی بیان ژن‌های مربوطه می‌شوند (Salaberria et al, 2014).

Laffon و همکاران در سال ۲۰۱۳، هفت سال پس از فاجعه نشت نفتکش پرستز، کاهش قابل توجهی در تعداد سلول‌های کشنده طبیعی خون در یک گروه در معرض نفت خام در مقایسه با یک گروه بدون مواجهه گزارش کردند. مطالعه‌ای که توسط Kirkeleit و همکاران در سال ۲۰۰۸ در ۱۰۰ نفر از ساکنین مناطق بندر کراچی تحت تأثیر نشت نفت از کشتی به گل نشسته صورت گرفت؛ نتایج نشان داد که در افراد مناطق مربوطه، میزان لنفوسیت و ائوزینوفیل افزایش اندکی داشته است.

در مطالعه‌ای دیگر، Kirkeleit و همکاران در سال ۲۰۰۶ به بررسی تغییرات مولکولی و سلول‌های سیستم ایمنی در

مطالعات ایمونوتوکسیکولوژیک اثرات نفت خام در اغلب موارد روی ماهی و سایر موجودات دریایی (از جمله سخت پوستان) تمرکز داشته‌اند که دلیل آن پراکندگی شیمیایی و مکانیکی نفت خام در اقیانوس‌ها است. در مواردی اثرات نفت خام بر تعدیل پاسخ‌های سیستم ایمنی ماهی به سیستم ایمنی بدن انسان نسبت داده شده است که با توجه به تفاوت گونه‌ای قابل توجه، صحت آن مورد شک است. در چندین مطالعه از گورخرماهی به عنوان حیوان مدل در محیط آزمایشگاهی استفاده شده است (Langenau et al, 2003). در مطالعه‌ای که توسط Perrichon و همکاران در سال ۲۰۲۱ بر روی ماهی‌های هالیبوت اقیانوس اطلس انجام شد، اثرات تراژوژنی نفت خام شامل نقائص قلبی، نقص در جمجمه و صورت مشاهده شد. در این مطالعه ارتباط مستقیم ایجاد ناهنجاری با میزان در معرض آلاینده‌های نفت خام قرار گرفتن به خصوص در سنین رویانی مشاهده شد. McLoone در سال ۲۰۲۱ ذکر نموده است انسان‌هایی که در نزدیکی مکان‌های اکتشاف نفت هستند، با توجه به میزان قرارگیری در معرض آلاینده‌های نفتی دچار ضایعاتی از قبیل کم خونی، آتروفی غدد لنفاوی، ناهنجاری ژنی در سلول‌های ایمنی، کاهش تعداد گلبول‌های سفید، کاهش سطح لیپوزیم، تعدیل بیان ژن سیتوکین

مطالعه تغییر در بیان ژن‌های مورد بررسی مشاهده شد. با توجه نقش این ژن‌ها در شکل‌گیری اندام‌های لنفاوی و ایجاد پاسخ‌های ایمنی مؤثر می‌توان تأثیر مخرب آلاینده‌های نفتی بر پاسخ‌های سیستم ایمنی نوزادان حاصل از مادران مواجه با بخارات نفتی را تأیید نمود. تأثیر ترکیبات هیدروکربنی چندحلقه‌ای آروماتیک در حضور سلول‌های استرومایی مغز استخوان سبب القا آپوپتوز در سلول‌های پیش‌ساز لنفوسیت B می‌شود چرا که متابولیت‌های تولید شده در برخورد سلولی سبب این اثر توکسیک می‌شوند (Allan et al, 2003). در بررسی van Grevenynghe و همکاران در سال ۲۰۰۵ مشخص شد ترکیبات PAH سبب اختلال در تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز به رده‌های مختلف از شامل رده‌های زاینده گلبول قرمز، پلاکت و ماکروفاژ می‌شوند؛ همانند سایر مطالعات گیرنده آریل هیدروکربن (AhR) نقش اساسی در این تأثیرات دارد به نحوی که ترکیبات آنتاگونیست این گیرنده تا حدودی سبب جلوگیری از این اثرات مضر شدند (van Grevenynghe et al, 2005). هر چند در سال ۲۰۱۶ در مطالعه Rondelli و همکاران این تأثیر را وابسته به Cyp1b1 دانسته‌اند و AhR را در این روند بی‌تأثیر دانسته‌اند. مکانیسم معرفی شده در تأثیر ترکیبات هیدروکربنی چند حلقوی شامل فعال‌سازی آنزیم‌ها از طریق AhR، تغییر در DNA سلول، ایجاد استرس اکسیداتیو، افزایش کلسیم داخل سلولی و کاهش فعالیت NFkB می‌باشد (Novosad et al, 2002). طبق بررسی Hersikorn در سال ۲۰۱۰، افزایش مرگ و میر بچه قورباغه‌ها در اثر برخورد با غلظت کم اسیدهای نفتی در آزمایشگاه مشاهده شد. در این پژوهش غلظت‌های مختلف بررسی شد و نتایج نشان داد در مراحل اول رویانی برخورد با غلظت‌های اندک نیز می‌تواند سبب افزایش تا ۵۰ درصدی مرگ و میر شود. در سال ۲۰۰۷ نیز Peters و همکاران به این نتیجه رسیدند که لارو ماهیان در معرض اسیدهای نفتی به طور قابل توجهی کوچک‌تر بودند. در پژوهشی که توسط Gillian در سال ۲۰۱۲ بر روی ماهی قزل آبی رنگین کمان صورت گرفت، سرکوب سیستم

کارگران یکی از سکوه‌های نفتی دریایی نروژ پرداختند. نتایج آن مطالعه حاکی از ارتباط معنی‌دار کاهش میزان IgM، IgA و TCD4<sup>+</sup> با میزان بنزن خون بود. به رغم کاهش غیرمعنی‌دار پاسخ ایمنی هومورال نوزادان نسبت به آنتی‌ژن گلبول‌های قرمز گوسفند، افزایش غیرمعنی‌داری در میزان ایمنوگلوبولین تام گروه آلاینده مشاهده شد؛ این مشاهدات احتمال تأثیر آلاینده بر تمایز سلول‌های Th و کاهش نسبت Th1/Th2 را مشخص می‌نماید. Lotorova و Kenessariyev در سال ۲۰۱۰ در تحقیقی که بر روی ساکنین برزوکا قزاقستان، در ۵ کیلومتری میدان نفتی کاراچانگ، نشان داد، میزان بروز بیماری‌های عفونی و آلرژی نسبت به جمعیت روستای الکساندرو که در ۵۰ کیلومتری میدان نفتی کاراچانگ واقع شده دارای تفاوت معنی‌داری است. درصد ابتلا به بیماری‌های عفونی در جمعیت برزوکا ۴۳/۷ درصد در مقابل الکساندرو که ۲۳/۳ درصد بود؛ بیماری آلرژی در برزوکا ۲۴/۲ درصد در مقابل ۹/۵ درصد الکساندور بود. علاوه بر این، عملکرد فاگوسیتیک سلول‌های بیگانه‌خوار خون محیطی در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافته بود. تعداد لنفوسیت‌های TCD4<sup>+</sup> دارای افزایش ۱/۳ برابر و لنفوسیت TCD8<sup>+</sup> دارای افزایش ۱/۷ برابر بوده است. همچنین در افراد مبتلا به سندرم عفونی در Berezovka در مقایسه با افرادی از جمعیت گروه کنترل، محققان پیشنهاد کردند که زندگی در نزدیکی میدان نفتی کاراچانگ با باعث تغییر پاسخ سیستم ایمنی و بروز تظاهرات بالینی مانند عفونت و آلرژی شده است (Lotorova and Kenessariyev, 2010). بسیاری از PAHها، گیرنده‌ها (AHR) را تحریک می‌کنند، فاکتورهای رونویسی سیتوزولی فعال با لیگاند که در تنظیم ژن نقش دارند. رونویسی و پاسخ بیولوژیکی به لیگاندها، از جمله PAHs. AHR نتیجه در معرض قرار گرفتن است. به دنبال قرار گرفتن در معرض نفت خام، تنظیم آنزیم‌های متابولیزه کننده بیگانه مانند سیتوکروم P450، افزایش در فعالیت سیتوکروم P450 1A1 رخ می‌دهد (Salaberria et al, 2014). در بررسی ژن‌های جنین‌های گروه آلاینده در این

اثرات سمی بیش‌تر بر کلیه اجزای ایمنی ذاتی و اکتسابی نسبت به پستاندارن یافت شده است (Reynaud and Deschaux 2006a; Dezateux et al, 2004). در سال ۲۰۱۶ Bluhm و همکاران، سوخت‌های زیستی اتیل لولینات (EL-2)، متیل تتراهیدروفوران (۲-MTHF) و ۲-متیل فوران (MF-۲) را از نظر سمیت حاد جنینی و امکان تراژونیسیته آن‌ها با استفاده از آزمون سمیت برای جنین ماهی (FET) بررسی نمودند. در این مطالعه دو سوخت فسیلی (دیزل و بنزین) و یک سوخت زیستی تثبیت شده (متیل استر روغن کلزا) به عنوان مرجع مورد بررسی قرار گرفتند. آزمون FET در بررسی‌های سم‌شناسی به طور گسترده‌ای انجام می‌شود. این مطالعه بر روی گورخرماهی *Danio rerio*، یک مدل مناسب برای پیش‌بینی تراژونیسیته در انسان، انجام شد. این مطالعه، سمیت حاد بالاتری برای EL (LC50: 83) در مقایسه با MTHF (LC50: 2980)، MF (LC50: 405) و دیگر بخش‌های سوخت‌های مرجع مانند گازوئیل (LC50: 244) (برحسب میلی‌گرم در لیتر) گزارش شد. علاوه بر این، EL تأثیر آماری معنی‌داری بر رشد سر داشت که منجر به افزایش طول سر در جنین‌های گورخرماهی شده بود.

در مجموع می‌توان عنوان نمود، بخار ناشی از آلاینده‌های نفتی دارای اثر مخرب و چشم‌گیری بر کلیه پاسخ‌های سیستم ایمنی ذاتی، هومورال و سلولی زاده‌های مادران مجاور شده با این ترکیبات هستند. تغییر بیان ژن‌های مؤثر بر تکامل اندام‌های لنفاوی، در مطابقت با وقوع ناهنجاری‌های ذکر شده در سنین مختلف است. همچنین، افزایش بیان ژن‌های التهابی و سرکوب‌گر پاسخ‌های سیستم ایمنی، گویای تغییر بنیادین وضعیت تکامل سلول‌های ایمنی در نوزادان می‌باشد. مکانیسم دخیل بر این تأثیرات و بررسی راه‌های کاهش این تأثیرات مخرب می‌تواند در مطالعات آینده بررسی گردد.

ایمنی ماهیان در معرض اسیدهای نفتی مشاهده شد. بنزوپیرن موجود در نفت خام می‌تواند عامل کاهش لنفوسیت‌های T، لنفوسیت‌های B، ترومبوسیت‌ها، سلول‌های میلوئید خون و بافت‌های لنفاوی باشد. با توجه به تغییر سطح سیتوکاین‌های حاصل از مطالعه کنونی، نتایج مشابهی در این مطالعه را می‌توان متذکر نمود. Robinson و همکاران در سال ۱۹۹۷، مطابق با نتایج این مطالعه تغییر در پاسخ ایمنی هومورال نسبت به گلبول قرمز گوسفند، در موش‌های صحرائی مجاور شده با بخارات نفتی به مدت ۲ هفته را غیرمعنی‌دار گزارش نمودند، گرچه کاهش لنفوسیت‌های T و B نیز مشاهده شده بود. Kawabata و White در سال ۱۹۹۰، نشان داد قرار گرفتن موش‌ها در معرض نفتالین، منجر به کاهش پاسخ سلول‌های تولیدکننده آنتی‌بادی می‌شود. التهاب آلرژیک در اثر ذرات آلاینده هوا افزایش می‌یابد که ممکن است نقش مهمی در افزایش شیوع و عوارض آسم داشته باشند. مطالعات تجربی در انسان و حیوانات نشان داده است که برخورد با ریزگردهای آگروز موتورهای دیزل، عامل تحریک، پاسخ‌های القایی آلرژیک است؛ تولید IgE، اثر بر تولید سیتوکین و کموکاین و همچنین فعال شدن ماکروفاژها، تغییر بیان سیتوکاین‌ها و تحریک سلول‌های مخاطی از دیگر جنبه‌های قابل ذکر است (Nel et al, 1998). افزایش سیتوکاین‌های التهابی و سرکوب‌کننده سیستم ایمنی در مطالعه کنونی مشاهده شده است؛ این مشاهدات دال بر تحریک التهاب و تأثیر آلاینده بخارات نفتی بر تمایز سلول‌های Th2 و سرکوب پاسخ‌های سیستم ایمنی است. پیش از این تأثیر هیدروکربون‌ها که از متابولیت‌های بنزن می‌باشد و در محیط‌های نفتی وجود دارد بر سرکوب پاسخ‌های التهابی، فعالیت ماکروفاژها، بیان سلکتین‌ها و تکثیر لنفوسیت‌ها ذکر شده است (Cho, 2008). همچنین، در بررسی تأثیر ترکیبات کربوهیدراتی آروماتیک چندحلقه‌ای بر سیستم ایمنی شواهدی مبنی بر

## تشکر و قدردانی

نویسندگان از شرکت ملی مناطق نفت خیز جنوب جهت همکاری در تهیه نمونه‌های نفت تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی ندارند.

## منابع مالی

منابع مالی این پژوهش در قالب بودجه پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین شده است.

## منابع

- Al-Dasooqi, N., Bowen, J. M., Gibson, R. J., Logan, R. M., Stringer, A. M., & Keefe, D. M. (2011). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in a rat model of irinotecan-induced mucositis. *Chemotherapy*, 57(1), 43-53.
- Allan, L. L., Mann, K. K., Matulka, R. A., Ryu, H. Y., Schlezinger, J. J., & Sherr, D. H. (2003). Bone marrow stromal-B cell interactions in polycyclic aromatic hydrocarbon-induced pro/pre-B cell apoptosis. *Toxicological Sciences*, 76(2), 357-365.
- Altshuler, A. E., Penn, A.H., Yang, J. A., Kim, G. R., Schmid-Schönbein G. W. (2012). Protease activity increases in plasma, peritoneal fluid, and vital organs after hemorrhagic shock in rats. *PLoS One*, 7(3):e32672.
- Bluhm, K., Seiler, T. B., Anders, N., Klankermayer, J., Schaeffer, A., & Hollert, H. (2016). Acute embryo toxicity and teratogenicity of three potential biofuels also used as flavor or solvent. *Science of the total environment*, 566, 786-795.
- Boule, L. A., Burke, C. G., Fenton, B. M., Thevenet-Morrison, K., Jusko, T. A., Lawrence, B. P. (2015). Developmental activation of the AHR increases effector CD4+ T cells and exacerbates symptoms in autoimmune disease-prone Gnaq<sup>+/-</sup> mice. *Toxicological Sciences*, 148(2), 555-566
- Boulé, L. A., Chapman, T. J., Hillman, S. E., Kassotis, C. D., O'Dell, C., Robert, J., Lawrence, B. P. (2018). Developmental exposure to a mixture of 23 chemicals associated with unconventional oil and gas operations alters the immune system of mice. *Toxicological Sciences*, 163(2), 639-654.
- Boverhof, D. R., Ladics, G., Luebke, B., Botham, J., Corsini, E., Evans, E., Yang, Y. (2014). Approaches and considerations for the assessment of immunotoxicity for environmental chemicals: a workshop summary. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 68(1), 96-107.
- Cerrizuela, S., Vega-Lopez, G. A., & Aybar, M. J. (2020). The role of teratogens in neural crest development. *Birth Defects Research*, 112(8), 584-632.
- Chapman, T. J., & Georas, S. N. (2014). Regulatory tone and mucosal immunity in asthma. *International immunopharmacology*, 23(1), 330-336.
- Cho, J. Y. (2008). Suppressive effect of hydroquinone, a benzene metabolite, on in vitro inflammatory responses mediated by macrophages, monocytes, and lymphocytes. *Mediators of inflammation*, 2008.
- Dezateux, C., Lum, S., Hoo, A. F., Hawdon, J., Costeloe, K., & Stocks, J. (2004). Low birth weight for gestation and airway function in infancy: exploring the fetal origins hypothesis. *Thorax*, 59(1), 60-66.
- Dezateux, C., Stocks, J., Dundas, I., & Fletcher, M. E. (1999). Impaired airway function and wheezing in infancy: the influence of maternal smoking and a genetic predisposition to asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 159(2), 403-410.
- Dietert, R. R. (2009). Developmental immunotoxicology: focus on health risks. *Chemical research in toxicology*, 22(1), 17-23.
- Dietert, R. R. (2014). Developmental immunotoxicity, perinatal programming, and noncommunicable diseases: focus on human studies. *Advances in medicine*, 2014.
- Esser, C. (Ed.). (2016). Environmental influences on the immune system (pp. 1-17). Vienna, Austria: Springer.
- Hahad, O., Lelieveld, J., Birklein, F., Lieb, K., Daiber, A., & Münzel, T. (2020). Ambient air pollution increases the risk of cerebrovascular and neuropsychiatric disorders through induction of inflammation and oxidative stress. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4306.

- Hanson, M. L., Holásková, I., Elliott, M., Brundage, K. M., Schafer, R., & Barnett, J. B. (2012). Prenatal cadmium exposure alters postnatal immune cell development and function. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 261(2), 196-203.
- Hubert, F. X., Voisine, C., Louvet, C., Heslan, M., & Josien, R. (2004). Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+ CD11b- OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *The Journal of Immunology*, 172(12), 7485-7494.
- Inglis, J. E., Radziwon, K. A., Maniero, G. D. (2008). The serum complement system: a simplified laboratory exercise to measure the activity of an important component of the immune system. *Advances in Physiology Education*, 32(4), 317-312
- Johnson, N. M., Hoffmann, A. R., Behlen, J. C., Lau, C., Pendleton, D., Harvey, N., Zhang, R. (2021). Air pollution and children's health—a review of adverse effects associated with prenatal exposure from fine to ultrafine particulate matter. *Environmental health and preventive medicine*, 26(1), 1-29.
- Kawabata, T. T., White Jr, K. L. (1990). Effects of naphthalene and naphthalene metabolites on the in vitro humoral immune response. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 30(1), 53-67.
- Kirkeleit, J., Riise, T., Bratveit, M., & Moen, B. E. (2008). Increased risk of acute myelogenous leukemia and multiple myeloma in a historical cohort of upstream petroleum workers exposed to crude oil. *Cancer Causes & Control*, 19(1), 13-23.
- Kirkeleit, J., Ulvestad, E., Riise, T., Bratveit, M., Moen, B. E. (2006). Acute suppression of serum IgM and IgA in tank workers exposed to benzene. *Scandinavian Journal of Immunology*, 64(6), 690-698.
- Laffon, B., Aguilera, F., Ríos-Vazquez, J., García-Lestón, J., Fuchs, D., Valdíglesias, V., Pasaro, E. (2013). Endocrine and immunological parameters in individuals involved in Prestige spill cleanup tasks seven years after the exposure. *Environment international*, 59, 103-111.
- Langenau, D. M., Traver, D., Ferrando, A. A., Kutok, J. L., Aster, J. C., Kanki, J. P., ... & Look, A. T. (2003). Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science*, 299(5608), 887-890.
- McLoone, P., Dyussupov, O., Nurtlessov, Z., Kenessariyev, U., & Kenessary, D. (2021). The effect of exposure to crude oil on the immune system. Health implications for people living near oil exploration activities. *International Journal of Environmental Health Research*, 31(7), 762-787.
- MacDonald, G. Z., Hogan, N. S., Köllner, B., Thorpe, K. L., Phalen, L. J., Wagner, B. D., & Van Den Heuvel, M. R. (2013). Immunotoxic effects of oil sands-derived naphthenic acids to rainbow trout. *Aquatic toxicology*, 126, 95-103.
- Maione, M., Mocca, E., Eisfeld, K., Kazepov, Y., & Fuzzi, S. (2021). Public perception of air pollution sources across Europe. *Ambio*, 50(6), 1150-1158.
- Malle, E., Furtmüller, P. G., Sattler, W., & Obinger, C. (2007). Myeloperoxidase: a target for new drug development? *British Journal of Pharmacology*, 152(6), 838-854.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., & Maguire, D. (2013). *Clinical veterinary microbiology e-book*. Elsevier Health Sciences.
- McLoone, P., Dyussupov, O., Nurtlessov, Z., Kenessariyev, U., & Kenessary, D. (2021). The effect of exposure to crude oil on the immune system. Health implications for people living near oil exploration activities. *International Journal of Environmental Health Research*, 31(7), 762-787.
- McMullin, T., Bamber, A., Flores, J., Vigil, D., & Van Dyke, M. (2017). Assessment of Potential Public Health Effects from Oil and Gas Operations in Colorado. Colorado Department of Public Health and Environment. [http://accdan.org/assets/FULL\\_REPORT-CDPHE\\_Study.pdf](http://accdan.org/assets/FULL_REPORT-CDPHE_Study.pdf).
- McMullin, T., Bamber, A., Flores, J., Vigil, D., & Van Dyke, M. (2017). Assessment of Potential Public Health Effects from Oil and Gas Operations in Colorado. Colorado Department of Public Health and Environment. [http://accdan.org/assets/FULL\\_REPORT-CDPHE\\_Study.pdf](http://accdan.org/assets/FULL_REPORT-CDPHE_Study.pdf).
- Nakagawa, M., Karim, M. R., Izawa, T., Kuwamura, M., & Yamate, J. (2021). Immunophenotypical characterization of M1/M2 macrophages and lymphocytes in cisplatin-induced rat progressive renal fibrosis. *Cells*, 10(2), 257.
- Nel, A. E., Diaz-Sanchez, D., Ng, D., Hiura, T., & Saxon, A. (1998). Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102(4), 539-554.
- Ng, S. P., Silverstone, A. E., Lai, Z. W., & Zelikoff, J. T. (2006). Effects of prenatal exposure to cigarette smoke on offspring tumor susceptibility and associated immune mechanisms. *Toxicological Sciences*, 89(1), 135-144.
- Novosad, J., Fiala, Z., Borska, L., & Krejsek, J. (2002). Immunosuppressive effect of polycyclic aromatic hydrocarbons by induction of apoptosis. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 45(4).

- O'Bryan, M. K., Gerdprasert, O., Nikolic-Paterson, D. J., Meinhardt, A., Muir, J. A., Foulds, L. M., & Hedger, M. P. (2005). Cytokine profiles in the testes of rats treated with lipopolysaccharide reveal localized suppression of inflammatory responses. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(6), R1744-R1755.
- Oertelt-Prigione, S. (2012). The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmunity Reviews*, 11(6-7), A479-A485.
- Perrichon, P., Donald, C. E., Sørhus, E., Harboe, T., & Meier, S. (2021). Differential developmental toxicity of crude oil in early life stages of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Science of the Total Environment*, 770, 145349.
- Peters, L. E., MacKinnon, M., Van Meer, T., van den Heuvel, M. R., & Dixon, D. G. (2007). Effects of oil sands process-affected waters and naphthenic acids on yellow perch (*Perca flavescens*) and Japanese medaka (*Orizias latipes*) embryonic development. *Chemosphere*, 67(11), 2177-2183.
- Pompermayer E, De La Corte FD, Rubin MI. Zinc sulphate turbidity as a screening test of passive transfer of immunity in newborn foals. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2019;47(1).
- Puett, R. C., Yanosky, J. D., Mittleman, M. A., Montresor-Lopez, J., Bell, R. A., Crume, T. L., Liese, A. D. (2019). Inflammation and acute traffic-related air pollution exposures among a cohort of youth with type 1 diabetes. *Environment international*, 132, 105064.
- Rasne, A., Sonwane, V., Somani, R., & Kumthekar, P. (2018). Evaluation of immunomodulatory activity of protocatechuic acid. *J Res Notes*, 1, 1007.
- Reynaud, S., & Deschaux, P. (2006). The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquatic toxicology*, 77(2), 229-238.
- Robertson, S. A., Chin, P. Y., Femia, J. G., & Brown, H. M. (2018). Embryotoxic cytokines—Potential roles in embryo loss and fetal programming. *Journal of Reproductive Immunology*, 125, 80-88.
- Robinson, S. N., Shah, R., Wong, B. A., Wong, V. A., & Farris, G. M. (1997). Immunotoxicological effects of benzene inhalation in male Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, 119(3), 227-237.
- Rondelli, C. M., Larsen, M. C., N'jai, A., Czuprynski, C. J., & Jefcoate, C. R. (2016). PAHs target hematopoietic lineages in bone marrow through Cyp1b1 primarily in mesenchymal stromal cells but not AhR: A reconstituted in vitro model. *Stem Cells International*, 2016.
- Saidana, D., Mahjoub, M. A., Boussaada, O., Chriaa, J., Chéraif, I., Daami, M., Helal, A. N. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of volatile compounds of *Tamarix boveana* (Tamaricaceae). *Microbiological Research*, 163(4), 445-455.
- Salaberria, A. M., Labidi, J., & Fernandes, S. C. (2014). Chitin nanocrystals and nanofibers as nano-sized fillers into thermoplastic starch-based biocomposites processed by melt-mixing. *Chemical Engineering Journal*, 256, 356-364.
- Salaberria, I., Brakstad, O. G., Olsen, A. J., Nordtug, T., & Hansen, B. H. (2014). Endocrine and AhR-CYP1A pathway responses to the water-soluble fraction of oil in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 77(9-11), 506-515.
- Smits, J. E., Hersikorn, B. D., Young, R. F., & Fedorak, P. M. (2012). Physiological effects and tissue residues from exposure of leopard frogs to commercial naphthenic acids. *Science of the total environment*, 437, 36-41.
- Sun, H., He, X., Tao, X., Hou, T., Chen, M., He, M., & Liao, H. (2020). The CD200/CD200R signaling pathway contributes to spontaneous functional recovery by enhancing synaptic plasticity after stroke. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 1-15.
- van Grevenynghe, J., Bernard, M., Langouet, S., Le Berre, C., Fest, T., & Fardel, O. (2005). Human CD34-positive hematopoietic stem cells constitute targets for carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(2), 693-702.
- Veraldi, A., Costantini, A. S., Bolejack, V., Miligi, L., Vineis, P., & van Loveren, H. (2006). Immunotoxic effects of chemicals: A matrix for occupational and environmental epidemiological studies. *American Journal of Industrial Medicine*, 49(12), 1046-1055.
- World Health Organization. (2005). Effects of air pollution on children's health and development: a review of the evidence.
- Wu, B. (2019). Introductory chapter: new theory and technology in early clinical embryogenesis. In *Embryology-theory and practice*. IntechOpen.
- Yamane, H., & Paul, W. E. (2013). Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD 4+ T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunological Reviews*, 252(1), 12-23.

Received: 30.05.2022

Accepted: 04.07.2022

## Immunotoxicity study of crude oil gaseous pollutants in development of the rat embryonic and neonates' development

Hassan Salehvand<sup>1</sup>, Mohammad Khosravi<sup>2\*</sup>, Kaveh Khazaeil<sup>3</sup>, Mohammad Reza Tabandeh<sup>4</sup> and Zahra Basir<sup>3</sup>

<sup>1</sup> PhD Student of Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

<sup>4</sup> Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 30.05.2022

Accepted: 04.07.2022

### Abstract

Environmental pollution, especially oil and gas pollutants, has devastating effects on maternal and fetal health. In this study, the direct effects of petroleum gases on the development and function of the immune system during prenatal and neonatal periods in rats were investigated. Pregnant rats (N=36) were divided into two groups: one exposed to pollutants and one serving as the control group. The group of pollutants was exposed to oil vapors in the vivarium compartment for 5 hours per day starting from the first day of pregnancy. Fetal spleen samples were taken on day 20 of embryonic life to investigate the expression of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interferon beta-1 (IFN- $\beta$ 1), alpha lymphotoxin (LT- $\alpha$ ), and Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) genes. The total serum immunoglobulins and antibody titer to sheep red blood cells were evaluated when the neonates were 45 days old. Innate immune responses were investigated in terms of serum bactericidal, lysozyme, myeloperoxidase, anti-protease, and complement activity. The expression of the mentioned genes in newborns was also evaluated at the ages of 15 and 30 days compared to the control group. The results indicated a significant decrease in the activity of lysozyme, complement, and myeloperoxidase, as well as a non-significant reduction in the serum bactericidal activity and humoral immune response of the pollutant group compared to the control group. The expression levels of LT- $\alpha$  and IFN- $\beta$ 1 were reduced, while the expressions of TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-10 were elevated in the embryos exposed to pollutants. An age-related increase in TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 was observed in the offspring of the pollutant group. In conclusion, petroleum vapors have been shown to have a destructive and significant effect on the innate, humoral, and cellular immune responses of fetuses and neonates. The mechanisms involved in these destructive effects can be investigated in future studies.

**Key words:** Crude oil pollutants, Immunotoxics, Fetus, Neonate, Development

---

\* **Corresponding Author:** Mohammad Khosravi, Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran  
E-mail: m.khosravi@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).