DOI: 10.22092/vj.2019.126931.1596
شماره ۱۲۸ پاییز ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی آزمایشگاهی اثر سایتوتوکسیسیتی آفلاتوکسین‌های B1 و G1 برروی لنفوسیت‌های T موشی

• نازنین کیخا
گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، اصفهان، ایران
• نوشین سهرابی (نویسنده مسئول)
گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
• مرتضی تقی زاده
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۵-۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۶-۱۶
Email: : nsohrabi75@yahoo.com

چکیده

آفلاتوکسین‌ها ترکیبات شیمیائی سمی مشتق از قارچ هستند که توسط سویه‌هایی از قارچ آسپرژیلوس تولید می‌شوند. این مطالعه با هدف جداسازی آفلاتوکسین‌های ناشی از آسپرژیلوس‌های مولد آفلاتوکسین جداشده ازخوراك دام و بررسی سمیت سلولی (سایتوتوکسیسیتی) آن‌ها برروی رده سلولی لنفوسیت T موش انجام شده است. در این تحقیق از قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس (*Aspergillus flavus*) و آسپرژیلوس پارازیتیکوس(*Aspergillus parasiticus*) استاندارد و جدا شده از خوراک دام استفاده شد. قابلیت تولید آفلاتوکسین توسط این سویه‌ها به روش‌های کیفی (TLC) و کمی (HPLC) مورد بررسی قرارگرفت. سپس رده سلولی لنفوسیت T موش (EL۴) درمواجهه با غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین قرار گرفت و میزان توکسیسیتی آن به روش MTT اندازه‌گیری شد. میزان سلول‌های کشته شده نیز به روش فلوسایتومتری ارزیابی شد. بیشترین میزان تولید آفلاتوکسین G1 و B1 در سویه استاندارد آ. پارازیتیکوس و آ. فلاووس جدا شده از خوراک دام و بیشترین میزان توکسی سیتی آفلاتوکسین‌های فوق در رقت ۰/۱ از آفلاتوکسین مشتق از آ. پارازیتیکوس مشاهده شد. نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که سویه‌های آسپرژیلوس جدا شده از خوراک دام قابلیت تولید آفلاتوکسین‌های G1 و B1 رادارند که اثر کشندگی قابل ملاحظه‌ای بر روی رده لنفوسیتی T موش نشان دادند که این امر می‌تواند بیانگر اهمیت حفظ سلامت و بهداشت غذای دام باشد.

کلمات کلیدی: آسپرژیلوس، آفلاتوکسین، سایتوتوکسیسیتی، خوراك دام، لنفوسیت T

Veterinary Researches & Biological Products No 128 PP: 140-148

The In-vitro Cytotoxicity Effect of Aflatoxins B1 and G1 on Mice T lymphocyte

By: Keikha, N., Department of Biochemistry, Payame Noor University, Tehran, Iran. Sohrabi, N., (Corresponding Author) Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran. and Taghizadeh, M., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extention Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2019-07-23 **Accepted: 2019-09-07**

Email: : nsohrabi75@yahoo.com

Aflatoxins are chemical toxic metabolites which are produced by *Aspergillus* species. This study was designed to investigate the aflatoxines cytotoxicity effects on mice T lymphocyte. In this work, four different standard and feed derived strains of *A. parasiticus* and *A. flavus* were selected. The levels of G1 and B1 aflatoxins were determined by TLC and HPLC methods. For evaluation of cytotoxity effect, the different concentration of aflatoxins were mixed by mice T cell line (EL4) on different time and the percentage of cell death were been evaluated by MTT assay and flowcytometry (FCM) method. Among different strains, the standard *A. parasiticus* and feed derived *A. flavus* have highest levels of G1 and B1. The most cytotoxity effect were seen on 1/10 concentration of *A. parasiticus* extracted aflatoxins. These results shown feed derived *Aspergillus* could produce G1 and B1 aflatoxins which have considerable cytotoxicity effect on mice T lymphocytes.

Keyword: *Aspergillus*, Aflatoxin, Cytotoxicity , Cattle feed, T lymphocyte

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها (mycotoxins) متابولیت‌های ثانویه سمی قارچ‌های رشته‌ای هستند که به طور طبیعی طیف وسیعی از محصولات گیاهی ،غلات ونهایتا" غذای دام ها را در سراسر جهان آلوده می کنند. شرایط محیطی به همراه رطوبت و دمای مطلوب در علوفه و غلات آلوده به قارچ‌های رشته‌ای می‌تواند منجر به تولید این گروه توکسین‌ها شود که سلامت غذای انسان وحیوان را تحت تاثیر خود قرار می‌دهد (۴ ,۲۳). یکی از مهم‌ترین انواع مایکوتوکسین‌ها، آفلاتوکسین‌ها می‌باشند که توسط قارچ‌های خانواده آسپرژیلوس تولید می‌شوند. آفلاتوکسین‌ها گروهی از مواد سرطان‌زای طبیعی هستند که با آلوده کردن مواد غذائی مختلف انسانی وحیوانی باعث اثرات مخرب بر روی اندام‌ها و سلول‌های مختلف بدن می‌شوند ودر ایجاد و گسترش بیماری‌های عفونی و سرطان (به خصوص سرطان کبد) نقش مهمی دارند (۲۲, ۳, ۱۱). آفلاتوکسین‌های *G2*, *G1*, *B2*, *B1* مهم‌ترین گروه توکسین‌هایی می‌باشند که تهدید کننده سیستم بهداشت غذائی محسوب می‌شوند (۲۲).

آفلاتوکسین *B1* (*AFB1*) غالب ترین وسمی ترین متابولیت در این خانواده می‌باشد و معمولا" در غذاهای آلوده به ارگانیسم‌هائی نظیر آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس یافت می‌شود. مواجهه با *AFB1* باعث ایجاد بیماری‌هائی نظیر سرطان کبدی، سرکوب و تضعیف سیستم ایمنی، سقط جنین و عوارض شدید در زمان تولد می‌گردد (۲۲, ۱۷). آفلاتوکسین *B1* توسط سیتوکروم کبدی P450 3A4 فعال می‌شود و به متابولیت فعال خود (فرم اکسید) تبدیل می‌گردد. سپس به سرعت به DNA، به ویژه ژن سرکوبگر سرطان (P53) متصل و نقش مستقیم در ایجاد سرطان‌های کبد و کلیه اعمال می‌کند (۱۷). فرم فعال آفلاتوکسین B۱ با باز گوانین پیوند کووالانسی برقرار می‌کند وهمچنین باعث تبدیل گوانین به تیمین وتغییر توالی‌های DNA و آسیب به DNA یا ایجاد جهش و در نهایت تشکیل سلول‌های سرطانی (۱۷).

اغلب اطلاعات مربوط به اثر سمی آفلاتوکسین B1 بر سیستم ایمنی از مطالعات حیوانی بدست آمده است. مطالعات قبلی نشان داده است که آفلاتوکسین B1 باعث سرکوب عملکرد سیستم ایمنی می‌شود و بر روی پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال تاثیر می‌گذارد (۷,۱۶). مصرف رژیم غذای حاوی آفلاتوکسین B1 به مدت یک هفته، باعث کاهش درصد سلول‌های T CD8+ و سلول‌های کشنده طبیعی CD3− CD8a+ طحال می‌گردد(۱۲). در نتیجه تجویز آفلاتوکسین B1 با دوز مشخص، تعداد سلول‌های TCD3+ روده‌ای موش کاهش نشان داد(۲۱). علاوه براین گزارش شده که مصرف رژیم حاوی آفلاتوکسین B1 در جوجه ، منجر به کاهش در صد لنفوسیت‌های TCD4+ و CD8+ T در خون محیطی، تیموس و طحال می‌شود (۲۵).

آفلاتوکسین G1 نیز که به دلیل ایجاد رنگ سبز در زیرنور UV، به این نام خوانده می‌شود، از جمله مهم‌ترین آفلاتوکسین‌های بیماری‌زا برای انسان و حیوانات شناخته می‌شود که قارچ‌های مولد آن برروی غلات و مواد غذایی یافت می‌شوند (۸).

بررسی سمیت مواد شیمیایی برروی رده‌های سلولی به وسیله روش‌های مختلف کمی وکیفی صورت می‌گیرد که ازجمله معمول‌ترین این روش‌ها می‌توان به روش MTT اشاره نمود. اساس این آزمون برمبنای احیای رنگ MTT [۳-(۴, ۵-dimethylthiazolyl-۲)-۲,۵-diphenyltetrazolium bromide] به فورمازان می‌باشد. استفاده از روش فلوسایتومتری و بررسی فنوتایپ و تغییر اندازه سلول‌های مجاورشده با مواد شیمیائی نیز به عنوان یکی از روش‌های معرفی شده برای تغییرات سلولی معرفی شده است.

به دلیل اهمیت زیاد سموم مختلف آفلاتوکسین و آسیب‌هایی که بر روی سیستم ایمنی موجودات مختلف وارد می‌کند و باتوجه به مطالعات قبلی درزمینه جداسازی سویه‌های آسپرژیلوس مولد آفلاتوکسین مستخرج از خورام، هدف از این مطالعه بررسی اثرات سایتوتوکسیسیته آفلاتوکسین‌های استخراج شده از خوراک دام برروی رده سلولی T موش می‌باشد.

مواد و روش‌کار

جداسازی و کشت گونه‌های آسپرژیلوس از خوراک دام

در این تحقیق از سویه‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس جدا شده از نمونه‌های خوراک دام(ذرت) که در مطالعه قبلی جداسازی و مورد بررسی‌های مولکولی قرار گرفته بودند، استفاده شد.(۱۵, ۲۰). با توجه به نتایج به دست آمده ازمطالعه قبلی ، ابتدا از بین ۶۰ نمونه آسپرژیلوس، ۹ نمونه آسپرژیوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس مولد آفلاتوکسین جدا شد و نمونه‌های قارچی جدا شده در محیط کشت اختصاصی عصاره مخمرساکروز آگار (YES) و عصاره سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) به مدت یک هفته قرارگرفتند. کشت‌های مذکور از نظر ویژگی‌های ماکروسکوپی کلنی شامل شکل، رنگ، میزان رشد، حالت کلنی مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج آفلاتوکسین از سویه‌های قارچی و بررسی کمی و کیفی آنها

نمونه‌هایی کشت اختصاصی عصاره مخمرساکروز آگار (YES) و عصاره سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) کشت داده شد و در دمای ۲۵ درجه که در غربالگری اولیه شناسایی شده بودند در لوله‌های آزمایش حاوی محیط PDA به صورت شیب‌دار کشت و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا کاملاً اسپورزایی صورت گیرد.

برای استخراج آفلاتوکسین از روش شیمیایی با کمی تغییرات استفاده شد و سپس بوسیله روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) مورد ارزیابی اولیه قرار گرفت (۱۵). به منظور بررسی کمی میزان آفلاتوکسین تلید شده توسط سویه‌های مورد ارزیابی، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور هر یک از نمونه‌های استخراج شده به همراه نمونه کنترل منفی به اینژکتور تزریق شده و سطح زیر منحنی مربوط به توکسین‌های B1 و G1 با دستگاه محاسبه گردید. از طریق مقایسه سطح زیر منحنی نمونه‌های تزریق شده و استانداردها با احتساب ضریب رقت، مقدار توکسین هر نمونه تعیین شد.

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی آفلاتوکسین B1 و G1 بر روی لنفوسیت‌های T موش

در این مطالعه به منظور بررسی فنوتیپ و عملکرد لنفوسیت‌های T، از سلول EL۴ (رده سلولی لنفوما موش) استفاده شد. پس از تکثیر لنفوسیت‌ها در محیط RPMI حاوی FBS (۵٪) ، شمارش سلولی انجام شد و میزان ۱۰۵ از سلول‌های فوق به هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت سلول انتقال داده شد.

سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های ۱/. و ۰۱/. و ۰۰۱/. میگروگرم/ میلی‌لیتر از آفلاتوکسین مستخرج از نمونه‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس جدا شده از خوراک دام و رقت‌های ۰/۱ ، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۱ ، ۰/۰۰۰۰۱ میکروگرم/ میلی‌لیتر از نمونه‌های استاندارد آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس به هر چاهک اضافه شد. در چاهک‌هایی که به منظور کنترل منفی درنظر گرفته شده بود، از محیط کشت بدون آفلاتوکسین و برای کنترل مثبت از PHA استفاده شد. بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و

جدول ۱- مقادیر حاصل از اندازه گیری آفلاتوکسین های مستخرج از سویه های آسپرژیلوس استاندارد و جدا شده از خوراک دام

	میزان آفلاتوکسین تولید شده بر مبنای ppb (یک قسمت در یک بیلیون)			
	آفلاتوکسین B1	آفلاتوکسین B2	آفلاتوکسین G1	افلاتوکسین G2
آ. پارازیتیکوس استاندارد	۷۰۷/۹	۴/ ۸	۸۰۶/ ۵	۷
آ. فلاووس استاندارد	۱۰۸/۸	ND	۱۴۹	۱/۳
آ. پارازیتیکوس جداشده	۰/۵۳	ND	۰/۶	ND
آ. فلاووس جداشده	۰/۸۵	ND	۱/۱	ND

انکوبه گردید. در ادامه بعد از سانتریفوژ پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰، مایع‌رویی خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO (۱مولار) به هرکدام از چاهک‌ها افزوده شد و در ادامه جذب نوری هرکدام از نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی آفلاتوکسین B1 و G1 بر روی لنفوسیت‌های موشی به روش فلوسایتومتری

به منظور بررسی میزان کشندگی آفلاتوکسین B1 و G1 برروی لنفوسیت‌های موشی از روش فلوسایتومتری استفاده شد. برای این منظور سلول‌های کشت داده شده در مرحله قبل که با آفلاتوکسین مجاور شده بودند به لوله‌های فلوسایتومتری منتقل شدند و بوسیله دستگاه FACSCalibur خوانده شد. نمودار پراکنش نوری جمعیت لنفوسیتی بوسیله نرم‌افزار Flowjo ترسیم و تفسیر شد.

نتایج

جداسازی و کشت نمونه‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس مولد آفلاتوکسین

با توجه به مطالعات قبلی ۹ نمونه قارچی از سویه‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس که مولد آفلاتوکسین بودند جدا شده و پس از یک هفته کشت در محیط‌های اختصاصی YES و PDA، از نظر خصوصیات ماکروسکوپی بررسی شدند و کلنی‌های متفرقه از مطالعه حذف گردیدند. تمام کلنی‌های بدست آمده با خصوصیات سویه آسپرژیلوس پارازیتیکوس و آسپرژیلوس فلاووس تطا بق داشتند(شکل ۱).
بعد از گذشت ۱۰ روز از کشت نمونه‌ها برای بررسی وجود یا عدم وجود آفلاتوکسین با روش TLC بروی این ۹ نمونه انجام شد. لکه‌های فلورسنت ایجاد شده روی کاغذ TLC (سیلیکا ژل) موید حضور آفلاتوکسین می‌باشد. نتایج نشان داد که از بین سویه‌های انتخاب شده، ۴ نمونه (۲ نمونه استاندارد و ۲ نمونه جدا شده از خوراک دام) قابلیت تولید لکه فلورسنت را دارند که این امر موید قابلیت این نمونه‌ها در تولید آفلاتوکسین است. در ادامه و جهت تعیین نوع توکسین تولید شده آزمون HPLC برروی نمونه‌های مورد نظر انجام شد. برمبنای نتایج بدست آمده، تمام سویه‌های آسپرژیلوس مورد مطالعه دارای قدرت تولید آفلاتوکسین‌های G1 و B1 بودند. در نتیجه سویه استاندارد آسپرژیلوس پارازیتیکوس و آسپرژیلوس فلاووس جدا شده از خوراک دام که بالاترین میزان آفلاتوکسین B1 و G1 را تولید می کردند (به ترتیب ۷۰۷/۹ و ۰/۸۵ ppb برای AFB1 و ۸۰۶/۵ و ۱/۱ PPb برای AFG1) برای ادامه مطالعه انتخاب شد (شکل ۲ و جدول ۱).

بررسی اثر سیتوتوکسیسیته آفلاتوکسین B1 و G1 برروی لنفوسیت‌های T موش

برای این منظور پس از مجاورت سلول‌های کشت داده شده با غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین به مدت ۲۴ ساعت، از روش MTT برای بررسی حیات و تکثیر سلول استفاده شد.

همان‌گونه که در شکل ۳ مشخص است، تمامی غلظت‌های آفلاتوکسین مستخرج از سویه استاندارد آسپرژیلوس پارازیتیکوس برروی لنفوسیت T اثر سایتوتوکسیسیتی نشان دادند که بیشترین میزان مرگ میر سلول در غلظت ۰/۱ آفلاتوکسین و در عرض ۴۸ ساعت مشاهده شد (۰/۰۹۸ ± ۰/۲۴۸) که با سایر گروه‌ها و کنترل منفی اختلاف معنی‌داری نشان داد.
در مورد آفلاتوکسین مستخرج از نمونه آسپرژیلوس فلاووس جدا شده از خوراک دام نیز تمامی غلظت‌های آفلاتوکسین در مقایسه با گروه کنترل برروی لنفوسیت‌ها اثر کشندگی نشان داد که بیشترین میزان مرگ میر سلول در غلظت ۰/۱ و در عرض ۲۴ ساعت مشاهده شد (۰/۲۱۳ ± ۰/۳۳۴) (شکل ۴).
نتایج فلوسایتومتری لنفوسیت‌های T موشی مواجه شده با آفلاتوکسین نشان داد که در مقایسه با نمونه کنترل منفی که بیشتر از ۹۰ ٪ سلول‌ها در ناحیه انتخاب شده (Gating) قرارگرفته اند، تنها حدود ۵۲٪ از لنفوسیت‌های فوق در مواجهه با غلظت ۰/۱ از مخلوط آفلاتوکسین B1 و G1 و حدود ۶۷٪ در مجاورت غلظت ۰/۰۱، دارای اندازه و گرانول طبیعی لنفوسیتی بودند. این نتایج نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های موجود در ناحیه انتخاب شده کاهش یافته است که درصد کاهش نشان‌دهنده سلول‌هایی است که کشته شده و از ناحیه انتخاب شده خارج شده‌اند (شکل ۵).

بحث

مصرف مواد غذایی آلوده به آفلاتوکسین یک مشکل شایع در انسان و حیوانات در سراسر جهان به ویژه در کشورهای فقیر است. زیرا دراین کشورها فرایند برداشت، پردازش و ذخیره‌سازی مواد غذایی، ضعیف است و امکان آلودگی قارچی در آن‌ها وجود دارد. آفلاتوکسین‌ها اثرات مخرب شناخته شده‌ای بر روی ارگان‌های مختلف بدن دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به ایجاد انواع مختلف سرطان، خصوص سرطان کبد، اشاره کرد. علاوه براین گزارش شده که آفلاتوکسین مسئول سرکوب ایمنی هومورال و سلولی و در نتیجه افزایش احتمال ابتلای افراد به بیماری‌های عفونی است (۲۲, ۸) .
مطالعات مختلفی برای ارزیابی اثرات آفلاتوکسین‌ها برروی سیستم ایمنی انجام شده است. اغلب این مطالعات نشان داده‌اند که آفلاتوکسین B1 (AFB1) برروی لنفوسیت‌های T و B اثر می‌گذارد و ضمن ممانعت از تکثیر این سلول‌ها، باعث مهار پاسخ‌های ایمنی سلولی می‌شود. علاوه براین اثرات مهاری این توکسین بروی عملکرد سلول‌های کشنده طبیعی (NKC) نیز گزارش شده است. آفلاتوکسین B1 ضمن کاهش تعداد ماکروفاژها، باعث ممانعت از اعمال این سلول‌ها مانند فاگوسیتوز می‌شود (۱۳).
برطبق مطالعات انجام شده، گزارش شده که اثرات آفلاتوکسین B1 برروی سیستم ایمنی وابسته به دوز و زمان تجویز آن است. این توکسین می‌تواند منجر به کاهش لنفوسیت‌های T و B شود و در دوزهای بالا می‌تواند منجر به افزایش تولید IL-1 و IL-6 و پاسخ‌های التهابی می‌شود (۵).
مطالعات قبلی نشان داده‌اند که بیشترین تاثیر AFB1 بر روی سیستم ایمنی سلولی بوده است و این توکسین می‌تواند باعث کاهش تکثیر

لـنفوسیت‌ها و میزان تولید سایتوکاین‌ها بشود (۱, ۹, ۲۴). علاوه براین یکی دیگراز قابلیت‌های آفلاتوکسین B۱، القای تولید متابولیت‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌باشدکه برروی فرایندهای رشد، تنظیم و سیگنالینگ سلولی اثرات مخربی به جای می‌گذارد (۱۸, ۶).

مصرف رژیم غذایی حاوی 0.6 mg/kg از آفلاتوکسین AFB۱ در جوجه‌ها باعث کاهش برخی از زیر رده‌های لنفوسیت T شده و میزان بیان سایتوکان‌های IFN-γ, IL-17, IL-10, IL-6, IL-4, IL-2 و TNF را در مخاط دئودونوم، ژژنوم و ایلئوم کاهش می‌دهد و در نتیجه عملکرد سیستم ایمنی مخاطی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۷). در مطالعه مشابه دیگری که برروی آفلاتکسین M1 انجام شده است، گزارش شد که تجویز داخل صفاقی ۲۵ , ۵۰ g/kg از AFM1 به موش‌های Balb/C، منجر به مهار پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی می‌شود (۱۹).

علاوه براین، گزارش شده که استفاده مکرر از AFB1 موجب افت تعداد لنفوسیت‌های T CD۳ و درنتیجه تضعیف ایمنی سلولی می‌شود که این مورد می‌تواند باکاهش سطح مقاومت حیوان نسبت به بیماری‌های عفونی همراه باشد(۲۱). در نتیجه تحریك همزمان ماکروفاژهای صفاقی موشی با LPS و مواجهه این سلول‌ها با AFB1، قدرت کشندگی و میزان سایتوکاین‌های IL-6، TNF-α و IL-1 تولید شده توسط این سلول‌ها کاهش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد (۱۴). کشت همزمان ماکروفاژها با آفلاتوکسین‌های B1 و B2 و G1 موجب تغییرسایتوکاین‌های ترشحی شده و درعین حال میزان IL-6 (به عنوان یك سایتوکاین التهابی) را افزایش داده است (۲).

طبق مطالعه انجام شده توسط لونگو و همکارانشان، آفلاتوکسین‌ها در مقادیری بالاتراز حد آستانه، اثرات بیولوژیکی خود برروی پاسخ‌های ایمنی را نشان می‌دهند.به طوری که در نتیجه مواجهه رده سلولی لنفوسیت T انسانی با آفلاتوکسین B1 و M1، میزان تکثیر این سلول‌ها کاهش داشته ولی تاثیر چندانی برروی میزان بیان mRNA سایتوکاین‌های IL-2 و IFN-γ نداشته است (۱۰).

در این تحقیق به بررسی اثر آفلا توکسین در غلظت‌های مختلف روی سلول EL۴ موش انجام شد که با بررسی نتایج حاصل، مشخص شد که آفلاتوکسین در تمامی غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۰۰۰۰۱ اثر کشندگی بر روی سلول‌های T موش (EL۴) دارد. ولی چون تحقیق مشابهی در این زمینه مشاهده نشده بود مقایسه نتایج امکان‌پذیر نبود . با توجه به اینکه مطالعه مقادیر ناچیز و یا منفی از آفلاتوکسین‌های B۲ و G۲ در نمونه آسپرژیلوس فلاووس استاندارد و جدا شده از خوراک دام وجود داشت لذا این گونه نتیجه گرفته شد که در نبود B۲ و G۲ اثر کشندگی هر دو نمونه بسیار قابل توجه بود.

بالاترین مقدار آفلاتوکسین تولید شده در بین ۴ نمونه مورد بررسی مربوط به سویه استاندارد آسپرژیلوس پارازیتیکوس بوده است که میزان کل آن ۱۵۲۶/۲ PPb و بیشترین سمیت سلولی آن در غلظت ۰/۱ بود.

نتایج به دست امده در این تحقیق نشان داد که سویه‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس جدا شده از خوراک دام قابلیت تولید آفلاتوکسین‌های G1 و B1 را دارند که اثر کشندگی قابل ملاحظه‌ای بر روی سلول‌های T موش داشتند که این امر می‌تواند بیانگر اهمیت حفظ سلامت و بهداشت غذای دام باشد.

منابع مورد استفاده

1- Abbes, S., Ben Salah-Abbes, J., Abdel-Wahhab, M.A., Ouslati, R. 2010. Immunotoxicological and biochemical effects of aflatoxins in rats prevented by Tunisian montmorillonite with reference to HSCAS. *Immunopharmacology and Immunotoxicology,* 32(3):514-522.

2- Bruneau, J.C., Stack, E., O'Kennedy, R., Loscher, C.E. 2012. Aflatoxins B (1), B (2) and G (1) modulate cytokine secretion and cell surface marker expression in J774A.1 murine macrophages. *Toxicology in Vitro,* 26(5):686-93.

3- Eaton, D.L., Gallagher, E.P. 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology,* 34:135-72.

4- Gnonlonfin, G.J., Hell, K., Adjovi, Y., Fandohan, P., Koudande, D.O., Mensah, G.A. 2013. A review on aflatoxin contamination and its implications in the developing world: a sub-Saharan African perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 53(4):349–65.

5- Hinton, D.M., Myers, M.J., Raybourne, R.A., Francke-Carroll, S., Sotomayor, R.E., Shaddock, J., Warbritton, A., Chou, M.W. 2003. Immunotoxicity of aflatoxin B1 in rats: effects on lymphocytes and the inflammatory response in a chronic intermittent dosing study. *Toxicological Sciences*, 73(2):362-77.

6- Hou, Y.J., Zhao, Y.Y., Xiong, B., Cui, X.S., Kim, N.H., Xu, Y.X., Sun, S.C. 2013. Mycotoxin-containing diet causes oxidative stress in the mouse. *PLoS One,* 8(3):e60374.

7- Jiang, M., Peng, X., Fang, J., Cui, H., Yu, Z., Chen, Z. 2015. Effects of aflatoxin b1 on T-cell subsets and mRNA expression of cytokines in the intestine of broilers. *International Journal of Molecular Sciences,* 16(4):6945-59.

8- Kumar, P., Mahato, D.K., Kamle, M., Mohanta, T.K., Kang, S.G. 2017. Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *Frontiers in microbiology,* 7:2170.

9- Lewis, C., Smith, J., Anderson, J., Freshney, R. 1999. Increased cytotoxicity of food borne mycotoxins toward human cell lines in vitro via enhanced cytochrome P450 expression using the MTT bioassay. *Mycopathologia*, 148(2):97-102.

10- Luongo, D., Russo, R., Balestrieri, A., Marzocco, S., Bergamo, P., Severino, L. 2013. In vitro study of AFB1 and AFM1 effects on human lymphoblastoid Jurkat T-cell model. *Journal of Immunotoxicology,* 11:353–358.

11- Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S., Severino, L. 2018. Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. *Toxins* (Basel), 10(6). pii: E214

12- Meissonnier, G.M., Pinton, P., Laffitte, J., Cossalter, A.M., Gong, Y.Y., Wild, C.P., Bertin, G., Galtier, P., Oswald, I.P. 2008. Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. *Toxicology and Applied Pharmacology,* 231(2):142-9.

13- Mohsenzadeh, M.S., Hedayati, N., Riahi-Zanjani, B., Karimi, G. 2016. Immunosuppression following dietary aflatoxin B1 exposure: a review of the existing evidence. *Toxin Reviews,* 35:121–127.

14- Moon, E.Y., Rhee, D.K., Pyo, S. 1999. In vitro suppressive effect of aflatoxin B1 on murine peritoneal macrophage functions. *Toxicology*, 133(2-3):171-9.

15- Rahimi, S., Sohrabi, N., Ebrahimi, M.A., Tebyanian, M., Taghizadeh, M. 2016. Studying the effect of aflatoxin genes Aflp and Aflq on Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus in the cattle feed used in industrial animal husbandries. *Acta Medica Mediterranea,* 32(6):2091-2100.

16- Raisuddin, S., Singh, K.P., Zaidi, S.I., Paul, B.N., Ray, P.K. 1993. Immunosuppressive effects of aflatoxin in growing rats. *Mycopathologia*, 124(3):189-94.

17- Rushing, B.R., Selim, M.I. 2019. Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology,* 124:81-100.

18- Shen, H., Shi, C., Shen, Y.I., Ong, C. 1996. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1. *Free Radical Biology & Medicine,* 21(2):139-146.

19- Shirani, K., Zanjani, B.R., Mahmoudi, M., Jafarian, A.H., Hassani, F.V., Giesy, J.P, Karimi G. 2018. Immunotoxicity of aflatoxin M1 : as a potent suppressor of innate and acquired immune systems in a subacute study. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 98(15):5884-5892.

20- Sohrabi, N., Taghizadeh, M. 2018. Molecular identification of aflatoxigenic Aspergillus species in feedstuff samples. *Current Medical Mycology,* 4(2):1-6.

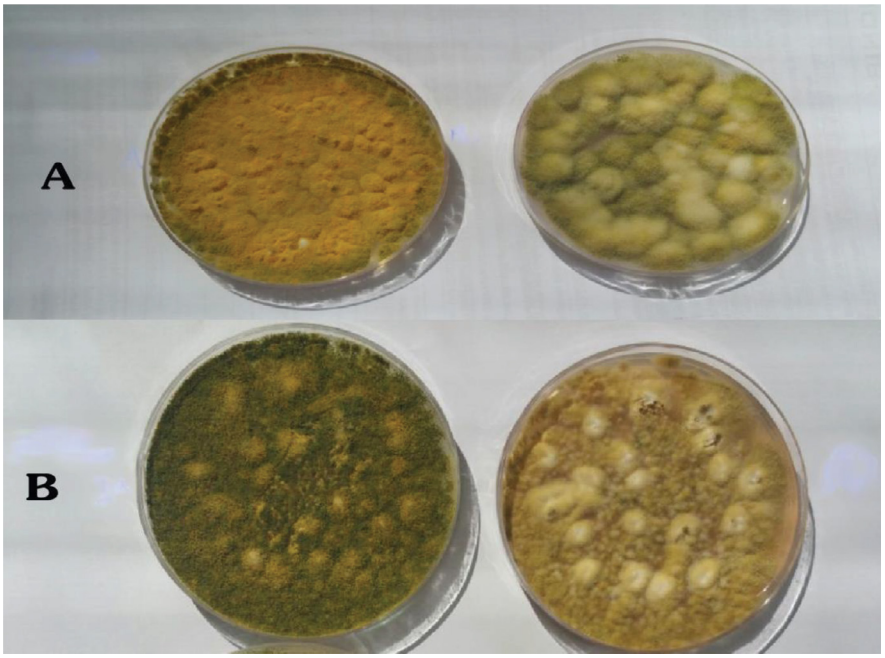
21- Tomková, I., Sevcíková, Z., Levkut, M., Revajová, V., Conková, E., Laciaková, A., Lenhardt, L. 2002. Effect of aflatoxin B1 on CD3 T cells and alkaline phosphatase in the intestine of mice. *Mycopathologia*, 154(1):15-9.

22- Umesha, S., Manukumar, H.M., Chandrasekhar, B., Shivakumara, P., ShivaKumar, J., Raghava, S., Avinash, P., Shirin, M., Bharathi, T.R., Rajini, S.B., Nandhini, M., Vinaya Rani, G.G., Shobha, M., Prakash, H.S. 2017. Aflatoxins and food pathogens: impact of biologically active aflatoxins and their control strategies. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 97(6):1698-1707.

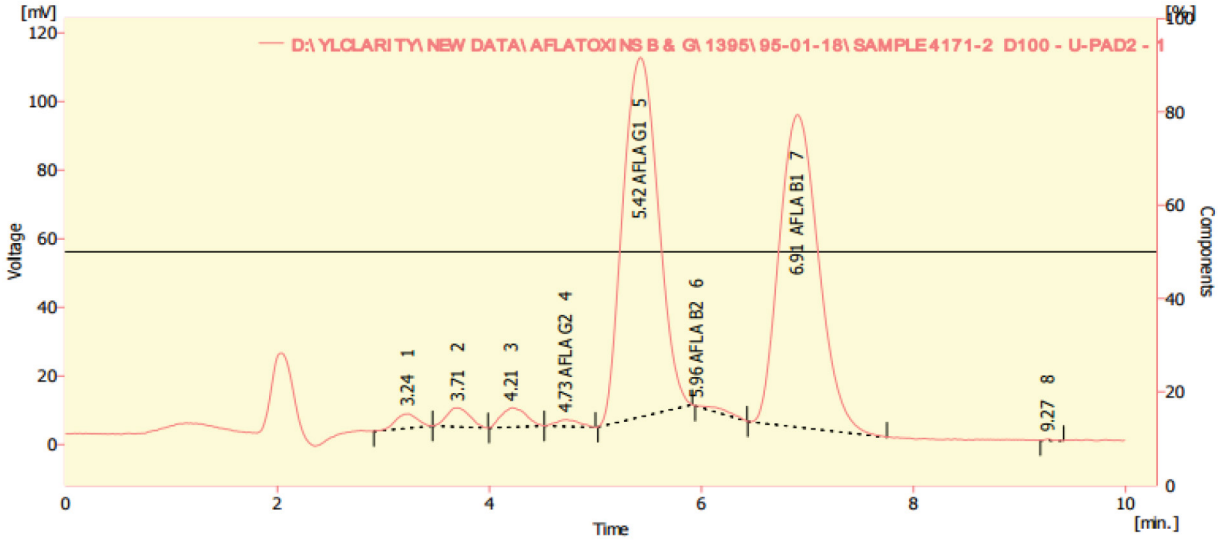
23- Wild, C.P., Turner, P.C. 2002. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*, 17(6):471-81.

24- Williams, J., Phillips, T., Jolly, P., Stiles, J., Jolly, C., Aggarwal, D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, Potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition,* 80(5):1106–22.

25- Zimmermann, C.E.P., Machado, A.K., Cadoná, F.C., Jaques, J.A.S., Schlemmer, K.B., Lautert, C., Cruz, I.B.M., Zanette, R.A., Leal, D.B.R., Santurio, J.M. 2014. Invitro cytotoxicity of aflatoxin B1 to broiler lymphocytes of broiler chickens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 16(3), 307-312.

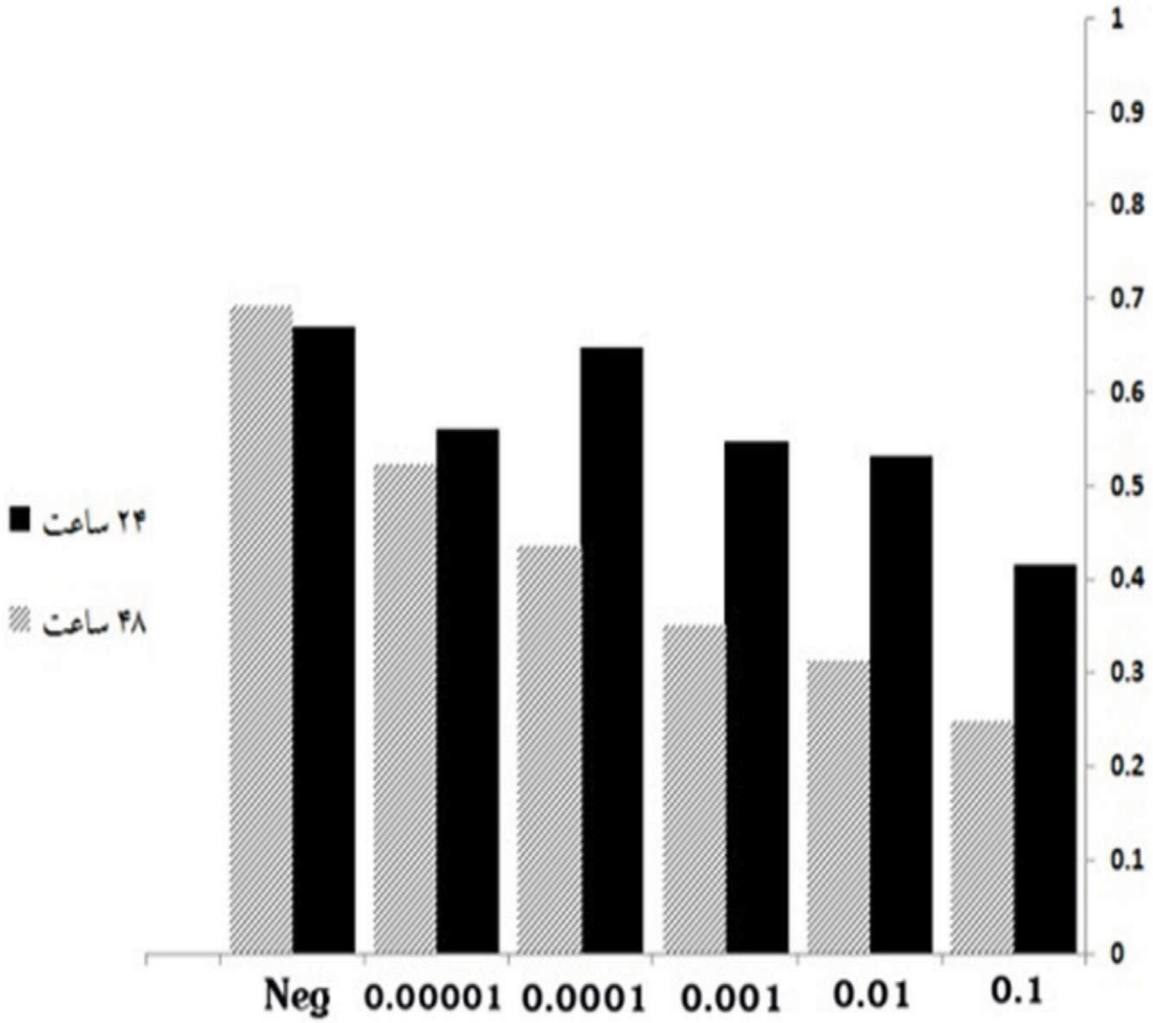


شکل۱ - نمای کلنی های آسپرژیلوس پارازیتیکوس (سمت راست) و فلاووس (سمت چپ) جدا شده از خوراک دام بر روی محیط های کشت YESA (A و PDA (B

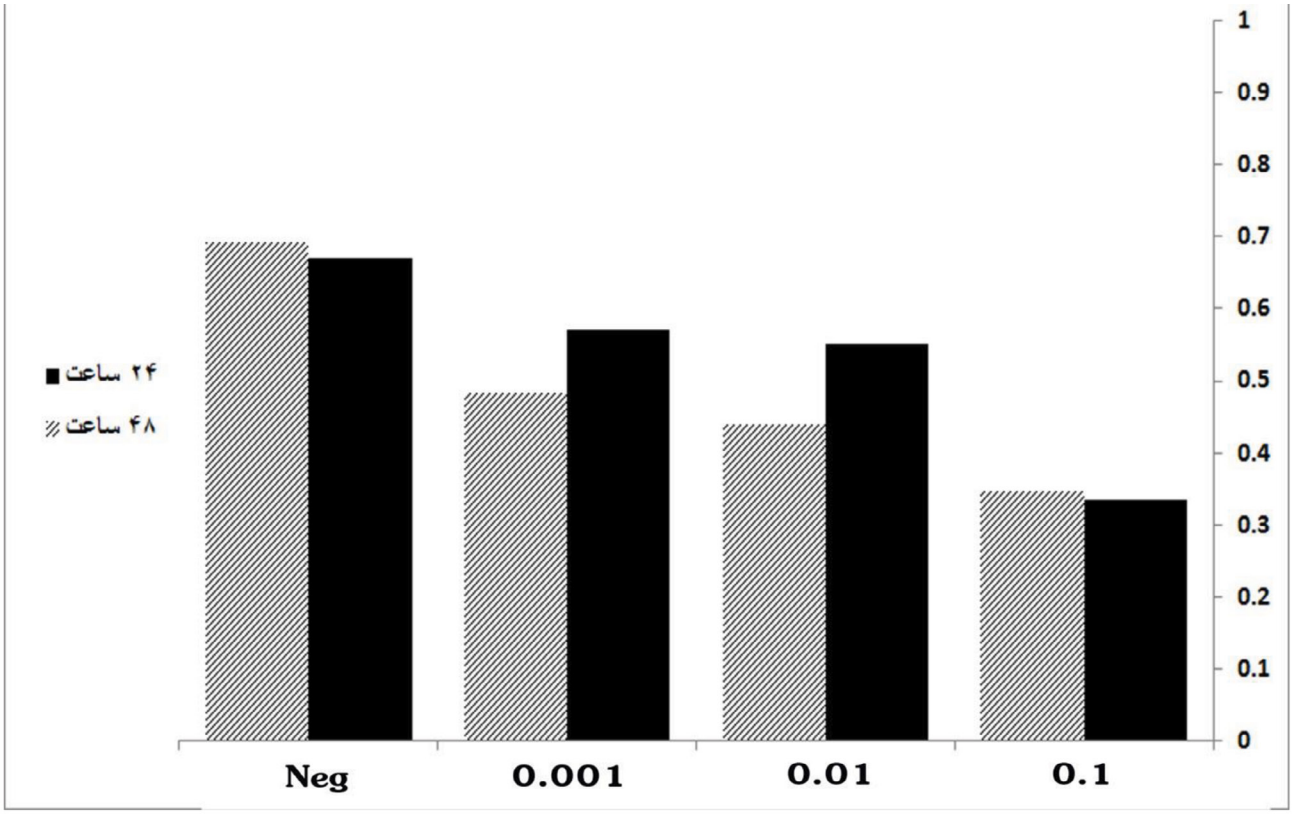


شکل ۲- نتایج HPLC سویه استاندارد آسپرژیلوس پارازیتیکوس

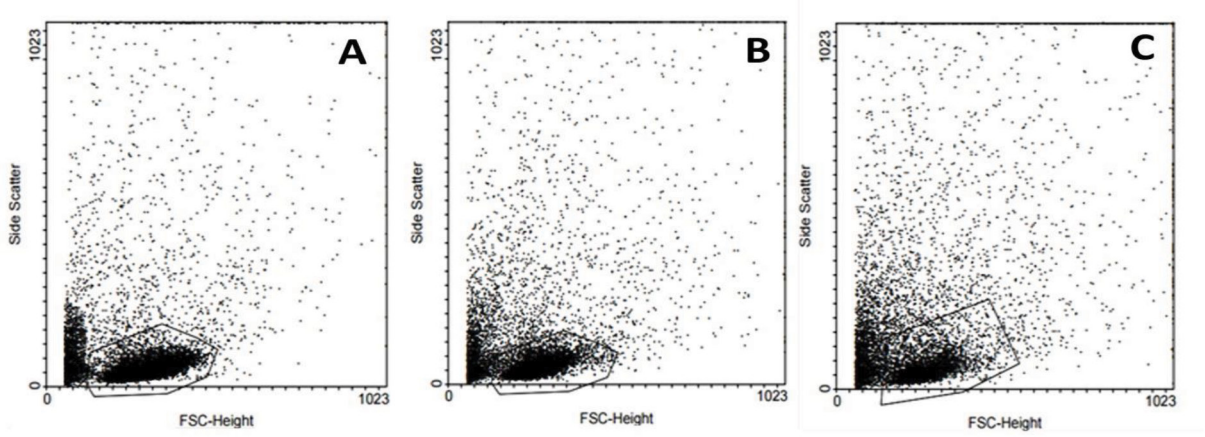
شرایط دستگاهHPLC : ستون: (۲۵۰×۶,۴ ۱۰µm, mm) ODS۲ C۱۸، فاز متحرك: متانول، استونیتریل، آب و اسید استیك با نسبت های حجمی ۲۰ :۲۰ :۵۹ :۱ درصد، دمای محیط ۲۷ درجه سانتیگراد، سرعت جریان یك میلیلیتر بر دقیقه، آشکارسازفلئورسنت: طول موج برانگیختگی ۳۶۵ و طول موج نشر ۴۲۵ نانومتر ، حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر.



شکل ۳ - نمودارمیانگین جذب نوری لنفوسیت های T موشی (سلول های EL۴) تحت تاثیر رقت های مختلف آفلاتوکسین های B۱ و G۱ حاصل از نمونه استاندارد آسپرژیلوس پارازیتیکوس پس از ۲۴و ۴۸ ساعت انکوباسیون)



شکل ۴- نمودارمیانگین جذب نوری سلول های کشته شده EL۴ تحت تاثیر رقت های مختلف آفلاتوکسین های B۱ و G۱ حاصل از سویه آسپرژیلوس فلاووس جدا شده از خوراک دام در مجاورت سلول های EL۴ پس از ۲۴و ۴۸ ساعت انکوباسیون)



شکل ۵- نتایج فلوسایتومتری سلول های EL۴ متعاقب ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول در کنار محیط کشت به عنوان کنترل منفی (A) و در مجاورت رقت ۰/۱ (B) غلظت۰/۰۱ (C) از آفلاتوکسین های B۱ و G۱ مستخرج از آسپرژیلوس فلاووس جدا شده از خوراک دام.