



بررسی برون تنی تاثیر آفلاتوکسین B₁ بر عملکرد نوتروفیل های نوزاد شتر به روش بیولومینسانس

سجاد نجفی مصلح^۱، غلامرضا محمدی^۲، جلیل مهرزاد^۳، مهرداد مهری^۴، سامان حسین خانی^۴

^۱-دستیار بیماری های داخلی دام های بزرگ، گروه علوم درمانگاهی، بهداشت و پیشگیری بیماری های دامی، دانشکده

دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

^۲-استاد، گروه علوم درمانگاهی، بهداشت و پیشگیری بیماری های دامی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

^۳-دانشیار، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

^۴-استاد، گروه بیوشیمی دانشکده علوم زیستی، دانشکده تربیت مدرس

نویسنده مسئول: سجاد نجفی مصلح

[Email: najafi.dvsc@gmail.com](mailto:Email:najafi.dvsc@gmail.com)

چکیده

هدف از انجام این مطالعه بررسی تاثیر برون تنی آفلاتوکسین B₁ بر نوتروفیل های نوزاد شتر است. نوتروفیل ها فراوان ترین گلبولهای سفید در اکثر پستانداران هستند که نقش مهمی در ایمنی ذاتی بر عهده دارند. آپوپتوز نوعی از مرگ برنامه ریزی شده سلولی است که در ارگانیزم های چند سلولی اتفاق می افتد. به دنبال القای آپوپتوز در نوتروفیل ها میزان ATP درون سلولی کاهش یافته و کاسپاز ۳ و ۷ و ۹ افزایش می یابد. در این مطالعه از ۱۲ نوزاد شتر سه روزه نمونه خون گرفته شد. مراحل جداسازی و کشت نوتروفیل طبق روش های استاندارد انجام گرفت. به هر پلیت سلولی گروه تست آفلاتوکسین B₁ با غلظت 20 ng/ml اضافه شد و به مدت ۱۶ الی ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پلیت سلولی جدا شد و پس از لیز سلولها، ATP درون سلولی و کاسپاز ۳ و ۷ و ۹ با استفاده از سوبسترای کیت لوسیفیرین-لوسیفراز بررسی گردید. نتایج نشان داد ATP درون سلولی نوتروفیل های گروه تست به صورت معنی داری کمتر از گروه کنترل است. همچنین فعالیت و آزاد شدن کاسپاز های ۳ و ۷ و ۹ در نوتروفیل های گروه تست به صورت معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود. این مطالعه نشان داد آفلاتوکسین B₁ می تواند با تضعیف سیستم ایمنی نوزاد شتر سبب افزایش احتمال ابتلای نوزاد شتر به بیماریهای عفونی شود که خود می تواند خسارات اقتصادی سنگینی را به شترداران تحمیل نماید.

واژگان کلیدی: نوزاد شتر، نوتروفیل، آفلاتوکسین B₁، ATP، کاسپاز، بیولومینسانس



مقدمه

آفلاتوکسین ها گونه ای از مایکوتوکسین ها هستند که در ایجاد بیماری های مختلفی در حیوانات و انسان حائز اهمیت می باشند. آفلاتوکسین ها خانواده ای از ترکیبات بسیار سمی، موتاژنیک و کارسینوژن هستند که توسط انواع مختلف آسپرژیلوس ها (آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس) تولید می شوند. آفلاتوکسین ها ی غالب که بصورت آفلاتوکسین های G2, G1, B2, B1 در غذا و محیط و بصورت متابولیت های M1 و M2 در شیر و ترشحات شناخته می شوند (1,2,3). آفلاتوکسین اثرات توکسیک بسیار زیاد در بدن انسان و حیوانات دارد که از جمله ی آن ها می توان به اثرات تراژنیک، موتاژنیک، هپاتوتوکسیک، سایتوتوکسیک، اثرات ایمنوتوکسیک و القاء اپوپتوز اشاره کرد (۲) تفاوت های نژادی و گونه ای در متابولیزم AFB1 وجود دارد. که این به علت تفاوت در فعالیت آنزیم های درگیر در متابولیزم این توکسین ها می باشد. دوز و زمان در معرض قرار گرفتن نیز در حساسیت و بروز اثرات سوء افلاتوکسین ها موثر می باشد (5) آفلاتوکسین B1 نقش بسیار مهمی در ایجاد اختلال در عمل کرد سیستم ایمنی در حیوانات و انسان دارد (5). نوزادان که تحت استرس بیشتری هستند و سیستم ایمنی آنها ضعیف تر است. بیشتر تحت تاثیر قرار می گیرند (۳) نوزادان در آغاز تولد دارای سیستم ایمنی ضعیف بوده و مایکوتوکسین های تولید شده به وسیله قارچ های مهاجم، می توانند ایمنی را در آنها سرکوب کنند و در نتیجه عفونت زایی قارچ ها و باکتری ها را افزایش دهند (۲) نوزادان ایمنی خود را از ایمونوگلوبولین آغوز دریافت می کنند که آنها را در برابر بیماری هایی که در آغاز زندگی با آنها روبرو می شوند محافظت می کند. اگر آغوز و شیر دریافتی نوزاد شتر همراه با آفلاتوکسین باشد سیستم ایمنی آن را تضعیف کرده و باعث ابتلا آنها به سایر بیماری های عفونی می گردد که خود باعث ضرر های اقتصادی زیادی می شود (۳).

روش کار

۱۲ نفر شتر آبتن به صورت تصادفی از یک گله ۲۰۰ نفری انتخاب شدند و شاخص های بالینی و آزمایشگاهی شامل تعداد ضربان قلب و تعداد تنفس درجه حرارت و تعداد حرکات گوارش و میزان گلبول های سفید و قرمز و شاخص های التهابی بررسی شدند با توجه به نتایج بررسی سلامتی شتران آبتن مورد تایید قرار گرفت. نوزادان شترهایی که متولد شده تا سه روز تحت مراقبت و نظارت شدید با ارزیابی علایم حیاتی قرار می گرفتند و در روز سوم به صورتی که به نوزاد شتر استرس وارد نشود ۱۰ سی سی نمونه خون از ورید و داجی آنها گرفته و به لوله های حاوی EDTA منتقل شد و در کنار یخ به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد انتقال می یافت. تخلیص و جداسازی نوتروفیل ها طبق پروتکل انجام می شد (۸). سپس نوتروفیل ها در دو گروه کنترل و تست قرار گرفتند و به هر پلیت سلولی گروه تست AFLB با غلظت 20 ng/ml اضافه شد و به مدت ۱۶ الی ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. آنگاه پلت سلولی جداسازی و فریز شده و برای سنجش ATP داخل سلولی و کاسپازها با استفاده از دستگاه بیولومینسانس در کنار یخ خشک به دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس ارسال شدند.

نتایج و بحث

نتایج این مطالعه آشکار نمود که ATP درون سلولی نوتروفیل های گروه تست به صورت معنی داری کمتر از گروه کنترل بود. همچنین فعالیت و آزاد شدن کاسپازهای ۳ و ۷ و ۹ در نوتروفیل های گروه تست به صورت معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود که حاکی از سرکوب ایمنی و اختلال در عملکرد نوتروفیل ها ناشی از آفلاتوکسین B1 می باشد. آفلاتوکسین B1 عملکرد نوتروفیل های خون نوزادان را در سطح سلولی و مولکولی تغییر می دهد و موجب اختلال این بازوی مهم ایمنی ذاتی و متعاقب آن اختلال



در رشد و سلامتی نوزادان می شود که این آسیب ها می تواند در گله های شتر خود را به صورت ضرر اقتصادی هنگفت نشان دهد. این مطالعه نشان می دهد آفلاتوکسین B₁ سبب تضعیف سیستم ایمنی و به دنبال آن افزایش احتمال ابتلا به بیماریهای عفونی در نوزادان شتر می شود. نوتروفیل ها به عنوان سلول های تاثیرگذار ایمنی ذاتی در گردش خون، در کنترل واکنش های ایمنولوژیک به عفونت های میکروبی نقش حیاتی دارند. این سلول ها با مهاجرت به محل بافت عفونی، عامل بیماریزای ایجاد کننده عفونت را محدود نموده و جلوی گسترش آن را می گیرند. نقش اصلی نوتروفیل ها در ایمنی ذاتی بلع پاتوژن های مهاجم و آغاز پاسخ ایمنی و ایجاد آماس می باشد. نوتروفیل ها قابلیت های زیادی دارند، از جمله قادرند به مقدار زیادی مواد ضد میکروبی به خصوص رادیکال های آزاد داخل سلولی یا انواع اکسیژن واکنش گر برای کشتن میکروب های فاگوسیت شده تولید نمایند، و به عنوان خط نخست دفاعی موثر در برابر پاتوژن ها نقش اساسی ایفا نمایند. هر گونه آسیب به نوتروفیل ها ممکن است اثرات مخرب زیادی بر سلامت حیوان داشته باشد. عوامل آسیب رسان بیشماری میتوانند باعث اختلال عملکرد نوتروفیل ها شوند که از جمله آن مایکوتوکسین ها می باشد. بررسی ها نشان می دهد آفلاتوکسین B₁ حتی در مقادیر بسیار کم قادر است تا وظایف نوتروفیل ها در گاوهای شیری را به شدت تضعیف نماید و باعث اختلال عملکرد نوتروفیل و تضعیف سیستم ایمنی می گردد. (۱۲ و ۱۱ و ۱۰ و ۹ و ۸). بیولومینسانس یکی از تکنیک های پیشرفته و بسیار حساس برای بررسی پدیده آپوپتوز سلولی است. برای سنجش فعالیت کاسپاز ها در سلول از کیت هایی استفاده می شود که اساس آن بر مبنای سنجش بیولومینسانس می باشد. آفلاتوکسین باعث کاهش عمل کرد گلبول های سفید از جمله نوتروفیل ها شده و به همین جهت در نوزادان شاهد کاهش پاسخ مناسب به درمان و کاهش مقاومت در برابر بیماری های مزمن و افزایش احتمال ابتلاء به سایر بیماری ها و شکست در برنامه های واکسیناسیون را شاهد خواهیم بود (۱،۴،۶). به خاطر ضرر های اقتصادی زیادی که آفلاتوکسین ب₁ می تواند بر سطح گله های شتر از نظر کاهش تولید، بیماری ها و تلفات ایجاد کند به همین خاطر بررسی انبار غذایی و مراقبت های نگه داری از مواد غذایی می تواند در کاهش میزان آفلاتوکسین B₁ موثر باشد و همین مراقبت های ساده می تواند از ایجاد خسارت های اقتصادی زیادی جلوگیری نماید.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم است از آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد و آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس که در انجام این پروژه مساعدت نموده اند تشکر نمایم

References

- 1-Marin S., Ramos A.J., Cano-Sancho G., Sanchis V., 2013. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. Food Chem. Toxicol. 60, 218–237
- 2-Chaytor, A.C, See, M.T, Hansen, J.A, de Souza, A.L., Middleton, T.F, Kim, S.W, 2011. Effects of chronic exposure of diets with reduced concentrations of aflatoxin and deoxynivalenol on growth and immune status of pigs. J. Anim. Sci. 89, 124–135.



- 3- Wild, C. P., Turner, P. C. (2002). The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*. 17 (6), 471–481.
- 4- Alpsy L, Yalvac ME (2011) Key roles of vitamin A, C and E in aflatoxin B1-induced oxidative stress. In: Litwack G (ed) *Vitamins and the Immune System*. Elsevier, London, UK: Academic Press, pp. 287–305.
- 5- Bondy GS, Pestka JJ. 2000. Immunomodulation by fungal toxins. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*; 3(2):109-143.
- 6- Wright DA, Welbourn P. *Environmental Toxicology*: Cambridge University Press; 2002.
- 7- Mehrzad, J., Duchateau, L., Burvenich, C., 2009. Phagocytic and bactericidal activity of blood and milk-resident neutrophils against *Staphylococcus aureus* in primiparous and multiparous cows during early lactation. *Vet. Microbiol.* 134, 106–112.
- 8- Mehrzad J, Devriendt B, Baert K, Cox K (2014a) Aflatoxin B1 interferes with the antigen-presenting capacity of porcine dendritic cells. *Toxicology in Vitro* 28: 531-537.
- 9- Mehrzad, J., Dosogne, H., Meyer, E., Heyneman, R., Burvenich, C., 2001. Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation. *J. Dairy Res.* 68, 399–415.
- 10- Mehrzad, J., Duchateau, L., Burvenich, C., 2004. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *J. Dairy Sci.* 87, 4150–4162.
- 11- Mehrzad, J., Duchateau, L., Burvenich, C., 2005a. High milk neutrophil chemiluminescence limits the severity of bovine coliform mastitis. *Vet. Res.* 36, 101–116.
- 12- Mehrzad, J., Desrosiers, C., Lauzon, K., Robitaille, G., Zhao, X., Lacasse, P., 2005b. Proteases involved in mammary tissue damage during endotoxin-induced mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88, 211–222.