دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی

شماره ثبت :۴۳۴

بررسی اثر مخلوط آفلاتوکسین‌های B و G روی میزان بیان ژن گیرنده شبه تول ۴ (TLR4) در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) گاو در زمان‌های مختلف انکوباسیون و شرایط *in vitro* با روش Real-time quantitative (q)PCR

به کوشش:

مژگان میلانی مقدم

استاد راهنما:

دکتر جلیل مهرزاد

استاد مشاور:

دکتر محمود محمودی

مهر ۱۳۹۱

بسم الله الرحمن الرحيم

تعهدنامه

اینجانب **مژگان میلانی مقدم** دانشجوی دوره **دکتري حرفه‌اي**، دانشکده **دامپزشکي**، دانشگاه **فردوسي مشهد**، نویسنده پایان‌نامه: **بررسی اثر مخلوط آفلاتوکسین‌های B و G روی میزان بیان ژن گیرنده شبه تول ۴ (TLR4) در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) گاو در زمان‌های مختلف انکوباسیون و شرایط *in vitro* با روش Real-time quantitative (q)PCR** تحت راهنمایی **آقای دکتر جلیل مهرزاد** متعهد مي شوم:

- تحقیقات در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهاي محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگري براي دریافت هیچ نوع مدرك یا امتیازي در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوي این اثر متعلق به دانشگاه فردوسي مشهد مي‌باشد و مقالات مستخرج با نام «دانشگاه فردوسي مشهد» و یا «Ferdowsi University of Mashhad» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوي تمام افرادي که در به دست آمدن نتایج اصلي پایان‌نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردي که از موجود زنده (یا بافتهاي آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقي رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردي که به حوزه اطلاعات شخصي افراد دسترسي یافته یا استفاده شده است، اصل رازداري، ضوابط و اصول اخلاق انساني رعایت شده است.

تاریخ و امضاي دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوي این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌هاي رایانه‌اي، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه فردوسي مشهد مي‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضي در تولیدات علمي مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمي‌باشد.

به نام خدا

گواهی اعضای کمیته ی پایان نامه

بررسی اثر مخلوط آفلاتوکسین‌های B و G روی میزان بیان ژن گیرنده شبه تول ۴ (TLR4) در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) گاو در زمان‌های مختلف انکوباسیون و شرایط *in vitro* با روش Real-time quantitative (q)PCR

به کوشش:

مژگان میلانی مقدم

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه فردوسی مشهد به عنوان بخشی از فعالیت‌های تحصیلی لازم جهت اخذ درجه دکتری حرفه‌ای دامپزشکی

در رشته دامپزشکی

از دانشگاه فردوسی مشهد

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی کمیته ی پایان نامه، با درجه: عالی و نمره: ۱۹/۷۵

استاد راهنما: دکتر جلیل مهرزاد (استادیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد)

استاد مشاور: دکتر محمود محمودی(استاد مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد)

داور پایان‌نامه: دکتر حسام دهقانی (دانشیار گروه بیوتکنولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد)

داور پایان‌نامه:دکتر علیرضا حق‌پرست(استادیارگروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد)

مهر ۱۳۹۱

تقدیم به مهربان فرشتگانی که لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه های زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آنهاست.

روح پاک پدرم ؛ او که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی، ایستادگی را تجربه نمایم .

مادر مهربانم ؛ شوق زیبای نفس کشیدن

به پاس عشق، محبت، صبر، گذشت و فداکاری اش

همسر عزیزم دکتر امیر مصدق؛ اسطوره زندگی، پناه خستگی و امید بودنم

خانواده همیشه سبزم که همواره در مسیر زندگی همراه و تکیه گاهم بودند:

خواهر عزیزم **مهندس الهام میلانی**؛ برادر مهربانم **دکتر امیر میلانی** و همسر عزیزش **مهندس بهاره جعفری**؛ استاد گرامی و شوهر خواهر عزیز **دکتر مجید جمشیدیان**؛ خواهرزاده های نازنینم **آیدا و امیرعباس و خانواده با محبت همسرم**؛

به پاس محبت های بی دریغ و همراهی صمیمانه شان؛ حضور زیبایشان تمام لحظاتم را خاطره انگیز می سازد.

سپاس پروردگار دو عالم را، که بزرگترین امید و یاور در لحظه لحظه زندگیست.

از اساتید محترم و فرهیخته **جناب آقای دکتر جلیل مهرزاد** استاد راهنمای گرامیم و **جناب آقای دکتر محمود محمودی** استاد مشاور گرانقدر که دلسوزانه و مدبرانه این حقیر را در امر پایان نامه راهنمایی کردند، کمال تشکر را دارم.

از اساتید محترم **جناب آقای دکتر حسام دهقانی** و **جناب آقای دکتر علیرضا حق پرست** که زحمت داوری این پایان نامه را متقبل شدند سپاسگزارم.

قدردان زحمات **تمام اساتید بزرگوارم** طی دوران تحصیل در دانشکده دامپزشکی، هستم.

همچنین از جناب **آقای دکتر عباس بهاری** به دلیل کمک های بی دریغشان در طول این مدت تشکر می کنم.

از **تمامی همکلاسیهای عزیزم در ورودی ۸۵** که سال هایی پر از خاطرات شیرین را در کنارشان سپری کردم، کمال تشکر و سپاس را دارم و برایشان بهترین ها را آرزو می کنم.

چکیده

بررسی اثر مخلوط آفلاتوکسین‌های B و G روی میزان بیان ژن گیرنده شبه تول ۴ (TLR4) در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) گاو در زمان‌های مختلف انکوباسیون و شرایط *in vitro* با روش Real-time quantitative (q)PCR

به کوشش:

مژگان میلانی مقدم

آفلاتوکسین‌ها (AFs) ازخطرناک‌ترین مایکوتوکسین‌ها و متابولیت‌های سمی هستند که بوسیله قارچ‌ها در مواد غذایی تولید می‌شوند و دارای اثرات سمی، موتاژنیک، تراتوژنیک، کارسینوژنیک و تضعیف کننده سیستم ایمنی می‌باشند. پاسخ‌های سیستم ایمنی ذاتی، اولین سد دفاعی بدن در برابر پاتوژن‌ها می‌باشند. گیرنده‌های شناساگر الگو (PRRs) بخصوص TLRs، از مولکول‌های مهم ایمنی ذاتی و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) مانند مونوسیت‌ها، از مهم‌ترین سلول‌های ایمنی ذاتی محسوب می‌شوند. دوز پایین آفلاتوکسین‌ها معمولا در غذای حیوانات وجود داشته و ممکن است قابل شناسایی نباشد، ولی مطالعات اخیر نشان داده که این دوز می‌تواند در انسان و حیوانات بخصوص گاو باعث تضعیف سیستم ایمنی و افزایش ابتلاء به بیماری‌های عفونی و غیرعفونی شود. هدف اصلی مطالعه حاضر بررسی اثر مخلوط آفلاتوکسین‌ها بر بیان ژن TLR4 در PBMCs گاوهای سالم است. در این مطالعه بعد از خونگیری از گاوهای سالم، PBMCs با روش فایکول جدا شد و در معرض دوزهای پایین مخلوط آفلاتوکسین‌های (AFB_1 (۱ng/ml) ، (۰/۵ng/ml) AFB_2، (AFG_1 (۰/۲۵ng/ml) و (AFG_2 (۰/۲۵ng/ml) در زمان‌های مختلف (۱۵، ۳۰، ۴۵ دقیقه، ۱، ۱/۵، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۱۸ ساعت) قرار گرفت و تغییرات بیان ژن TLR4 با روش qPCR سنجیده شد. آنالیز نتایج، افزایش معنادار بیان ژن TLR4 را در زمان‌های ۴۵ دقیقه، ۲ و ۵ ساعت نشان داد. تغییر بیان ژن در زمان‌های ۱۵ و ۳۰ دقیقه، ۳، ۴، ۶ و ۱۸ ساعت زیاد قابل توجه نبود اما در زمان‌های ۱ و ۱/۵ ساعت کاهش بیان ژن TLR4 دیده شد. این نتایج نشان می‌دهد که در معرض قرارگیری با آفلاتوکسین‌ها منجر به اختلال در میزان بیان ژن TLRها در سلول‌های ایمنی می‌شود. یافته‌های حاضر بینش جدیدی در زمینه مطالعه اثرات و جنبه‌های مختلف مولکولی آفلاتوکسین‌ها و PRRها در حیوانات ایجاد می‌کند.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین‌ها، گیرنده‌های شناساگر الگو، گیرنده‌های شبه تول، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، qPCR

فهرست مطالب

بررسی اثر مخلوط آفلاتوکسین‌های B و G روی میزان بیان ژن گیرنده شبه تول ۴ (TLR4) در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) گاو در زمان‌های مختلف انکوباسیون و شرایط *in vitro* با روش Real-time quantitative (q)PCR

مقدمه ۱

فصل اول: مروری بر تحقیقات انجام شده

۱-۱- مایکوتوکسین ۵

۱-۱-۱- معرفی آفلاتوکسین ۶

۱-۱-۲- تاریخچه کشف و شناسایی آفلاتوکسین ۸

۱-۱-۳- ساختار شیمیایی آفلاتوکسین ۸

۱-۱-۴- تولید و بیوسنتز آفلاتوکسین ۹

۱-۱-۵- آلودگی محصولات کشاورزی با آفلاتوکسین ۱۲

۱-۱-۶- جذب و توزیع آفلاتوکسین ۱۳

۱-۱-۷- حذف آفلاتوکسین ۱۴

۱-۱-۷-۱- دفع از طریق ادرار و مدفوع ۱۴

۱-۱-۷-۲- دفع از طریق شیر ۱۴

۱-۱-۸- تجزیه آفلاتوکسین ۱۵

۱-۱-۹- متابولیسم آفلاتوکسین در بدن گاو شیری ۱۵

۱-۱-۹-۱- متابولیسم شکمبه‌ای آفلاتوکسین ۱۵

۱-۱-۹-۲- متابولیسم آفلاتوکسین در اپیتلیوم روده، کبد و کلیه ها ۱۶

۱-۱-۹-۳- مسیرهای مختلف متابولیسم آفلاتوکسین مرتبط با سمیت‌زایی آن ۱۷

۱-۱-۱۰- اثرات آفلاتوکسین در بدن گاو شیری ۲۱

۱-۲- پاسخ‌های ایمنی بدن ۲۵
۱-۲-۱- پاسخ‌های ایمنی ذاتی ۲۶
۱-۲-۲- پاسخ‌های ایمنی تطبیقی ۲۸
۱-۲-۳- ارتباط ایمنی ذاتی و تحریک پاسخ‌های ایمنی تطبیقی ۲۸
۱-۳- گیرنده‌های شناساگر الگوی سلولی(PRRs) ۳۰
۱-۳-۱- تاریخچه کشف و شناسایی گیرنده‌های شبه تول(TLRs) ۳۲
۱-۳-۲- ساختار مولکولی گیرنده‌های TLRs ۳۳
۱-۳-۳- محل قرارگیری گیرنده‌های TLRs در سلول‌ها ۳۵
۱-۳-۴- گیرنده‌های شبه‌تول و لیگاندهای آن‌ها ۳۶
۱-۳-۵- مسیرهای پیام‌رسانی توسط TLRs ۴۲
۱-۳-۵-۱- مسیر پیام‌رسانی وابسته به MyD88 ..... ۴۳
۱-۳-۵-۲- مسیر پیام‌رسانی مستقل از MyD88 ..... ۴۳
۱-۳-۶- اهمیت و نقش TLRs در کنترل پاسخ‌های ایمنی ذاتی و تطبیقی ۴۵
۱-۴- روش‌های بررسی بیان ژن ۴۶
۱-۴-۱-Real-time quantitative (q)PCR ۴۶
۱-۴-۱-۱- مزایای روش qPCR ۴۸
۱-۴-۲- روش‌های سنجش با qPCR ۴۹
۱-۴-۲-۱- روش‌های غیراختصاصی ۴۹
۱-۴-۲-۱-۱- آنالیز منحنی ذوب ۵۰
۱-۴-۲-۲- روش‌های اختصاصی ۵۰
۱-۴-۲-۲-۱- پروب‌های هیدرولیز شونده ۵۱
۱-۴-۲-۲-۱-۱- پروب تگ من ۵۱
۱-۴-۲-۲-۲- پروب‌های سنجاق‌سری ۵۲
۱-۴-۲-۲-۲-۱- بایکون‌های مولکولی ۵۲
۱-۴-۲-۲-۲-۲- پروب اسکورپیون ۵۲
۱-۴-۲-۲-۳- پروب‌های هیبریداسیونی ۵۳
۱-۴-۲-۲-۴- پرایمرهای Sunrise ۵۳

۱-۴-۲-۲-۵- پرایمرهای LUX ۵۳
۱-۴-۳- روش‌های تعیین کمیت با qPCR ۵۵
۱-۴-۳-۱- روش تعیین کمیت مطلق ۵۵
۱-۴-۳-۲- روش تعیین کمیت نسبی ۵۷
۱-۴-۳-۲-۱- روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ۵۸
۱-۴-۳-۲-۲- روش Pfaffl ۶۰
۱-۵- مروری بر تحقیقات گذشته ۶۱
۱-۶- هدف از انجام تحقیق ۶۶

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- مکان و زمان انجام تحقیق ۶۸
۲-۲- مراحل انجام کار ۶۸
۲-۲-۲- انتخاب نمونه‌ها و نمونه‌گیری ۶۹
۲-۲-۳- جداسازی و کشت سلول‌های تک هسته ای خون محیطی گاو (PBMCs) . ۶۹
۲-۲-۴- شمارش سلول‌های PBMC استحصالی و بررسی میزان بقای آن‌ها ۷۱
۲-۲-۵- کشت سلول‌های PBMC استحصالی در تیمارهای مختلف ۷۲
۲-۲-۶- چالش سلول‌های PBMC با مخلوط آفلاتوکسین‌ها در شرایط آزمایشگاه ۷۲
۲-۲-۷- استخراج Total RNA از تیمارهای مختلف سلول های PBMC گاو ۷۳
۲-۲-۸- بررسی کیفیت و کمیت RNAهای استخراج شده از سلول‌های PBMC ۷۶
۲-۲-۹- ساخت cDNA با انجام واکنش رونوشت برداری معکوس RT-PCR ۷۶
۲-۲-۱۰- طراحی پرایمرها ی مورد نظر در مطالعه‌ی حاضر ۷۹
۲-۲-۱۱- تعیین دمای مرحله‌ی اتصال به وسیله‌ی PCR گرادیانت برای پرایمرهای اختصاصی طراحی شده در مطالعه حاضر ۸۱
۲-۲-۱۲- انجام واکنش qPCR برای تعیین بازده واکنش بعد از تهیه رقت‌های متوالی از cDNA سنتز شده ۸۲
۲-۲-۱۳- انجام واکنش qPCR برای نمونه‌های cDNA ۸۳

۲-۲-۱۴- انتقال محصولات واکنش qPCR روی ژل آگارز و ارزیابی آن‌ها زیر نور UV ۸۶
۲-۲-۱۵- محاسبه کمی تغییر بیان نسبی (RFC) ژن با استفاده از روش Pfaffl ۸۶
۲-۲-۱۶- آنالیز آماری نتایج qPCR گروه‌های کنترل و تیمار ۸۶

فصل سوم: نتایج

۳-۱- نتایج بررسی کمیت و کیفیت RNAهای استخراج شده از سلول‌های PBMC ۸۸
۳-۲- نتایج حاصل از تعیین کمیت cDNA توسط نانودراپ اسپکتروفتومتری ۸۹
۳-۳- نتایج PCR گرادیانت برای تعیین دمای مطلوب اتصال پرایمرهای GAPDH وTLR4 .....۸۹
۳-۴- نتایج تعیین بازده‌ی واکنش qPCR ۹۲
۳-۴-۱- نتایج تعیین بازده واکنش qPCR مربوط به پرایمر GAPDH ۹۲
۳-۴-۲- نتایج تعیین بازده واکنش qPCR مربوط به پرایمر TLR4 ..... ۹۳
۳-۵- نتایج حاصل از انجام واکنش qPCR برای نمونه‌ها ۹۴
۳-۶- نتایج حاصل از انتقال محصولات qPCR روی ژل آگارز و ارزیابی زیر نور UV ۹۶
۳-۷- نتایج آنالیز آماری محاسبه کمی تغییرات بیان ژن TLR4 در سلول‌های PBMC گاو..... ۹۷

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها

۴-۱- بحث و نتیجه گیری ۹۹
۴-۲- پیشنهادها ۱۰۶
منابع و مراجع ۱۰۹
ضمائم ۱۱۶

فهرست جدول‌ها

عنوان و شماره صفحه

جدول۱-۱: میزان LD50 در گونه‌های حیوانی مختلف در اثر مسمومیت حاد با AFB_1 ..... ۲۲
جدول۱-۲: مشخصات و اجزای سیستم ایمنی ذاتی وتطبیقی ۲۶
جدول ۱-۳: گیرنده های شبه تول و لیگاند های آن ها ۳۶
جدول ۲-۱: مواد مورد نیاز برای واکنش RT- PCR ۷۷
جدول ۲-۲: برنامه‌ی حرارتی سنتز cDNA از RNA های استخراج شده با روش RT-PCR ۷۷
جدول ۲-۳: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر ۷۹
جدول ۲-۴: ترکیب مواد مورد استفاده در واکنش PCR ۸۱
جدول ۲-۵: برنامه حرارتی مورد استفاده در واکنش PCR با استفاده از مناسب‌ترین دمای anneling .. ۸۲
جدول ۲-۶: ترکیب مواد مورد استفاده در واکنش نهایی qPCR برای ژن‌های هدف و رفرانس ۸۵
جدول ۲-۶: برنامه‌ی سیکل‌های حرارتی دستگاه qPCR ۸۵
جدول۲-۷: برنامه‌ی Melting curve برای qPCR روی ژن‌های هدف و رفرانس ۸۵
جدول۳-۱: دمای مناسب مرحله اتصال دو جفت پرایمر GAPDH و TLR4 بر اساس گرادیانت دمایی ۹۰

فهرست تصاویر

عنوان و شماره صفحه

تصویر۱-۱: ساختار شیمیایی آفلاتوکسین‌های رایج. ۹

تصویر ۱- ۲: متابولیسم AFB_1 در کبد. ۲۰

تصویر ۱-۳: تحریک سیستم ایمنی تطبیقی توسط پاسخ‌های ایمنی ذاتی. ۳۰

تصویر۱-۴: تغییر در بیان ژن و ایجاد مسیرهای سیگنالینگ به واسطه‌ی گیرنده‌های شناساگر الگو ۳۱

تصویر۱-۵: شباهت ساختاری TLRs و IL-1R ۳۴

تصویر ۱-۶: محل قرارگیری گیرنده‌های TLRs و لیگاندهای آن‌ها در سلول‌های ایمنی. ۳۵

تصویر ۱- ۷: انتقال پیام توسط TLRs و فعال سازی Nf-κβ در مسیر وابسته و مستقل از MyD88 ۴۴

تصویر۱-۸: TLRs و کنترل ایمنی تطبیقی. ۴۵

تصویر ۱-۹: نمودار تکثیر واکنش qPCR. ۴۷

تصویر ۱-۱۰: روش‌های سنجش بیان ژن توسط qPCR. ۵۴

تصویر۱-۱۱: منحنی استاندارد در شرایط وجود بازده تکثیر ۱۰۰٪. ۵۶

تصویر۲-۱ : اضافه کردن آهسته‌ی خون رقیق شده بر روی فایکول ۷۰

تصویر ۲-۲: جداسازی سلول‌های PBMC و لایه‌ی ابری حاوی سلول‌های PBMC بعد از سانتریفوژ ۷۰

تصویر۲-۳ : تصویر سلول‌های PBMC استحصالی بلافاصله بعد از جداسازی ۷۱

تصویر۲-۴ : چاهک‌های کشت سلولی ۷۵

تصویر۲-۵: استخراج RNA از سلول های PBMC .. ۷۵

تصویر۲-۶ : دستگاه ترموسایکلر(Bioer GenePro Thermal Cycler) ۷۸

تصویر۲-۷ : تصاویر شماتیک مربوط به تعداد اگزون‌های موجود در mRNA مربوط به ژن GAPDH و TLR4 گاوی و محل اتصال پرایمرهای GAPDH و TLR4 بر روی توالی mRNA مربوط به هر ژن ۸۰

تصویر ۲-۸: دستگاه آنالیزر qPCR مورد استفاده در پایان‌نامه حاضر (Rotor – Gene Q6000) ۸۴

تصویر۳-۱: نتیجه‌ی نانودراپ نمونه ای از RNAهای استخراج شده ۸۸

تصویر۳-۲: باندهای ریبوزومی ۱۸s و ۲۸s بعد از انتقال RNA استخراج شده روی ژل ۱/۵٪ ۸۸

تصویر ۳-۳: نمونه‌ای از نتایج کیفیت و کمیت cDNA سنتز شده با استفاده از نانودراپ ۸۹

تصویر۳-۴: تصویر ژل محصول PCR با گرادیانت دمایی مربوط به ژن GAPDH در مطالعه‌ی حاضر ۹۰

تصویر۳-۵ : تصویر ژل محصول PCR با گرادیانت دمایی مربوط به ژن TLR4 در مطالعه‌ی حاضر ۹۱

تصویر۳-۶: تصویر ژل محصولات واکنش PCR مربوط به ژن GAPDH و TLR4..... ۹۱
تصویر ۳-۷: مقادیر C_t و نمودار استاندارد مربوط به ژن GAPDH بعد از تهیه‌ی رقت‌های متوالی ۹۲
تصویر ۳-۸: مقادیر C_t و نمودار استاندارد مربوط به ژن TLR4 بعد از تهیه رقت‌های متوالی ۹۳
تصویر ۳-۹: باندهای حاصل از بردن رقت‌های تهیه شده از پرایمرهای GAPDH و TLR4 روی ژل ۱/۵٪
..... ۹۴
تصویر ۳-۱۰: منحنی تکثیر مربوط به نمونه‌های ژن GAPDH و TLR4 ..... ۹۴
تصویر ۳-۱۱ : منحنی ذوب مربوط به ژن های TLR4 و GAPDH گاوی در مطالعه‌ی حاضر و نمودار درجه
دوم حاصل مشتق گیری از آن ۹۵
تصویر ۳-۱۲: تصویر ژل نمونه‌ای از محصول qPCR مربوط به ژن GAPDH و TLR4 ..... ۹۶

«مقدمه»

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های سمی ثانویه‌ای هستند که توسط قارچ‌های گوناگون در مواد غذایی تولید می‌شوند. این توکسین‌ها می‌توانند در اثر خوردن مواد غذایی، از راه تنفسی و یا تماس پوستی منتقل شده و منجر به ایجاد بیماری‌های گوناگون در انسان و حیوانات شوند (۱). آلودگی مواد غذایی با مایکوتوکسین‌ها به عنوان یک معضل جهانی شناخته شده است. عمده‌ی مایکوتوکسین‌ها توسط قارچ‌هایی از خانواده‌ی آسپرژیلوس[۱]، فوزاریوم[۲] و پنی‌سیلیوم[۳] تولید می‌شوند و مهم‌ترین سموم تولید شده شامل آفلاتوکسین[۴](AFs)، زرالنون[۵]، تریکوتیسن[۶]، فومونیسین[۷]، اکراتوکسین[۸] و آلکالوئیدهای ارگوت[۹] می‌باشند. بیش از 25% محصولات کشاورزی در دنیا آلوده به این سموم هستند (۲). در این میان آفلاتوکسین‌ها ازخطرناک‌ترین مایکوتوکسین‌ها و متابولیت‌های سمی بوده که به وسیله‌ی قارچ‌ها، عمدتا گونه‌های آسپرژیلوس، در مواد غذایی دام‌ها و انسان تولید می‌شوند. AFs از مهم‌ترین عوامل توکسیک، موتاژنیک، تراتوژنیک و کارسینوژنیک محسوب می‌شوند و جزء عوامل ایجاد کننده‌ی سرطان‌های کبدی، خارج کبدی، سرطان‌های ریوی و نئوپلاسم‌های دستگاه گوارش می‌باشند (۳, ۴).

تاکنون حدود ۲۰ نوع آفلاتوکسین کشف شده است که از میان آن‌ها خطرناکی آفلاتوکسین‌های $(AFG_1)G_1$، $(AFG_2)G_2$، $(AFB_1)B_1$ و $AFB_2)B_2$) برای سلول‌ها و مولکول‌های بیولوژیک به اثبات رسیده است (۵). این آفلاتوکسین‌ها معمولاً به صورت مخلوط در جیره‌ی غذایی یافت می‌شوند و آلودگی با نسبت‌های مختلف و به طور همزمان اتفاق می‌افتد و AFB_1 $(C_{17}H_{12}O_6)$ متداول‌ترین و قویترین آن‌ها می‌باشد. همچنین میزان کمتری از AFB_2، AFG_1 و AFG_2 نیز به وسیله‌ی این گروه قارچ‌ها در غذای دام‌ها و انسان تولید می‌شوند. در واقع این قارچ‌ها و توکسین‌هایشان همیشه در زنجیره‌ی غذایی انسان و حیوانات وجود خواهند داشت

[1] *Aspergillus*
[2] *Fusarium*
[3] *Penicillium*
[4] *Aflatoxins*
[5] *Zearalenone*
[6] *Trichothecens*
[7] *Fumonisins*
[8] *Ochratoxins*
[9] *Ergot alkaloids*

و می‌توانند اثرات سمی گسترده‌ای به همراه داشته باشند. یکی از اثرات مخرب آفلاتوکسین‌ها اثرات تضعیف ایمنی[1] آن‌ها می‌باشد. دوزهای پایین AFB_1 ممکن است قابل شناسایی نباشد ولی مطالعات اخیر نشان داده است که دوزهای بسیار پایین، در انسان و حیوانات نیز می‌توانند باعث تضعیف سیستم ایمنی شده و حساسیت آن‌ها را در ابتلا به سایر عفونت‌ها افزایش دهند. درصد تضعیف سیستم ایمنی در افراد و نژادهای مختلف دامی متفاوت است (۶, ۷, ۸).

سیستم ایمنی ذاتی[2] اولین سد دفاعی بدن در برابر عوامل بیماریزا می‌باشد و نقش به سزایی در شناسایی عوامل بیماریزای مختلف در بدن حیوانات به عهده دارد. اگر ایمنی ذاتی به خوبی فعال شود وجود عفونت را در بدن هشدار داده و سیستم ایمنی اکتسابی[3] نیز به طور مناسب فعال خواهد شد و عامل بیماریزا به طور کامل از بدن پاک می‌شود (۹). نوتروفیل[4]ها اولین سد سلولی دفاع ذاتی بدن برای فاگوسیتوز و از بین بردن عوامل بیماریزا و تخریب مولکول‌های سمی از جمله AFB_1 می‌باشند (۱۰, ۱۱). سیستم ایمنی ذاتی بدن حیوانات به وسیله‌ی بسیاری از ژن‌های کدکننده‌ی مولکول‌های محلول و غیر محلول کنترل و فعال می‌شود. یکی از بازوهای مهم مولکولی سیستم ایمنی ذاتی، گیرنده‌های شناساگر الگو[5] (PRRs) می‌باشند. گیرنده‌های شبه تول[6] (TLRs) به عنوان یکی از مهم‌ترین دسته‌ی PRRsها در بسیاری از سلول‌های بدن مخصوصا در سلول-های ایمنی ذاتی حیوانات به وفور وجود دارند و مجموعه‌ی خاصی از الگوهای مولکولی وابسته به عوامل بیماریزا[7] (PAMPs) یا الگوهای مولکولی وابسته به عوامل میکروبی[8](MAMPs) را شناسایی می‌کنند. پس از شناسایی M/PAMPs موجود در سطح عوامل بیماریزا توسط PRRs، یکسری تغییرات در بیان ژن‌ها و مسیرهای سیگنالینگ و در نتیجه پاسخ‌های ایمنی مناسب ایجاد می‌شود (۱۲). TLR4 که از مهم‌ترین PRRsها است، در مسیرهای سیگنالینگ سلول‌ها مخصوصا سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی نقش بسیار به سزایی داشته و برای پاسخ به PAMPs مختلف از جمله لیپوپلی‌ساکاریدها[9] (LPS)، که جزء اصلی غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی است و منجر به ایجاد شوک سپتیک می‌شود، لازم و ضروری می‌باشد (۱۳).

[1] Immunosuppressive
[2] Innate immune System
[3] Acquired immune System
[4] Neutrophils
[5] Pattern recognition receptors
[6] Toll-like receptors
[7] Pathogen-associated molecular patterns
[8] Microbial-associated molecular patterns
[9] Lipopolysacharides

سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی[1] (PBMCs) از جمله لنفوسیت‌ها[2] و مونوسیت‌ها[3] در سرتاسر بدن پخش بوده و برای حیات حیوانات بسیار ضروری می‌باشند. TLR4 در سطح این سلول‌ها و سلول‌های مشتق از آن‌ها به وفور یافت می‌شود. این TLR در اکثر پدیده‌های آماسی سلول دخیل بوده و یکی از مهم‌ترین TLRهایی است که روی آن در حیوانات مختلف، مطالعات فراوانی صورت گرفته است. این مسئله در مورد حیوانات اهلی مثل گاو که یکی از مهم‌ترین منابع غذایی انسان‌ها می‌باشد، بیشتر نمایان است. این حیوان مدام در معرض AFs قرار می‌گیرد. به همین دلیل نیاز به تحقیق پایه‌ای در این زمینه بسیار ضروری دانسته شد. به علت انجام اقدامات مدیریتی سخت‌گیرانه در کشورهای توسعه یافته، شیوع آلودگی مواد غذایی با آفلاتوکسین-ها و به ویژه AFB_1، به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا کرده است، با این حال تجزیه و تحلیل داده‌های اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که دام‌ها و انسان نیز حتی در اروپا در معرض سطوح پایین AFs هستند، بنابراین مسئله‌ی آلودگی مواد غذایی با این سموم همیشه وجود خواهد داشت. به علاوه به دلیل گرم شدن کره‌ی زمین و تغییرات آب و هوایی شدید، ما با چالش‌های شدیدتر و سخت‌تر با موضوع AFs و مسمومیت مزمن نامرئی در گاوهای شیری روبه‌رو هستیم، بنابراین منطقی واساسی است که به مطالعه‌ی نقش بیولوژیکی این سم در سیستم ایمنی ذاتی پرداخته شود (۷). با توجه به وجود ضعف مدیریتی در کنترل و شناسایی آفلاتوکسین‌های جیره‌ی غذایی حیوانات مزرعه در ایران، می‌توان به سادگی رابطه‌ی معقولانه‌ای بین احتمال بروز بیماری‌های عفونی و وجود آفلاتوکسین‌ها متصور شد.

در مطالعه‌ی حاضر با انجام آزمایشات مولکولی Real-time qPCR، سعی بر این شد تا اثرات یک دوز مخلوط چهار نوع AFs (AFB_1، AFB_2، AFG_1 و AFG_2) به نسبت‌های مختلف و در زمان‌های متفاوت روی TLR4 در سلول‌های PBMCs، به طور کامل سنجیده شود.

[1] Peripheral blood mononuclear cells
[2] Lymphocytes
[3] Monocytes

«فصل اول»

مروری بر تحقیقات انجام شده

۱- مروری بر تحقیقات انجام شده

۱-۱- مایکوتوکسین

مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های سمی ثانویه با وزن مولکولی کم می‌باشند که توسط سویه‌های خاصی از قارچ‌های رشته ای (میله ای) مانند آسپرژیلوس، پنی‌سیلیوم و فوزاریوم تولید می‌شوند (۲, ۱۴). این قارچ‌ها یا به محصولات کشاورزی حمله کرده و یا در زمان ذخیره‌سازی مواد غذایی تحت شرایط گرم و مرطوب رشد می‌کنند و منجر به تولید سم و ایجاد بیماری‌های مختلف در انسان و حیوانات می‌گردند (۱۴). در این سموم که به صورت طبیعی تحت شرایط فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی مناسب به وسیله‌ی قارچ‌ها تولید می‌شوند، استرس گرمایی بالا، رطوبت زیاد (حداقل ۱۷٪) و آسیب محصولات کشاورزی توسط حشرات، ازجمله فاکتورهای تعیین کننده در تولید سم می‌باشد. مصرف مواد غذایی آلوده به مایکوتوکسین‌ها می‌تواند خطرات اقتصادی و بهداشتی فراوانی برای جمعیت انسانی و حیوانات داشته باشد (۲, ۱۵). علاوه بر مصرف مواد غذایی آلوده، این متابولیت‌های سمی گاهی از طریق تماس و تنفس منتقل می‌شوند (۱۶).

بر اساس تخمین سازمان بهداشت مواد غذایی[1](FAO) حدود ۲۵٪ محصولات غذایی در دنیا آلوده به مایکوتوکسین‌ها می‌باشند و هیچ نقطه ای از دنیا از مشکلات ناشی از مایکوتوکسین‌ها در امان نبوده و تخمین زده شده که بیش از ۳۰۰ نوع مایکوتوکسین خطرناک وجود دارد، اما روی تعداد کمی از آن‌ها تحقیقات علمی گسترده انجام شده است (۱۴). مسمومیت با این ترکیبات در نهایت منجر به ایجاد مایکوتوکسیکوزیز[2] می‌شود. اثرات بیولوژیک این توکسین‌ها به مقدار سم خورده شده، زمان در معرض قرارگیری، گونه‌ی حیوان، نژاد، سن، جنس و وضعیت سلامت آن‌ها بستگی دارد. سایر پارامترها از جمله تراکم حیوانات، حضور بیماری‌ها و درجه حرارت نیز باید در نظر گرفته شود (۱۴, ۱۵).

[1] Food and Agricultural Organisation
[2] Mycotoxicosis