



پایان نامه جهت اخذ کارشناسی ارشد

زیست شناسی (بیوشیمی)

بررسی اثر تیمار مخلوط آفلاتوکسین های گروه B بر روی سطح بیان بعضی

ژنهای وابسته به ایمنی ذاتی در سلول های تک هسته ای خون محیطی

انسانی در شرایط *In Vitro*

امیر محمد ملوندی

استاد راهنما:

دکتر جلیل مهرزاد

استاد مشاور:

دکتر مسعود صالح مقدم

۱۳۹۰

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

...تقدیم به تمام پویندگان صبور راه حق و حقیقت

که بمانند ناهید

در آسمان ابتدای شب

یاد آور پایان روزند

و

نوید دهنده فردایی روشن.

و تقدیم به

همسر عزیزم

پدر مهربان و مادر دلسوزم.

تشکر و قدردانی از:

- دکتر جلیل مهرزاد

استاد گرامیم که علاوه بر راه رسم پژوهش به من عاشقی و بندگی نیز آموختند.

- دکتر مسعود صالح مقدم

استاد ارجمندم که همیشه پدرانه مرا همراهی نمودند.

- خانم ها کهن قدر، خواجه نصیر، حیدری، باغستانی و عراقی

دوستان و همکاران عزیزم که در گروه بیوتکنولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد به اینجانب در انجام پایان نامه یاری رساندند.

چکیده

آفلاتوکسین ها متابولیت های ثانیه قارچ های از جمله خانواده اسپرژیلوس هستند که به عنوان آلودگی محصولات کشاورزی و خوراکی بحساب می آیند و تاثیرات مخرب زیادی بر سلامت انسان دارند. این ترکیبات به حرارت مقاوم بوده و به دلیل ساختارهای شیمیایی کوچکشان از سدهای زیستی به راحتی عبور می کنند. ناراحتی های کبدی، سرطان و ناهنجاری های ژنی از جمله پیامدهای مهم حضور این ترکیبات در تغذیه افراد است. تحقیقات اخیر مشخص نمود این ترکیبات قادر به ایجاد استرس اکسیداتیو و الفاء التهاب در سلول هستند. در این تحقیق برای بررسی مکانیزم تاثیرات التهابی مخلوط آفلاتوکسین ها (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) در بدن انسان، از سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMC) استفاده گردید. نتایج بررسی های بیان ژنی بوسیله روش واکنش زنجیره ای پلی مرز کم می نشان داد که در سلول های تیمار شده با غلظت های بسیار پایین آفلاتوکسین (1^{ng/ml}) پس از دو ساعت از تیمار ژنهای گیرنده های شبه تول (TLR) ۴ و ۲ افزایش چشمگیری یافت. همچنین برای تایید نتایج بیان ژن های MyD₈₈ به عنوان پروتئین آداپتور مسیر پیامی و CD۱۴ به عنوان گیرنده همیار TLR۴ در سلول های تیمار شده و کنترل بررسی گردید که در اینها هم افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. همچنین بررسی ها تا ۲۴ ساعت پس از تیمار نشان داد که روند افزایش همچنان در سلول های تیمار شده دیده می شود. بررسی های بیشتر در شرایط مشابه با غلظت ۲^{ng/ml} انجام شد. نتایج این آزمایش نشان داد در طی ۲۴ ساعت آفلاتوکسین ها باعث سرکوب بیان TLRها می شوند. نتایج این پروژه برای اولین بار نشان داد که مخلوط آفلاتوکسین ها در دوز بسیار پایین می تواند در زمان بسیار کوتاه بیان ژنهای TLR که واسطه های التهابی محسوب می شوند را افزایش دهد.

لغات کلیدی: گیرنده های شبه تول، مخلوط آفلاتوکسین های گروه ب، واکنش زنجیره ای پلی مرز کم می

فهرست مطالب

۸	فصل اول
۹	مایکوتوکسین ها
۹	و تاثیرات بهداشتی آنها
۱۰	۱-۱: مقدمه
۱۲	۲-۱: مایکوتوکسین های اصلی
۱۲	۱-۲-۱: آفلاتوکسین ها
۱۶	۲-۲-۱: اوکراتوکسین A
۱۷	۳-۲-۱: فومونیزین ها
۱۹	۴-۲-۱: پاتولین ها
۱۹	۵-۲-۱: تریکوتیسن ها
۲۰	۶-۲-۱: ارگوت
۲۱	۳-۱: آفلاتوکسین ها ، متابولیسم ، سرطان زایی و بر هم کنش های سلولی
۲۱	۱-۳-۱: مقدمه:
۲۳	۲-۳-۱: متابولیسم سلولی
۲۵	۳-۳-۱: بر هم کنش با مولکول های زیستی
۲۸	۳-۳-۱: تاثیر بر روی بیوسنتز ماکرومولکول ها
۳۰	۴-۳-۱: اثرات اختصاصی :
۳۴	گیرنده های شبه تول و لیگاندهای آنها
۳۵	۴-۱: مقدمه
۳۶	۵-۱: ایمنی ذاتی

۳۷	۶-۱: پاسخ های ایمنی در مگس سرکه.....
۴۱	۷-۱: گیرنده های شبه تول.....
۴۲	۸-۱: شناسایی پاتوژن بوسیله TLRS.....
۴۲	۱-۸-۱: باکتری ها.....
۴۶	۲-۸-۱: قارچ ها.....
۴۷	۳-۸-۱: پروتوزوا.....
۵۲	۴-۸-۱: ویروس ها.....
۵۲	۹-۱: جمع بندی.....
۵۴	فصل دوم.....
۵۴	مواد و روش ها.....
۵۵	۱-۲: لیست تمام مواد و تجهیزات مورد استفاده در این پروژه.....
۵۷	۱-۲: طرز تهیه محلول ها، بافرها و محیط کشت.....
۵۷	۱-۲-۱: تهیه محیط کشت RPMI-۱۶۴۰.....
۵۸	۲-۱-۲: آماده سازی FBS.....
۵۹	۲-۲: تهیه سلول های تک هسته ای خون محیطی.....
۶۰	۳-۲: شمارش سلولی و تعیین درصد سلول های زنده (Viability).....
۶۱	۴-۲: منجمد کردن سلول.....
۶۲	۵-۲: کشت سلول های PBMC جداسازی شده :.....
۶۲	۱-۵-۲: تیمار با مخلوط آفلاتوکسین ها.....
۶۳	۶-۲: استخراج RNA.....
۶۴	۷-۲: مراحل انجام تیمار DEPC :.....
۶۵	۸-۲: تیمار آنزیمی جهت حذف آلودگی DNA.....
۶۵	۹-۲: نسخه برداری معکوس و ساخت cDNA.....
۶۶	۱۰-۲: PCR و تهیه ژل.....
۶۹	۱۰-۲: بررسی بیان ژن ها به روش Real-Time RT PCR.....

فصل سوم	۷۱
نتایج	۷۱
۱-۳: کشت سلول های PBMC	۷۲
۲-۳: اثر تیمار غلظت های بسیار پایین آفلاتوکسین بر بیان ژن های TLR۲، TLR۴، CD۱۴ و MyD۸۸	۷۳
۲-۲-۲: بهینه سازی شرایط qRT-PCR	۷۴
۳-۲-۳: بیان TLR۲ با تیمار مقادیر بسیار پایین آفلاتوکسین افزایش یافته اما غلظت بالاتر عملکرد سرکوبی دارد.	۷۳
	۷۷
۴-۲-۳: بیان ژن TLR۴ در مواجهه با افزایش غلظت مخلوط آفلاتوکسین ها به طور متفاوتی از TLR۲ تغییر می یابد.	۷۸
۵-۲-۳: بیان ژن های CD۱۴ و MyD۸۸ با اعمال تیمار مخلوط آفلاتوکسین ها تقریباً مشابه الگوی TLR۴ تغییر می کنند.	۷۹
۳-۳: میزان حیات سلول ها در طی تیمار با مخلوط آفلاتوکسین ها کاهش می یابد.	۸۱
فصل چهارم	۸۳
بحث و تحلیل نتایج	۸۳
فصل پنجم	۹۹
منابع	۹۹

فصل اول

پیشگفتار

بخش اول

مایکوتوکسین ها

و تاثیرات بهداشتی آنها

مایکوتوکسین ها متابولیت های طبیعی قارچها هستند که اگر مورد تغذیه، تنفس و یا جذب از طریق پوست انسان قرار گیرند باعث کاهش عملکرد، ایجاد حالت مریضی (ضعف) و یا مرگ در انسان و حیواناتی از جمله پرندگان (pitt ۱۹۹۶) می شوند. مایکوتوکسین ها یک گروه بسیار بزرگ از ترکیبات بیولوژیک به حساب می آیند؛ به طور کلی این مواد دارای وزن مولکولی کم (اغلب کمتر از ۷۰۰ دالتون) بوده و ساختار شیمیایی و خصوصیات فیزیکی بسیار متنوعی دارند. می توان اینها را در گروه های شیمیایی متفاوتی دسته بندی نمود (به طور مثال پیرون ها، آنتراسینون ها، کومارین ها، ماکرولیدها، استروئیدها و پلی پتیدهای چرخه ای) و محصولات تبدیل زیستی مایکوتوکسین ها نیز جزء این گروه مواد زیستی بحساب می آیند (van Egmond and speijers ۱۹۹۹; weidenborner ۲۰۰۱). مایکو توکسین ها می توانند باعث آلودگی محصولات کشاورزی چه قبل از برداشت و چه بعد از برداشت گردند (FAO ۱۹۹۱). در حقیقت آلودگی های قارچی باعث این عمل می گردند، از میان هزاران گونه قارچی تنها حدود ۱۰۰ تا که متعلق به خانواده های *Penicillium Aspergillus* و *Fusarium* هستند به عنوان تولید کننده های اصلی مایکوتوکسین ها شناخته می شوند (Barrett ۲۰۰۰). این سموم به بخت غذا و فرایندهای اینچینی مقاومت نشان می دهند و بنابراین به طور کلی فعل و انفعالات تهیه غذا نمی تواند این توکسین ها را حذف کنند (Ruttedge ۱۹۷۶; Rao et al. ۱۹۸۲; Bullerman ۲۰۰۲).

پخش جهانی قارچی های سمی و تجارت جهانی غلات مسئولین اصلی گسترش مشاهده مایکوتوکسین ها در محل های مختلف می باشد (Smith ۱۹۹۷). غلات در مناطق حاره ای و جنب حاره ای نسبت به غلات مناطق معتدله مستعدتر به آلودگی مایکوتوکسینی هستند، در واقع رطوبت و دمای این مناطق محیط بهینه ای برای تشکیل توکسین فراهم می کند. از جمله دیگر منابع افزایش رشد قارچ ها و در نتیجه آن افزایش ریسک تولید ماکتوسین ها، می توان به فعالیت های ضعیف، نگه داری ناصحیح و پایین تر از شرایط بهینه در هنگام حمل و نقل و فروش محصولات اشاره نمود (Thomson and Henke ۲۰۰۰; Bhat and Vassanthi ۲۰۰۳). بنابر گزارش سازمان غذا و کشاورزی فائو ایالات متحده، حدود بیش از ۲۵٪ از حبوبات دنیا آلوده به مایکوتوکسین هستند (FAO ۱۹۹۶). با این وجود آثار اقتصادی مایکوتوکسین ها بر روی غلات و حیوانات اهلی، به علت کمبود داده جامع قابل تخمین نیست (CAST ۲۰۰۳).

از میان سوموم قارچی آفلاتوکسین ها (AFs)، اولین بار پس از مرگ و میر بیش از صد هزار جوجه بوقلمون (مریضی X بوقلمون) از بقایای وعده غذایی فندق های کپک زده آنها استخراج گردید (Blount ۲۰۰۳; Bennet amd Klick ۱۹۶۱). متون دامپزشکی منبع کاملی از اطلاعات در مورد آثار شناخته شده و محتمل آفلاتوکسین ها می باشند. در حیوانات مایکوتوکسین ها می توانند حالاتی نظیر سمیت حاد، سرطانی، ناهنجاری های مادرزادی ناشی از موتاسیون و آثار استروژنیک ایجاد کنند. البته یافته های میدانی نشان دهنده حساسیت بیشتر حیوانات جوان در مقابل این آثار هستند. مایکوتوکسین ها به عنوان عوامل هیجان

آور حیوانات نیز شناخته می شود که تاثیرات زیادی بر روی توان تولید مثلی آنها نیز دارد که از این طریق ضررهای اقتصادی زیادی را در پی داشته است (Goldblatt ۱۹۹۶; Fink ۱۹۹۹; WHO ۱۹۷۹; CAST ۲۰۰۳).

مایکوتوکسین ها می توانند فرایند های مختلف سلولی را تحت تاثیر قرار دهند و همچنین آثار توکسکولوژیک گسترده ای دارند. این پیچیدگی در پاسخ های متنوع گونه های مختلف حیوانی نمایان است و این احتمالاً به علت تفاوت ها در نژادهای مختلف و اساس ژنتیکی افراد مختلف است (Kuiper-Goodman ۲۰۰۴). آثار این سموم می توانند سیستم های تولیدمثلی، ایمنی، فعالیت هورمونی و یا ارگان های خاص را شامل شوند. همچنین می توانند به عنوان نوروکسین عمل کنند. یکی دیگر از آثار در معرض این مواد قرار داشتن، می تواند ناهنجاری ها تکوینی از جمله نقص های نوزادان باشد. در کنار این آثار که عموماً ارگان خاصی را تحت تاثیر قرار می دهند (Richard ۱۹۹۱; Sharma ۱۹۹۳; CAST ۲۰۰۳; Kuiper-Goodman ۲۰۰۴).

در انسان سموم قارچی می تواند باعث بروز مایکوتوکسیکوز حاد شود (Peraica et al. ۱۹۹۹; CDC ۲۰۰۰). سرطان زایی، بیشترین تاثیر طولانی مدت شناخته شده این سموم بر روی انسان است. تحقیقات همه روزه نشان دهنده افزایش بازشناخت تاثیرات بالقوه این سموم بر روی سلامتی انسان است. در سال های اخیر گونه *stachybotrys* که به ندرت برای انسان بیمارزایی ایجاد می کند به علت سموم قدرت مندش مورد توجه قرار گرفته است. تعدادی از مرگ و میر نوزادان در ارتباط با این گونه گزارش گردیده است (Jarvis ۲۰۰۲; CDC ۲۰۰۰).

بیشترین راه مواجهه با سموم قارچی سیستم گوارشی است؛ با این وجود سایر مسیرها از جمله تنفس، برخورد مستقیم و انتقال غیر فعال در نتیجه عفونت قارچی نیز گزارش شده است (CAST ۲۰۰۳). از منابع اصلی آلوده کننده جامعه انسانی می توان به محصولات کشاورزی آلوده همانند حبوبات و غلات (به طور مستقیم) و محصولات حیوانی از جمله گوشت، شیر و تخم مرغ (به طور غیر مستقیم) ناشی از سیستم های دامپروری نادرست، اشاره نمود. نتایج تحقیقات زیادی نشان دهنده انتقال آفاتوکسین ها از غذای دام به محصولات شیری است که در این زمینه آفاتوکسین M_1 از بقیه انواع حضور بیشتری دارد. (WHO ۱۹۹۷; Watson ۱۹۸۵; FAO ۲۰۰۱).

تاثیرات خطرناک در معرض مایکوتوکسین قرار گرفتن انسان به اشکال گوناگون شدت های متفاوت و اهمیت های بالینی دیده می شوند. مصرف غذاهای بسیار آلوده به سموم قارچی در بردارنده حوادث تحریک شدید سم در جمعیت انسانی می باشد. یک خصوصیت مهم مایکوتوکسیکوز علائم بالینی پیچیده و آرایه ها و نشانه های مشترک با سایر بیماری ها می باشد. در نتیجه تشخیص مایکوتوکسیکوز علائم بالینی پیچیده و آرایه ها و نشانه های مشترک با سایر بیماری ها می باشد. در نتیجه تشخیص مایکوتوکسیکوز منوط به انجام آزمایشات دقیق است (Etzel ۲۰۰۶; Kuiper-Goodman ۲۰۰۴). تاثیرات بلند مدت آلودگی به مقادیر کم

ماکوتوکسین ها بر سلامتی انسان مختلف است، اما به طور اصولی شامل سرطان می شود. به هر حال، بیماری های انسانی منتج از مایکوتوکسین ها می تواند فرای تصور، از یک مشکل بهداشتی عمومی بسیار بزرگتر گردد و این به دلیل باز زمانی طولانی تا بروز بیماری ها حتی در صورت آلودگی با مقادیر زیاد توکسین است (Hesseltine ۱۹۸۵). همچنان به مانند سموم آفت کشتایج مادام العمر آلودگی با مواد شیمیایی بر روی زندگی روزمره در حال بررسی است (Forrest and Riley ۲۰۰۴; NAS ۲۰۰۴).

اهمیت مشکلات بهداشتی ناشی از مایکوتوکسین ها از حضور طبیعی اینها به عنوان آلودگی حیوانات و غذاها نتیجه می شود. متأسفانه بعد از دهه ها تحقیق بر روی تاثیرات سموم قارچی (به عنوان آلودگی های اجتناب ناپذیر غذایی) جنبه های حیاتی روی اثرات بر سلامت انسان نامشخص مانده است. در این میان گزارشات موجود بدون وجود هیچ مدرک علمی کاملی مایکوتوکسین ها را مسئول بروز بسیاری از بیماری ها می دانند (CAST ۱۹۸۷; Kuiper-Goodman ۲۰۰۴).

۲-۱: مایکوتوکسین های اصلی

خیلی از مایکوتوکسین هایی که در محصولات غذایی و کشاورزی سبب ایجاد آسیب های جدی به سلامت انسان و حیوانات می شوند. اما از میان همه مواردی چون آفلاتوکسین ها (AF)، اوکراتوکسین ها و فومونیزین ها، زیرالون و تریکوتسین ها حائز اهمیت بیشتری هستند (FAO ۲۰۰۱).

زیرالون^۱ و تریکستین ها^۲ (FAO ۲۰۰۱)، AFS و فومونیزین ها، تریکوتسین ها و پاتولین و آلکالوئید های چاودار^۳، مایکوتوکسین هایی هستند که درجه اول اهمیت در موضوعات مرتبط با سلامت قرار دارند (CAST ۲۰۰۲، Etzel ۲۰۰۱، FAO ۲۰۰۳).

عملکرد مایکوتوکسین ها در یک سیستم سه جزئی قابل بررسی است: متابولیسم و توکسیکولوژی، سلامت و باروری بعد از آلوده شدن (با هضم، تنفس یا تماس پوستی) سمیت مایکوتوکسین ها بوسیله یکسری اتفاقات متوالی مشخص می شوند شامل جذب، دگرگونی، برهمکنش های مولکولی، توزیع و ترشح سموم و متابولیت (FAO ۲۰۰۱).

۱-۲-۱: آفلاتوکسین ها

آفلاتوکسین ها مشتقات دی فورانوکومارین هستند که از طریق مسیر پلی کتید در بسیاری از گونه های *Aspergillus flavus*، *A. parasiticus* و به ندرت *A. nomius* تولید می شوند که این قارچ ها آلوده

^۱ zearalenone

^۲ trichothecenes

^۳ ergot

کننده های اصلی محصولات کشاورزیند. اینها دارای آثار سمومیت ، سرطان زایی ، جهش زایی ، تراژونیک بر روی حیوانات آزمایشگاهی هستند. (Abdel – Wahnabet al. ۱۹۹۸, ۱۹۹۹b, ۲۰۰۵, ۲۰۰۶)

آفلاتوکسین ها (AFs) مهمترین سمی است که به صورت گسترده در محصولات کشاورزی بخصوص حبوبات و آجیل ها یافت می شود که به طور مستقیم بر روی سلامت انسان تاثیر گذار است. (Busby and Wogan ۱۹۶۹ . Goldblatt ۱۹۸۴)

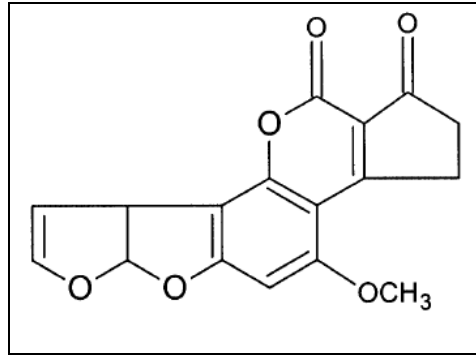
اگرچه تاکنون ۲۰ نوع AFS شناسایی شده اند تنها چهار نوع از این ها به طور طبیعی یافت می شوند و آلوده کننده های مهم خوراک دام و انسانند. این چهار نوع شامل G_1, B_1, B_2 و G_2

می باشند (شکل ۱). AFB_1 یک سرطان زای قدرتمند است که به طور طبیعی در گونه های *Aspergillus* تولید می شوند و توسط موسسه بین المللی تحقیقات سرطان به عنوان سرطان زای انسانی گروه ۱ طبقه بندی شدند (IARC ۱۹۹۳a). AFS به عنوان یکی از مایکوتوکسین های اصلی سمی و سرطان زا همچنان توجه اصلی تحقیقات را به خود اختصاص داده اند. (CAST ۲۰۰۳ , IARC ۱۹۹۳a , Goldbaltt ۱۹۶۹)

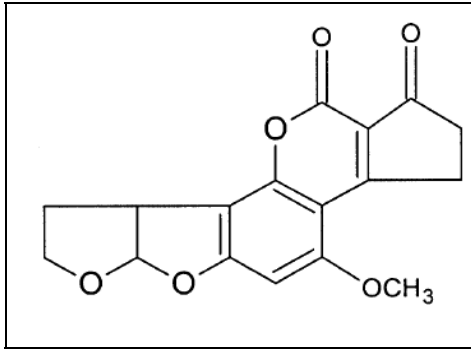
کبد اصلی ترین اندام مورد هدف سمیت و سرطان زایی آفلاتوکسین هاست. (Abdel _ Wahhab et al. ۲۰۰۶) اولین نشانه های هپاتوکستی ناشی از آفلاتوکسین ها ، تغییر شکل و انواع مختلفی از سمیت خونی است که می تواند در قالب بی اشتهایی، کسالت و تب خفیف نمایان شود. سمیت آفلاتوکسین می تواند به تورم کبد^۴ حاد و کشنده منجر شود که همراه است با استفراغ درد شکم تورم کبد و در نهایت مرگ. (Krishnamachari et al. ۱۹۷۵ , Etzel ۲۰۰۲) گسترده جغرافیایی گزارش شد که به مرگ ۱۲۳ نفر انجامید. (CDC ۲۰۰۴ , Azziz-Baumgartner et al. ۲۰۰۵ , lewis et al., ۲۰۰۵)

^۴ Hepatitis

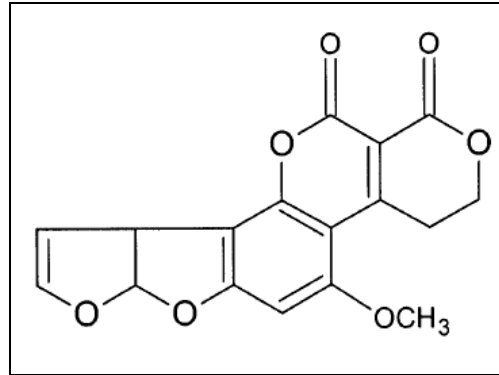
الف



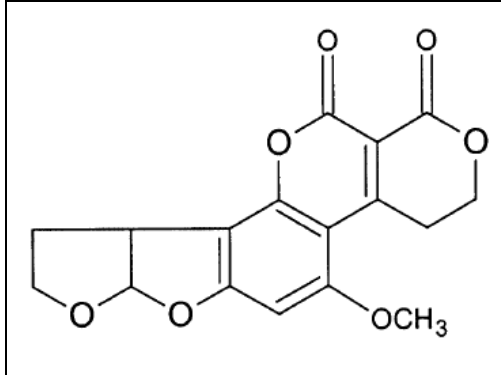
ب



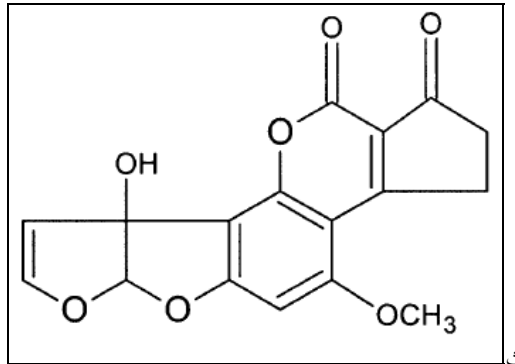
پ



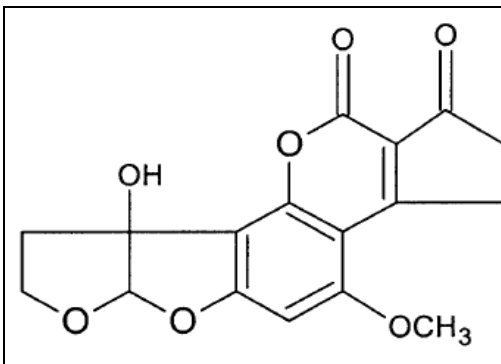
ت



ث



ج



شکل ۱-۱: ساختار شیمیایی آفلاتوکسین های مشهور. آفلاتوکسین B₁ (الف)، آفلاتوکسین B₂ (ب)، G₁ (پ)، G₂ (ت)، M₁ (ث)، M₂ (ج).

سیستم گوارش انسان بعد از مصرف غذای آلوده، AFS را به سرعت جذب کرده و از طریق سیستم گردش خون به کبد منتقل می‌کند (Fung and Clark ۲۰۰۴). بین ۱ تا ۳ درصد AFS هضم شده به طور غیر قابل برگشت به پروتئین‌ها و بازهای DNA متصل شده و محصولات جانبی ایجاد می‌کند؛ مانند آفلاتوکسین B-لیزین در آلبومین (Skipper and Tannenbaum ۱۹۹۰) بر اساس زمینه ژنتیکی گونه‌های حیوانات، آفلاتوکسین بوسیله اکسیژناز مخلوط با میکروزوم‌ها (MFOs^o) متابولیزه شده و متابولیت‌هایی مانند AFM_۱، AFQ_۱، P_۱، B_۱-۸ و ۹-اپوکسی ایجاد می‌کند. علاوه بر این در سلول‌های کبد ردوکتازهای سیتوپلاسمی بر روی AFB_۱ اثر کرده و آفلاتوکسیکول ایجاد می‌کند (Campbell and Hayes ۱۹۷۶) شکست پروتئین‌ها و بازهای DNA در سلول‌های کبدی منجر به سمیت کبد می‌شود. (Tandon et al. ۱۹۷۸) عامل اصلی تعیین‌کننده درجه سمیت و سرطان‌زایی AFS متابولیسم آنها می‌باشد (Patterson ۱۹۷۸).

ویژگی‌های جهش‌زایی و سرطان‌زایی و توانایی اتصال به DNA، AFS در تمامی بافت‌ها و گونه‌ها ناشی از فعال شدن آنها با آنزیم سیتوکروم P ۴۵۰ است که ایجاد آفلاتوکسین B_۱-۸ و ۹-اپوکسی می‌کند (WHO ۲۰۰۲). جمعیت‌های در معرض آسیا و غرب آفریقا و یروس‌هایتیت B و (همچنین هپاتیت C) می‌تواند ارتباط بین هضم آفلاتوکسین و سرطان کبد را پیچیده کند. (Wogan ۱۹۹۹) در کیودانگ چین، منطقه‌ای وجود دارد که هم آلودگی زیاد آفلاتوکسین و هم عفونت هپاتیت B به صورت بومی وجود دارد. در بافت توموری بیماران با کارسینومای سلول کبدی (HCC) جهش در ژن P۵۳ دیده می‌شود. خیلی از جهش‌های نقطه‌ای تبدیل GC یا G۷ می‌باشند. (Hsu et al. ۱۹۹۱)

آفلاتوکسین‌ها در تومورهای HCC می‌توانند در نقطه داغ^۶ در کدون ۲۴۹ ژن P۵۳ جهش ایجاد کنند (Bressac et al. ۱۹۹۱). موتاسیون ژن P۵۳ در نمونه خون قابل ردیابی است و به عنوان نشانگر زیستی در معرض بودن و تاثیر آفلاتوکسین محسوب می‌شود.

(Groopman and Kensler ۲۰۰۵).

AFS از سد جفت عبور کرده و اثرات سوئی بر سیستم جذبی گذارده و در نتیجه سبب افزایش مرگ و میر نوزادان تازه متولد شده شوند. (Maxwell ۱۹۹۸, Henricks ۱۹۹۷, wild et al. ۱۹۹۱)

آلودگی داخل رحمی به AFS را می‌توان از طریق سنجش محصولات جانبی AFB_۱-لیزین در خون محیطی سیاهرگ مادر، یا خون بند ناف تشخیص داده شود. مصرف غذا‌های آلوده به آفلاتوکسین توسط مادر هنگام شیردهی می‌تواند منجر به تجمع AFS و متابولیت‌های آنها در شیر شود. در جوامعی که در معرض قرار دارند در شیر مادران قابل تشخیص است

^o microsomal mixed function oxigenase

^۶ Hot spot

(Navas et al. ۲۰۰۵ , Saad et al. ۱۹۹۵) تخمین زده می شود که ۱٪ از AF موجود در رژیم غذایی حیوانات جذب شیر آنها می شود (Zarba et al. ۱۹۹۲). حدود ۹۵٪ متابولیت های AFB_۱ ترشح شده در شیر به فرم AFM_۱ دیده می شود هر چند فرم های AFB_۱ ، AFM_۲ ، AFG_۲ هم گزارش شده است. (Polyehronaki ۲۰۰۸ , Turconi et al. ۲۰۰۴)

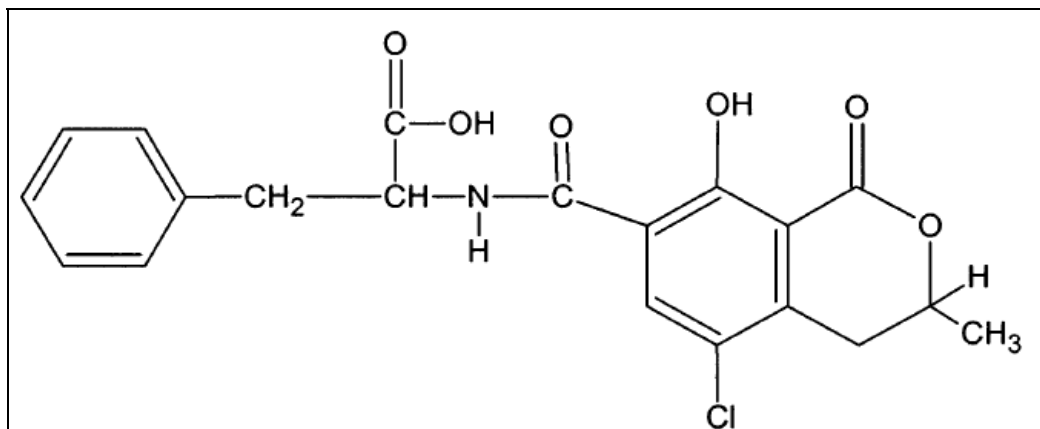
IARC (۱۹۹۳a) AFM_۱ را به عنوان یک کارسینوژن ثابت شده طبقه بندی کرده است. منتها هنوز اطلاعات کافی در مورد کارسینوژن بودن انسانی آن در دسترس نیست. و به نظر می رسد در گروه ۲B قرار گیرد. گزارشات حاکی از سمی بودن و پایین تر بودن درجه سرطان زایی AFM_۱ نسبت به AFB_۱ می باشد. (Neal et al. ۱۹۹۸)

مایکوتوکسین ها اثرات سوئی بر وضعیت سیستم ایمنی انسان دارند. (Jiang et al. ۲۰۰۵) در کودکان گامبایی آفلاتوکسین می تواند با کاهش سطح sIgA بزاق در ارتباط باشد. (Turner et al. ۲۰۰۳) افرادی که در دوران جنینی و در کودکی خود به طور مکرر در معرض AF بوده اند مستعد ابتلا به سرطان کبد در زندگی خود می باشند. علاوه بر این سرکوب ایمنی ناشی از مصرف AF نیز به عنوان یک فاکتور دیگر محسوب می شود (Maxwell ۱۹۹۸ , Wild et al. ۱۹۹۱). به این نحو AFS سبب افزایش حساسیت به عفونت و نقص مصنوعیت زایی شود (Hendricks ۱۹۹۷). اثرات مخرب مایکوتوکسین ها برای سیستم ایمنی حیوانات به خوبی مشخص شده است. در حالی که مدارک کافی جهت اثر این ترکیبات بر روی سلامت انسان در دسترس نیست.

یرقان نوزادی (NNJ) در خیلی از کشور های پیشرفته یکی از بیماری های مهم بشمار می آید. به تازگی مشخص شده است که AFS یک ریسک فاکتور برای این بیماری می باشد. بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیک ارتباط مشخصی را بین NNJ و در معرض بودن AF نشان نداده اند. (Hadhoud et al. ۲۰۰۱ , Golal et al. ۲۰۰۶). آفلاتوکسین ها همچنین می توانند با لکنت زبان اولیه دوران کودکی در ارتباط باشند و در واقع یکی از پیامد های احتمالی در معرض قرار گرفتن AF افزایش لکنت زبان است (Turner et al. ۲۰۰۳). AFS همچنین می توانند سبب القا آسیب های کبدی گشته که منجر به سیروز می شوند. (Amla et al. ۱۹۷۱ , Shank ۱۹۷۸)

۱-۲-۲: اوکراتوکسین A

اوکراتوکسین ها (شکل ۲) اولین گروه از مایکوتوکسین ها بودند که پس از AFS یافت شدند. OA یک متابولیت ثانویه قارچی است که در *Aspergillus* و *Penicillium* یافت می شود. اصلی ترین غذا های حاوی OA شامل آبجو ، حبوبات ، قهوه ، گوشت خوک (Petezinger and Weidenbach ۲۰۰۲) و محصولات نارگیل (Wanigasuriya et al. ۲۰۰۸ , Tafuri et al. ۲۰۰۴)



شکل ۱-۲: ساختار شیمیایی اوکراتوکسین نوع A.

حضور OA در غذاها گسترده است و می تواند در حیوانات آزمایشگاهی باعث ایجاد حالاتی از جمله نفروتوکسیستی هپاتوتوکسیک و تراتوژنتیک و سرطان زایی شود. (Kuiper_ Goodman , Abdel (۱۹۸۹ and Scott ۲۰۰۰ Wahhab همچنین در معرض قرار گرفتن OA می تواند ایجاد تومور های مجاری ادراری بالایی بنماید. (WHO ۲۰۰۱) عقیده بر این است که OA می تواند با سرطان بیضه در ارتباط باشد. اطلاعات اپیدمیولوژی پیشنهاد می کنند چنانچه افراد در اوایل زندگی در معرض عوامل سرطان زا قرار گیرند در استعداد پیشرفت این سرطان در سنین بالا حائز اهمیت است. (Schwartz ۲۰۰۲ , Drew et al. (۱۹۸۳.

OA ، IARC را جزء ترکیبات احتمالی برای انسان (گروه ۲b) تقسیم بندی کرده است. IARC (b ۲۰۰۳ در انسان سطح OA خون بند ناف دو برابر خون مادر است که نشان می دهد انتقال فعال از طریق جفت صورت می گیرد. (Zimmerli and Dick ۱۹۹۵ , Jonsyn et al. ۱۹۹۵) OA موجود در شیر پستان می تواند آسیب عملکرد کبد و پیشرفت تومور های مسیر ادراری در انسان را تقویت کند (Skaug (۱۹۹۹.

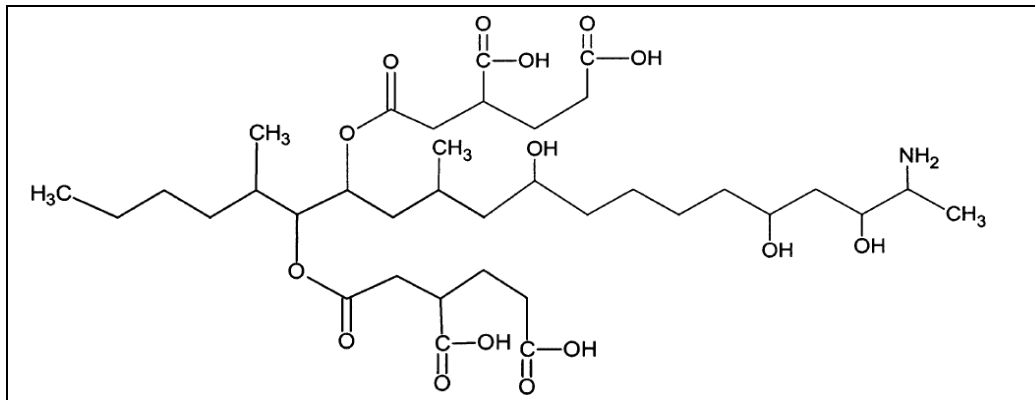
۱-۲-۳: فومونیزین ها

فومونیزین ها (شکل ۱-۳) میکوتوکسین هایی هستند که توسط حداقل ۱۱ گونه قارچی *Fusarium* شامل دو تا از پاتوژن های ذرت *F. verticillodes* ، *F. Proliferatum* تولید می شوند. فومونیزین ها از

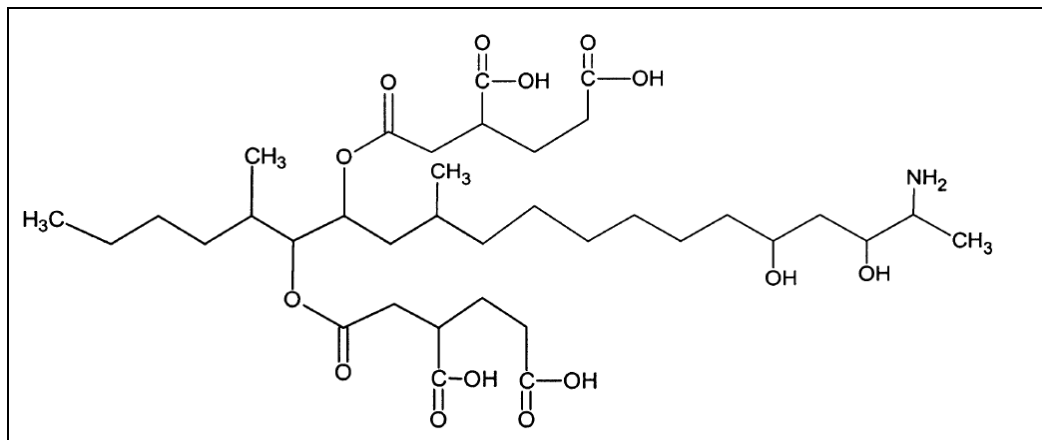
لحاظ ساختاری به گروه های کاملا متفاوتی تقسیم بندی می شوند. ۴ گروه با عناوین A, B, C, P معرفی می شوند. (Musser and Plathner ۱۹۹۷, Rheeder et al. ۲۰۰۲)

این مواد می توانند باعث اختلال در متابولیسم اسفنگولیپید ها شوند که در ساختار لیپو پروتئین و غشاء و به عنوان پیامبر ثانویه فاکتور های رشد، تمایزی و سایتوکسین ها نقش دارند. (Merrill et al. ۲۰۰۱)
 مطالعات اپیدمیولوژیک ارتباط بین فومونیزین B_۱ و سرطان مری می شود. (Shephard ۲۰۰۸)

الف



ب



شکل ۱-۳: ساختار شیمیایی فومونیزین ها. فومونیزین B_۱ (الف)، فومونیزین B_۲ (ب).

۱-۲-۴: پاتولین ها

مایکوتوکسین های تولید شده توسط *Penicillium Aspergillus* و گونه های *Byssochlamys* می باشد. اما *P. expansum* اصلی ترین گونه تولید کننده اینها می باشد. این قارچ عامل اصلی پوسیدگی سیب می باشد (Steinman et al. ۱۹۸۹, Davis and Diener ۱۹۸۷). اثرات سمی پاتولین به طور مستقیم بر روی سطح گلوکوتایون سلولی و عملکرد میتوکندری اثر می گذارد. علاوه بر این اثرات مستقیم بر غشاء پلاسمایی نیز دارد. همچنین دارای اثرات سرکوب کننده سیستم ایمنی و مهار سنتز DNA می باشد. (Sharma ۱۹۹۳ در مجموع می توان گفت که احتمالاً پاتولین دارای ویژگی های سرطان زایی می باشد اگرچه IARC شواهد لازم جهت اعلام سرطان زا بودن این ترکیب برای انسان را بدست نیاورده است.

۱-۲-۵: تریکوتیسین ها

این ترکیبات گروهی شامل بیش از ۲۰۰ متابولیت می باشند که از لحاظ ساختاری شبیه سرکوئی تریپنویید ها هستند. این ترکیبات ناشی از غذا و یا توسط قارچ های محیطی تولید شده و بوسیله سیستم حلقه تراسییک ۱۲ و ۱۳ اپوکسی ترکوتک ۹-۹-۹ ان شناسایی می شود. (Grove ۲۰۰۷)

اثر سمیت مرتبط مایکوتوکسین ها در انسان و حیوانات شامل بی اشتهایی، مشکلات معده، استفراغ و بیماری های خونی می باشد. (Pestka and Casale ۱۹۹۰) سیستم ایمنی به این سم ها حساسیت زیادی دارد. مقادیر کم این ماده سبب القا سریع و ناپایدار سایتوکین های پیش التهابی شده که منجر به تحریک سیستم ایمنی می شوند. در حالیکه مقادیر بالای تریکوتیسین سبب آپوپتوز بافت های لنفاوی شده که منجر به تحریک سیستم ایمنی می شود. (Pestka et al. ۲۰۰۴, CAST ۲۰۰۸)

۱-۲-۵-۱: سم T-۲

این سم (شکل ۱-۴) نماینده گروه بزرگی از تریکوتیسین ها که متعلق به کلاس شیمیایی نوع یک از تریکوتیسین های غیر چرخه ای می باشند. قارچ اصلی مسئول تولید سم T-۲، *F. sporotrichioides* می باشد (CAST ۲۰۰۳). بعضی از سویه های این قارچ ها مایکوتوکسین های مرتبط که متعلق به یک گروه شیمیایی هستند را تولید می کنند. یکی از اثر اصلی سمیت T-۲ و سایر تریکوتیسین ها مهار سنتز پروتئین هاست که با اختلال سنتز DNA, RNA همراه است. این عملکرد بر روی تقسیم سلول هایی مانند سلول های موجود در لوله گوارش، پوست، لنفوئید و اریتروسیت ها اثر می گذارد. همچنین منجر به کاهش سطح آنتی بادی، ایمنو گلوبولین ها و فاکتور های همورال مشخصی از جمله سایتوکسین ها می شود. (Niyo et al. ۱۹۹۱, Richard ۱۹۸۸)