

اثرات ویتامین E بر تغییرات سلولی و سینوزوئیدی کبد موش های نر (Albino-NMRI) ناشی از آفلاتوکسین B1

محمدحسین میرمومنی^۱، علی امینی^۲، اباضلت حسین زاده کلاگر^{۳*}، فریده امید^۴

۱- استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه رازی کرمانشاه ۲- دانشیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه رازی کرمانشاه

۳- استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه مازندران - بابلسر ۴- فوق لیسانس علوم سلولی و مولکولی

سابقه و هدف: آفلاتوکسین (AF) ها بخاطر داشتن اثرات سمیت بالا، سرطان زایی، تراژوژنی، سمیت روی سلولهای کبدی و خواص جهش زایی، خطرناکترین میکروتوکسین ها برای سلامت انسان می باشند. از میان ۲۰ آفلاتوکسین شناخته شده تنها آفلاتوکسین های B1، B2، G1 و G2 با قدرت سمیت $AFB1 < AFG1 < AFB2 < AFG2$ می باشند که بطور طبیعی در غذاهای انسان و دام یافت می شوند. AFB1 به عنوان یک عامل خطر در توسعه کارسینومای کبدی در انسان محسوب می شود. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات سمی AFB1 روی سلولهای کبدی و مهار اثر آن توسط α -توکوفرول است.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی، آفلاتوکسین B1 از قارچ *Aspergillus flavus* کشت شده در محیط سنتتیک SLS با استفاده از سیلیکاژل کروماتوگرافی لایه نازک استخراج گردید. سپس $40 \mu\text{g}$ و 2mg VitE با $2 \text{mg VitE} + \text{AFB1}$ بطور جداگانه در 0.2 میلی لیتر روغن زیتون (به عنوان حلال) حل گردید. این مخلوط ها سپس به ۵۰ موش جوان سفید آزمایشگاهی از نژاد Albino-NMRI (با وزن تقریبی ۳۴-۲۲ گرم) که در پنج گروه کنترل (۲۰۰ میکرولیتر از آب)، حلال (روغن زیتون)، VitE، AFB1، و AFB1+VitE بطور تصادفی تقسیم شده بودند، روزانه به مدت ۳۰ روز خوراندند. در روز ۳۱ نمونه های کبدی برای مطالعه میکروسکوپی آماده شدند.

یافته ها: در بافت کبدی موشهای تیمار شده با AFB1 اندازه ی سلولها بزرگتر شده و محدوده سلولها چندان مشخص نبود و تعدادی از سلولها نیز تخریب شده بودند. حجم سینوزوئید کاهش یافته و گاه اصلاً مشخص نبودند. همچنین تعداد هسته های بزرگ بیشتر از هسته های کوچک بود. در سلولهایی که دارای دو هسته بودند اکثراً مرز مابین دو هسته مشخص نبود و در همدیگر تداخل نشان می دادند و یا به نظمی رسد که تقسیم هسته ها ناتمام مانده است. در بافت کبدی گروه AFB1+VitE افزایش مساحت سلولی ($1117/5 \pm 2/5 \mu\text{m}^2$) نسبت به نمونه کنترل ($1116/5 \pm 2 \mu\text{m}^2$) دیده شد اما این تفاوت بین موشهای گروه AFB1 ($1116 \pm 1/2 \mu\text{m}^2$) و AFB1+VitE نیز در حد معنی داری مشاهده شد ($p < 0.01$).

نتیجه گیری: ویتامین E می تواند به عنوان یک ترکیب کاهش دهنده اثرات سمی مواد اکسیدانت موجود در رژیم غذایی از جمله آفلاتوکسین B1 باشد و اثرات کاهشی آن در مقابل هپاتوتوکسیته آفلاتوکسین B1 احتمالاً از طریق تجمع NADPH-اکسیدازها و توقف تولید سوپر اکسیدها است.

واژه های کلیدی: آفلاتوکسین B1، ویتامین E، α -توکوفرول، سلولهای کبدی، تغییرات مورفولوژیکی.

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره نهم، شماره ۶، بهمن - اسفند ۱۳۸۶، صفحه ۱۳-۲۱

مقدمه

بالایی هستند (۲۰۱). آفلاتوکسین ها از نظر ساختاری متنوع می باشند. چهار نوع اصلی آفلاتوکسین های B1، B2، G1 و G2 است که توسط سه گونه از قارچ *Aspergillus* (*A.flavus*، *A.nominus* و *A.parasiticus*) تولید می شوند (۳ و ۴). میزان تولید

آفلاتوکسین ها از جمله محصولات ثانویه ای هستند که توسط قارچ های متفاوتی تولید می شوند و دارای قدرت سمی

است (۱۲). همچنین AFB1 نه تنها به عنوان یکی از عوامل کلاس اول کارسینوژن انسانی معرفی شد، بلکه دارای اثرات تراژونی نیز می باشد به عنوان مثال محققین خوراندن ۰/۱ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن خرگوش را مینیمم غلظت دوز تراژونی این حیوان در طی ۶ الی ۱۸ روز خوراندن می دانند (۱۳ و ۱۴). در این تحقیق اثر این سم روی سلولهای کبدی و مهار اثر آن توسط α -توکوفرول مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

تهیه و کشت قارچ: اسپورهای قارچ *A. flavous* از کلکسیون قارچ های ایران (کرج) تهیه و سپس بر روی محیط Potato dextrose agar به روش عمومی در دمای 26 ± 1 درجه سانتیگراد کشت و نگهداری شدند. برای تولید آفلاتوکسین، اسپور قارچ به محیط سنتتیک SLS که شامل ۸۵ گرم Sucrose، ۱۰ گرم Asparagine، ۳/۵ گرم $(NH_4)_2SO_4$ ، ۱۰ گرم KH_2PO_4 ، ۲ گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۷۵ میلیگرم $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ، ۱۰ میلیگرم $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۵ میلیگرم $MnCl_2$ ، ۲ میلیگرم از هر یک از ترکیبات $Ammonium molybdate$ ، $Na_2B_2O_7$ و $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ در یک لیتر آب مقطر با pH کل معادل ۴/۵ بود، در شرایط دمایی فوق به مدت یک هفته در تاریکی کشت داده شد (۱۵).

استخراج آفلاتوکسین B1: محیط های رشد یافته قارچ بر اساس روش Shenasi و همکاران در استن آسیاب شد (۱۵). سپس به محلول صاف شده هم حجم کلروفرم گرم افزوده شد و با استفاده از کیف جداکننده فاز آبی جدا گردید. این محلول در Rotary Vapator قرار گرفت و محتوی تغلیظ شده آفلاتوکسین در حجم کل محلول به ۲-۳ میلی لیتر تهیه گردید.

برای جداسازی آفلاتوکسین B1، از کروماتوگرافی لایه نازک (Thin layer chromatography/ TLC) تهیه شده با سیلیکاژل به روش عمومی استفاده شد. باند آفلاتوکسین B1 بعد از نشانگذاری در نور ماوراء بنفش، در کنار استاندارد تهیه شده از شرکت Sigma، تراشیده شد. تراشه ها در کلروفرم حل شده و صاف گردیدند. کلروفرم صاف شده در شیشه های کوچک تاریک ریخته و جهت خشک نمودن روی بن ماری قرار داده شد. جهت تسریع در عمل خشک شدن از گاز نیتروژن استفاده گردید. آفلاتوکسین B1 استخراج شده در این روش در روغن زیتون جهت استفاده های بعدی حل شد.

سم آفلاتوکسین توسط این گونه های قارچی روی سوبستراهایی همچون غلات، انجیر، پسته، دانه های روغنی، تنباکو، بادام زمینی بسیار زیاد است (۵). البته محصولات لبنی نیز می توانند به عنوان منبع غیر مستقیم آفلاتوکسین عمل نمایند. هنگامی که دام ها از مواد غذایی آلوده به آفلاتوکسین B1 تغذیه نمایند در بدن آنها به طور متابولیکی آفلاتوکسین B1 به شکل هیدروکسیله ای که آفلاتوکسین M1 نامیده می شود متابولیزه می گردد (۶). بنابراین جذب غذایی آفلاتوکسین اغلب از طریق مصرف مواد غذای آلوده فوق و سایر محصولات مستعد آلودگی به قارچ های *Aspergillus* صورت می گیرد. از نظر شیمیایی، آفلاتوکسین ها بواسطه داشتن نقطه ذوب بالا (شکل ۱) مقاومت بسیار بالایی را در مقابل حرارت نشان می دهند بطوریکه مطالعات نشان داده است در ۱۲۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۵ دقیقه فقط یک صدم فعالیت سمی آن کاسته می شود. برای غیر فعال کردن آفلاتوکسین ها در ۱۲۰ درجه سانتی گراد ۴ ساعت وقت لازم است. بنابراین نابودی آفلاتوکسینها توسط حرارت بدون آسیب رساندن به ارزش تغذیه ای مواد خوراکی غیر ممکن است (۴).

آفلاتوکسین ها (بخصوص آفلاتوکسین B1) از مواد سرطان زایی هستند که بخودی خود سرطان زا نبوده و بعنوان پروکارسینوژن هستند (۷). در مقابل ترکیبات آنتی اکسیدانتی متفاوتی در بدن حیوانات وجود دارند که وقتی با غلظت های کم در مجاورت مواد قابل اکسیداسیون قرار گیرند به میزان قابل توجهی اکسیداسیون آن ماده را کاهش داده و یا مهار می نمایند از جمله این ترکیبات مهم ویتامین E است (۸). ویتامین E در حالت طبیعی به هشت فرم مختلف $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -توکوفرول و $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -توکوترینول وجود دارد. همه اینها دارای پتانسیل نسبی فعالیت آنتی اکسیدانتی هستند اما α -توکوفرول بیشترین فرم فعال مؤثر در جلوگیری از علائم کمبود ویتامین E می باشد (۹).

نظر به اینکه قدرت سمیت کلیه آفلاتوکسین ها از آفلاتوکسین B1 کمتر است، متابولیسم آفلاتوکسین B1 به خاطر داشتن بافت هدف کبدی، در گونه های مختلف حیوانات به منظور پی بردن به میزان حساسیت و مقاومت حیوان به سرطان زاهای کبدی همواره مورد توجه محققین بوده است (۱۰ و ۱۱). بطوریکه آلودگی به هپاد نایروس ها و مسمومیت با AFB1 به عنوان دو عامل خطر اصلی در ایجاد کارسینومای کبدی انسان مورد توجه

طول و عرض سلولها را به دست آورده و حاصل ضرب آنها به عنوان مساحت سلول منظور گردید. سپس برای بررسی و آنالیز داده ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) و Tukey's test استفاده گردید.

یافته ها

استخراج آفلاتوکسین B1: برای مطالعه اثرات متفاوت AFB1 روی بافت کبدی ابتدا اسپورهای قارچ A. flavus در محیط مایع در شرایط مطلوب فوق کشت شد. سپس باند آبی رنگ توکسین آفلاتوکسین B1 بعد از نشانه گذاری در زیر تابش نور UV با توجه به استاندارد، از سیلیکاژل TLC (شکل ۱) به روش فوق استخراج و تهیه شد.

اثر آفلاتوکسین B1 و α -توکوفرول بر مورفولوژی سلولهای کبدی: مطالعات مورفولوژیکی از بررسی لامهای کبدی رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین-ائوزین تیمارهای مختلف کنترل، حلال، AFB1، VitE و AFB1+VitE که از پنج گروه ده تایی موش های نر ۳۴-۳۲ گرمی تهیه شده بودند انجام شد (شکل ۲). همانطوریکه در شکل ۲ آمده است بافت کبدی موشهای کنترل و تیمار شده با حلال و VitE، طبیعی است. سلولهای هیپاتوسیت چند وجهی بوده و قطری حدود ۳۰-۲۰ میکرومتر دارند. لوپهای کبدی مشخص بوده و نحوه پیوستگی هیپاتوسیت با همدیگر واضح و روشن می باشد. زمینه سیتوپلاسمی یکنواخت و دانه دار است. سلولهای هیپاتوسیت دارای هسته های کوچک و بزرگ به تعداد یک یا دو عدد بوده و سینوزوئیدها دارای دیواره مشخصی هستند و سلولهای کوپفر قابل تشخیص می باشند. سطح هر سلول هیپاتوسیت از طریق فضای دیس (Disse)، با دیواره سینوزوئیدها و سطوح دیگر هیپاتوسیت ها، در تماس می باشد. موشهای گروه حلال نیز مورفولوژی شبیه به گروه کنترل داشتند. بنابراین مابین دو تیمار (حلال و کنترل) هیچ نوع تفاوت مورفولوژیکی وجود ندارد. در نتیجه سایر گروهها تنها با گروه کنترل مقایسه گردید.

در بافت کبدی موشهای تیمار شده با AFB1 اندازه سلولها بزرگتر شده و محدوده سلولها چندان مشخص نبود و تعدادی از سلولها نیز تخریب شده بودند. حجم سینوزوئید کاهش یافته و گاه اصلاً مشخص نبودند. همچنین تعداد هسته های بزرگ بیشتر از هسته های کوچک بود، در سلولهایی که دارای دو هسته بودند اکثراً

تهیه موش سفید و شرایط نگهداری: موش های سفید آزمایشگاهی از نژاد Albino-NMRI، از مؤسسه تحقیقاتی سرم سازی رازی تهیه و در قفس های مخصوص تحت شرایط کنترل شده دمایی محیط (۲۲±۲ درجه سانتیگراد)، رطوبتی (۳۰ تا ۴۰ درصد) و پر بود نوری ۱۲ ساعته نگهداری و پرورش یافتند. در طول آزمایش موش ها به وسیله غذای آماده (به فرم pellet تهیه شده از شرکت خوراک دام پارس تهران) و با آب آشامیدنی شهر کرمانشاه تغذیه شدند و به فاصله هر دو روز یک بار قفس ها نظافت گردیده و غذای مانده جمع آوری و مجدداً غذای تازه در دسترس موشها قرار گرفت.

تیمارهای موش های نر: تعداد ۵۰ راس موش نر جوان Albino-NMRI با وزن ۳۴-۳۲ گرم، بطور تصادفی در ۵ گروه ۱۰ تایی براساس روش ورما و همکاران تقسیم گردیدند (۱۶). هر یک از گروه ها در قفس های جداگانه در شرایط یکسان آزمایشگاهی فوق نگهداری شدند. سپس گروه کنترل ۰/۲ میلی لیتر آب، گروه حلال ۰/۲ میلی لیتر روغن زیتون، گروههای VitE، AFB1 و AFB1+VitE به ترتیب محلولهای ۲ میلی گرم α -توکوفرول، ۴۰ میکروگرم آفلاتوکسین B1 و ۲ میلی گرم α -توکوفرول همراه با ۴۰ میکروگرم آفلاتوکسین B1 (که هر یک بصورت تازه در ۰/۲ میلی لیتر روغن زیتون به روش ورما و همکاران (۱۶) تهیه شدند)، را بصورت خوراکی دریافت کردند.

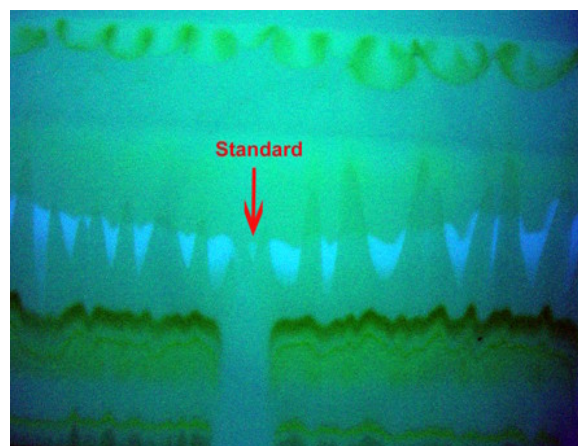
مقطع گیری بافت کبدی: بمنظور بررسی اثرات هیستولوژیکی و سیتولوژیکی آفلاتوکسین و α -توکوفرول در موش نر، هر یک از موش ها در روز سی و یکم به وسیله اثر بیهوش شدند. سپس کبد موش ها خارج گردید و حداقل بمدت ۲۴ ساعت جهت فیکساسیون در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار گرفت. برای تهیه اسلاید های بافتی، ابتدا روش پاساژ بافتی به وسیله ی پارافین جامد، به روش عمومی انجام شد. سپس برش هایی با ضخامت ۶ و ۷ میکرون بوسیله میکروتوم دوار ساخت شرکت Leitz مدل ۱۵۱۲، در تکرارهای متعدد بصورت سریال، تهیه گردید. برای رنگ آمیزی بافت های کبدی از روش رنگ آمیزی معمولی هماتوکسیلین - ائوزین استفاده شد.

اندازه گیری ابعاد سلول های کبدی موش نر: برای اندازه گیری ابعاد سلولی، ابعاد ۴۰ عدد سلول از هر تیمار که بطور تصادفی انتخاب شده اند با استفاده از میکرومتر چشمی و صفحه ای شرکت المپوس اندازه گیری شدند. برای محاسبه مساحت سلولهای کبدی، ابعاد

AFB1+VitE نیز در حد معنی داری مشاهده شد. محدوده سلولها تقریباً "مشخص بود و با مصرف α -توکوفرول همراه با آفلاتوکسین تأثیر خاصی بر روی مساحت هسته های کوچک و پلی پلوئیدی سلولهای کبدی و قطر سینوزوئیدها مشاهده نشد و سینوزوئیدها در مقایسه با گروه آفلاتوکسین مشخص تر بودند.

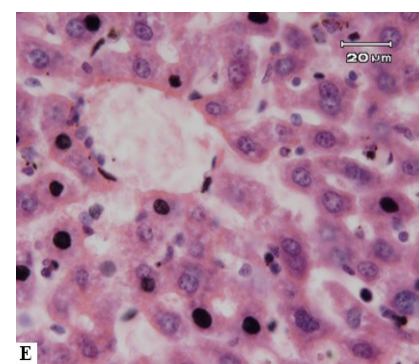
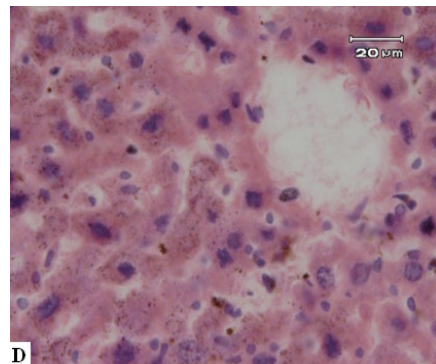
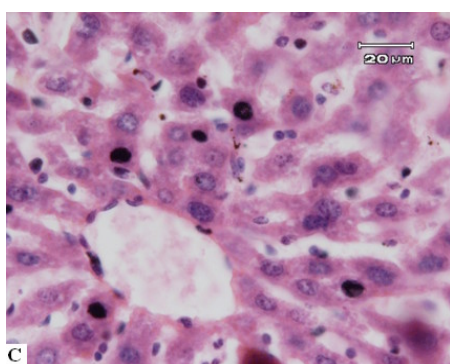
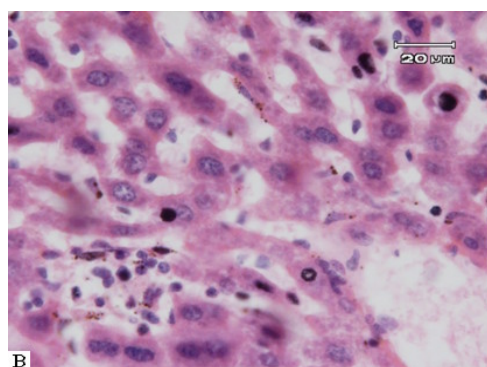
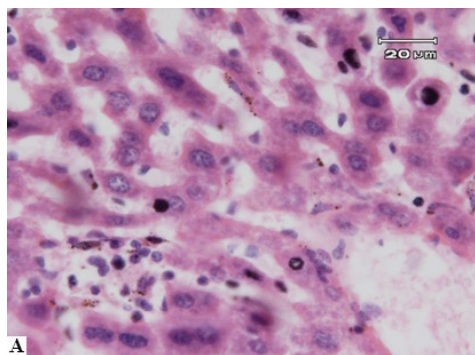
اثر آفلاتوکسین B1 و α -توکوفرول بر طول سلولهای کبدی: اندازه گیری طول ۴۰ عدد از هریک از سلولهای کبدی موش های نر کنترل و تیمار شده با AFB1 و AFB1+VitE نشان داد که افزایش طول سلولهای کبدی موشهایی که AFB1 دریافت کرده بودند با گروه کنترل دارای تفاوت معنی دار بود ($p < 0.05$). مطالعه طول سلولهای کبدی موشهایی که AFB1+VitE دریافت کرده بودند با گروه کنترل تفاوت معنی دار نشان دادند. گروهی که AFB1 دریافت کرده بودند با گروهی که AFB1+VitE دریافت کرده بودند نیز دارای تفاوت معنی داری بود ($p < 0.01$). این بدان معنی است که α -توکوفرول در ایجاد وضعیت عادی نقش مهمی داشته است (نمودار ۱-A).

مرز مابین دو هسته مشخص نبود و در همدیگر تداخل نشان می دادند و یا بنظر می رسید که تقسیم هسته ها ناتمام مانده است.



شکل ۱. آفلاتوکسین B1 در زیر نور UV جداسازی شده در سیلیکاژل به روش TLC

در بافت کبدی موشهای نری که AFB1+VitE دریافت کرده بودند تا حدودی افزایش مساحت سلولها دیده می شد و این تفاوت معنی دار بود. اما این تفاوت بین موشهای گروه AFB1 و



شکل ۲. مورفولوژی سلولهای کبدی رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین-ئوزین در تیمارهای مختلف کنترل (A)، حلال (B)، VitE (C)، AFB1 (D) و AFB1-VitE (E): عکس با استفاده از دوربین Practica متصل به میکروسکوپ Leitz در درشتمایی X1000 تهیه شد.

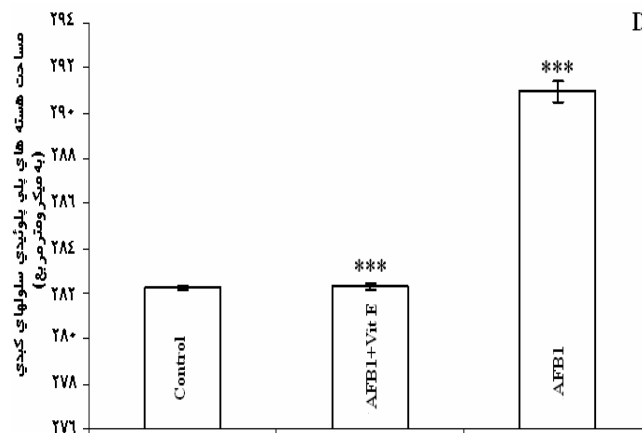
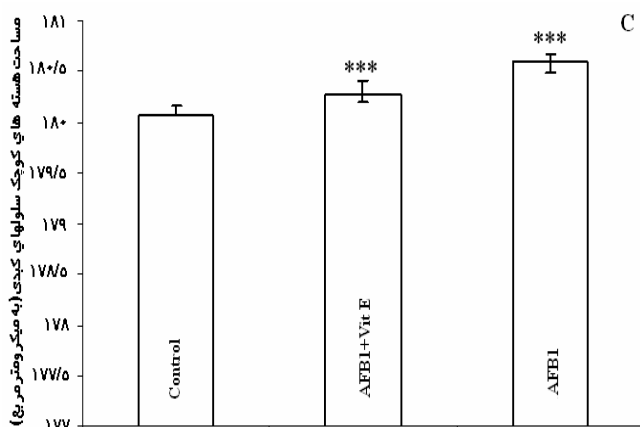
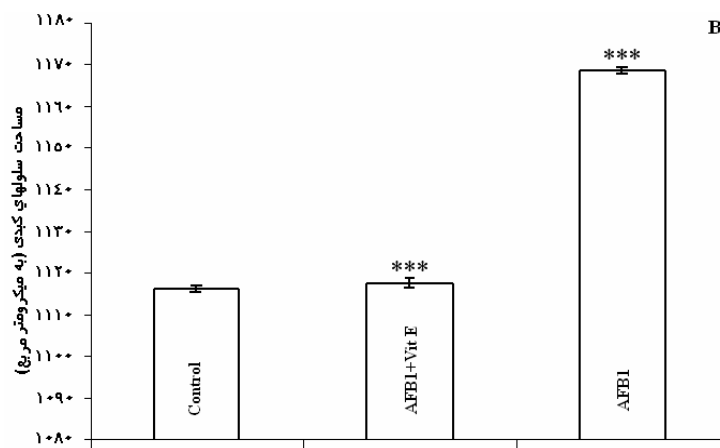
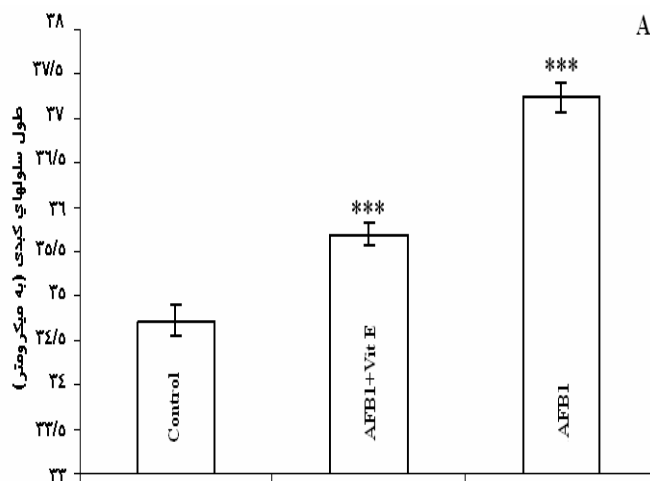
AFB1 به تنهایی و همچنین تفاوت معنی دار با گروه کنترل نشان دادند (نمودار C-۱).

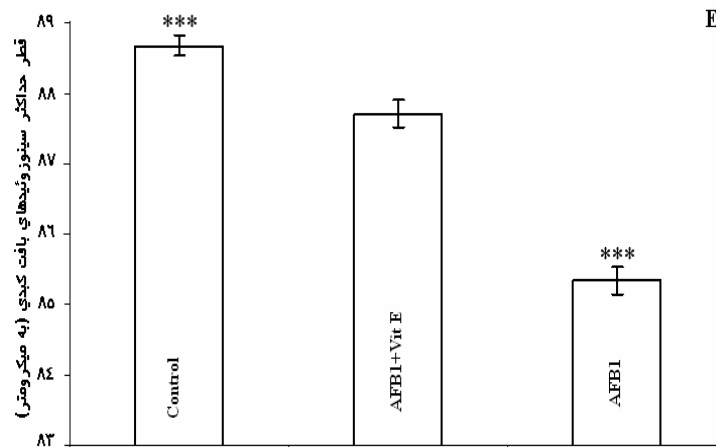
هسته های پلی پلوئید سلول های کبدی: بررسی نمودار حاصل از اندازه گیری مساحت هسته های پلی پلوئید (نمودار D-۱)، نشان داد که AFB1 باعث افزایش مساحت هسته های پلی پلوئید در مقایسه با گروه کنترل شده است و مقایسه گروه دریافت کننده AFB1 و AFB1+VitE تفاوت معنی داری بین دو گروه نشان داد. مقایسه گروه AFB1+VitE نیز با گروه کنترل تفاوت معنی داری نشان دادند.

اثر آفاتوکسین B1 و α -توکوفرول بر قطر حداکثر سینوزوئیدهای کبدی: سینوزوئیدها مویرگ های متخلخل بافت کبدی می باشند که فاقد شکل منظم اند. بررسی مقاطع مختلف تهیه شده از تیمارها در این تحقیق نشان داد که آفاتوکسین علاوه بر اثرات مورفولوژیک که بر روی سلولها دارد باعث کاهش قطر مویرگهای سینوزوئیدی می گردد که از نظر آماری با گروه کنترل تفاوت معنی دار نشان می دهد ($p < 0.01$) (نمودار E-۱). همچنین مقایسه گروههای AFB1 و AFB1+VitE با گروه کنترل از نظر آماری تفاوت معنی دار مشاهده شد.

اثر آفاتوکسین B1 و α -توکوفرول بر مساحت سلولهای کبدی: مطالعه مساحت سلولهای کبدی موش های نر در تیمارهای مختلف نشان داد مساحت سلولهای کبدی گروهی از موشها که AFB1 دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه کنترل دارای تفاوت معنی دار بودند ($p < 0.01$). مساحت سلولهای کبدی گروه AFB1+VitE با گروه کنترل تفاوت معنی داری نشان ندادند و مقایسه گروه AFB1+VitE با گروه AFB1 به تنهایی تفاوت آماری معنی داری نشان می داد ($p < 0.01$) و این بیانگر آن است که α -توکوفرول اثر افزایش مساحت سلولهای کبدی را خنثی کرده است (نمودار B-۱).

اثر آفاتوکسین B1 و α -توکوفرول بر مساحت هسته های کوچک سلول های کبدی: سلولهای بافت کبدی اکثراً چند هسته ای بوده و معمولاً دارای یک هسته بزرگ (پلی پلوئید) و یک هسته کوچک می باشند. در این تحقیق برای محاسبه مساحت هسته های کوچک، تعداد ۴۰ عدد از هسته های کوچک به صورت تصادفی انتخاب و با اندازه گیری طول و عرض آنها، حاصلضرب آنها بعنوان مساحت هسته های کوچک (Nuclear Area) تعیین گردید. هسته های کوچک سلولهای کبدی موش نری که AFB1+VitE دریافت کرده بودند تفاوت معنی داری با گروههای مصرف کننده





نمودار ۱. مقایسه اثر آفلاتوکسین B1 (AFB1)، α -توکوفرول (VitE) و آفلاتوکسین بعلاوه α -توکوفرول (AFB1+VitE) روی طول (A)، مساحت (B)، مساحت هسته های کوچک (C) و هسته های پلی پلوئیدی (D) سلول های کبدی و سینوزوئیدهای بافت کبدی موش نر کنترل (Control) تیمار شده با AFB1 و AFB1+VitE (E) $p < 0.001$ ***

بحث و نتیجه گیری

حدود ۴۰۰ میکروتوکسین شناخته شده اند که از بین آنها، آفلاتوکسین ها بخاطر داشتن اثرات سمیت بالا، سرطان زا، ترانوژنی، سمیت روی سلولهای کبدی و خواص جهش زا، خطرناکترین میکروتوکسین ها برای سلامت انسان می باشند (۱۷). از میان ۲۰ آفلاتوکسین شناخته شده تنها انواع B1، B2، G1 و G2 که بطور طبیعی در غذاهای انسان و دام یافت می شوند از اهمیت بالایی برخوردار هستند (۱۸). انجمن بین المللی سرطان (International Agency for Research on Cancer/ IARC) همه این چهار نوع سم را در کلاس اول کارسینوژن ها با قدرت سمیت $AFB1 < AFB2 < AFG1 < AFG2$ معرفی نموده است (۱۹ و ۲۰). آفلاتوکسین B1 از جمله فراوانترین نوع آفلاتوکسین مشاهده شده در نمونه های آلوده قارچی است که بطور غالب توسط قارچهای جنس آسپرگیلوس از جمله *A. flavous* و *A. parasiticus* تولید می شود. این قارچ بطور گسترده روی مواد غذایی انسانی و حیوانی خصوصا دانه های روغنی و غلات رشد می کند (۲ و ۵). نظر به اینکه بافت هدف آفلاتوکسین B1 کبد می باشد لذا هنگامی که انسان و یا دام از مواد غذایی آلوده به آفلاتوکسین تغذیه نمایند در بدن آنها به طور متابولیکی AFB1 به شکل هیدروکسیله ای که آفلاتوکسین M1 نامیده می شود متابولیزه می گردد (۶). مطالعات Rastogi و همکاران نشان دادند خوردن دو بار در هفته از ۸۰ نانومول AFB1 به موشهای ماده Albino Swiss

(20 ± 2 گرمی) به مدت ۲۴ هفته می تواند به عنوان شروع کننده و پیش برنده سرطان در سلولهای کبدی باشد و نشان داد که می تواند سبب افزایش پراکسیداسیون لیپید های غشایی و کاهش محتوای گلوتاتیون سلولهای کبدی و پوستی گردد. آنها پیشنهاد نمودند که AFB1 می تواند منجر به تغییرات دژنره شدن سلولهای کبدی شود در این تحقیق دژنراسیون سلولی دیده شد که با مصرف ویتامین E این دژنراسیون کاهش یافت (۱۳). از نظر بیوشیمیایی مولکولی محققین نشان دادند توالی های معمولی، جهت اتصال AFB1 به DNA ترجیح داده می شوند، به موقعیت باز گوانین هدفی که در میان توالی بازی گوانین قرار گرفته باشد و یا گوانینی که در انتهای ۳' خود دارای باز سیتوزین باشد بستگی دارد. به عنوان مثال در سلول های لنفوبلاستوئید انسانی آنزیم نوترکیب CYP1A2 را بیان می کنند تغییر باز G:C به T:A (G:C to T:A) در اثر آفلاتوکسین B1 القاء شده است را در توالی GGGGGG (G نوکلئوتید هدف) نشان می دهند (۲۱). از سوی دیگر مطالعات *in vitro* نشان داد که متابولیت های موتاژنیک AFB1 به DNA متصل می شوند و می توانند باعث تبدیل G به T (G-to-T transversion) گردند (۷). برخلاف تصور اینکه AFB1 سبب جهش در نقطه داغ (Hot spot) کدون ۲۴۹ تومور ساپرسور پروتئین P53 شده و ایجاد P53 ناقص در سلولهای کارسینومای کبدی می نماید، محققین نشان دادند اگرچه هیچ

باعث جلوگیری از فعالیت آنها می گردد (۲۲). مهار پروتئین کیناز C به وسیله α -توکوفرول سبب مهار تکثیر سلول ماهیچه صاف می شود این حوادث در غلظت های اپتیمال α -توکوفرول در انسان به وقوع می پیوندد (۲۳ و ۲۴). همچنین در سلولهای آندوتلیال ترومبین فعال شدن PKC را القاء کرده و ترشح آندوتلین به وسیله α -توکوفرول مهار می شود (۲۲). با مهار PKC در مونوسیت ها، فسفوریلاسیون و ترانسلوکاسیون فاکتور سیستمیک P47 (Phox) هم مهار می شود در نتیجه NADPH-اکسیداز تجمع یافته و تولید سوپر اکسید مختل می شود (۲۵). مهار فعالیت PKC به وسیله α -توکوفرول در سطح سلولی وابسته به دفسفوریلاسیون پروتئین است که پروتئین فسفاتاز 2A (PP2A) می تواند بوسیله α -توکوفرول فعال شده و سبب دفسفوریلاسیون PKC شود (۲۶). نتایج این تحقیق نشان می دهد α -توکوفرول را می توان به عنوان یک ترکیب کاهش دهنده اثرات سمی مواد اکسیدانت موجود در رژیم غذایی از جمله آفلاتوکسین B1 معرفی کرد. لذا α -توکوفرول اثر کاهشی در مقابل هپاتوتوکسیته آفلاتوکسین B1 دارد که احتمالاً از طریق تجمع NADPH-اکسیدازها و توقف تولید سوپر اکسیدها انجام می دهد.

تغییری در این کدون یافت نشد اما AFB1 سبب تحریک متیله شدن جایگاه های نوکلئوتیدی CpG می گردد که در نتیجه کنترل سیکل سلولی به شدت تضعیف شده و کارسینومای کبدی توسعه می یابد (۱۲ و ۱۳).

تحقیقات اخیر بر نقش تنظیمی مواد غذایی از نظر آنتی اکسیدانتی، پتانسیل ایمنی و فعالیت های شبه هورمونی در اعمال بیولوژیکی تأکید دارند. توصیه های غذایی به بیماران مزمن بر مصرف غذاهای گیاهی به منظور دستیابی به سلامت بیشتر تأکید دارند. غذاهای گیاهی نظیر غلات حاوی مواد فتوشیمیایی (ترکیبات شیمیایی مشتق از گیاهان) و فیتو پروتکتیو (محافظت کننده های مشتق از گیاهان) هستند. اثرات بیولوژیکی مفید غذاهای گیاهی از نظر اثرات ضد سرطانی، ضد جهش زایی و ضد اکسیدانتی به این مواد بستگی دارند (۱۶ و ۲۱).

مطالعات محققین نشان داد آنتی اکسیدانتهایی نظیر ویتامین E، β -کاروتن و اوژنول از تشکیل پراکسید ممانعت به عمل می آورند. اوژنول فلفل و زردچوبه از اکسیداسیون روغن ها و چربیها جلوگیری می کنند. این مواد همچنین بوسیله پیوند با یون های فلزی مورد نیاز برای آنزیم های آغاز کننده پراکسیداسیون لیپیدها،

References

- Hwang JH, Chun HS, Lee KG. Aflatoxins in foods-analytical methods and reduction of toxicity by physicochemical processes. J KSABC 2004; 47(1): 1-16.
- Lee NA, Wang S, Allan RD, Kennedy IR. A rapid aflatoxin B1 ELISA: development and validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and soybeans. J Agric Food Chem 2004; 52(10): 2746-55.
- Rustom IYS. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. Food Chem 1997; 59(1): 57-67.
- Mandart AM, Hainaut P, Hollstein M. Genetic steps in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus. Mutat Res 2000; 462(2-3): 335-42.
- Namilki M. Antioxidants/ antimutagens in food. Crit Rev Food Sci Nutr 1990; 29(4): 273-300.
- White PD, Thomas JM, Kangro HO, et al. Predictions and associations of fatigue syndromes and mood disorders that occur after infectious mononucleosis. Lancet 2001; 358(9297): 1946-54.
- Young MR, Li JJ, Rincon M, et al. Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(17): 9827-32.

8. Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 1995; 18(1): 125-6.
9. Liu S, Manson JE, Lee IM, et al. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: The Women's Health Study. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(4): 922-8.
10. Cid A, Auwarakul P, Garcia Carranca A, Ovseiovich R, Gaissert H, Gissmann L. Cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region in transgenic mice and its modulation by tetradecanoyl phorbol acetate and glucocorticoids. *J Virol* 1993; 67(11): 6742-52.
11. Cockerill GW, Gamble JR, Vadas MA. Angiogenesis: models and modulators. *Int Rev Cytol* 1995; 159: 113-60.
12. Park US, Su JJ, Ban KC, Qin L, Lee EH, Lee YI. Mutations in the p53 tumor suppressor gene in tree shrew hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus infection and intake of aflatoxin B1. *Gene* 2000; 251(1): 73-80.
13. Rastogi S, Dogra RKS, Khanna SK, Das M. Skin tumorigenic potential of aflatoxin B1 in mice. *Food Chem Toxicol* 2006; 44 (5): 670-7.
14. Wangikar PB, Dwivedi P, Sinha N, Sharma AK, Telang AG. Effects of aflatoxin B1 on embryo fetal development in rabbits. *Food Chem Toxicol* 2005; 43(4): 607-15.
15. Shenasi M, Candlish AG, Aidoo KE. The production of aflatoxin in fresh date fruits and under simulated, storage conditions. *J Sci Food Agric* 2002; 82: 848-53.
16. Verma RJ, Nair A. Effect of aflatoxins on testicular steroidogenesis and amelioration by vitamin E. *Food Chem Toxicol* 2002; 40(5): 669-72.
17. O' Riordan MJ, Wilkinson MG. A survey of the incidence and level of aflatoxin contamination in a range of imported spice preparations on the Irish retail market. *Food Chem* 2008; 107(Issue 4): 1429-35.
18. Iamanaka BT, De Menezes HC, Vicente E, Leite RSF, Taniwaki MH. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. *Food Control* 2007; 18(5): 454-7.
19. Ammida Nagwa HS, Micheli L, Palleschi G. Electrochemical immunosensor for determination of aflatoxin B1 in barley. *Analytica Chimica Acta* 2004; 520: 159-64.
20. Chiavaro E, Dall'Asta C, Galaverna G, et al. New reversed-phase liquid chromatographic method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. *J Chromatogr A* 2001; 937(1-2): 31-40.
21. Fosslie E. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2000; 37(5): 431-502.
22. Reddy SV, Farid W. Properties of aflatoxin and it producing fungi. In [http:// www.aflatoxin.info/aflatoxin](http://www.aflatoxin.info/aflatoxin) 2005; 1-6.
23. Cachia O, Benna JE, Pedruzzi E, Descomps B, Gougerot Pocidalo MA, Leger CL. Alpha- tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. Attenuation of p47 (phox) membrane translocation and phosphorylation. *J Biol Chem* 1998; 273(49): 32801-5.

24. Ames BN, Gold LS. Chemical carcinogenesis: too many rodent carcinogens. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87(19): 7772-6.
25. Tasinato A, Boscoboinik D, Bartoli G, Maroni P, Azzi A. D- alpha- tocopherol- inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentrations, correlates with protein kinase C inhibition, and is independent of its antioxidant properties. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92(26): 12190-4.
26. Nanjee MN, Verhagen H, Van Poppel G, Rompelberg CJ, Van Bladeren PJ, Miller NE. Do dietary phytochemicals with cytochrome P-450 enzyme-inducing activity increase high-density-lipoprotein concentrations in humans? Am J Clin Nutr 1996; 64(5): 706-11.