

ارزیابی تاثیر آفلاتوکسین B₁ بر تمایز نورونی و تکوین هیپوکامپ موش های صحرائی

سارا الهوتی نظری^۱، نسیم حیاتی رودباری^{۱*}، کاظم پریور^۱، اکرم عیدی^۱

چکیده

مطالعه به بررسی تاثیرات آفلاتوکسین B₁ بر تکوین هیپوکامپ موش های صحرائی نوزاد پرداخته شد. در این مطالعه پس از تهیه و آماده سازی آفلاتوکسین B₁، از ۱۸ سر موش ماده ی باردار نژاد ویستار با سن چهار هفته و وزن متوسط 85 ± 10 گرم استفاده گردید. حیوانات در سه گروه شم (دریافت کننده ی روغن کنجد به عنوان حلال آفلاتوکسین B₁)، آفلاتوکسین B₁ و کنترل سالم تقسیم بندی شدند و در یک دوره ی تیماری سه ماهه جهت بررسی تغییرات ایمونوهیستوشیمی مارکرهای Ki-67، GFAP و NeuN یافت هیپوکامپ در موش های ویستار مورد استفاده قرار گرفتند. طبق نتایج بدست آمده از مطالعات ایمونوهیستوشیمی، گروه های تیمار شده با آفلاتوکسین B₁ کاهش آماری معنی داری در بیان Ki-67 و NeuN نسبت به گروه کنترل نشان دادند ($P < 0.01$). در حالیکه میزان بیان مارکر GFAP در مقایسه با گروه کنترل، افزایش آماری معنی داری ($P < 0.01$) یافته بود. از طرفی کاهش چشمگیری در بیان پروتئین های NeuN و Ki-67 و افزایش در میزان بیان GFAP مشاهده گردید که این یافته ها همراه با مشاهدات حاصل از عکس برداری ایمونوهیستوشیمی فلورسنت تایید گردید. آفلاتوکسین B₁ با ایجاد اختلال در میزان فعالیت و بیان پروتئین های حیاتی در ناحیه هیپوکامپ منجر به اختلال در تمایز نورونی و افزایش صدمات مغزی می شود که این علائم با کاهش شدید در NeuN و افزایش در GFAP اثبات گردید.

واژگان کلیدی: آفلاتوکسین B₁، Ki-67، GFAP، NeuN، هیپوکامپ.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۱۳

مقدمه

حافظه فرایندی است که توسط آن اطلاعات اکتسابی از طریق یادگیری ذخیره شده و مجدداً بازخوانی میشود برای اینکه یک تجربه قسمتی از حافظه شود، باید تغییرات عملکردی و ساختاری پایدار ایجاد گردد که نشانه ی آن تجربه در مغز باشد (۱). مطالعات رفتاری و زیست شناسی نشان میدهند که یادگیری و حافظه از فرایندهای متعدد مجزایی تشکیل شده اند. یادگیری فرایند کسب اطلاعات

جدید از دنیای اطراف بوده درحالی که حافظه به قابلیت حفظ و بازخوانی این اطلاعات گفته میشود (۲). هیپوکامپ بعنوان مرکز سیستم لیمبیک در حافظه است و در پردازش و بازیابی دو نوع حافظه آشکارکننده و ارتباطات فضایی در انسان و حیوانات نقش دارد. با توجه به عملکرد هیپوکامپ در فعالیت های شناختی و هیجانی تحقیقات وسیعی در رابطه با هیپوکامپ صورت می پذیرد و ارتباط آن با بیماری های رایج عصبی مورد بررسی قرار می گیرد (۳). برای مثال زوال عقل نوعی بیماری دژنراتیو پیش رونده است که سبب اختلال شدید در ظرفیت فکری در اثر از دست دادن یا آسیب دیدن سلول های عصبی مغزی می شود. بیماری آلزایمر شایع ترین اختلال تحلیل برنده عصبی است که به عنوان یکی از مهم ترین علل مرگ در سنین بالا محسوب می شود که در آن پلاک های پپتید آمیلوئید بتا به صورت داخل سلولی و خارج سلولی رسوب می کنند که وجود این پلاک ها در هیپوکامپ مانع از انتقال پیام عصبی می شود (۴). هیپوکامپ در لوب گیجگاهی مغز قرار دارد و از لحاظ آناتومیکی شامل هیپوکامپ اصلی (شاخ آمون)، شکنج دندانه دار، توده ریه ای و قشر انتوراینال است. هر یک از این نواحی از لایه های مختلفی تشکیل شده است که محل قرارگیری اجسام سلولی و زوائد نوروها است. تحقیقات جدید نشان می دهد که هر کدام از قسمت های هیپوکامپ مسئول عملکرد خاصی است که در بروز بیماری های عصبی دخالت دارد (۵). وجود مایکوتوکسینها در مواد غذایی یک مشکل اساسی در بهداشت عمومی است زیرا اثرات سرکوب کننده بر سیستم ایمنی، کبدی و عصبی دارند. مایکوتوکسین

۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (nasimhayati@yahoo.com)

ممکن بود به حداقل رسید. موش های صحرایی ویستار به صورت جداگانه در قفس های پلی کربنات حیوانات و بدون محدودیت در دسترسی به آب، غذا، لیوم قرار گرفتند. همچنین چرخه های روشن/ تاریکی (۱۲/۱۲ ساعت) در دمای ثابت (۲۲±۲) درجه سانتیگراد) و رطوبت (۵۵٪) نیز برای تمامی موش ها تعبیه گردید. پس از ۷ روز سازگاری، موش های صحرایی نژاد ویستار به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند و گروه های مورد مطالعه به مدت دو هفته، از هفته های دوم و سوم بارداری (روزهای ۸ تا ۲۱) با آفلاتوکسین B1 و روغن کنجد تیمار شدند.

گروه ۱. شم، تیمار با روغن کنجد به عنوان حلال آفلاتوکسین B1، ۰/۱ میلی گرم/ کیلوگرم از وزن موش
گروه ۲. آفلاتوکسین B1، تیمار با آفلاتوکسین B1، ۰/۱ میلی گرم/ کیلوگرم از وزن موش
گروه ۳. کنترل سالم، بدون هیچ تیمار

ایمونوهیستوشیمی

از نمونه های بافتی هیپوکامپ مغز در نوزادان پس از فیکس شدن در فرمالین بافر ۱۰٪ به روش رایج قالبهای پارافینی تهیه و یک برش به ضخامت ۳ میکرون تهیه و با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی مارکر Ki-67، NeuN و GFAP مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه ها با PBS در ۴ مرحله و به فاصله ۵ دقیقه شسته شدند. برای مارکهای فلورسانتی Ki-NeuN/67 از روش آنتی ژن رتریوال و برای مارکر GFAP از روش Heat induced antigen retrieval استفاده شد. به منظور بازیابی آنتی ژنی مارکهای Ki-67 و NeuN بر روی نمونه ها اسیدکلریدریک ۲ نرمال به مدت ۳۰ دقیقه ریخته شد. بافر بورات به منظور خنثی سازی اسید به مدت ۵ دقیقه اضافه گردید. نمونه ها با PBS شسته شدند. تریتون ۰/۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه به منظور نفوذ پذیر کردن غشاء سلولها استفاده گردید.

ها همچنین اثرات جهش زا و سرطان زا را پس از قرارگرفتن در معرض طولانی مدت با این مواد ایجاد میکنند. از جمله مایکوتوکسین هایی که مواد غذایی را آلوده میکنند، آفلاتوکسین ها مانند آفلاتوکسین B1 هستند که قدرتمندترین سرطان زای طبیعی اند (۶). مسمومیت ناشی از آفلاتوکسین B1 منجر به علائم افسردگی، بی اشتها، اسهال، زردی یا کم خونی می شود که می تواند منجر به مرگ شود، اما مطالعات بسیار اندکی تأثیر آفلاتوکسین را بر تنظیمات عصبی مورد بررسی قرار داده اند (۴). آفلاتوکسین ها به عنوان متابولیت های ثانویه سویه های قارچی *Aspergillus Flavus* و *Aspergillus Parasiticus* تولید میشوند. این قارچ ها می توانند در انواع کالاهای غذایی و خوراکی رشد کنند (۷). نشان داده شده که آفلاتوکسین B1 دارای وزن مولکولی پایینی بوده، بنابراین قابلیت انتشار فعال به درون انتروسیت ها را داراست و بر اساس این مکانیسم پیشنهاد شده که به راحتی در دستگاه گوارش جذب و وارد جریان خون می شوند. این سموم در جریان خون با آلبومین پیوند خورده و به نقاط مختلف بدن انتقال می یابند (۸). آفلاتوکسین همچنین می تواند سبب تخریب بافت مغزی و حافظه شود. از اینرو در این مطالعه به بررسی تاثیرات آفلاتوکسین B1 بر عملکرد سلول های هیپوکامپ مغزی در موش های ویستار پرداخته شد

مواد و روش کار

حیوانات تجربی و جنبه های اخلاقی

تمام مراحل مراقبت حیوانی و آزمایشات صورت گرفته کاملاً مطابق با معیارهای کمیته اخلاق مراقبت از حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران با کد اخلاق (IR.1398.055) انجام شد. در این مطالعه، هجده سر موش ماده نژاد ویستار (۸۵±۱۰ گرم، ۴ هفته) از انستیتوی پاستور تهران خریداری شدند. تعداد موش ها تا آنجا که

پروتئیناز k به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. در ادامه لام های بافتی مورد نظر به مدت ۱۰ دقیقه با محلول نفوذ پذیرکننده انکوبه و سپس مجدداً با PBS شستشو داده شدند. در مرحله بعد، محلول رنگ تانل (ScyTek-ACV999) به میزان ۵۰ میکرولیتر روی هر نمونه بافتی ریخته شد و مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید و پس از شستشوی نهائی با میکروسکوپ فلورسنت 5 LSM microscope fluorescent Zeiss مشاهده شدند. برای شمارش سلول های مرده ۵ فیلد در هر گروه مورد شمارش قرار گرفتند. سطحی معادل ۱ میلی متر مربع در هر گروه جهت شمارش در نظر گرفته شد. در این پروتکل جهت رنگ آمیزی نمونه های کنترل از هر دو محلول solution Enzyme-TUNEL و solution Lable-TUNEL به نسبت ۱ به ۹ استفاده شد. در حالی که برای نمونه های کنترل منفی تنها از solution lable-TUNEL استفاده گردید. سلول های آپوپتوز شده در این بافت، نقطه های روشن بودند که نمایانگر سلول های آپوپتوز شده ی نشان دار شده طی رنگ آمیزی تانل می باشند. هسته سلول ها به رنگ Propidium iodide (PI) به میزان ۱ میلی گرم/ میلی لیتر به عنوان محلول ذخیره که به میزان ۵۰۰ برابر در زمان استفاده رقیق شده بود، به صورت قرمز درآمدند و سلول های سبز رنگ تانل مثبت پس از ترکیب با رنگ قرمز هسته ای به صورت نارنجی رنگ از سلول های سالم قرمز رنگ قابل تفکیک و شمارش بودند.

تجزیه و تحلیل آماری

داده های بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ویرایش ۲۱ و با استفاده از آزمون های آماری-Kruskal Wallis و آنالیز واریانس یک طرفه با معنی داری $P < 0.05$ مورد بررسی قرار گرفتند.

مجدد با PBS شستشو داده شدند. سرم بز ۱۰ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه به منظور بلوک کردن واکنش آنتی بادی ثانویه به صورت رنگ اضافی زمینه اضافه شد. آنتی بادی اولیه رقیق شده (۱ به ۱۰۰) با PBS به نمونه اضافه گردید و بعد از ایجاد یک محیط مرطوب برای جلوگیری از خشک شدن بافت به مدت یک شب درون یخچال با دمای ۲ تا ۸ درجه قرار داده شد. روز بعد ظرف حاوی بافت از یخچال خارج شد و سپس ۴ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو داده شدند. به نمونه آنتی بادی ثانویه با رقت ۱ به ۱۵۰ اضافه گردید و سپس در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. بعد از آن نمونه از انکوباتور به اتاق تاریک منتقل گردید و بعد از ۴ بار شستشو برای مارکرهای NeuN و DAPI-Ki-67 و برای مارکر GFAP، DAB اضافه شد، سپس بلافاصله برداشته شد و روی نمونه PBS ریخته شد. در مرحله آخر نمونه توسط میکروسکوپ فلوروسنت و میکروسکوپ نوری مدل Olympus و با لنز ۴۰۰ برای تایید مارکرها مشاهده شدند.

رنگ آمیزی تانل

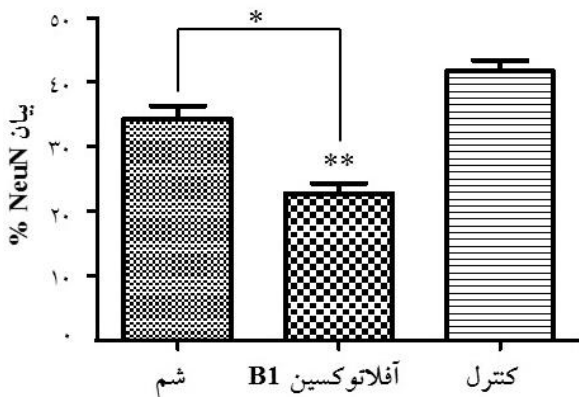
در این مطالعه جهت اندازه گیری تعداد سلول های آپوپتوز شده از رنگ آمیزی Tunnel استفاده شد. قطعه قطعه شدن فرآیند غیر قابل برگشتی است که حتی قبل از اینکه تغییراتی در نفوذپذیری غشا روی دهد صورت می گیرد. به نظر می رسد فعال شدن آندونوکلیاز هسته ای وابسته به کلسیم و منیزیم باعث این رویداد می شود. این آنزیم به طور انتخابی DNA را در محل بین واحدهای نوکلئوزومی می شکند و با نشان دار کردن آنزیمی توسط تانل که قادر است انتهای شکست ها در زنجیره DNA را شناسایی کند بررسی می شود. به این ترتیب که پس از پارافین زدایی، نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در گزیلول قرار گرفتند. سپس لام ها به ترتیب در الکل های ۹۰ و ۸۰ و ۷۰ آبدهی شدند. پس از آن، لام ها با استفاده از محلول PBS شسته شدند و سپس در

نتایج

ایمونوهیستوشیمی

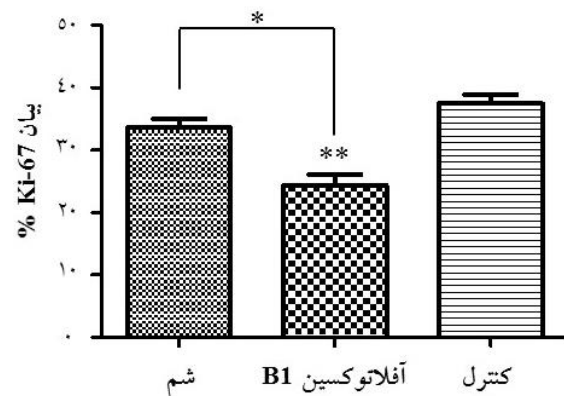
از رنگ آمیزی Ki-67 و DAPI برای بررسی میزان تکثیر سلولی در ناحیه هیپوکامپ استفاده شد. سلول های Ki-67 مثبت به رنگ سبز و هسته سلول ها به رنگ آبی مشاهده شد همانطور که در تصاویر میکروسکوپی حاصل از رنگ آمیزی مشخص است، در گروه تیمار شده با آفلاتوکسین B1 میزان بیان Ki-67 بسیار کمتر از گروه های شم و کنترل سالم بود (نگاره ۱) که این نتایج در بررسی های آماری نیز مشاهده شد گروه تیمار شده با آفلاتوکسین B1 ($24/29 \pm 3/1$) در مقایسه با گروه های کنترل ($37/45 \pm 2/47$) و شم ($33/5 \pm 2/44$) کاهش آماری معنی داری به ترتیب ($P < 0/05$) و ($P < 0/05$) پروتئین Ki-67 میزان تکثیر را نشان می دهد و افزایش این پروتئین در بافت نشان دهنده بالا بودن میزان تکثیر سلول در آن گروه می باشد.

در تصاویر زیر سلول های NeuN مثبت با رنگ سبز نشان داده شد و هسته سلول ها با DAPI رنگ شده و به رنگ آبی مشخص شد (نگاره ۳). آنالیز آماری حاصل از تصاویر در گروه های مختلف نشان داد که درصد بیان پروتئین NeuN در گروه های سالم ($41/6 \pm 2/8$) و شم ($34/3 \pm 3/5$) بوده و در این دو گروه با هم اختلاف معناداری مشاهده نشد. از سوی دیگر، بیان NeuN در گروه آفلاتوکسین ($22/77 \pm 2/72$) به صورت معناداری نسبت به گروه کنترل ($P < 0/01$) و شم ($P < 0/05$) کاهش یافته بود (نگاره ۴). پروتئین NeuN مارکر اختصاصی سلول های نورونی می باشد و افزایش بیان این پروتئین نشان دهنده بالا بودن تعداد سلول های نورونی در آن گروه می باشد.

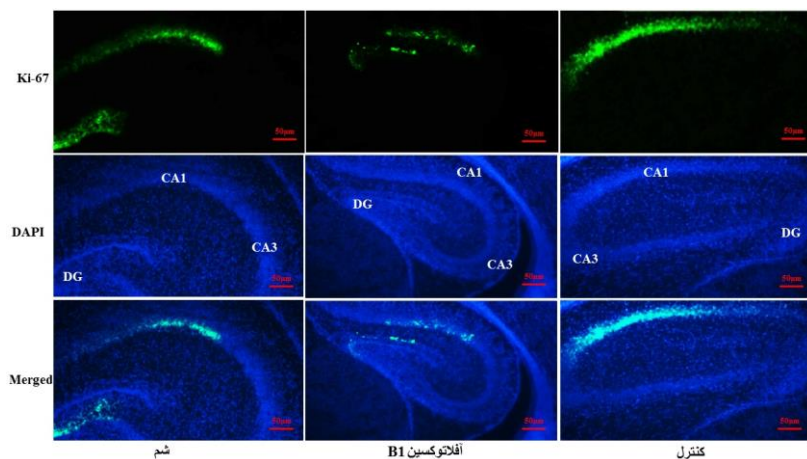


نگاره ۴. میزان بیان NeuN به عنوان مارکر نورونی در سلول های ناحیه هیپوکامپ مغزی موش های ویستار نوزاد. میانگین و انحراف معیار (Mean±SD) در گروه های مختلف مورد مطالعه در مدت ۳ ماه. $P < 0/001$ ، $P < 0/01$ ، $P < 0/05$ * نشان دهنده اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل سالم می باشد.

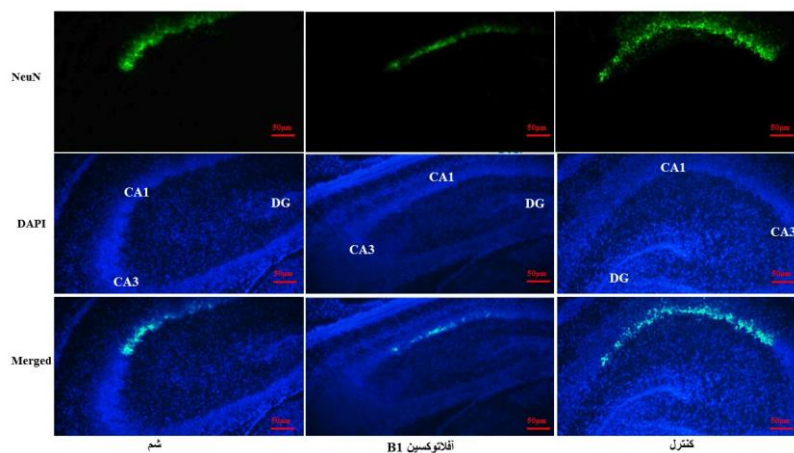
در تصاویر میزان بیان پروتئین GFAP در گروه های مورد مطالعه ارائه گردید. طبق نتایج بدست آمده نقاط قهوه ای رنگ که با فلش قرمز مشخص شده است، بیان پروتئین GFAP را نشان می دهد (نگاره ۵). در گروه تیمار شده با آفلاتوکسین B1 ($31/8 \pm 3/05$) میزان بیان GFAP بسیار بالاتر از گروه های شم ($11/9 \pm 0/6$) و کنترل سالم ($8/9 \pm 0/9$) بود و از نظر آماری افزایش آماری معنی داری



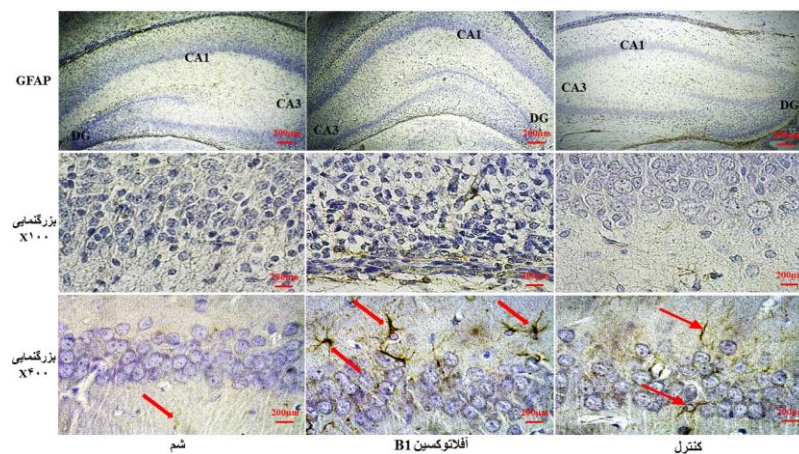
نگاره ۲. میزان بیان Ki-67 آپوپتوزی در سلول های ناحیه هیپوکامپ مغزی موش های ویستار نوزاد. میانگین و انحراف معیار (Mean±SD) در گروه های مختلف مورد مطالعه در مدت ۳ ماه. $P < 0/001$ ، $P < 0/01$ ، $P < 0/05$ * نشان دهنده اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل سالم می باشد.



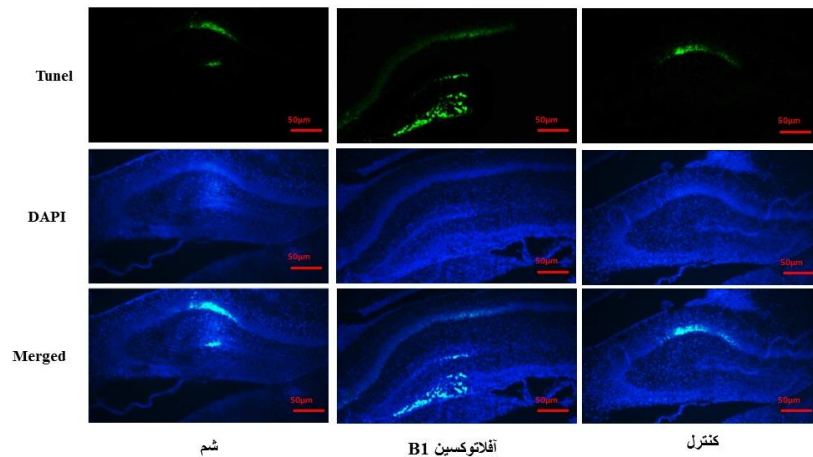
نگاره ۱. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی در جهت مطالعه ی مارکر Ki-67 گروه های شم، آفلاتوکسین B1 و کنترل (X 50µm).



نگاره ۳. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی در جهت مطالعه ی مارکر NeuN گروه های شم، آفلاتوکسین B1 و کنترل (X 50µm).



نگاره ۵. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی جهت مطالعه ی مارکر GFAP گروه های شم، آفلاتوکسین B1 و کنترل. تصاویر در بزرگنمایی های 100x و 400x نمای نزدیک تری از سلول های آستروسیت که با ماده DAB به رنگ قهوه ای درآمده اند را نشان می دهد.



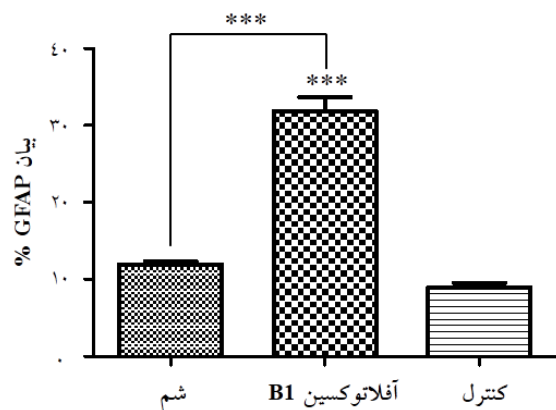
نگاره ۷. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی در جهت مطالعه ی سلول های آپوپتوزی گروه های شم، آفلاتوکسین B1 و کنترل (X 50µm).

مشخص است، در گروه تیمار شده با آفلاتوکسین B1 میزان مرگ سلول ها بسیار بیشتر از گروه های شم و کنترل سالم بود (نگاره ۷) که این نتایج در بررسی های آماری نیز مشاهده شد گروه تیمار شده با آفلاتوکسین B1 در مقایسه با گروه های کنترل (۴۳/۱±۹/۸۷۰) و شم (۲۸/۱±۰۵/۷۵) کاهش آماری معنی داری به ترتیب ($P < ۰/۰۱$) و ($P < ۰/۰۵$) نشان داد (نگاره ۸).

بحث

اگر چه امروزه بیماری های جدی مانند سرطان جوامع انسانی را درگیر کرده است ولی شناخت مسمومیت های ناشی از مواد طبیعی و میکروارگانیسم های خطرناک به چالش جدی تبدیل شده است (۹). گروهی از قارچ ها با محصولات سمی به نام مایکوتوکسین ها شناخته می شوند و در مواد غذایی وجود دارند و به دلیل ویژگی های قابل توجهشان از جمله پایداری و ماندگاری شیمیایی بالا، ممکن است حتی پس از نابود کردن قارچ ها، در مواد غذایی وجود داشته باشند (۱۰). فراوان ترین و سمی ترین نوع مایکوتوکسین ها، آفلاتوکسین می باشد (۱۰). آفلاتوکسین دارای دو ساختار برجسته است: یکی از آنها دیفوروکوکوماروسیکلوپنتنون است (آفلاتوکسین B1، B2،

مشاهده گردید ($P < ۰/۰۰۱$). در حالی که در مقایسه ی میزان بیان پروتئین GFAP در گروه های شم و کنترل، تغییرات آماری معنی داری مشاهده نشد (نگاره ۶).



نگاره ۶. میزان بیان GFAP آپوپتوزی در سلول های ناحیه هیپوکامپ مغزی موش های ویستار نوزاد. میانگین و انحراف معیار (Mean±SD) در گروه های مختلف مورد مطالعه در مدت ۳ ماه. $P < ۰/۰۰۱$ ، $P < ۰/۰۱$ ، $P < ۰/۰۵$ * نشان دهنده اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل سالم می باشد.

رنگ آمیزی تانل

از رنگ آمیزی تانل برای بررسی میزان سلول های آپوپتوزی در ناحیه هیپوکامپ استفاده شد. سلول های آپوپتوزی به رنگ سبز و هسته سلول ها به رنگ آبی مشاهده شد همانطور که در تصاویر میکروسکوپی حاصل از رنگ آمیزی

های مغزی را مختل می کنند و مانع فسفوریلاسیون اکسیداتیو و منجر به آپوپتوز می شود (۲۵). آفاتوکسین در بافت های مغزی کودکان در معرض و ارتباط آنها با بیماری های ادم مغزی و تخریب سلول های عصبی مشاهده شده است و این یافته ی پر اهمیتی است از اینکه آفاتوکسین میتواند از سد مغز خون عبور کرده و به سیستم عصبی نفوذ کند و منجر به آسیب مغزی شود (۲۶, ۲۷). آزمایشات هیستوپاتولوژیک و ایمونوهیستوشیمی در مدل های آزمایشی پس از تیمار با آفاتوکسین، گشاد شدن عروق ، نکروز و گلیوز آستروسیت ها را نشان داده اند (۲۶). در دوران بارداری مادری که در معرض آفاتوکسین قرار میگیرد، آفاتوکسین از سد جفت عبور کرده و به سیستم عصبی جنین میرسد و منجر به آسیب در مغز می شود همچنین تیمار مادر در اواخر دوره حاملگی منجر به انواع تومورها در سیستم عصبی مرکزی و محیطی فرزندان به دنیا آمده می شود (۲۸). همچنین گزارش دادند که قرار گرفتن در معرض آفاتوکسین در طی روزهای حاملگی ۸-۱۰ منجر به تخریب سلول های عصبی در مغز می شود. گزارش ها نشان داده اند که قرار گرفتن در معرض آفاتوکسین طی روزهای حاملگی ۱۱-۱۴ در موش صحرایی باردار عملکرد عصبی رفتاری را در فرزندان را کاهش می دهد (۲۹). به طور خاص آفاتوکسین اختلالاتی مانند افسردگی ، اسکیزوفرنی یا اختلال دو قطبی ایجاد میکند (۳). در مطالعه ای موش های صحرایی که به مدت ۸ هفته تحت درمان با آفاتوکسین B₁ قرار گرفتند چندین تغییر هیستوپاتولوژیک در قشر مخ و هیپوکامپ ایجاد کردند به صورت ساختارهای بی نظمی ، تخریب سلولی و اتساع رگ های خونی. همچنین تغییرات دژنراتیو را در قشر مخ و منچه ی موش تراکم، شلوغی و اتساع رگهای مغزی ، منچه ای و میوکاردا همچنین بعد از قرار گرفتن مزمن در دوزهای مختلف آفاتوکسین گزارش شدند (۳). آفاتوکسین ها همچنین ممکن است غلاف میلین

B_{2A}، M₁، M₂، M_{2A} و آفاتوکسیکول) و دیگری دیفوروکووومارولاکتون است (آفاتوکسین G₁، G₂، G_{2A}، GM₁، GM₂، GM_{2A} و B₃)، آفاتوکسین B₁ به سرعت در دستگاه گوارش جذب شده و توسط کبد متابولیزه می شود، که آن را برای ترشح بعدی در شیر و ادرار به آفاتوکسین M₁ تبدیل می کند (۱۱، ۱۲). آفاتوکسین دارای تاثیرات بسیار خطرناکی بر سلامت انسان از جمله سرطان (۱۳، ۱۴)، آسیب مزمن کبدی، تداخل در سیستم عصبی و تکوین اجزای مرتبطش (۱۵)، کاهش سرعت رشد، کاهش وزن بدن و اندام ها (۱۵)، کاهش تولید تخم و تولید مثل (۱۶)، سرکوب سیستم ایمنی (۷) می باشد. از اینرو در این مطالعه به بررسی تاثیرات سم آفاتوکسین B₁ بر بیان پروتئین های ضروری و حیاتی Ki-67، NeuN و GFAP در هیپوکامپ موش های ویستار نوزاد پرداختیم.

ارتباط تنگاتنگی بین آسیب اکسیداتیو ناشی از آفاتوکسین و آسیب های بافتی و سلولی از جمله آسیب DNA، پراکسیداسیون لیپید، اکسیداسیون پروتئین، آسیب به سیستم تکاملی مغز و تومورزایی و مکانیسم های القایی پیری و آلزایمر وجود دارد (۴، ۱۷). گزارشاتی از تغییر در چرخه ی سلولی و مسیرهای سیگنالینگ آپوپتوز در مدل های حیوانی وجود دارد (۱۸، ۱۹). آفاتوکسین نه تنها به کبد و آنزیم های کبدی آسیب میرساند بلکه به اندام های حیاتی نیز حمله می کند از جمله ریه ها و مغز (۲۰، ۲۱). مغز کودکانی که در معرض آفاتوکسین قرار میگیرد تخریبات حاد دستگاه عصبی را نشان می دهد و با ایجاد اختلال در تنظیم فعالیت انتقال سیگنال های سلول های نوروبلاستوما تاثیرات خود را نشان می دهد (۲۰، ۲۲). آفاتوکسین باعث ایجاد آسیب مغزی در داخل بدن موش های صحرایی می شود (۲۳). قرار گرفتن در معرض مزمن آفاتوکسین همچنین می تواند مسئول اختلالات و تخریب عصبی باشد (۲۴). گزارش شده است که آفاتوکسین ها ساختار و عملکرد میتوکندری سلول

است منجر به انحطاط سلول های عصبی شود که عوامل پروتئینی پر اهمیتی در این روند موثر می باشند (۳). پروتئین NeuN هم در هسته و هم در سیتوپلاسم اغلب نورو ن های سیستم عصبی مرکزی پستانداران یافت می شوند و به عنوان مارکر نورونی ضروری در مطالعات مربوط به تمایز نورونی مورد استفاده قرار میگیرد (۳۴). Ki-67 شاخص تکثیر سلولی سلول های تومورال است که افزایش میزان آن ارتباط واضحی با سیر تهاجمی تومور در بسیاری از تومورهای انسانی دارد. در منژیوم های گرید بالا، اندکس Ki-67 بالاتری دیده شده است (۳۵)، هر چه گرید تومور بالاتر باشد، سرعت رشد تومور و امکان عود آن بیشتر است زیرا درصد بیشتری از سلول های تومور در حال میتوز و در فاز تکثیر هستند و از طرفی پروتئین Ki-67 میزان تکثیر را نشان می دهد و افزایش این پروتئین در بافت نشان دهنده بالا بودن میزان تکثیر سلول می باشد (۳۵). تکثیر Ki-67 به صورت نرمال در مغز نوزادان موش نسبت به موش بالغ ۱۰ برابر میزان بالاتری را نشان می دهد (۳۶). رت های مبتلا به آسیب مغزی دارای افزایش میزان GFAP در ساقه مغز خود می باشند (۳۷)، چرا که افزایش بیان GFAP ممکن است در ارتباط با صدمه مغزی و گلیوزیس باشد و GFAP مارکری است که با وسعت آسیب مغزی مرتبط است و عضوی از خانواده اسکلت سلولی محسوب میشود که در فرایندهای حرکتی آستروسیتی و شکلی آن، با ایجاد ساختارهای تثبیتی شرکت میکند. در سیستم اعصاب مرکزی مهره داران عالی در پی جراحت و صدمات ناشی از تروما، بیماری ها، اختلالات ژنتیکی و تاثیرات شیمیایی، آستروسیت ها باز فعال شده و حالت آستروگلیوزیس را بوجود می آورند (۳۸). در موش هایی که فاقد بیان GFAP هستند گزارش شده است که بیشتر مستعد گسترش بیماری های سیستم عصبی هستند و با علائم شامل نفوذ بیشتر سلول های التهابی به سیستم عصب

اعصاب را تخریب کنند. گزارش شده است که مایکوتوکسین ها خصوصاً آفلاتوکسین ها برای جنبه های مختلف شیمی مغز و کارکرد آنها سمی هستند (۳۰). آفلاتوکسین B1 همچنین سطح آمین های بیوژنیک مختلف انتقال دهنده های عصبی و پیش سازهای آنها را در مغز موش و رت تغییر می دهد. گزارش شده است که تیمار با آفلاتوکسین B1 در حیوانات آزمایشگاهی باعث کاهش آنزیم های استیل کولین استراز در مغز می شود که ممکن است بر عملکردهای شناختی و همچنین حافظه و یادگیری افراد تأثیر بگذارد. در حالی که قرار گرفتن در معرض آفلاتوکسین بصورت مزمن باعث افزایش آدنو هیپوفیزی استیل کولین استراز می شود (۳۱). آفلاتوکسین باعث کاهش دوپامین، سروتونین و تغییر در سطح پیش ماده تیروزین و تربیتوفان می شود (۳۱). کمبودها در این انتقال دهنده عصبی منجر به علائم عصبی مانند کاهش عصبی شناختی و تغییر چرخه خواب و علائم آسیب مغزی مانند کندی، بی قراری، لرزش عضالت، تشنج، از دست دادن حافظه، صرع، سبک مغزی، از دست دادن هماهنگی عضالت و احساسات غیر طبیعی می شود (۳۲). گزارش شده است که آفلاتوکسین B1 باعث افزایش $ATPase-K + Na$ سیستم عصبی مرکزی و محیطی، β -گلوکوکورونیداز و β -گالکتوزیداز می شود در حالی که $ATPase-Mg2$ را در حیوانات آزمایشگاهی مهار می کند و این نیز در عملکرد طبیعی انتقال دهنده عصبی گلوتامات و گیرنده های NMDA آنها مهم است (۳۳).

از دست دادن سلول های عصبی ناشی از آفلاتوکسین به طور بالقوه می تواند توسط چندین مکانیزم توضیح داده شود. اول، آفلاتوکسین ممکن است با برخی از اجزای سلولی برهم کنش داشته باشد و آنزیم های کلیدی درگیر در تنظیم مسیرهای چرخه سلولی و روند آپوپتوز را تحریک کند (۳). دوم، آفلاتوکسین ها به طور قابل توجهی فعالیت استیل کولین استراز را در مغز و نخاع مهار می کند که ممکن

شود که این علائم با کاهش شدید در NeuN و افزایش در GFAP اثبات گردید.

نتیجه گیری

آفلاتوکسین B₁ نسبت به سایر سموم قارچی به علت اثرات سرطان زایی و ایجاد مسمومیت حاد از اهمیت بیشتری برخوردار هستند و می تواند در تخریبات عصبی و القای بیماری های دژنراتیو عصبی موثر باشد. در رابطه با این نوع توکسین ها بیان شده که این عوامل همچنین می توانند اختلالات حافظه ای به وجود آورند. لذا توصیه اصلی بر کنترل و حذف این سموم در مواد غذایی می باشد که نباید در برنامه غذایی قرار داده شوند. در گروه مادران باردار مصرف مواد غذایی به طور مستقیم فرزند را نیز تحت تاثیر قرار می دهد از اینرو در جوامع امروزی، باید سیاست های جدی تری در خصوص سلامت تولید تا مصرف مواد غذایی مستعد به آلودگی با آفلاتوکسین ها اعمال و اجرا شود تا از ناهنجاری های غیر قابل جبران در نسل های آینده جلوگیری به عمل آید.

فهرست منابع

1. Hu, J., et al., How the brain formulates memory: A spatio-temporal model research frontier. IEEE Computational Intelligence Magazine, 2016. 11(2): p. 56-68.
2. Salim, S., Oxidative stress and the central nervous system. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2017. 360(1): p. 201-205.
3. Bahey, N.G., H.O. Abd Elaziz, and K.K.E.S. Gadalla, Toxic effect of aflatoxin B₁ and the role of recovery on the rat cerebral cortex and hippocampus. Tissue and cell, 2015. 47(6): p. 559-566.
4. Shen, H.-M., et al., Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B₁. Free Radical Biology and Medicine, 1996. 21(2): p. 139-146.

مرکزی مشخص می شوند (۳۹). اخیراً، مطالعات نشان داده اند که آفلاتوکسین B₁ قادر به ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژیکی و بیان پروتئین های عملکردی در قشر مغز و هیپوکامپ در مدل موش است (۳). علاوه بر این، نشان داده شده است که قرار گرفتن مادر در معرض آفلاتوکسین B₁ و متابولیت آن آفلاتوکسین M₁ باعث انتقال این سموم به شیر می شود و باعث تغییر در نورونز هیپوکامپ با سرکوب سیگنال های کولینرژیک و عملکرد پروتئین های نام برده شده در فرزندان می شود (۴۰). کاهش گستردگی تعداد نورون های مغزی به ویژه در ناحیه هیپوکامپ، رسوب پروتئین بتا آمیلوئید در جدار عروق و گسترش پلاک های نوروتیک و ظهور کلاف های داخل سلولی فیبریلازی منجر به آسیب به حافظه و آزیمر میشود. این اختلالات به ویژه مناطق کورتکس، هیپوکامپ و لوب های میانی و تمپورال را درگیر میسازد و با عملکرد غیرطبیعی میتوکندری ها، صدمه ی اکسیداتیو نورون ها، از بین رفتن سیناپس ها و تخریب نورونی، اختلالات شناختی و ادراکی توأم است (۴۱). همسو با نتایج محققان پیشین، ما نیز در این بررسی نتایجی مشابهی مشاهده نمودیم از جمله اینکه در گروه های موشی باردار و تیمار شده با آفلاتوکسین B₁، موش های نوزاد تحت تاثیر تاثیرات خطرناک آفلاتوکسین B₁ قرار گرفته بودند که به احتمال زیاد این اتفاق از طریق خون و شیر مادر رخ داده بود، از طرفی کاهش چشمگیری در بیان پروتئین های NeuN و Ki-67 و افزایش در میزان بیان GFAP مشاهده گردید که این یافته ها همراه با مشاهدات حاصل از عکس برداری ایمونوهیستوشیمی فلورسنت تایید گردید. در این مطالعه مشخص شد که آفلاتوکسین با ایجاد اختلال در میزان فعالیت و بیان پروتئین های حیاتی در ناحیه هیپوکامپ منجر به اختلال در تمایز نورونی و افزایش صدمات مغزی می

- Valizade, M.R., An overview of the toxic effects and nutritional hazards reduction technique of ochratoxin on food products. *Clinical Excellence*, 2015. 4(1): p. 139-121.
6. LIU, D.-m., et al., Screening, Identification and Antifungal Properties of a Bacterium with Antagonistic Activities Against Mycotoxin-producing *Aspergillus* spp. *Biotechnology Bulletin*, 2019. 35(8): p. 42.
 7. Jiang, Y., et al., Aflatoxin B1 albumin adduct levels and cellular immune status in Ghanaians. *International immunology*, 2005. 17(6): p. 807-814.
 8. Verma, R. and S. Chaudhari, Detection of Aflatoxin in human urine. *Indian J Environ Toxicol*, 1997. 7: p. 47-48.
 9. Moghaddam, F.D., et al., Apoptotic effects of melittin on 4T1 breast cancer cell line is associated with up regulation of Mfn1 and Drp1 mRNA expression. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 2020. 20(7): p. 790-799.
 10. Coulombe, R., Aflatoxins. *Mycotoxins and phytoalexins*. Sharma, RP, Salunkhe, DK, Eds. 1991, CRC Press: Boca Raton, USA.
 11. Bbosa, G.S., et al., Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems. *Aflatoxins-recent advances and future prospects*, 2013. 12: p. 239-265.
 12. Reddy, S. and F. Waliyar, Properties of aflatoxin and its producing fungi. *Aflatoxins*. 2012.
 13. Liu, Z.-M., et al., Hepatitis B virus infection contributes to oxidative stress in a population exposed to aflatoxin B1 and high-risk for hepatocellular carcinoma. *Cancer letters*, 2008. 263(2): p. 212-222.
 14. Wu, H.-C., et al., Aflatoxin B1 exposure, hepatitis B virus infection, and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 2009. 18(3): p. 846-853.
 15. Xie, Y., et al., Potential roles of Alzheimer precursor protein A4 and β -amyloid in survival and function of aged spinal motor neurons after axonal injury. *Journal of neuroscience research*, 2003. 73(4): p. 557-564.
 16. Trucksess, M., et al., Aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed. *Poultry Science*, 1983. 62(11): p. 2176-2182.
 17. Thrasher, J.D., Are chlorinated pesticides a causation in maternal mitochondrial DNA (mtDNA) mutations? 2000, Taylor & Francis.
 18. Josse, R., et al., Identification of early target genes of aflatoxin B1 in human hepatocytes, inter-individual variability and comparison with other genotoxic compounds. *Toxicology and applied pharmacology*, 2012. 258(2): p. 176-187.
 19. Sun, X., et al., Selective induction of tumor cell apoptosis by a novel P450-mediated reactive oxygen species (ROS) inducer methyl 3-(4-nitrophenyl) propionate. *Journal of Biological Chemistry*, 2013. 288(13): p. 8826-8837.
 20. Oyelami, O., et al., Aflatoxins in the autopsy brain tissue of children in Nigeria. *Mycopathologia*, 1995. 132(1): p. 35-38.
 21. Yang, X.-J., et al., Cytochrome P450 2A13 mediates aflatoxin B1-induced cytotoxicity and apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 2012. 300(3): p. 138-148.
 22. Bonsi, P., et al., Aflatoxin B1 is an inhibitor of cyclic nucleotide. *General Pharmacology: The Vascular System*, 1999. 32(5): p. 615-619.
 23. Rawi, S.M. and A.M. Waggas, Impact of 90-Day oral dosing with naturally occurring aflatoxin mixture on male Sprague-Dawley rat neurochemistry and behavioral pattern. *Middle East Journal of Scientific Research*, 2013. 14(2): p. 228-238.
 24. Wild, C.P., J.D. Miller, and J.D. Groopman, *Mycotoxin control in low-and middle-income countries*. 2015.

25. Verma, R., Aflatoxin cause DNA damage. *International Journal of Human Genetics*, 2004. 4(4): p. 231-236.
26. Alsayyah, A., et al., Chronic neurodegeneration by aflatoxin B1 depends on alterations of brain enzyme activity and immunoexpression of astrocyte in male rats. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2019. 182: p. 109407.
27. Mehrzad, J., et al., Environmentally relevant level of aflatoxin B1 elicits toxic pro-inflammatory response in murine CNS-derived cells. *Toxicology letters*, 2017. 279: p. 96-106.
28. Goerttler, K., et al., Effects of aflatoxin B1 on pregnant inbred Sprague-Dawley rats and their F1 generation. A contribution to transplacental carcinogenesis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 1980. 64(6): p. 1349-1354.
29. Quik, M., et al., Localization of nicotinic receptor subunit mRNAs in monkey brain by in situ hybridization. *Journal of Comparative Neurology*, 2000. 425(1): p. 58-69.
30. Butterworth, R.F., Complications of cirrhosis III. Hepatic encephalopathy. *Journal of hepatology*, 2000. 32: p. 171-180.
31. Coulombe Jr, R.A. and R.P. Sharma, Effect of repeated dietary exposure of aflatoxin B1 on brain biogenic amines and metabolites in the rat. *Toxicology and applied pharmacology*, 1985. 80(3): p. 496-501.
32. Ammann, H.M., Indoor mold contamination—a threat to health. *J Environ Health*, 2002. 64(6): p. 43-4.
33. Arundine, M. and M. Tymianski, Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2004. 61(6): p. 657-668.
34. Mullen, R.J., C.R. Buck, and A.M. Smith, NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 1992. 116(1): p. 201-211.
35. Robinson, J.C., et al., Pericytosis and edema generation: a unique clinicopathological variant of meningioma. *Neurosurgery*, 1996. 39(4): p. 700-706.
36. Knoth, R., et al., Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PloS one*, 2010. 5(1): p. e8809.
37. Nylén, K., et al., Serum glial fibrillary acidic protein is related to focal brain injury and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 2007. 38(5): p. 1489-1494.
38. Eng, L.F., R.S. Ghirnikar, and Y.L. Lee, Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochemical research*, 2000. 25(9): p. 1439-1451.
39. Liedtke, W., et al., Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking glial fibrillary acidic protein is characterized by a more severe clinical course and an infiltrative central nervous system lesion. *The American journal of pathology*, 1998. 152(1): p. 251.
40. Tanaka, T., et al., Developmental exposure of aflatoxin B1 reversibly affects hippocampal neurogenesis targeting late-stage neural progenitor cells through suppression of cholinergic signaling in rats. *Toxicology*, 2015. 336: p. 59-69.
41. Serrano-Pozo, A., et al., Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2011. 1(1): p. a006189.

