طب‌نظامی
بهار ۱۳۸۶، شماره ۹(۱)
صفحات: ۶-۱

اثر مایکو توکسین T-2 بر مرگ سلولی و ترشح نیتریک اکساید

کاظم احمدی[۱]* Ph.D. مجید ریاضی پور[۲]* Ph.D.

*آدرس مکاتبه: * دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج) – مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی و گروه ایمونولوژی – تهران – ایران*

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸۵/۱۱/۱۰ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۶/۱/۱۸ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۶/۱/۲۲

خلاصه

مقدمه: مایکو توکسین T-2 روی بخش‌های مختلف سیستم ایمنی از قبیل مغز استخوان، طحال، تیموس، غدد لنفاوی و سلول‌های ایمنی اثرات تخریبی داشته و ساختار و اعمال ایمنی را دچار اختلال می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر مایکو توکسین T-2 بر مرگ سلولهای ماکروفاژی وتولید نیتریک اکساید می‌باشد.

مواد و روش کار: سلول‌های ماکروفاژ از صفاق موش‌ها با تزریق PBS سرد به داخل حفره شکمی و سپس مکش آن به کمک پیپت پلاستیکی بدست آمد و پس از سه بار شستشو و شمارش، سوسپانسیون سلولی به تعداد 10^5 سلول در هر میلی لیتر محیط RPMI به هر چاهک پلیت‌های ۲۴ خانه اضافه شد، و پس از دو ساعت انکوباسیون در ۵٪ Co_2، مایع رویی کشت سلولی آن خارج شد. ماکروفاژهای چسبیده به ته پلیت با غلظتهای مختلف مایکو توکسین T-2 تیمار شده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط فوق، مایع رویی جهت اندازه‌گیری نیتریک اکساید برداشت و درصد مرگ سلولها با روش ترپن بلو بررسی گردید.

نتایج: نتایج بدست آمده نشان داد که در سلولهای تیمار شده با مایکو توکسین T-2 بیشترین مرگ سلولی و کمترین مقدار نیتریک اکساید در پاسخ به ۱۰۰ نانوگرم بدست آمد ($P<0/01$) ولی در غلظتهای کمتر از یک نانو گرم، مرگ سلولی در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

بحث: مرگ سلولی ناشی از مایکوتوکسین T-2 مستقل از ترشح نیتریک اکساید می‌باشد و مایکوتوکسین T-2 در غلظت کم نه تنها خطری برای سلولهای ماکروفاژی ندارد بلکه اثر ایمونومدولاتوری نیز دارد.

واژه گان کلیدی: مرگ سلولی، ماکروفاژ، مایکوتوکسین T-2، نیتریک اکساید.

مقدمه

مایکو توکسین T-2 یکی از سموم قارچی مهم از خانواده ترایکوتسن‌ها است. این سم که عامل بالقوه‌ای برای سلاح‌های بیولوژیک بشمار می‌رود [۱]، به وسیله جنس‌های مختلف قارچها بویژه فوزاریوم‌ها تولید می‌شود. محصولات کشاورزی در مراحل مختلف تولید، توزیع، و نگهداری در معرض آلودگی با قارچهای مولد این سم قرار دارند و در صورت آلوده شدن و وجود شرایط مساعد از نظر رطوبت و حرارت، ممکن است مایکو توکسین T-2 در آنها تولید شود [۲،۳]. مسمومیت با این سم اختلال در ارگان‌های مختلف بدن بویژه آسیب بافت‌هایی که به سرعت تکثیر می‌شوند را به دنبال دارد. سیستم ایمنی از جمله ارگان‌هایی است که به شدت تحت تاثیر این سم قرار می‌گیرد. مایکوتوکسین T-2 روی بخش‌های مختلف این سیستم از قبیل مغز استخوان، طحال، تیموس، غدد لنفاوی و سلول‌های ایمنی اثرات تخریبی دارد و

۱- استاد- دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»- نویسنده مسئول

۲- استادیار- دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»

ساختار و اعمال ایمنی را دچار اختلال می‌کند [۴-۹]. مطالعات متعددی بر عوارض سوء مایکو توکسین T-2 بر سلول‌های ایمنی از جمله ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها دلالت می‌کند [۱۰] اما در مورد مکانیسم‌های مولکولی این اختلالات اطلاعات زیادی وجود ندارد. کوری و لیندال کیسلینگ [۱۱] اثر مایکوتوکسین T-2 را بر روی سلولهای تولید کننده آنتی بادی و دیگر سلولهای غیرلنفوئیدی در طحال موش بررسی نموده و نشان دادند تعداد اریتروسیتهای موش که تحت دوز روزانه سم قرار گرفته‌اند افزایش داشته ولی مقدار هموگلوبین آنها کاهش یافته است. کاهش تحریک و سرکوب سلول B در اثر اریتروپوئز یا عمل ماکروفاژهای فعال بوده است.

در گزارش هالیدی و همکاران آمده است که تجویز خوراکی روزانه ۱/۲ میلی گرم بر کیلوگرم مایکوتوکسین T-2 به بچه موش‌های B6C3F1 به مدت ۴ روزباعث کاهش زیر گروه‌های $CD44R^+$ و $CD45R^+$ لنفوسیتی در کبد شده است [۱۲].

در مطالعه دیگری توسط هالیدی [۱۳]، تجویز روزانه مقدار ۱/۲ یا ۱/۵ میلی گرم بر کیلوگرم سم T-2 به مدت ۱۷ روز در هنگام بارداری به موش‌های B6C3F ماده و مطالعه سلولهای کبدی جنین در روز هجدهم با دستگاه فلوسایتومتری نشان دهنده کاهش سلولهای $CD44^+$ و $CD45^+$ بوده است. آنالیزهای بعدی در محیط‌های واجد پرولنفوسیت سلولهای کبدی جنینی حاوی مایکوتوکسین T-2 نیز حذف انتخابی زیر گروه‌های لنفوسیتی $CD45B^+$ را نشان داده است. کاهش مشابهی نیز در سلول‌های $CD44^+$ و $CD45R^+$ مغز استخوان موش بالغ که از طریق جیره روزانه مقدار ۱/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم مایکوتوکسین T-2 دریافت کرده بودند مشاهده شده است. در این مطالعه مشاهدات نشان داده که پیش‌سازهای سلول B هدف حساسی برای مایکوتوکسین T-2 محسوب می‌شوند. دوز تحت حاد مایکوتوکسین T-2 باعث کاهش انتخابی و قابل ملاحظه سلولهای پیش‌ساز $CD44R^+$ و $CD45R^+$ در کبد جنین، و سلولهای $CD45R^+$ در مغز استخوان شده است [۱۳].

آپوپتوزیس لنفوسیتهای محیطی انسان را دانشمندی به نام یوشینو در In vitro بررسی کرد و اثر مایکوتوکسین T-2 با غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ نانو گرم بر میلی لیتر محیط کشت را روی سلول‌های لنفوسیتی انسانی آزمایش نمود. پس از ۳ تا ۵ روز غلظت‌های بیشتر، یا مساوی یک نانو گرم بر میلی لیتر باعث افزایش سلول‌های آپوپتوتیک شده بود [۱۴].

مطالعه حاضر برای روشن‌تر شدن مکانیسم‌های مولکولی اختلالات ایمنی ناشی از مایکو توکسین T-2 در ماکروفاژها انجام شد.

مواد و روش کار

سلول‌های ماکروفاژ از صفاق موش‌ها با تزریق PBS سرد به داخل حفره شکمی و سپس مکش آن به کمک پیپت پلاستیکی تهیه شد و به داخل لوله آزمایش در شرایط روی یخ منتقل گردید. سلول‌ها پس از سه بار شستشو شمارش و سوسپانسیون سلولی به تعداد 10^5 سلول در هر میلی لیتر محیط RPMI به هر چاهک پلیت‌های ۲۴ خانه اضافه و بمدت ۲ دوساعت در شرایط ۵٪ Co2 انکوبه شدند. سپس مایع رویی آن خارج و سه بار با PBS گرم شسته شدند تا اینکه سلول‌های غیر ماکروفاژی حذف شد ند. به ماکروفاژهای چسبیده به ته پلیت مقدار ۱ میلی لیتر محیط کشت کامل RPMI بدون فنول رد و حاوی مقدار ۱۰٪ – Fetal Calf Serum- FCS و آنتی بیوتیک به مقدار ۵۰ میکروگرم استرپتومایسین و ۵۰ واحد پنی‌سیلین در میلی لیتر اضافه شد. به یک ردیف از چاهک‌ها بعنوان گروه کنترل هیچگونه ماده‌ای اضافه نشد. به سایر چاهک‌ها غلظتهای مختلفی از مایکو توکسین T-2 بین ۱ پیکوگرم تا ۱۰۰ میکروگرم اضافه شد (n=3). پلیت‌ها بمدت ۲۴ ساعت دیگر در شرایط ۵٪ Co_2 انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت مایع رویی کشت سلولی برای اندازه‌گیری نیتریک اکساید جمع‌آوری و به لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی لیتری انتقال یافت.

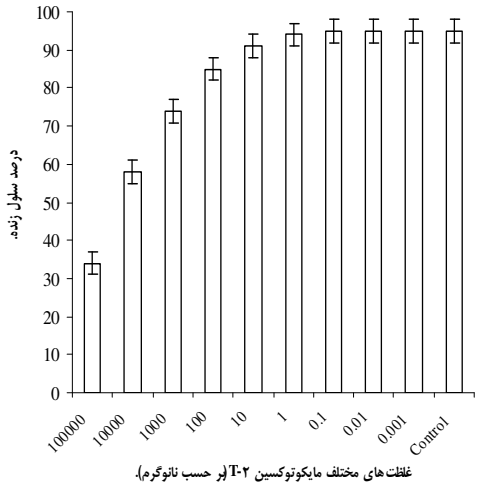
اندازه‌گیری نیتریک اکساید (NO). نیتریک اکساید ماده‌ای است بسیار ناپایدار و به سرعت به نیترات و نیتریت تبدیل می‌شود. لذا مقدار نیتریت بعنوان اندیکاتوری از نیتریک اکساید و بروش گریس اندازه‌گیری شد. برای اینکار مقدار ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی هر چاهک با هم حجم خود از ماده گریس (1% Sulphanilamid, 0.1% N-1-Naphtylethylenediamine hydrochloride, و 2.5%

PO4H3) مخلوط شد. سپس رنگ تولیدی در دستگاه (Micro Plate Multiscan) و در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. غلظتهای مختلفی از نیتریت سدیم تهیه گردید و پس از مخلوط نمودن با هم حجم خود از ماده گریس مانند نمونه‌ها رنگ تولیدی آنها در طول موج ۵۴۰ نانو متر قرائت و بعنوان استاندارد استفاده شد [۱۵].

شمارش سلولهای زنده. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر PBS سرد به سلولهای چسبیده به ته پلیت اضافه کرده و با تکان دادن ملایم آن نمونه ای از سلول‌ها در حجم ۱۰ میکرولیتر برداشت و با مقدار ۱۰ میکرو لیتر ترپن‌بلو ۰/۴ درصد مخلوط شدند. تعداد سلول‌های زنده و مرده با میکروسکوپ نوری شمارش شدند. تعداد سلولهای زنده بر مجموع سلولهای زنده و مرده تقسیم شده و سپس در مقدار ۱۰۰ ضرب شد و بدین وسیله نسبت درصد سلول‌های زنده بدست آمد (n=3).

نتایج

نتایج حاصل از اثر مایکوتوکسین T-2 بر مرگ سلولی نشان داده که مرگ سلولی ناشی از مایکوتوکسین T-2 در غلظت ۱۰۰ نانوگرم ۱۰ در صد بیشتر از گروه کنترل بوده است.

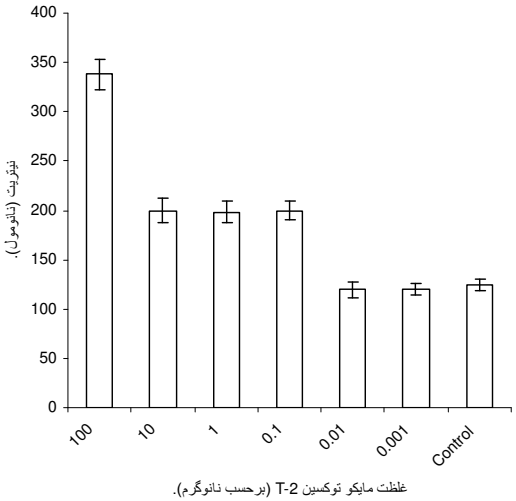


شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف مایکوتوکسین T-2 بر مرگ سلولی (n=3).

در حالیکه در غلظت ۱ نانو گرم فقط ۱٪ افزایش مرگ سلولی داشته ودر غلظتهای کمتر از آن در مقایسه با گروه کنترل تغییری در مرگ سلولی دیده نشد (جدول ۱و شکل ۱).

جدول ۱. درصد تغییرات مرگ سلولی و میزان نیتریک اکساید مترشحه توسط ماکروفاژهای صفاقی موش در پاسخ به غلظت‌های مختلف مایکوتوکسین T-2 در مقایسه با گروه کنترل.

غلظت مایکوتوکسین T-2 (نانوگرم)	درصد افزایش مرگ سلولی	درصد تغییرات نیتریت
۱۰۰	۱۰	۸۲/۴کاهش
۱۰	۴	۶۰ افزایش
۱	۱	۲۰ افزایش
۰/۱	۰۰	۱۲ افزایش
۰/۰۱	۰۰	۲۸کاهش
۰/۰۰۱	۰۰	۳۶کاهش



شکل ۲: اثر مایکوتوکسین T-2 بر ترشح نیتریک‌اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی موش.

بحث

نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد که مایکوتوکسین T-2 در غلظتهای بیشتر از ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر بر سلولهای ماکروفاژی اثر کشندگی داشته و باعث مرگ سلولی بیشتر از ۵۰ درصد می‌شود (شکل ۱). با توجه به اینکه در این تحقیق منظور اصلی بررسی اثر مایکوتوکسینT-2 بر ترشح نیتریک اکساید بود، لذا سعی شد از غلظتهایی استفاده شود که مرگ سلولی قابل قبولی در حد گروه کنترل و کمتر از ۱۰ درصد داشته باشد. به دلیل اینکه

استفاده از غلظتهای بالا که منجر به مرگ سلولی کامل می‌شد، نمی‌توانست جهت بررسی میزان ترشح نیتریک اکساید مورد بهره‌برداری قرار گیرد. حداکثر مرگ سلولی در پاسخ به ۱۰۰ نانو گرم در میلی لیتر مایکوتوکسین T-2 بدست آمد که به میزان ۱۰ درصد بیشتر از گروه کنترل می‌باشد (P<۰/۰۱). مرگ سلولی در غلظتهای ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ نانو گرم مایکوتوکسین T-2 در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نبود. مایکوتوکسین T-2 در غلظتهای ۱۰، ۱، و ۰/۱ نانوگرم باعث افزایش ترشح نیتریک اکساید شده و در سایر غلظتها منجر به کاهش ترشح آن شده است. بطوریکه حداکثر کاهش ترشح نیتریک اکساید در پاسخ به ۱۰۰ نانو گرم بدست آمد که مقدار آن ۸۲/۴ درصد کمتر از مقدار آن در گروه کنترل بوده است. بنابراین به نظر می‌رسد که مرگ سلولی در پاسخ به مایکوتوکسین T-2 مستقل از اثر نیتریک اکساید می‌باشد. نکته دیگری که در تحقیق دیده شد این است که مایکوتوکسین T-2 در غلظتهای ۰/۱،۱،۱۰ نانوگرم به ترتیب باعث افزایش ۶۰ و ۲۰ و ۱۲ درصدی نیتریک اکساید شده در حالیکه درصد افزایش مرگ سلولی در همین غلظتها در مقایسه با گروه کنترل به ترتیب ۴، ۱، صفر بوده است. بنابراین اثر مایکوتوکسین T-2 بر فعالیت‌های بیولوژیکی ماکروفاژها مستقل از غلظت بوده و در بعضی از غلظتها نه تنها اثرات توکسیک ندارد بلکه می‌تواند نقش ایمونومدولاتوری مثبت داشته باشد. در این رابطه Ouyang [۱۶] نیز نشان داده که مایکوتوکسین T-2 در غلظت ۱ نانو گرم در محیط کشت سلولهای TCD_4^+ در روز هفتم، باعث افزایش ترشح اینترلوکین-۴ شده است در حالیکه بر ترشح اینترلوکین-۲ تاثیری نداشته است. بر خلاف مورد فوق Holt [۱۷] یک افزایش ۴ برابری در ترشح اینترلوکین-۲ در پاسخ به مایکوتوکسین T-2 گزارش نموده است. Murshedul و همکاران [۱۸] نیز ثابت کرده که مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (آپوپتوزیس) ناشی از مایکوتوکسین T-2 مستقل از مولکولهای Fas/FasL می‌باشد. در تایید نتایج بدست آمده در این تحقیق، Hymery [۱۹] نیز اثرات متفاوتی از مایکوتوکسین T-2 را برروی سلول‌های دندریتیک گزارش نموده است. Hymery و همکارانش نشان داده‌اند که مایکوتوکسین T-2 در طی روند بلوغ سلول‌های دندریتیک باعث مهار بروز نشانگرهای CD86, HLA-DR, CCR7 و همچنین باعث کاهش ترشح اینترلوکین-۱۲ شده است. در همین رابطه Gerberich [۲۰] ثابت کرده که مایکوتوکسین T-2 بر ماکروفاژهای ریوی سمی بوده و پیشنهاد نموده که توکسی سیتی می‌تواند ناشی از مهار سنتز بعضی از پروتئین‌های سلولی باشد. نتایج بدست آمده در این تحقیق همچنین با یافته‌های Fu [۲۱] همخوانی دارد که افزایشی را در ترشح سایتو کاینهای IL-1β, IL-6 در پاسخ به ۸ نانوگرم مایکوتوکسین T-2 در محیط کشت سلول‌های کوندریوسایت گزارش نموده است.

نتیجه‌گیری

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مرگ سلولی ناشی از مایکوتوکسین T-2 مستقل از ترشح نیتریک اکساید می‌باشد و غلظتهای کم مایکوتوکسین T-2 نه تنها ضرری بر سلولهای ایمنی نداشته بلکه می‌تواند اثر ایمو نومدولاتوری نیر بر ماکروفاژها داشته باشد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی و اداره تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله(عج) به جهت تصویب و تامین اعتبار لازم در این پروژه.

منابع:

1- Madsen JM. Toxins as weapons of mass destruction. A comparison and contrast with biological-warfare and chemical-warfare agents. Clin Lab Med 2001; 21(3): 593-605.

2- Schothorst RC, van Egmond HP. Report from SCOOP task 3.2.10 "collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states". Subtask: trichothecenes. Toxicol Lett 2004; 153(1):133-43.

3- Sudakin DL. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. Toxicol Lett 2003; 143(2): 97-107.

4- Dugyala RR, Kim YW, Sharma RP. Effects of aflatoxin B1 and T-2 toxin on the granulocyte-macrophage progenitor cells in mouse bone marrow cultures. Immunopharmacology 1994; 27(1): 57-65.

5- Holladay SD, Smith BJ, Luster MI. B lymphocyte precursor cells represent sensitive targets of T2 mycotoxin exposure. Toxicol Appl Pharmacol 1995;131(2): 309-15.

6- Kidd MT, Hagler WM Jr, Qureshi MA.. Trichothecene mycotoxins depress the mononuclear-phagocytic system of young turkeys. Immunopharmacol Immunotoxicol 1995; 17(2): 385-98.

7- Parent-Massin D, Fuselier R, Thouvenot D. In vitro toxicity of trichothecenes on human haematopoietic progenitors. Food Addit Contam 1994; 11(4): 441-7.

8- Parent-Massin D. Haematotoxicity of trichothecenes. Toxicol Lett 2004; 153(1):75-81.

9- Sharma RP. Immunotoxicity of mycotoxins. J Dairy Sci 1993; 76(3): 892-7.

10- Kidd MT, Qureshi MA, Hagler WM Jr, Ali R. T-2 tetraol is cytotoxic to a chicken macrophage cell line. Poult Sci 1997; 76(2): 311-3.

11. Lindenfelser LA. Aflatoxin and trichothecene toxins, skin tumor induction and synergistic acute toxicity in white mice. J Natl Cancer Inst1974; 52: 113-116.

12- Holladay, SD. Fetal thymic atrophy after exposure to T-2 toxin, selectivity for lymphoid progenitor cells, Toxicol. Appl. Pharmacol 1993; 121: 8-14.

13- Holladay SD. B lymphocyte precursor cells represent sensetive targets of T-2 mycotoxin exposure, Toxicol. Appl. Pharmacol 1995; 131: 309-315.

14- Fairhurst, S. Skin effects of trichothecenes and their amelioration by decontamination ,Toxicology 1987; 46: 307-319.

15- Green LC, Wagner DA, Glowgowski J, Skipper PL, Wishnok JJ, Tannenbaum SS. Analysis of Nitrate, nitrite and $\{^{15}N\}$Nitrate in Biological Fluids. Analytical Biochemistry 1982; 126: 131-38.

16- Ouyang YL, Azcona-Olivera JI, Pestka JJ. Effects of trichothecene structure on cytokine secretion and gene expression in murine CD_4^+ T cells.Toxicology 1995; 104(1-3): 187-202.

17- Holt PS, Corrier DE, Deloach JR. Suppressive and enhancing effect of T-2 toxin on murine lymphocyte activation and interleukin-2 production Immunopharmacol Immunotoxicol 1988; 10(3): 365-85.

18- Murshedul AM, Nagase M, Yoshizawa T, Sakato N. Thymocyte apoptosis by T2-toxin in vivo in mice is independent of Fas/Fas ligand system. Biosci Biotechnol Biochem 2000; 64(1): 210-13.

19- Hymery N, Sibiril Y, Parent-Massin D. In vitro effects of trichothecenes on human dentritic cells. Toxicol In Vitro 2006; 20(6): 899-909.

20- Gerberick GF, Sorenson WG, Lewis DM. The effects of T-2 toxin on alveolar macrophage function in vitro. Environ Res 1984; 33(1): 246-260.

21- Fu YT, Lin WG, Baocheng Z, Quan G. The effect of T-2 Toxin on IL-1 beta and IL-6 secretion in human fetal chondrocytes. Int Orthop 2001; 25(3): 199-201.