

بررسی مقایسه بین میزان آفلاتوکسین با ضایعات پاتولوژی مشاهده شده در کبدهای ماکیان کشتار شده در کشتارگاه اهواز

تورج ضمیرنستا^۱، بابک محمدیان^{۲*}، آناهیتا رضایی^۳، معصومه عزتی‌گیوی^۴ و زهرا برومند^۴

^۱ دانش آموخته دکتری تخصصی پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران

^۳ استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران

^۴ دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران

دریافت: ۱۴۰۰/۱/۲۰

پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۲۲

چکیده

این مطالعه که به منظور بررسی ارتباط بین میزان آفلاتوکسین با ضایعات پاتولوژی مشاهده شده در کبدهای ماکیان صورت گرفته است، ۵۰ نمونه کبد شامل ۱۰ نمونه با ظاهر سالم و ۴۰ نمونه با ظاهر رنگ پریده از ۱۰ گله در کشتارگاه‌های شهر اهواز به روش تصادفی، انتخاب گردیدند. قسمتی از نمونه‌های کبد پس از رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین-اُوزین و پریودیک اسید شیف از نظر ضایعات هیستوپاتولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفت و بخش دیگر با هدف اندازه‌گیری انواع آفلاتوکسین‌ها با تکنیک HPLC فریز گردیدند. نتایج نشان داد که آلودگی به آفلاتوکسین در هیچ یک از ۱۰ نمونه بافت کبد با ظاهر سالم مشاهده نگردید، در مقابل، از مجموع ۳۰ نمونه بافت کبد با ظاهر متورم و رنگ پریده، ۲ مورد آلودگی به آفلاتوکسین‌های B1، B2 و G1 (به ترتیب 0.19 ± 0.01 ، 0.17 ± 0.04 ، 0.075 ± 0.007) نشان داده شد. یافته‌های هیستوپاتولوژی هم در بافت‌های کبد با ظاهر سالم و هم در کبدهای با ظاهر متورم و رنگ پریده اغلب به صورت تورم سلول‌های کبدی و دژنراسیون واکوتلار قابل مشاهده بود. نتایج این مطالعه نشان داد که بین ضایعات هیستوپاتولوژی کبد با آلودگی آفلاتوکسینی در نمونه‌های مربوطه، ارتباط خاصی دیده نشد و این ضایعات عمومی تحت تأثیر عوامل پاتوژن دیگر هم رخ می‌دهند، لذا تأثیر سایر عوامل تأثیرگذار در حین رشد جوجه‌های گوشتی بایستی مدنظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، هیستوپاتولوژی، کبد مرغ

مقدمه

در مواد خوراکی طیور ۲ppb است و بنابراین خوراک طیور در معرض خطر بالای آلودگی با آفلاتوکسین قرار دارند (Fouad et al, 2019). مطالعات مختلف در داخل کشور نشان دادند که جیره غذایی طیور، آلوده به آفلاتوکسین است و از این رو سلامت انسان و حیوانات در معرض تهدید

آفلاتوکسیکوزیس مشکل عمده مرتبط با صنعت تولید مرغ در مناطق مختلف دنیاست که می‌تواند به صورت مجموعه گسترده‌ای از اثرات بیولوژیکی خود را نشان دهد (Mgbeahuruike et al., 2018; Rashid et al, 2013). بر اساس استاندارد اتحادیه اروپا، میزان مجاز آفلاتوکسین B1

*نویسنده مسئول: بابک محمدیان، دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران

E-mail: mohammadb@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

داده‌اند، بر اساس جستجوهای صورت گرفته تا کنون تحقیقی در خصوص بررسی همزمان آسیب‌های کبدی و احتمال ارتباط آن با میزان آفلاتوکسین انجام نگرفته است. بنابراین هدف کلی تحقیق حاضر بررسی ارتباط بین میزان آفلاتوکسین با ضایعات پاتولوژی مشاهده شده این ارگان در کشتارگاه شهر اهواز است.

مواد و روش کار

مواد و حلال‌های شیمیایی

استاندارد افلاتوکسین‌های B1, B2, G2, G1 (سیگما، آلمان)، کلروفرم، متانول، استونیتریل، هگزان نرمال، خاک دیاتومه، کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (Whatman Inc., USA, NJ, Clifton)

مشخصات و شرایط کروماتوگرافی

سیستم HPLC با شناساگر فلورسانس Rf_20x، پمپ K-1000 و برای کنترل سیستم و آنالیز کروماتوگرام‌های حاصل از نمونه‌ها از نرم‌افزار Clarity استفاده گردید (KNAUER، برلین، آلمان). ستون C18 با اندازه ذرات ۵ میکرومتر (Germany, Duran, Machery & Nagel) بود و دمای ستون ۲۵ درجه سانتی‌گراد و میزان تزریق ۲۰ میکرولیتر تنظیم گردید. میکسر گرداب مورد استفاده یک ویراتور لوله آزمایش مدل هیدولف ریکس (شواباخ، آلمان) و همزن مغناطیسی مدل FALC (Terviglio, Italy) بود.

روش نمونه‌گیری

در یک دوره ۶ ماهه از مهر ماه ۱۳۹۸، تعداد ۵۰ نمونه کبد شامل ۱۰ نمونه با ظاهری سالم و ۴۰ نمونه با ظاهری متورم و رنگ پریده از ۱۰ گله در کشتارگاه‌های شهر اهواز به صورت تصادفی جمع‌آوری شد و در کنار یخ به سرعت به آزمایشگاه پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل گردید.

جدی است (Ghaemmaghami et al, 2016; Nemati et al, 2014). در ایران، میزان مجاز آفلاتوکسین M1 در شیر و فرآورده های آن، ۵ ppb است (Mahmoudi and Norian, 2015). تا کنون ۱۷ نوع متابولیت جداسازی شده است که نام یا عنوان آفلاتوکسین به خود گرفته‌اند، اما معمولاً چهار نوع از آن‌ها شامل AFB1, AFB2, AFG2, AFG1 اصلی‌ترین آفلاتوکسین‌ها می‌باشند (Luo, 2014). امروزه آفلاتوکسین B1 به عنوان عامل هپاتوتوکسیک، موتازن و سرطان‌زا شناسایی شده است (Williams et al, 2004). کبد اولین ارگان هدف در برابر سموم و مواد مضر است. با استفاده از تکنیک HPLC نشان داده شده که در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با ذرت آلوده به آفلاتوکسین، بافت کبد بیش‌ترین ذخیره آفلاتوکسین را دارا می‌باشد (Li et al, 2012; Rehman et al, 2018; Yang et al, 2012). بافت کبد مرغ به دلیل عوامل مختلف از نظر شکل ظاهری بزرگ‌تر، زردتر و نرم‌تر می‌شود. آفلاتوکسین به عنوان یکی از آلاینده‌های موجود در رژیم غذایی باعث افزایش وزن نسبی کبد نیز می‌شود (Heidarpour and Nobakht, 2015; Wang et al, 2013). ضایعات کبدی حاصل از AFB1 شامل تورم سلول‌های کبدی، دژنراسیون واکوتولار هپاتوسیت‌ها، هیپرپلازی سلول‌های کوپفر، پیکنوز شدن هسته سلول‌های کبدی، التهاب، هیپرپلازی مجرای صفراوی، نکروز و همچنین افزایش غلظت ALP و کاهش فعالیت AST و غلظت اوریک اسید می‌باشد (Denli et al, 2009; Karaca et al, 2019; Malekinezhad et al, 2021). در این مطالعه از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) باروش استخراج (Dispersive liquid-liquid-extraction micro DLLME) به عنوان یک روش نسبتاً جدید با حساسیت بالا، مقرون به صرفه، دوست‌دار محیط زیست، سریع و ساده برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها (B1, B2, G1, G2) استفاده شده است (Asadi, 2020; Hepsag et al, 2014). از سویی دیگر بیش‌تر مطالعات به بررسی اثرات تجربی آفلاتوکسین پرداخته‌اند و یا فقط میزان آفلاتوکسین را در موارد مختلف مورد اندازه‌گیری قرار

نمونه‌برداری و ثبوت بافت‌ها

هر بافت کبد به دو قسمت جدا شده و قسمتی از کبد بعد از برداشت به منظور ارزیابی ضایعات هیستوپاتولوژیک از قبیل تورم سلول‌های کبدی، هیپرپلازی مجرای صفراوی، نکروز و غیره در داخل فرمالین بافر ۱۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند تا کاملاً ثابت شوند. مقدار مصرف محلول ثبوتی در حدود ۸۰-۵۰ برابر حجم نمونه‌ها بود. قسمت دیگر از همان لوب کبد در آزمایشگاه مرکزی (دمای ۱۰- درجه) جهت تکنیک HPLC برای اندازه‌گیری انواع آفلاتوکسین منجمد و نگهداری شدند.

استخراج آفلاتوکسین از نمونه‌ها

روش استخراج آنالیت از نمونه‌های کبدی طبق مطالعه-ای با تغییرات جزئی انجام شد (Amirkhizi et al, 2015). ابتدا ۵ گرم بافت کبد با استفاده از هموژنایزر به خوبی همگن گردید. سپس ۰/۱ گرم NaCl و ۲۰ میلی‌لیتر متانول و آب به نسبت ۸۰:۲۰، V/V اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه توسط هم زن مغناطیسی مخلوط گردیدند. ۱ گرم خاک دیاتومه اضافه و مخلوط گردید و از کاغذ صافی whatman شماره ۱ (USA, NJ, Clifton, Whatman Inc.) عبور داده شد. برای حذف لیپید، ۳ میلی‌لیتر از هگزان به ۱۰ میلی‌لیتر از محلول استخراج شده اضافه شد و توسط شیکر به خوبی مخلوط و سپس به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردید تا n- هگزان جدا گردد.

روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی^۱

این روش، روشی ساده و سریع بوده و توانایی تشخیص و اندازه‌گیری آنالیت‌های با غلظت بسیار کم فراهم شده است. بدین منظور ۲۲۰ میکرولیتر کلروفرم (حلال استخراج) به ۱ میلی‌لیتر عصاره به دست آمده اضافه گردید و pH توسط اسیدفرمیک در حدود ۵/۸ تنظیم شد. به این محلول در یک لوله آزمایش ۱۰ میلی‌لیتری با کف مخروطی

حاوی ۲ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و برای به دست آوردن یک محلول پایدار و ابری به مدت چند ثانیه ورتکس و سپس به مدت ۴ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. لایه فوقانی آبی جدا شده و لایه کلروفرمی رسوب شده حاوی آفلاتوکسین توسط یک سمپلر ۲۲۰ میکرولیتر به یک لوله کوچک منتقل شد و در مرحله بعدی با جریان خفیف گاز نیتروژن خشک شد. باقی‌مانده در ۲۰ میکرولیتر متانول مجدداً حل شد و سپس به سیستم HPLC تزریق شد و میزان آفلاتوکسین‌های (B1, B2, G1, G2) به صورت مجزا در نمونه‌ها در قالب $\mu\text{g kg}^{-1}$ بیان گردید.

بررسی‌های آسیب‌شناسی

از بافت‌های مورد نظر با استفاده از دستگاه اتوتکنیکون، کاست‌های پارافینی و از این کاست‌ها به کمک دستگاه میکروتوم دستی دوار مقطعی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شده و پس از رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و پرئودیک اسید شیف (PAS)، در نهایت به منظور ارزیابی ضایعات هیستوپاتولوژیک از قبیل تورم سلول‌های کبدی، هیپرپلازی مجرای صفراوی، نکروز، التهاب و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. ارتباط بین ضایعات پاتولوژی بافت‌های کبد با ظاهر سالم و ظاهر متورم و رنگ پریده با میزان آفلاتوکسین موجود در هر بافت بررسی و ارزیابی داده‌های این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام گرفتند و نتایج حاصل به صورت Mean \pm SD بیان گردید.

برای ارزیابی، خطی بودن روش، حساسیت، بازیافت و تکرارپذیری تأیید شد. برای خطی بودن شش رقت از محلول استاندارد AFB1 در سطوح غلظت ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸ و ۲۰ نانوگرم در هر واحد به سه نسخه تزریق شد تا منحنی کالیبراسیون به دست آید. برای حساسیت، حد تشخیص (LOD) و حد کمی (LOQ) به ترتیب ۰/۰۵ و ۰/۱۴ میکروگرم بر کیلوگرم تعیین گردید. درصد بازیافت

1- Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME)

نتایج نمونه‌های اندازه‌گیری شده توسط دستگاه HPLC در ۳۰ نمونه کبد با ظاهر متورم و رنگ پریده (نمونه غیرمصرفی) و ۱۰ نمونه کبد با ظاهر سالم (نمونه مصرفی) آلودگی به آفلاتوکسین‌های (B1, B2, G1, G2) در Table 1 and 3 نمایش داده شده است.

بررسی‌ها نشان داد که از ۱۰ نمونه بافت کبد با ظاهر سالم هیچ کدام آلوده به آفلاتوکسین‌ها نبودند در حالی که از ۳۰ نمونه بافت کبد با ظاهر متورم و رنگ پریده ۲ مورد آلودگی به آفلاتوکسین‌های (B1, B2, G1) گزارش شد. همچنین مقدار میانگین آفلاتوکسین‌های B1, G1, B2 در نمونه آلوده به ترتیب 0.19 ± 0.01 , 0.17 ± 0.04 , $0.007 \mu\text{g}$ در $0.075 \pm \text{kg}^{-1}$ نشان داده شد (Table 2).

با افزودن ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میکروگرم استاندارد آفلاتوکسین توتال (B2, G1, G2, B1) به نمونه‌های کبدی اندازه‌گیری شد. برای تعیین تکرارپذیری استانداردهای آفلاتوکسین توتال (B2, G1, G2, B1) به میزان ۰/۲ و ۰/۵ میکروگرم بر کیلوگرم به مدت ۶ روز و هر روز ۶ بار تکرار و ضریب تغییرات تعیین گردید. بهترین نتایج استخراج DLLME با بررسی پارامترهایی از قبیل نوع حلال استخراج و پراکندگی، حجم حلال، pH و زمان سانتریفیوژ انجام گرفت. این پارامترها به منظور تعیین بهترین مقادیر بازیافتی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

نتایج HPLC

Table 1: Positive control sample results

sample	AFs(B1,B2,G1,G2) $\mu\text{g kg}^{-1}$ spiked	AFs(B1,B2,G1,G2) $\mu\text{g kg}^{-1}$ Found	Recovery(%)
Liver	0.05	0.046 ± 0.0008	92.5
Liver	0.1	0.0915 ± 0.0033	91.5
Liver	0.2	0.18 ± 0.006	90

Table 2: Mean aflatoxins (B1, B2, G1, G2) in chicken livers of Ahvaz slaughterhouse

Sample name	AFB1 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (Mean \pm SD)	AFG1 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (Mean \pm SD)	AFB2 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (Mean \pm SD)	AFG2 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (Mean \pm SD)
Abnormal Liver	0.019 ± 0.01	0.017 ± 0.04	0.075 ± 0.007	-

Table 3: Number of aflatoxin infection (B1, B2, G1, G2) in the liver of chickens in Ahvaz slaughterhouse

Sample name	Number of Samples	Positive samples of aflatoxins (B1,B2,G1,G2)
Normal Liver	10	-
Abnormal Liver	30	2(30)

نتایج هیستوپاتولوژی

HPLC تأیید شده بود از نظر هیستوپاتولوژیک تورم سلولی به همراه دژنراسیون واکولار مشاهده گردید (Figure 1). در بافت‌های کبد که آلودگی آن‌ها به آفلاتوکسین‌ها با روش HPLC منفی گزارش شد ضایعات از قبیل کاهش

در بافت‌های کبد به ظاهر سالم از نظر هیستوپاتولوژی التهاب حاد و مزمن خفیف و غالباً لنفوسیتی دیده شد و در بافت‌های کبد آسیب دیده که از نظر شکل ظاهری متورم و زرد رنگ بودند و آلودگی آن‌ها به آفلاتوکسین‌ها با روش

ضایعات مشاهده شده بافت‌های کبد که آلودگی آن‌ها به آفلاتوکسین‌ها منفی بود التهاب مزمن کبد به همراه جایگزینی بافت همبند، کانون‌های نکروز هپاتوسیت‌ها با تغییرات هسته به صورت پیکنوزه و کاریولیز، و تجمعات ائوزینوفیلیک می‌باشد (Figure 2). همچنین با رنگ‌آمیزی PAS وجود قطرات گلیکوژن در سلول‌های کبدی مشاهده گردید (Figure 3).

فضای سینوزوئید سلول‌های کبدی که نشانه تورم سلول در سلول‌های کبدی به صورت وسیع در تمام بافت کبدی، آسیب دیده به همراه ادم سلولی و قالب‌های هیالینی، دژنراسیونواکولار سلول کبدی اطراف ورید مرکزی که برخی واکوئل‌ها مشخص نبوده و دارای مرزهای مه آلود و بدون لبه‌های تیز (میکرو واکوئلار) و برخی دارای مرزهای مشخص و واضحی (ماکرو واکوئلار) هستند. از دیگر

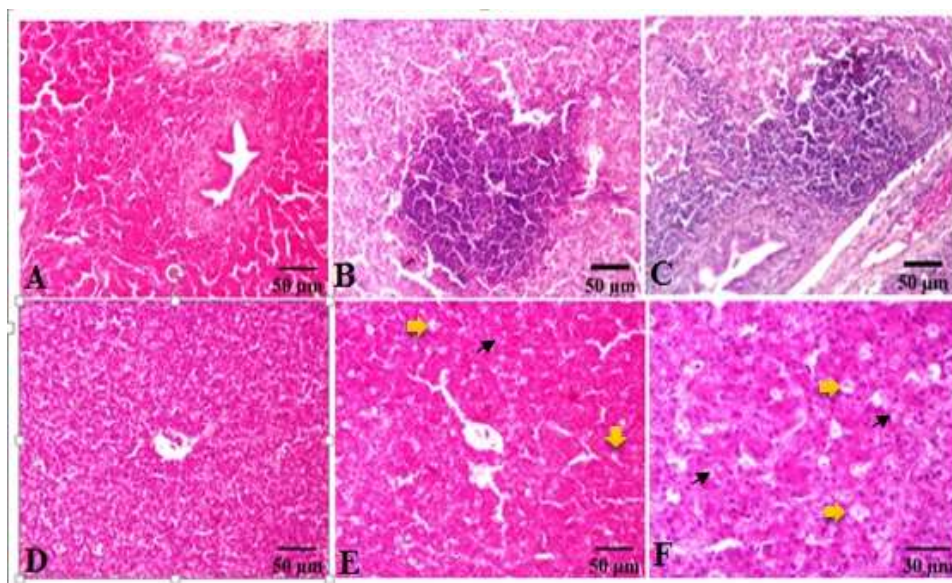


Figure1: Microscopic view of liver tissue. (A, B, C) Acute and chronic inflammation, often of the lymphocytic type in healthy appearance livers, in image (A, B) acute reaction and (C) chronic reaction with the presence of lymphocytes and connective tissue replacement. (D, E, F) Cell swelling with vacuolar degeneration in damaged liver tissue with swollen and pale appearance contaminated with aflatoxins: (D) Cell swelling and disappearance of hepatic sinusoids (E, F) Hepatic vacuolar degeneration in the form of micro-vacuolar (black arrow) and macro-vacuolar (yellow arrow). (H&E, X20, X40)

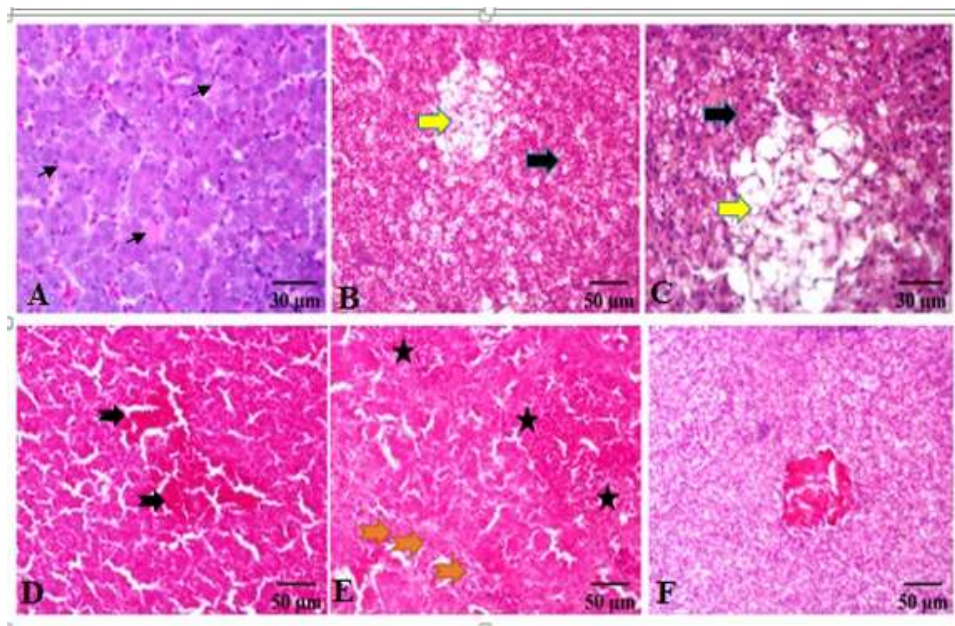


Figure 2: Microscopic view of damaged liver tissue with a swollen and pale appearance that is not contaminated with aflatoxin. (A) Cell swelling in hepatocytes with extensive cell edema and hyaline casts (arrowhead), (C, B) Severe vacuolar degeneration of hepatocytes in microvacuolar (black arrow) and macrovacuolar (yellow arrow). (D) Focal necrosis of hepatocytes with karyolysis nuclei: (E) Chronic inflammation of the liver with bleeding and the presence of inflammatory cells of the eosinophil type (star spots) with replacement of connective tissue (arrowhead) (F) eosinophilic foci that Extensive vacuolar degeneration of liver cells can be seen around it. (H&E, X20, X40)

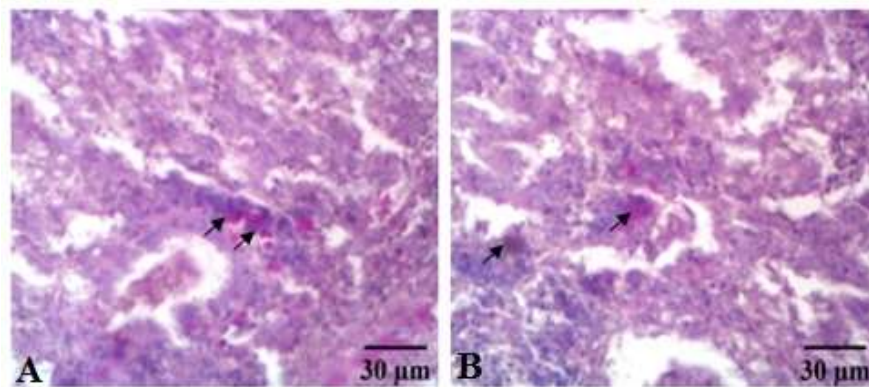


Figure 3: Microscopic view of damaged liver tissue with a swollen and pale appearance that is not contaminated with aflatoxin. (A, B) The presence of glycogen droplets in liver cells (arrowhead). PAS, X40

بحث

آفاتوکسین را در این منابع به اثبات رسانده‌اند (Amirkhizi et al, 2015; Rahmani et al, 2010; Slizewska et al, 2019). در مقابل، برخی تحقیقات از عدم وجود آلودگی بافت کبد و جیره غذایی طیور به آفاتوکسین‌ها سخن به میان آورده‌اند و در مواردی نیز میزان آلودگی بافت‌های مختلف ماکیان به این سموم را

جذب غذایی آفاتوکسین اغلب از طریق مواد غذایی آلوده و سایر محصولات مستعد آلودگی به قارچ‌های آسپرژیلوس صورت می‌گیرد و خوراک طیور نیز در معرض خطر بالای آلودگی با آفاتوکسین قرار دارند. برخی مطالعات پیشین با بررسی میزان آفاتوکسین در بافت‌های مختلف طیور و نیز در جیره غذایی آن‌ها، وجود آلودگی به

تحقیق حاضر آشکار ساخت در دو نمونه کبدی که آلودگی به آفلاتوکسین‌ها در آن‌ها تأیید گردید، از نظر هیستوپاتولوژیک آثاری چون تورم سلولی به همراه دژنراسیونواکولار در سلول‌های کبدی مشهود است. در مطالعه‌ای به ارزیابی ضایعات میکروسکوپی و فراساختاری کبد جوجه‌های گوشتی در طی پروراندی، ضایعاتی چون انحطاط چربی دژنراسیون واکولار سلول‌های کبدی، نکروز سلول‌های اپیتلیال مجاری صفراوی، نکروز سلول‌های کبدی در اطراف مجاری صفراوی در حال تکثیر، نفوذ سلول‌های لنفاوی در اطراف مجاری صفراوی و رگ‌های خونی و هیپرپلازی مجاری صفراوی در روزهای ۱۷، ۳۱ و ۳۸، نشان داده شده است (Gesek et al, 2013). بررسی‌ها بیان داشتند که تحت شرایط تقاضای مداوم و زیاد اکسیژن و مواد مغذی، کبد ممکن است این سطح از تقاضا را با ضایعات برگشتی (پارانیشیماتوز، وکولار و دژنراسیون چربی و نکروز سلول‌های کبدی) پاسخ دهد (Gesek et al, 2013; Rafiei-eti, 2018). نسبت نامناسب انرژی متابولیکی و پروتئین در جیره غذایی که با غلظت بیش از حد انرژی در خوراک همراه است، ممکن است تجمع واکول‌های چربی در سلول‌های کبدی و آسیب‌های فوق ساختاری را موجب شود (Cullen and MacLachlan, 2016; Rozenboim et al, 2007). از سویی با سنجش تأثیر عوامل دیگری از قبیل تغذیه با اوره به عنوان یک پروتئین ارزان قیمت، کادمیوم موجود در جیره، استرس، باکتری‌های روده‌ای مانند کلستریدیوم پرفرین جنس و برخی ویروس‌ها دریافتند که شرایط مذکور منجر به ایجاد ضایعاتی از قبیل تورم سلولی، نکروز کانونی و دژنراسیون واکولار در بافت کبد شده است (Gaballah et al, 2017; Li et al, 2019; Liu et al, 2015; Zhao et al, 2019). تحقیق حاضر، در بررسی‌های هیستوپاتولوژی بافت‌های کبدی ضایعات متنوعی از جمله تورم سلولی وسیع در بافت‌های کبدی آسیب دیده، دژنراسیون واکولار سلول‌های کبدی اطراف ورید مرکزی، التهاب مزمن کبد به همراه جایگزینی بافت همبند، کانون‌های نکروز هپاتوسیتی با

بسیار ناچیز و غیرقابل توجه گزارش داده‌اند (Awad et al, 2016; Nazari et al, 2014; Hussain et al, 2016). بر طبق نتایج حاصل از HPLC در مطالعه حاضر، از مجموع ده بافت کبد با ظاهر سالم، هیچ یک آلودگی به آفلاتوکسین را نشان ندادند و این در حالی است که از تعداد ۳۰ بافت کبد با ظاهر ناسالم (متورم و رنگ پریده)، در دو مورد (۶/۶ درصد) آلودگی به آفلاتوکسین‌های B1, G1, B2 (به ترتیب 0.19 ± 0.01 , 0.17 ± 0.04 , 0.075 ± 0.007) محرز گردید. در نتیجه، این یافته‌ها بر میزان پایین آلودگی به این سموم در نمونه‌های مورد مطالعه، دلالت دارد. از جمله تکنیک‌های مورد استفاده در تشخیص میزان آلودگی‌های آفلاتوکسین در بافت‌های مختلف استفاده از تکنیک HPLC می‌باشد. مراحل آماده‌سازی نمونه در HPLC دارای اهمیت بسیاری می‌باشد چرا که بدون تخلیص و استخراج سم از نمونه، جداسازی و اندازه‌گیری آن کار دشواری است. استخراج فاز جامد (SPE) و استفاده از ستون‌های ایمونوآفینیته (IAC) روش‌های پرکاربردی جهت استخراج آفلاتوکسین‌ها هستند. از معایب این روش می‌توان به زمان‌بر بودن، هزینه بالا و به کار بردن حجم بالایی از حلال‌های سمی اشاره کرد (Brera et al, 2011; Mayahi et al, 2008). در این بررسی برای اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین‌ها با HPLC از روش میکرو استخراج مایع-مایع پخش (DLLME) بهره برده شد. از مزایا و قابلیت‌های این تکنیک مواردی چون سرعت بالا در روند آزمایش، حساسیت بالا و نیز مقرون به صرفه بودن از نظر اقتصادی حائز اهمیت است (Asadi, 2020; Campone et al, 2011). در مطالعات متعدد، ضایعات کبدی ناشی از AFB1 با تظاهراتی از جمله تورم سلول‌های کبدی، دژنراسیون واکولار سلول‌های کبدی، هیپرپلازی سلول‌های کوپفر، پیکنوز شدن هسته سلول‌های کبدی، التهاب، هیپرپلازی مجرای صفراوی و نکروز سلول کبدی گزارش شده است (Hadley et al, 2010; Ishikawa et al, 2017; Malekinezhad et al, 2021).

مربوطه ارتباط خاصی دیده نشد و این ضایعات عمومی در بسیاری از بیماری‌ها و تحت تأثیر عوامل پاتوژن‌ز دیگر نیز رخ می‌دهد، لذا سایر فاکتورهای تأثیرگذار در حین رشد جوجه‌های گوشتی بایستی مورد توجه قرار گیرد.

تغییرات هسته به صورت پیکنوزه و کاریولیز، ادم سلولی به همراه قالب‌های هیالینی و تجمعات ائوزینوفیلیک در تمامی گروه‌ها دیده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که بین ضایعات هیستوپاتولوژی کبد به خصوص تورم سلولی و دژنراسیون واکوئلار با آلودگی آفلاتوکسینی در ارگان

تشکر و قدردانی

تیم تحقیق از همکاری مدیریت و معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز که در این پژوهش ما را یاری نمودند سپاسگزارند.

تعارض منافع

تعارضی بین نویسندگان و محققین پژوهش مذکور وجود ندارد.

منابع مالی

منبع مالی پژوهش مذکور از محل پژوهانه دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین شده است. از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز سپاسگزاریم.

منابع

- Amirkhizi, B., Arefhosseini, S. R., Ansarin, M., & Nemati, M. (2015). Aflatoxin B1 in eggs and chicken livers by dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 8(4), 245-249.
- Asadi, M. (2020). Separation and quantification of aflatoxins in grains using modified dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(2), 925-930.
- Awad, A., Elhofy, F., Mahmoud, A., & Rashed, D. (2019). Determination of aflatoxins by HPLC and the identification of biosynthetic nor-1 gene of aflatoxins in poultry products by PCR assay. *Benha Veterinary Medical Journal*, 36(2), 161-186.
- Brera, C., Debegnach, F., De Santis, B., Pannunzi, E., Berdini, C., Prantera, E., . . . Miraglia, M. (2011). Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods and paprika by HPLC with fluorescence detection: A single-laboratory validation study. *Talanta*, 83(5), 1442-1446.
- Campono, L., Piccinelli, A. L., Celano, R., & Rastrelli, L. (2011). Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in cereal products. *Journal of chromatography A*, 1218(42), 7648-7654.
- Cullen, J., & MacLachlan, N. (2007). Liver, biliary system, and exocrine pancreas. *Pathologic basis of veterinary disease*, 4, 393-461.
- Denli, M., Blandon, J., Guynot, M., Salado, S., & Perez, J. (2009). Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B1. *Poultry Science*, 88(7), 1444-1451.
- Fouad, A. M., Ruan, D., El-Senousey, H. K., Chen, W., Jiang, S., & Zheng, C. (2019). Harmful effects and control strategies of aflatoxin b1 produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains on poultry. *Toxins*, 11(3), 176.
- Gaballah, M. S., El-Mashad, A.-E. I., Khater, D. F., & Zayed, R. M. (2017). Pathological study on urea utilization by poultry. *Benha Veterinary Medical Journal*, 33(2), 65-74.

- Gesek, M., Szarek, J., Otrocka-Domagala, I., Babinska, I., Pazdzior, K., Szweda, M., . . . Szynaka, B. (2013). Morphological pattern of the livers of different lines of broiler chickens during rearing. *Veterinari Medicina*, 58(1).
- Ghaemmaghami, S. S., Modirsaneii, M., Khosravi, A. R., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2016). Study on mycoflora of poultry feed ingredients and finished feed in Iran. *Iranian journal of microbiology*, 8(1), 47.
- Hadley, T. L., Grizzle, J., Rotstein, D. S., Perrin, S., Gerhardt, L. E., Beam, J. D., . . . Daniel, G. B. (2010). Determination of an oral aflatoxin dose that acutely impairs hepatic function in domestic pigeons (*Columba livia*). *Journal of avian medicine and surgery*, 24(3), 210-221.
- Heidarpour, B., & Nobakht, A. (2015). The effects of using of mineral and organic toxin absorbents on broiler performance and internal organs weight in experimental aflatoxicosis. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 7(3), 318-328.
- Hepsag, F., Golge, O., & Kabak, B. (2014). Quantitation of aflatoxins in pistachios and groundnuts using HPLC-FLD method. *Food Control*, 38, 75-81.
- Hussain, Z., Rehman, H. U., Manzoor, S., Tahir, S., & Mukhtar, M. (2016). Determination of liver and muscle aflatoxin B1 residues and select serum chemistry variables during chronic aflatoxicosis in broiler chickens. *Veterinary clinical pathology*, 45(2), 330-334.
- Ishikawa, A. T., Hirooka, E. Y., Alvares e Silva, P. L., Bracarense, A. P. F. R. L., Flaiban, K. K. M. d. C., Akagi, C. Y., . . . Itano, E. N. (2017). Impact of a single oral acute dose of aflatoxin B1 on liver function/cytokines and the lymphoproliferative response in C57Bl/6 mice. *Toxins*, 9(11), 374.
- Karaca, A., Yilmaz, S., Kaya, E., & Altun, S. (2019). The effect of lycopene on hepatotoxicity of aflatoxin B1 in rats. *Archives of physiology and biochemistry*, 1-8.
- Li, T., Yu, H., Song, Y., Zhang, R., & Ge, M. (2019). Protective effects of Ganoderma triterpenoids on cadmium-induced oxidative stress and inflammatory injury in chicken livers. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 52, 118-125.
- Liu, C., Fu, J., Xu, F., Wang, X., & Li, S. (2015). The role of heat shock proteins in oxidative stress damage induced by Se deficiency in chicken livers. *Biometals*, 28(1), 163-173.
- Luo, J. (2014). *Detection, identification, and quantification of aflatoxin producing fungi in food raw materials using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays*. Technische Universität München.
- Mahmoudi, R., & Norian, R. (2015). Aflatoxin B1 and M1 contamination in cow feeds and milk from Iran. *Food and Agricultural Immunology*, 26(1), 131-137.
- Malekinezhad, P., Ellestad, L. E., Afzali, N., Farhangfar, S. H., Omid, A., & Mohammadi, A. (2021). Evaluation of berberine efficacy in reducing the effects of aflatoxin B1 and ochratoxin A added to male broiler rations. *Poultry Science*, 100(2), 797-809.
- Mayahi, M., ZAND, M. A., Fazlara, A., & JAFARI, H. (2008). A survey on the aflatoxin B1 and M1 level in liver, leg and breast muscles of broiler chicks slaughtered in Ahvaz poultry slaughter house.
- Mgbeahuruike, A. C., Ejiofor, T. E., Christian, O. C., Shoyinka, V. C., Karlsson, M., & Nordkvist, E. (2018). Detoxification of aflatoxin-contaminated poultry feeds by 3 adsorbents, bentonite, activated charcoal, and fuller's earth. *Journal of Applied Poultry Research*, 27(4), 461-471.
- Nazari, F., Moeini, M., Solgi, R., & Hosseini, M.-J. (2014). Survey of aflatoxins in non-alcoholic beers sold in Lorestan Province, Iran, by high-performance liquid chromatography. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 23(110), 137-144.
- Nemati, Z., Janmohammadi, H., Taghizadeh, A., Nejad, H. M., Mogaddam, G., & Arzanlou, M. (2014). Occurrence of aflatoxins in poultry feed and feed ingredients from northwestern Iran. *European Journal of Zoological Research*, 3(3), 56-60.
- Rafiei-Tari, A., Sadeghi, A., & Mousavi, S. (2018). Effect of vegetable oil supplementation on hepatic pathology and liver PPAR γ gene expression in broiler chickens exposed to heat stress. *Livestock Science*, 9, 70-74.
- Rahmani, A., Jinap, S., & Soleimany, F. (2010). Validation of the procedure for the simultaneous determination of aflatoxins ochratoxin A and zearalenone in cereals using HPLC-FLD. *Food additives & contaminants: part a*, 27(12), 1683-1693.
- Rashid, N., Bajwa, M. A., Rafeeq, M., Tariq, M. M., Abbas, F., Awan, M. A., . . . Ahmad, Z. (2013). Prevalence of aflatoxicosis in broiler chickens in Quetta, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 45(4).

- Rehman, Z. U., Meng, C., Sun, Y., Safdar, A., Pasha, R. H., Munir, M., & Ding, C. (2018). Oxidative stress in poultry: lessons from the viral infections. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.
- Rozenboim, I., Mahato, J., Cohen, N., & Tirosh, O. (2016). Low protein and high-energy diet: a possible natural cause of fatty liver hemorrhagic syndrome in caged White Leghorn laying hens. *Poultry science*, 95(3), 612-621.
- Śliżewska, K., Cukrowska, B., Smulikowska, S., & Cielecka-Kuszyk, J. (2019). The effect of probiotic supplementation on performance and the histopathological changes in liver and kidneys in broiler chickens fed diets with Aflatoxin B1. *Toxins*, 11(2), 112.
- Wang, C., Zhang, T., Cui, X., Li, S., Zhao, X., & Zhong, X. (2013). Hepatoprotective effects of a chinese herbal formula, longyin decoction, on carbon-tetrachloride-induced liver injury in chickens. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., & Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American journal of clinical nutrition*, 80(5), 1106-1122.
- Yang, J., Bai, F., Zhang, K., Lv, X., Bai, S., Zhao, L., . . . Zhang, J. (2012). Effects of feeding corn naturally contaminated with AFB1 and AFB2 on performance and aflatoxin residues in broilers. *Czech Journal of Animal Science*, 57(11), 506-515.
- Zhao, Y., Zeng, D., Wang, H., Qing, X., Sun, N., Xin, J., . . . Shu, G. (2019). Dietary Probiotic *Bacillus licheniformis* H2 Enhanced Growth Performance, Morphology of Small Intestine and Liver, and Antioxidant Capacity of Broiler Chickens Against *Clostridium perfringens*-Induced Subclinical Necrotic Enteritis. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 1-13.

Received: 09.04.2021

Accepted: 12.06.2021

Evaluation of the relationship between aflatoxins levels and pathological lesions observed in chicken livers slaughtered in Ahvaz slaughterhouse

Touraj Zamir Nasta¹, Babak Mohammadian^{2*}, Anahita Rezaei², Masoumeh Ezzati Givi³ and Zahra Boroomand⁴

¹ PhD Graduated from Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Associated Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³ Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

⁴ Associated Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 09.04.2021

Accepted: 12.06.2021

Abstract

This study was aimed to investigate the relationship between aflatoxin levels and pathological lesions observed in poultry liver. Out of 50 liver samples including 10 samples with healthy appearance and 40 samples with pale appearance from 10 herds in Ahvaz slaughterhouses were randomly selected. One part of the selected liver was evaluated for histopathological lesions after staining by hematoxylin & eosin and periodic schiff method, and the other part was frozen to measure different types of aflatoxins by HPLC technique. The results showed that none of the 10 liver tissue samples with healthy appearance and 2 of 30 liver tissue samples with swollen and pale appearance were infected with aflatoxins B1, G1, B2 0.19 ± 0.01 , 0.17 ± 0.04 , $0.075 \pm 0.007 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. In liver tissues with healthy appearance and with swollen and pale appearance, histopathological lesions were often observed in the form of hepatocellular swelling and vacuolar degeneration. The results of this study showed that there was no significant relationship between histopathological lesions of the liver and aflatoxin contamination in the relevant samples and these general lesions also occur under the influence of other pathogenesis factors, so the effect of other factors affecting the growth of broilers should be studied.

Key words: Aflatoxin, HPLC, Pathology, Liver chicken

* **Corresponding Author:** Babak Mohammadian, Associated Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: mohammadb@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).