

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

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

^۱ دانش آموخته‌ی 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

چکیده

میزان مجاز آفلاتوکسین در مواد خوراکی طیور در مقایسه با سایر مایکوتوکسین‌ها ۲۰ ppm است و خوراک طیور در معرض خطر آلودگی با آفلاتوکسین قرار دارند. در ایران، میزان مجاز آفلاتوکسین ۵ میکروگرم بر کیلوگرم در غذای انسان و خوراک دام است. HPLC یک روش دقیق جهت اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها است. هدف کلی این مطالعه بررسی ارتباط بین میزان آفلاتوکسین با ضایعات پاتولوژی مشاهده شده در کبدهای ماکیان می‌باشد. از ۲۰۰ نمونه کبد شامل ۱۰۰ نمونه با ظاهر سالم و ۱۰۰ نمونه با ظاهر رنگ پریده از ۱۰ گله در کشتارگاه‌های شهر اهواز به روش تصادفی ۴۰ نمونه بافت کبد شامل ۱۰ نمونه با ظاهر سالم، ۳۰ نمونه با ظاهر متورم و رنگ پریده (کبد غیرمصرفی) انتخاب گردید. قسمتی از آن پس از رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین-ئوزین و پریودیک اسید شیف از نظر ضایعات هیستوپاتولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفت و بخش دیگر با هدف اندازه‌گیری انواع آفلاتوکسین‌ها با تکنیک HPLC فریزگردیدند. نتایج نشان داد که آلودگی به آفلاتوکسین در هیچ یک از ۱۰ نمونه‌ی 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 0.17 ± 0.04 ، 0.19 ± 0.01 $\mu\text{g kg}^{-1}$)، 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 تاثیر عوامل پاتوژن دیگر هم رخ می‌دهند، لذا تاثیر سایر عوامل تاثیرگذار در حین رشد جوجه‌های گوشتی بایستی مدنظر قرار گیرد.

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

مقدمه

آفلاتوکسین است و از این رو سلامت انسان و حیوانات در معرض تهدید جدی است (Ghaemmaghami, et al., 2016; Nemati et al., 2014). در ایران، میزان مجاز آفلاتوکسین در غذای انسان و خوراک دام، ۵ میکروگرم بر کیلوگرم است (Mahmoudi & Norian, 2015). تاکنون ۱۷ نوع متابولیت جدا سازی شده است که نام یا عنوان آفلاتوکسین به خود گرفته اند، اما معمولاً چهار نوع از آنها شامل AFB1، AFB2، AFG2، AFG1 اصلی ترین آفلاتوکسین‌ها می‌باشند (Luo, 2014). امروزه آفلاتوکسین

آفلاتوکسیکوزیک مشکل عمده مرتبط با صنعت تولید مرغ در مناطق مختلف دنیاست که می‌تواند به صورت مجموعه گسترده ای از اثرات بیولوژیکی خود را نشان دهد (Mgbeahuruike et al., 2018; Rashid et al., 2013). میزان مجاز آفلاتوکسین در مواد خوراکی طیور در مقایسه با سایر مایکوتوکسین‌ها ۲۰ ppm 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

B1 به عنوان عامل هپاتوتوکسیک، موتاژن 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 جوجه های گوشتی تغذیه شده با ذرت آلوده به آفلاتوکسین، بافت کبد بیشترین ذخیره یا آفلاتوکسین را دارا می باشد (Li et al., 2019; Rehman et al., 2018; Yang et al., 2012). بافت کبد مرغ به دلیل عوامل مختلف از نظر شکل ظاهری بزرگتر، زردتر و نرمتر می شود. آفلاتوکسین به عنوان یکی از آلاینده های موجود در رژیم غذایی باعث افزایش وزن نسبی کبد نیز می شود (Heidarpour & Nobakht, 2015; Wang et al., 2013). ضایعات کبدی حاصل از AFB1 شامل تورم سلول-های کبدی، دژنراسیون واکوئولار هپاتوسیت ها، هیپرپلازی سلول های کوپفر، پیکنوزه شدن هسته سلول های کبدی، التهاب، هیپرپلازی مجرای صفراوی، نکروز و همچنین افزایش غلظت ALP و کاهش فعالیت AST و غلظت اوریک اسید می باشد (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) micro-Dispersive liquid-liquid extraction (DLLME) به عنوان یک روش نسبتاً جدید با حساسیت بالا، مقرون به صرفه، دوست دار محیط زیست، سریع و ساده برای اندازه گیری آفلاتوکسین ها (B1, B2, G1, G2) استفاده شده است (Asadi, 2020; Hepsag et al., 2014). از سویی دیگر بیشتر مطالعات به بررسی اثرات تجربی آفلاتوکسین پرداخته اند و یا فقط میزان آفلاتوکسین را در موارد مختلف مورد اندازه گیری قرار داده اند، بر اساس جستجوهای صورت گرفته تاکنون تحقیقی در خصوص بررسی همزمان آسیب های 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 حلال های شیمیایی

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

مشخصات و شرایط کروماتوگرافی

سیستم HPLC با شناساگر فلورسانس Rf_20x، پمپ K-1000 و برای کنترل سیستم و آنالیز کروماتوگرام های حاصل از نمونه ها از نرم افزار Clarity استفاده گردید (KNAUER، برلین، آلمان). ستون C18 با اندازه ذرات ۵ میکرومتر (Duran, Machery & Nagel, Germany) بود و دمای ستون ۲۵ درجه سانتی گراد و میزان تزریق ۲۰ میکرولیتر تنظیم گردید. میکسر گرداب مورد استفاده یک ویبراتور لوله آزمایش مدل هیدولف ریکس (شوایخ، آلمان) و همزن مغناطیسی مدل FALC (Terviglio, Italy) بود.

روش نمونه گیری

در یک دوره ۶ ماهه از ماه مهر ۱۳۹۸، ۲۰۰ نمونه کبد شامل ۱۰۰ نمونه با ظاهر سالم و ۱۰۰ نمونه با ظاهر رنگ پریده از ۱۰ گله در کشتارگاه های شهر اهواز جمع آوری شد و از بین آن ها به صورت تصادفی ۴۰ نمونه بافت کبد شامل ۱۰ نمونه بافت کبد با ظاهر سالم (کبد مصرفی)، ۳۰ نمونه با ظاهر متورم و رنگ پریده (کبد غیر مصرفی) با انتخاب گردید و در کنار یخ به سرعت به آزمایشگاه تحقیقاتی پاتولوژی دانشده دامپزشکی اهواز منتقل گردید.

نمونه برداری و ثبوت بافت ها

هر بافت کبد به دو قسمت جدا شده و قسمتی از کبد بعد از برداشت به منظور ارزیابی ضایعات هیستوپاتولوژیک از

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 آفلاتوکسین های (B1, B2, G1, G2) بصورت مجزا در نمونه ها در قالب $\mu\text{g kg}^{-1}$ بیان گردید.

بررسی های آسیب شناسی

از بافت های مورد نظر با استفاده از دستگاه اتوتکنیکون، کاست های پارافینی و از این کاست ها به کمک دستگاه میکروتوم دستی دوار مقاطعی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شده و پس از رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و پریودیک اسید شیف (PAS)، در نهایت به منظور ارزیابی ضایعات هیستوپاتولوژیک از قبیل تورم سلول های کبدی، هیپرپلازی مجرای صفراوی، نکروز، التهاب و ... با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. ارتباط بین ضایعات پاتولوژی بافت های کبد با ظاهر سالم و ظاهر متورم و رنگ پریده با میزان آفلاتوکسین موجود در هر بافت بررسی و ارزیابی داده های این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ انجام گرفتند و نتایج حاصل به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ 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 ۰/۲۰ نانوگرم در هر واحد به سه نسخه تزریق شد تا منحنی کالیبراسیون بدست آید. برای حساسیت، حد تشخیص (LOD) و حد کمی (LOQ) به ترتیب ۰/۰۵ و ۰/۱۴ میکروگرم بر کیلوگرم تعیین گردید. درصد بازیافت با افزودن ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ میکروگرم استاندارد آفلاتوکسین توتال (B1, G1, G2, B2) به نمونه های کبدی

قبیل تورم سلول های کبدی، هیپرپلازی مجرای صفراوی، نکروز و غیره در داخل محلول ثبوتی (فرمالین فیزیولوژیک خشی ۱۰٪) بمدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند تا کاملاً ثابت شوند. مقدار مصرف محلول ثبوتی در حدود ۸۰-۵۰ برابر حجم نمونه ها بود. قسمت دیگر از همان لوب کبد در آزمایشگاه مرکزی (دمای ۱۰- درجه) جهت تکنیک HPLC برای اندازه گیری انواع آفلاتوکسین منجمد و نگهداری شدند.

استخراج آفلاتوکسین از نمونه ها

روش استخراج آنالیت از نمونه های کبدی طبق مطالعه ای با تغییرات جزئی انجام شد (Amirkhizi et al., 2015). ابتدا ۵ گرم بافت کبد با استفاده از هموژنایزر بخوبی همگن گردید. سپس ۰.۱ گرم NaCl و ۲۰ میلی لیتر متانول و آب به نسبت ۲۰:۸۰، ۷/۷ 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 میلی لیتر از هگزان به ۱۰ میلی لیتر از محلول استخراج شده اضافه شد و توسط شیکر بخوبی 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 اندازه گیری آنالیت های با غلظت بسیار کم فراهم شده است. بدین منظور ۲۲۰ میکرولیتر کلروفرم (حلال استخراج) به ۱ میلی لیتر عصاره بدست آمده اضافه گردید و pH توسط اسید فرمیک در حدود ۵/۸ تنظیم شد. به این محلول در یک لوله آزمایش ۱۰ میلی لیتری با کف مخروطی حاوی ۲ میلی لیتر آب مقطر اضافه و برای به دست آوردن یک محلول پایدار و ابری به مدت چند ثانیه ورتکس و سپس به مدت ۴ دقیقه

1. Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME)

اندازه گیری شد. برای تعیین تکرارپذیری استاندارد های آفلاتوکسین توتال (B2,G1,G2,B1)، به میزان ۰/۲ و ۰/۵ میکروگرم بر کیلوگرم به مدت ۶ روز و هرروز 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

نتایج نمونه های اندازه گیری شده توسط دستگاه HPLC در ۳۰ نمونه کبد با ظاهر متورم و رنگ پریده (نمونه غیر مصرفی) و ۱۰ نمونه کبد با ظاهر سالم (نمونه مصرفی) آلودگی به آفلاتوکسین های (B1,B2,G1,G2) در (Table 1 and 3) نمایش داده شده است.

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

نتایج هیستوپاتولوژی

در بافت های کبد به ظاهر سالم از نظر هیستوپاتولوژی التهاب حاد و مزمن خفیف و غالباً لنفوسیتی دیده شد و در بافت های کبد آسیب دیده که از نظر شکل ظاهری متورم و زرد رنگ بودند و آلودگی آن ها به آفلاتوکسین ها با روش HPLC تایید شده بود از نظر هیستوپاتولوژیک تورم سلولی به همراه دژنراسیون و اکولار مشاهده گردید (Fig. 1)

در بافت های کبد که آلودگی آن ها به آفلاتوکسین ها با روش HPLC منفی گزارش شد ضایعات از قبیل کاهش فضای سینوزوئید سلول های کبدی که نشانه تورم سلول در سلولهای کبدی به صورت وسیع در تمام بافت کبد های آسیب دیده به همراه ادم سلولی و قالب های هیالینی، دژنراسیون اکولار سلول کبدی اطراف ورید مرکزی که برخی واکوئل ها مشخص نبوده و دارای مرزهای مه آلود و بدون لبه های تیز (میکرو واکوئلار) و برخی دارای مرزهای مشخص و واضحی (ماکرو واکوئلار) هستند. از دیگر ضایعات مشاهده شده بافت های کبد که آلودگی آن ها به آفلاتوکسین ها منفی بود التهاب مزمن کبد به همراه جایگزینی بافت همبند، کانون های نکروز هپاتوسیت ها با تغییرات هسته به صورت پیکنوز و کاریولیز، و تجمعات ائوزینوفیلیک می باشد (Fig. 2). همچنین با رنگ آمیزی PAS وجود قطرات گلیکوژن در سلول های کبدی مشاهده گردید (Fig. 3).

Table1: 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	0.0008±0.046	92.5
Liver	0.1	0.0033±0.0915	91.5
Liver	0.2	0.006±0.18	90

Table2: Mean aflatoxins (B1, B2, G1, G2) in chicken livers of Ahvaz slaughterhouse

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

Table3: 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)

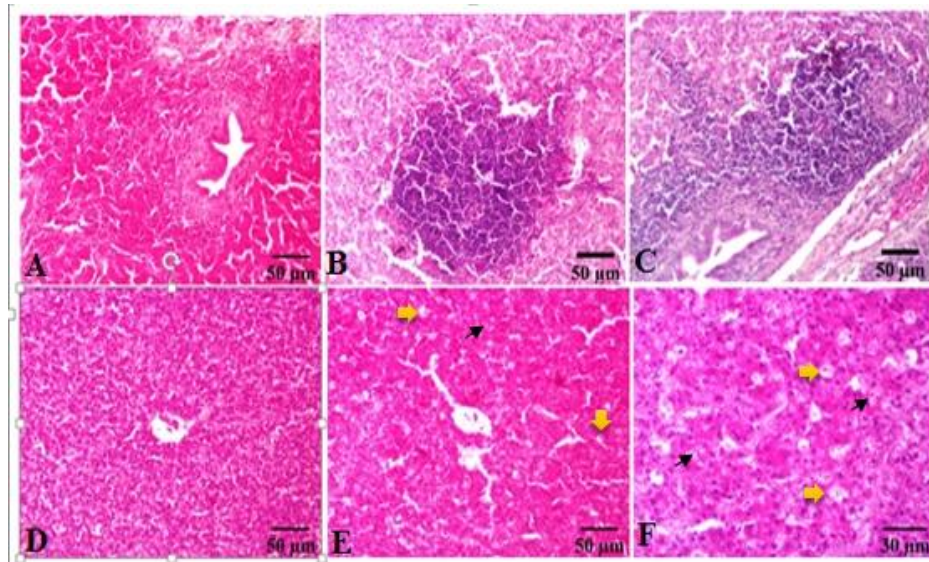


Figure1: Microscopic view of liver tissue. (A, B, C) Acute and chronic inflammation, often of the lymphocytic type in healthy appearance livers, in image (A, B) acute reaction and (C) chronic reaction with the presence of lymphocytes and connective tissue replacement. (D, E, F) Cell swelling with vacuolar 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)

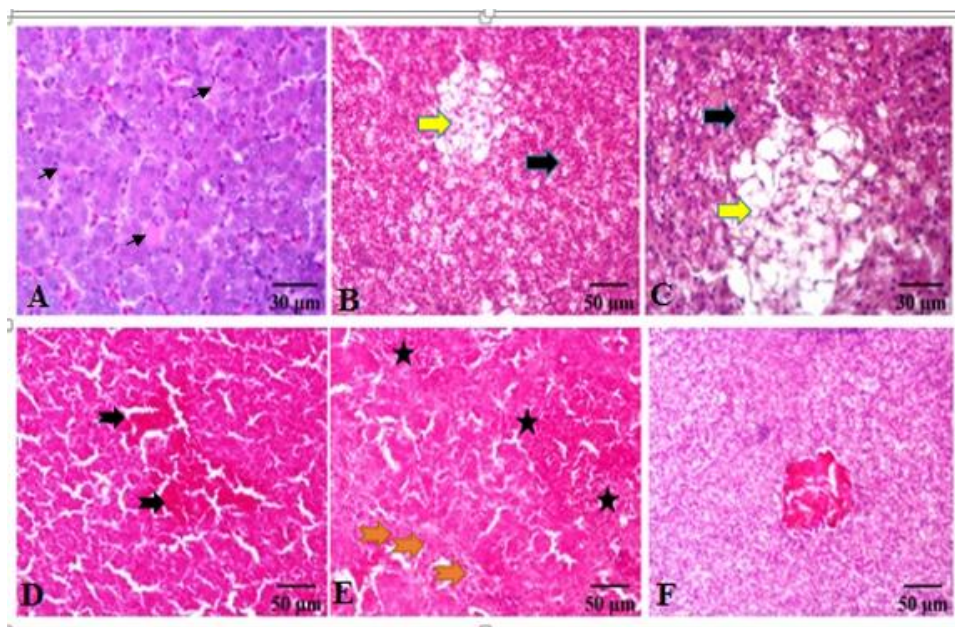


Figure 2: Microscopic view of damaged liver tissue with a swollen and pale appearance that is not contaminated with aflatoxin. (A) Cell swelling in hepatocytes with extensive cell edema and hyaline casts (arrowhead), (C, B) Severe vacuolar degeneration of hepatocytes in microvacuolar (black arrow) and 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)

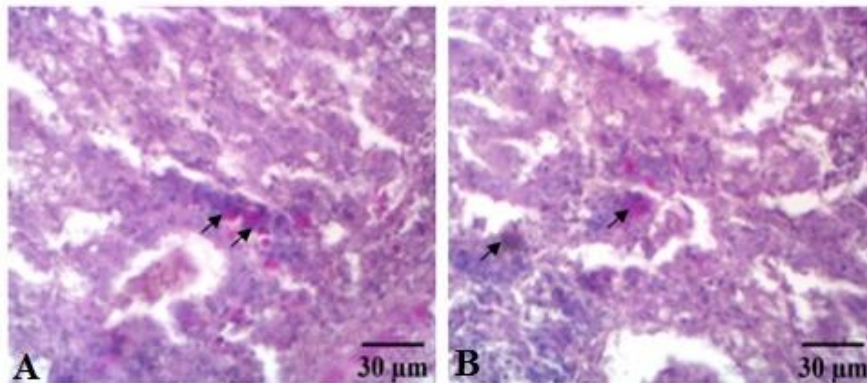


Figure 3: Microscopic view of damaged liver tissue with a swollen and pale appearance that is not contaminated with aflatoxin. (A, B) The presence of glycogen droplets in liver cells (arrowhead). PAS, X40

بحث

HPLC می باشد. مراحل آماده سازی نمونه در HPLC دارای اهمیت بسیاری می باشد چرا که بدون تخلیص و استخراج سم از نمونه، جداسازی و اندازه گیری آن کار دشواری است. استخراج فاز جامد (SPE) و استفاده از ستونهای ایمونوآفینیتی (IAC) روش های پرکاربردی جهت استخراج آفلاتوکسین ها هستند. از معایب این روش می توان به زمان بر بودن، هزینه ی بالا و به کاربردن حجم بالایی از حلال های سمی اشاره کرد (Brera et al., 2011; Mayahi et al., 2008). ما در این بررسی برای اندازه گیری میزان آفلاتوکسین ها با HPLC از روش میکرو استخراج مایع- مایع پخشی (DLLME) بهره بردیم. از مزایا و قابلیت های 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 سلول های کبدی، دژنراسیون واکوتولارسلول های کبدی، هیپرپلازی سلول های کوپفر، پیکنوزه شدن هسته سلول های کبدی، التهاب، هیپرپلازی مجرای صفراوی و نکروز سلول کبدی گزارش شده است (Hadley et al., 2010; Ishikawa et al., 2017; Malekinezhad et al., 2021).

تحقیق حاضر آشکار ساخت در دو نمونه ی کبدی که آلودگی به آفلاتوکسین ها در آن ها تایید گردید، از نظر

جذب غذایی آفلاتوکسین اغلب از طریق مواد غذایی آلوده و سایر محصولات مستعد آلودگی به قارچ های آسپرژیلوس صورت می گیرد و خوراک طیور نیز در معرض خطر بالای آلودگی با آفلاتوکسین قرار دارند. برخی مطالعات پیشین بابررسی میزان آفلاتوکسین دربافتهای مختلف طیور و نیز در جیره ی غذایی آن ها، وجود آلودگی به آفلاتوکسین را در این منابع به اثبات رسانده اند (Amirkhizi et al., 2015; Rahmani, et al., 2010; Ślizewska et al., 2019). در مقابل، برخی تحقیقات از عدم وجود آلودگی بافت کبد و جیره ی غذایی طیور به آفلاتوکسین هاسخن به میان آورده اند و در مواردی نیز میزان آلودگی بافت های مختلف ماکیان به این سموم را بسیار ناچیز و غیرقابل توجه گزارش داده اند (Awad et al., 2019; Nazari et al., 2014; Hussain et al., 2016). بر طبق نتایج حاصل از HPLC در مطالعه ی حاضر، از مجموع ده بافت کبد با ظاهر سالم، هیچ یک آلودگی به آفلاتوکسین را نشان ندادند و این درحالیست که از تعداد ۳۰ بافت کبد با ظاهر ناسالم (متورم و رنگ پریده)، در دو مورد (۶/۶ درصد) آلودگی به آفلاتوکسین های B1، B2، G1 (به ترتیب 0.19 ± 0.01 ، 0.17 ± 0.04 ، 0.075 ± 0.007) محرز گردید. در نتیجه، این یافته ها بر میزان پایین آلودگی به این سموم در نمونه های مورد مطالعه، دلالت دارد. از جمله تکنیک های مورد استفاده در تشخیص میزان آلودگی های آفلاتوکسین در بافت های مختلف استفاده از تکنیک

پروتئین ارزان قیمت، کادمیوم موجود در جیره، استرس، باکتریهای رودهای مانند کلستریدیوم پرفرینجنس و برخی ویروس ها دریافتند که شرایط مذکور منجر به ایجاد ضایعاتی از قبیل تورم سلولی، نکروز کانونی و دژنراسیون واکوئالار در بافت کبد شده است. (Gaballah et al., 2017; Li et al., 2019; Liu et al., 2015; Zhao et al., 2019). در تحقیق حاضر، در بررسی های هیستوپاتولوژی بافت های کبدی ضایعات متنوعی از جمله تورم سلولی وسیع در بافت های کبدی آسیب دیده، دژنراسیون واکوئالار سلول های کبدی اطراف ورید مرکزی، التهاب مزمن کبد به همراه جایگزینی بافت همبند، کانون های نکروز هپاتوسیتی با تغییرات هسته به صورت پیکنوزه و کاریولیز، ادم سلولی به همراه قالب های هیالینی و تجمعات ائوزینوفیلیک در تمامی گروه ها رویت گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که بین ضایعات هیستوپاتولوژی کبد به خصوص تورم سلولی و دژنراسیون واکوئالار با آلودگی آفلاتوکسینی در ارگان مربوطه ارتباط خاصی دیده نشد و این ضایعات عمومی در بسیاری از بیماری ها و تحت تاثیر عوامل پاتوژن دیگر نیز رخ می دهد، لذا سایر فاکتورهای تاثیر گذار در حین رشد جوجه های گوشتی بایستی مورد توجه قرار گیرد.

هیستوپاتولوژیک آثاری چون تورم سلولی به همراه دژنراسیون واکوئالار در سلول های کبدی مشهود است. در مطالعه ای به ارزیابی ضایعات میکروسکوپی و فراساختاری کبد جوجه های گوشتی در طی پروراندی، ضایعاتی چون انحطاط چربی دژنراسیون واکوئالار سلول های کبدی، نکروز سلولهای اپیتلیال مجاری صفراوی، نکروز سلولهای کبدی در اطراف مجاری صفراوی در حال تکثیر، نفوذ سلولهای لنفاوی در اطراف مجاری صفراوی و ورگهای خونی و هیپرپلازی مجاری صفراوی در روزهای ۱۷، ۳۱ و ۳۸ نشان داده شده است (Gesek et al., 2013). بررسی ها بیان داشتند که تحت شرایط تقاضای مداوم و زیاد اکسیژن و مواد مغذی، کبد ممکن است این سطح از تقاضا را با ضایعات برگشتی (پارانشیماتوز، وکولار و دژنراسیون چربی، و نکروز سلول های 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 واکوئلهای چربی در سلولهای کبدی و آسیب های فوق ساختاری را موجب شود (Cullen & MacLachlan, 2007; Rozenboim et al., 2016). از سویی با سنجش تاثیر عوامل دیگری از قبیل تغذیه با اوره به عنوان یک

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. *Veterinarni 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. *Biomaterials*, 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., Omidi, 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., Ejioffor, 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.

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 in Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz

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

Abstract

Permissible levels of aflatoxins in poultry feed are low compared to other mycotoxins, and therefore poultry feed is at high risk of aflatoxin contamination. In Iran, the permissible level of aflatoxin is $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ in human and animal feed. (HPLC) is an accurate method for measuring aflatoxins. The overall aim of this study was to investigate the relationship between aflatoxin levels and pathological lesions observed in poultry livers. Out of 200 liver samples including 100 samples with healthy appearance and 100 samples with pale appearance of 10 herds in Ahvaz slaughterhouses randomly 40 samples of liver tissue including 10 samples of liver tissue with healthy appearance, 30 samples with swollen appearance and pale was selected. part of the liver after staining by hematoxylin and eosin and periodic Schiff method were evaluated for histopathological lesions 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.

Keywords: Aflatoxin, HPLC, Pathology, liver chicken