



Protective Effect of Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) Against Aflatoxin on Blood Parameters, Ileum Morphometry and Hepatocytes' Histopathology of Broiler Chickens Fed Aflatoxin B1

Ali Nakhaei¹, Nazar Afzali¹, Seyyed Javad Hosseini Vashan¹, Mohammad Amir Karimi Torshizi²

1. Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran
2. Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tarbiyat modares, Tehran, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2018/07/01
Accepted: 2018/08/01
Available online: 2018/10/11

Article Subject:

Food Microbiology

IJMM 2018; 12(3): 199-207

Corresponding author:

Nazar Afzali

Department of Animal Sciences,
Faculty of Agriculture,
University of Birjand, Birjand,
Iran

Tel: 09151612157

Email:

nafzali@birjand.ac.ir

Use your device to scan
and read the article online



Abstract

Background and Aims: The aim of this study was to evaluate the protective effect of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against aflatoxin on reducing the defects of aflatoxin by adding to the drinking water of 192 day Ross 308 broiler chickens from 1 to 42 days old.

Materials and Methods: The experiment was based on a completely randomized design with 6 treatments, 4 replications, and 8 observations (chicks). First egg yolks were immunized against aflatoxin by injecting aflatoxin-BSA conjugate to laying hens. Also extracted immunoglobulin with 1 and 0.5 percent /volume concentration was added to broilers' drinking water. The experimental treatments were: 1) control (without any additives); 2) ration contaminated with 1 mg kg⁻¹ aflatoxin B1 (negative control treatment); 3) negative control + 0.5% (V/V) immunized yolk against AFB₁, 4) negative control + 0.5% (V/V) unimmunized yolk against AFB₁; 5) negative control + 1% (V/V) immunized yolk against AFB₁ and 6) negative control + 1% (V/V) unimmunized yolk against AFB₁.

Results: Using aflatoxin contaminated diet significantly increased serum cholesterol, and decreased serum total protein and albumin concentration ($P < 0.05$). Also, histopathologic lesions observed in the liver. Adding 1% (V/V) of immunized egg yolk to the drinking water (treatment 5) reduced serum cholesterol and increased total protein concentration compared to treatment 2 ($P < 0.05$). The length and width of the villi and the villi surface area of chicks receiving treatment 5 were higher than treatment 2 ($P < 0.05$). Liver tissue in chicken receiving treatment 3 and 5, was almost normal and few changes were observed in hepatocytes.

Conclusions: The results indicate that specific IgY against AFB₁ can be effective in reducing the defects of experimental aflatoxicosis as a detoxification agent.

Keywords: Aflatoxin B₁, Blood parameters, Specific immunoglobulin

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Nakhaei A, Afzali N, Hosseini Vashan S J, Karimi Torshizi M A. Protective Effect of Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) Against Aflatoxin on Blood Parameters, Ileum Morphometry and Hepatocytes' Histopathology of Broiler Chickens Fed Aflatoxin B1. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (3) :199-207



بررسی اثر محافظتی ایمنوگلوبولین اختصاصی زرده تخم مرغ (IgY) علیه آفاتوکسین بر فراسنجه‌های خونی، مورفومتری ایلنوم و هیستوپاتولوژی سلول‌های کبد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با آفاتوکسین B₁

علی نخعی^۱، نظر افزلی^۱، سید جواد حسینی و اشان^۱، محمدمیر کریمی ترشیزی^۲

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران
۲. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: این تحقیق به منظور بررسی اثر محافظتی ایمنوگلوبولین اختصاصی زرده تخم مرغ (IgY) علیه آفاتوکسین بر کاهش عوارض آفاتوکسین از طریق افزودن به آب آشامیدنی ۱۹۲ قطعه جوجه گوشتی یکروزه سویه راس ۳۰۸ از سن ۱ تا ۴۲ روزگی انجام شد.

مواد و روش کار: آزمایش به صورت کاملاً تصادفی با ۶ تیمار، ۴ تکرار و ۸ مشاهده (جوجه) صورت پذیرفت. ابتدا با تزریق کنژوگه آفاتوکسین B₁-آلبومین سرم گاوی به مرغان تخم‌گذار، زرده حاوی IgY علیه آفاتوکسین تولید (زرده ایمن) شد و در ادامه ایمنوگلوبولین استخراج شده با غلظت‌های ۱ و ۵/۰ درصد (حجمی) به صورت مخلوط با آب آشامیدنی استفاده شد. در این مطالعه گروه‌ها برحسب نوع تیمار عبارت‌اند از: (۱) شاهد (بدون هیچ افزودنی)؛ (۲) جیره حاوی یک میلی‌گرم آفاتوکسین B₁ (تیمار شاهد منفی)؛ (۳) شاهد منفی + ۵/۰ درصد حجمی زرده ایمن؛ (۴) شاهد منفی + ۵/۰ درصد حجمی زرده غیرایمن؛ (۵) شاهد منفی + ۱ درصد حجمی زرده ایمن؛ (۶) شاهد منفی + ۱ درصد زرده حجمی غیرایمن.

یافته‌ها: جیره حاوی آفاتوکسین سبب افزایش غلظت سرمی کلسترول و کاهش غلظت سرمی پروتئین تام و آلبومین شد ($P < 0/05$). همچنین ضایعات هیستوپاتولوژیکی در کبد مشاهده شد. افزودن یک درصد حجمی زرده ایمن به آب آشامیدنی (تیمار ۵)، موجب کاهش غلظت سرمی کلسترول و افزایش غلظت پروتئین تام در مقایسه با تیمار ۲ شد ($P < 0/05$). طول و عرض ویلی و سطح پرز روده جوجه‌های دریافت‌کننده تیمار ۵ بالاتر از تیمار ۲ بود ($P < 0/05$). در طیور دریافت‌کننده تیمارهای ۳ و ۵، برش بافت کبد تقریباً نرمال و تغییرات کمی در سلول‌های کبدی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: می‌توان گفت IgY اختصاصی زرده تخم مرغ علیه آفاتوکسین می‌تواند در کاهش اثرات آفاتوکسیکوزیس تجربی به‌عنوان یک عامل سم‌زدایی مؤثر واقع شود.

کلمات کلیدی: آفاتوکسین B₁، سم‌زدایی، ایمنوگلوبولین Y، فراسنجه‌های خونی، هیستوپاتولوژی

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۱۰
پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۱۰
انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۷/۱۹
موضوع:
میکروبیولوژی مواد غذایی
IJMM1397;12(3): 199-207
نویسنده مسئول:

نظر افزلی
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی،
دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران
تلفن: ۰۹۱۵۱۶۱۲۱۵۷
پست الکترونیک:
nafzali@birjand.ac.ir

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

تاکنون روش‌های بیولوژیکی، شیمیایی و فیزیکی متعددی برای خنثی کردن آفاتوکسین بررسی شده است (۲). یک روش به‌کارگیری مواد جاذب در جیره غذایی است که با آفاتوکسین‌ها پیوند ایجاد کرده و جذب آنها را در دستگاه گوارش کاهش می‌دهد (۳). اما محدودیت‌های روش‌های فیزیکی و شیمیایی محققان را به

آفاتوکسین B₁ از نظر بیولوژیکی فعال‌ترین مشتق آفاتوکسین از بین انواع آفاتوکسین‌های شناخته شده (B₁, G₂, G₁) و B₂) است که موجب مهار سنتز DNA، RNA و کاهش سنتز پروتئین و حساسیت نسبت به استرس‌های میکروبی و محیطی می‌شود (۱).

تولید سم

کشت قارچ آسپرزیلوس فلاووس سویه NRRL 2999 در محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) (Merck, آلمان) انجام شد. سپس قارچ بر فلاسک‌های حاوی ۲۵ گرم برنج و ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر تحت شرایط استریل، به‌منظور رشد و تولید توکسین اضافه و به انکوباتور (شیماز، ایران) با دمای ۲۸ درجه سلسیوس منتقل شد. پس از سپری شدن هفت روز، فلاسک‌ها برای غیرفعال شدن قارچ و جلوگیری از آلودگی محیط اتوکلاو شده و برنج‌های آلوده در محیطی به‌دور از تابش نور خورشید خشک شدند (۱۳). اندازه‌گیری غلظت سم آفلاتوکسین از طریق HPLC در آزمایشگاه تستی مشهد انجام شد.

ایمن‌سازی پرندگان و تولید IgY

ایمن‌سازی مرغان تخم‌گذار و تولید IgY با استفاده از کونژوگه آفلاتوکسین B1-آلبومین سرم گاوی (AFB1-BSA Conjugate) (Sigma, آلمان) انجام شد. تزریق طی سه مرحله و به فواصل ۱۴ روز و به روش عضلانی در دو نقطه از سینه انجام شد. کونژوگه به‌ترتیب با ۰/۲ میلی‌لیتر ادجوانت کامل فروند در تزریق اول و ادجوانت ناقص فروند در تزریقات بعدی همراه بود تا پاسخ ایمنی مناسب‌تری به‌دست آید (۱۴). استخراج IgY طبق روش Fulton و همکاران انجام گرفت (۱۴). به‌اختصار ابتدا زرده تخم‌مرغ به‌طور کامل از سفیده جدا شد. به‌اندازه حجم زرده به‌دست‌آمده، محلول بافر فسفات نمکی افزوده و مخلوط حاصل به‌مدت سه دقیقه با سرعت بالا در دستگاه مخلوط‌کن همگن شد و سپس در دمای ۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ دقیقه و با نیروی $1800 \times g$ سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ لایه میانی حاوی IgY جمع‌آوری شد. برای تعیین قابلیت زرده ایمن‌شده در کاهش سم آفلاتوکسین B1، مقدار ۵۰ میکرولیتر از زرده استخراج‌شده از تخم پرندگان ایمن و غیرایمن پس از رقیق‌سازی به یک میلی‌لیتر بافر فسفات حاوی ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر آفلاتوکسین B1 افزوده شد. پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر محلول اسید تری‌کلرواستیک ۱۰ درصد، مجموعه IgY و آفلاتوکسین B1 متصل به آن با استفاده از سانتریفیوژ رسوب داده شد. سم غیرمتصل باقی‌مانده در مایع رویی پس از استخراج در ۵۰ میکرولیتر کلروفورم مخلوط و روی صفحه TLC (Thin-layer Chromatography) (صفحه آلومینیومی TLC همراه با سیلیکاژل 60 F₂₅₄; Merck, آلمان) در یک راستا و همراه استاندارد سم نقطه‌گذاری شد. صفحه در یک بشر محتوی محلول

جستجوی روش‌های مؤثر جایگزین وادار کرده است. به‌تازگی روش‌های بیولوژیکی به‌علت قابلیت استفاده آسان و کم‌هزینه، توجه محققین را جلب کرده است (۴). نخستین بار در سال ۱۹۸۳ کسب ایمنی اکتسابی غیرفعال در برابر سم تتانوس از طریق انتقال ایمنی از مرغ به جوجه‌ها اثبات شد (۵). مطالعات نشان داد که IgY ایمنی ایجادشده را از مرغ مادر به جوجه‌ها منتقل می‌کند. تولید پادتن از سوی مرغ‌ها مزیت‌های فراوانی دارد؛ از جمله اینکه اقتصادی بوده و از طرفی فقط نیاز به جمع‌آوری روزانه تخم‌مرغ‌ها در مقایسه با خون‌گیری از پستانداران دارد.

ایمونوگلوبولین Y (IgY) در طیور معادل ایمونوگلوبولین G (IgG) در پستانداران است که به‌صورت غیرفعال از جنین در حال رشد محافظت می‌کند. در بدن طیور سه نوع پادتن IgA, IgY و IgM یافت می‌شود (۶). در طول مراحل تولید تخم‌مرغ، IgY موجود در سرم به‌صورت انتخابی و از طریق گیرنده‌های موجود در سطح غشای زرده به داخل زرده منتقل می‌شود (۷). IgA و IgM نیز به داخل سفیده منتقل می‌شوند (۸). پژوهشگران، استفاده از IgY را برای مقابله یا پیشگیری از عوامل بیماری‌زا نظیر سالمونلا و آنفلوآنزای پرندگان بررسی کرده‌اند (۹،۱۰). همچنین برای تشخیص سموم قارچی مختلف با استفاده از تکنیک ELISA از IgY استفاده شده است (۱۱). Tsukamoto و همکاران (۱۲) توانستند IgY ضدویروس آنفلوآنزای A/H1N1 2009 را با استفاده از واکسن آنفلوآنزای خوکی تهیه کنند. پادتن‌های به‌دست‌آمده به‌شدت نسبت به هر دو سویه آنفلوآنزای خوکی و انسانی ویروس واکنش داده و در شرایط آزمایشگاهی قادر به خنثی‌سازی ویروس A/H1N1 شد. نخستین بار Qiu و همکاران با مطالعه روی سلول‌های انسانی و بررسی سمیت سلولی ناشی از آفلاتوکسین B₁ نشان دادند که ایمونوگلوبولین اختصاصی زرده تخم‌مرغ توانایی اتصال به توکسین‌هایی همچون آفلاتوکسین B₁ را داشته و می‌تواند از اثرات این توکسین‌ها بکاهد (۲۵). از این‌رو هدف از این بررسی امکان بهره‌برداری خوراکی از IgY تولیدی علیه آفلاتوکسین B₁ در کاهش اثرات آفلاتوکسیکوزیس بر اساس شاخص‌های مرتبط با بیوشیمی خون، مورفومتری ایلئوم و هیستوپاتولوژی کبد جوجه‌های گوستی است.

مواد و روش‌ها

محل انجام آزمایش

این پژوهش در سالن تحقیقاتی واحد دام‌پروری دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند در مهرماه ۱۳۹۶ انجام شد.

هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شد تا بتوان صفات بافتی را با کمک میکروسکوپ نوری و نرم افزار Image Pro Plus v 4.5 اندازه گیری کرد (۱۶). در مورفومتری ایلنوم طول و عرض ویلی، شاخص پرز (نسبت طول به عرض ویلی) و سطح پرز (عرض × طول/۱۰۰۰) بررسی شد.

آنالیز آماری

داده های حاصل با استفاده از نرم افزار SAS و روش مدل خطی عمومی (GLM) تجزیه و تحلیل شد (۱۷). میانگین گروه های آزمایشی با استفاده از روش توکی در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته ها

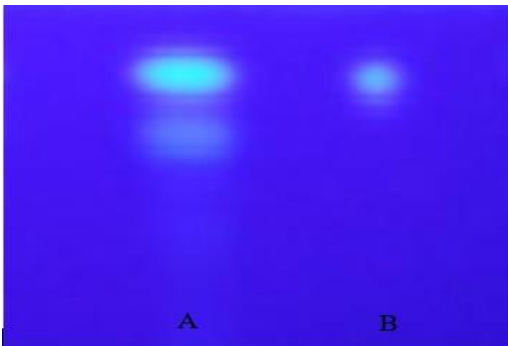
غلظت سم تولیدی

آزمایشگاه تست میزان آلودگی دانه های برنج به آفلاتوکسین B₁ را ۷۵ میلی گرم در کیلوگرم گزارش کرد.

استخراج پادتن و قابلیت آفلاتوکسین زدایی زرده

ایمن شده

با بررسی صفحات سیلیکاژل زیر نور فلورسنس (شکل ۱) مشاهده شد میزان کاهش سم در زرده ایمن شده علیه آفلاتوکسین B₁ بیشتر از زرده ایمن نشده است.



شکل ۱. بررسی قابلیت زرده ایمن شده در کاهش سم آفلاتوکسین B₁ در شرایط آزمایشگاهی و با استفاده از صفحات کروماتوگرافی سیلیکاژل. A: غلظت سم آفلاتوکسین B₁ تحت تأثیر زرده ایمن نشده علیه آفلاتوکسین B₁. B: غلظت سم آفلاتوکسین B₁ تحت تأثیر زرده ایمن شده علیه آفلاتوکسین B₁

بیوشیمیایی سرم خون

نتایج تأثیر تیمارهای مختلف مورد بررسی بر غلظت سرمی لپیدها، پروتئین ها و آنزیم های کبدی جوجه های گوشتی در جدول ۱ ارائه شده است. براساس نتایج، آلوده شدن خوراک جوجه های گوشتی به یک میلی گرم در کیلوگرم آفلاتوکسین موجب بالا رفتن سطح سرمی کلسترول خون جوجه های گوشتی شد. پایین ترین

کلروفرم: استون: آب (۸۸: ۱۱: ۱) قرار گرفت سپس در معرض هوا خشک و تحت نور لامپ UV (۳۶۵ nm) شدت نقطه فلورسنس نمونه با نقطه فلورسنس استاندارد مقایسه شد (۱۳).

مدل آزمایش

تعداد ۱۹۲ جوجه گوشتی نر سوپیه راس (۳۰۸) به طور تصادفی بین ۲۴ قفس (۸ جوجه در هر قفس) توزیع شدند. پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار، ۴ تکرار و ۸ قطعه جوجه در هر تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: (۱) شاهد (بدون هیچ افزودنی)؛ (۲) جیره حاوی یک میلی گرم در کیلوگرم آفلاتوکسین B₁ (تیمار شاهد منفی)؛ (۳) شاهد منفی + ۰/۵ درصد حجمی زرده تخم مرغ ایمن؛ (۴) شاهد منفی + ۰/۵ درصد حجمی زرده تخم مرغ غیرایمن؛ (۵) شاهد منفی + ۱ درصد حجمی زرده تخم مرغ ایمن؛ (۶) شاهد منفی + ۱ درصد حجمی زرده تخم مرغ غیرایمن. زرده تخم مرغ براساس درصد حجمی به آب آشامیدنی جوجه های گوشتی اضافه شد.

ارزیابی بیوشیمیایی سرم خون

در انتهای دوره آزمایش (۴۲ روزگی) از هر تیمار ۸ قطعه جوجه انتخاب و خون گیری از ورید بال به منظور تعیین پارامترهای بیوشیمیایی خون انجام گرفت. میزان پروتئین تام (TP) و آلبومین (ALB) و آنزیم های سرم خون از قبیل آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و لپیدهای خون شامل میزان کلسترول (CHOL)، تری گلیسرید (TG)، لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL) و لیپوپروتئین با دانسیته پایین (LDL) با استفاده از کیت های تجاری پارس آزمون در دستگاه اتوانالیزر (Geesan، ایتالیا) اندازه گیری شد.

مورفومتری ایلنوم و هیستوپاتولوژی کبد

در ۴۲ روزگی با انتخاب دو پرنده از هر تکرار و ذبح جوجه ها، شکم هر پرنده را باز کرده و یک قطعه حدوداً ۱۰ سانتی متری از ایلنوم و کبد آنها جدا شد. قطعه های کبد و ایلنومی (۵cm × ۰/۵) در داخل فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت و در دمای محیط و به دور از نور به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شد تا مطالعات بافتی روی آنها انجام گیرد. در ادامه نمونه هایی که در بافر ۱۰ درصد فرمالین قرار داشتند، پس از خارج کردن و شستشو با آب مقطر به تفکیک در یک سبد (حدوداً ۳cm × ۲) گذاشته و در داخل دستگاه آماده کننده بافت (Tissue processor) قرار داده شدند تا مراحل ثابت کردن، آبگیری، شفاف کردن و آغستگی آنها با پارافین انجام پذیرد. پس از خروج از دستگاه، از هر نمونه فیکس شده، یک بلوک پارافین تهیه شد (۱۵). سپس از هر بلوک، برش مقطعی تهیه و با

آسپاراتات آمینوترانسفراز و گاماگلوبولین ترانسفراز بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری نشان نداد. مصرف جوجه‌های گوشتی از خوراک تیمار شاهد منفی موجب کاهش غلظت پروتئین تام و آلبومین خون جوجه‌های گوشتی شد که در مقایسه با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری دارد ($P < 0.05$). افزودن زرده تخم‌مرغ به آب آشامیدنی جوجه‌های گوشتی موجب افزایش میزان پروتئین تام و آلبومین خون جوجه‌های گوشتی در مقایسه با تیمار شاهد منفی شد. بالاترین غلظت سرمی آلبومین و پروتئین تام تحت‌تأثیر افزودن یک درصد زرده تخم‌مرغ حاوی IgY به آب آشامیدنی جوجه‌های گوشتی است که در مقایسه با تیمار شاهد اختلاف آن معنی‌دار است ($P < 0.05$).

میزان کلسترول خون جوجه‌های گوشتی تحت‌تأثیر افزودن یک درصد زرده تخم‌مرغ فاقد IgY به آب آشامیدنی است که در مقایسه با تیمار شاهد منفی اختلاف آن معنی‌دار است ($P < 0.05$). مصرف جوجه‌های گوشتی از خوراک تیمار شاهد منفی موجب افزایش میزان لیپوپروتئین با دانسیته پایین (LDL) شد. اضافه‌کردن زرده تخم‌مرغ حاوی و فاقد IgY به آب آشامیدنی جوجه‌های تغذیه‌شده با خوراک آلوده، موجب کاهش میزان LDL خون جوجه‌های گوشتی شد. کمترین غلظت سرمی LDL تحت‌تأثیر افزودن ۰/۵ درصد زرده تخم‌مرغ حاوی IgY به آب آشامیدنی جوجه‌های گوشتی که در مقایسه با تیمار شاهد منفی اختلاف آن معنی‌دار است ($P < 0.05$). غلظت سرمی آنزیم‌های

جدول ۱. تأثیر تیمارهای مختلف بر غلظت سرمی لیپیدها، پروتئین‌ها و آنزیم‌های کبدی (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) جوجه‌های گوشتی در ۴۲ روزگی

تیمارها	CHOL	TG	HDL	LDL	AST	ALB	GGT	TP
شاهد	۱۲۳/۲۵ ^{ab}	۸۸/۲۵	۷۴/۲۵	۳۲/۲۵ ^{ab}	۳۳۳/۷۵	۱/۵۵ ^{ab}	۲۴/۷۵	۲/۶۰ ^a
شاهد منفی	۱۵۵/۰۰ ^a	۹۰/۲۵	۷۹/۰۰	۴۵/۰۰ ^a	۳۸۲/۷۵	۱/۲۶ ^{bc}	۲۵/۷۵	۱/۸۳ ^b
۰/۵ درصد زرده ایمن	۱۲۴/۳۳ ^{ab}	۸۹/۰۰	۸۱/۳۳	۲۲/۳۳ ^b	۳۴۶/۳۳	۱/۵۳ ^{ab}	۲۴/۶۶	۲/۴۶ ^a
۰/۵ درصد زرده غیرایمن	۱۱۱/۴۳ ^b	۷۷/۶۷	۷۱/۶۶	۲۷/۰۰ ^b	۳۵۸/۶۷	۱/۳۵ ^c	۲۳/۶۶	۱/۸۳ ^b
۱ درصد زرده ایمن	۱۳۰/۰۰ ^{ab}	۸۷/۳۳	۷۹/۰۰	۳۰/۰۰ ^{ab}	۳۷۱/۵۰	۱/۷۰ ^a	۲۵/۳۳	۲/۶۶ ^a
۱ درصد زرده غیرایمن	۱۱۲/۳۳ ^b	۸۶/۰۰	۷۲/۱۶	۲۸/۶۶ ^{ab}	۳۴۳/۶۷	۱/۳۶ ^{bc}	۲۲/۰۰	۲/۲۳ ^{ab}
سطح معنی‌داری	۰/۰۰۹	۰/۲۳۲۱	۰/۰۶۸۰	۰/۰۰۵۵	۰/۲۶۴۲	۰/۰۰۰۵	۰/۳۶۴۴	۰/۰۰۰۹
خطای آزمایشی	۷/۶۳	۱۰/۱۴	۲/۳۷	۳/۸۵	۲۵/۷۴	۰/۰۵	۱/۲۵	۰/۱۱
انحراف معیار	۱۲/۱۰	۲۴/۴۲	۶/۲۲	۲۴/۶۲	۱۵/۱۶	۷/۹۰	۱۰/۳۰	۱۰/۱۹

a, b, c: میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ستون، تفاوت معنی‌دار آماری دارند ($P < 0.05$).

منفی (تیمار ۲) اختلاف معنی‌داری دارد ($P < 0.05$). شاخص پرز و سطح پرز در جوجه‌های تغذیه‌شده با یک میلی‌گرم در کیلوگرم آفلاتوکسین در مقایسه با تیمار شاهد مثبت، کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$). افزودن زرده تخم‌مرغ حاوی اینوگلوبولین اختصاصی به جیره آلوده به آفلاتوکسین، موجب بهبود سطح پرز و شاخص پرز ایلئوم جوجه‌های گوشتی شد ($P < 0.05$).

هیستوپاتولوژی کبد

فتومورفوگراف آسیب‌شناسی بافتی کبد طیور تحت‌تأثیر تیمارهای مختلف (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین) در شکل ۲ قابل‌مشاهده است. در پایان دوره آزمایش (۴۲ روزگی)، آسیب‌شناسی بافتی کبد طیور دریافت‌کننده جیره‌های آلوده‌شده با سم آفلاتوکسین نشان‌دهنده نفوذ سلول‌های مونونوکلئار

مورفومتری ایلئوم

تأثیر تیمارهای مختلف بر مورفومتری ایلئوم جوجه‌های گوشتی در جدول ۲ ارائه شده است. کمترین طول ویلی در جوجه‌هایی که از خوراک آلوده به یک میلی‌گرم در کیلوگرم آفلاتوکسین تغذیه شدند، اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد مثبت دارد ($P < 0.05$). افزودن زرده تخم‌مرغ به آب آشامیدنی جوجه‌های گوشتی موجب افزایش طول ویلی ایلئوم جوجه‌های گوشتی شد ($P < 0.05$). کمترین عرض ویلی مشاهده‌شده در مورفومتری ایلئوم جوجه‌های گوشتی تحت‌تأثیر افزودن یک میلی‌گرم در کیلوگرم آفلاتوکسین به جیره پایه جوجه‌های گوشتی است. بالاترین عرض ویلی تحت‌تأثیر افزودن یک درصد زرده تخم‌مرغ حاوی IgY به جیره شاهد منفی (تیمار ۵) است که در مقایسه با تیمار شاهد

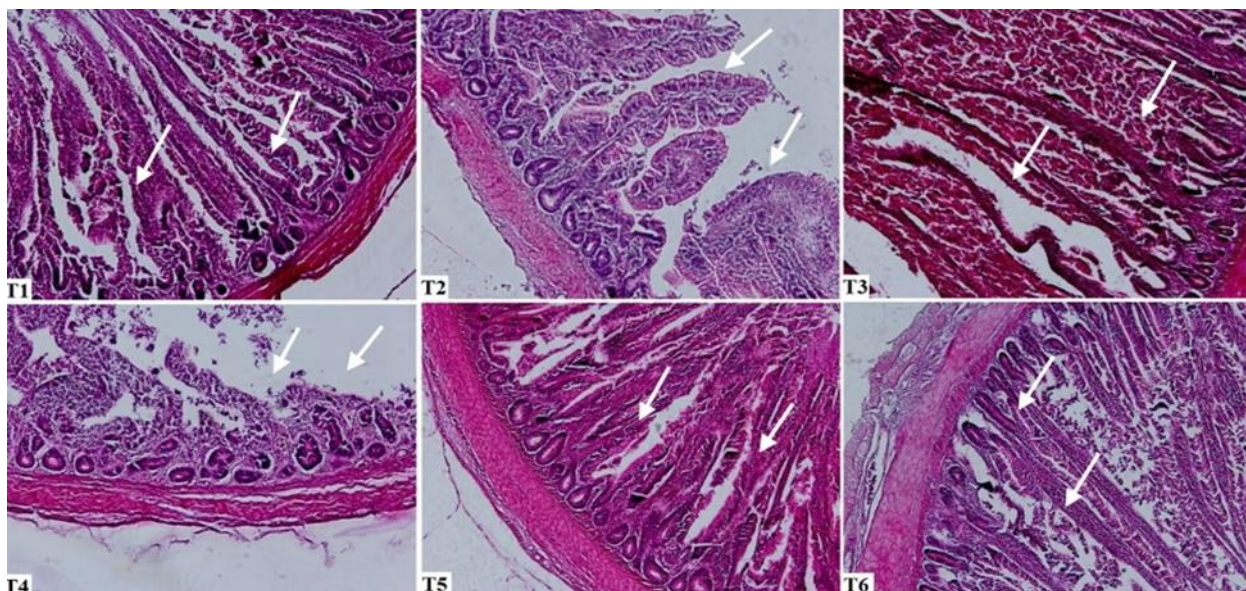
سطوح زرده تخم مرغ حاوی ایمنوگلوبولین اختصاصی تقریباً نرمال بوده و نشان دهنده انتشار گسسته تورم سلولی، همراه با تأثیرات خفیف بر هیپاتوسیت ها و تغییرات خفیف سیتوپلاسمی بود (نواحی ای که با نوک پیکان مشخص شده است).

(Mononuclear) در نواحی پورتال، تکثیر غیرمجاری صفراوی، تخریب وسیع، نکروز، ایجاد حفره های سیتوپلاسمی و فساد چربی در هیپاتوسیت ها، همراه با مشاهده نواحی پری لوبولار (Perilobular) است (نواحی ای که با نوک پیکان مشخص شده است). برش بافت کبد طیور دریافت کننده جیره های محتوی

جدول ۲. تأثیر تیمارهای مختلف بر مورفومتری ایلئوم جوجه های گوشتی در ۴۲ روزگی

تیمارها	طول ویلی (میکرومتر)	عرض ویلی (میکرومتر)	شاخص پرز (میکرومتر/میکرومتر)	سطح پرز (میکرومتر/میکرومتر)
شاهد	۱۳۹۵/۰۰ ^a	۱۶۵/۰۰ ^{ab}	۸/۵۵ ^a	۰/۲۲ ^a
شاهد منفی	۶۸۲/۵۰ ^e	۱۶۲/۵۰ ^{ab}	۴/۲۴ ^b	۰/۱۱ ^c
۰/۵ درصد زرده ایمن	۱۲۰۰/۰۰ ^{bc}	۱۴۰/۰۰ ^b	۸/۶۶ ^a	۰/۱۶ ^b
۰/۵ درصد زرده غیرایمن	۸۸۰/۰۰ ^d	۱۹۰/۰۰ ^a	۴/۶۵ ^b	۰/۱۶ ^b
۱ درصد زرده ایمن	۱۲۸۵/۰۰ ^{ab}	۱۷۲/۵۰ ^{ab}	۷/۵۶ ^a	۰/۲۲ ^a
۱ درصد زرده غیرایمن	۱۰۸۵/۰۰ ^c	۱۵۷/۵۰ ^{ab}	۶/۹۱ ^a	۰/۱۷ ^b
سطح معنی داری	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۹۰	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱
خطای آزمایشی	۳۶/۰۵	۷/۹۲	۰/۴۶	۰/۰۰۹۵
انحراف معیار	۶/۶۲	۹/۶۳	۱۳/۷۲	۱۰/۷۳

a, b, c: میانگین های با حروف متفاوت در هر ستون، تفاوت معنی دار آماری دارند ($P \leq 0.05$).



شکل ۲. آسیب شناسی بافتی کبد طیور تحت تأثیر تیمارهای مختلف: (۱) شاهد مثبت (بدون هیچ افزودنی); (۲) جیره حاوی یک میلی گرم در کیلوگرم آفلاتوکسین B1 (تیمار شاهد منفی); (۳) شاهد منفی + ۰/۵ درصد حجمی زرده ایمن; (۴) شاهد منفی + ۰/۵ درصد حجمی زرده غیرایمن; (۵) شاهد منفی + یک درصد حجمی زرده ایمن; (۶) شاهد منفی + ۰/۵ درصد حجمی زرده غیرایمن. (نواحی مشخص شده با پیکان نشان دهنده تخریب وسیع و ایجاد حفره های سیتوپلاسمی در هیپاتوسیت ها است).

بحث

را مهار کرد که می‌تواند به علت جذب سم از طریق پادتن موجود در زرده ایمن باشد (۲۵).

ارتفاع ویلی و نسبت ارتفاع به عمق کریبت در ناحیه ایلنوم جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با آفلاتوکسین نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است. در یک بررسی دیگر ارزیابی گلوکومانان اصلاح‌شده (Mycosorb) و آلومینوسیلیکات هیدراته برای کاهش سمیت آفلاتوکسین و توکسین T-2 در جوجه‌های گوشتی بررسی و بیان شد. ارتفاع ویلی در آلودگی به آفلاتوکسین کاهش یافت که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (۲۶). این مشاهدات می‌تواند تحت تأثیر توده میکروفلور روده باشد که آفلاتوکسین اثرات منفی بر سطح قابل جذب روده می‌گذارد. ویلی‌های کوتاه‌تر و نازک‌تر در جوجه‌های تغذیه‌شده با آفلاتوکسین در نتیجه اختلال در سنتز پروتئین (۲۷) و کاهش تکثیر سلولی اپیتلیال است (۲۸). در جوجه‌های دریافت‌کننده زرده ایمن (تیمارهای ۳ و ۵) پروتئین‌های محافظت‌کننده خانواده BCL2 می‌توانند مانع نفوذپذیری میتوکندری و انتشار پروتئین آپوپتوزین از میتوکندری شده و در نهایت مانع آپوپتوز یا نکروز شود (۲۹). در مقابل پروتئین‌های پروآپوپتیک از قبیل BAX می‌توانند با تخریب میتوکندری منجر به آپوپتوز یا نکروز شوند (۲۹). آفلاتوکسین‌ها موجب مهار بیان BCL2 و محرک بیان پروتئین‌های BAX هستند (۳۰). ایمنوگلوبولین اختصاصی زرده تخم‌مرغ با مهار بیان BAX و افزایش بیان پروتئین‌های محافظت‌کننده BCL2 اثرات مخرب آفلاتوکسین را بر میتوکندری کاهش می‌دهد (۲۵). نتایج تحقیق حاضر با مطالعات Awad و همکاران و Wu و همکاران که اثرات مضر میکوتوکسین‌ها بر موفورلوژی روده را نشان دادند، مطابقت دارد (۳۱-۳۲).

متابولیت‌های سمی آفلاتوکسین به اسیدهای نوکلئیک و نوکلئوپروتئین‌ها که برای زنده ماندن سلول‌ها حیاتی هستند، متصل شده و سبب تولید زیاد لیپید کبدی، بزرگ شدن کبد، تکثیر مجاری صفراوی، نکروز یا مرگ سلولی و سرطان سلول‌های کبدی می‌شود (۳۳). در این مطالعه مکمل‌سازی جیره‌های آلوده‌شده با یک ppm سم آفلاتوکسین و غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد ایمنوگلوبولین Y، توانایی بالای این ایمنوگلوبولین را در جذب سم و کاهش اثرات آن بر بافت کبد طیور دریافت‌کننده این جیره‌ها نشان داد. هرچند که در بررسی پاتولوژیک کبد تأثیرات خفیف بر سلول‌های کبدی، نفوذ سلول‌های مونونوکلئار و هایپرپلازی خفیف صفراوی قابل مشاهده است.

اندازه‌گیری تغییرات بیوشیمیایی سرم خون و فعالیت آنزیم‌ها می‌تواند به تشخیص موارد آفلاتوکسیکوزیس، قبل از ظهور علائم بالینی کمک کند (۱۸). در تحقیق حاضر تغذیه جوجه‌ها با تیمار شاهد منفی موجب افزایش غلظت سرمی کلسترول و LDL و کاهش غلظت سرمی پروتئین تام و آلبومین شد. هم‌سو با نتایج تحقیق حاضر، در مطالعه Hedayati و همکاران نیز عنوان شد که در جوجه‌های دریافت‌کننده سم آفلاتوکسین، میزان کلسترول افزایش یافته است (۱۹). کلسترول یکی از استرول‌های اصلی موجود در همه بافت‌ها بوده که در هپاتوسیت‌ها بیوسنتز می‌شود. مکانیسم دقیق این افزایش به وضوح درک نمی‌شود؛ اما این امر ممکن است به دلیل نفوذ چربی و دژنراسیون هپاتوسیت‌ها طی آفلاتوکسیکوز باشد (۲۰). در جوجه‌هایی که آب آشامیدنی آنها حاوی یک درصد IgY علیه آفلاتوکسین B₁ است، مقدار کلسترول خون در مقایسه با تیمار شاهد منفی کاهش یافته است. در تیمارهای دریافت‌کننده آب حاوی زرده تخم‌مرغ غیرایمن نیز کاهش در مقدار غلظت سرمی کلسترول مشاهده شد که کاهش اثرات سم از سوی زرده غیرایمن را با توجه به اجزای سازنده آن می‌توان به واکنش اجزای پروتئینی و تا حدی کربوهیدرات موجود در زرده نسبت داد (۲۱).

آفلاتوکسین، RNA پلی‌مراز وابسته به DNA را مهار می‌کند و موجب اختلال در عملکرد DNA هسته‌ای می‌شود که به مهار کلی تولید پروتئین منتج می‌شود (۲). علاوه بر اینها میزان فعالیت برخی آنزیم‌ها از جمله آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز که برای ترانس آمیناسیون اسیدهای آمینه لازم است، در کبد افزایش یافت. این موارد حاکی از این است که مصرف پروتئین یا اسیدهای آمینه در پروسه گلوکونوژنز در موقع آفلاتوکسیکوزیس افزایش می‌یابد (۲۲). در این تحقیق کاهش غلظت پروتئین تام خون در جوجه‌های تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی آفلاتوکسین، نشان‌گر اختلال سنتز پروتئین در کبد است (۲۳). براساس گزارش‌های Malekinejad و همکاران (۲۴) که تأثیر سطوح مختلف بنتونیت سدیم و خارمریم را در جوجه‌های گوشتی چالش‌یافته با آفلاتوکسین B₁ مورد بررسی قرار دادند، تیمار شاهد منفی موجب افزایش معنی‌دار تری‌گلیسرید، کلسترول و کاهش پروتئین تام در مقایسه با تیمار شاهد مثبت شد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. افزودن زرده ایمن به آب آشامیدنی (تیمارهای ۳ و ۵) تأثیر سم بر تغییر متابولیت‌های سرم

براساس نتایج این مطالعه، تأثیرگذاری زرده در تخم مرغ‌های ایمن شده نسبت به تخم مرغ‌های غیرایمن بیشتر است، پس می‌توان ایمنوگلوبولین اختصاصی زرده تخم مرغ علیه آفاتوکسین B₁ را برای توسعه آنتی‌بادی‌ها به‌عنوان عوامل سم‌زدایی پیشنهاد داد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکتری تخصصی رشته تغذیه طیور دانشگاه بیرجند است که در تاریخ ۹۴/۴/۳۰ به تصویب رسیده است. نویسندگان از تمام کسانی که در اجرای این تحقیق صمیمانه یاری رسانده‌اند، قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

- Edrington T, Kubena L, Harvey R, Rottinghaus G. Influence of a superactivated charcoal on the toxic effects of aflatoxin or T-2 toxin in growing broilers. *Poult Sci.* 1997;76(9):1205-11. <https://doi.org/10.1093/ps/76.9.1205> PMID:9276881
- Kececi T, Oguz H, Kurtoglu V, Demet O. Effects of polyvinylpolypyrrolidone, synthetic zeolite and bentonite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis. *Br Poult Sci.* 1998;39(3):452-8. <https://doi.org/10.1080/00071669889051> PMID:9693831
- Harvey R, Kubena L, Elissalde M, Phillips T. Efficacy of zeolitic ore compounds on the toxicity of aflatoxin to growing broiler chickens. *Avian Dis.* 1993;37(1):67-73. <https://doi.org/10.2307/1591459> PMID:8383962
- Teniola OD, Addo PA, Brost IM, Färber P, Jany KD, Alberts JF, et al. Degradation of aflatoxin B₁ by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenvivorans* sp. nov. DSM44556T. *Int J Food Microbiol.* 2005;105(2):111-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.004> PMID:16061299
- Klemperer F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisierungstherapie. *Arch Exp Pathol Pharmacol.* 1893;31(4-5):356-82. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01832882>
- Leslie GA, Martin LN. Studies on the Secretory Immunologic System of Fowl: III. Serum and Secretory IgA of the Chicken. *J Immunol.* 1973;110(1):1-9. PMID:4631071
- Tesar DB, Cheung EJ, Bjorkman PJ. The chicken yolk sac IgY receptor, a mammalian mannose receptor family member, transcytoses IgY across polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 2008;19(4):1587-93. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-09-0972> PMID:18256279 PMCID:PMC2291411
- Rose ME, Orlans E, Buttress N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur J Immunol.* 1974;4(7):521-3. <https://doi.org/10.1002/eji.1830040715> PMID:4213170
- Chalghoumi R, Beckers Y, Portetelle D, Théwis A. hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 2009;13(2):295-308. <http://www.pressesagro.be/base/text/v13n2/295.pdf>
- Rahimi S, Shiraz ZM, Salehi TZ, Torshizi MAK, Grimes JL. Prevention of Salmonella infection in poultry by specific egg-derived antibody. *Int J Poult Sci.* 2007;6(4):230-5. <https://doi.org/10.3923/ijps.2007.230.235>
- Lee E, Sunwoo H, Menninen K, Sim J. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Poult Sci.* 2002;81(5):632-41. <https://doi.org/10.1093/ps/81.5.632> PMID:12033412
- Tsukamoto M, Hiroi S, Adachi K, Kato H, Inai M, Konishi I, et al. Antibodies against swine influenza virus neutralize the pandemic influenza virus A/H1N1. *Mol Med Rep.* 2011;4(2):209-14. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.410> PMID:21468553
- Shotwell OL, Hesseltine C, Stubblefield R, Sorenson W. Production of aflatoxin on rice. *Appl Microbiol.* 1966;14(3):425-8. PMID:5970829
- Fulton R, Nersessian B, Reed W. Prevention of *Salmonella enteritidis* infection in commercial ducklings by oral chicken egg-derived antibody alone or in combination with probiotics. *Poult Sci.* 2002;81(1):34-

40. <https://doi.org/10.1093/ps/81.1.34>
PMID: [11885897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11885897/)
15. Bancroft J, Marilyn G. Theory and practice of histological techniques. 5nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2002.
16. Sakamoto K, Hirose H, Onizuka A, Hayashi M, Futamura N, Kawamura Y, et al. Quantitative study of changes in intestinal morphology and mucus gel on total parenteral nutrition in rats. *J Surg Res.* 2000;94(2):99-106. <https://doi.org/10.1006/jsre.2000.5937>
PMID: [11104649](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11104649/)
17. Institute S. SAS/GRAPH 9.1 Reference. Jakarta: SAS institute; 2004.
18. Oguz H, Parlat S. Effects of dietary mannanoligosaccharide on performance of Japanese quail affected by aflatoxicosis. *S Afr J Anim Sci.* 2004;34(3):144-8. <http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v34i3.3957>
19. Hedayati M, Manafi M, Yari M, Mousavipour S. Commercial broilers exposed to aflatoxin b 1: Efficacy of a commercial mycotoxin binder on internal organ weights, biochemical traits and mortality. *Int J Agric For.* 2014;4(5):351-8.
20. Jha A, Shah K, Verma RJ. Aflatoxin-induced biochemical changes in liver of mice and its mitigation by black tea extract. *Acta Pol Pharm.* 2012;69(5):851-7. PMID: [23061280](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23061280/)
21. Mine Y. Egg bioscience and biotechnology. New Jersey: John Wiley & Sons; 2007. <https://doi.org/10.1002/9780470181249>
22. van Rensburg CJ, Van Rensburg C, Van Ryssen J, Casey N, Rottinghaus G. In vitro and in vivo assessment of humic acid as an aflatoxin binder in broiler chickens. *Poult Sci.* 2006;85(9):1576-83. <https://doi.org/10.1093/ps/85.9.1576> PMID: [16977843](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16977843/)
23. Tung H, Wyatt R, Thaxton P, Hamilton P. Concentrations of serum proteins during aflatoxicosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1975;34(2):320-6. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(75\)90038-1](https://doi.org/10.1016/0041-008X(75)90038-1)
PMID: [1209630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1209630/)
24. Malekinejad P, Afzali N, Mohammadi A, Sarir H. Protective effects of milk thistle (*silybum marianum*) seeds and sodium bentonite in ameliorating the toxic effects of aflatoxin b1 in broiler chicks. *Arch Med Lab Sci.* 2015;1(2):67-73. <http://dx.doi.org/10.22037/amls.v1i2.10292>
25. Qiu T, Shen X, Tian Z, Huang R, Li X, Wang J, et al. IgY reduces AFB1-induced cytotoxicity, cellular dysfunction, and genotoxicity in human L-02 hepatocytes and Swan 71 trophoblasts. *J Agric Food Chem.* 2018;66(6):1543-50. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05385>
PMID: [29325416](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29325416/)
26. Girish C, Devegowda G, editors. Evaluation of modified glucomannan (Mycosorb) and hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the individual and combined toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. Proceedings of the 16th Australian Poultry Science Symposium; 2004 Feb 9-11; Sydney, New South Wales, Australia: Poultry Research Foundation; 2004. p.126-9. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20063231556>
27. Awad WA, Böhm J, Razzazi-Fazeli E, Ghareeb K, Zentek J. Effect of Addition of a Probiotic Microorganism to Broiler Diets Contaminated with Deoxynivalenol on Performance and Histological Alterations of Intestinal Villi of Broiler Chickens. *Poult Sci.* 2006;85(6):974-9. <https://doi.org/10.1093/ps/85.6.974> PMID: [16776464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16776464/)
28. Fleming S, Youngman L, Ames B. Intestinal cell proliferation is influenced by intakes of protein and energy, aflatoxin, and Whole-body radiation. *Nutr Cancer.* 1994;22(1):11-30. <https://doi.org/10.1080/01635589409514328>
PMID: [11304907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11304907/)
29. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 2003;22(53):8590-608. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207102>
PMID: [14634621](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14634621/)
30. Yang X-J, Lu H-Y, Li Z-Y, Bian Q, Qiu L-L, Li Z, et al. Cytochrome P450 2A13 mediates aflatoxin B1-induced cytotoxicity and apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Toxicol.* 2012;300(3):138-48. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.06.010>
PMID: [22743290](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22743290/)
31. Awad W, Ghareeb K, Bohm J, Razzazi E, Hellweg P, Zentek J. The impact of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) on poultry. *Int J Poult Sci.* 2008;7(9):827-42. <https://doi.org/10.3923/ijps.2008.827.842>
32. Wu L, Liao P, He L, Ren W, Yin J, Duan J, et al. Growth performance, serum biochemical profile, jejunal morphology, and the expression of nutrients transporter genes in deoxynivalenol (DON)-challenged growing pigs. *BMC Vet Res.* 2015;11(1):144. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0449-y>
PMID: [26138080](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26138080/) PMCID: [PMC4490653](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4490653/)
33. Bammler TK, Slone DH, Eaton DL. Effects of dietary oltipraz and ethoxyquin on aflatoxin B1 biotransformation in non-human primates. *Toxicol Sci.* 2000;54(1):30-41. <https://doi.org/10.1093/toxsci/54.1.30>
PMID: [10746929](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10746929/)