

## تاثیر افزودن ترکیب پودر آویشن و رزماری به جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین ب ۱ بر آسیب های بافت کبد ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

بیبا وطن دوست<sup>۱</sup>، کوروش سروی مغانلو<sup>۲</sup>، مزدک رازی<sup>۳</sup>، احمد ایمانی<sup>۴</sup>

۱- کارشناس ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه.

۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه [k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir](mailto:k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir)

۳- دانشیار گروه بافت شناسی مقایسه ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه.

۴- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه.

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۱۰

### چکیده

زمینه و هدف: آلودگی جیره غذایی با آفلاتوکسین، باعث آسیب های بافت کبد و تضعیف سیستم ایمنی در آبزیان می گردد. متابولیت های فعال برخی از گیاهان دارویی در بازدارندگی رشد قارچ و ممانعت از سنتز آفلاتوکسین موثر است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی آسیب های بافت کبد ناشی از سم آفلاتوکسین ب ۱ و پتانسیل حفاظتی پودر آویشن و رزماری در ماهی قزل آلائی رنگین کمان انجام پذیرفت.

روش کار: تعداد ۲۲۵ قطعه ماهی با وزن متوسط  $90 \pm 5$  گرم در قالب ۳ تیمار شامل گروه شاهد (جیره غذایی فاقد سم آفلاتوکسین ب ۱)، تیمار دوم (جیره غذایی حاوی ۵۰ ppb سم آفلاتوکسین ب ۱) و تیمار سوم (جیره غذایی دارای ۵۰ ppb سم آفلاتوکسین ب ۱ و ترکیب ۲ درصد پودر گیاه آویشن و ۲ درصد پودر گیاه رزماری) به مدت ۶ هفته تغذیه شدند. سپس آسیب های بافت کبد با استفاده از روش های H&E و رنگ آمیزی Masson-Trichrom، هم چنین سنجش فعالیت آنزیم های التهابی کبدی مورد بررسی قرار گرفت. یافته ها: بر اساس نتایج H&E عارضه هایی مانند نفوذ سلول های ایمنی، پرخونی عروق، ادم و تکرور سلول های کبدی در تیمار دوم و با شدت بیشتری در تیمار سوم مشاهده شد. در رنگ آمیزی Masson-Trichrom شدیدترین میزان فیبروز در تیمار سوم مشاهده شد ( $p < 0/05$ ). فعالیت آنزیم های التهابی کبد نیز در تیمار سوم افزایش معنی داری نسبت به گروه های دیگر داشت ( $p < 0/05$ ). نتیجه گیری: به طور کلی سم آفلاتوکسین موجب آسیب های بافتی در کبد گردیده و افزودن پودر گیاهان آویشن و رزماری باعث تشدید این آسیب ها می گردد.

**واژه های کلیدی:** آسیب های بافت کبد، آفلاتوکسین ب ۱، ماسون تری کروم، آنزیم های التهابی کبد، قزل آلائی رنگین کمان.

### مقدمه

قارچ های فوزاریوم، پنی سیلیوم، کلاویسیس، آلترناریا و آسپرژیلوس فراوان ترین قارچ هایی هستند که این سموم را تولید می کنند (۱۳). یکی از مهم ترین و خطرناک ترین میکوتوکسین ها، آفلاتوکسین می باشد که در بسیاری از غلات و عمدتاً در پی آلودگی آنها با *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* به وجود می آید (۱۷). سالانه حدود ۲۰ درصد از محصولات غذایی تولید شده در جهان توسط سموم قارچی آلوده می شوند

مایکوتوکسین ها، متابولیت های ثانویه حاصل از رشد قارچ های رشته ای بر روی مواد غذایی هستند. برخی از مایکوتوکسین ها برای انسان و حیوانات به شدت سمی هستند و باعث ایجاد بیماری های گوناگونی می شوند (۲۰). آن دسته از مایکوتوکسین ها که به میزان قابل توجهی موجب ایجاد آلودگی در محصولات زراعی و خوراکی می گردند شامل آفلاتوکسین ها، زیرالنون، تریکوتسن ها، اکراتوکسین و فومونیسین هستند (۱۶).

که در این میان آلودگی ناشی از آفلاتوکسین ها سهم بیشتری نسبت به آلودگی با سایر سموم دارد (۲۲). افزایش مصرف مواد اولیه با منشأ گیاهی در فرمولاسیون جیره غذایی آبزیان، منجر به افزایش ظرفیت ایجاد آفلاتوکسیکوزیس در سیستم های پرورشی گردیده است. برای مثال آلودگی به آفلاتوکسین در بسیاری از مواد اولیه غذایی مورد استفاده در جیره های غذایی آبزیان از جمله پنبه دانه، ذرت، سویا و پودر ماهی گزارش شده است (۳۰). تغذیه مداوم آفلاتوکسین ها در سطوح پایین ممکن است صدمات فیزیولوژیکی قابل مشاهده ای ایجاد نکند اما باعث پایین آمدن عملکرد حیوان و زیان اقتصادی قابل توجهی می گردد. آفلاتوکسین ب ۱ تأثیرات قابل توجهی بر آبزیان می گذارد. در میان اندام های مختلف، کبد که بزرگ ترین اندام ضمیمه دستگاه گوارش بوده و نقش محوری در تغذیه، متابولیسم و حذف سموم به عهده دارد، در معرض آسیب های جدی ناشی از آفلاتوکسین ها مثل کم خونی، هموراژی، نکروز بافتی و سرطان کبد قرار دارد (۲۸، ۱۵). این ترکیب در سلول های کبدی پستانداران و ماهیان منجر به ایجاد برخی تغییرات زیستی گردیده که زمینه ساز شروع سرطان زایی است (۱۸). برای مثال تغذیه ماهی قزل آلائی رنگین کمان با جیره غذایی حاوی ۰/۴ppb آفلاتوکسین، منجر به ایجاد ۱۴٪ تومور شده است، ولی تغذیه قزل آلائی رنگین کمان با ۲۰ppb آفلاتوکسین باعث ایجاد ۵۸٪ تومور کبدی در ماهیان گردید و با ادامه تغذیه ماهیان با همان جیره غذایی این میزان به ۸۳٪ رسید (۱۲). علاوه بر این، آفلاتوکسین موجب تغییرات محسوسی مانند رنگ باختگی کبد، کبد چرب، هیپرپلازی، تغییرات مجاری صفراوی در ماهی قزل آلائی رنگین کمان (۲۱)، هم چنین پر خونی، دژنراسیون و نکروز هپاتوسیت ها در کبد ماهی اوزون برون شده است (۵). از طرفی دیگر جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین ب ۱ باعث

ایجاد تغییرات معنی داری در میزان آنزیم های کبدی شامل آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و آسپارات آمینو ترانسفراز (AST) نسبت به گروه شاهد در بچه ماهی ازون برون پرورشی شده است، که نشان دهنده آسیب های بافتی به ویژه در کبد می باشد (۲). در سال های اخیر موفقیت های زیادی در استفاده از گیاهان دارویی در صنعت آبی پروری شده است. گیاهان دارویی دارای خاصیت التیام دهنده زخم های سطحی و آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی هستند و می توان از آن ها جهت کاهش اثرات این سموم و جلوگیری از سرطان زایی در حیوانات پرورشی استفاده کرد (۳). در ارتباط با خاصیت ضد قارچی تعدادی اسانس گیاهی و اثر آن ها بر تولید آفلاتوکسین ب ۱ در خوراک ها، دریافتند که کارواکرول می تواند مانع مهمی برای رشد قارچ های *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* در نتیجه تولید آفلاتوکسین باشند (۱۴). هم چنین، افزودن یک درصد اسانس دارچین به جیره غذایی ماهی قزل آلائی رنگین کمان، سبب کاهش تغییرات نامطلوب بافتی و نیز بهبود شاخص های خونی و بیوشیمیایی سرم ماهیان تغذیه شده با جیره های غذایی آلوده با ۲۵ ppb آفلاتوکسین گردید (۳). عصاره روغنی رزماری و آویشن به علت دارا بودن ترکیبات فنولی نظیر تیمول (Thymol) و کارواکرول (Carvacrol) در آویشن و ترکیباتی مانند سینئول (Cineole) و کامفور (Camphor) در رزماری دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی و ضد التهابی هستند که اثرات آن ها در انسان و حیوانات به اثبات رسیده است (۲۵). تأثیر تیمول و کارواکرول موجود در آویشن دنیایی در التیام زخم های عفونی باکتری سودوموناس اثر وینوزا در موش سوری آزمایشگاهی و بازدارندگی رشد این باکتری گزارش شده است (۷). در برخی از گزارشات افزودن ۰/۵ درصد عصاره آویشن در جیره

همراه مقداری ژل نم گیر با ثبت تاریخ و تیمار در فریزر نگهداری شدند. برای غذادهی ماهیان هر گروه آزمایشی، یک کیسه معین از جیره غذایی آن گروه از فریزر بیرون آورده شده و بعد از توزین غذای هر مخزن به صورت جداگانه در هر ظرف، مابقی غذا به یخچال منتقل شد.

#### تهیه ماهی و شرایط انجام آزمایش

تعداد ۲۲۵ قطعه بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان با میانگین وزنی ۹۰ گرم از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان تهیه و به سالن تکثیر و پرورش آبزیان منتقل شد. بچه ماهیان با محلول نمک ۳ درصد ضد عفونی و به طور تصادفی ۲۵ قطعه در هر مخزن (۹ مخزن ۳۰۰ لیتری) توزین شدند. سپس ماهیان در قالب ۳ تیمار و با ۳ تکرار (جدول ۱) به مدت ۶ هفته با جیره های غذایی آزمایشی تغذیه و غذادهی به میزان ۳ درصد وزن بدن و در سه نوبت انجام گرفت (۲۶).

#### سنجش فعالیت آنزیم های انتهایی کبد

در انتهای آزمایش، به صورت تصادفی از هر تیمار ۳ عدد ماهی صید و بعد از بیهوشی با عصاره ی گل میخک، خون گیری از بخش ساقه ی دمی با سرنگ هپارینه انجام شد (۳). جهت سنجش فعالیت آنزیم های کبدی آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) و آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) سرم خون با دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه توسط سانتریفیوژ جداسازی و تا زمان اندازه گیری در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. فعالیت آنزیم های مذکور با استفاده از کیت های آنزیمی Roche و دستگاه COBAS (INTEGRA 400 plus) اندازه گیری گردید (۸).

#### بررسی های بافت شناسی

غذایی، منجر به بهبود هضم و ترشح نمک های صفراوی، افزایش وزن و بهبود ضریب تبدیل خوراک، کاهش چربی خون، مهار اکسیداسیون LDL و بهبود فراسنجه های خونی و کاهش لیپیدهای سرم شده است (۲۷). با این حال اطلاعات کمی در مورد تأثیر پودر گیاهی بر کاهش آسیب های پاتولوژیک ناشی از سموم مایکوتوکسینی وجود دارد، بنابراین تحقیق حاضر به دنبال بررسی اثر آفلاتوکسین ب ۱ بر بافت کبد و همچنین اثر افزودن ترکیب پودر آویشن و رزماری به عنوان گیاهان دارویی متداول با نقش آنتی اکسیدانی و ضد التهابی در کاهش ضایعات بافتی است.

#### مواد و روش ها

##### آماده سازی جیره غذایی

در این پژوهش جیره غذایی تجاری GFT<sub>۲</sub> ساخت شرکت فرادانه بر اساس نیازهای غذایی ماهی قزل آلا (۴۵ درصد پروتئین خام، ۲۰ درصد چربی خام و کربوهیدرات ۱۵ درصد، مکمل های ویتامینی و معدنی هر کدام در حد ۲ درصد) استفاده شد. به این شکل که پس از آسیاب نمودن دان های غذایی ۵۰ ppb آفلاتوکسین (۲۳، ۳) و گیاهان آویشن و رزماری پس از خشک کردن و آسیاب کردن با توجه به تیمارهای غذایی (جدول ۱) به جیره غذایی افزوده شد. در مرحله بعد با افزودن ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر به هر کیلوگرم غذا، خمیر به دست آمده به کمک چرخ گوشت صنعتی به صورت رشته های نازک (قطر تقریبی ۲ mm) درآمد. رشته ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق خشک گردید. سپس در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد در آون به مدت یک شب نگهداری شدند، تا به طور کامل خشک گردند. رشته های خشک شده به قطعات کوچک تری شکسته شدند و برای زدودن خاکه از الک به اندازه چشمه کوچک تر (۱ mm) استفاده گردید. در نهایت دان های تهیه شده در کیسه های فریزر یک کیلوگرمی به

Aniline Phosphotungstic acid به مدت ۱۵ دقیقه، blue به مدت ۱۰ دقیقه و Acetic acid ۱٪ به مدت ۳ دقیقه بر اساس پروتکل شرکت سازنده کیت (شیمی پژوهش آریا) استفاده و ضایعات بافتی توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت (۲۹).

#### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون HSD 'Tukey' انجام شد. البته تمام مفروضات آنالیز واریانس پیش از انجام تحلیل‌های آماری، مورد بررسی قرار گرفت. سطح معنی داری تمامی آزمون‌ها کم‌تر از ۵ درصد بود و نتایج نهایی به صورت Mean±SE گزارش گردید. برای ترسیم نمودارها نیز از نرم افزار اکسل نسخه ۲۰۱۳ استفاده شد.

#### نتایج

##### فعالیت آنزیم‌های التهابی سرم

نتایج مربوط به آنزیم‌های AST، ALT و ALP در جدول ۲ گزارش گردیده است. کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم AST در تیمار دوم و بیشترین میزان فعالیت در تیمار سوم مشاهده و تفاوت معنی داری در بین این دو تیمار وجود داشت ( $p < 0.05$ ). هم‌چنین اگر چه در دو آنزیم ALT و ALP تفاوت معنی داری بین تیمارهای مختلف وجود نداشت ( $p > 0.05$ )، ولی کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم ALT در تیمار دوم و بیشترین میزان فعالیت این آنزیم‌ها در تیمار سوم مشاهده شد. هم‌چنین فعالیت آنزیم ALP در تیمار سوم نسبت به تیمارهای دیگر بیشتر بود.

در پایان دوره پرورش از هر تیمار ۳ ماهی به صورت تصادفی انتخاب و به کمک گل میخک بیهوش شدند (۳). بدین منظور پس از کالبدگشایی، بافت کبد جداسازی و در محلول تثبیت کننده فرمالین ۴٪ تثبیت و برای تهیه اسلایدهای بافتی، نمونه‌ها پس از مراحل معمول بافت شناسی که عبارتند از آنگیری، شفاف سازی، پارافینه شدن، قالب گیری، برش های بافتی ۵ میکرونی با دستگاه میکروتوم آماده و بر روی لام، قرار گرفت (۱۱).

##### رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین

به منظور بررسی عارضه‌های عمومی بافت پس از انجام پاساژ و برش زنی و تهیه مقاطع ۵ میکرونی، اسلایدها به شیوه H&E رنگ آمیزی شد. بدین منظور ابتدا اسلایدها را در محلول هماتوکسیلین به مدت ۱۵ دقیقه و بعد از شستشو با آب مقطر در انوزین ۰/۱٪ به مدت ۲ تا ۵ دقیقه قرار گرفت. ضایعات بافتی با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت (۱۱).

##### رنگ آمیزی ماسون تری کروم

جهت بررسی میزان فیروز بافت کبد از روش رنگ آمیزی ماسون تری کروم (Masson-Trichrom) استفاده شد. بدین منظور ابتدا اسلایدها را به مدت ۱ ساعت در محلول بوئن و سپس به مدت ۱ ساعت در آن قرار گرفت و در ادامه به ترتیب از ترکیب دو محلول Wiegert'B و Wiegert'A به مدت ۱۰ دقیقه، و بعد از شستشو با آب روان به مدت ۱۰ دقیقه از محلول Biebrich-Scarlet به مدت ۵ دقیقه استفاده شد، سپس از ترکیب دو محلول Phosphomolybdic acid و

جدول ۱- گروه های مختلف مورد آزمایش

گروه غذایی فاقد آفلاتوکسین ب ۱	(شاهد) ۱
جیره غذایی حاوی ۵۰ ppb آفلاتوکسین ب ۱	۲
جیره غذایی حاوی ۵۰ ppb آفلاتوکسین ب ۱ و ۲ درصد پودر آوبشن و ۲ درصد پودر رزماری	۳

جدول ۲- فعالیت آنزیم های انتهایی کبد ماهی قزل آلاهی رنگین کمان در تیمارهای مختلف آزمایشی (Mean±SD)

تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱	آنزیم
۱۰۷/۸±۴۶/۷ <sup>b</sup>	۲۹/۳۰±۱/۹۳ <sup>a</sup>	۴۸/۷±۲۱/۷ <sup>ab</sup>	AST (U/I)
۲۸۸/۷±۱۲۲/۲ <sup>a</sup>	۱۸۲±۶۱/۱ <sup>a</sup>	۱۸۳±۴۱/۶ <sup>a</sup>	ALP (U/I)
۴/۵۳±۰/۹۱ <sup>a</sup>	۱/۶۷±۱/۳۶ <sup>a</sup>	۳/۳۷±۱/۳۲ <sup>a</sup>	ALT (U/I)

حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار آماری است (p < ۰/۰۵)

### رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین

نتایج حاصل از بررسی مقاطع بافتی کبد ماهی قزل-آلای رنگین کمان به روش رنگ آمیزی H&E در شکل ۱ گزارش شده است. در گروه شاهد عارضه‌ی خاصی مشاهده نشد، در تیمار دوم عارضه‌های مانند نفوذ سلول‌های ایمنی، پرخونی عروق، ادم و نکروز سلول‌های کبدی وجود داشت. در حالی که شدیدترین میزان این آسیب‌ها نسبت به گروه‌های دیگر در تیمار سوم مشاهده شد.

### رنگ آمیزی ماسون تری کروم

نتایج مربوط به میزان فیروز بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به روش رنگ آمیزی ماسون-تری کروم (Masson-Trichrom) در شکل ۲ و جدول ۳ گزارش شده است. محل‌های آبی رنگ مشخص شده با

پیکان در شکل ۲، فیروز در بافت و دیواره‌ی عروق بافت کبد ماهی قزل آلاهی رنگین کمان را نشان می‌دهد. علاوه بر این، میزان کمی شاخص های فیروز بر اساس اطلاعات رنگ سنجی در جدول ۳ گزارش شده است. بر این اساس فیروز خاصی در تیمار شاهد فیروز مشاهده نشد. در حالی که در تیمار دوم فیروز خفیف وجود داشت و شدیدترین میزان فیروز نیز در تیمار سوم مشاهده شد. کمترین میزان کلاژن در بافت کبد ماهی قزل آلاهی رنگین کمان در گروه شاهد و بیشترین میزان در تیمار سوم وجود داشت. هم‌چنین بیشترین میزان فیروز در عروق کبدی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان در تیمار سوم مشاهده شد و دارای اختلاف معنی داری نسبت به گروه‌های دیگر بود (p < ۰/۰۵).

جدول ۳- میزان شاخص های فیروز بافت کبد ماهی قزل آلاهی رنگین کمان در تیمارهای مختلف آزمایشی (Mean±SD)

تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱	میزان فیروز
۳/۴±۰/۵۴۷ <sup>b</sup>	۲/۲±۰/۸۳۶ <sup>b</sup>	۰ <sup>a</sup>	میزان کلاژن بافت
۳۱/۶۸±۱۷/۱۶۴ <sup>b</sup>	۲۷/۲۴±۱۴/۴۴۶ <sup>b</sup>	۱۵±۹/۱۱۰ <sup>a</sup>	فیروز عروق
۵۶/۵±۲/۸۸۶ <sup>c</sup>	۱۳/۲۵±۳/۴۰۳ <sup>b</sup>	۴/۲۵±۱/۷۰۷ <sup>a</sup>	

حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار آماری است (p < ۰/۰۵)

### بحث و نتیجه گیری

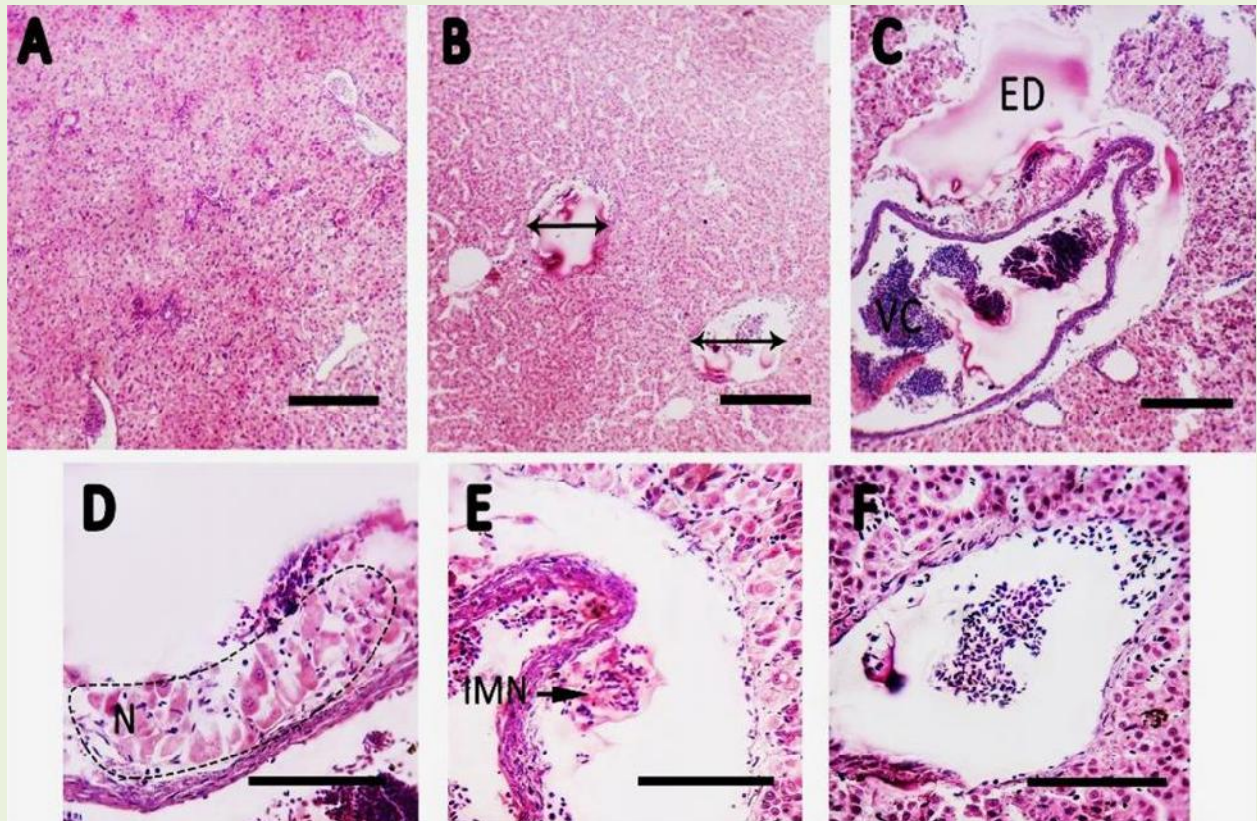
نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که به علت وجود سم آفلاتوکسین در جیره‌ی غذایی، عارضه‌های مانند نفوذ سلول‌های ایمنی، پرخونی عروق، ادم و نکروز در سلول‌های کبدی وجود دارد. نتایج مشابهی نیز در تحقیقات دیگر گزارش شده است. برای مثال آلودگی جیره غذایی با ۵۰ ppb سم آفلاتوکسین موجب انباشتگی چربی در سلول‌های کبدی فیل ماهی (*Huso huso*)، دژنراسیون سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها، حضور رنگدانه‌های

ملانین در هسته‌ی هپاتوسیت‌ها و شروع مراحل نکروز در برخی از سلول‌ها شد. هم‌چنین، با طولانی شدن مدت زمان مواجهه با این سم از ۳۰ روز به ۹۰ روز، علاوه بر عوارض فوق پرخونی نسبی عروق کبدی و تخریب دیواره عروق کبدی توام با هجوم سلول‌های آماسی به دیواره عروق و نکروز کبد و افزایش مراکز ملانوماکروفاژ مشاهده شد. هم‌چنین این سم در ماهی ازون برون سبب دژنراسیون چربی هپاتوسیت‌ها، پرخونی سینوزوئیدهای خونی و نکروز کامل بافت کبد شد که



کلاژن و تجمع فیروز، همراستا با نتایج مشاهده شده در مورد جوجه های گوشتی نر تغذیه شده با ۱ ppm آفلاتوکسین و آفلاتوکسین آمونیاکی شده می باشد. آسپاراتات آمینو ترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز دو آنزیم شاخص برای بررسی آسیب های بافتی و عضله به ویژه در بافت کبد می باشد که در آسیب های بافت کبد به داخل خون تراوش یافته و افزایش میزان آن ها در خون نشان دهنده ی آسیب های کبدی است. در مطالعه حاضر، سم آفلاتوکسین باعث افزایش فعالیت آنزیم های AST، ALP و ALT شده است

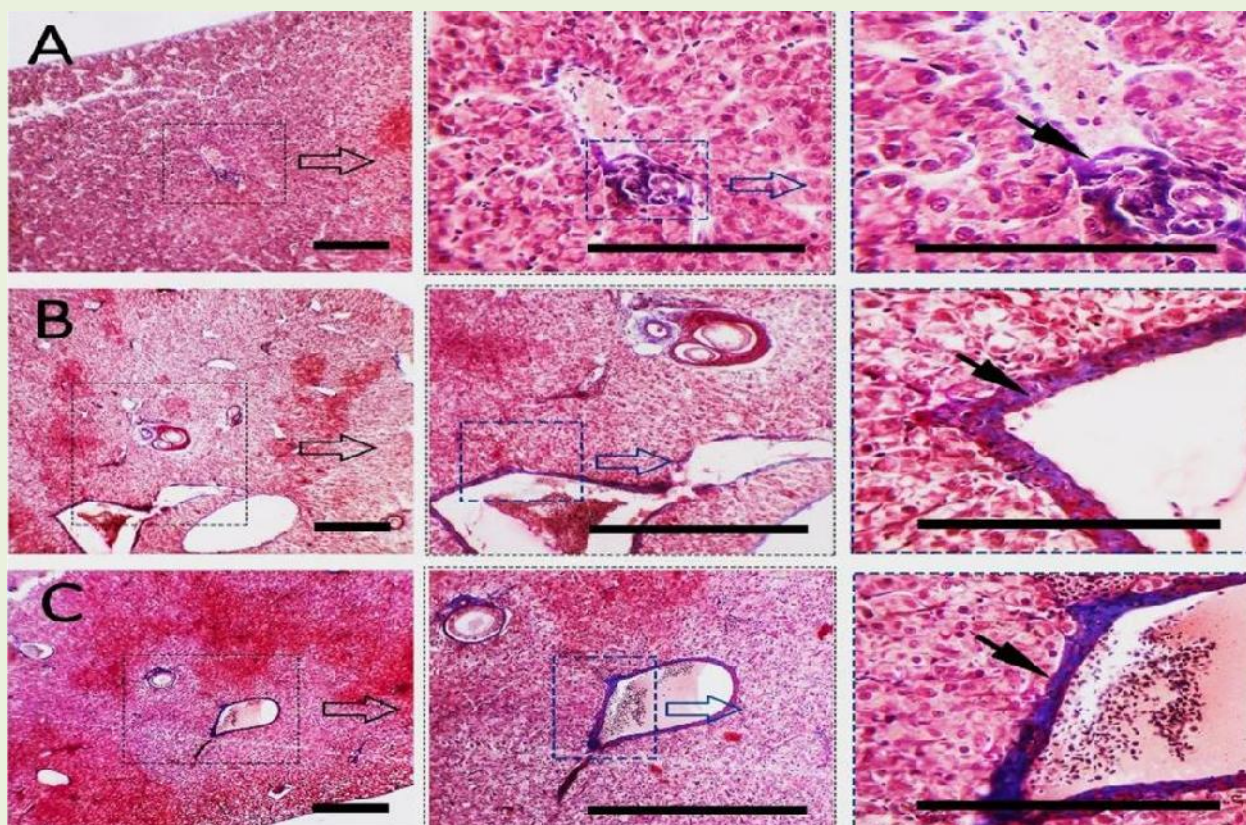
این گزارش های از نظر دوز سم مورد استفاده و عوارض ایجاد شده در بافت کبد مانند پرخونی نسبی عروق، فیروز و نکروز با نتایج این تحقیق مشابهت دارد (۱۰). در مطالعات بافت شناسی و میکروسکوپی تغییر چربی بسیار شدید در سلول های کبدی و فیروز نواحی باب و هیپرپلازی مجاری صفراوی در تیمار مربوط به آفلاتوکسین در جوجه های گوشتی گزارش شد که جهت از بین بردن اثرات سمی آفلاتوکسین ب ۱، آمونیاکی کردن ذرت آلوده به آفلاتوکسین را پیشنهاد کردند (۶). نتایج مطالعه حاضر در مورد افزایش میزان



شکل ۱- آسیب شناسی بافت کبد ماهی قزل آلی رنگین کمان تغذیه شده با جیره های غذایی مختلف.

**A:** جیره ی فاقد آفلاتوکسین ب ۱. **B:** تیمار ۵۰ PPb سم آفلاتوکسین ب ۱. **C:** تیمار ۵۰ PPb سم آفلاتوکسین ب ۱ و ۲ درصد پودر آوبشن و ۲ درصد پودر رزماری است. همچنین **D, E و F:** محل عارضه های **N:** Necrosis (نکروز سلول های کبد)، **VC:** Vascular Congestion (پرخونی عروق)، **IMN:** Infiltration of immune cells (نفوذ سلول های ایمنی)، **ED:** Edema (ادم) را با بزرگنمایی بیشتر از تیمار سوم نشان می دهد. مقیاس ۲۵۰ μm می باشد.





شکل ۲- تصاویر مطالعات بافت شناسی کبد ماهی قزل آلائی رنگین کمان به روش Masson-Trichrom.

A: تیمار جیره‌ی فاقد آفلاتوکسین ب ۱. B: تیمار ۵۰ ppb سم آفلاتوکسین ب ۱. C: تیمار ۵۰ ppb سم آفلاتوکسین ب ۱ و ۲ درصد پودر آویشن و ۲

درصد پودر رزماری است. مقیاس ۲۵۰ μm می‌باشد

های التهابی کبد در کپور ماهی مواجهه شده با سرب و کادمیوم (۹) گزارش شده است. همچنین اسانس دارچین منجر به کاهش تغییرات نامطلوب بافتی در کبد ماهی قزل آلائی رنگین کمان شده است (۳). به نظر می‌رسد که اثرات فارماکولوژیکی و اثرات محافظ کبدی گیاهان دارویی از قبیل آویشن می‌تواند ناشی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها بوده است که به طور عمده ناشی از توانایی آنها در حذف رادیکال‌های آزاد یا ممانعت از پراکسیداسیون لیپیدی باشد (۱۹). با این حال بر اساس نتایج مطالعه حاضر، گیاهان دارویی تاثیر مثبتی بر کاهش آسیب‌های بافتی نداشتند و حتی باعث تشدید این آسیب‌ها بر بافت کبد، افزایش تجمع کلاژن و ایجاد فیروز و نکروز بافت کبد می‌گردد و علت عدم هم‌خوانی نتایج تحقیق حاضر با سایر پژوهش‌ها را می‌توان به

به طور کلی می‌توان گفت در تیمارهای آزمایشی، سم آفلاتوکسین باعث آسیب به بافت کبد شده و در نتیجه‌ی آسیب این بافت، میزان فعالیت این آنزیم‌ها در سطح سرم افزایش یافته است. با ادامه‌ی مواجهه‌ی حیوان با آفلاتوکسین، هایپرپلازی مجاری صفراوی داخل کبدی اتفاق می‌افتد که در این صورت حیوان سعی بر تولید یا ایجاد مجدد پارانشیم کبدی در موقعی که سلول‌های پارانشیمی ظرفیت خود را از دست می‌دهند، دارد. در چنین حالتی افزایش معنی‌دار آلانین آمینو ترانسفراز، گاما گلو تامیل ترانسفراز و بیلی روبین اتفاق می‌افتد (۳۱). نقش پیشگیری کنندگی گیاهان دارویی در کاهش رسوب کلاژن و ایجاد فیروز کبدی (۱) و کاهش آسیب‌های بافتی کبد موش صحرائی مسموم شده با تتراکلرید کربن (۴) و تاثیر مثبت گیاهان دارویی بر آنزیم

کمان باعث ایجاد ضایعات کبدی مانند نفوذ سلول‌های ایمنی، پرخونی عروق، ادم، فیروز و و تجمع کلاژن و نکرور سلول‌های کبدی شد. همچنین اگرچه تعداد فزاینده ای از مطالعات نشان می‌دهد که گیاهان دارویی باعث کاهش آسیب‌های بافتی می‌شود، ولی در تحقیق حاضر نه تنها پودر آویشن و رزماری تاثیر موثری در التیام آسیب‌ها بر بافت کبد نداشته است بلکه باعث تشدید این آسیب‌ها گردید.

روش مصرف گیاهان دارویی به صورت پودر و یا ترکیبات آن و یا نقش آنتی اکسیدانی گیاهان نسبت داد. علاوه بر این بالا بودن دوز مصرفی ممکن است باعث شود که سیستم‌های دفاع آنتی اکسیدان، کارآیی لازم را نداشته باشند، مقادیر زیادی ROS در بدن تجمع می‌یابد و استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد (۲۴). با این حال به علت نبود اطلاعات کافی در این زمینه انجام مطالعات بیشتری احساس می‌شود. در نتیجه می‌توان چنین بیان نمود که سم آفلاتوکسین در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین-

پژوهش های محیط زیست و کشاورزی ایران. همدان. ۹-۱ ص.

۶- صفامهر، ع.، علامه، ع. الف.، شیوازاد، م.، مرادی، م.، میر هادی، س. الف. ۱۳۸۴. مطالعه ضایعات آسیب شناسی کبد و عملکرد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده از ذرت آلوده به آفلاتوکسین آمونیاکی شده. مجله علوم کشاورزی ایران. دوره سی و شش. شماره ۵. ص ۱۳۰۳-۱۲۹۵.

۷- قشقای، ف.، جعفری، ع. ا.، معظمیان، الف. ۱۳۹۵. بررسی اثر اسانس گیاهان اسفند، آویشن دنبای و چویل بر عفونت سوختگی ناشی از سودوموناس اثرورژینوزا مولد اگزوتوکسین A در موش سوری آزمایشگاهی. سال ۱۰، شماره ۱. ص ۸۲-۸۷.

۸- محمد تقوایی، ن.، جلالی، م.، قاسمی فلاورجانی، م.، بی بی شهبازیان، م.، ساکی، آ. ۱۳۹۴. ارزیابی صحت، دقت و توافق چهار کیت آزمایشگاهی اندازه گیری گلوکز با روش مرجع. مجله علوم آزمایشگاهی. دوره نهم. شماره ۲. ص ۳۹-۴۶.

۹- محیسنی، م.، آقابابایی امیر، ز.، بنایی، م.، نعمت دوست حقی، ب.، شوکت، پ. ۱۳۹۳. تاثیر عصاره گیاه خنمی بر بهبود توان فیزیولوژیکی ماهی کپور معمولی در مواجهه با سرب و کادمیوم. مجله بهره‌برداری و پرورش آبزیان. دوره سوم. شماره ۳. ص ۶۶-۵۳.

۱۰- مطلبی مغانجوخی، ع.ع. ۱۳۹۵. مطالعه و ارزیابی اثرات اقتصاد و بهداشتی ناشی از آفلاتوکسین‌ها در برخی از آبزیان

۱- تایانلوی، الف.، زارع، ص.، کریم زاده باردی، ل.، حسینی، س. ۱۳۹۶. بررسی تاثیرات عصاره هیدور الکلی گیاه گزنه بر روی فاکتورهای التهابی کبدی رت‌های ویستار مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک القا شده با استرادیول والرات. یافته‌های نوین در علوم زیستی. سال چهارم. شماره ۲. ص ۱۸۱-۱۸۸.

۲- جلیل پور، ج.، وهاب زاده، رودسری، ح.، سپهداری، الف.، پزند، ذ. ا. ۱۳۹۲. اثر سمیت غذای آلوده به آفلاتوکسین B<sub>1</sub> بر رشد، بازماندگی و برخی آنزیم‌های کبدی بچه ماهی ازون برون پرورشی. نشریه ی توسعه‌ی آبرزی پروری، سال هفتم. شماره ۴. ص ۱۱-۱.

۳- خانی، س.، سروی مغانلو، ک.، ایمانی، الف.، آق، ن.، رازی، م. ۱۳۹۵. اثر حفاظتی افزودن اسانس دارچین (*Cinnamomum verum*) به جیره غذایی در کاهش سمیت آفلاتوکسین B<sub>1</sub> در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان (*Oncorhynchus mykiss*). نشریه شیلات (مجله منابع طبیعی). دوره شصت و نه. شماره ۴. ص ۴۹۵-۴۸۱.

۴- رفیعی، ف. ۱۳۹۲. اثر حفاظتی عصاره متانولی میوه زرشک زرافشانی در برابر آسیب کبدی القا شده توسط تتراکلرید کربن در موش‌های صحرایی. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا. جلد سوم. شماره ۳. ص ۱۷۹-۱۸۷.

۵- صادقی لیمنجوب، ه. ۱۳۹۴. اثرات بیولوژیک آفلاتوکسین B<sub>1</sub> در پرورش و تغذیه ماهی اوزون برون. سومین همایش ملی



trout(*Oncorhynchus mykiss*) is extremely sensitive to the feed-borne Fusarium mycotoxin deoxynivalenol (DON). *Aquaculture*, 311; 224–232.

**22.** ICMSF (International commission on Microbiological Specification for Food). (1996). *Toxicogenic fungi: Aspergillus in ICMSF, Microorganisms in foods. 5. Characteristics of Food Pathogens*, London, Blackie Academic and Professional, 347-81.

**23.** Imani, A., Bani, M. S., Noori, F., Farzaneh, M., Moghanlou, K. S. (2017). The effect of bentonite and yeast cell wall along with cinnamon oil on aflatoxicosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Digestive enzymes, growth indices, nutritional performance and proximate body composition. *Aquaculture*, 476; 160-167.

**24.** Juránek, I., Bezek, S. (2005). Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species-cause or consequence of tissue injury? *Gen. Physiol. Biophys.*, 24; 263-78.

**25.** Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C. (1995). Antibacterial activities of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.*, 43(11); 2839- 2845.

**26.** Lovell, R. T. (2003). Diet and Fish Husbandry, In: John E. Halver and Ronald W. Hardy (Eds), *Fish Nutrition (3rd Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 703-754.

**27.** Mirzaei-Aghsaghali, A., Syadati, S.A., Fathi, H. (2012). Some of thyme (*Thymus vulgaris*) properties in ruminant's nutrition. *Ann. Biol. Res.*, 3(2); 1191-1195.

**28.** Murjani, P. (2003). Role of free radicals in liver disease, *J. Hepatol*, 3(4); 526-536.

**29.** Rezazadeh-Reyhani, Z., Razi, M., Malekinejad, H., Sadrkhanlou, R. (2015). Cytotoxic effect of nanosilver particles on testicular tissue; evidence for biochemical stress and hsp70-2 protein expression. *environ. Toxicol. Pharmacol.*, 40(2); 626-638.

**30.** Spring, P., Fegan, D.F. (2005). Mycotoxins a rising threat to aquaculture. *Feedmix 13:5 Nutritional biotechnology in the feed and food industries. Proceedings of Alltech's 21st Annual Symposium*, Lexington, Kentucky, USA, pp: 323-331.

**31.** Zaky, Z. M., Ismail, M. A., Refaie, R. S. (1995). *Aspergillus flavus* and aflatoxins residues in luncheon meat. *Assiut Vet. Med. J.*, 33(66); 114-118.

پرورسی ایران. موسسه‌ی تحقیقات علوم شیلاتی کشور. ۲۹۰ صفحه.

**11.** Al-Bairuty, G.A., Shaw, B.J., Handy, T.B. (2013). Histopathological effect of waterborne copper nanoparticulates and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, 126; 104-115.

**12.** Abdel Hakeem, I.E., Dominique, P.B., Jamie, M.H., Pedro, E. (2011). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is extremely sensitive to the feed-borne Fusarium mycotoxin deoxynivalenol (DON). *Aquaculture*, 311(1-4); 224–232.

**13.** Adams, M.R., Moss, M.O. (1998). Fermented weaning foods. In *Microbiology of fermented food*, 790-811.

**14.** Ashok, K., Ravindra, S., Priyanka, S., Anuradha, N., Dubay, K. (2010). Efficacy of extract and essential oil of *Lantana indica* Roxb against food contaminating moulds and aflatoxin B1 production. *Int j. of Food Sci. and Technol.*, 45(1); 179-185.

**15.** Bellentani, s., Tiribell, C. (2001). The spectrum of liver disease in the general population: lesson from the Dionysos study. *J. Hepatol.*, 35; 531-537.

**16.** Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J., Richard, J. (2007). World wide occurrence of mycotoxins in commodities feeds and feed ingredients. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 137; 265-282.

**17.** Bintvihok, A., Thiengnin, S., Doi, K., Kumagai, S. (2002). Residues of aflatoxins in the liver, muscle and eggs of domestic fowls. *J. Vet. Med. Sci.*, 64(11); 1037 – 1039.

**18.** Dragan, Y.P., Pitot, H.C. (1993). Aflatoxin carcinogenesis in the context of the multistage nature of cancer. In: Eaton DL, Groopman JD (eds) *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. Academic Press, London, 179–198.

**19.** Farag, R.S., Bad i, Z.M.A., Hewedi, F.M., El- Baroty, G.S.A. (1989). Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 66; 792-799.

**20.** Garcia, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marin, S. (2009). Predicting mycotoxins in foods. A review. *Food Microbiol.*, 26(8); 757-769.

**21.** Hoofft, J.M., Abdel Hakeem, I.E., Encarnaçao, P., Bureau, D. (2011). Rainbow

# The Effect of Thyme and Rosemary Powder Supplementation in Aflatoxin B1 Contaminated Diet on Liver Histopathology of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

B. Vatandost<sup>1</sup>, **K. Sarvi Moghanlou**<sup>2</sup>, M. Razi<sup>3</sup>, A. Imani<sup>4</sup>

1.MSc student of Fisheries Science, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, I.R. of Iran.

2.Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, I.R. of Iran.

**k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir**

3.Associate Professor, Department of Comparative Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, I.R. of Iran

4.Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, I.R. of Iran.

Received:2019.16.3

Accepted: 2019.31.5

## Abstract

**Introduction & Objective:** Dietary aflatoxin contamination cause liver tissue damage and immunosuppression in aquatic animals. Active metabolites of some medicinal herbs have promising effects on controlling fungi growth and aflatoxin contamination of feedstuffs. This study was to investigate liver pathogenesis of aflatoxin B1 and protective potency of rosemary and thyme powder in rainbow trout.

**Material and Methods:** Therefor, 225 fish with an average weight of  $90\pm 3$  g were allocated amongst three treatments including control group (diet devoid of aflatoxin B1), treatment two (diet included with 50 ppb aflatoxin B1) and treatment three ( 50 ppb aflatoxin B1 contaminated diet containing 2% rosemary and 2% thyme powder). After 6 weeks of feeding on the diets, hepatic tissue pathologies were studied using H&E and Masson-Trichrom staining methods. Serum inflammatory enzymes activity were also assayed.

**Results:** H&E staining results were indicative of immune cell infiltration, congestion, edema and necrosis of hepatic tissue in groups two and three, with severe tissue alterations in third experimental group. Mason-Trichrom showed advanced tissue fibrosis in treatment three ( $p<0.05$ ). Inflammatory enzymes activity also showed higher activity in fish fed on third experimental diet ( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** Aflatoxin B1 resulted in hepatic tissue pathologies and rosemary and thyme powder inclusion to such a diet exacerbated the pathological alterations.

**Keywords:** Hepatic Tissue Pathology, Aflatoxin B1, Masson-Trichrom, Hepatic Inflammatory Enzymes, Rainbow Trout.