سموم الأفلا في عليقة الدجاج وتأثيرها في موت الخلية المبرمج

سحر حمدي عبد المجيد عماد جواد خماس
كلية الطب البيطري – جامعة بغداد
تأريخ القبول 7/1/2010

الخلاصة

أُخذت مائة عينة من مواد العلف والعلائق المركزة المستخدمة في حقول دواجن محافظة بغداد والمناطق المحيطة بها، لقياس كمية تلوث هذه المواد بسموم الأفلا بوساطة تقنية الأليزا. أظهرت النتائج وجود نسب عالية من سموم الأفلا حيث بينت تفوق معدل سموم الأفلا في العليقة المركزة على بقية المواد العلفية الأخرى وبشكل معنوي $P<0.05$، ويليها تفوق مادة الصويا في معدل التلوث وبشكل معنوي $P<0.05$، تلتها الذرة ثم الحنطة وأخيراً البروتين بأقل معدل . مزجت العينات المائة معاً ومن ثم تم قياس كمية السموم فيها بوساطة تقنية الأليزا أيضاً، ثم أعطيت الى أفراخ التجربة منذ اليوم الأول حيث استخدم (120) فرخاً قسمت الى أربع مجموعات أعطيت المجموعة الأولى (G1) علفاً ملوثاً وبدون تلقيح، وأعطيت المجموعة الثانية (G2) علفاً ملوثاً ولُقحت بلقاح مرض نيوكاسل ولقاح مرض جراب فابريشيا المعدي (كمبورو) أما المجموعة الثالثة (G3) فقد أعطيت علف خالٍ من التلوث ولقحت بلقاح مرض نيوكاسل، ولقاح مرض كمبورو وأعطيت المجموعة الرابعة (G4) السيطرة علفاً خالياً من التلوث وبدون تلقيح وأخذت عينات دم ونسيج كبد وكلية بعد أربعة أيام من إعطاء العلف الملوث وكررت هذه العملية كل أربعة أيام، وحتى إنتهاء مدة التجربة بأسابيعها الخمسة، وقد أجريت القياسات الفسلجية والإختبارات المناعية والمتمثلة بأجراء فحص البروتين الكلي وإختبار إثباط تلازن الدم وإختبار الأنزيم المناعي الممتز ELISA لمعرفة معيار الأضداد ضد مرض نيوكاسل.

أظهرت النتائج تثبيط وقلة في تركيز البروتين الكلي مع هبوط المناعة وقلة معيار أضداد مرض نيوكاسل في المجاميع المتغذية بعلف ملوث بسموم الأفلا مع فشل التلقيح للمجموعة الثانية المتغذية على العلف الملوث والملقحة بلقاح مرض نيوكاسل ولقاح مرض جراب فابريشيا المعدي. وأجريت دراسة تأثير سموم الأفلا على نسيج وخلايا الكبد والكلية وقد تبين وجود التفجي والتغيرات الدهنية مع نزف في الكبد والكلية مع تجمع الخلايا اللمفية وتثخن الاوعية الدموية في محفظة بومان. وقد بينت النتائج وجود زيادة في عدد الخلايا التي ظهر فيها الموت المبرمج في المجاميع التي تناولت العلف الملوث حيث تفوقت المجموعتين الأولى والثانية وبشكل معنوي على المجموعتين الثالثة والسيطرة. أُستنتِج وجود مستويات عالية من سموم الأفلا في عليقة ومفردات عليقة الدواجن، وأُستنتِج أن لسموم الأفلا تأثيراً سلبياً على الأستجابة المناعية للقاح مرض نيوكاسل وعلى مستوى البروتين الكلي في الدم ولسموم الأفلا تأثيرسلبي في خلايا الكبد والكلية، ويزداد موت الخلية المبرمج في خلايا الكبد والكلية.

Aflatoxin in Chicken's Feed and it's Effects on Apoptosis

Sahar H. A.Majeed and Emad J. Khammas
Coll. Vet. Med. Uni Bagh

Summery

One hundred samples of ration, protein, corn, soybean, and wheat were collected from poultry houses in Baghdad and suburbs to examine Aflatoxin occurrence in chicken's diet. ALISA technique was used for this purpose.The results revealed presence of high level of Aflatoxin in ration ($P< 0.05$) compared with other contents of diet fallowed by soybean ($P< 0.05$) then corn, wheat, and protein respectively .These contents were mixed and tested by ELISA and presented to the experiment chicks. One hundred and twenty, one day old chicks, were divided to four groups, first group (G1) was fed contaminated Aflatoxin feed and did not vaccinated. The second group (G2) was fed contaminated feed and vaccinated with Newcastle Disease vaccine (NDV) and Infectious Bursal Disease vaccine (IBDV), whereas the third group (G3) was fed uncontaminated feed and vaccinated with NDV and IBDV, and the forth group (G4) - Control group- was fed uncontaminated feed and didn't vaccinated.After four days of the beginning of the experiment, blood, liver, and kidney samples were collected, and this procedure was repeated every four days to estimate total protein, haemagglutination inhibition (HI) test, ELISA test to detect (ND) antibody titer. Results showed decrease in total protein and (ND) antibodies in the groups which were fed contaminated feed.Liver and kidney samples were collected for histopathologic examination which showed vacculation, fatty change and hemorrhage in liver and kidney samples in addition to accumulation of lymphocytes. Condensing of Bauman capsule's tufts in kidney. Increased Kupher's cell in the liver. Apoptosis was noticed significantly in group one and group two, compared with group three and control. It was concluded that Aflatoxin in high concentration in chicken feed and feed contents was present, with negative impact of the toxin on ND vaccination and blood total protein, also affects the histology of liver and kidney.

المقدمـــة

تعرف السموم الفطرية بأنها مركبات أيضية ثانويةُ تنتجها الفطريات السامة التي بإستطاعتها الدخول الى غِذاء الأنسان والحيوان من خلال التلوث المباشر، وغير المباشر للحبوب والنباتات المنتجة لها (1). تؤدي السموم الفطرية وخاصة سموم الأفلا الى قلة التحويل الغذائي وبالتالي قلة وزن الطير (2) وتؤدي الى إثباط مناعي يؤثر على فعالية الطير إضافة الى تهيئته للإصابة بالأمراض الأخرى (3). كما تسبب سموم الأفلا وبالأخص B1 قلة كفاءة الطير، تغيرات إمراضية وفي أعضاء مهمة هي الكبد و الكلى وأيضاً لها تأثير وتداخل في الجهاز المناعي للطيور، هناك تأثيرات وأعراض عامة في الدواجن حيث تسبب الأصابة بالتسمم بسموم الأفلا Aflatoxicosis خمول وكسل، فقدان الشهية مع قلة معدل النمو، قلة في التحويل الغذائي، قلة في إنتاج البيض وزيادة الهلاكات (4)، بالإضافة الى فقر الدم (5)، نقص وإنخفاض في وظيفة المناعة (6)، تسبب أيضاً تسمماً كبدياً hepatotoxicosis ونزفاً (7) تشوهاًُ خلقياً ، مسرطناً ومطفراً وراثياً (8) كذلك تؤثرعلى أنزيمات الهضم حيث تعمل على إنخفاض معنوي في فعالية أنزيمات البنكرياس الإبتدائية لهضم البروتين والدهون، والنشا والأحماض النووية وهي Trypsin, Amylase, Dnase, Rnase, Lipase, إضافة الى ذلك إنخفاض تركيز الصفراء التي يحتاجها الجسم لهضم الدهون، وإمتصاصها مع زيادة في حجم كيس المرارة (9) وتؤدي التغذية على عليقة ملوثة بالسموم الى إنخفاض في وزن الجسم مع زيادة أوزان الكبد، البنكرياس، الطحال والمعدة الغدية (10) .

الهدف من البحث هو إجراء فحص السموم بوساطة إختبار الأليزا للتأكد من وجود سموم الأفلا وذلك بجمع عينات من الأعلاف المركزة ؛ أو الحبوب أو البروتين والصويا من أماكن مختلفة لمحافظة بغداد وضواحيها وإجراء هذا الفحص الميداني للتأكد من نسبة وجود السموم. أما الهدف الثاني فهو إجراء تجربة بإستخدام هذه الأعلاف على أفراخ دجاج اللحم لدراسة تأثير سموم الأفلا على الكبد والكلية، ودراسة تأثير السموم على الخلية من خلال دراسة فحص موت الخلية المبرمج.

المواد وطرائق العمل

جمعت مائة عينة من العلف (مكونات العليقة أوالعلف ككل) المستخدم في تربية حقول دواجن منطقة بغداد وضواحيها آخذين بنظر الأعتبار عدم تكرار العينة من الحقل الواحد وقياس سموم الأفلا بإستخدام جهاز الإليزا . مزجت العينات المائة وقيست كمية سموم الأفلا بوساطة تقنية الأليزا (وكان مقدار كمية السموم 18 ppb) بعدها أعطيت الى أفراخ التجربة لمعرفة تأثير السموم على موت الخلية المبرمج في كبد وكلية أفراخ التجربة. استُخدم في هذه التجربة مائة وعشرون من أفراخ لحم نوع هبرد تم جلبها من مفقس الشركة الحديثة في الحله بِعُمر يوم واحد، قُسمت الأفراخ الى أربعة مجاميع وبِواقع ثلاثين فرخاً للمجموعة الواحدة .

G1 المجموعة الاولى**:** قدم علف ملوّث بسموم الأفلا وبدون تلقيح.

G2 المجموعة الثانية: قدم علف ملوّث بسموم الأفلا + تلقيح نيوكاسل وگمبورو.

G3 المجموعة الثالثة: قدم علف خالي من سموم الأفلا + تلقيح نيوكاسل وگمبورو.

G4 المجموعة الرابعة (السيطرة): قدم علف خالٍ من السموم وبدون تلقيح.

وقد لقحت المجموعتين الثانية والثالثة بلقاح نيوكاسل عترة La Sota بماء الشرب في اليوم 10 و 20 ولقاح گمبورو عترة IBDL من إنتاج شركة CEVAC بماء الشرب وكان لقاح نيوكاسل الأول بعمر 10 أيام واللقاح الثاني بعمر 20 يوماً، ولقاح گمبورو بعمر 13 يوماً بماء الشرب ايضاً، وخفف اللقاحين بالماء المقطر، وأعطيت عن طريق ماء الشرب وجرى سحب عينات دم لغرض فحص المناعة الأمية ضد مرض نيوكاسل بوساطة اختباري الأليزا واثباط التلازن الدموي في اليوم الثاني وكررت نفس العملية اضافة الى جمع عينات من الكبد والكلية لغرض الفحص النسجي في الأيام 4 و 8 و12 و 16 و 20 و24 و28 و32 و 36 .ربيت الأفراخ في وحدة التجارب الخاصة بفرع الإمراض والدواجن في كلية الطب البيطري / جامعة بغداد .جُمعت خمسة نماذج دم من الأفراخ ومن جميع المجاميع بعمر يومين لغرض إجراء فحص المناعة الأمية وبالأعمار 4، 8، 12..... يوماً والى آخر يوم من التجربة وبواقع 4 أيام بين سحبة وأُخرى، خمس عينات دم في كل مرة ومن القلب مباشرة بعدها جُمعت الأمصال في أنابيب إختبار أُخرى أُغلقت بإحكام وحفظت في المجمدة بدرجة – 20 مْ لحين إجراء الفحوصات المصلية عليها. الغاية من إجراء فحص الأليزا أوإثباط التلازن لمعرفة التغير الذي قد يحصل في معيار أضداد نيوكاسل بسبب سموم الأفلا الموجودة في العلف.

استخدمت طريقة بايوريت (Biuret method) لقياس البروتين الكلي في مصل الدم وقد إستخدمت عِدة إختبار تجارية نوع $(RANDOX)^R$ لقد اعتمدت المختبرات على إنتاج هذه العدة وتعليماتها حسب الطريقة التي أشارإليها الباحثون (11).

حُضرت المحاليل الخاصة بإجراء الفحص بإتباع التعليمات التي أوصى بها المختبر المنتِج. استخدم إختبار الإنزيم المناعي الممتز Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) من أجل تتبع مناعة الطيور ومعرفة مدى تأثير سموم الأفلا عليها. وقد استخدم لهذا الفحص عِدة إختبار تجاري نوع Chicken ® proflok plus إنتاج شركة Synbiotic للتحري عن الأضداد الخاصة بمرض نيوكاسل. استخدمت العترة اللقاحية نوع La Sota التي حضر منها عالق الحمة الحاوي على 4 وحدات تلازنية لإجراء فحص تلازن الدم وفي أطباق بلاستيكية وحسب طريقة (12) .

قيست سموم الأفلا بالعلف عن طريق استخدام تقنية الأليزا بأخذ 5 غم من العلف وطحنها بالمطحنة جيداً ثم أضيف 25 مل من كحول الميثانول، والمخفف بتركيز 70% (70 مل كحول + 30 مل ماء مقطر) نضيف الكحول الى عينة العلف حيث تمزج جيداً مع الرج المستمر لمدة 3 دقائق بعدها رشح السائل الطافي بورق ترشيح No.1 أو استخدام القطن الزجاجي وحسب إرشادات الشركة المنتجة للعدة .

بعد إجراء الصفة التشريحية للطيور أوخذت نماذج من الكبد والكلية وثبتت بالفورمالين بتركيز 10% لمدة 48 ساعة ثم تم تغيير الفورمالين بآخر وبنفس التركيز لاجراءالفحص النسجي وصبغت شرائح بصبغة الهيماتوكسلين والأيوزين وشرائح أخرى صبغت بصبغة Ag-Nor silver nitrate stain الخاصة ثُم فحصت العينات لمشاهدة الخلايا التي حدث بها الموت المبرمج ومراحله وحساب عدد هذه الخلايا صبغت الشرائح حسب طريقة (13). عدت الخلايا الحاوية على النقاط (Dots) التي اصطبغت بالفضة والتي تمثل ال Ag-NoRs Protein حسب طريقة (14).

استخدم تحليل التباين (Analysis of Variance) للتعرف على وجود الفروق المعنوية بين المجاميع وقد استخدم إختبار أقل فرق معنوي (Least Significant Difference) (LSD) لإيجاد الفروق الإحصائية بين مجاميع التجربة. وعدت قيمة P معنوية عندما كانت تساوي أو أصغر من قيمة 0.05 (15).

النتائــج

أظهرت النتائج في جدول رقم (1) تفوق معدل سموم الأفلا في العليقة المركزة على بقية المواد العلفية (صويا، بروتين، حنطة، ذرة) وبشكل معنوي $P < 0.05$ وكذلك تفوق معدل سموم الأفلا في مادة الصويا مقارنة مع باقي المواد العلفية وبشكل معنوي $P < 0.05$ وتفوق معدل سموم الأفلا في مادة الحنطة على معدل السموم الموجودة في الذرة والبروتين وبشكل غير معنوي $P > 0.05$.

جدول رقم (1) معدلات سموم الأفلا في المواد العلفية(p.p.b) المعدل ± الخطأ القياسي

نوع العليقة	صويا	عليقة مركزة	بروتين	حنطة	ذرة
المعدل ± الخطأ القياسي	B 29.2 ± 1.7	A 35.5 ± 4.1	C 18.9 ± 1.6	C 21.2 ± 2.6	C 20.5 ± 1.4

- إختلاف الأحرف الكبيرة أفقياً تشير الى وجود فروقات معنوية تحت مستوى P<0.05.
- تشابه الأحرف يشير الى عدم وجود فروق معنوية تحت مستوى P<0.05 .

بينت نتائج التحليل الإحصائي لقياس البروتين الكلي في الجدول رقم (2) وجود تفوق في معدل قيم البروتين الكلي في اليوم الرابع مقارنة مع بقية الأيام اللاحقة وبشكل معنوي P < 0.05 ، وأظهرت النتائج تفوق مجموعة السيطرة على بقية المجاميع في اليوم الرابع أيضاً وبشكل معنوي P < 0.05 ، وغير معنوي P > 0.05في الأيام اللاحقة 8 ،16 ،20 ،24 ،32 ،36 .

جدول رقم (2) قياس تركيز البروتين في مصل الدم المعدل ± الخطأ القياسي

العمر بالأيام / المجاميع	4	8	12	16	20	24	28	32	36
G1	A ac 48.4 ± 3.1	BC a 31 ± 5.6	D a 10.2 ± 2.4	B c 22.8 ± 5.3	BC a 31.4 ± 3.9	B a 2.7 ± 1.3	AC a 39.6 ± 5.5	A a 41.2 ± 5.5	C bc 34.8 ± 3.6
G2	A ac 50.8 ± 3.4	B a 32.3 ± 4.7	D a 10.1 ± 2.5	AC a 47.4 ± 7.9	BE a 33 ± 2.7	DE a 26.4 ± 2.23	BE a 33.8 ± 4.9	BC a 39.8 ± 3.2	B ac 36.4 ± 2.6
G3	A bc 43.2 ± 5.8	B a 30.8 ± 1.4	C a 13.2 ± 5.6	A b 36.8 ± 3.8	A a 35 ± 5.7	B a 27.2 ± 1.6	A a 39 ± 3.3	A a 36.3 ± 7.7	A ac 38.6 ± 4.6
G4	A a 55.8 ± 1.7	A a 39.2 ± 1.8	C a 13.2 ± 5.6	A b 37.2 ± 1.1	A a 37.7 ± 3.0	B a 29 ± 2.1	B a 31.4 ± 1.2	A a 44.8 ± 5.4	A a 44 ± 2.3

- إختلاف الأحرف الكبيرة أفقياً تشير الى وجود فروقات معنوية تحت مستوى P<0.05.
- إختلاف الأحرف الصغيرة عمودياً يشير الى وجود فروقات معنوية تحت مستوى P<0.05.
- تشابه الأحرف يشير الى عدم وجود فروق معنوية تحت مستوى P<0.0

بين الجدول رقم (3) تفوق معدل معيار الأضداد في اليوم الرابع مقارنة مع المدد الزمنية الأخرى التالية 8, 12 ,16 , 20 ,24 ,28 ,32 ,36 بشكل معنوي P<0.05 , وتفوق معيار الأضداد في المجموعة الثالثة بشكل معنوي P<0.05 مقارنة مع المجموعة الأولى وبشكل غير معنوي بالمجاميع الثانية، والرابعة.

جدول رقم (3) معدلات معيار أضداد مرض نيوكاسل في الأفراخ بوساطة فحص إثباط التلازن

المعدل±الخطأ القياسي

العمر (يوم) / المجاميع	2	4	8	12	16	20	24	28	32	36
G1	853.3 ± 102.6	A a 819.2 ± 125.41	B b 89.6 ± 15.68	B b 67.2 ± 24.99	B b 44.80 ± 11.76	B b 57.6 ± 18.66	B a 22.4 ± 3.92	B a 11.2 ± 1.96	B a 9.6 ± 1.6	B a 8 ± 3.58
G2	853.3 ± 102.6	A a 819.2 ± 125.41	C a 294.4 ± 94.06	B b 38.4 ± 6.4	B b 54.4 ± 19.98	B b 57.6 ± 6.4	B a 25.6 ± 10.85	B a 11.2 ± 3.2	B a 12.8 ± 4.8	B a 10 ± 3.83
G3	853.3 ± 102.6	A b 768 ± 161.91	B a 320.4 ± 74.64	C a 105.6 ± 41.60	B b 179.2 ± 47.3	B a 179.2 ± 31.35	C a 44.8 ± 7.84	C a 38.40 ± 6.40	C a 41.6 ± 21.82	C a 84 ± 27.23
G4	853.3 ± 102.6	A a 819.2 ± 125.41	B a 230.40 ± 25.60	CD b 99.20 ± 43.64	C b 44.8 ± 7.84	D b 24 ± 10.12	CD a 28.8 ± 3.2	D a 25.6 ± 6.4	E a 12.8 ± 3.2	D a 22.4 ± 3.9

- إختلاف الأحرف الكبيرة أفقياً تشير الى وجود فروقات معنوية تحت مستوى P<0.05 .
- تشابه الأحرف يشير الى عدم وجود فروق معنوية تحت مستوى P<0.05
- إختلاف الأحرف الصغيرة عمودياً يشير الى وجود فروقات معنوية تحت مستوى P<0.05
- عمر يومين يمثل المناعة الأمية.

بينت النتائج في الجدول (4) وجود إنخفاض في معدل معيار الأضداد وبشكل معنوي P<0.05 في اليوم الثامن، ثم الذي يليه من الأيام مقارنة مع اليوم الرابع وفي كافة المجاميع بإستثناء المجموعة الثالثة التي كان تأثرها أقل من بقية المجاميع. وأظهرت النتائج وجود إرتفاع في معيار الأضداد في اليوم الرابع وبشكل معنوي P<0.05 للمجموعتين الأولى والثانية مقارنة مع المجموعتين الثالثة والرابعة.

جدول رقم (4) معدلات معيارالگلوبيولينات لمرض نيوكاسل في الأفراخ بوساطة فحص الأليزا

المعدل ±الخطأ القياسي

العمر (يوم) / المجاميع	2	4	8	12	16	20	24	28	32	36
G1	14735 ± 375.1	A a 14183.4 ± 886.92	B b 9880 ± 1214.22	C b 5516 ± 751.24	E bc 1928.8 ± 392.5	D b 493.2 ± 159.67	F a 251.8 ± 104.01	F a 111.4 ± 111.4	F a 52.6 ± 184.12	F a 14.4 ± 188.21
G2	14735 ± 375.1	A ac 13318 ± 975.15	B ab 9976 ± 728.52	C c 3381.6 ± 705.83	C b 1658.8 ± 747.76	EF b 1115.2 ± 282.47	E a 1413.8 ± 415.87	EF a 305.60 ± 77.19	F a 60.6 ± 60.6	F a 59.80 ± 59.80
G3	14735 ± 375.1	A c 11904.8 ± 847.81	B a 10935.6 ± 1298.16	D a 8402.2 ± 1040.74	C a 6224.6 ± 1370.68	E a 2234.2 ± 528.41	E a 676.6 ± 220.67	E a 399.2 ± 101.52	E a 425 ± 118.87	E a 834.4 ± 258.87
G4	14735 ± 375.1	A c 12612.6 ± 833.21	B c 9534.6 ± 712.54	C b 5736.80 ± 1546.04	D b 3139 ± 978.57	E b 1154.8 ± 228.82	E a 1151.60 ± 307.52	E a 422.20 ± 201.56	E a 79.80 ± 79.80	E a 114.4 ± 114.4

- إختلاف الأحرف الكبيرة أفقياً تشير الى وجود فروقات معنوية تحت مستوى $P<0.05$.
- تشابه الأحرف يشير الى عدم وجود فروق معنوية تحت مستوى $P<0.05$.
- إختلاف الأحرف الصغيرة عمودياً يشير الى وجود فروقات معنوية تحت مستوى $P<0.05$.
- عمر يومين يمثل المناعة الأمية

بين الفحص النسجي لطيور المجموعة الأولى المتناولة لسموم الأفلا في الكبد وبعمر أربعة أيام وجود تغيرات تنكسية في الخلايا الكبدية تميزت بتورّم تلك الخلايا وانسداد أو ضيق الجيبانيات مع تفجي هيولي الخلايا الكبدية، بعدها لوحظ وجود تجمعات صغيرة من الخلايا وحيدة النواة حول الوريد المركزي مع تكاثر خلايا كفر Kupher's cell ووجود تجمعاتٍ حبيبية تكونت من تجمع الخلايا البلعمية واللمفية في متن الكبد . بعدها لوحظ تغيرات تنكسية خلوية مع تكون تركيب حويصلي كبير إضافة الى توسع الوريد المركزي (شكل 2). وكذلك إحتقان الأوعية الدموية والأوردة المركزية وإحتواء تجاويفها على خلايا إلتهابية مع تثخن جدار الوعاء الدموي وتليف جدرانه وتكاثر طفيف للأرومات الليفية (شكل: 1و2). أما في نسيج الكلية فقد لوحظ بعمر ثمانية أيام وجود تغيرات تنكسية حادة تمثلت بتفجي وتوسف وتهتك ظهارة النبيبات الكلوية. بعدها لوحظ توسع الأنابيب الكلوية الجامعة مما أدى الى الضغط على النبيبات الكلوية المجاورة لها.. وبعمر العشرين يوماً من تناول السموم لوحظ وجود تجمعات حبيبية في النسيج

الخلالي للكلية تكونت نتيجة تجمع الخلايا البلعمية). بعدها لوحظ ضمور اللمة الكبيبية وتوسع محفظة بومان مع إرتشاح شديد للخلايا الإلتهابية حول محفظة بومان وفي النسيج الخلالي للكلية مكون من العدلات والهتروفيل (شكل:6). واستمر ملاحظة نفس التغيرات مع تثخن الغشاء القاعدي للأنابيب الكلوية ولمحيط محفظة بومان بسبب تكاثرالأورمات الليفية إضافة الى ضموراللمة الكبيبية(شكل:3 ،4 ،5 ، 6).

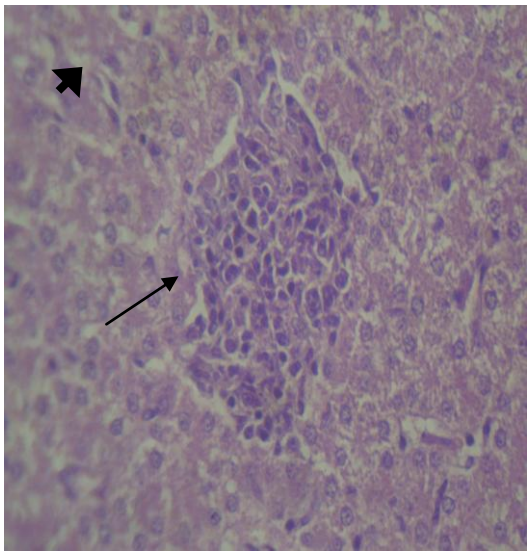
بالنسبة الى المجموعة الثانية التي تم إعطائها السموم وتلقيحها بلقاحي نيوكاسل وگمبورو فلم تشهد تغيرات مرضية واضحة في نسيج الكبد والكلية سوى تجمعات معتدلة من الخلايا اللمفية، وخلايا وحيدة النواة حول الأوردة المركزية وتغيرات تنكسية بسيطة مع تكاثر لخلايا كفر في متن الكبد. أما في الكلية فقد لوحظ وجود تجمع طفيف لخلايا وحيدة النواة حول اللمة الكبيبية. أما المجموعة الثالثة فلم تظهر أي تغيرات مرضية، وكذلك بالنسبة لمجموعة السيطرة. تبين وجود حالة الموت المبرمج لخلايا الكبد والكلية حيث لوحظ تجزئة الكروماتين الذي تتجمع أجزاؤه على غشاء النواة مكونة نقاط dots تأخذ اللون الداكن بعد صبغها بصبغة نترات الفضة (Ag-NOR silver nitrate stain) وقد أظهرت النتائج في الجدول (5) وجود إرتفاع في نسب الخلايا الميتة للمجموعة الثانية مقارنةً مع المجموعتين الثالثة والرابعة (السيطرة) وبشكل معنوي $P<0.05$ وبكافة المدد الزمنية ، في حين لم يكن هناك فرق معنوي بين المجموعتين الأولى، والثانية ، وتبين وجود ارتفاع في نسبة الخلايا الميتة للمجموعة الأولى مقارنةً مع المجموعة الثالثة وبشكل معنوي $P<0.05$، وغير معنوي. وأوضحت النتائج أيضاً وجود انخفاض في نسبة الخلايا الميتة في مجموعة السيطرة وبشكل معنوي $P<0.05$ مقارنةً مع المجاميع الأولى، والثانية، والثالثة وبكافة المدد الزمنية (شكل 7و8) .

جدول رقم (6) معدلات الخلايا التي تمر بمرحلة الموت المبرمج في نسيج الكلية والكبد .

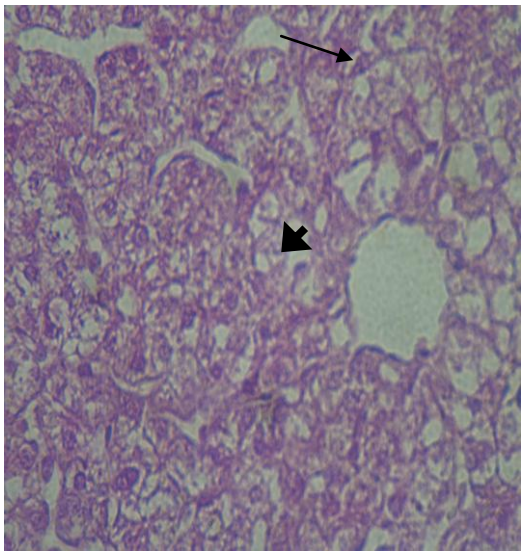
المعدل ± الخطأ القياسي

العمر (يوم) / المجاميع	12		24		36	
	كلية	كبد	كلية	كبد	كلية	كبد
G1	E B 77.2 ± 6.6	B Ac 83.2 ± 4.9	CD a 92 ± 0.6	AC a 94.8 ± 0.8	AD Ac 93.3 ± 0.6	A a 96.6 ± 0.5
G2	C A 83.5 ± 3.6	B A 86.8 ± 2.7	A A 95.2 ± 0.7	A A 95.6 ± 0.6	A A 94.3 ± 0.5	A A 96.1 ± 0.5
G3	C B 73.5 ± 3.8	B C 80.3 ± 2.8	A B 85.5 ± 0.8	A B 87.5 ± 1.2	A C 89.2 ± 0.9	A B 88.5 ± 0.96
G4	AC C 38.3 ± 1.8	AC b 38.8 ± 2.2	BC c 36.5 ± 3.1	B c 33.8 ± 2.8	A b 41 ± 1.6	AC C 38.3 ± 0.9

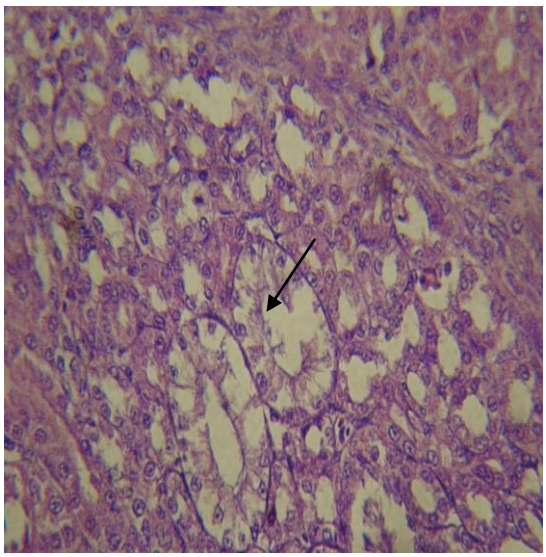
- إختلاف الأحرف الكبيرة أفقياً تشير الى وجود فروقات معنوية تحت مستوى $P<0.05$.



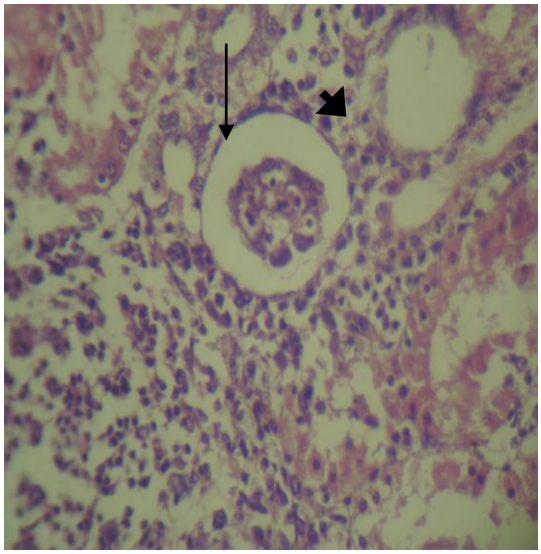
(شكل:1) مقطع نسجي في الكبد بعد 12 يوم يلاحظ وجود تجمعات حبيبية تكونت من تجمع الخلايا البلعمية واللمفية في متن الكبد ← مع تكاثر خلايا كفر◄ (H & E 40X).



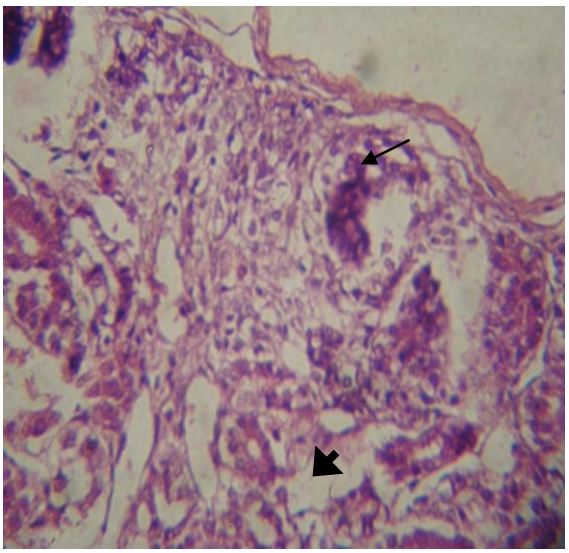
(شكل2) يلاحظ وجود تغيرات تنكسية في الخلايا الكبدية تميزت بتفجي هيولي تلك الخلايا ← مع وجود تغيرات تنخرية تمثلت بأختفاء أنوية الخلايا الكبدية◄ (H & E 40X)



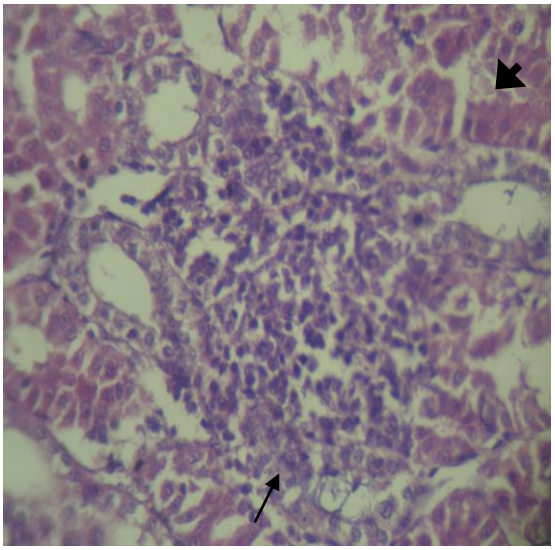
(شكل:3) يلاحظ تفجي هيولي الخلايا المبطنة للنبيبة الكلوية وتوسفها ←(H & E 40X)



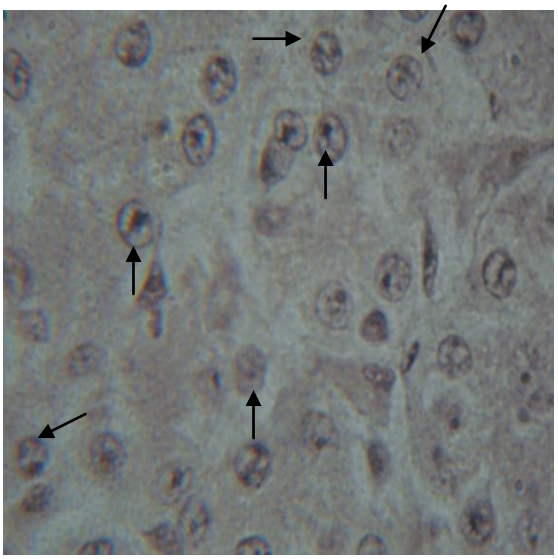
(شكل:4) يلاحظ ضمور اللمة الكبيبية وتوسع محفظة بومان ← مع إرتشاح شديد لخلايا الهتروفيل والبلعمية واللمفية حول الكبيبة الكلوية وبين النبيبات الكلوية ◄ .(H & E 40X)



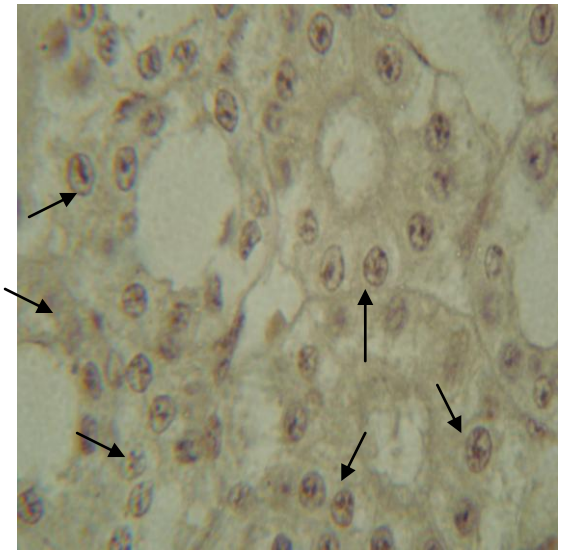
(شكل:5) مقطع نسجي يوضح تليف شديد في الكبيبة الكلوية وضمور اللمة الكبيبية ← إضافة الى تغيرات تنكسية في ظهارة النبيبة الكلوية المتوسعة ◄. (H & E 40X) .



(شكل:6) يلاحظ وجود بؤر حبيبية في نسيج الكلية تكون من تجمع الخلايا متعددة النوى والخلايا البلعمية واللمفية ← مع وجود تغيرات تنكسية في ظهارة النبيبات الكلوية ◄ .(H & E 40X).



(شكل:7) مقطع نسجي في الكبد،G2 يوضح مراحل مختلفة لموت الخلية المبرمج ← (Ag-Nor silver nitrate stain 100x).



(شكل:8) مقطع نسجي في الكلية G1 بعمر 12 يوماً ومراحل مختلفة من موت الخلية المبرمج← (Ag-Nor silver nitrate stain 100x).

المناقشة

تبين تفوق معدل سموم الأفلا وبشكل معنوي في العليقة المركزة على باقي المواد العلفية وهذا يتفق مع ماوجده الباحثون (16) من أن مستوى التلوث العالي يوجد في عليقة الدواجن المركزة تليها المواد العلفية الأخرى مثل الذرة والحنطة. يختلف مستوى تلوث عليقة الدواجن وموادها العلفية بالفطريات، وسمومها لاسيما سموم الأفلا بإختلاف المكان والبيئة وطرق نقل وخزن هذه الأعلاف ثم ضررها الكبير على صناعة الدواجن وهذا ما أشار إليه الباحثون (17).

إن تفوق مستوى تركيز البروتين الكلي لمصل الدم في المجموعة الرابعة (السيطرة) على بقية المجاميع يتفق مع ما أشار اليه الباحثون (18) و(19) من وجود إنخفاض في مستوى البروتين الكلي في مصل دم أفراخ دجاج اللحم نتيجة تغذيتها على علف ملوث بسموم الأفلا وتأثير هذه السموم عليها، ويأتي هذا التأثير نتيجة لتلف في نسيج الكبد حيث أن الكبد هو العضو الهدف لسموم الأفلا، مما يؤدي الى عرقلة وظيفة الكبد وذلك كون الكبد يلعب دورا رئيسيا في عملية تنظيم تركيز البروتين في مصل الدم (20) وهذا قد يكون سبب إنخفاض تركيز البروتين الكلي في مصل الدم وبالتالي التأثير على تصنيع البروتين وقد يعود السبب الى الإجهاد نتيجة التعرض لهذه السموم حيث يؤدي الإجهاد الى زيادة إفراز هرمون (ACTH) (Adino Cortico Tropic Hormone) من الغدة النخامية الذي يحفز قشرة الغدة الكظرية على إفراز الهرمون القشري (Corticosterone) الذي يساعد على إجراء عمليات الهدم للبروتينات والدهون من أجل تحويلها الى الكلوكوز الذي يحتاجه الطير كمصدر للطاقة لمقاومة حالة الإجهاد (21).

أظهرت نتائج معيار أضداد مرض نيوكاسل لإختبار إثباط تلازن الدم وإختبار الأليزا في الأفراخ التفوق المعنوي في المجموعة الثالثة الملقحة وغير المعاملة بالسموم مقارنة مع المجموعتين المعاملتين بالسموم، وهي المجموعة الأولى الغير ملقحة والمجموعة الثانية الملقحة وهذا يتفق مع ما أشار اليه الباحثون (22) من تأثير سموم الأفلا السلبي على الجهاز المناعي للطير ومع الباحثون(23) الذي أشار الى تأثير سموم الأفلا السلبي بتثبيط الإستجابة المناعية الخلطية ومع الباحث (24) حيث أشار الى أن سموم الأفلا تسبب فشلاً في اللقاحات خاصة ضد مرض نيوكاسل، وقد يعود السبب الى تأثير السموم على الأعضاء اللمفية الرئيسية وهي الغدة الزعترية وجراب فابريشيا مما يؤدي الى حدوث ضمور في هذه الأعضاء إضافة الى قلة في الخلايا اللمفاوية T-Cell وإضعاف الاستجابة الخلوية في الطير (25) وتثبيط المتمم والتأثير على عملية نضوج وتمايز خلايا B اللمفاوية ويمنع تصنيع البروتين وإنتاج الأجسام المضادة وبالتالي فشل التلقيح (26)، وهذا يتفق مع ما لاحظه الباحثون (27) من إن الطيور المعرضة لهذه السموم تعاني من قلة في تركيز بروتينات الدم لاسيما الكلوبيولينات المناعية وهي من أهم البروتينات المسؤولة عن المناعة الخلطية ثم يقلل من البروتين اللازم لتكوين الأجسام المضادة مما يثبط الإستجابة المناعية الخلطية للطير. وأظهرت أفراخ التجربة ولكافة المجاميع إنخفاضاً ملحوظاً في معدل معيار الأضداد في فحص إثباط تلازن الدم وفي مستوى الگلوبيولينات المناعية في مصل الدم في فحص الأليزا لمرض نيوكاسل، وقد يعود سبب هذا الإنخفاض الى الإجهاد الحراري الذي تعرضت له أفراخ التجربة نتيجة الظروف البيئية والجوية وهذا يؤثر على الأضداد المتكونة وعلى الأعضاء اللمفية الرئيسة مثل جراب فابريشيا والتوثة وهذا ينطبق

مع ما أشار اليه الباحثون (28) و(29) ويؤدي الإجهاد الى هدم البروتين بالجسم وبما أن الگلوبيولينات المناعية هي عبارة عن سكريات بروتينية لذا يُعتقد أن الإنخفاض الحاصل كان نتيجة لهدم البروتين المتأثر سلباً بأرتفاع هرمون الكورتيكوستيرون المقترن بالإجهاد لغرض تكوين الكلوكوز الذي يحتاجه الطير كمصدر للطاقة لمواجهة حالة الإجهاد وهذا ماأشار اليه الباحث (30) والباحثة (31). أما الإنخفاض الحاصل في المجموعة الثالثة والتي غذيت على علف خالٍ من السموم ولقحت بلقاحي نيوكاسل وجراب فابريشيا المعدي، فقد يكون السبب ناتج من المعيار العالي للأضداد الأمية المنتقلة للأفراخ عن طريق الأم التي تتداخل مع المستضد اللقاحي فهي تعمل كوسيلة دفاع رئيسة في فترة عمر الأفراخ الأولى وفي الوقت نفسه تعمل على تثبيط تكاثر فايروس اللقاح، وبوجود هذه الأضداد فأنها تجعل عملية التلقيح الأولى صعبة كما أن الأجسام المناعية الأمية ترتبط بالعوز المناعي الشديد للأفراخ الفتية التي ينتج عنها إستجابة قليلة أو ضعيفة جدا للتلقيح الأبتدائي وهذا ماأشار إليه الباحثون (32).

قد يكون سبب وجود عدد كبير من الخلايا أحادية النواة في خلايا الكبد والكلى دليل على التمنيع الوقائي ضد الفطريات (33) ويمكن أن نعد هذا دليلا على وجود الفطريات في العلف المعطى للأفراخ حيث لم تعزل الفطريات ضمن خطة الدراسة. إن كثرة خلايا كفر في الكبد هو دليل على فعالية الخلايا البلعمية ومن ضمنها خلايا كفر، إضافة الى وجود التنكس الحاد فهناك أيضاً التنخر والتوسف إضافة الى التفجي الشديد ويعود ذلك الى تجمع الدهن في الكبد فمن المعروف أن سموم الأفلا تؤدي الى خلل في عمل الكبد ثم تجمع الدهن إضافة الى خلل أيض البروتين (34).

أما موت الخلايا المبرمج وعد الخلايا التي مرت بمرحلة الموت المبرمج وهوشكل خاص لموت الخلية وعملية فعالة تحدث بصورة طبيعية للخلايا التي تصل الى الشيخوخة مثلا،ونظام إنتحاردقيق تلجأ إليه الخلية عندما يكون هناك خلل تبعاته مؤذية للخلية وللجسم (36,35). فقد أظهرت النتائج وجود أرتفاع نسبة الخلايا الميتة للمجموعة الثانية في اليوم الثاني عشر مقارنة مع المجموعتين الثالثة والسيطرة وبشكل معنوي وقد يعود السبب الى تأثير سموم الأفلا لاسيما أفلا B1 على كروموسومات الخلية حيث يعمل على زيغ الكروموسوم من خلال إحداث كسر في الكروماتيد وعامة فهو يسبب كسر في DNA الخلايا المتعرضة له (37). وتعمل سموم الأفلا على تلف في المتقدرات مما يؤدي الى إعتلال المتقدرات والذي قد يكون السبب في شيخوخة الخلية ،ويحصل تلف لـ DNA المتقدرات على شكل طفرات وإعتلال وكذلك تلف لأغشية المتقدرات؛ مما يؤدي الى زيادة في موت الخلية المبرمج مع أعتلال إنتاج الطاقة (إنتاج ATP) (38) ويعمل سم الأفلا وخاصة أفلا B1 الى زيادة في الجذور الحرة ؛ مما يؤدي الى التلف التأكسدي (Oxidative damage) وكذلك الى Lipid Peroxidation وكل هذا يؤدي في النهاية الى تلف الخلية وبالتالي موتها (39).وقد يعود السبب أيضاً الى تأثير لقاح جراب فابريشيا المعدي نوع IBDL والمستخدم في هذه التجربة في ارتفاع نسبة الخلايا التي تمر بحالة الموت المبرمج وهذا يتفق مع ماأشارت إليه الباحثة(31).

المصادر :

1. Pier AC (1973). An overview of the mycotoxicosis of domestic animals. J Anim Vet Med Assoc 163: 1259-1261.

2. Hoerr FJ (1997). Poisons and Toxins. In: Diseases of Poultry, Edite by Calnek BW Barnes H.J Beard CW McDougald LR and Saif Y.M 10th ed. Iowa State University Press USA. 951-979.
3. Santin E (2000). Mycotoxicosis. In: Berchieri, Jr., A., Macari M. (Eds.). Doencas das Aves Facta Campinas. 379-388.
4. Miazzo R Rosa CA DeQueiroz Carvalho EC Magnoli, C Chiacchiera SMPalacio G Saenz M Kikot A Basaldella E and Dalcero A (2000). Efficacy of ynthetic zeolite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chick. Poult Sci. 79: 1-6.
5. Oguz H. and Kurtoglu V (2000). Effect of clinoptilolite on fattening performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. Bri. Poult Sc, 41: 512-517.
6. Oguz H Hamdiml, HH Kurtoglu V and Erganis O (2003). Evaluation of humoral immunity of broiler during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. Revu de Med Vet 154: 483-486.
7. Ortatatli M Og`uz H (2001). Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological changes in broiler chickens during aflatoxicosis. Res Vet Sci 71: 59-66.
8. Sur F and Celik I. (2003). Effects of aflatoxin B1 on the development of bursa of fabricious and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken. Brit Poul. Sci. 44: 558-566.
9. Kryukov V.S and Krivtov VI (1992). Influence of aflatoxin B1 on the use of dietary protein in chick broilers. Nank VI Lenina, 1: 45-49.
10. Stanley VG Ojo R Woldesenbet S and Hutchinson DH (1993). The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. Poult. Sci, 72: 1867-1872.Huff WE Kubena LF Harvey RB and Phillies TD (1992). Efficacy of hydrated sodium calcium Aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. Poult Sci. 71: 64-69.
11. Henry RJ Cannon DC and Winkelman JW (1974). Clinical Chemistry. Principls and Techniques. 2nd ed. Harper and Row.
12. Office international des epizooties (2004). New Castle disease. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines 5th ed.Paris, P:1-18.
13. Ploton D Menager M Jeannesson P (1986). Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of nucleolar organizer region at the optical level. Histochemical J. 18: 5-14.

14. Crocker J Boldy DAR and Egan MJ (1989). How shoud we count Ag-NORs? Proposal for a standerized approach J Patho. 158 : 185-188.

15. المحمد، نعيم ثاني،خاشع الراوي،مؤيد يونس ووليد المراني .(1986).مبادئ الإحصاء–مديرية دار الكتب للطباعة والنشر–جامعة الموصل.

16. Zinedine A Juan C Soriano JM Molto JC Idriss, L and Man`es J (2007). Limited survey for the occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feeds from Rabat,Morocco. International J food Micro. (115) 124-127.

17. Lynne LC Tenholm HL Prelusky DB and Rosenberg A(1995). Economic losses and decontamination of aflatoxin B1. Natural toxin. 3: 199-203.

18. Basmacioglu.H Oguz H Ergul M Col R and Birdane YO(2005).Effect of dietary esterified glomannan on performance serum biochemistry and haematology in broilers exposed to aflatoxin . Czech J Anim Sci. 50:31-39.

19. Rosa CA Miazzo M Magnoli C Salvano M Chiacchiera SM Ferrero S Saen ZM Carvalho EC and Dalcero A (2001). Evaluation of the efficacy of bentonite from the South of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. Poult Sci. 80(2): 139-144.

20. Anderson L Dibble MV and Rybergen H J(1982).Nutrition in health and disease. 1St ed . Lipin cott company. Philadelphia Torento.

21. إبراهيم، ضياء خليل. (1993).استخدام بعض الطرائق للتخفيف من تأثير الأجهاد الحراري على فروج اللحم والدجاج البياض.أطروحة دكتوراه،كلية الزراعة.جامعة بغداد.

22. Celik S Erdogan Z Erdogan S and Bol R (2005). Efficacy of Tribasic Copper Chlorid (TBCC) to reduce the harmful effect of aflatoxin in broiler. Turk J Vet Anim Sci. 29: 909-916.

23. النعيمي، حاتم مجيد مهنة،نوال صالح جعفر،حسيبة عباس عمران.(2008).دراسة استخدام مسحوق ورق الزعتر لتقليل التثبيط المناعي بسموم الأفلا في دجاج اللحم–المجلة الطبية البيطرية العراقية مجلد 32 عدد 1.

24. Anjum AD (1994). Outbreak of Infectious Bursal Disease in vaccinated chickens due to aflatoxicosis. Indian Vet J. 71: 322-324.

25. Hurley DJ Neiger RD Higgins KF Rottinghaus GE and Stahr H(1999). Short-term exposure to subacute doses of aflatoxin induced depressed mitogen responses in young mallard ducks. Avi Dis. 43: 649-655.

26. Giambrone JJ and Closser J (1990). Efficacy of live vaccines against serologic subtypes of infectious bursal disease virus. Av. Dis. 34:7-11.

27. Eraslan G Akdogan M Yarsan E Sahindokuyucu F Essiz D and Altintas L (2005). The effects of aflatoxins on oxidative stress in broiler chickens .Turk J Vet Anim Sci. 29: 701-707.

28. Compton MM Gibbs PS and Jonson LR(1990). Glucocorticoid activation of deoxy ribonucleic acid degradation in bursal lymphocytes. Polt Sci. 69: 1292-1298.

29. هويدي، عماد حامد.(1999).حمض الاسكوربك كعامل مضاد للتثبيط المناعي في دجاج. أطروحة دكتوراه.كلية الطب البيطري–جامعة بغداد.

30. الدراجي، حازم جبار شاه علي.(1995).دراسة بعض الصفات الفسلجية والمقاومة الحرارية لفروج اللحم فابرو ومقارنته ببعض هجن اللحم التجارية.رسالة ماجستير. كلية الزراعة–جامعة بغداد.

31. الهاشمي، بلقيس حسن علي.(2007).دراسة مقارنة للتغيرات النسجية المرضية والمناعية المصاحبة لأعطاء خمسة أنواع من لقاحات مرض گمبورو .أطروحة دكتوراه. كلية الطب البيطري–جامعة بغداد.

32. Davison TF Morris TR and Payan LN (1996). Poultry immunology. 1st ed. J. Oxford Ltd. , London.

33. Michel, G.M. (2000). The granulomatous inflammatory response. J Amar. Path. 92: 184-196.

34. Ortatatl, M Og`us H Hatipog`lu F and Karaman M(2005). Evaluation of pathological changes in broiler during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. Res Vet Sci 78: 61-68.

35. Rana A Sathyanarayana P and Lieberthal W (2001). Role of apoptosis of renal tubular cells in acute renal failure:Theraputic applications.Apoptosis. 6: 83-102.

36. McLaughlin R Kelly CJ Kay E and Bouchlier-Hayes D (2001). The role of apoptotic cell death in cardiovascular disease .J Med Sci. 170: 132-140.

37. الجبوري، كركزمحمد ثلج، إبراهيم إسماعيل خليل (1998) السموم الفطرية آثارها ومخاطرها –الطبعة الأولى– مركز إباء للأبحاث الزراعية.

38. Thrasher JD (2000). Are chlorinated pesticides a causation in maternal mt DNA mutations ? Arch. Envir. Health, 255-292.

39. Surai PF(2002). National antioxidants and mycotoxins. natural antioxidants in avian nutrition and reproduction ,1st ed . Nottingham university press. 455-509.