التغيرات النسجية في كبد وكلى الجرذان المغذاة على تراكيز مختلفة من الأفلاتوكسين

رنا جلال شاكر، كركز محمد ثلج، امين سلمان بدوي

قسم علوم الحياة ، كلية التربية ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

قسم علوم الأغذية ، كلية الزراعة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

(تاريخ الاستلام: 20 / 3 / 2012 ---- تاريخ القبول: 14 / 11 / 2012)

الملخص

تعتبر سموم الأفلاتوكسن (Aflatoxin) من بين انواع السموم الفطرية الاكثر اهمية في الصحة العامة للانسان والحيوان، إذ بينت الدراسات البايولوجية على الحيوانات المختبرية بإن اعطاء سموم الافلا مع الغذاء قد سبب في احداث تأثيرات مرضية مختلفة تضمنت الخلل في الجهاز المناعي وحصول التطفير الوراثي والتسرطن في اعضاء مختلفة من الجسم لا سيما الكبد والكلى اللذان يعتبران المستهدفين من قبل هذه السموم. تم تحضير سموم الأفلا ووضعت بتراكيز متدرجه (0.312 ، 0.625، 1.250 و 2.5 ملغم / كلغم عليقه) مع غذاء الجرذان لمدة 21 يوما ثم قتلت وحضو ت عينات نسجية لكل من الكبد والكلى. سجلت التغييرات الفسلجيه في نسيج الكبد والكلى، تمثلت التغيرات بظهور تضخم في الخلايا الكبدية، حصول نزف دموي مع تجمعات لكريات الدم الحمراء في نسيج الكبد. اما الكلى فقد ازدادت التغيرات فيها واصبحت تغيرات مرضية خصوصا في مجموعة الحيوانات المغذاة على التراكيز العالية من سموم الأفلا. مع ضمور شديد في العديد من الكبيبات الكلوية ،و النبيبات الملفوفة الدانية خاصة حيث اصبحت ظهارة النبيبات منخفضة الأرتفاع وامتلاكتجاويف ممتلئة بالحطام الخلوي او الراشح الكبيبي والنبيبات الجامعة ايضاً .

المقدمة

تعد السموم الفطرية Mycotoxin مجموعة من مركبات الايض الثانوية ذات الوزن الجزيئي المنخفض نسبياً والتي تتمكن من انتاجها انواع من الفطريات لاسيما من اجناسAspergillus،Penicillium، Fusarium وانواع اخرى مختلفة ،وتعد سموم الافلاتوكسين المنتجة من قبل انواع الاعفان *Aspergillus flavus* ، *A. parasiticus* و*A. nomeoius* من السموم الفطرية الاكثر اهمية في الصحة العامة للإنسان والحيوان ، وتتضمن أربعة أشكال هي(AFG_2) G_2، $G1(AFG_1)$، $B_1(AFB_1)$,$B_2(AFB_2)$ [1 ، 2]. اذ بينت الدراسات ان لها تأثيرات سلبية في صحة الأنسان والحيوان وخصوصا النوع B_1 إذ اعتبره معهد ابحاث السرطان الدولي بأنه من ضمن المجموعة الاولى من المواد المسرطنة [3] ، وقد بينت الدراسات البيولوجية على الحيوانات المختبرية بأن اعطاء سموم الافلا مع الغذاء قد سبب في احداث تأثيرات مرضية مختلفة تضمنت الخلل في الجهاز المناعي وحصول التطفير الوراثي والتسرطن في اعضاء مختلفة من الجسم لا سيما الكبد والكلى اللذان يعتبران العضوين المستهدفين من قبل هذه السموم [4 ،5]. إذهدف البحث الى دراسة التاثيرات النسجية الحاصلة في كبد وكلى الحيوانات المختبرية (الجرذان) والمغذية على تراكيز متدرجة من سموم الأفلاتوكسين.

المواد وطرق العمل :

إنتاج سموم الأفلا:

تم تحضير سموم الأفلا وذلك بتنمية سلالة العفن *A.parasiticus* NRRL2999 على بذور الرز وكما متبع في طريقة [6] ، حيث عقمت كمية من الرز (1 كغم) الذي يحوي على العفن النامي في المؤصدة على درجة حراره 121م° لمدة 10 دقائق ثم جفف وطحن على شكل مسحوق ناعم، واستخدم جهاز المطياف ذي الأشعة المرئية وفوق البنفسجية لقياس الامتصاص عند طول موجي 265 و362 نانو غرام، وتم تأكيد النتائج باستخدام جهاز كروماتوكرافيا السائل ذي الكفاءة العالية (HPLC) .

الحيوانات المختبرية:

استخدم 20 حيوانا" مختبريا"(جرذان) من النوع *Albino Sprague* Dawley– ، حيث تم الحصول عليها من كلية الزراعه /جامعة صلاح الدين وبأعمار 45 يوما تقريبا" وتم تربيتها في اقفاص حديدية حيث وفرت لها التهوية المستمرة وقدمت لها العليقه الذي تم إعداده والمتكون من 35% حنطه، 33%،20%فول الصويا،10% بروتين حيواني ،1% حليب مجفف مضافا" إليها 1%من كل من الفيتامينات والأملاح المعدنية ،وكان إعطاء الغذاء والماء بشكل متوفر دائما طو ال مدة التجربة التي استمرت لمدة 28 يوما ، اضيف الى علف كل مجموعة كمية من سموم الأفلا بعد ان تم خلطها معها للحصول على نسبة من سموم الأفلا حسب ما مذكو ر في المجاميع ادناه:-

المجموعة الأولى : صفر من سموم الأفلا(تجربة السيطرة)، المجموعة الثانية :0.312 ملغم /كغم عليقه، المجموعة الثالثة:0.625 ملغم /كغم عليقه ، المجموعة الرابعة :1.250ملغم /كغم عليقه ،

المجموعة الخامسة:2.5 ملغم /كغم علف. بعد انتهاء مدة التجربة (28 يوم)، قتلت الحيوانات وحضرت منها عينات المقاطع النسيجية لكل من الكبد والكلى حسب الطريقة المشار اليها في [7

النتائج والمناقشة

التأثير ات في الكبد :

بينت نتائج فحص مقاطع انسجة الكبد لمجاميع الحيوانات التي أضيف لغذائها تر كيز 0.312 ملغم/كغم عليقه من سموم الأفلا حصول تغيرات فسلجيه لها تمثلت بحدوث انتفاخ خلوي واضح، فقد بدت الخلايا بشكل صفوف مرصوصة تترتب مع بعضها البعض بشكل شبكة(Network) بينها الجيبانيات الدموية (Blood

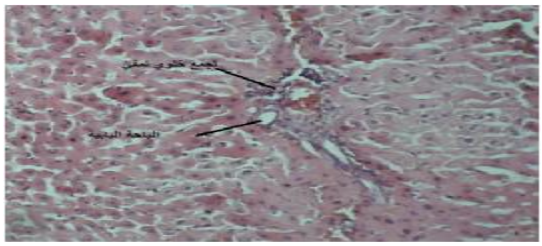
sinusoid lumen) أما نوى الخلايا الكبدية فقد ظهرت كبيره الحجم ودائرية الشكل وكذلك لوحظ إن عدد من الخلايا الكبدية لايبدو فيها وجود النوى ، غير إن الخلايا بأجمعها يبدو اصطباغ هيوليها باللون الأحمر وتحاط كل مجموعه منها بالوريد المركزي المحتف بالدم ،كذلك يوجد انتشار محدود من الخلايا اللمفية المحيطة ببعض فروع الأورقه ألبابيه وبعض هذه الفروع ألبابيه محاطة بالخلايا اللمفية وفي تجاويف هذه الاورقة هناك كريات الدم الحمراء RBC (شكل 1) وعند مقارنة ذلك مع مجموعة السيطرة فقد لوحظ بأن خلايا النسيج فيها كانت ذا مظهر طبيعي لكل من الهيولي و الأنويه وتظه بعض الخلايا ثنائية النواة (Binucleated hypocyted) مع وجود الجيبانيات الدموية ، و وجود خلايا كفر Kupffer cell والأوعية الدموية Blood vessels (شكل 2).

أما في المجموعة الثالثة ذاتالتر كيز 0.625 ملغم/كغم من العليقة ، فقد لوحظ في متن الكبد ظهور خلايا كبديه متضخمة Swollen غير واضحة المعالم وبعضها لها نوى كبيرة محاطه بنطاق خال من الصبغة ،وحصول احتقان دموي في بعض الجيبانيات الدموية والهيولي يبدو محبباً granulated cytoplasm مع وجود تجمع لمفي بؤري Lymphocytic focus في نسيج الكبد والمنطقة البابية portal areas ولوحظ وجود الخلايا اللمفية حول فروع الشريان الكبدي والوريد البابي (شكل 3).

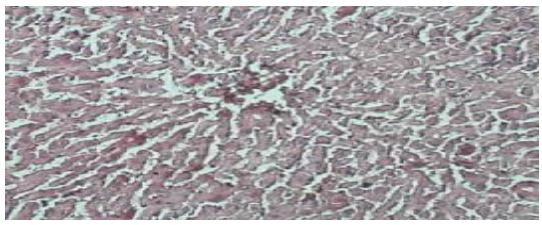
ولوحظ وجود تغيرات نسيجيه مرضيه على الخلايا الكبدية في نسيج كبد حيوانات المجموعة الرابعة و التي اضيف إلى غذائها تراكيز عند 1.250 ملغم/كغم عليقه حيث بدت معالم الخلايا غير مميزة ونوى الخلايا يبدو عليها علامات التغلظ Pyknosis وبعضها متكسر Karyohexsis بينما تظهر خلايا كبديه أخرى بدا خاليةمن النو اة بعد تحللها Karyolysis ، كما إن بعض الخلايا بدا عليها انتفاخ وظهرت بشكل بالونات Balloning ولها حدود واضحة ونوى كرويه كبيرة الحجم وهناك مناطق ظهر فيها في متن الكبد وجود خلايا بشكل حبال من خلايا ضامرة مع انويتها على جانبي الجيبانيات (شكل4،5).

كذلك لوحظ في عينات أخر ى للمجموعة نفسها حصول تغييرات خلوية مميزة تتمثل في اختفاء معالم الخلايا الكبدية ذات الشكل المتعدد الأضلاع وظهور اندماج بعضها مع البعض الآخر بكتلة واحدة تشبه عناقيد العنب مع زيادة في عدد الحبيبات الحمضية Eosinophilia granules المجوده في هيولي الخلايا الكبدية ويبدو العديد من نوى الخلايا متغلظاً او متكسرا او ويمكن تمييز الجيبانيات الدموية بشكل واضح مع ظهور خلايا كوفر في تجاويفها ،ولوحظ وجود كريات الدم الحمراء مع بعض الخلايا اللمفية في الأوردة المركزية (شكل 6 ،7) .

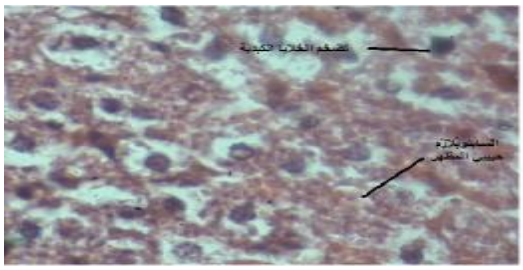
إما في حيوانات المجموعة الخامسة و المضاف إلى غذائهاتر كيز 2.5 ملغم/كغم عليقه، فقد بدا فيها تضخم الخلايا الكبدية بارزا في متن الكبد وحدود الخلايا واضحة بينما كانت هناك خلايا أخرى افتقدت إلى هذه الحدود مع انويتها وبدت ككتله واحدة لها بعض الأنوية المتكسرة ،ولوحظ أن العديد من الجيبانيات الدموية التي احتوت على كريات دم حمراء بكثرة وبشكل محتقن داخل تجاويفها Congested وبعض الجيبانيات الدموية التي أمكن تميزها احتوت على خلايا كوفر مفردة وفروع الأوعية الدموية قد احيطت بغمد من الخلايا اللمفية of Sheath lymphocytic aggregation (شكل 8) ، كذلك لوحظ اختفاء معالم وحدود الخلايا الكبدية في معظمها ،حيث بدت ككتلة غير متجانسة وليس لها أشكال مميزة ويكون هيولها ذو مظهر حبيبي Granular pattern حمضي الصبغة Esinophilic stain ،إما نوى الخلايا فظهر في معظمها متحلله Karyohexsis وبعضها يبدو متغلظاً Pycknotic ،وفي خلايا اخرى اختفت النوى تماما بشكل Karyolysis والجيبانيات الدموية واضحة ويلاحظ احتقان Corgested في الأوردة المركزية Central veins فكانت محتقنة Corgested (شكل 9).



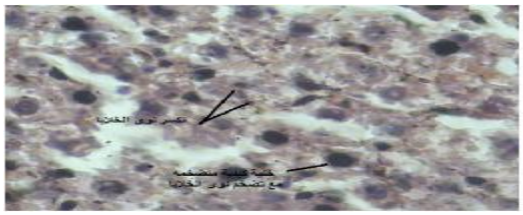
شكل(1) مقطع مستعرض في نسيج الكبد للجرذ المغذى على الأفلاتوكسين بتركيز 0.312 ملغم /كغم عليقه (قوة التكبير X20)



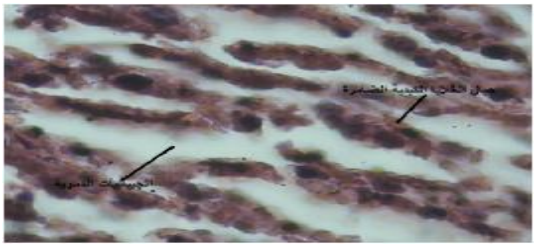
شكل(2) مقطع مستعرض في نسيج الكبد للجرذ في مجموعة السيطرة (قوة التكبير X10)



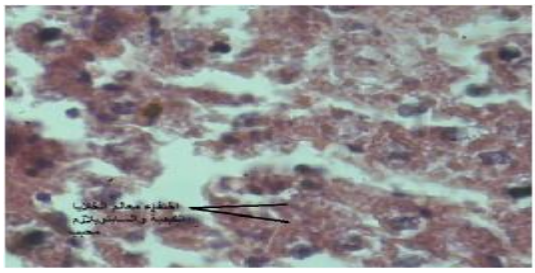
شكل(3) مقطع مستعرض في نسيج الكبد للجرذ المغذى على الأفلاتوكسين بتركيز 0.625 ملغم /كغم عليقه (قوة التكبير X40)



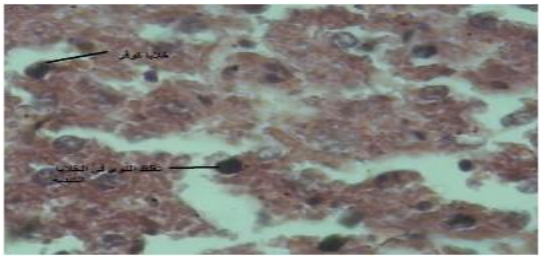
شكل(4) مقطع مستعرض في نسيج الكبد للجرذ المغذى على الأفلاتوكسين بتركيز 1.250 ملغم /كغم عليقه (قوة التكبير X40)



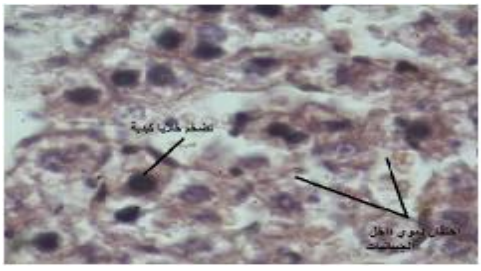
شكل(5) مقطع مستعرض في نسيج الكبد للجرذ المغذى على الأفلاتوكسين بتركيز 1.250 ملغم /كغم عليقه (قوة التكبير X40)



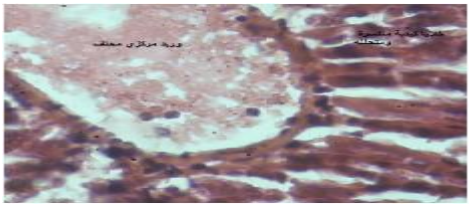
شكل(6) مقطع مستعرض في نسيج الكبد للجرذ المغذى على الأفلاتوكسين بتركيز 1.250 ملغم /كغم عليقه ملغم/كغم من سموم الأفلا (قوة التكبير X20)



شكل (7) مقطع مستعرض في نسيج الكبد للجرذ المغذى على الأفلاتوكسين بتركيز 1.250 ملغم /كغم عليقه (قوة التكبير X40)



شكل(8) مقطع مستعرض في نسيج الكبد للجرذ المغذى على الأفلاتوكسين بتركيز 2.5 ملغم /كغم عليقه (قوة التكبير X40)



شكل(9) مقطع مستعرض في نسيج الكبد للجرذ المغذى على الأفلاتوكسين بتركيز 2.5 ملغم /كغم عليقه (قوة التكبير20 X)

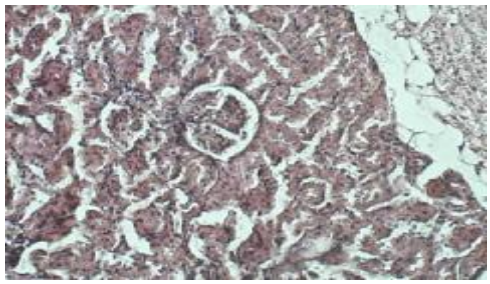
التأثير ات في الكلى

اوضح فحص المقاطع النسجية لكلى حيوانات المجموعة الثانية و المضاف لغذائها افلاتوكسين بتركيز 0.312 ملغم/كغم عليقه، بأن الكبيبات الكلوية الموجودة في قشرة الكلية كان معظمها طبيعيا" وعدد قليل منها قد حصل لها انكماش Shrinkage بصغر حجم الكبيبات داخل محفظة بومان Bowmans capsules وكبر حجم الحيز المحفظي Capsuler space ، وحدوث ظمور في الخلايا الظهارية المبطنة لعدد النبيبات الملتوية الدانية Proximal convoluted tubules لذا بدا التجويف اوسع من الحالة الطبيعية مع وضوح هيولي في خلايا بطانة النبيبات القاصية convoluted tubules Distal (شكل 10) ، مقارنة مع مجموعة السيطرة (شكل 11 ،12).

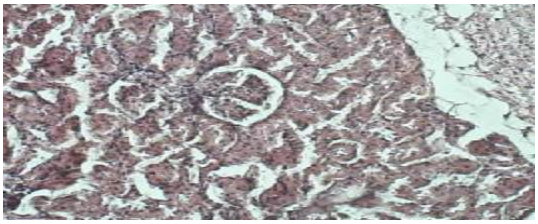
اما المقاطع النسجية لكلى حيوانات المجموعة الثالثة والمضاف لغذائها افلاتوكسين بتركيز 0.625 ملغم/كغم عليقة فقد لوحظ وجود عدد من الكبيبات الكلوية الطبيعية منكمشة مع ظهور حيز محفظي كبير حول هذه الكبيبات ،اما النبيبات الملتوية تبدو ضيقة التجاويف او مقفلة بارتفاع الخلايا الظهارية (شكل13). اما في انسجة حيوانات المجموعة الرابعة و المضاف لغذائها افلاتوكسين بتركيز 1.250 ملغم/كغم عليقة فقد لوحظ حصول انكماش جزئي في الكبيبات الكلوية Glomeruli مع وجود حيز محفظي واسع حولها Capsular space وهناك بعض النبيبات الكلويه الملفوفة الدانية والقاصية وقد حصل لها تلف او تحطم في ظهارتها Degradation of epithelia ويستدل علية من انسلاخ بعض التجاويف في الخلايا البينية ويبدو هناك نزف دموي بين النبيبات (شكل 14) ويلاحظ في لب القشرة عروات هنلي (الشدفات الدقيقة) مع وجود اعداد كبيرة من الاوعية الدموية الشعرية بينها وكذلك وجود تحطم Degenerated في عدد محدود من النبيبات الجامعة Collecting tubules الموجودة في لب الكلية (شكل15).

بينما مقاطع نسيج المجموعة الخامسة المغذاةبالتر كيز العالي2.5 ملغم/ كلغم عليقة،فقد و جد انه كبيبات كلوية ضامرة حيث تبدو بشكل كتلة من فص او فصين في وسط محفظة بومان (شكل 16) اما النبيبات الملتوية فقد ظهرت في بعض خلايا بطانتها فقدان انويتها وكانت تجاويف النبيبات غير منتظمة مع وجود تجمعات دموية كما لو حظ في لب الكلية وجود اعداد كثيرة من عروات هنلي (الشدفات الرقيقة) محاطة بأعداد من النبيبات الجامعة مع وجود انتشار لكريات الدم الحمراء خارج الأوعية الدموية (شكل 17). وفي عينات اخرى للمجموعة نفسها لوحظ ضمور شديد في العديد من الكبيبات الكلوية atrophy of glomeruli وظهرت الكبيبة بشكل نطاق واسع خال من اي مظهر خلوي او كبيبي وظهرت النبيبات الملتوية الدانية منخفضة البطانة الظهارية و تجويفها ممتلىء بالحطام الخلوي او الراشح الكبيبي، مع تحطم ظهارة النبيبات الجامعة Degradation epithelia (شكل 18).

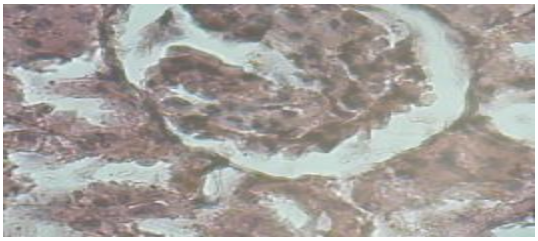
ان النتائج الحالية تؤكد ماأشارت اليه العديد من الأبحاث في تأثير الأفلاتوكسين الموجودة في عليقة الجرذان على الكبد والكلى إذ ظهرت تغيرا نسيجية حتى في التراكيز الواطئة ونلاحظ زيادة التأثير مع زيادة تركيز سموم الأفلا المتناولة في غذاء الجرذان [8 ، 9 ،10 ، 11] .



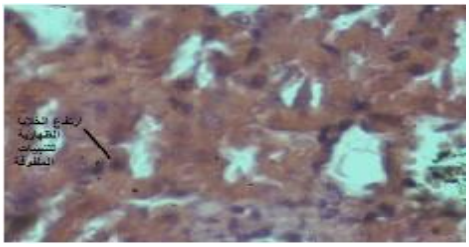
شكل(10) مقطع مستعرض في كلية الجرذ المغذى على الأفلاتوكسين بتركيز عند 0.312 ملغم/كغم .ملون H&E تكبير X 20



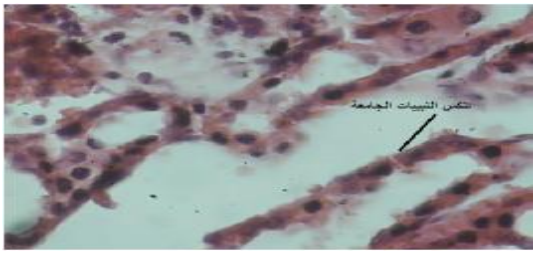
شكل(11) مقطع مستعرض في كلية الجرذ (مجموعة السيطرة) .ملون H&E تكبير X 10



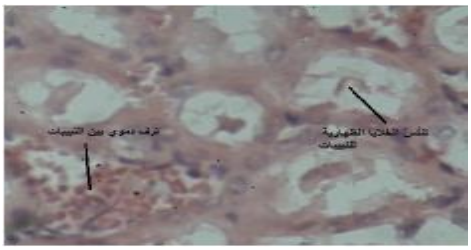
شكل(12) مقطع مستعرض في كلية الجرذ (مجموعة السيطرة) .ملون H&E تكبير X40



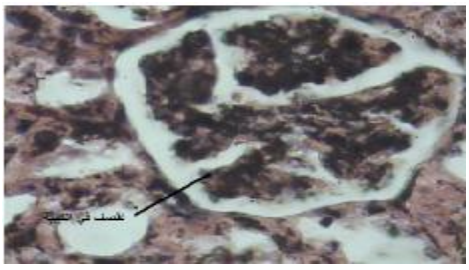
شكل(13) مقطع مستعرض في كلية الجرذ المغذى على الأفلاتوكسين بتركيز عند 0.625 ملغم/كغم .ملون H&E تكبير X 40



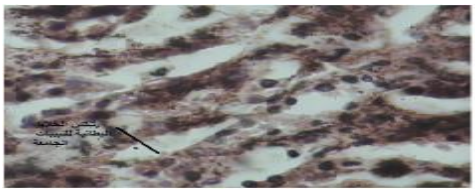
شكل(14) مقطع مستعرض في كلية الجرذ المغذى على الأفلاتوكسين بتركيز عند 1.250 ملغم/كغم .ملون H&E تكبير X 20



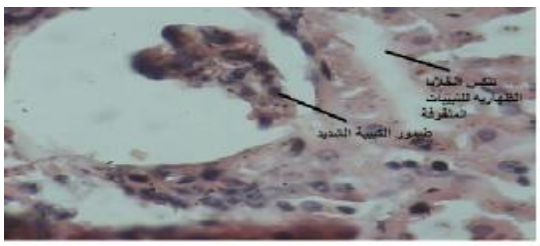
شكل(15) مقطع مستعرض في كلية الجرذ المغذى على الأفلاتوكسين بتركيز عند 1.250 ملغم/كغم .ملون H&E تكبير X 20



شكل(16) مقطع مستعرض في كلية الجرذ المغذى على الأفلاتوكسين بتركيز عند 1.250 ملغم/كغم .ملون H&E تكبير X 40



شكل(17) مقطع مستعرض في كلية الجرذ المغذى على الأفلاتوكسين بتركيز عند 2.5 ملغم/كغم .ملون H&E تكبير X 20



شكل(18) مقطع مستعرض في كلية الجرذ المغذى على الأفلاتوكسين بتركيز عند 2.5 ملغم/كغم .ملون H&E تكبير X 20

Reference

1- Bjeldanes, L. F. **(1983)**. Hazards in the food supply, Lead aflatoxins and mutagens produce by cooking. Nutrition update, edited by Jean Weiinger and Geoge M.B. New York.

2- Ngoako Z., Daoudo I.H, Kamga P.T., Mendi S., Mwangi M., Baandyopadhyay R. and Marasas W.F.O.(**2008**).Fungi and Mycotoxins associated with food commodities in Cameroon. Journal. Appli .Bio. Scie. Vol.6:164-168.

3- IARC. (International Agency for Research on cancar). **(2002)**. Aflatixins. In monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. pp. 9-13 IARC Scientific publication No. 82 : 548 – 556, IARC press. Lyon. France .

4- **Bennett, J**.W and M. Microbiol.**(2003)**. Rev. 16: 497-516 .Klich Mycotoxins. Clin.

5-Wagacha,J.M.and Muthomi,J.W.**2008**.Mycotoxin problem in Africa: current status ,implications to food safety and health and possible management strategies. Int. J.Food Microbiol.124(1):1-12.

6-Shotwell O L, C W Hessettine, R.D. Stubbiefield and W.G. Sorenson
Nabny J, Nesbitt B F A spectropotometric method of determiningthe aflatoxin Analysis.**1965**;90:155-160 .

7-Lee,G.Luna,H.T.(**1968**).Manual of Histologic of the Armed Forces Institute of Pathology

8-Eaton DI. And JD. Groopman (**1994)**.The Toxicology of aflatoxin:Human Health ,veterinary ,and Aaricultural significancesan Diego, C.A. Academic press,347-364.

9-Boudra,H.; Barnouin; J.;S. Dragacci and D.P. Morgavi**, (2007)**.Aflatoxin M1and Ochratoxin a in raw bulk milk from French dairy herds.J.Dairy Sci.,90:3197-3201.

10-Fung, F.; and RF. Clark (**2004)**. Health effects of mycotoxins atoxicological Overview. Toxicol clin Toxical., 42(2): 217-234.

11-Hussein, H. and J.M. Brasel**. (2001).** Toxicity, Metabolism and impact of mycotoxins on Human& animals.Toxicology,167-134.

Histological Changes on liver and kidney in rat fed on different concentrations of Aflatoxin

Rana Jalal Shaker,Karkiz Mohamed Thalij,Amen Salman Bdooy
Department of Biology , College of Education , Tikrit University
Department of Food Sci.College of Agriculture, Tikrit University

(Received: 20 / 3 / 2012 ---- Accepted: 14 / 11 / 2012)

Abstract

Aflatoxin poisons are the most dangerous toxins for human and animal health.The biological studies, showed that, giving afltoxin with the food of the experimental animals , There are different pathogenic effects take place . These effects include; some disorder with immune system , mutation, carcinogenic effects with different organs of the body especially the liver and kidney ,which considered the subjected organs for the toxins. Aflatoxin poisons were produced with gradient concentrations (0.312 ,0.625, 1.250 , 2.5 mg/kg of feed) .These concentrations mixed with food and feed to the animals for 21 days in different treatments. Then, the animals were killed, and histopathology of the tissue slices were made from liver and kidney . Physiological changes in the liver and kidney tissues were recorded .These changes ,represented a swollen of the liver cells with some bleeding ,and RBC aggregate in the liver tissue. However, the kidney tissues, hese changes are increased and become pathogenic especially with high levels of aflatoxin . Also, an extensive shrinkage noticed with the kidney`s glomeruli cells and the proximal convoluted tubules cells become degraded of epithelia. These cells were filled with degradation cells. Also , the filtrate of the glomeruli and Collecting tubes have allot of degraded of epithelia cells, and some of them become unconnected .