

Broyler Civcivlerde Aflatoksin B1'in Karaciğerin Vitamin A Depolaması Üzerine Etkisi

Berrin SALMANOĞLU

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 06110, Dışkapı, Ankara - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 26.07.2001

Özet: Bu çalışmada, aflatoksin B1 (AFB1) içeren yemle beslenen broyler civcivlerinde kan serumu ve karaciğerde vitamin A ve β -karotin düzeylerini saptamak ve AFB1'e karşı en hassas organ olan karaciğerin vitamin A depolama yeteneğini belirlemek amacı ile yapılmıştır.

Araştırmada 20 adet Ross genotipinden günlük civciv materyal olarak kullanılmış ve civcivler rastgele örnekleme metodu ile biri kontrol grubu ve her grupta beş civciv olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Kontrol ve I. gruptaki civcivler normal civciv yemi ile beslenirken II. ve III. gruptaki civcivler ise 4 ppm AFB1 içeren yemle beslenmişlerdir. Denemenin yedinci gününde I. ve III. grup civcivlere deri altı yolla 500.000 IU retinol palmitat verilmiştir. Deneme 21 gün devam etmiş ve denemenin sonunda serum ve karaciğer örnekleri toplanmıştır. Serum ve karaciğer örneklerinde retinol ve β -karotin düzeyleri, hekzan ekstraktının spektrofotometrik ölçümüne dayanan metoda göre belirlenmiştir. Elde edilen veriler Kruskal Wallis varyans analizi ile gruplar arası farklar da Duncan testi uygulanarak istatistikî yönden önem kontrolü yapılmıştır.

Serum β -karotin düzeyleri gruplarda kontrol grubu başta olmak üzere I., II. ve III. gruplarda sırasıyla $230 \pm 22,1$, $169,7 \pm 15,1$, $124,7 \pm 55,7$ ve $107,5 \pm 62,0$ $\mu\text{g/dl}$ olarak ölçülmüştür. Gruplar arası farklar istatistikî önemde çıkmıştır ($p < 0,01$). Serum retinol ve karaciğerdeki β -karotin düzeyleri açısından gruplar arası fark istatistikî yönden önemsizdir. Karaciğerdeki retinol miktarları bakımından ise gruplar arası farkların istatistikî yönünden yüksek derecede önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$).

Araştırma bulgularına göre AFB1 içeren yemin civcivlerin karaciğerlerinde vitamin A depolama yeteneğini ve serum β -karotin düzeylerini olumsuz yönde etkilediği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Aflatoksin, civciv, vitamin A, karaciğer, depolama

The Effect of Aflatoxin B1 on the Vitamin A Storage in the Livers of Broiler Chicks

Abstract: The effect of AFB1 in feed on the liver and serum vitamin A and β -carotene levels and the ability of the liver to store vitamin A in broiler chicks were investigated. Twenty day-old Ross broiler chicks were randomly allocated into 4 groups with 5 each in the control group, group I, group II, and group III. The chicks of the control group and group I were fed ad libitum on broiler chick growing feed. The chicks of group II and group III were fed ad libitum on feed with AFB1 (4 ppm/kg) feed. On the seventh day, vitamin A palmitate was administered subcutaneously at 500,000 IU to the chicks of group I and III. The experiment was continued for 21 days. On the twenty-first day, blood and liver samples were collected from the chicks. Serum and liver β -carotene and retinol levels were analysed spectrophotometrically using n-hexane extraction. The significant differences between the values obtained from the analyses were determined using Kruskal Wallis variance analysis. The differences between the groups were analysed using Duncan's test. Serum β -carotene levels in the control group, group I, II and III were $230 \pm 22,1$ $\mu\text{g/dl}$, $169,7 \pm 15,1$ $\mu\text{g/dl}$, $124,7 \pm 55,7$ $\mu\text{g/dl}$, and $107,5 \pm 62,0$ $\mu\text{g/dl}$ respectively. There were significant differences in the serum β -carotene levels between the groups ($p < 0,01$). There were no significant differences in serum retinol and liver β -carotene levels between the groups. Significant differences in the liver retinol levels were found between the groups ($p < 0,001$).

It was concluded that AFB1 in feed had an important effect on the ability of the liver to store vitamin A and on the levels of serum β -carotene.

Key Words: Aflatoxin, chicks, liver, vitamin A, storage

Giriş

Aflatoksikozis, tavukçuluk sektöründe karşılaşılan önemli hastalıklardan biridir. Tavuk yemleri, mantar üremesini sağlayan ortamlarda depo edildiğinde

Aspergillus falvus ve Aspergillus parasiticus tarafından aflatoksin üretilir. Yemlerle alınan aflatoksinin, karaciğerde sitokrom P₄₅₀ monooksijenaz enzim sistemi tarafından metabolize edilmesi sonucu açığa çıkan

metabolit aflatoksin B1 (AFB1) hepatotoksik, hepatokarsinojenik ve mutajenik etkilidir (1). AFB1 promutajen özelliğinden dolayı, önemli polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve önemli heterosiklik aminler gibi etkir. İn vivo olduğu kadar in vitro olarak yine ksenobiyotik enzim sistemi tarafından metabolize edilir (2). Genel anlamda sitokrom P₄₅₀ enzimleri karsinojenlerin metabolizmasında bioaktivasyon ve detoksifikasyonda önemli rol oynarlar. Fakat konjugasyon enzimleri tarafından katalize edilen reaksiyon basamakları sırasında yarı ömrü 1 saniye olan reaktif elektrofilik ara ürünler ortaya çıkar. AFB1 ve diğer metabolik ürünleri mutajenik etkiden sorumludur. Buna rağmen AFB1 metabolitlerinin hücresel yıkıma neden olan etki mekanizması tam olarak açıklık kazanmamıştır. Fakat lipid peroksidasyonuna yol açması, neden olduğu oksidatif yıkımda etkilidir (3). DNA tek zincirinde kırılmalara yol açması toksisitesi ve karsinojenik etkisini açıklamaktadır (4).

Her türün aflatoksin duyarlılığı farklıdır. Kanatlılarda yapılan çalışmalar özellikle karaciğerin en duyarlı organ olduğunu belirlemiştir (5). Aflatoksin karaciğer enzimlerini inhibe ederek hepatik lipidlerinin periferel dokulara taşınmasına engel olur (6). Lipojenik enzim aktivitelerinde azalma olmasına rağmen, karaciğerde yağlanma görülmesi, lipid transportunun azalması ile açıklanmaktadır (7). Aflatoksinin karaciğerde oluşturduğu histolojik değişikliklerin başında, karaciğer hücrelerinin membran ve çekirdeklerini kaybederek üç veya dört hücreli grupların oluşturduğu fokal yağ odakları gelir (8). Aflatoksikozisin karaciğerde bulunan makroskopik bulguları ise, sarı renkli görünümü yanında nodüler ve ekimotik hemorajilerdir (9). Retinol, AFB1 gibi karaciğerde aynı mikrozomal enzimlerin substratı olarak etkir. Substratın yerine geçen retinolün AFB1 metabolizmasını dolayısı ile toksik etkisini değiştirmesi mümkün olmaktadır (10).

Bu araştırmanın amacı, düşük dozda (4 ppm) AFB1 bulunan yemle 21 gün boyunca beslenen broyler cıvcıvlerinde, serum ve karaciğer örneklerinde vitamin A ve β-karotin düzeyleri ile karaciğerin vitamin A depolama kapasitesi üzerine etkisini araştırmaktır.

Materyal ve Metot

Çalışmada "kullanma melezi ticari tavuk" tipinde Ross genotipinden 20 broyler cıvciv kullanıldı. Bir günlük cıvcıvler her grupta 5 cıvciv olmak üzere kontrol, grup I,

II ve III olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubu ve grup I'deki cıvcıvler normal cıvciv yemi ile *ad libitum* olarak beslendi. Grup II ve III'deki cıvcıvlerin yemlerine ise 4 ppm/kg yem olacak şekilde AFB1 ilave edildi. Grup I ve grup III'deki cıvcıvlere denemenin 7. gününde 500.000 IU retinol palmitat (Sigma Chemical Company, USA) deri altı enjekte edildi. Üç hafta sonunda kan ve karaciğerde vitamin A ve β-karotin düzeyleri belirlendi. Kan serumu ilk 4 saat içinde ayrılarak her iki parametre ölçümleri hemen yapıldı (11). Karaciğer örnekleri -20 °C dondurularak analiz yapılincaya kadar saklandı. Kan ve karaciğer retinol ve β-karotin analizi doku ekstraksiyon aşaması dışında aynıdır. Metodun prensibi, hezkanda ekstrakte edilmiş β-karotin ve retinolün sırasıyla 453 ve 325 nm'de maksimum ışık absorpsiyonu esasına dayanır. Karaciğer ve serumda ölçülen miktarlar, Kruskal Wallis varyans analizi ile, gruplar arası farklarda Duncan testi yapılarak istatistik olarak değerlendirildi (12).

Bulgular

Kontrol ve deneme grup I, II, III serum gruplarına ait serum ve karaciğer vitamin A ve β-karotin düzeyleri Tablo 1'de verilmiştir. Kontrol, grup I, II, III serum β-karotin düzeyleri sırasıyla; 230,0±22,1, 169,7±15,1, 124,7±55,7, 107,5±62,0 µg/dl'dir. Kontrolle karşılaştırıldığında tüm grupların serum karoten düzeylerinde önemli bir azalma belirlenmiştir. Serum retinol düzeyleri kontrol, grup I, II ve III'de sırasıyla; 28,4±2,8, 24,2±2,6, 20,6±2,2, 18,3±3,7 µg/dl'dir. İstatik anlamda önemli olmamakla birlikte AFB1 verilen gruplardaki cıvcıvlerin serum retinol düzeylerinde düşme gözlenmiştir.

Karaciğer β-karotin düzeyleri kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla 1,08±0,09, 1,25±0,13, 0,86±0,11 ve 1,03±0,32 µg/g'dir. Gruplar arası istatistik karşılaştırmada herhangi bir fark bulunamamıştır. Bununla birlikte, AFB1 verilen gruplarda β-karotin düzeyleri kontrol ve vitamin A verilen gruplardan daha düşük düzeydedir. Karaciğer retinol düzeyleri kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla 28,9±2,9, 124,4±6,9, 18,4±1,5, 113,7±3,0 µg/g'dir. 500.000 IU vitamin A palmitat verilen grup I ve grup III'de (vitamin A'ya ilaveten 4 ppm AFB1 verilen gruplar) retinolün karaciğerde depolandığı görülmüştür.

	Serum b-Karotin µg/dl	Serum Retinol µg/dl	Karaciğer b-karotin µg/g	Karaciğer Retinol µg/g
Kontrol n:5	230±22,1* a	28,4±2,8	1,08±0,09	28,9±2,9** a
Grup I 500,000 IU n:5	169,7±15,1* b	24,2±2,6	1,25±0,13	124,4±6,9** b
Grup II AFB1 n:5	124,7±5,5* c	20,6±2,2	0,86±0,11	18,4±1,5** c
GrupIII AFB1 500,000 IU n:5	107,5±6,2* d	18,3±3,7	1,03±0,32	113,7±3,0** d

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan gruplar arası farklar önemli (* p<0,01, ** p<0,001)

Tablo1. Gruplarda Serum ve Karaciğerde β-Karotin ve Retinol Düzeyleri

Tartışma

Yapılan çalışmalar, deneysel olarak geliştirilen kanatlı aflatoksikozunda ilk üç haftada karaciğerin hedef doku olduğunu göstermiştir (5). 4 ppm aflatoksin verilen deneme grubunda ilave vitamin A verildiğinde serum vitamin A düzeyi etkilenmezken, karaciğer vitamin A düzeyinde p<0,01 önemlilik derecesinde artışlar belirlenmesi (Tablo 1) vitamin A'nın karaciğerde depolandığını göstermektedir. Vitamin A ve karotenoidlerin parenteral olarak verilmesinin AFB1'in hepatotoksik etkisini azalttığı bildirilmektedir (4,13). 500 000 IU ilave vitamin A verilen (Grup I) deneme civcivlerinin, karaciğer retinol düzeyi 124,4±6,9 µg/g, kontrol grubunda ölçülen 28,9±2,9 µg/g'a göre yüksek bulunmuştur. AFB1 verilen deneme grubunda (Grup II) ise karaciğer retinol düzeyi 18,4±1,5 µg/g iken ilave retinol verilen gruptaki (Grup III) civcivlerin karaciğer retinol düzeyi 113,7±3,0 µg/g'a yükselmiştir. Her iki grup arasındaki fark yapılan Duncan testinde p<0,001 derecesinde önemli bulunmuştur.

Bu sonuçlara göre, vitamin A uygulanmasından iki hafta sonra ölçümler yapıldığında, vitamin A verilen grupların (Grup I ve III) AFB1 tüketilmesine rağmen iki hafta içinde serumdan vitamin A'nın alınarak karaciğerde depolandığını gösterir, fakat kontrol grubuna göre depolanan vitamin A miktarı p<0,001 derecesinde düşüktür. Bu sonuç, yapılan başka bir araştırmalarla (14,15) ile uyum göstermektedir. Bu çalışmalarda yapılan elektron mikroskopik incelemelerde yağlanmaya bağlı olarak hepatositlerin granüllü endoplazma

retikulumlarının paralel düzeninde bozulmalara ve bunlara ait ribozom sayılarında azalmalara sıklıkla rastlanılmıştır. Bu durum birçok araştırmacı tarafından protein sentezindeki azalmalara bağlanmıştır (5,13). Dolayısıyla vitamin A'nın hücre içinde ve dışında taşınmasını sağlayan "Retinol Bağlayan Protein" sentezinde de azalmalar görülecektir. AFB1 ile beslenen grupta parenteral verilen vitamin A'nın kontrol grubuna göre neden daha düşük oranda depo edildiği protein sentezindeki azalma ile açıklanabilir. Yüksek düzeylerde AFB1 ile beslenen kanatlılarda karaciğer yağ dejenerasyonlarının büyük boyutlarda olduğu bildirilmiştir (5). Karaciğerin histolojik incelemelerinde, perisinüzoidal hepatositlerde rastlanılan lipid damlacıklarının çoğunun retinil esterleri (15), hepatositlerdeki lipid damlacıklarının ise trigliseridler olduğu (16) saptanmıştır. Düşük dozda olmasına rağmen toksik sınırlarda AFB1 verilen civcivlerin karaciğer ışık mikroskopik incelenmesinde, hepatositlerde önemli miktarlara oluşan yağ damlacıklarının birleşerek daha büyüdükleri, hücre duvarları ve çekirdeklerini kaybettikleri bildirilmiştir. Aynı grubun elektron mikroskopik bulgularında, hepatositlerin bazılarında lipid damlacıkları büyük boyutlara ulaşırken bazı hücrelerde önemsiz boyutlarda, bir kısmı ise toksinden hiç etkilenmemiştir (17).

Ölçülen karaciğer retinol düzeyleri istatistik olarak değerlendirildiğinde, düşük dozda AFB1'in, kanatlı karaciğerinin en hassas olduğu 21 günlük süre içinde parenteral olarak verilen vitamin A'nın bu organda depolanmasında önemli düzeyde yetersizliklere neden olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Kaynaklar

1. Guengerich, F.P.: Forging the links between metabolism and carcinogenesis. *Mutant Res.* 2001; 408 (3): 195-209.
2. Waters, M.D., Stack, H.F., Jackson, M.A., Brockman, H.E., De Flora, S.: Activity profiles of antimutagens: In vitro and in vivo data. *Mutant Res.* 1996; 350 (1): 109-129.
3. Rastogi, R., Srivastava, A.K., Rastogi, A.K.: Long term effect of aflatoxin B1 and lipid peroxidation in rat liver and kidney: effect of picroliv and silymarin. *Phytother. Res.* 2001; 15 (4): 307-310.
4. Gradlet, W.L., Astrog, P., Le Bon, A.M., Berges, R., Suschetet, M.: Modulation of aflatoxin B1 carcinogenicity genotoxicity and metabolism in rat liver by dietary carotinoids: evidence for a protective effect of CYP1A inducers. *Cancer Lett.* 1997; 114 (1-2): 221-223.
5. Huff, V.E., Kubena, L.E., Harvey, R.B., Corrier, D.E., Mollenhauer, H.H.: Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. *Poult. Sci.* 1986; 65: 1891-1899.
6. Smith, J.W., Hamilton, P.B.: Aflotoxicosis in broiler chicken. *Poult. Sci.* 1970; 49: 207-215.
7. Bryden, W.L., Cumming, R.B., Balnove, D.: The influence of vitamin A status on the response of chickens to aflatoxin B1 and changes in liver lipid metabolism associated with aflatoxicosis. *Br. J. Nutr.* 1979; 41: 529-540.
8. Mohiuddin, S.M., Reddy, M.V., Reddy, M.M., Ramakrishna, K.: Studies on phagocytic activity and haematological changes in aflotoxicosis in poultry. *Indian Vet. J.* 1986; 63: 442-445.
9. Moorthy, A.S., Mahendar, M., Rao, P.R.: Hepatology in experimental aflatoxicosis in poultry. *Indian Vet. J.* 1985; 63: 442-445.
10. Yu, M.W., Zhang, Y.J., Blaner, W.S., Santella, M.: Influence of vitamins A, C, E and β -carotene on aflatoxin B1 binding to DNA in woodchuck hepatocytes. *Cancer* 1994; 1 (73): 596-604.
11. Suzuki, J.I., Katoh, N.A.: A simple and cheap method for measuring serum vitamin A in cattle using only a spectrophotometer. *Jpn. J. Vet. Sci.* 1990; 52 (6): 1281-1283.
12. Sümbüloğlu, K., Sümbüloğlu, V.: Biyoistatistik. Hacettepe Yayınları 1993.
13. Hilton, H.M., Donald, H.C., William, E.H., Leon, F.K., Roger, B.H., Robert, E.D.: Ultrastructure of hepatic and renal lesions in chickens fed aflatoxin. *Am. J. Vet. Res.* 1989; 50: 771-777.
14. Mahipal, S.K., Mahajan, N.K.: Toxicity of aflatoxin B1 in broiler chicks and its reduction by activated charcoal. *Vet. Res.* 1994; 54: 37-40.
15. Hendriks, H.F.J., Verhoofstadt, W., Brauwer, A., Leeuw, A.M., Knook, D.L.: Persinusoidal fat storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. *Exper. Cell Res.* 1985; 160: 139-149.
16. Merkle, J.W., Maxwell, R.J., Phillips, J.G., Huff, W.E.: Hepatic fatty acid profiles in aflatoxin-exposed broiler chickens. *Poult. Sci.* 1987; 66: 59-67.
17. Ergün, L.: Aflatoksin B1 verilmiş civcivlerin karaciğer parenşimi üzerinde ışık-flüresan- ve elektron mikroskopik çalışmalar. *Ankara Üniv. Vet. Fak Derg.* 2000; 46 (1): 105-114.