

ВЛИЯНИЕ НА АФЛАТОКСИН В₁ ВЪРХУ ФУНКЦИЯТА НА ЧЕРНИЯ ДРОБ И ПАНКРЕАСА ПРИ ПАТЕТА МЮЛАРИ СЛЕД ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ПРЕДИЗВИКАНА АФЛАТОКСИКОЗА В₁

ИВАН ВЪЛЧЕВ

Тракийски университет, Ветеринарномедицински факултет - Стара Загора

Микотоксините са вторични токсични метаболити, продуцирани от нишковидни гъбички, които са вредни за здравето на животните и хората и причиняват значителни икономически загуби в животновъдството (Hussein and Brasel, 2001; Wu and Munkvold, 2008; Zhang and Caupert, 2012). Микотоксините се установяват като контаминанти на хранителните продукти навсякъде по света и притежават способността да предизвикват редица вредни ефекти върху здравето на животните и хората. Тези съединения представляват голяма група от токсини, продуцирани от плесенни гъбички, които се установяват като контаминанти при естествени условия във фуражите, произведени от зърнени и маслодайни култури (Council for Agricultural Science and Technology, 1989). По-особена група от микотоксини, притежаваща токсичен, мутагенен и канцерогенен потенциал, са афлатоксините (AF). Плесенните гъбички от род *Aspergillus* са сред най-често срещаните токсигенни гъбички, които засягат хранителните вериги при хората и животните. Те контаминират редица основни земеделски култури като царевица, сорго, фъстъци, памук, други маслодайни семена, орехи, ориз, подправки, люти чушки (Calvo et al, 2004; Qazi and Fayyaz, 2006).

Афлатоксините са дифуранокумаринови деривати, продуцирани по поликетиден път. Те са високотоксични и канцерогенни микотоксини, продуцирани от плесенните гъбички, принадлежащи към род *Aspergillus* (*A. flavus* и *A. parasiticus*). Други афлатоксини, продуциращи гъбички са: *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus ochraceoroseus*, *Aspergillus nomius* и *Aspergillus pseudotamari*, но те се установяват по-рядко (Bennett and Klich, 2003). Различните видове

птици, особено пилетата, гъсетата, патетата и пуйчетата са чувствителни към токсичното действие на афлатоксините. Токсичните ефекти на афлатоксините се локализируют предимно в черния дроб и се характеризират с некротизиране на чернодробните клетки, жълтеница и кръвоизливи. Хронично протичащата афлатоксикоза при тези видове птици се характеризира с по-ниско живо тегло, прираст, намалено усвояване на фураж, повишена конверсия на фураж, намалена носливост, повишена чувствителност към инфекциозни заболявания (Dalvi, 1986; Zao et al., 2010; Yildirim et al., 2011), промени в хематологичните и биохимичните показатели (Kececi et al., 1998; Ledoux et al., 1999). Основните афлатоксини, които се установяват във фуражите за птици и хранителните продукти от животински произход, са афлатоксин В₁, В₂, G₁, G₂, М₁ и М₂ (Shotwell et al., 1991; Monbaliu et al., 2010). Афлатоксин, М₁ и М₂ се установяват предимно в млякото (AFM₁ се установява в малки количества и в яйца) под формата на метаболити на В₁ и В₂. Измежду различните видове афлатоксини афлатоксин В₁ (AFB₁) е най-често срещаният в житните растения, брашното от маслодайните култури, сушените плодове и подправките и в същото време най-токсичен (Yoshizawa et al., 1991; Diaz, 2005). Афлатоксикозата е основен проблем в птицевъдния отрасъл навсякъде по света (Shoyinka et al., 1987). Условията на околната среда, при които се благоприятства растежът на плесенните гъбички от род *Aspergillus* и продуцирането на афлатоксини, са топлината и влагата. Оптималните условия на околната среда при продуциране на афлатоксини са температура между 24°C и 28°C (D'Mello, 2003), влажност на семената по-малка от 17.5%

(Ominski et al., 1994) и влажност на околната среда от 62% (Diener et al., 1987). Допустимите количества на AFB₁ и общия афлатоксин (AFT) (B₁ + G₁ + B₂ + G₂) според законодателството на Европейския съюз в селскостопанските продукти е съответно - 2–12 µg/kg за AFB₁, 4–15 µg/kg - за AFT и 0.05 µg/kg - за AFM₁ в мляко, въпреки това пределно допустими концентрации в други животински продукти не са препоръчани (European Commission, 2010). AFB₁ се трансформира в токсични метаболити в черния дроб, като AFB₁-8,9-epoxide е основният и най-токсичен метаболит, образуващ ковалентна връзка с ДНК, РНК и протеините, в резултат на което се наблюдават канцерогенни ефекти (Nomura et al., 2011).

Афлатоксините намаляват активността на панкреатичните ензими, участващи в разграждането на въглехидратите, протеините, липидите и нуклеиновите киселини при птиците и в същото време намаляват кръвните стойности на общия белтък, холестерола и уреята (Dewegowda and Murthy, 2005). Въпреки че храненето с фуражи, контаминирани с афлатоксини, в повечето случаи предизвиква морфологични промени в черния дроб и бъбреците, те също така увреждат нормалната хистологична структура на панкреатичните ацинарни клетки. След експериментално възпроизведена афлатоксикоza при пьдпъдъци (Chang and Hamilton, 1982) и пилета (Bailey et al., 1998; Kubena et al., 1993a,b; 1998; McKenzie et al., 1998; Ledoux et al., 1999) е установено увеличаване размера на панкреаса, кръвоизливи и застойни явления при пьдпъдъци (Jakhar and Sadana, 2004), вакуолна дистрофия и дегенеративни промени при патици (Agag, 2004). Съгласно законодателството на европейската икономическа общност (ЕС) и американската агенция по храни и лекарства (FDA) общото количество на афлатоксини във фуражите за птици не трябва да надвишава 20 ppb (ЕЕС, 1991).

Описани са различни методи (физични, химични, биологични) за детоксикация на контаминирани с афлатоксини фуражи (Jouany, 2007). Адсорбент-базираните методи са най-често използваните за минимизиране на ток-

сичността на контаминирани с афлатоксини фуражи при домашните птици (Ibrahim et al., 2000; Parlat et al., 2001; Daković et al., 2005). Редица микосорбенти, като бентонити (Rosa et al., 2001), зеолити (Miazzo et al., 2000), хидратиран калциево-алуминиев силикат (Scheideler, 1993), дрожди (*Saccharomyces cerevisiae*) (Celik et al., 2001) и активен въглен (Jindal et al., 1994) са били използвани успешно при детоксикацията на контаминирани с AFB₁ фуражи (Ramos and Hernandez, 1997).

Целта на настоящото проучване бе да се направи преценка на токсичните ефекти на AFB₁ върху мофологичните промени в черния дроб и панкреаса и свързаните с това промени в биохимичните показатели при патета мюлари. Едновременно с това друга наша цел бе да се определи възможността за ефективно облекчаване или превенция на токсичните ефекти на AFB₁ чрез прибавяне към фуража на микосорбента Mycotox NG (Ceva Sante Animale, France).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

За реализиране на целта беше осъществен експеримент с 80 броя десетдневни патета мюлари от женски пол. Патетата бяха разделени на четири групи, по 20 броя в група, разпределени по равно в 2 подгрупи.

Експериментът беше проведен по следната схема:

I група – контролна. Мюларите от контролната група бяха хранени с балансирана фуражна смеска, съобразена с възрастта им, производство на фуражен завод Зоохранивест–Стара Загора. Те бяха хранени с гранулирани стартер, гроуер и финишер;

II група – експериментална, в която мюларите получаваха със стандартната фуражна смеска 0.5 mg/kg фураж афлатоксин B₁;

III група – експериментална, в която мюларите получаваха със стандартната фуражна смеска 0.8 mg/kg фураж афлатоксин B₁;

IV група – експериментална, в която мюларите получаваха със стандартната фуражна смеска 0.5 mg/kg фураж афлатоксин B₁ и 2g/kg фураж Mycotox NG (Ceva Sante Animale, France).

Използваният в експеримента афлатоксин B₁ е продуциран от *Aspergillus flavus* (99% чистота) и беше закупен от Sigma-Aldrich, Germany. При опитните групи мюлари, за по-добро размесване на афлатоксин B₁, фуражът бе смлян. Осигурени бяха оптимални микроклиматични параметри, еднакви за всички групи. В началото на експеримента температурата на въздуха в жизнената зона на мюларите беше 35°C и до 15-тия ден се понижаваше с 1°C на ден; до 28-мия ден беше 20°C, а след това +18°C при относителна влажност на въздуха – 60-75% (Наредба №44/2006 г). Продължителността на светлинния ден беше 24 h от началото до края експеримента. Патета от контролната и опитната група бяха разположени в различни секции с площ по 4 m² в едно и също помещение. Отделните секции бяха застлани с чисти и сухи стърготини с дебелина на слоя 5 cm. През първата седмица фронтът на хранене беше 1 cm, а след това 10 cm. Кръвните проби бяха получени от *v. metatarsalis medialis* на 21-ия и 42-ия ден след началото на експеримента с помощта на стерилни контейнери, съдържащи хепарин (FL medical, Italy) за определяне ензимната активност на аланин аминотрансфераза (ALT), аспартат аминотрансфераза (AST), алкална фосфатаза (AP), гама глутамилтрансфераза (γ GT), лактат дехидрогеназа (LDH) количеството на общия белтък, албумина, кръвната захар, холестерола, триглицеридите, α -амилазата, липазата и инсулина. В рамките на 30 min след получаване на кръвта кръвните проби бяха центрофугирани в продължение на 10 min при 1500 оборота при 4°C. Непосредствено след това плазмите бяха отделени и бяха съхранявани при температура -20°C до момента на анализа. Изследването на AST, ALT, AP, LDH, γ GT общия белтък, албумина, кръвната захар, холестерола, триглицеридите, α -амилазата и липазата беше извършено с помощта на автоматичен биохимичен анализатор BS-120, Mindray, China. Стойностите на инсулина бяха определени посредством автоматичен биохимичен анализатор Elecsys 2010, Rohsh, електrolуминисцентен метод (ECLIA).

След приключване на експеримента патета-

та от контролната и експерименталните групи бяха евтаназирани посредством цервикална дислокация. Материалите от черния дроб и панкреаса за хистологично изследване бяха фиксирани в 10% формалин. Пробите включихме в парафин при използването на алкохолна редица. Получените блокчета срязихме на микротом „Leica“-model RM 2235, с дебелина на среза 5 μ m. Срезове отцветихме с хематоксилин и еозин.

Вариационностатистическата обработка беше осъществена с еднофакторен модел на Anova, а статистическата достоверност беше определена с Tukey-Kramer test.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Химични изследвания на кръв. Данните, представени в табл. 1, показват ефекта на AFB₁ самостоятелно или в комбинация с Mucotox Ng върху върху плазмените стойности на общия белтък, албумина, глюкозата, холестерола и триглицеридите на 21-ия и 42-ия ден от началото на експеримента. На 21-ия ден беше установено, че при патетата, получавали самостоятелно с фуража нарастващи дози AFB₁ (0.5 и 0.8 mg/kg фураж), II и III група стойностите на общия белтък са съответно – 32.6 \pm 1.36 g/l и 24.2 \pm 1.42 g/l (22.39% и 42.39%) и албумина съответно – 19.6 \pm 1.04 g/l и 15.5 \pm 0.92 g/l (24.62% и 40.39%) ($P < 0.001$) са достоверно по-ниски в сравнение с тези при контролната група (42.0 \pm 1.09 g/l и 26.0 \pm 1.39 g/l) ($P < 0.001$). На 42-ия ден наблюдаваните промени се задълбочават, като стойностите на общия белтък бяха – 25.0 \pm 1.62 g/l и 19.0 \pm 1.57 g/l (37.82% и 52.74%) ($P < 0.001$) в сравнение с контролната група (40.2 \pm 1.22 g/l) ($P < 0.001$), а на албумина съответно – 13.4 \pm 0.94 g/l и 10.0 \pm 0.69 (44.4 и 58.51%) ($P < 0.001$) в сравнение с контролната група – 24.1 \pm 1.10 g/l ($P < 0.001$). Промените в стойностите на общия белтък и албумина при IV група, получавала с фуража 0.5 mg/kg фураж AFB₁ и 2 g/kg фураж микосорбент, се редуцират достоверно на 21-ия (11.43% и 22.7%) и 42-ия ден (12.94% и 19.09%) ($P < 0.05$ – $P < 0.01$). От анализа на промените в плазмена-

Таблица 1. Влияние на афлатоксин В₁ (AFB₁) самостоятелно и в комбинация с Mucotox NG върху плазмената концентрация на общия белтък, албумина, глюкозата, холестерола и триглицеридите при патега мюлари

Table 1. Effect of aflatoxin B₁ (AFB₁) alone or combined with Mucotox NG on blood plasma total protein, albumin, glucose, cholesterol and triglycerides concentrations in mulard ducklings

Група	Общ белтък, g/l		Албумин, g/l		Глюкоза, mmol/l		Холестерол, mmol/l		Триглицериди, mmol/l	
	21-ви ден/21 Day	42-ри ден/42 Day	21-ви ден/21Day	42-ри ден/42Day	21-ви ден/21Day	42-ри ден/42Day	21-ви ден/21Day	42-ри ден/42Day	21-ви ден/21Day	42-ри ден/42Day
I	42.0±1.09	40.2±1.22	26.0±1.39	24.1±1.10	19.0±0.73	17.27±0.74	3.87±0.13	3.71±0.11	1.38±0.05	1.36±0.03
II	32.6±1.36 ^{1c}	25.0±1.62 ^{1c}	19.6±1.04 ^{1c}	13.4±0.94 ^{1c}	16.04±0.35 ^{1c}	11.71±0.37 ^{1c}	3.15±0.07 ^{1c}	2.85±0.06 ^{1c}	1.03±0.03 ^{1c}	0.88±0.05 ^{1c}
III	24.2±1.42 ^{1c,2c}	19.0±1.57 ^{1c,2a}	15.5±0.92 ^{1c,2a}	10.0±0.69 ^{1c,2a}	13.55±0.67 ^{1c,2a}	9.86±0.40 ^{1c}	2.76±0.07 ^{1c,2a}	2.41±0.08 ^{1c,2b}	0.79±0.03 ^{1c,2c}	0.62±0.05 ^{1c}
IV	37.2±0.71 ^{1a,2a,3c}	35.0±0.84 ^{1a,2c,3c}	20.1±0.65 ^{1b,3a}	19.5±0.65 ^{1b,2c,3c}	15.58±0.46 ^{1b,3a}	14.71±0.52 ^{1a,2b,3c}	3.5±0.03 ^{1a,2a,3c}	3.38±0.04 ^{1a,2a,3c}	1.2±0.02 ^{1a,2a,3c}	1.13±0.03 ^{1b,2b,3c}

Резултатите са представени като средни стойности (mean) ± стандартна грешка (SEM); n=20 патега във всяка група, ^aP<0.05; ^bP<0.01; ^cP<0.001; 1 – в сравнение с контролната група; 2 – в сравнение с първа опитна група; 3 – в сравнение с втора опитна група

та концентрация на глюкозата се установява, че стойностите й достоверно намаляват на 21-ия ден. Измерените стойности бяха съответно – 16.04±0.35 mmol/l при II опитна група (15.58%) и съответно с – 13.55±0.67 mmol/l при III опитна група (28.69%) (P<0.001) в сравнение с контролната група. На 42-ия ден наблюдаваните промени бяха много по-забележими в сравнение с контролната група (P<0.001). Измерените стойности бяха – 11.71± 0.37 mmol/l (32.2%) при II група, а при III група 9.86±0.40 mmol/l (42.91%). При IV група вредните ефекти AFB₁ върху стойностите на глюкозата бяха отчасти редуцирани (P<0.05 – P<0.01). На 21-ия ден стойностите й бяха 15.58±0.46 mmol/l (18%) в сравнение с контролната група 19.0±0.73 mmol/l и 14.71±0.52 mmol/l (14.83%) на 42-ия ден в сравнение с контролната група 17.27±0.74 mmol/l.

Както е видно от данните в табл. 1, стойностите на холестерола и триглицеридите са достоверно по-ниски и през двата периода на проследяване при II и III група, получавали самостоятелно с фуража AFB₁ в нарастващи дози 0.5 или 0.8 mg/kg фураж (P<0.001). Стойностите на холестерола и триглицеридите при II и III група в сравнение с контролната група (3.87±0.03 mmol/l и 1.38±0.05 mmol/l) на 21-ия ден бяха – 3.15±0.07 mmol/l (18.61%) и 2.76±0.07 mmol/l (28.69%), а на триглицеридите – 1.03±0.03 mmol/l (25.37%) и 0.79±0.03 mmol/l (42.76%) (P<0.001). На 42-ия ден промените се задълбочават, като отчетените стойности бяха 2.85±0.06 mmol/l (23.19%) и 2.41±0.08 mmol/l (35.05%) за холестерола, а за триглицеридите – 0.88±0.05 mmol/l (35.3%) и 0.62±0.05 mmol/l (54.42%) (P<0.001) в сравнение с контролната група (3.71±0.11 mmol/l и 1.36±0.03 mmol/l). Прибавянето на 2 g/kg фураж микосорбент към фуража на IV група, съдържащ 0.5 mg/kg AFB₁, облекчава токсичните ефекти на AFB₁ върху стойностите на холестерола, триглицеридите на 21-ия ден съответно с 9.57% и 13.05%, а на 42-ия ден с 8.9% и 16.92% (P<0.05 – P<0.01).

Промените в плазмената активност на аминокиселините (аспартат аминокиселина, аланин аминокиселина, глутамин)

трансферазата), както и активността на лактат дехидрогеназата и алкалната фосфатаза са отразени в табл. 2. От анализа на промените в активността на аминотрансферазите се установява, че активността им при II и III група на 21-ия ден нараства. Измерените стойности на аминотрансферазите са съответно 62.9±1.96 U/L и 81.8±2.12 U/L за аспартат аминотрансферазата; 27.0±1.21 U/L и 40.4±1.65 U/L за аланин аминотрансферазата; 26.1±1.13 U/L и 32.7±1.83 U/L за гама глутамилтрансферазата в сравнение със стойностите при контролната група (44.7±1.14 U/L; 15.5±0.74 U/L и 15.8±0.90 U/L). Активността на аминотрансферазите е с 40.71% и 82.99% по-висока при AST, 74.19% и 160.64% при ALT и с 65.18% и 106.96% при γ GT в сравнение с контролната група ($P<0.001$). На 42-ия ден наблюдаваните промени се задълбочават като активността на AST се повишава на 79.0±2.29 U/L и 108.9±3.03 U/L; на ALT на 31.7±0.89 U/L и 49.8±2.30 U/L и γ GT на 37.8±2.46 U/L и 48.0±1.71 U/L спрямо тези при контролната група (48.1±2.85 U/L; 16.4±0.60 U/L и 17.1±1.00 U/L). Повишението е съответно с 64.24% и 126.40% при AST; с 93.29% и 203.65% при ALT и 121.05 и 180.70% при γ GT спрямо контролната група (48.1±2.85 U/L, 16.4±0.60 U/L и 17.1±1.00 U/L) ($P<0.001$). Аналогични бяха и промените в активността на лактат дехидрогеназата и алкалната фосфатаза. На 21-ия ден активността на лактат дехидрогеназата бе съответно – 356.5±11.55 U/L и 440.0±21.89 U/L, а на алкалната фосфатаза – 100.0±2.58 U/L и 122.3±4.00 U/L в сравнение с контролната група (270.0±11.42 U/L и 76.0±3.41 U/L). През втория период на проследяване (42-ия ден) активността на LDH II и III група бе 470.0±15.96 U/L и 527.9±26.98 U/L, а на AP бе 117.3±3.30 U/L и 147.2±5.15 U/L в сравнение с контролната група (281.0±11.19 U/L и 79.0±4.04 U/L). Повишението в стойностите на LDH на с 21-ия ден е с 32.03% и 62.96%, а на 42-ия ден е с 67.25% и 87.86%, докато повишението в активността на AP е с 31.57% и 60.92 % на 21-ия ден и с 48.48% и 86.32% на 42-ия ден. Добавянето на микосорбент (2 g/kg фураж Mucotox NG) 0.5 mg/kg AFB₁ редуцира достоверно токсичните

Таблица 2. Влияние на афлатоксин B₁ (AFB₁) самостоятелно и в комбинация с Mucotox NG върху плазмената активността на AST, ALT, γ GT, LDH и AP при патета молари

Table 2. Effect of aflatoxin B₁ (AFB₁) alone or combined with Mucotox NG on blood plasma AST, ALT, γ GT, LDH and AP in mulard ducklings

Група	AST, U/L		ALT, U/L		γ GT, U/L		LDH, U/L		AP, U/L	
	Ден/Day 21	Ден/Day 42	Ден/Day 21	Ден/Day 42	Ден/Day 21	Ден/Day 42	Ден/Day 21	Ден/Day 42	Ден/Day 21	Ден/Day 42
I	44.7±1.14	48.1±2.85	15.5±0.74	16.4±0.60	15.8±0.90	17.1±1.00	270.0±11.42	281.0±11.19	76.0±3.41	79.0±4.01
II	62.9±1.96 ^c	79.0±2.29 ^c	27.0±1.21 ^{1c}	31.7±0.89 ^{1c}	26.1±1.13 ^{1c}	37.8±2.46 ^{1c}	356.5±11.55 ^{1b}	470.0±15.96 ^{1c}	100.0±2.58 ^{1c}	117.3±3.30 ^{1c}
III	81.8±2.12 ^{1c,2c}	108.9±3.03 ^{1c,2c}	40.4±1.65 ^{1c,2c}	49.8±2.30 ^{1c,2c}	32.7±1.83 ^{1c,2a}	48.0±1.71 ^{1c,2b}	440.0±21.89 ^{1c,2b}	527.9±26.98 ^{1c,2b}	122.3±4.00 ^{1c,2c}	147.2±5.15 ^{1c,2c}
IV	51.9±1.03 ^{1a,2c,3c}	62.3±1.46 ^{1c,2c,3c}	20.9±0.91 ^{1a,2b,3c}	23.9±1.42 ^{1c,2c,3c}	20.6±0.90 ^{1a,2c,3c}	27.1±1.81 ^{1b,2b,3c}	328.0±13.06 ^{1a,3c}	381.2±12.96 ^{1b,2b,3c}	87.9±1.34 ^{1a,2a,3c}	98.4±3.27 ^{1a,2a,3c}

Резултатите са представени като средни стойности (mean) ± стандартна грешка (SEM); n=20 патета във всяка група; ^aP<0.05; ^bP<0.01; ^cP<0.001; 1 – в сравнение с контролната група; 2 – в сравнение с I опитна група; 3 – в сравнение с II опитна група

ефекти на AFB₁ върху изследваните показатели ($P < 0.05$ – $P < 0.01$). Прибавянето на 2 g/kg фураж Mycotox NG към стандартната фуражна смеска на II група не предизвиква достоверни промени в стойностите на изследваните биохимични показатели ($P > 0.05$).

В табл. 3. са представени промените в стойностите на α -амилазата, липазата и инсулина при контролната група патета и тези, получавали с комбинираната фуражна смеска AFB₁, самостоятелно или в комбинация с изпитвания микосорбент. Стойностите на панкреатичните ензими (α -амилаза и липаза) бяха статистически достоверно по-ниски ($P < 0.001$) при патетата, третирани самостоятелно посредством фуражната смеска с AFB₁ (II и III група) и през двата периода на проследяване (21-ия и 42-ия ден). На 21-ия ден стойностите на α -амилазата бяха съответно 461±11.60 U/L и 400±12.66 U/L (11.18% и 22.93%), а на липазата съответно – 28.3±2.79 U/L и 23.7±3.74 U/L (26.88% и 38.76%) в сравнение с контролната група (519±39.01 U/L и 38.7±4.29 U/L) ($P < 0.001$). На 42-ия ден наблюдаваните промени бяха по-силно изразени. Измерените стойности на α -амилазата бяха 418±17.09 U/L и 360±19.06 U/L (20.84% и 31.82%) ($P < 0.001$), а на липазата 24.6±2.95 U/L

и 19.8±1.93 U/L (32.61% и 45.76%) ($P < 0.001$) в сравнение с контролната група (528±28.51 U/L и 36.5±4.42 U/L). Добавянето към фуража на патетата от IV група, контаминиран с 0.5 mg/kg AFB₁ на 2 g/kg фураж на Mycotox NG редуцира достоверно ($P < 0.05$) токсичните ефекти на изпитвания микотоксин върху изследваните ензими. Измерените стойности на α -амилазата при патета от IV група на 21-ия и 42-ия ден бяха съответно 488±10.09 U/L и 498±26.79 U/L, а на липазата съответно – 33.2±3.85 U/L и 31.9±4.38 U/L. Наблюдаваното понижение при α -амилазата бе редуцирано съответно до 5.98% и 5.69%, а за липазата съответно до 14.22% и 12.61%. Стойностите на инсулина (μ IU/mL) при експерименталните групи са недостоверно по-високи и през двата периода на проследяване в сравнение с контролната група ($P > 0.05$).

Патохистологични изследвания. Наблюдаваните патохистологични промени в черния дроб на патетата, третирани с 0.5 mg/kg фураж AFB₁, се изразяваха в силно разширение на капиллярите, перикапиларен едем и активиране на Купферовите клетки. При някои от патетата се наблюдаваха и кръвоизливи. В хепатоцитите бяха установени зърнесто разпадане и вакуолизация на цитоплазмата, кариорексис, кариопикноза и на-

Таблица 3. Влияние на афлатоксин B₁ (AFB₁) самостоятелно и в комбинация с Mycotox NG върху плазмената концентрация на α -амилазата, липазата и инсулина при патета мюлари
Table 3. Effect of aflatoxin B₁ (AFB₁) administered independently or with Mycotox NG on blood plasma α -amylase, lipase and insulin in mulard ducks

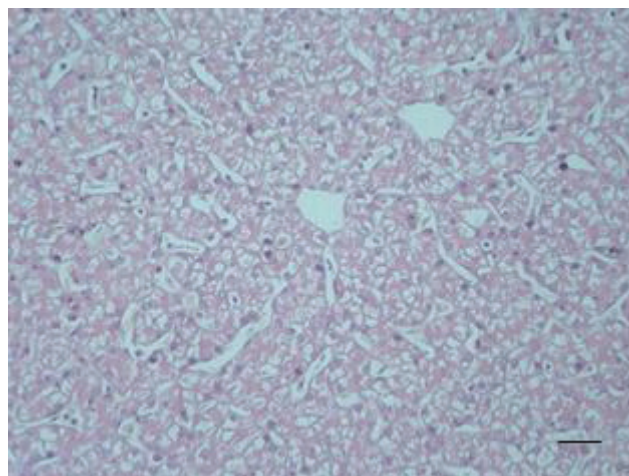
Групи	α -амилаза U/L		Липаза U/L		Инсулин μ IU/mL	
	21-ви ден/ 21 Day	42-ри ден/ 42 Day	21-ви ден/ 21 Day	42-ри ден/ 42 Day	21-ви ден/ 21 Day	42-ри ден/ 42 Day
I	519±39.01	528±28.51	38.7±4.29	36.5±4.42	2.82±0.10	3.10±0.17
II	461±11.60 ^{1c}	418±17.09 ^{1c}	28.3±2.79 ^{1c}	24.6±2.95 ^{1c}	3.35±0.20	3.56±0.15
III	400±12.66 ^{1c,2c}	360±19.06 ^{1c,2c}	23.7±3.74 ^{1c,2a}	19.8±1.93 ^{1c,2a}	3.42±0.23	3.62±0.15
IV	488±10.09 ^{1a,2a,3c}	498±26.79 ^{1a,2c,3c}	33.2±3.85 ^{1a,2a,3c}	31.9±4.38 ^{1a,2c,3c}	2.98±0.20	3.42±0.12

Резултатите са представени като средни стойности (mean) ± стандартна грешка (SEM); n=20 патета във всяка група; ^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$; ^c $P < 0.001$; 1 – в сравнение с контролната група; 2 – в сравнение с първа опитна група; 3 – в сравнение с втора опитна група



Фиг. 1. Кръвоизливи в паренхима на черен дроб при патета, третирани с 0.5 mg/kg фураж AFB₁. X/E. Увл. 20 µm.

Fig. 1. Haemorrhages in the liver parenchyma in ducklings treated with AFB₁ at 0.5 mg/kg feed. H/E. Bar=20 µm.



Фиг. 2. Силна вакуолизация и зърнесто разпадане на цитоплазмата в хепатоцитите на черен дроб при патета, третирани с 0.5 mg/kg фураж AFB₁. X/E. Увл. 20 µm.

Fig. 2. Strong vacuolisation and granular cytoplasmic degradation in liver hepatocytes of ducklings treated with AFB₁ at 0.5 mg/kg feed. H/E. Bar= 20 µm.

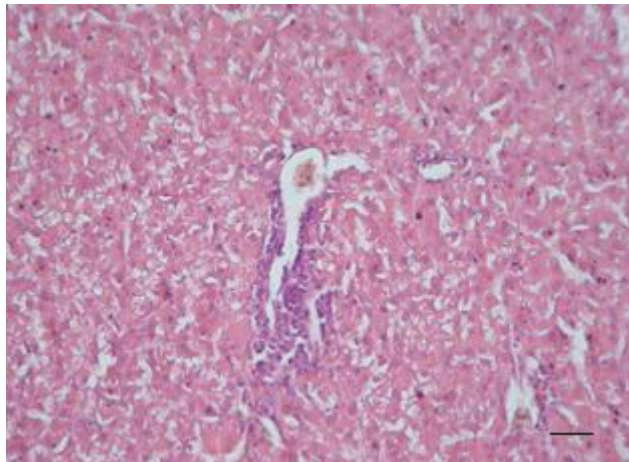
чална форма на мастна дистрофия. (фиг. 1 и 2).

При патетата, третирани с 0.8 mg/kg фураж AFB₁, дистрофичните промени в черния дроб бяха засилени по интензитет, като преобладаваше мастната дистрофия. Наблюдаваха се и периваскуларни мононуклеарни инфилтрати (фиг. 3). На места се срещаха и малки ареактивни некротични огнища и жлъчни тромби (фиг. 4). Жлъчните каналчета бяха с хиперплазиран епител.

При патетата, третирани с 0.5 mg/kg фураж AFB₁ и 2 g/kg фураж Mucotox NG, в чер-

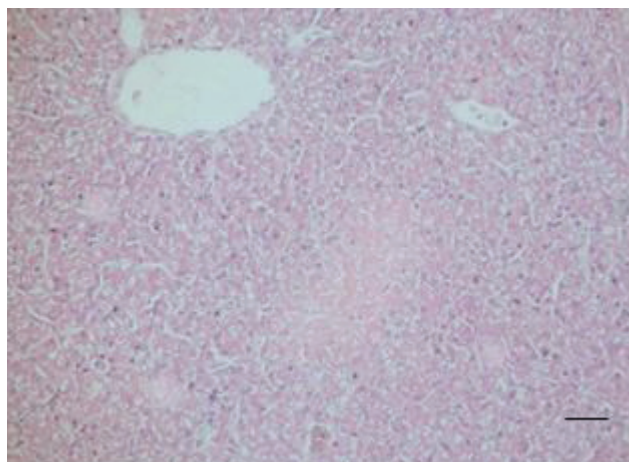
ния дроб се наблюдаваха слаби до средни по сила дистрофични промени в хепатоцитите – мътно набъбване със зърнеста дистрофия и по-рядко мастна дистрофия (фиг. 5). Патологоанатомични и патохистологични промени в черния дроб на патетата от контролната група не бяха установени.

При патетата, третирани с 0.5 mg/kg фураж AFB₁, в панкреаса наблюдавахме силно разширени капиляри и интерлобуларен оток. Панкреатичните ацинарни клетки показваха



Фиг. 3. Периваскуларни мононуклеарни инфилтрати в паренхима на черен дроб при патета, трети-
рани с 0.8 mg/kg фураж AFB₁. X/E. Увл. 20 μm.

Fig. 3. Perivascular mononuclear infiltrations in liver parenchyma ducklings treated with AFB₁ at 0.8 mg/
kg feed. H/E. Bar=20 μm.



Фиг. 4. Ареактивни некрози и жлъчни тромби в паренхима на хепатоцитите на черен дроб при па-
тета, третиращи с 0.8 mg/kg фураж AFB₁. X/E. Увл. 20 μm.

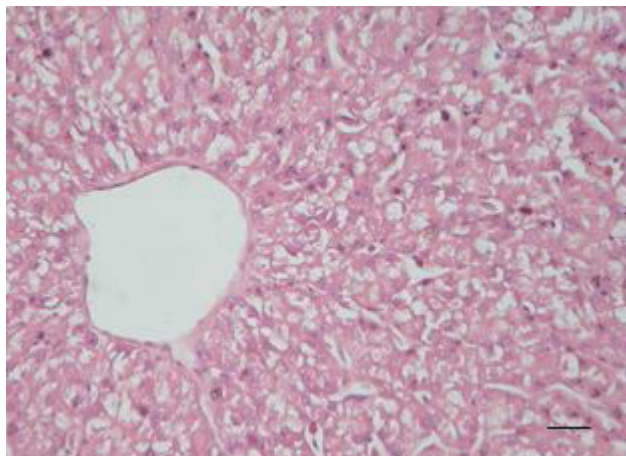
Fig. 4. Areactive necrosis and biliary thrombi in the parenchyma of hepatocytes in ducklings treated with
AFB₁ at 0.8 mg/kg feed. H/E. Bar=20 μm.

признаци на дезинтеграция, с начална степен на дезорганизация на жлезните ацини. В клетките се наблюдаваше зърнесто разпадане и вакуолизация на цитоплазмата, а ядрата на повечето клетки бяха с кариорексис и кариопикноза, като започват да се забелязват и клетки с лизирани ядра (фиг. 6).

При патетата, третиращи с 0.8 mg/kg фураж AFB₁, дистрофичните промени в панкреаса бяха засилени по интензитет. Наред с разширените и препълнени с кръв капилляри се наблюдаваха и масови кръвоизливи. Интерлобуларният оток

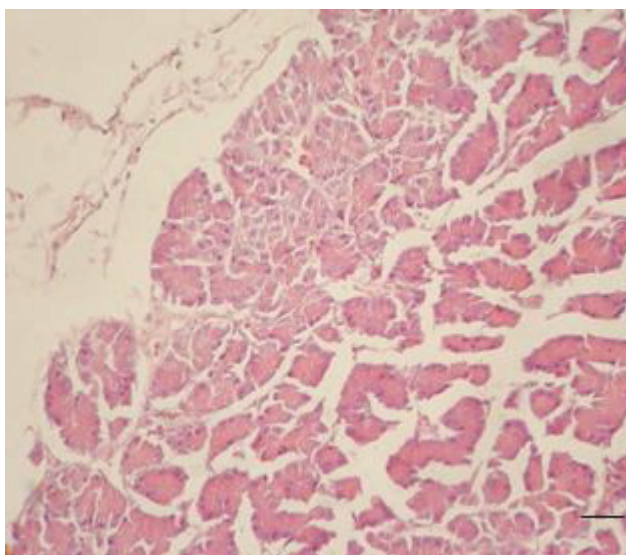
беше засилен и бе наблюдава пълна дезорганизация на жлезните ацини, некробиотични участъци и инфилтрация с мононуклеарни клетки (фиг. 7).

При патетата, третиращи с 0.5 mg/kg фураж AFB₁ и Mucotox NG, дистрофичните промени в клетките на панкреаса бяха значително по слаби в сравнение с патетата от групите, третиращи с 0.5 ppm AFB₁ и с 0.8 ppm AFB₁. Намален интензитетът на интерлобуларния оток, степента на дезинтеграция на ацинарните клетки бе незначителна, не се наблюдаваха кръвоизливи, а само



Фиг. 5. Зърнеста и слаба мастна дистрофия, с активиране на капилярния ендотел в хепатоцитите на патета, третирани с 0.5 mg/kg фураж AFB₁ и 2g/kg фураж Mycotox NG. X/E. Увл. 15 μm.

Fig. 5. Granular and mild fatty dystrophy with activation of capillary endothelium in hepatocytes of ducklings treated with AFB₁ at 0.5 mg/kg feed and 2g/kg feed Mycotox NG. H/E. Bar= 15 μm.



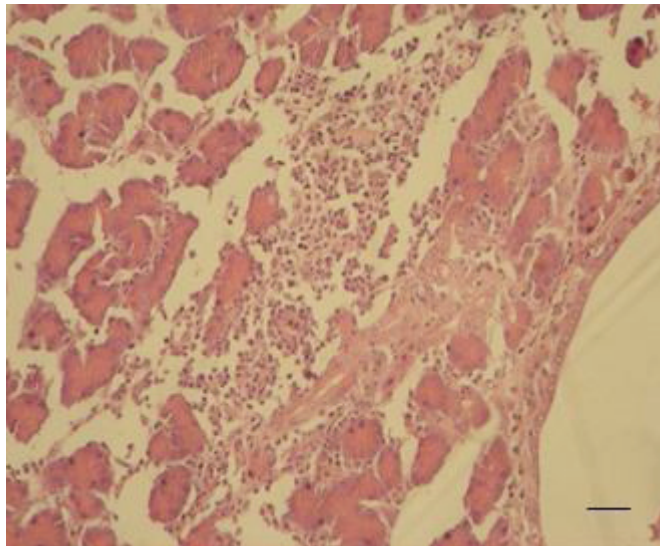
Фиг. 6. Панкреас при патета, третирани с 0.5 ppm AFB₁. Зърнесто разпадане и вакуолизация на цитоплазмата на ацинарните клетки. X/E. Увл. 20 μm.

Fig. 6. Pancreas in mulard ducks treated with 0.5 mg/kg feed AFB₁. Granular disintegration and vacuolation of the cytoplasm of acinar cells. H/E. Bar 20 μm.

хиперемия на кръвоносните съдове (фиг.8).

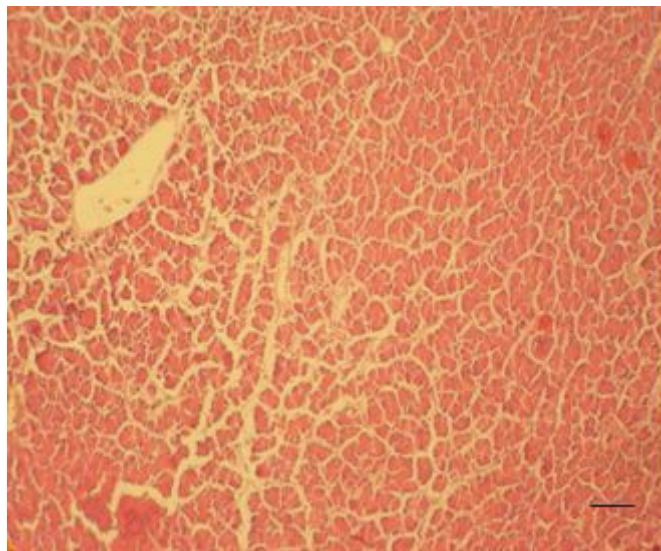
В настоящото проучване се установи, че афлатоксин В₁ предизвиква достоверни промени в плазмените нива на изследваните ензими. В клиничен аспект серумните нива на AST, AP, γ GT, LDH и ALT са биомаркери, характеризиращи чернодробната функция. Те са локализиращи в цитоплазмата и митохондриите на хепатоцитите и са указание за тежестта на струк-

турните увреждания в черния дроб (El-Agamy, 2000; El-Nekeety et al., 2001; Abdel-Wahhab et al., 2002; Aravind et al., 2003). Повишаване активността на трансминазите (AST, γ GT и ALT) е указание за освобождаването им от хепатоцитите вследствие на тяхното увреждане (повишена пропускливост на клетъчните мембрани, клетъчна некроза или на автолитичното разпадане на хепатоцитите) (Awad et



Фиг. 7. Панкреас при патета, третирани с 0,8 ppm AFB₁. Мононуклеарни инфилтрати в екзокринните участъци на панкреаса. Х/Е. Увл. 20 µm.

Fig. 7. Pancreas in mulard ducks treated with 0.8 mg/kg feed AFB₁. Mononuclear infiltrations in exocrine pancreatic areas. H/E. Bar 20 µm.



Фиг. 8. Панкреас при патетата, третирани с 0,5 ppm AFB₁ и Mycotox NG. Хиперемия на кръвоносните съдове и незначителен по степен интерлобуларен оток. Х/Е. Увл. 20 µm.

Fig. 8. Pancreas in mulard ducks treated with 0.5 mg/kg feed AFB₁ and Mycotox NG. Blood vessel hyperaemia and insignificant interlobular swelling. H/E. Bar 20 µm.

al., 1998; Recknagel et al., 1989; Gaskill et al., 2005). Фосфатазите, включително и алкалната фосфатаза (AP), играят важна роля в детоксикацията, метаболизма и биосинтеза на енергийни макромолекули необходими за различни жизнено важни функции. Подобно на трансаминазите повишаването на активността на AP

е резултат от повишената пропускливост на плазмените мембрани и некроза на хепатоцитите и бъбречните епителни клетки (Rahman et al., 2000). Аналогични промени са установени и в други проучвания при пилета и плъхове, получавали различни количества афлатоксини (Kececi et al., 1998; Raju and Devegowda,

2000; **Aravind et al.**, 2003; **Yener et al.**, 2009; **El-Agamy**, 2010). **Lesson et al.**, (1995) съобщава, че основният метаболит на AFB₁ – 8,9 епоксид метаболита се свързва посредством ковалентна връзка с ДНК и протеините, механизъм чрез който се променят редица ензимни процеси като гликонеогенеза, цикъла на Кребс или синтеза на мастни киселини. Серумните нива на LDH са съвкупност от изоензими с различен произход. От клинична гледна точка би било необходимо да се разграничат различните под-типове LDH (**Cardinet III**, 1989). Повишената активност на LDH се разглежда като указание за чернодробно и сърдечно увреждане. При птиците високи ензимни нива се установяват в черния дроб, бъбреците и сърцето (**Campbell and Coles**, 1989). Повишаване на активността на γ -GT е наблюдавана при пилета бройлери, получавали за храна естествено контаминирани фуражи с афлатоксини и това вероятно се дължи на хепатоцитната дегенерация и последващото резорбиране на ензима в кръвта, както и на хиперплазия на жлъчните каналчета (**Afzali and Devegowda**, 1999; **Yildirim et al.**, 2011).

Понижената концентрация на глюкоза в кръвта се дължи на понижения прием на храна и/или на понижена активност на ензимите, участващи при усвояване на въглехидратите (**Zhao et al.**, 2010).

Метаболитните нарушения при афлатоксикозата при птиците се характеризират с инхибиране на протеиновия синтез и последващо намаляване концентрацията на плазмения протеин и албумин (**Raju and Devegowda**, 2000; **Denli et al.**, 2005; **Bintvihok and Kositcharoenkul**, 2006; **Shi et al.**, 2006; **Safameher et al.**, 2008; **Denli et al.**, 2009; **Zhao et al.**, 2010). Афлатоксин В₁ претърпява метаболитна трансформация в черния дроб посредством чернодробната цитохром Р450 до реактивен 8,9-epoxide, съединение което е в състояние да се свързва с протеините и ДНК (**Eaton et al.**, 1994). Афлатоксините инхибират белтъчния синтез, като се свързват с ДНК, РНК и протеините, инхибират синтеза на ДНК и активността на ДНК зависимата РНК полимераза (**Cullen et al.**, 1994; **Mohamed and Mohamed**, 2009) дегранулират ендоплазмения

ретикулум, механизми чрез които се предизвикват промени в структурата на редица тъкани (черен дроб, бъбреци, скелетна мускулатура, сърце, панкреас) (**Wangikar et al.**, 2005; **Mohammed and Metwally**, 2009; **Sharma et al.**, 2011).

Афлатоксините са хепатотоксични за всички видове гръбначни животни и причиняват мастна дистрофия, дистрофични и некротични промени в хепатоцитите (**Miazzo et al.**, 2000; **Rosa et al.**, 2001; **Valdivia et al.**, 2001; **Riley et al.**, 2005; **Ortattali et al.**, 2005; **Mohamed and Mohamed**, 2009; **Zao et al.**, 2010; **Yildirim et al.**, 2011). Наблюдаваните дистрофични и некротични промени в черния дроб при афлатоксикозите може би се дължат на увреждането на основни клетъчни макромолекули (липиди, протеини и ДНК). Тези увреждания са резултат от оксидативния стрес, причинен от афлатоксините, механизъм, чрез който се провокират оксидативни нарушения в ДНК и пероксидация на липидите (**Mohamed and Mohamed**, 2009; **Saif et al.**, 2003). От друга страна, натрупването на калций в хепатоцитите предизвиква митохондриална дисфункция и намалено образуване на аденозинтрифосфат водещи до морфологични нарушения в структурата на черния дроб (**Fatemi et al.**, 2006).

Достоверно по-ниските стойности на холестерола и триглицеридите са резултат от нарушен чернодробен метаболизъм, резултат от хепатоцелуларните увреждания (**Sakhare et al.**, 2007). Нарушеният липиден метаболизъм при афлатоксикозата се приема като причина за намаленото освобождаване на холестерол и триглицериди от черния дроб, което би обяснило намалените стойности на тези показатели в кръвта (**Kubena et al.**, 1993a; **McKenzie et al.**, 1998; **Safameher et al.**, 2008).

Панкреасът е важен орган, който с помощта на своите ензими и хормони участва в усвояването на въглехидратите, протеините и липидите. Всяко нарушение във функцията на този орган пряко може да повлияе качеството на живот и продуктивните показатели на животните (**Simsek et al.**, 2007). В допълнение на икономическите загуби при животните, причи-

нени вследствие храненето с контаминирани с ниски количества афлатоксини фуражи е възможно да се наблюдават тератогенни ефекти при хора след консумацията на месо и яйца от животни, изложени на вредното действие тези токсини (**Sawhney et al.**, 1973), имunosупресивни ефекти при птици (**Agag**, 2004) и повишена чувствителност към паразитни, бактериални и вирусни заболявания (**Pier.**, 1981). Едно от най-важните усложнения при кокошки, хранени с фураж, контаминиран с афлатоксини, е неефективното усвояване на липидите и стеатореята в резултат от намалената активност на липазата (**Matur et al.**, 2010). В настоящото проучване активността на α -амилазата и липазата намалява при патетата, хранени с фураж, съдържащ нарастващи количества афлатоксин B_1 в сравнение с контролната група и тази, получавала с фуража микосорбент. Използването на някои природни глини като каолин (**Al-Jubory**, 2000) и някои растения като джинджифил (**Abd El-Haleem et al.**, 2011) са в състояние да адсорбират афлатоксините и да окажат превантивен ефект върху функцията на панкреаса. Резултатите от настоящото проучване показват, че използването на микосорбент е в състояние да подобри функцията на панкреаса. **Osborne and Hamilton** (1981) установяват понижение в активността на липазата при пилета бройлери, получавали с фуража високи дози афлатоксин. При консумацията от животните на фуражи, контаминирани с афлатоксини, органът, мишена за токсичното действие, е черният дроб, но ясно изразени промени се установяват и в панкреатичните ацинарни клетки (**Simsek, et al.**, 2007).

Намалената активност на панкреатичните храносмилателни ензими (α -амилаза и липаза), наблюдавана в настоящото проучване, е в съответствие с резултатите на други автори, получени при пилета бройлери с експериментално възпроизведена афлатоксикоза (**Balachandran and Balachandran**, 1988; **Al-Jubory**, 2000). Наблюдаваният недостиг на панкреатични храносмилателни ензими, от една страна, е резултат от намалена абсорбция на хранителни вещества. От друга, този недостиг на панкреатични ферменти вероятно е резултат от дистрофични-

те промени в жлезните ацини.

Дегенеративни и некротични процеси в ацинарните клетки на панкреаса са наблюдавани при прасета, третирани със сублетална доза Т-2 токсин (0.6 mg/kg живо тегло), приложен интравенозно във ушната вена (**Pang et al.**, 1986). При пилета, третирани посредством фуража с 0.5 mg/kg Т-2 токсин е наблюдавана инфилтрация от мононуклеарни клетки, вакуолна дегенерация и намаляване на секреторните гранули (**Krishnamoorthy et al.**, 2007).

Нарушение в екзокринната функция на панкреаса е наблюдавана при пьдпъдъци, получавали с фуража 2.5 или 5.0 mg/kg общ афлатоксин АF в продължение на три седмици (**Simsek et al.**, 2007). При светлинномикроскопското изследване на панкреаса са наблюдавани вакуолна дистрофия и мононуклеарни инфилтрати в екзокринните участъци на панкреаса при групата, получавала с фуража 2.5 mg/kg АF. В сравнение с нея при птиците от групата, третирани с фураж, съдържащ 5.0 mg/kg АF, са били установени по-тежки увреждания (некротични огнища).

ИЗВОДИ

Резултатите от настоящото проучване показват, че изпитаните концентрации АFB₁, включени към комбинираната фуражна смеска при патета мюлари, повлияват неблагоприятно чернодробната функция, характеризираща се с повишаване на ензимната активност на AST, ALT, LDH, γ GT и AP. Едновременно с това изпитаните дози афлатоксин B_1 предизвикват намаляване на плазмената концентрация на общия белтък, албумина, кръвната захар, триглицеридите, холестерола, α -амилазата и липазата.

Нарастващите дози АFB₁ (0.5 или 0.8 mg/kg фураж) предизвикват характерни за афлатоксикозата хистологични промени в черния дроб и панкреаса). В условията на настоящото проучване добавянето на 0.2% (2 g/kg фураж) Mucotox NG към дажбата, съдържаща 0.5 mg/kg АFB₁, е в състояние ефективно да облекчи тежестта на промените в стойностите на проследените химични показатели и да намали тежестта на хистологичните лезии, свързани с афлатоксикозата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Наредба №44/20.04.2006 г. за ветеринарно-медицинските изисквания към животновъдните обекти, ДВ 41 Приложение № 9/II, стр.61-62.
2. **Abd El-Haleem, M. R., A. M. Dalia**, 2011. The effects of experimental aflatoxicosis on the pancreas of adult male albino rats and the role of ginger supplementation: a histological and biochemical study. *Egyptian Journal of Histology*, 34, 3, 423-435.
3. **Abdel-Wahhab, M. A., S. A. Nada, F. A. Khalil**, 2002. Physiological and toxicological responses in rats fed aflatoxincontaminated diet with or without sorbent materials. *Animal Feed Science and Technology*, 97, 209–219.
4. **Afzali, N., G. Devegowda**, 1999. Ability of modified mannanoligosaccharide to counteract aflatoxicosis in broiler breeder hens. *Poultry Science*, 78, (Supl. 1), 228. (Abstr.).
5. **Agag, B. I.**, 2004. Mycotoxins in foods and feeds : Aflatoxins. *Association of Universal Bulletin of Environmental Research*, 7, 1, 173-191.
6. **Al-Jubory, K. M. T.**, 2000. The effect of kaolin on pancreatic digestive enzymes during aflatoxicosis in broiler chicks. *Journal Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 13, 1,: 15-20.
7. **Aravind, K. L., V. S. Patil, G. Devegowda, B. Umakantha, S. P. Ganpule**, 2003. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis with naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poultry Science*, 82, 571–576.
8. **Awad, M. E., M. S. Abdel-Rahman, S. A. Hassan**, 1998. Acrylamide toxicity in isolated at hepatocytes. *Toxicology In Vitro* 12, 699–704.
9. **Bailey, R. H., L. F. Kubena, R. B. Harvey, S. A. Buckiey, G. E. Rottinghaus**, 1998. Efficacy of various inorganic sorbents to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. *Poultry Science*, 77, 11, 1623–1630.
10. **Balachandran, C., R. Ramarkrishnan**, 1988. Influence of dietary aflatoxin on certain serum enzyme levels in broiler chickens. *Mycopathologia*, 101, 2, 65-7.
11. **Bennett, J. W., M. Klich**, 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 3, 497-516.
12. **Bintvihok, A., S. Kositcharoenkul**, 2006. Effect of dietary calcium propionate on performance, hepatic enzyme activities and aflatoxin residues in broilers fed a diet containing low levels of aflatoxin B₁. *Toxicon*, 47, 41–46.
13. **Calvo, A. M., J. Bok, W. Brooks, N. P. Keller**, 2004. *veA* Is Required for Toxin and Sclerotial Production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4733-4739.
14. **Cambell, T. W., E. H. Coles**, 1989. Patología Clínica de Aves. In: *Diagnóstico y Patología Veterinaria*, 4th edn, pp. 285-308. (México, Editorial Interamericana).
15. **Cardinet, III. G. H.**, 1989. Skeletal muscle function. In: *KANEKO, J.J. (Ed.) Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, pp. 462-495. (San Diego, California, Academic Press, Inc).
16. **Celik, K., M. Denli, M. Erturk, O. Ozturkcan, F. Doran**, 2001. Evaluation of dry yeast *Saccharomyces Cerevisiae* in the feed to reduce aflatoxin B (AFB) residues and toxicity to Japonica Quails (*Coturnix coturnix Japonica*). *Journal of Applied Animal Research*, 20, 245-250.
17. **Chang, C. F., P. Hamilton**, 1982. Experimental aflatoxicosis in young Japanese quail. *Poultry Science*, 61, 5, 869–874.
18. **Council for Agricultural Science and Technology**, 1989. Pages 1–91 in: *Mycotoxins: Economic and Health Risks*. K. A. Nisi, ed. Task Force Report No. 116. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, IA.
19. **Cullen, J. M., P. M. Newberne**, 1994. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. In: *Eaton, D.L., Groopman, J. D. (Eds.), Toxicology of Aflatoxins*. Academic Press, San Diego, pp. 3–26.
20. **D’Mello, J. P. F.**, 2003. Mycotoxins in cereal grains, nuts and other plant products. In: *Food Safety Contaminants and Toxins*. D’Mello, J P. F.(Ed).Cromwell Press, Trowbridge, UK; 2003. 65-90.
21. **Daković, A., M. Tomasevic-Canovic, V. Dondur, G. E. Rottinghaus, V. Medakovic, S. Zanic**, 2005. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 46, 20–25.
22. **Dalvi, R. R.**, 1986. An overview of aflatoxicosis of poultry: its characteristics, prevention

and reduction. *Veterinary Research Communications*, 10, 429–443.

23. Denli, M., F. Okan, F. Doran, T. C. Inal, 2005. Effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on carcass quality, serum lipid variables and histopathological changes of broiler chickens infected with aflatoxin B₁. *African Journal of Animal Science*, 35, 109–116.

24. Denli, M., J. C. Blandon, M. E. Guynot, S. Salado, J. F. Perez, 2009. Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B₁. *Poultry Science*, 88, 1444–1451.

25. Dewegowda, G., T. N. K. Murthy, 2005. Mycotoxins: Effects on poultry performance and health. *In: The Mycotoxin Blue Book*, Diaz D.E. (ed.), Nottingham University Press, Nottingham, 25–56.

26. Diaz, D. E., 2005. *The Mycotoxin Blue Book*, 1st ed.; Nottingham University Press: Nottingham, UK, pp. 25–56.

27. Diener, U. L., R. J. Cole, T. H. Sanders, G. A. Payne, L. S. Lee, M. A. Klich, 1987. Epidemiology of Aflatoxin, in formation by *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology* 25, 240–270.

28. Eaton, D. L., D. Groopman, 1994. The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. Academic Press, San Diego, CA, 1994. Ehrlich, K.C. (2009). Predicted roles of uncharacterized clustered genes in aflatoxin biosynthesis, *Toxins*, 1, 37–58.

29. EEC, 1991. EEC Council Directive 91/126/EEC. Amending the annexes to Council Directive 74/63/EEC on undesirable substances and products in animal nutrition. *Official Journal of the European Community*, No., L 60.

30. El-Agamy, D. S., 2010. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B (1)-induced liver injury in rats. *Archives of Toxicology*, 84, 389–396.

31. El-Nekeety, A. A., S. R. Mohamed, A. S. Hathout, N. S. Hassan, S. E. Aly & M. A. Abdel-Wahhab, 2011. Antioxidant properties of Thymus vulgaris oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. *Toxicon*, 57, 984–991.

32. European Commission, 2010. Commission Regulation (EU) No. 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union*, L50, 8–12.

33. Fatemi, F., A. Allameh, A. Dadkhah, M., Forouzandeh, S. Kazemnejad, R. Sharifi, 2006. Changes in hepatic cytosolic glutathione S-transferase activity and expression of its class-P during prenatal and postnatal period in rats treated with aflatoxin B₁. *Archives of Toxicology*, 80, 572–579.

34. Gaskill, C. L., L. M. Miller, J. S. Mattoon, W. E. Hoffmann, S. A. Burton, H. C. J. Gelens, S. L. Ihle, J. B. Miller, D. H. Shaw, A. E. Cribb, 2005. Liver histopathology and liver serum alanine aminotransferase and alkaline phosphatase activities in epileptic dogs receiving phenobarbital. *Veterinary Pathology*, 42, 147–160.

35. Hussein, H. S., J. M. Brasel, 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101–134.

36. Ibrahim, I. K., A. M. Shareef, K. M. T. Al-Joubory, 2000. Ameliorative effects of sodium bentonite on phagocytosis and Newcastle disease antibody formation in broiler chickens during aflatoxicosis. *Research in Veterinary Science*, 69, 2, 119–122

37. Jakhar, K. K., J. R. Sadana, 2004. Sequential pathology of experimental aflatoxicosis in quail and the effect of selenium supplementation in modifying the disease process. *Mycopathologia*, 157:99–109.

38. Jindal, I. V., S. K. Mahipal, 1994. Toxicity of Aflatoxin B₁ in broiler chicks and its reduction by activated charcoal. *Research in Veterinary Science*, 56, 37.

39. Jouany, J. P., 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137, 342–362.

40. Kececi, T., H. Oguz, V. Kurtoglu, V. O. Demet, 1998. Effects of polyvinylpyrrolidone, synthetic zeolite and bentonite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis. *British Poultry Science*, 39, 452–458.

41. Krishnamoorthy, P., S. Vairamuthu, C. Balachandran, B. Muralimanohar, 2007. Pathology of chlorpyrifos and T-2 toxin on broiler chicken. *Veterinaria Italiana*, 77, 1, 47-57.
42. Kubena, L. F., R. B. Harvey, R. H. Baile, S. A. Buckley, G. E. Rottinghaus, 1998. Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate [T-Bind] on mycotoxicosis in young broiler chickens. *Poultry Science*, 77, 1502-1509.
43. Kubena, L. F., R. B. Harvey, W. E. Huff, M. H. Elissalde, A. G. Yersin, T. D. Phillips and G. E. Rottinghaus, 1993a. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxyscirpenol. *Poultry Science*, 72, 1, 51-59.
44. Kubena, L. F., R. B. Harvey, T. D. Phillips, B. A. Clements, 1993b. Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate on aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science*, 72, 4, 651-657.
45. Ledoux, D. R., G. E. Rottinghaus, A. J. Bermudez, M. Alonso-Debolt, 1998. Efficacy Of a Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate To Ameliorate The Toxic Effects Of Aflatoxin In Broiler Chicks. *Poultry Science*, 77, 204-210.
46. Leeson, S., G. J. Diaz, J. D. Summers, 1995. "Poultry Metabolic Disorders And Mycotoxins." Pp. 249-298, University Books, Guelph, Ontario, Canada.
47. Matur, E., E. Ergul, I. Akyazi, E. Eraslan, Z. T. Ciraklit, 2010. The effects *Saccharomyces cerevisiae* extract on the weight of some organs, liver and pancreatic digestive enzyme activity in breeder hens fed diets contaminated with aflatoxins. *Poultry Science*, 89, 2213-2220.
48. McKenzie, K. S., L. F. Kubena, A. J. Denvir, T. D. Rogers, G. D. Hitchens, R. H. Bailey, R. B. Harvey, S. A. Buckley, T. D. Phillips, 1998. Aflatoxicosis In Turkey Poults Is Prevented By Treatment Of Naturally Contaminated Corn With Ozone Generated By Electrolysis. *Poultry Science*, 77, 8, 1094-102.
49. Miazzo R., C. A. Rosa, E. C. De Queiroz Carvalho, C. Magnoli, S. M. Chiacchiera, G. Palacio, M. Saenz, A. Kikot, E. Basaldella, A. Dalcero, 2000. Efficacy of synthetic zeolite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Poultry Science*, 79, 1-6.
50. Mohamed, M. A., M. H. Mohamed, 2009. Haemato-biochemical and pathological studies on aflatoxicosis and treatment of broiler chicks in Egypt. *Veterinaria Italiana*, 45, 2, 323-37.
51. Mohammed, A. M., N. S. Metwally, 2009. Antiaflatoxicogenic activities of some aqueous plant extracts against AFB₁ induced Renal and Cardiac damage. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 4, 1, 1-16.
52. Monbaliu S., C. Van Poucke, C. Detavernier, F. Dumoulin, M. Van De Velde, E. Schoeters, S. Van Dyck, O. Averkieva, C. Van Peteghem, S. De Saeger, 2010. Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 66-71.
53. Nomura H., M. Ogiso, M. Yamashita, H. Takaku, A. Kimura, M. Chikasou, Y. Nakamura, S. Fujii, M. Watai, H. Yamada, 2011. Uptake by dietary exposure and elimination of aflatoxins in muscle and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5150-5158.
54. Ominski, K. H., R. R. Marquardi, R. N. Sinha, D. Abramson, 1994. Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. In: Miller, J.D and Trenholm, H.L. *Mycotoxins in grains: Compounds other than aflatoxins*. Eagan Press, St. Paul Minnesota, USA. 1994; 287-314.
55. Ortatatli, M., H. Oguz, F. Hatipoglu, M. Karaman, 2005. Evaluation of pathological changes in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. *Research in Veterinary Science*, 78, 61-68.
56. Osborne, D. J., P. B. Hamilton, 1981. Decreased pancreatic digestive enzymes during aflatoxicosis. *Poultry Science*, 60, 8, 1818-1821.
57. Pang, V. F., J. H. Adams, V. R. Beasley, W. R. Buck, W. M. Haschek, 1986. Myocardial and Pancreatic Lesions Induced by T-2 Toxin, a Trichothecene Mycotoxin, in Swine. *Veterinary Pathology*, 23, 3, 310-319.
58. Parlat, S. S., M. Ozcan, H. Oğuz, 2001. Biological suppression of aflatoxicosis in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) by dietary addition of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Research in Veterinary Science*, 71, 207-211.

59. **Pier, A. C.**, 1981. Mycotoxins and animal health. *Advances in Veterinary Sciences and Comparative Medicine*, 42, 185–243.
60. **Qazi, J. I., Z. Fayyaz**, 2006. Aflatoxin contaminated foods and health risk perspective for Pakistani population (Review). *Mycopathologia*, 4, 27–34.
61. **Rahman, M. F., M. K. Siddiqui, K. Jamil**, 2000. Acid and alkaline phosphatase activities in a novel phosphorothionate (RPR-11) treated male and female rats. Evidence of dose and time-dependent response. *Drug and Chemical Toxicology*, 23, 497–509.
62. **Raju, M., G. Devegowda**, 2000. Influence of esterifiedglucosaminan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British Poultry Science*, 41, 640–650.
63. **Ramos, A. J., E. Hernandez**, 1997. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuff: A review. *Animal Feed Science and Technology* 65, 197–206.
64. **Recknagel, R. O., E. A. Glende, J. A. Dolak, R. L. Waller**, 1989. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology and Therapeutics*, 43, 139–154.
65. **Riley R. T., J. Pestka**, 2005. Mycotoxins: Metabolism, mechanism, and biochemical markers. In: *The Mycotoxin Blue Book*, Diaz D.E. (ed.), Nottingham University Press, Nottingham, 2005, pp.: 279–294.
66. **Rosa, C. A. R., R. Miazzo, C. Magnoli, M. Salvano, S. M./ Chiacchiera, S. Ferrero, M. Saenz, E. C. Q. Carvalho, A. Dalcero**, 2001. Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *Poultry Science*, 80, 2, 139–144.
67. **Safameher, A.**, 2008. Effects of clinoptilolite on performance, biochemical parameters and hepatic lesions in broiler chickens during aflatoxicosis. *Journal of the American Veterinary Association*, 7, 381–388.
68. **Saif, Y. M., H. J. Barnes, J. R. Glissons, L. R. McDougald, D. E. Swayne** Ed, 2003. Diseases of poultry, 11th. Editorial Board for the American Association of Avian Pathologists. Masby-Wolfe, Iowa, State University, Press, Ames, Iowa, 320–326.
69. **Sakhare, P. S., S. D. Harne, D. R. Kalorey, S. R. Warke, A. G. Bhandarkar, N. V. Kurkure**, 2007. Effect of Toxiroak® polyherbal feed supplement during induced aflatoxicosis, ochratoxicosis and combined mycotoxicoses in broilers. *Veterinarski Arhiv*, 77, 129–146.
70. **Sawhney, D. S., P. V. Vadehra, R. C. Baker**, 1973. Aflatoxicosis in the laying Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Poultry Science*, 52, 465–473
71. **Schneideled, S. E.**, 1993. Effects of various types of aluminosilicates and aflatoxin B₁ on aflatoxin toxicity, chick performance, and mineral status. *Poultry Science*, 72, 282–288.
72. **Sharma, V., C. Sharma, R. Paliwai, Prachetal, S. Sharma**, 2011. Ameliorative Effects of Curcuma Longa and Curcumin on Aflatoxin B₁ Induced Serological and Biochemical Changes In Kidney of Male Mice. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, 1, 2, 338–351.
73. **Shi, Y. H., Z. R. Xu, J. L. Feng, C. Z. Wang**, 2006. Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology*, 129, 138–148.
74. **Shotwell, O. L.**, 1991. In: 1. E. Smith and R. Henderson (eds.). *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press: Boca Raton, FL, 325–340.
75. **Shoyinka, S. V. O., E. O. Onyekweodiri**, 1987. Clinicopathology of interaction between aflatoxin and aspergillosis in chickens. *Bulletin of Animal Health Production and Africa*, 35, 47–51.
76. **Simsek, N, L. Ergun, R. Alabay, D. Es-siz**, 2007. The effects of experimental aflatoxicosis on the exocrine pancreas in quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Archives of Toxicology*, 81, 8, 583–588.
77. **Valdivia, A. G., A. Martinez, F. J. Damian, T. Quezada, R. Ortiz, C. Martinez, J. Llamas, M. L. Rodriguez, L. Yamamoto, F. Jaramillo, M. G. Loarca-Pina, G. L. Reyeя**, 2001. Efficacy of N-Acetylcysteine to Reduce the Effects of Aflatoxin B₁ Intoxication in Broiler Chickens. *Poultry Science*, 80, 6, 727–734.

78. Wangikar, P. B., P. Dwivedi, N. Sinha, A. K. Sharma, A. G. Telang, 2005. Teratogenic effects in rabbits of simultaneous exposure to ochratoxin A and aflatoxin B₁ with special reference to microscopic effects. *Toxicology*, 215, 37–47.

79. Wu, F., G. P. Munkvold, 2008. Mycotoxins in ethanol coproducts: modeling economic impacts on the livestock industry and management strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3900–3911.

80. Yener, Z., I. Celik, F. Ilhan, R. Bal, 2009. Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin induced tissue injury in rats. *Food Chemical Toxicology*, 47, 2, 418–424.

81. Yildirim, E., I. Yalchinkaya, M. Kanbur, M. Çnar, E. Oruc, 2011. Effects of yeast luco-

mannan on performance, some biochemical parameters and pathological changes in experimental aflatoxicosis in broiler chickens. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 162, 8-9, 413-420.

82. Yoshizawa, T., 1991. In: J. E. Smith and R. Henderson (eds.). *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press: Boca Raton, FL, 301-324.

83. Zhang, Y., J. Caupert, 2012. Survey of mycotoxins in U.S. distiller's dried grains with solubles from 2009 to 2011. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 539–543.

84. Zhao, J., R. B. Shirley, J. D. Dibner, F. Uraizee, M. Officer, M. Kitchell, M. Vazquez-Anon, C. D. Knight, 2010. Comparison of hydrated sodium calcium aluminosilicate and yeast cell wall on counteracting aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science*, 89, 2147–2156.

INFLUENCED OF AFLATOXIN B₁ ON LIVER AND PANCREATIC FUNCTION IN MULARD DUCKS WITH EXPERIMENTAL AFLATOXICOSIS B₁

I. Valchev

Thrakia University, Faculty of Veterinary Medicine - Stara Zagora

SUMMARY

Ducklings are among the most sensitive avian species to the toxic effects of aflatoxin B₁ (AFB₁). In this experiment, the toxic effects of AFB₁ on liver and pancreatic morphology, blood plasma aspartate amino-transferase (AST), alanine amino-transferase (ALT), alkaline phosphatase (AP), lactate dehydrogenase (LDH), γ -glutamyltransferase (γ -GT), total protein (TP), albumin, blood glucose, cholesterol, triglyceride, alpha amylase, lipase and insulin were established in mulard ducks. The experiment was carried out with four groups of 20 10-day-old ducklings each. Each group included three subgroups with 10 birds. The groups were as followed: group I – control (which received standard feed according to the species and age), group II – experimental, which received compound feed with 0.5 mg/kg AFB₁, group III – receiving compound feed supplemented with 0.8 mg/kg AFB₁ and group IV – compound feed supplemented with 0.5 mg/kg AFB₁ and 2g/kg Mycotox NG. The experiment lasted for 42 days. Blood biochemical data on the 21st day of the experiment showed increased activities of AST, ALT, AP, LDH, γ -GT and decrease activities of alpha amylase and lipase in groups receiving only AFB₁. Total protein, albumin, cholesterol, triglycerides and blood glucose were lower than respective control values. The observed changes tended to become more pronounced by the 42nd day of the trial. Insulin concentrations in experimental groups of mulards were insignificantly higher during both sampling intervals compared to untreated birds (control group) ($P > 0.05$). Histopathologically, the liver exhibited a various extent of dystrophy was detected depending on the dose of ingested toxin (hepatocytes exhibited granular degradation and cytoplasm vacuolation, karyorrhexis, karyopyknosi, fatty dystrophy, erivascular mononuclear

infiltrations, areactive necrotic, epithelium of biliary ductules was hyperplastic). Histopathologically, the pancreas exhibited intralobular swelling, disorganisation and disintegration of glandular acini, various extents of dystrophic changes, mononuclear infiltrates as well as necrobiotic changes depending on the dose of ingested toxin. The supplementation of feed of group IV with Mycotox NG improved deviations in blood biochemical parameters and substantially reduced the severity and prevalence of histological lesions.

Key words: *aflatoxicosis B_p, toxicity, duckling,; liver and pancreatic damage, Mycotox NG*

e-mail:valtchev@abv.bg