DOI: 10.22092/vj.2018.120258.1421
شماره ۱۲۱ زمستان ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

# اثر متقابل سمیت آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون بر ایمنی سلولی و هومورال ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *(Oncorhynchus mykiss)*

• **ساناز سلیمی**
فارالتحصیل کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
• **کوروش سروی مغانلو (نویسنده مسئول)**
دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران،
• **سید میثم ابطحی**
استادیارگروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
• **فرزانه نوری**
استادیارگروه شیلات، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
• **احمد ایمانی**
دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
تاریخ دریافت: ۲۴-۱۰-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۲۵-۰۲-۱۳۹۷
Email: k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

**چکیده**

**مواد غذایی در معرض طیف گسترده‌ای از آلودگی‌های مایکوتوکسینی مانند آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون هستند. مطالعه حاضر با هدف بررسی همزمان آثار سموم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون انجام گرفت. به این منظور ۵۴۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان (۰/۲±۳/۰گرم) در قالب ۹ تیمار متشکل از ۳ سطح آفلاتوکسین ب ۱ (۰، ۲۵ و ۵۰ppb) و ۳ سطح زیرالنون (۰، ۲۰۰ و ppb ۴۰۰) به مدت ۳۰ روز پرورش یافتند. تعداد گلبول‌های قرمز و سفید و همچنین برخی فراسنجه‌های ایمنولوژیکی از جمله سطح فعالیت لیزوزیم سرم،پادتن، تکثیر لنفوسیت، مسیر فرعی کمپلمان و قدرت فاگوسیتوزی سلول‌های فاگوسیتیک خون‌محیطی (تست برداشت NR)، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سطح فعالیت لیزوزیم، پادتن و تعداد گلبول‌های قرمز و سفید تحت تاثیر سموم قارچی موجود در جیره‌های آزمایشی قرار نگرفتند ($p > ۰/۰۵$)، اما شاخص مسیر فرعی کمپلمان دارای اختلاف معنی‌دار بوده ($p \leq ۰/۰۵$)، به‌طوری که تنها تحت تاثیر سطوح مختلف آفلاتوکسین ب ۱ قرار گرفت و کم‌ترین میزان آن در تیمار حاوی ppb۵۰ و بیش‌ترین مقدار آن در تیمار شاهد (بدون سم) مشاهده گردید. شاخص‌های تکثیر لنفوسیت و تست برداشت NR نشان دادند که سموم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون به‌صورت هم‌افزایی بر سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تاثیرگذار بوده‌است ($p \leq ۰/۰۵$)، به‌طوری که کم‌ترین میزان آن‌ها نسبت به تیمار شاهد، به ترتیب در تیمار ppb ۵۰ آفلاتوکسین ب ۱ و تیمار حاوی ppb ۵۰ آفلاتوکسین ب ۱ - ppb ۲۰۰ زیرالنون مشاهده گردید. وجود همزمان سموم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون در جیره غذایی از طریق اثر هم‌افزایی موجب تضعیف سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌گردد.**

**کلمات کلیدی: آفلاتوکسین ب ۱، زیرالنون، شاخص‌های ایمنی، *Oncorhynchus mykiss***

● Veterinary Researches & Biological Products No 121 pp: 82-90

**Interactive toxic effects of aflatoxin B1 and zearalenone on cellular and humoral immunity of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)***

*By: Salimi, S., MSc Graduate of Fisheries Science, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, I.R. of Iran. Sarvi Moghanlou, K., (Corresponding Author) Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, I.R. of Iran. Abtahi, S.M., Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, I.R. of Iran. Noori, F., Assistant Professor, Urmia Lake Research Institute, Urmia University, I.R. of Iran. and Imani, A., Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, I.R. of Iran.*

**Received: 2018-01-14** **Accepted: 2018-05-15**

Email: k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

Feeds are widely exposed to various mycotoxin contaminations including aflatoxin and zearalenone. The present study was designed to investigate the simultaneous toxic effects of aflatoxin and zearalenone. To this end, 540 rainbow trout fingerlings (3.0 ± 0.2 g) were randomly allotted to nine different experimental groups composed of three different dietary aflatoxin (0, 25 and 50 ppb) and zearalenone (0, 200 and 400 ppb) levels. The experiment lasted 30 days. Red and white blood cell counts along with some immunological indices including serum lysozyme activity, antibody, lymphocyte proliferation, complementary pathway and phagocytic intensity of peripheral blood phagocytic cells (NR assay) were investigated. Results showed that lysozyme activity, serum antibody content, red and white blood cell counts were not significantly affected by dietary mycotoxin contamination ($p>0.05$). However, the complementary pathway was significantly affected by dietary aflatoxin B1 content ($p<0.05$) and the lowest and highest activity was observed in those fish received 50 ppb and diet lacking aflatoxin contamination, respectively. Aflatoxin B1 and zearalenone interactively affected lymphocyte proliferation and NR indices ($p\leq 0.05$) with the lowest and highest activities were recorded in those fish fed diet containing 50 ppb aflatoxin devoid of zearalenone and diet containing 50 ppb aflatoxin and 200 ppb zearalenone, respectively. It is conceivable that simultaneous dietary contamination of aflatoxin and zearalenone attenuates immune system functioning of rainbow trout.

**Key words:** Aflatoxin B1, Zearalenone, Immune indices, *Oncorhynchus mykiss*

## مقدمه

نهاده‌های اولیه جیره‌های غذایی دام، طیور و آبزیان در معرض آلودگی‌های قارچی می‌باشند (۱۷). تشکیل مایکوتوکسین‌ها در موادغذایی یک مشکل جهانی است، به طوری‌که سالانهیک چهارم محصولات تولید شده تحت تاثیر سموم قارچی قرار می‌گیرند. این ترکیبات از یک‌سو زیان‌های اقتصادی قابل توجهی را به بار آورده و از سوی دیگر تهدیدی برای سلامت محصولات دامی و سرانجام انسان تلقی می‌شوند (۵). مایکوتوکسین‌ها گروه مجزایی از متابولیت‌های ثانویه قارچی هستند، که طی مراحل انبار کردن و فرآوری محصولات کشاورزی و خوراک دام در مواقعی که شرایط مناسب محیطی و آب و هوایی برای فعالیت قارچ‌های مضر و سمی فراهم باشد، به‌وجود می‌آیند. رطوبت محیط و درجه حرارت از عوامل تعیین‌کننده به وجود آمدن قارچ و تولید مایکوتوکسین می‌باشند (۱۰). دو نوع از فراوان‌ترین سموم مایکوتوکسینی در جیره‌های غذایی شامل آفلاتوکسین‌ها و زیرالنون‌ها هستند (۱۷).

آفلاتوکسین‌ها حاصل متابولیسم گونه‌های قارچی نظیر *Aspergillus flavus* و *A. parasiticus* هستند که در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری رشد می‌کنند. این سموم به‌ویژه در محصولات حاوی نشاسته و چربی بالا مانند بادام زمینی، پنبه دانه، ذرت، گندم، آفتابگردان و سویا رایج هستند (۲۶). آفلاتوکسین ب ۱، به علت آثار مهلک و زیانبار آن، به‌عنوان یکی از معروف‌ترین مایکوتوکسین‌های سرطان‌زا می‌باشد (۲۲). استفاده روزافزون از منابع گیاهی در تغذیه آبزیان و تجمع این سم و متابولیت‌های آن در بافت‌های حیوانی سبب انتقال آن‌ها به زنجیره غذایی و در نهایت انسان می‌شود (۲۹، ۳۵). آفلاتوکسین ب ۱ موجب اختلال در سوخت و ساز کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها (چرخه تولید انرژی) شده و یا با اسیدهای نوکلئیک تداخل ایجاد می‌کند و از این طریق ابتدا سبب کاهش تولید پروتئین و در نهایت سبب کاهش رشد سلولی و کاهش بازدهی حیوان می‌گردد (۱۷). همچنین، سیستم ایمنی شامل سیستم هومورال و سلولی را تحت تاثیر قرار داده، به صورتی که آفلاتوکسین‌ها

در مقادیر بسیار کم، باعث تضعیف سیستم ایمنی سلولی می‌شوند که از مهم‌ترین اثرات آن‌ها کاهش شدت واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری در پاسخ به فیتوهماگلوتیتین (PHA) می‌باشد (۳۶). علاوه بر آن آفلاتوکسین ب۱ در مقادیر بالاتر، تولید پادتن را با مشکل مواجه می‌کند و باعث سرکوب ایمنی هومورال به ویژه از طریق کاهش تولید پادتن‌ها (ایمونوگلوبولین‌های IgA و IgG)، اینترفرون‌های آلفا و بتا و هم‌چنین کاهش پروتئین‌های سیستم کمپلمان می‌شوند (۷، ۱۲). از علایم دیگر این سم می‌توان نکروز حاد، سیروز و تومورهای کبدی را نام برد که در نهایت منجر به مرگ جانور می‌گردد (۱۷، ۲۵). این تاثیرات در ماهیانی چون تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*)، آزادماهیان (salmonidae)، گربه‌ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*)، گوپی (*Poecilia reticulata*) و قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)گزارش شده است (۹).

زیرالنون یک مایکوتوکسین استروژنی غیراستروئیدی است که به‌عنوان متابولیت ثانویه از قارچ Fusarium sp. تولید می‌شود و در محصولات گیاهی همچون گندم، جو و چاودار قابل مشاهده است (۸). اثرات ناشی از سم زیرالنون تا حدودی در حیوانات پرورشی و خانگی مشاهده شده است. اکثر این اثرات ناشی از اختلالات غدد درون‌ریز شامل القای تکثیر سلول‌های بافتی حساس به استروژن و یا اختلالات تولیدمثل، پوکی استخوان، اختلال در بافت‌های مغز استخوان، ایجاد بافت‌های غده‌ای خوش‌خیم و تغییر شکل اسکلتی است (۳۸). اثرات زیستی زیرالنون در گونه‌های مختلف ماهی شامل ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) (۳۴، ۴۰) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (۲۲) مشاهده شده است.

سیستم ایمنی ماهیان شبیه سایر مهره‌داران از دو بخش ذاتی (Innate) و اکتسابی (Adaptive) تشکیل شده و به صورت هماهنگ و متحد مسئولیتحفاظت از ماهی را در برابر عوامل مهاجم بر عهده دارند. سیستم ایمنی ماهی بیش‌تر برای منی ذاتی متکی است و لذا ماکروفاژها مهم‌ترین سلولای منی در ماهیان محسوب می‌شوند. ماکروفاژها علاوه بر تولید سیتوکین‌ها، مسئول بیگانه‌خواری و تخریب دیواره سلول‌های مهاجم می‌باشند (۲۸). در بد وورود يك عامل خارجی به بدن ابتدا ایمنی ذاتي، از طریق فاگوسیتوزیس، کشتن پاتوژن‌ها و ترشح سیتوکین عمل می‌کند. در صورتی که ایمنی ذاتی نتواند آن را از بین ببرد، در آن صورت عامل خارجی از راه کانال‌های لنفاوی به نزدیك‌ترین گره لنفاوی یا از راه خون وارد طحال شده و لنفوسیت‌های ایمنی اکتسابی مستقر در این اعضاء را تحریك می‌کند. لنفوسیت‌ها ابتدا تکثیر یافته و موجب متورم شدن این اعضاء می‌گردند. سرانجام لنفوسیت‌های نوع T و B و همینطور سلول‌های دندریتیک (Dendritic) تکامل‌یافته و وظایف اختصاصی خود را انجام می‌دهند (۱، ۳۱). سلول‌های دندریتیک با اتصال به گیرنده‌های خود روی سلول T، رفتار آن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. این سلول‌ها عوامل خارجی را به دام انداخته و سلول‌های T و بیگانه‌خوارها را برای فاگوسیتوز عوامل خارجی تحریک می‌کنند (۶). ایمنی اکتسابی با ایمنی ذاتی در ارتباط مستقیم هستند. بدین صورت که پادتن تولید شده به عامل خارجی متصل شده و سپس پروتئین‌های کمپلمان که به طور طبیعی در خون و مایعات بدن وجود دارند، به آن‌ها پیوسته و تشکیل مجموعه ایمنی را می‌دهند. این مجموعه به سرعت توسط سلول‌های نوتروفیل بلعیده شده و از بین می‌روند. در سطح سلول‌های نوتروفیل گیرنده‌هایی برای عامل خارجی، پادتن و کمپلمان وجود دارد که موجب تسریع و تسهیل عمل بیگانه‌خواری می‌گردد (۱). عملکرد سیستم ایمنی می‌تواند تحت تاثیر عوامل تغذیه‌ای از جمله سموم قارچی موجود در جیره غذایی قرار گیرد، به شکلی که این سموم با اثر بر ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌های B و T در ایمنی سلولی و همچنین اثر بر لیزوزیم، کمپلمان و ایمونوگلوبولین‌های طبیعی، باعث تضعیف عملکرد سیستم ایمنی ماهی می‌گردد (۱۵، ۳۳).در تحقیقی، آفلاتوکسین ب ۱ در غلظت ۱/۵ mg/kg باعث کاهش فعالیت ضد باکتریایی سرم، لیزوزیم سرم و فعالیت اکسیداتیو نوتروفیل‌ها در کپور هندی گردید (۲۴). در مطالعه‌ای اثر ۱۰ mg/kgوزن بدن سم زیرالنون را در مدت‌های ۲۴ و ۷۲ و ۱۶۸ ساعت بر میزان گلوکز و پروتئین کلو فعالیت آمینوترانسفرازهای سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان بررسی کردند و آسیب کبد، تاثیر سم روی فرآیند ذخیره آهن و عدم اثر آن روی فعالیت آمینوترانسفراز و سطوح گلوکز و پروتئین کل مشاهده گردید (۴۰).

سموم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون هر کدام به تنهایی آثار مهلکی بر سلامتی موجودات زنده بر جای می‌گذارند. در طبیعت و همین‌طور در جیره‌های حاوی منابع گیاهی ممکن است دو یا چند سم به‌طور همزمان وجود داشته و بدین ترتیب از طریق هم‌افزایی سبب ایجاد آسیب‌های شدیدتر در آبزیان گردند. البته احتمال دارد نتیجه عکس داشته و یا اثر یکدیگر را تعدیل نمایند (۲۸، ۳۷). به دلیل اهمیت زیاد این سموم از لحاظ آسیب‌هایی که بر موجودات مختلف وارد داشته و همین‌طور اهمیت آن‌ها نسبت به سایر سموم قارچی از لحاظ سرطان‌زایی و ایجاد مسمومیت حاد (۱۳)، و باتوجه به اینکه در مورد اثر همزمانی این دو سم، کار چندانی انجام نشده و اطلاعاتی در این مورد وجود ندارد لذا تصمیم برآن شد که در این مطالعه اثر همزمانی دو سم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون بررسی گیرد.

## مواد و روش‌ها

تعداد۵۴۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی۰/۲±۳/۰ گرم از یک مرکز پرورش ماهی قزل‌آلا تهیه و با محلول نمک ۳ درصد ضد عفونی گردیدند. (۴) و پس از گذراندن یک هفته دوره سازگاری با محیط جدید، با تراکم ۲۰ قطعه به‌صورت تصادفی در ۲۷ مخزن ۳۰۰ لیتری (برای ۹ تیمار با سه تکرار) حاوی ۲۰۰ لیتر آب با اکسیژن محلول (USA, HANNA instrument) ۰/۲ ± ۸/۴ میلی‌گرم در لیتر و دمای (دماسنج دیجیتالی مدلTP۱۰۱) ۰/۵ ± ۱۴/۵ درجه سانتی‌گراد، نگهداری شدند. جهت ساخت غذا، اقلام غذایی شامل پودر ماهی کیلکا، روغن ماهی، نشاسته ژلاتینه، مکمل‌های معدنی و ویتامینی تهیه و بر اساس نیازهای غذایی ماهی قزل‌آلا (۴۵ درصد پروتئین خام، ۲۰ درصد چربی خام و کربوهیدرات ۱۵ درصد، مکمل‌های ویتامینی و معدنی هر کدام در حد ۲ درصد) جیره مورد نظر تنظیم گردید. سپس آفلاتوکسین ب ۱و زیرالنون با توجه به تیمارهای غذایی به جیره غذایی افزوده شد (جدول ۱). در مرحله بعد با افزودن رطوبت به میزان مورد نیاز، خمیر به دست آمده به کمک چرخ گوشت صنعتی به صورت رشته‌های نازک با طول و قطر تقریبی ۲ mm در آمد و پس از خشک شدن در دمای ۴۰

درجه سانتی‌گراد در کیسه‌های پلاستیکی بسته‌بندی و تا زمان استفاده در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. ماهی‌ها به مدت ۴ هفته، هر روز در سه وعده و در هر وعده یک درصد وزن بدن (۳ درصد روزانه)، با جیره‌های غذایی مختلف تغذیه شدند (جدول ۱).

جهت بررسی پارامترهای خون شناسی و ایمنی، در انتهای دوره پرورش از هر تیمار تعداد ۶ قطعه ماهی به طور تصادفی انتخاب و در محلول پودر گل میخک با غلظت ppm ۲۵۵ (۲) بی‌هوش شدند و توسط سرنگ‌های آغشته به هپارین از ساقه دمی آن‌ها خون‌گیری به‌عمل آمد. سپس خون هر دو قطعه بچه ماهی، با همدیگر مخلوط و بعنوان یک نمونه مدنظر قرار گرفت. در ادامه نمونه خون درون یونولیت به همراه یخ، با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد. تعداد گلبول‌های سفید (WBC) و تعداد گلبول‌های قرمز خون (RBC) با روش Tabarestani و همکاران (۳۲) تعیین گردید.

برای سنجش تکثیر لنفوست‌ها از روش MTT استفاده گردید (۲۰)، برای این کار تعلیقی حاوي $1\times10^6$ سلول به ازای هر میلی‌لیتر از بافر RPMI -1640[1] حاوی ۱۰ درصد FBS[2] تهیه و µl ۱۰۰ از آن در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار در حضور µl ۵۰ از محلول فیتوهماگلوتینین (PHA) (۱ mg/ml) و سه تکرار بدون حضور فیتوهماگلوتینین در نظر گرفته شد. به‌عنوان بلانک نیز در سه چاهک از محیط RPMI -1640خالی (شرکت Sigma-آمریکا) استفاده گردید. بعد از ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور حاوی $CO_2$ ۵ درصد، به هر چاهک µl ۲۵ محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر PBS[3]) افزوده شده، و به مدت ۴ ساعت دیگردر دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید. در این مدت احیاء ماده MTT[4] توسط سلول‌های زنده و در حال تکثیر، سبب تشکیل بلورهای فورمازون گردید که با افزودن µl ۱۰۰ از ماده‌ی DMSO (دی متیل سولفوکساید) به حالت محلول درآمد. سپس شدت رنگ در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین شد و اندکس تحریک بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید (۱۴).

$$\text{اندکس تحریک} = \frac{\text{OD بلانک} - \text{در حضور میتوژن فیتوهماگلوتینین OD}}{\text{OD بلانک} - \text{در عدم حضور میتوژن فیتوهماگلوتینین OD}}$$

قدرت فاگوسیتوزی نوتروفیل‌ها توسط تست برداشت NR اندازه‌گیری شد (۱) اساس کار آزمون NR[5] بر مبنای جذب رنگ در لیزوزوم سلول‌های زنده بوده که پس از لیزشدن غشای سیتوپلاسمی سلول‌های نوتروفیل و خارج شدن رنگ آن‌ها، میزان رنگ جذب شده توسط دستگاه الایزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر بررسی شد، به‌طوری که میزان OD به‌دست آمده نشان‌گر مقدار رنگ جذب شده توسط سلول‌های زنده بود. برای این منظور به µl ۵۰۰ خون هپارینه، µl ۵۰ از رنگ NR اضافه شد. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد سلول‌ها به مدت ۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. سلول‌ها دو بار با بافر RPMI -۱۶۴۰ مورد شست‌وشو قرار گرفته و هم حجم میزان خون و رنگ موجود در آن از محلول اسید استیک گلاسیال- اتانول (اسیداستیک ۱ درصد و اتانول ۵۰ درصد با نسبت ۱:۱) اضافه و به شدت تکان داده شد. در نهایت به منظور استخراج کامل رنگ از سلول‌ها، محلول توسط سمپلر، چندین بار از ظرف آن برداشته و مجددا به ظرف آن باز گردانده شدند. و µl ۲۰۰ از مایع رویی هر یک از خانه‌ها در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته (سه چاهک برای هر نمونه) و نتیجه با دستگاه الایزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید (۱). در نهایت برای سنجش فراسنجه‌های ایمنی سرم خون، پارامترهای فعالیت مسیر فرعی کمپلمان بر اساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش (۳)، میزان پروتئین کل سرم با استفاده از کیت تشخیص کمی TOTAL PROTEIN (شرکت پارس آزمون، کرج، ایران) و با روش فتومتریک (۲۱)، میزان پادتن سرم از

جدول ۱- میزان سموم درتیمارهای آزمایشی مختلف

| تیمار | آفلاتوکسین ب۱(ppb) | زیرالنون (ppb) |
|---|---|---|
| کنترل | ۰ | ۰ |
| ۱ | ۰ | ۲۰۰ |
| ۲ | ۰ | ۴۰۰ |
| ۳ | ۲۵ | ۰ |
| ۴ | ۲۵ | ۲۰۰ |
| ۵ | ۲۵ | ۴۰۰ |
| ۶ | ۵۰ | ۰ |
| ۷ | ۵۰ | ۲۰۰ |
| ۸ | ۵۰ | ۴۰۰ |

روش Siwicki و همکاران (۳۱) و میزان فعالیت لیزوزیم سرم بر مبنای لیز شدن باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لیزوزیم (*Micrococcus lysodeikticus*) (شرکت ویرومد، رشت، ایران) اندازه‌گیری گردیدند (۱۱).

جهت بررسی آماری داده‌های مربوط به شاخص‌های ایمنی مورد مطالعه از آنالیز واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) به کمک نرم افزار Minitab نسخه ۱۹ استفاده گردید. همچنین در صورت معنی‌دار بودن نتایج آنالیز واریانس، از آزمون توکی برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف استفاده شد. در این مطالعه سطح معنی‌داری آزمون‌های آماری کم‌تر از ۵ درصد در نظر گرفته شد و نتایج نهایی بصورت Mean±SE گزارش گردید.

## نتایج

نتایج آنالیز واریانس مربوط به فراسنجه‌های مختلف سنجش شده در تیمارهای آزمایشی در جدول ۲ ارائه شده است.

بر اساس نتایج آنالیز واریانس (جدول ۲) شاخص‌های میزان پادتن سرم، لیزوزیم، پروتئین کل سرم، تعداد گلبول‌های سفید و تعدادگلبول‌های قرمز، گروه‌های مختلف آزمایش، تحت تاثیر تیمارهای مختلف غذایی قرار نگرفتند و تغییر معنی‌داری را نشان ندادند ($p > ۰/۰۵$).

همچنین آنالیز واریانس (جدول ۲) نشان داد که میزان فعالیت کمپلمان تنها تحت تاثیر سطوح مختلف آفلاتوکسین ب ۱ قرار گرفت و با افزایش میزانآفلاتوکسین ب ۱ در جیره غذایی، سطح فعالیت کمپلمان به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p\leq ۰/۰۵$، شکل ۱).

با توجه به نتایج، شاخص تکثیر لنفوسیت و همچنین بررسی توانایی فاگوسیتیک نوتروفیل‌ها (تست برداشت NR) به صورت هم‌افزایی تحت اثر متقابل دو سم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون قرار گرفتند (جدول ۳). بر این اساس میزان تکثیر لنفوسیت پس از قرار گرفتن در معرض سموم کاهش یافت و کم‌ترین میزان آن در تیمار حاوی ppb۵۰ آفلاتوکسین ب ۱ تعیین شد و بالاترین میزان آن به تیمار شاهد اختصاص داشت ($p\leq ۰/۰۵$). تست برداشت NR تحت تاثیر سموم قارچی مورد مطالعه کاهش یافت و کم‌ترین میزان در تیمار حاوی ppb ۵۰ آفلاتوکسین ب۱و ppb ۲۰۰ زیرالنون و بالاترین میزان در تیمار شاهد مشاهده گردید ($p\leq ۰/۰۵$، جدول ۳).

## بحث

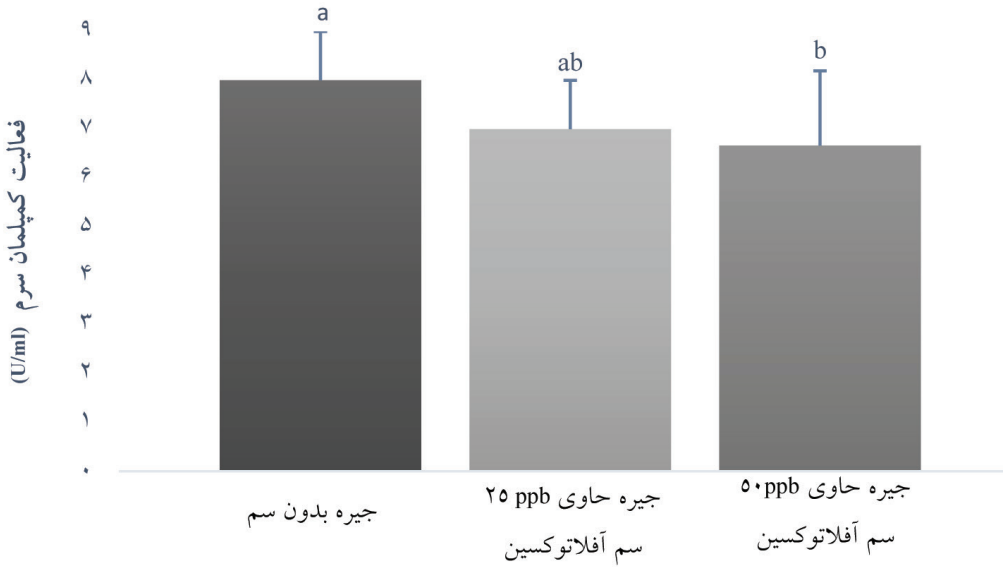
یکی از ارکان اصلی صنعت آبزی‌پروری، تغذیه و اطمینان از سلامت غذای مصرفی است. نهاده‌های غذایی که در ساخت جیره ماهیان پرورشی استفاده می‌شوند در معرض آلودگی‌های مایکوتوکسینی قرار دارند، که موجب ایجاد مشکلات زیادی برای آبزی و پرورش‌دهندگان می‌شوند (۱۷).

ایمنی ذاتی یا طبیعی در ماهی توسط سه عامل فیزیکی، سلولی و شیمیایی ایجاد می‌شود. لیزوزیم، بعضی از پروتئین‌های سیستم کمپلمان جزء عوامل شیمیایی می‌باشند. سیستم کمپلمان در پستانداران، مجموعه‌ای مشتمل بر ۳۵ نوع پروتئین سرمی است که ارتباط بسیار نزدیک و کنترل شده‌ای با یکدیگر و سایر مولکول‌های سیستم ایمنی دارند (۲۲). مطالعات انجام شده در خصوص سیستم ایمنی ماهیان، نشان داده‌است که شباهت زیادی از نظر پروتئین‌های تشکیل‌دهنده‌ی سیستم کمپلمان بین ماهیان و پستانداران وجود دارد (۱۶) در تحقیق حاضر، فعالیت کمپلمان فقط تحت تاثیر سطوح مختلف آفلاتوکسین ب ۱ جیره‌های غذایی قرار گرفت، به‌طوری که بیش‌ترین میزان تاثیر در جیره حاوی ppb ۵۰ دیده شد. تغییر فعالیت کمپلمان به‌عنوان بخشی از سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهیان، بسیار مهم است و بالا بودن میزان فعالیت آن، بیانگر سلامتی ماهی است. در غالب موارد، ساخت پروتئین کمپلمان توسط ماکروفاژهای کبدی صورت می‌گیرد، از طرف دیگر، کبد مرکز

جدول ۲- نتایج آنالیز واریانس شاخص‌های خونی و ایمنی گروه‌های مختلف آزمایشی در پایان دوره پرورش

| | کمپلمان | پروتئین کل سرم | آنتی‌بادی | لیزوزیم | تست تکثیر لنفوسیت | تست برداشت NR | گلبول‌های قرمز | گلبول‌های سفید |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | P-value | P-value | P-value | P-value | P-value | P-value | P-value | P-value |
| آفلاتوکسین ب ۱ | ۰/۰۳۹ | ۰/۶۴۶ | ۰/۵۲۶ | ۰/۳۹۸ | ۰/۰۰۰ | ۰/۰۰۰ | ۰/۷۰۲ | ۰/۶۷۴ |
| زیرالنون | ۰/۹۵۹ | ۰/۳۷۷ | ۰/۳۷۰ | ۰/۹۸۳ | ۰/۰۰۰ | ۰/۰۱۶ | ۰/۸۴۰ | ۰/۸۰۲ |
| آفلاتوکسین ب ۱× زیرالنون | ۰/۱۵۱ | ۰/۹۸۷ | ۰/۹۸۵ | ۰/۷۲۲ | ۰/۰۰۹ | ۰/۰۰۶ | ۰/۸۲۲ | ۰/۷۱۹ |

فعالیت کمپلمان(U/ml)، پروتئین کل سرم(mg/dl)، میزان پادتن(mg/ml)، لیزوزیم (µg/ml)، تکثیر لنفوسیت (OD/mg)، تست برداشت NR (OD/mg)،تعداد گلبول‌های قرمز خون ($1\times10^6$ cell/ml)، تعداد گلبول‌های سفید خون ($1\times10^3$ cell/ml).




شکل ۱- تاثیر سطوح مختلف آفلاتوکسین ب۱ جیره بر فعالیت کمپلمان، حروف متفاوت نشان دهنده تفاوتمعنی‌دار آماری است ($p \leq ۰/۰۵$).

جدول ۳- شاخص های تکثیر لنفوسیت و قدرت فاگوسیتوزی نوتروفیل‌ها (تست برداشت NR) ماهیان تیمارهای مختلف در پایان آزمایش(Mean ± SE, n=3).

| تیمار | آفلاتوکسین ب ۱ (ppb) | زیرالنون(ppb) | تست تکثیر لنفوسیت(OD/mg) | تست برداشت NR (OD/mg) |
|---|---|---|---|---|
| کنترل | ۰ | ۰ | ۲± ۰/۲ c* | ۱/۲۱± ۰/۱۱ d* |
| ۱ | ۰ | ۲۰۰ | ۱/۴۶± ۰/۱ c | ۰/۸۳± ۰/۰۹ d |
| ۲ | ۰ | ۴۰۰ | ۰/۷۶± ۰/۱ b | ۰/۵۲± ۰/۰۳ cd |
| ۳ | ۲۵ | ۰ | ۰/۵۹± ۰/۰۵ ab | ۰/۴۳± ۰/۰۵ bc |
| ۴ | ۲۵ | ۲۰۰ | ۰/۷۳± ۰/۰۶ b | ۰/۳۵± ۰/۰۲ ab |
| ۵ | ۲۵ | ۴۰۰ | ۰/۵۹± ۰/۰۳ ab | ۰/۴۱± ۰/۰۳ bc |
| ۶ | ۵۰ | ۰ | ۰/۴۸± ۰/۰۶ a | ۰/۳۵± ۰/۰۱ ab |
| ۷ | ۵۰ | ۲۰۰ | ۰/۶۴± ۰/۱ ab | ۰/۳۳± ۰/۰۳ a |
| ۸ | ۵۰ | ۴۰۰ | ۰/۵۱± ۰/۰۷ a | ۰/۳۵± ۰/۰۷ abc |

*حروف متفاوت در هر ستون نشانه وجود تفاوت آماری معنی‌دار میان تیمارها می‌باشد ($p \leq ۰/۰۵$).

سم زدایی بدناستوترکیباتگزنوژن (ترکیبات وداروها و عوامل خارجی) از مسیر کبد عبور می‌کنند. بنابراین سطوح بالایی از آفلاتوکسین ب ۱ در کبد یافت خواهد شد که به صورت موضعی بر ماکروفاژهای کبدی اثر گذاشته و مانع تولید پروتئین‌های کمپلمان توسط آن‌ها گردیده است (۱).

رنگ NR یک رنگ کاتیونی است که نوتروفیل‌ها بر اساس میزان فعالیت خود قادر به برداشت و ذخیره‌سازی آن در اندامک‌های خود (لیزوزوم) هستند. میزان برداشت رنگ NR توسط فاگوسیت‌ها به قابلیت غشایی این سلول‌ها و خصوصیت زنده‌مانی آن‌ها بستگی دارد. به نحوی که هر چقدر میزان برداشت NR توسط سلول فاگوسیت‌کننده بیش‌تر باشد، نشان‌دهنده قابلیت بیش‌تر فاگوسیتوز توسط این سلول‌ها است (۱). در مطالعه حاضر مشخص شد که سلول‌های ماهی تحت اثر هم‌افزایی سموم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون قرار گرفته و میزان برداشت NR کاهش پیدا کرده‌است. با توجه به نقص اطلاعات در این زمینه، منابعی جهت تایید یا رد نتایج حاصله ارائه نشده است.

مادهMTT پس از برداشت توسط میتوکندری سلول‌های لنفوسیت تبدیل به کریستال‌های فرومازون می‌شود. بدیهی است که هرچه قدرت و توان تکثیر لنفوسیت‌ها به دنبال تحریک با میتوژن فیتوهمآگلوتنین بیش‌تر باشد میزان فرومازون بیش‌تری تشکیل شده و در نهایت جذب نوری بالاتری ایجاد می‌شود (۱). بر این اساس به نظر می‌رسد که فاکتور تکثیر لنفوسیت تحت تاثیر اثر متقابل سموم آفلاتوکسین ب ۱و زیرالنون قرار گرفته است، به این صورت که کم‌ترین مقدار آن نسبت به تیمار شاهد، مربوط به تیمار ۶، حاوی ppb۵۰ آفلاتوکسین ب ۱ می‌باشد. ماهیانی که در جیره غذایی خود از هر دو سم به طور همزمان (اثر متقابل) تغذیه کردند (تیمارهای ۷ و ۸ در جدول ۳) نسبت به ماهیانی که از جیره حاوی آفلاتوکسین ب۱ (تیمار ۶ در جدول ۳) تغذیه نموده‌اند، دارای میزان تکثیر لنفوسیت بیش‌تری بوده‌اند و میزان بالاتری را نشان دادند. این اتفاق احتمالاً به دلیل حضور سم زیرالنون در کنار آفلاتوکسین ب ۱ بوده و ممکن است به‌دلیل رقابت با هم مانع جذب یکدیگر شوند. همچنین احتمال دارد زیرالنون به دلیل اثرات استروژنی و تأثیر مستقیم بر بیان ژن‌ها، توانسته باشد با اثرات ضد تقسیم سلولی آفلاتوکسین ب ۱ مقابله کند، که البته نیازمند بررسی‌های بیش‌تر است (۳۹).

لنفوسیت‌ها یکی از مهم‌ترین سلول‌های دفاعی بدن هستند و تکثیر آن‌ها به‌عنوان یک پاسخ آسیب‌شناختی محسوب می‌گردد. تعداد لنفوسیت‌ها در بدن ماهی نشان‌دهنده این است که سیستم ایمنی ماهی می‌تواند برای غلبه بر استرس ناشی از مواد سمی، مکانیسم دفاعی خود را فعال کند (۱۸). به‌عنوان مثال می‌توان به اثر سم دیازینون‌که از سموم متداول کشاورزی مورد استفاده در استان‌های شمالی کشور می‌باشد بر روی کپور ماهیان اشاره کرد که با تحقیق حاضر همسو بود و نتایج نشان داد که میزان تکثیر لنفوسیت ماهیانی که در معرض سم بودند، کاهش یافتند(۲۷). همینطور در مطالعه دیگری سم نوروتوکسین A بر ایمنی ماهی کپور موجب کاهش میزان تکثیر لنفوسیت آن‌ها شد (۲۹). در پژوهشی، سموم مایکوتوکسین پنی‌سیلیوم (اکراتوکسین A، سیترینین و پاچولین) بر تکثیر سلول‌های لنفوسیت خون گاو بررسی شدند و نتایج نشان داد که تکثیر سلول‌های لنفوسیت تحت تاثیر این سموم قرار گرفتند و میزان آن کاهش یافته است (۳۰)، که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارند. سموم دیازینون، نوروتوکسین A و مایکوتوکسین‌های پنی سیلیوم همانند سموم آفلاتوکسین و زیرالنون به محض ورود به بدن با آسیب به بافت‌های خون‌ساز از جمله کبد، طحال و کلیه باعث کاهش ایمنی اختصاصی در ماهی شده و سلول‌های ایمنی از جمله تعداد لنفوسیت‌ها و تکثیر آن‌ها را دست‌خوش تغییر می‌کنند (۱۹، ۲۳).

## نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی با توجه به نتایج حاصل می‌توان چنین بیان نمود که سموم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون از طریق اثرگذاری بر روی لنفوسیت‌های B و T و همچنین دخالت در ساخت پروتئین‌های خونی موجب تضعیف سیستم ایمنی ماهي‌ها شده‌اند. که این موضوع احتمالا می‌تواند منجر به بروز بیماری و نهایتا تلفات در مزارع پرورشی ماهي‌ها گردد.

## پاورقی‌ها

1- RPMI: (RosWell Park Memorial Instiute)

2- FBS: (Fetal Bovine Serum)

3- PBS (Phosphate Buffer Solution)

4- MTT: [3-(4,5Dimethylthiazol-2-Yl) – 2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]

5- Neutral Red

## منابع مورد استفاده


1. Abtahi Froushani ,S.M., Motlagh, B.M. and Ahangaran, N.A., 2015. Calcitriol modulates the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on macrophage functions. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 18(7): 672–676.

2. Akhlaghi, M. and Mirab Brojerdi, M., 1997. Investigating the effect of anesthetizing clove in fish and determining its LC50. *Journal of Veterinary Research*, 54(2): 49-52.

3. Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N. and Watanabe, T., 2001. Effects of dietary β-carotene on the immune response of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fisheries Science*, 66(6): 1068-1075.

4. Amend, D.F. and Pietsch, J.P., 1972. Virucidal activity of two iodophors to salmonid viruses. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 29(1): 61-65.

5. Arukwe, A., Grotmol, T., Haugen, T.B., Knudsen, F.R. and Goksoyr, A., 1999. Fish model for assessing the in vivo estrogenic potency of the mycotoxin zearalenone and its metabolites. *Science of the Total Environment*, 236: 153–161.

6. Bassity, E. and Clark, T.G., 2012. Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Proccedings of the National Academy of Sciences of the

United States of America (PNAS), 7(3), p.e33196.
7. Bryden, W.L., 2007. Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(S1): 95-101.
8. Bucheli, T.D., Wettstein, F.E., Hartmann, N., Erbs, M., Vogelgsang, S., Forrer, H.R. and Schwarzenbach, R.P., 2008. Fusarium mycotoxins: overlooked aquatic micropollutants?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3): 1029-1034.
9. Chavez-Sanchez, M.C., Palacios, C.M. and Moreno, I.O., 1994. Pathological effects of feeding young *Oreochromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin B1. *Aquaculture*, 127(1): 49-60.
10. Chen, H.Y. and Rawlings, R., 2008. The truth of mycotoxin contamination of feed in Asia region. *China Poult,* 30(16): 33-35.
11. Clerton, P., Troutaud, D., Verlhac, V., Gabaudan, J. and Deschaux, P., 2001. Dietary vitamin E and Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 11(1): 1-13.
12. Corrier, D.E., 1991. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 30(1): 73-87.
13. Ersali A, Baho-Aldini Baigi F, Ghasemi R., 2009. Transmission of Aflatoxins from Animal Feeds to Raw and Pasteurized Milk in Shiraz City and its Suburbs. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences.* 17(3): 175-183.
14. Fukui, H., GOTO, K. and TABATA, M., 1988. Two antimicrobial flavanones from the leaves of Glycyrrhiza glabra. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36(10): 4174-4176.
15. Ghaedi, A., Hosseinzade Sahafi, H., Zargham, D., 2015. The role of nutrition in increasing the safety of fish. *Iranian Ornamental Fish Society* (IOFS), 1(4): 24-35.
16. Holland, M.C.H. and Lambris, J.D., 2002. The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, 12(5): 399-420.
17. Khani, S., Sarvi Moghanlou, K., Imani, A., Agh, N. and Razi, M., 2016.Capability of dietary supplementation of composite toxin binder in reducing aflatoxin B1 toxicity and Its immunomodulation in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 114: 173-182.
18. Kristensen, F., Kristensen, B. and Lazary, S., 1982. The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 3(1-2): 203-277.
19. Kuiper-Goodman T., Scott P. and Watanabe H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 7(3): 253-306.
20. Kunwar, A., Barik, A., Mishra, B., Rathinasamy, K., Pandey, R. and Priyadarsini, K.I., 2008. Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects,* 1780(4): 673-679.
21. Lowry, O.H. Rosebrough, N.J. Farrand A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
22. Metzler, M., Pfeiffer, E., Hildebrand, A.A., 2010. Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. *World Mycotoxin Journal,* 3(4): 385–401.
23. Miller, D.M. and Wilson, D.M., 1994. Veterinary Diseases. The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance.
24. Mohapatra, S., N.P. Sahu, A.K. Pal, A.K. Prusty, V., Kumar and Kumar,S., 2011. Haemato-immunology and histo-architectura changes in *Labeo rohita* fingerlings: Effect of dietary aflatoxin and mould inhibitor. *Fish physiology and Biochemistry,* 37: 177-186.
25. Olsen, C.A., Meussen-Elholm, E.T.M., Hongslo, J.K., Stenersen, J. and Tollefsen, K.E., 2005. Estrogenic effects of environmental chemicals: An interspecies comparison. *Comparative Biochemistry and Physiology. Comparative Pharmacology*, 141: 267–274.
26. Pakzad, I., Rezaee, A., Rasaee, M. J., Tabbaraee, B. and Delpisheh, A. 2009. Immunogencity of HSA-L7/L12 (*Brucella abortus* ribosomal protein) in an animal model. *Iranian Journal of Immunology*, 6(1):12.
27. Porgholam, R., Esmaiely, F., Farhomand, H., Soltani, M., Yosefi, P. and Mehdad, H., 2001. Study of blood parameters of grass carp (*Ctenopharygondon idella*) after exposure to organophosphate diazinon. *Journal of Fisheries*, 3(2): 1-18.
28. Raghavan, P.R., Zhu, X., Lei, W., Han, D., Yang, Y. and Xie, S., 2011. Low levels of aflatoxin B1 could cause mortalities in juvenile hybrid sturgeon, *Acipenser ruthenus* ♀ × *A. baerii* ♂. *Aquaculture Nutrition,* 13, 39–47.
29. Rymuszka, A., 2012. Cytotoxic activity of the neurotoxin anatoxin-a on fish leukocytes *in vitro* and in vivo studies. *Acta Veterinaria Brno,* 81(2): 175-182.
30. Stec, J.A.N., Rachubik, J.A.R.O.S.Ł.A.W., Szczotka, M.A.R.I.A. and Kuźmak, J.A.C.E.K., 2008. Effects of Penicillium mycotoxins: citrinin, ochratoxin A, and patulin on *in vitro* proliferation of bovine lymphocytes. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 52: 163-167.
31. Siwicki, A.K., Anderson, D.P. and Rumsey, G. L., 1994. Dietary intake of immunostimulants by Rainbow trout affects nonspecific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41(1) :125-139.

32. Tabarestani, M., Keramati, M.R., Maroozi, F. and Keramati, A.S.G.H.A.R., 2007. The determination of hematologic reference values oriented by sex and age in general population of Mashhad. *The Horizon of Medical Sciences,* 13(2): 27-33.
33. Tollefsen, K.E., Mathisen, R. and Stenersen, J., 2003. Induction of vitellogenin synthesis in an Atlantic salmon (*Salmo salar*) hepatocyte culture: a sensitive *in vitro* bioassay for the oestrogenic and antioestrogenic activity of chemicals. *Biomarkers*, 8 :394–407.
34. Valtchev, I., Koynarski, T., Sotirov, L., Nikolov, Y. and Petkov, P., 2015. Effect of Aflatoxin B1 on Moulard Duck's Natural Immunity. *Pakistan Veterinary Journal*, 35(1): 67-70.
35. Vanyi, A., Buza, L., Széka, A., 1974. Fusariotoxicosis IV. The effect of F-2 toxin (zearalenone) on the spermiogenesis of the carp. *Hungarian Veterinary Journal*, 29: 457–461.
36. Virdi, J.S., Tiwari, R.P., Saxena, M., Khanna, V., Singh, G., Saini, S.S. and Vadehra, D.V., 1989. Effects of aflatoxin on the immune system of the chick. *Journal of Applied Toxicology*, 9(4): 271-275.
37. Williams, B.A., Mills, K.T., Burroughs, C.D. and Bern, H.A., 1989. Reproductive alterations in female C57BLCrgl mice exposed neonatally to zearalenone, an estrogenic mycotoxin. *Cancer Letters*, 46(3): 225–230.
38. Wo´zny, M., Brzuzan, P., Wolinska, L., Góra, M. and Luczynski, K.M., 2010. Preliminary evaluation of ER and AhR-mediated gene expression patterns in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver after short-term exposure to zearalenone in binary mixtures. *Environmental Biotechnology*, 6(1): 16–23.
39. Woźny, M., Dobosz, S., Obremski, K., Hliwa, P., Gomułka, P., Łakomiak, A., Różyński, R., Zalewski, T. and Brzuzan, P., 2015. Feed-borne exposure to zearalenone leads to advanced ovarian development and limited histopathological changes in the liver of pre-market size rainbow trout. *Aquaculture*, 448: 71-81.
40. Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C. and Ma˜nes, J., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1): 1–18.