جامعة الموصل
كلية الطب البيطري

دراسة التأثيرات التطورية والسمية للفلورفنيكول في اجنة الدجاج المحلي

محمد مرعي حسن الجبوري

اطروحة دكتوراه

الطب البيطري / السموم البيطرية

بإشراف

الاستاذ الدكتور
محمد خالد طه شندالة

الاستاذ المساعد الدكتور
عمار غانم محمد الحائك

1444 هـ

2023 م

الخلاصة

كان الهدف من دراستنا الحالية هو استخدام اجنة افراخ الدجاج كنموذج حساس لكشف تأثيرات المضاد البكتيري البيطري الفلورفنيكول السمية (تحديد الجرعة المميتة الوسطية المثالية) والسمية المسخية والسمية الجينية والسمية الدموية وتاثيراته على تكاثر وتمايز خلايا الدم الحمر فضلا عن دراسة تأثيراته الوعائية وعلاقة الاستجابة الوعائية مع زيادة الجرعة كمؤشر للإجهاد والتغيرات النسيجية التي يحدثها في كل من الكبد والقلب والطحال ومن ضمنها موت الخلايا المبرمج والذي تم كشفه باستخدام تقنية (TUNEL assay) وتأثير هذه التغييرات على محتوى كلايكوجين الخلايا الكبدية باستعمال صبغة – Periodic Acid (Schiff Stain) PAS stain). حيث استخدم 350 بيضة من بيض الدجاج المحلي المخصب بوزن (50 ± 2 غم) للبيضة.

كانت الجرعة المميتة الوسطية المثالية للفلورفنيكول في أَجنَّة افراخ الدجاج (354.5 ملغم \ كغم من وزن البيض ، موضعيا على الغشاء اللقانقي المشيمي في اليوم التاسع من الحضن) بعد مرور 48 ساعة من الحضن.

أَحدث الفلورفنيكول تاثيرات مسخية في أَجنة أَفراخ الدجاج وبعد مرور 48 ساعة من التعرض له مما يدل على الحساسية العالية لهذا النموذج تمثلت بفقدان تكوين العيون والأطراف والأَجنحة فضلًا عن حدوث تشوُّهات في المنقار والعيون صاحبها اضطراب في النمو.

وأَدَّت معاملة الغشاء اللقانقي المشيمي بالفلورفنيكول بالجرع (25 ، 50 ، 100 ، 200 ، 400 ، 800 ملغم \ كغم من وزن البيض ، موضعيا على الغشاء اللقانقي المشيمي) الى حدوث انخفاض معنوي في اقطار الأَوعيَّة الدموية من النوع الأَوَّل صاحبها زيادة في كثافة الأَوعيَّة الدموية من النوع الثاني والثالث وبشكل معتمد على الجرعة مقارنة مع مجموعة السيطرة وتؤكد هذه النتيجة علاقة الاستجابة الوعائية مع زيادة الجرعة كمؤشر للإجهاد.

وفيما يخص تأثير زيادة جرعة الفلورفينكول (50 و100 ملغم \ كغم من وزن البيض، الغشاء اللقانقي المشيمي) وعدد أيام التعرض (8 او 8 و 9 او 8 و 9 و 10) من الحضن لهذه الجرع على التكاثر

الخلوي لخلايا الدم الحمر لأجنة افراخ الدجاج، فقد كانت هذه التاثيرات على اشدها في المجموعة المعاملة بجرعة (100 ملغم \ كغم من وزن البيض) والمعرضة للدواء في الأيام (8 و 9 و 10) من الحضن تمثلت بالانخفاض الكبير في نسبة (خلايا الدم الناضجة \ خلايا الدم غير الناضجة) نتيجة الظهور الكثيف لخلايا الدم الحمر غير الناضجة حيث كانت خلايا الهدف للتاثيرات المضادة للتكاثر الخلوي المحدثة بالدواء بسبب امتلاكها انقسامات خلوية كبيرة مما أدى الى عدم وصولها الى مرحلة النضوج الكامل.

أدى تعرض اجنة افراخ الدجاج في اليوم 12 من الحضن للفلورفنيكول بجرع (25 ، 50 ، 100 ، 200 ، 300 ، 400 ملغم \ كغم من وزن البيض ، الغرفة الهوائية) الى حدوث تأثيرات سمية دموية وبطريقة معتمدة على الجرعة في اليوم 18 من الحضن كانت على اشدها عند التعرض الى الجرعة العالية (400 ملغم \ كغم من وزن البيض) تمثلت بظهور الفجوات السايتوبلازمية وفجوات نووية في اسلاف خلايا الدم الحمر والبيض رافقها تغيرات في نواة خلايا الدم الناضجة مع حدوث تكسر وتحلل لخلايا الدم بالمقارنة مع الجرع الأخرى ومجموعة السيطرة.

ان التغيرات النسيجية في كل من (القلب والكبد والطحال) في اجنة افراخ الدجاج في اليوم 18 من الحضن والمعاملة بالفلورفنيكول (75 ، 150 ملغم \ كغم ، في الغرفة الهوائية) في اليوم 12 من الحضن كانت معتمدة على الجرعة وعلى نوع العضو فقد كانت هذه التغيرات على اشدها في المجموعة المعاملة بجرعة (150 ملغم \ كغم من وزن البيض) المتمثلة في الزيادة كبيرة في عدد الخلايا الكبدية الحاوية على الفجوات السايتوبلازمية مما أدى الى فقدانها التركيب السوي رافقها حدوث نقص التنسج في الالياف العضلية لخلايا عضلة القلب وظهورها بصورة غير منتظمة في حين كانت التغيرات النسيجية في الطحال على شكل زيادة معنوية في عدد الاوعية الدموية والمراكز الانتاشية الطحالية رافقها حدوث انخفاض معنوي في اقطار هذه المراكز الانتاشية ، كما كشفت صبغة (TUNEL) الخاصة بكشف موت الخلايا المبرمج عن وجود اعداد كبيرة من الخلايا الكبدية والقلبية والطحالية كانت موجبة لهذه الصبغة .

أدت معاملة اجنة افراخ الدجاج بالفلورفنيكول (150 ملغم \ كغم ، في الغرفة الهوائية) في اليوم 12 من الحضن الى حدوث انخفاض في محتوى الكلايكوجين في الخلايا الكبدية في اليوم 18 من الحضن تم كشفها باستخدام صبغة (PAS) وذلك بسبب التغيرات النسيجية في خلايا الكبد (موت الخلايا المبرمج) .

نستنتج من نتائج دراستنا الحالية امتلاك المضاد البكتيري البيطري الفلورفنيكول تاثيرات سمية مسخية وسمية جينية وسمية دموية وتاثيرات مضادة للتكاثر الخلوي لخلايا الدم الحمراء وتغيرات نسيجية في كل من الكبد والقلب سببها احداث المضاد لموت الخلايا المبرمج وتعكس هذه التاثيرات السمية خطورة تعرض المستهلك لبقايا هذا المضاد البكتيري في المنتجات الحيوانية (اللحوم والحليب والبيض) بسبب استخدامه الواسع في علاج الحيوانات المنتجة للغذاء (الابقار والاغنام والدواجن).

University of Mosul
College of Veterinary Medicine

Study of developmental and toxic effects of florfenicol in local chick embryos

Mohammad Maree Hasan Al-Jubory

Ph.D. Dissertation

Veterinary Medicine / Veterinary Toxicology

Supervised by

Professor **Dr.Mohammed Khalid Shindala**

Assistant Professor **Dr.Ammar Ghanim Alhaek**

2023 A.D. **1444 A.H.**

Abstract

The aim of our current study was to use chick embryos as a sensitive model to detect the toxic effects of the veterinary antibacterial florfenicol (determining the ideal lethal dose), teratogenic, genotoxic, and hematotoxicity and its effects on the proliferation and differentiation of red blood cells, as well as studying its vascular effects and the relationship of the vascular response with increasing the dose (as an indicator of stress) and the histological changes that it causes in the liver, heart and spleen, including programmed cell death, which was detected using the (TUNEL assay) technique, and the effect of these changes on the glycogen content of hepatocytes using the Periodic Acid - Schiff Stain (PAS stain). We used 350 fertilized local chicken eggs with a weight of (50 ± 2 g) per egg.

Florfenicol produced teratogenic effects in chick embryos 48 hours after exposure to it, which indicates the high sensitivity of this model represented by the loss of the formation of eyes, limbs and wings, in addition to the occurrence of deformities in the beak and eyes accompanied by a growth disorder.

Treatment of the chorioallantoic membrane with florfenicol in doses (25, 50, 100, 200, 400, 800 mg/kg of egg weight, locally on the chorioallantoic membrane) resulted in a significant decrease in the diameter of blood vessels of the first type accompanied by an increase in the density of blood vessels of the second and third types in a dose-dependent manner compared with the control group, and this result confirms the relationship of vascular response with increasing the dose as an indicator of stress.

Regarding the effect of increasing the dose of florfenicol (50 and 100 mg / kg of egg weight, locally on the chorioallantoic membrane) and the number of exposure days (8^{th} or 8^{th} and 9^{th} or 8^{th}, 9^{th}, and 10^{th} days) of incubation to these doses on the cellular proliferation of red blood cells of chick embryos, these effects were most severe in the group treated with a dose of (100 mg / kg of egg weight) and exposed to the drug on days (8, 9 and 10) of incubation which represented as a decrease in the ratio of mature to immature red blood cells (appearance of larg numbers of immature red blood cells) which is considered as the target cells for the drug-induced anti-

proliferation effects because they had large cell divisions, which led to their failure to reach the stage of full maturity.

Exposure of chick embryos on the 12th day of incubation to florfenicol at doses (25, 50, 100, 200, 300, 400 mg/kg of egg weight, air chamber) resulted in hematotoxic effects in a dose-dependent manner on the 18th day of incubation. The most severe effects occurred when exposed to the high dose (400 mg / kg of egg weight) and was represented by the appearance of cytoplasmic vacuoles and nuclear vacuoles in the progenitors of red and white blood cells, accompanied by changes in the nucleus of mature blood cells with the occurrence of breakage and decomposition of blood cells compared with the other doses and the control group.

The histological changes in each of the heart, liver and spleen in the embryos of chicks on the 18th day of incubation and treatment with florfenicol (75, 150 mg / kg, in the air chamber) on the 12th day of incubation were dependent on the dose and the type of organ. These changes were the most severe in the group treated with a dose of (150 mg / kg of egg weight) represented by a significant increase in the number of hepatocytes containing cytoplasmic vacuoles, which led to their loss of normal structure, accompanied by the occurrence of hypoplasia in the muscle fibers of the heart muscle cells and their irregular appearance, while the histological changes in the spleen were in the form of a significant increase in the number of blood vessels and splenic germinal centers, accompanied by a significant decrease in the diameters of these germinal centers. The TUNEL stain for programmed cell death revealed the presence of large numbers of hepatic, cardiac and splenic cells that were positive for this dye.

Treatment of chick embryos with florfenicol (150 mg/kg, in the air chamber) on the 12th day of incubation led to a decrease in the glycogen content in the hepatocytes on the 18th day of incubation, which was detected using the (PAS) stain, due to histological changes in the hepatocytes (Apoptosis).

We conclude from the results of our current study that the veterinary antibacterial florfenicol has teratogenic, genotoxic, hematotoxic, anti-proliferative effects of red blood cells, and histological changes in both the

liver and the heart caused by induction of apoptotic events. These toxic effects reflect the danger of consumer exposure to the residues of this antibacterial in animal products (meat, milk and eggs) due to its wide use in the treatment of food-producing animals (cows, sheep and poultry).