آثار آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بر پاسخ سیستم ایمنی، آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و شاخص‌های خونی جوجه‌های گوشتی

حسن صالح[۱*]، ابوالقاسم گلیان[۲]، حسن کرمانشاهی[۲]، محمدطاهر میرکزهی[۳] و محمدجواد آگاه[۴]

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۴

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی آثار α-توکوفرول استات، پوست و عصاره‌ی پوست انار بر پاسخ سیستم ایمنی هومورال و سلولی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های خونی جوجه‌های گوشتی، انجام شده است. در این تحقیق، تعداد ۳۸۴ قطعه جوجه‌ی گوشتی نر یک روزه سویه راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی، با ۸ تیمار غذایی و ۴ تکرار ۱۲ جوجه‌ای در هر واحد آزمایشی، به مدت ۴۲ روز تغذیه شدند. هشت تیمار غذایی، شامل جیره‌ی شاهد فاقد افزودنی، جیره‌ی شاهد حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم α-توکوفرول استات، جیره‌های حاوی ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره‌ی پوست انار و جیره‌های حاوی ۱، ۲ و ۳ گرم در کیلوگرم پوست انار بودند. به منظور بررسی تغییرهای سیستم ایمنی، تغییرهای تیتر آنتی‌بادی با تزریق گلبول قرمز خون گوسفند در ۲۶ و ۳۲ روزگی مورد بررسی قرار گرفت. در سن ۲۸ روزگی، ۲ پرنده از هر گروه آزمایشی به وسیله‌ی فیتو هموگلوتنین، چالش شدند و پاسخ به آن برای بررسی سیستم ایمنی سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. با خون‌گیری از ۲ قطعه پرنده در هر واحد آزمایشی، اندازه‌گیری میزان کلسترول، تری گلیسرید، LDL سرم خون و آنزیم‌های کبدی AST و ALT در روزهای ۴۲ انجام شد. میزان اکسیداسیون با اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید MDA و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پلاسما مورد بررسی قرار گرفت. نتایج، نشان داد که پاسخ سیستم ایمنی هومورال در جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی α-توکوفرول استات و عصاره‌ی پوست انار، بهبود یافت ($p<۰/۰۵$)؛ اما چالش با فیتوهموگلوتنین، سیستم ایمنی سلولی جوجه‌ها را تحت تأثیر قرار نداد ($p>۰/۰۵$). میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، MDA و تری-گلیسرید در جوجه‌های تغذیه شده با عصاره‌ی پوست انار و α-توکوفرول تغییرهای معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$)؛ ولی سایر شاخص‌های خونی و آنزیم‌های کبدی، تحت تأثیر قرار نگرفتند. در مجموع، افزودن ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره‌ی پوست انار به جیره‌ی جوجه‌های گوشتی، سبب بهبود پاسخ سیستم ایمنی، کاهش اکسیداسیون و تری‌گلیسرید خون شده است.

کلمات کلیدی: اسیدهای چرب، آنتی‌اکسیدان، پوست انار، ترکیبات فنلی

مقدمه

در سال‌های اخیر، تغذیه‌ی اسیدهای چرب غیر اشباع با زنجیره‌ی بلند[۱] (LC-PUFA: n-3) در انسان و حیوان، مورد توجه خاص، قرار گرفته است. با تغییر اسیدهای چرب جیره، حیوانات تک معده‌ای ممکن است بدون تغییر قابل ملاحظه‌ای، آن‌ها را در بافت‌های خوراکی جذب و ذخیره کنند. جیره‌های حاوی روغن ماهی،

[۱*] استادیار گروه علوم دامی، مجتمع آموزش عالی سراوان E-mail: saleh_tmu@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] استاد گروه علوم دامی، مرکز تحقیقات علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۳] استادیار گروه علوم دامی، مجتمع آموزش عالی سراوان

[۴] استادیار پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس

1- Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid n-3

سرشار از اسیدهای چرب n-۳ می‌باشند که مهم‌ترین آن‌ها شامل اسید ایکوزاپنتانوئیک[1] (EPA)، اسید دوکوزا پنتانوئیک[2] (DPA) و اسید دوکوزا هگزانوئیک[3] (DHA) می‌باشند. تجمع اسیدهای چرب امگا- ۳ داخل گوشت و تخم‌مرغ به وسیله‌ی تغذیه‌ی جیره‌های غنی از n-۳ در تغذیه‌ی طیور، امکان پذیر می‌باشد (Rymer and Givens 2010). یکی از مهم‌ترین مشکلات برای محقق شدن افزایش این اسیدهای چرب در طیور، کنترل اکسیداسیون چربی با افزایش درجه‌ی غیر اشباع بودن اسیدهای چرب در گوشت‌های غنی شده، می‌باشد (Spolare et al. 2005)؛ البته یکی از روش‌های کاهش اکسیداسیون چربی، استفاده از آنتی‌اکسیدان می‌باشد. علاقه‌مندی به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی با منشاء طبیعی در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتیتیک، به دلیل امنیت و سلامت غذایی، خوشمزگی و پایداری در داخل گوشت، طی سالیان اخیر افزایش یافته است (Kim et al. 2006, Nagendra Prasad et al. 2009). فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان به دلیل ترکیب‌های فنلی موجود در آن‌هاست که به صورت ترکیب‌های فرار می‌باشد. مطالعات قبلی نشان از کاهش آثار منفی حاصل از اکسیداسیون با استفاده از جیره‌های حاوی مخلوط گیاهان دارویی و تفاله‌ی انگور دارد (Brenes et al. 2008, Wang et al. 2008).

از سویی، ایران به عنوان اولین و بزرگ‌ترین تولید کننده و صادرکننده‌ی انار در جهان شناخته شده است (Yasoub et al. 2007). پوسته‌ی انار، یکی از فرآورده‌های فرعی کارخانجات تهیه‌ی آب‌میوه و رب انار می‌باشد. سالیانه هزاران تن محصول جانبی (پوست و دانه) این میوه در کارخانجات فرآوری، بدون استفاده دور ریخته می‌شود. پوست انار، حاوی منابع غنی آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنلی می‌باشد. مهم‌ترین ترکیب‌های فنلی موجود در پوست انار، شامل اسید گالیک، اسید الاجیک، پونی‌کالین، پونی‌کالاجین، آنتوسانیدین و فلاوانول می‌باشند. بر اساس مطالعاتی که در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفته، مشخص شده است که ترکیب‌های پلی‌فنولیک انار، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، جلوگیری از تصلب شرایین، کاهش اکسیداسیون LDL، ممانعت از رسوب پلاکت‌های خون، بهبود سیستم ایمنی، سرطان پروستات و سرطان روده‌ی بزرگ، خاصیت ضدباکتریایی و ضدویروسی هستند و پوست انار، حاوی منابع غنی آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنلی می‌باشد (Madrigal-Carballob et al. 2009). در طی سال‌های اخیر، مطالعاتی درباره‌ی نقش اسیدهای چرب غیر اشباع در سیستم ایمنی طیور، انجام شده است. ایکوزانوئیدها مواد شبه هورمون می‌باشند که دارای فعالیت بیولوژیکی در تنظیم پلاکت‌ها، تداخل در دیواره‌ی رگ‌ها، منوسیت‌ها و ماکروفاژها هستند. محصول نهایی متابولیسم ایکوزانوئیدهای (پروستاگلاندین‌ها و لوکوترین‌ها) مشتق شده از اسیدهای چرب n-۳ توان بیولوژیکی در تحریک پاسخ سلولی دارند و معمولاً باعث کاهش التهاب می‌شوند. مهم‌ترین اندام‌های ایمنی در طیور، تیموس، طحال و بورس فابریسیوس هستند. در طی پاسخ سیستم ایمنی، لنفوسیت‌های بالغ و سلول‌های دیگر سیستم ایمنی با آنتی‌ژن درگیر می‌شوند؛ در نتیجه، اندازه‌ی بافت ایمنی ممکن است نشان دهنده‌ی وضعیت سیستم ایمنی باشد (Al-Khalifa et al. 2012). هدف از این آزمایش، بررسی آثار افزودن α-توکوفرول استات، پوست و عصاره‌ی انار، در جیره‌های حاوی روغن ماهی بر پاسخ سیستم ایمنی هومورال و سلولی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های خونی جوجه‌های گوشتی است.

مواد و روش کار

استخراج عصاره

در ابتدا پوست انار (واریته اردستانی کشت شده در تربت حیدریه) از کارخانه‌ی آب‌میوه‌گیری (انارین،

1- Eicosa pantadocanoic acid
2- Docosa pantadocanoic acid
3- Docosa hexaenoic acid

فردوس) تهیه و سپس به آزمایشگاه منتقل و در دمای محیط خشک و با استفاده از آسیاب (مش ۴۰) خرد شد و به منظور محافظت ترکیبات فنلی موجود در آن، در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان انجام دادن آزمایش، نگه‌داری گردید. برای عصاره‌گیری پوست، از حلال متانول/آب (۶۰/۴۰) استفاده شد؛ مقدار ۴ لیتر از حلال به یک کیلوگرم پوست انار افزوده و به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق، نگه‌داری گردید. سپس محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شد. پس از آن، محلول با کاغذ واتمن شماره‌ی ۴۲ فیلتر گردید تا ذرات درشت به خوبی جدا شوند و عصاره‌گیری مجدداً با ذرات درشت تکرار شد. بعد از عصاره‌گیری، محلول با استفاده از روتاری اواپریتور (تحت شرایط خلاء و ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد) تغلیظ و در شرایط انجماد، نگه‌داری شد (Madrigal-Carballob et al. 2009).

حیوانات و جیره‌های آزمایشی

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی، انجام گردید. بدین منظور تعداد ۳۸۴ قطعه جوجه‌ی گوشتی نر یک روزه سویه‌ی راس ۳۰۸ با ۸ تیمار غذایی و ۴ تکرار ۱۲ جوجه‌ای به مدت ۴۲ روز تغذیه شدند. برای غنی‌سازی گوشت، ۲ درصد روغن ماهی به همه‌ی جیره‌ها افزوده گشت. هشت تیمار غذایی، شامل جیره‌ی شاهد فاقد آنتی‌اکسیدان، جیره‌ی شاهد حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم α-توکوفرول استات، جیره‌های حاوی ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره‌ی پوست انار و جیره‌های حاوی ۱، ۲ و ۳ گرم در کیلوگرم پوست انار بودند. هم‌چنین برای یکسان‌سازی میزان فیبر در تمامی تیمارها، مقدار ۳ گرم در کیلوگرم خاک اره در همه‌ی جیره‌ها به جز جیره‌های حاوی پوست انار، مورد استفاده قرار گرفت. همه‌ی جیره‌ها دارای غلظت انرژی قابل متابولیسم و درصد مواد مغذی یکسان و بر اساس راهنمای پرورش راس ۳۰۸ تنظیم شدند (جدول ۱)؛ البته جوجه‌ها در کل دوره‌ی پرورش، به آب و غذا دسترسی آزاد داشتند.

بررسی سیستم ایمنی

ارزیابی سیستم ایمنی همورال

به منظور بررسی وضعیت سیستم ایمنی پرندگان مورد مطالعه، تغییرات تیتر آنتی‌بادی با تزریق گلبول قرمز خون گوسفند[1] (۲ درصد) به عنوان یک آنتی‌ژن غیر بیماری‌زا، در دو نوبت، مورد بررسی قرار گرفت. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون ۲ درصد گلبول قرمز خون گوسفند به ورید بال ۳ جوجه از هر تکرار در ۲۶ روزگی تزریق شد و ۶ روز پس از تزریق در ۳۲ روزگی از جوجه‌ها خون‌گیری به عمل آمد و تزریق دوم SRBC نیز انجام شد. سپس ۶ روز پس از تزریق دوم در ۳۸ روزگی برای بررسی پاسخ ثانویه، مجدداً خون‌گیری به عمل آمد. در نهایت تیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه SRBC با استفاده از روش میکروتیتر، اندازه‌گیری شد (Boa-Amponsem et al. 2001). برای اندازه‌گیری ایمنو گلوبولین G از مرکاپتواتانول ۰/۰۱ مولار استفاده شد. ذکر این نکته لازم است که از تفریق ایمنوگلوبولین G از عدد کل، مقدار ایمنو گلوبولین M حاصل شد.

ارزیابی سیستم ایمنی سلولی

در سن ۲۸ روزگی، پوست بین انگشتان پای ۲ پرنده از هر گروه آزمایشی، با ۰/۱ میلی‌لیتر فیتوهموگلوتنین (محلول حاوی ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فیتوهموگلوتنین) چالش و با استفاده از کولیس دیجیتال، با دقت ۱± میکرومتر، اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی میزان تکثیر سلول‌های T در سیستم ایمنی سلولی، اختلاف ضخامت قبل و بعد از هر تزریق به عنوان معیار سنجش، در نظر گرفته شد. ضخامت پوست در زمان صفر، پیش از چالش و ۲۴ ساعت پس از چالش، اندازه‌گیری گردید. میانگین افزایش ضخامت پوست در هر پرنده، از اختلاف ضخامت قبل و بعد از هر چالش به دست آمد. هر عدد اندازه‌گیری شده، میانگینی از سه تکرار اندازه‌گیری از ناحیه‌ی مورد

1- Sheep Red Blood Cell (SRBC)

نظر بود و به عنوان میانگین هر پرنده‌ی درون هر گروه آزمایشی در نظر گرفته شد. اندازه‌گیری‌های روز ۳۳ نیز به همین روش، صورت گرفت (Thompson et al. 1980). هم‌چنین، در ۴۲ روزگی، یک قطعه جوجه از هر تکرار، کشتار و وزن اندام‌های لنفاوی، شامل تیموس، طحال و بورس فابرسیوس اندازه‌گیری شد.

جدول ۱: ترکیب جیره‌های آزمایشی (درصد) جهت بررسی اثر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بر پاسخ‌های ایمنی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی خون ماکیان گوشتی

اجزای جیره	دوره‌ی آغازین (۷-۰)	دوره‌ی رشد (۲۴-۸)	دوره‌ی پایانی (۲۵-۴۲)
ذرت	۵۰/۵۰	۵۴/۴۰	۵۲/۹۰
سویا	۳۵/۵۰	۳۱/۵۶	۳۳/۸۶
گلوتن درت	۵/۰۰	۴/۰۰	۲/۴۰
چربی حیوانی	۲/۰۰	۳/۵۰	۵/۰۰
روغن ماهی[1]	۲/۰۰	۲/۰۰	۲/۰۰
آنتی‌اکسیدان[2]	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
خاک اره[3]	۰/۳۰	۰/۳۰	۰/۳۰
دی کلسیم فسفات	۱/۷۷	۱/۶۰	۱/۴۰
سنگ آهک	۰/۳۸	۱/۰۷	۱/۰۵
نمک	۰/۳۵	۰/۴۷	۰/۴۱
دی ال-ترئونین	۰/۰۸	۰/۰۶	۰/۰۰
دی ال- متیونین	۰/۳۲	۰/۲۶	۰/۱۸
ال- لیزین	۰/۳۸	۰/۲۸	۰/۰۰
مکمل معدنی-ویتامینه[4]	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰
انرژی قابل متابولیسم (کیلو کالری /کیلوگرم)	۳۰۲۵/۰۰	۳۱۵۰/۰۰	۳۲۰۰/۰۰
پروتئین خام (درصد)	۲۳/۵۰	۲۱/۴۳	۲۱/۰۰
چربی خام (درصد)	۵/۳۲	۵/۹۹	۷/۳۲
فیبرخام (درصد)	۵/۷۲	۵/۵۱	۵/۵۹
کلسیم	۱/۰۵	۰/۹۰	۰/۸۵
فسفر قابل دسترس	۰/۵۰	۰/۴۵	۰/۶۳
لیزین	۱/۴۳	۱/۲۴	۱/۰۶
متیونین	۰/۷۰	۰/۵۵	۰/۵۲
متیونین+سیستین	۱/۰۷	۰/۹۵	۰/۸۶

[1] روغن ماهی از شرکت مهرگان خزر رشت، تهیه گردید.

[2] هشت تیمار غذایی، شامل جیره‌ی شاهد فاقد آنتی‌اکسیدان، جیره‌ی شاهد حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم α-توکوفرول استات، جیره‌های حاوی ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره‌ی پوست انار و جیره‌های حاوی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ گرم در کیلوگرم پوست انار بودند.

[3] مقادیر پوست انار در جیره‌های حاوی پوست انار، جایگزین خاک اره شد.

[4] در هر کیلوگرم جیره، مقادیر: ۷۰۴۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۲۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D_3، ۸/۸ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۱/۷۶ میلی‌گرم ویتامین K_3، ۱/۲ میلی‌گرم ویتامین B_1، ۳/۲ میلی‌گرم ویتامین B_2، ۶/۴ میلی‌گرم ویتامین B_3 (کلسیم پنتوتنات)، ۲۸ میلی‌گرم ویتامین B_5 (نیاسین)، ۱/۹۷ میلی‌گرم ویتامین B_6، ۰/۳۸ میلی‌گرم ویتامین B_9 (فولیک اسید)، ۰/۰۰۸ میلی‌گرم ویتامین B_{12}، ۰/۱۲ میلی‌گرم ویتامین H_2 (بیوتین) و ۳۲۰ میلی‌گرم کولین کلراید را در هر کیلوگرم جیره تأمین کرد و هم‌چنین، پیش مخلوط معدنی اضافه شده به جیره، مقادیر ۶۰ میلی‌گرم منگنز، ۶۰ میلی‌گرم آهن، ۵۱/۷۴ میلی‌گرم روی، ۴/۸ میلی‌گرم مس، ۰/۶۹ میلی‌گرم ید و ۰/۱۶ میلی‌گرم سلنیوم را تأمین شد.

اندازه‌گیری لیپیدها، پروتئین و فعالیت آنزیم‌های سرمی

برای اندازه‌گیری میزان کلسترول، تری‌گلسیرید، LDL سرم پلاسما، در روزهای ۴۱ پرورش جوجه‌های گوشتی از هر واحد آزمایشی، ۲ قطعه پرنده انتخاب شد و از طریق ورید بال آن‌ها، خون‌گیری به عمل آمد. نمونه‌های خون به مدت ۴ تا ۶ ساعت در دمای اتاق برای جدا شدن سرم از لخته، نگه‌داری گردید و بعد از گذشت این زمان، سرم در داخل میکروتیوب ریخته شد . سپس در آزمایشگاه برای اطمینان از عدم باقی ماندن لخته در پلاسما در دور ۳۵۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه، سانتریفیوژ شد . آن‌گاه، کلسترول، تری گلیسرید، AST و ALT کبدی و LDL سرم خون به کمک دستگاه اتوآنالیزر اسپکتروفتومتری (اتوآنالایزر بیوسیستم ۱۵A، شرکت بیوسیستم) تعیین گردید. در هنگام خون‌گیری، هم‌چنین ۲ میلی‌لیتر از خون، در لوله‌های هپارینی قرار داده شده در داخل یخ، برای به دست آوردن پلاسما ریخته شد. این همولیزات برای اندازه‌گیری MDA و آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی، مورد استفاده قرار گرفت (Hosseini-Vasha et al. 2012). فعالیت آنزیم‌های گلوتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از کیت تجاری رنسل و رنسد[1] انجام گرفت (RandoxLaboratories Limited, 55 Diamond Road, Crumlin, County Antrim, BT29 4QY, United Kingdom).

اندارهگیری میزان MDA پلاسما

برای بررسی میزان مالون دی آلدئید به عنوان شاخصی از میزان اکسیداسیون در پلاسمای خون (آماده شده در مرحله‌ی قبل) از آزمایش TBARS استفاده شد. بدین منظور، ابتدا محلول برای ساخت ۵۰ میلی‌لیتر معرف آماده گردید. مقدار ۷/۵ گرم تری کلرواستیک اسید + ۱۸۷ میلی‌گرم TBA + ۶/۲۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک (۲ نانومول بر لیتر) مخلوط شد و داخل بن ماری آب جوش، قرار گرفت تا به خوبی حل شود. سپس برای انجام دادن آزمایش، ۳ میلی‌لیتر معرف آماده با ۳۰۰ مایکرولیتر از پلاسما در داخل لوله‌ی آزمایش دردار می‌ریزیم، در آن را محکم می‌بندیم و در بن ماری، قرار می‌دهیم. پس از آن، به مدت ۲۰ دقیقه لوله‌های آزمایش در بن ماری با دمای ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌گذاریم. سپس لوله‌ها از آب گرم، خارج می‌کنیم و به سرعت در آب سرد قرار می‌دهیم تا زود خنک شوند. آن‌گاه، در لوله‌ها را باز کرده و به هر کدام ۲ میلی‌لیتر ایزو بوتانول اضافه می‌کنیم و به مدت ۲۰ ثانیه با هم‌زن مخلوط می‌نماییم. بعد از سانتریفوز کردن به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه با سانتریفوز یخچال‌دار، بلافاصله در طول موج ۵۳۲ خوانده شدند (Wang et al. 2008).

آنالیز آماری

در این مرحله، داده‌های حاصل شده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS در قالب طرح کاملاً تصادفی، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. برای مقایسه‌ی میانگین، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده گردید. مدل ریاضی این طرح در حالت کلی به صورت زیر است:

$$X_{ij} = \mu + t_i + \varepsilon_{ij}$$

X_{ij}=مقدار هر مشاهده، μ = میانگین جمعیت، t_i =اثر تیمار iام، ε_{ij} = اثرخطا

نتایج

بررسی سیستم ایمنی

درصد اجزای لاشه‌ی مرتبط با سیستم ایمنی

تأثیر مکمل‌های α توکوفرول استات و سطوح مختلف عصاره‌ی پوست و پوست انار بر وزن نسبی (درصد)، بورس فابریسیوس، تیموس و طحال در جدول ۲ نشان داده شده است. افزودن پوست انار به جیره، سبب افزایش وزن نسبی تیموس و کاهش وزن نسبی بورس گردید. هم‌چنین افزودن عصاره‌ی پوست، سبب افزایش نسبی

1- RANSEL and RANSOD kit

وزن تیموس، بورس و طحال شد (p<۰/۰۵)؛ البته مکمل کردن جیره با α توکوفرول استات، تغییر معنی‌داری بر وزن نسبی بورس فابریسیوس، تیموس و طحال ایجاد نکرد.

جدول ۲: تأثیر تغذیه‌ی مکمل‌های α توکوفرول استات، عصاره‌ی پوست انار و پوست انار بر وزن نسبی (درصد) اجزای لاشه‌ی مرتبط با سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی در ۴۲ روزگی

اجزای لاشه	جیره‌ی شاهد	میلی‌گرم در کیلوگرم α توکوفرول استات در جیره‌ی شاهد	میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره‌ی پوست انار در جیره‌ی شاهد			گرم در کیلوگرم پوست انار در جیره‌ی شاهد			P-Value	SEM[1]
	فاقد مکمل	۲۰۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۱	۲	۳		
بورس فابریسیوس	۰/۲۶^{b}	۰/۲۶^{b}	۰/۲۷^{ab}	۰/۲۹^{a}	۰/۲۹^{a}	۰/۲۴^{c}	۰/۲۳^{c}	۰/۲۴^{c}	۰/۰۵	۰/۰۸
تیموس	۰/۱۰۲^{b}	۰/۱۰۰^{b}	۰/۱۰۷^{a}	۰/۱۰۸^{a}	۰/۱۰۹^{a}	۰/۱۰۹^{a}	۰/۱۱۰^{a}	۰/۱۰۹^{a}	۰/۰۵	۰/۰۵
طحال	۰/۱۱^{b}	۰/۱۱^{b}	۰/۱۲^{b}	۰/۱۴^{a}	۰/۱۳^{ab}	۰/۱۲^{a}	۰/۱۱^{a}	۰/۱۲^{a}	۰/۷۸	۰/۰۵

$^{b-a}$ میانگین‌های هر سطر برای هر عامل که دارای حروف مشابه نباشند، دارای تفاوت معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵). [1] SEM: میانگین انحراف استاندارد

سیستم ایمنی هومورال

میزان پاسخ ایمنی اولیه و ثانویه، علیه آنتی‌ژن گلبول قرمز گوسفند در جدول ۳ نشان داده شده است . عیار پادتن IgM، IgG و آنتی‌بادی تام، ضد گلبول قرمز گوسفند در نوبت اول، تحت تأثیر افزودن عصاره‌ی پوست، پوست انار و α توکوفرول استات قرار گرفت و اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). در هر سه جوجه‌ی تغذیه شده با پوست انار، کم‌ترین و عصاره‌ی پوست و α توکوفرول استات، بیش‌ترین مقدار را نشان دادند . تأثیر تیمارهای آزمایشی بر پاسخ ایمنی ثانویه، مشابه پاسخ اولیه، اثری معنی‌دار نشان داد (P<۰/۰۱). در بررسی سیستم ایمنی، مقادیر ذکر شده برای نوبت اول، بیان‌کننده‌ی پاسخ ایمنی اولیه و مقادیر نوبت دوم خون‌گیری مربوط به پاسخ ایمنی ثانویه می‌باشند.

سیستم ایمنی سلولی

نتایج ارزیابی حساسیت پوستی بازوفیل[1] (CBH) که برای بررسی میزان پاسخ ایمنی سلولی، مورد استفاده قرار می‌گیرد، در جدول ۳ نشان داده شده است . تفاوت معنی‌داری بین ضخامت پوست بین انگشتان پا بعد از ۲۴ ساعت چالش با فیتو هموگلوتنین، بین جوجه‌های تغذیه شده با مکمل‌های مختلف، مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

لیپیدها و آنزیم‌های کبدی خون

تأثیر افزودن مکمل‌های آنتی‌اکسیدان‌های α-توکوفرول استات و سطوح مختلف عصاره‌ی پوست و پوست انار در جیره بر لیپیدها و آنزیم‌های کبدی خون در جدول ۴ نشان داده شده است . دو آنزیم گلوتامیک اگزالو استیک ترانس آمیناز، (GOT) و گلوتامیک پیرویک ترانس آمیناز (GPT) تحت تأثیر افزودن α- توکوفرول استات و سطوح مختلف عصاره و پوست انار قرار نگرفتند و اختلاف معنی‌داری از نظر آماری، نشان ندادند. هم‌چنین لیپیدهای پلاسما، کلسترول و لیپوپروتئین با دانسیته‌ی کم (LDL) تحت تأثیر مکمل ذکر شده، قرار نگرفتند. تری‌گلسیرید به عنوان دیگر لیپید پلاسما با افزودن α-توکوفرول استات و عصاره‌ی پوست انار، کاهش نشان داد (P<۰/۰۵). از سویی، کم‌ترین میزان تری‌گلسیرید در سطوح مختلف پوست انار، مشاهده شد.

1- Cutaneous basophil hypersensitivity assay

جدول ۳: تأثیر تغذیه مکمل‌های α توکوفرول استات و عصاره‌ی پوست انار و پوست انار بر پاسخ ایمنی هومورال و سلولی

تیمارهای غذایی		عیار اولیه‌ی پادتن ضد گلبول قرمز گوسفند[1]			عیار ثانویه‌ی پادتن ضد گلبول قرمز گوسفند			پاسخ سیستم ایمنی سلولی (میلی متر)[2]
		IgM	IgG	کل آنتی‌بادی	IgM	IgG	کل آنتی‌بادی	
جیره‌ی شاهد فاقد مکمل		۳/۶۹^{b}	۰/۸۰^{ab}	۴/۵۴^{b}	۲/۲۳^{ab}	۴/۰۹^{ab}	۶/۳۲^{c}	۰/۳۳
α توکوفرول استات در جیره‌ی شاهد								
غلظت ۲۰۰ (میلی‌گرم در کیلوگرم)		۳/۹۳^{a}	۰/۸۵^{a}	۴/۷۸^{a}	۲/۴۰^{a}	۴/۲۹^{a}	۶/۶۹^{ab}	۰/۳۷
عصاره‌ی پوست انار در جیره‌ی شاهد								
غلظت (میلی‌گرم در کیلوگرم)	۱۰۰	۳/۷۲^{b}	۰/۹۵^{a}	۴/۶۷^{ab}	۲/۳۷^{a}	۴/۳۰^{ab}	۶/۶۷^{b}	۰/۳۷
	۲۰۰	۴/۰۱^{a}	۰/۹۵^{a}	۴/۹۳^{a}	۲/۲۸^{a}	۴/۶۵^{a}	۶/۹۳^{a}	۰/۳۲
	۳۰۰	۴/۰۸^{a}	۰/۹۱^{a}	۴/۹۹^{a}	۲/۳۲^{a}	۴/۶۴^{a}	۶/۹۶^{a}	۰/۳۲
پوست انار در جیره‌ی شاهد								
غلظت (گرم در کیلوگرم)	۱	۳/۷۲^{c}	۰/۷۳^{b}	۴/۴۵^{b}	۱/۹۷^{c}	۳/۷۰^{c}	۵/۶۷^{d}	۰/۳۴
	۲	۳/۵۳^{c}	۰/۷۰^{b}	۴/۲۳^{c}	۱/۸۲^{c}	۳/۸۵^{c}	۵/۶۰^{d}	۰/۴۱
	۳	۳/۶۱^{c}	۰/۶۳^{cb}	۴/۲۴^{c}	۱/۸۱^{c}	۳/۵۴^{d}	۵/۳۵^{d}	۰/۳۶
P-Value		۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۵۴
[1]SEM		۰/۳۳	۰/۰۷	۰/۴۱	۰/۱۱	۰/۴۱	۰/۶۲	۰/۰۳

[1]عکس لگاریتم آخرین چاهکی که هماگلوتیناسیون داده است، [2]پاسخ حساسیت پوستی بازفیل‌ها بعد از ۲۴ ساعت از چالش با فیتو هموگلوتنین

$^{a-c}$ میانگین‌های هر ستون برای هر عامل که دارای حروف مشابه نباشند دارای تفاوت معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵). [1] SEM: میانگین انحراف استاندارد

لیپیدها و آنزیم‌های سرمی

تأثیر افزودن مکمل‌های آنتی‌اکسیدان‌های α-توکوفرول استات و سطوح مختلف عصاره‌ی پوست و پوست انار در جیره بر لیپیدها و آنزیم‌های کبدی خون در جدول ۴ نشان داده شده است . دو آنزیم گلوتامیک اگزالو استیک ترانس آمیناز، (GOT) و گلوتامیک پیروویک ترانس آمیناز (GPT) تحت تأثیر افزودن α- توکوفرول استات و سطوح مختلف عصاره و پوست انار قرار نگرفتند و اختلاف معنی‌داری از نظر آماری، نشان ندادند. هم‌چنین لیپیدهای پلاسما، کلسترول و لیپوپروتئین با دانسیته‌ی کم (LDL) تحت تأثیر مکمل ذکر شده، قرار نگرفتند. تری‌گلسیرید به عنوان دیگر لیپید پلاسما با افزودن α-توکوفرول استات و عصاره‌ی پوست انار، کاهش نشان داد (P<۰/۰۵). از سویی، کم‌ترین میزان تری‌گلسیرید در سطوح مختلف پوست انار، مشاهده شد. افزایش میزان آنزیم‌های GOT و GPT نشان دهنده‌ی افزایش میزان صدمات کبدی می‌باشد که در این آزمایش، تفاوت معنی‌داری در گروه‌های مختلف، مشاهده نگردید. این یافته‌ها با نتایج Jung و همکاران در سال ۲۰۱۰، که گزارش کردند، اسید گالیک به همراه اسید لینولئیک، تأثیری بر آنزیم‌های کبدی ندارد، مطابقت دارد. افزودن پودر سیر به همراه α توکوفرول استات به جیره‌ی جوجه‌های گوشتی، سبب کاهش کلسترول و LDL سرم شده است که با نتایج به دست آمده در این پژوهش، متناقض است (Guo et al. 2003). نتایج کاهش میزان تری‌گلسیرید با گزارش Jung و همکاران در سال ۲۰۱۰، که از جیره‌ی حاوی چربی زیاد

به همراه مکمل اسید گالیک به عنوان ترکیب‌های فنلی استفاده کرده بودند، مشابهت دارد. مصرف جیره‌ی حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع، قادر به کاهش میزان تری-گلسیرید سرم می‌باشد (Tai et al. 2005). ترکیب‌های فنلی بعد از جذب، وارد سیستم گردش خون می‌گردند و افزایش میزان آن در خون، سبب محافظت لیپیدهای سرم در برابر اکسیداسیون می‌شود (Manach et al. 2004). ویتامین E و کیورسین (به عنوان یکی ترکیب فنلی) سبب کاهش میزان اکسیداسیون LDL و HDL سرم می‌گردد. نحوه‌ی عمل آن‌ها از طریق باند کردن این لیپیدها با ترکیب‌های فنلی می‌باشد (Han et al. 2007). در این آزمایش، این آثار در لیپیدهای سرم جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با مکمل پوست انار، مشاهده نشد که احتمالاً به دلیل کم بودن میزان جذب ترکیب‌های فنلی پوست انار بوده است.

جدول ۴: تأثیر تغذیه‌ی مکمل‌های α توکوفرول استات، عصاره‌ی پوست انار و پوست انار بر لیپیدها، آنزیم‌های کبدی خون، آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی و شاخص آنتی‌اکسیدانی

شاخص‌های اندازه‌گیری شده	جیره‌ی شاهد	میلی‌گرم در کیلوگرم α توکوفرول استات در جیره‌ی شاهد	گرم در کیلوگرم عصاره‌ی پوست انار در جیره‌ی شاهد			گرم در کیلوگرم پوست انار در جیره‌ی شاهد			P-Value	SEM[1]
		۲۰۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۱	۲	۳		
GOT(U/L)[1]	۲۴۱	۲۱۸	۲۳۳	۲۳۳	۲۴۰	۲۴۳	۲۴۳	۲۵۳	۰/۳۵	۳۷/۳۰
GPT (U/L)[2]	۱۱	۲۰	۱۷	۱۳	۱۵	۱۹	۱۸	۱۷	۰/۵۳	۶/۶۰
کلسترول (mg/dl)	۱۴۷	۱۴۴	۱۵۶	۱۵۳	۱۴۹	۱۵۱	۱۴۷	۱۵۲	۰/۳۷	۲۸/۳۰
تری‌گلسیرید (mg/dl)	۹۱[a]	۷۴[bc]	۵۶[c]	۵۴[c]	۵۸[c]	۷۲[bc]	۶۹[b]	۷۴[bc]	۰/۰۵	۶/۰۰
LDL (mg/dl)[3]	۳۱	۲۹	۲۹	۲۷	۳۱	۲۸	۲۷	۳۲	۰/۵۷	۵/۴۳
GPx(U/L)[4]	۱۷۲	۱۸۰	۱۸۰	۱۹۳	۱۹۲	۱۷۴	۱۸۱	۱۷۸	۰/۱۰	۳۱/۳۲
SOD(U/L)[5]	۱۵۱[bc]	۱۶۴[ab]	۱۶۹[a]	۱۷۹[a]	۱۷۸[a]	۱۶۶[ab]	۱۶۹[ab]	۱۵۷[b]	۰/۰۹	۲۷/۳
MDA(nmol /dl)[6]	۸/۹۳[a]	۶/۷۶[c]	۶/۹۹[b]	۶/۶۶[c]	۶/۷۸[c]	۷/۳[b]	۷/۲[b]	۷/۴[b]	۰/۰۵	۱/۰۸

[1] گلوتامیک اگزالواستیک ترانس آمیناز، [2] گلوتامیک پیرووبک ترانس آمیناز، [3] لیپوپروتئین با دانسیته کم، [4] گلوتاتیون پراکسیداز، [5] سوپر اکسید دیسموتاز، [6] مالون‌دی آلدئید.

[a-b] میانگین‌های هر سطر برای هر عامل که دارای حروف مشابه نباشند، دارای تفاوت معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵). [1] SEM: میانگین انحراف استاندارد

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

تأثیر افزودن مکمل‌های آنتی‌اکسیدان‌های α-توکوفرول استات و سطوح مختلف عصاره و پوست انار در جیره بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)؛ سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)) و شاخص آنتی‌اکسیدانی مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در جدول ۴ نشان داده شده است. افزودنα-توکوفرول استات و عصاره‌ی پوست انار به جیره، سبب تغییرهای معنی‌داری در آنزیم آنتی‌اکسیدانی SOD شد، ولی بر میزان GPx اثر معنی‌داری را نشان نداد؛ اگر چه از نظر عددی، نسبت به گروه شاهد افزایش نشان دادند . میزان MDA با افزودن مکمل‌ها دچار تغییرهای معنی‌دار گردید؛ به نحوی که میزان آن با افزودن α- توکوفرول استات و عصاره‌ی پوست انار، کاهش بسیار معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵) و کم‌ترین میزان MDA در گروه α- توکوفرول استات مشاهده شد . افزودن

α- توکوفرول استات و عصاره‌ی پوست انار به جیره، سبب تغییرهای معنی‌داری در آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نشد؛ اگر چه از نظر عددی نسبت به گروه شاهد، افزایش نشان داد.

بحث

افزودن پوست انار به جیره، سبب افزایش وزن نسبی تیموس و کاهش وزن نسبی بورس گردید. برخی از گزارش‌ها نشان می‌دهد که با افزایش میزان اسیدهای چرب PUFA وزن نسبی طحال و تیموس افزایش و و وزن بورس، کاهش نشان می‌دهد . Al-Khalifa و همکاران در سال ۲۰۱۲، نشان دادند که با افزایش میزان استفاده‌ی روغن ماهی در جیره میزان وزن طحال و تیموس افزایش و وزن بورس، کاهش می‌یابد. Wang و همکاران در سال ۲۰۰۰، نشان دادند که جیره‌های مرغ‌های تخم‌گذار حاوی اسیدهای چرب۳–n سبب بهبود رشد اندام‌های لنفاوی، تیموس و طحال در چهار هفته بعد از تغذیه شده است. با توجه به مسیر تولید ایکوزانوئیدها تولیدی اسیدهای چرب n-3 و n-6، افزایش هر یک از این اسیدهای چرب، باعث تغییر محصول می‌گردد؛ اگرچه برخی از محققان، نشان دادند که همبستگی بین وزن تیموس و طحال با بهبود سیستم ایمنی در موش تغذیه شده با این اسیدهای چرب، تایید نشده است. در این آزمایش، علی‌رغم یکسان بودن میزان استفاده‌ی روغن ماهی در جیره، میزان اکسیداسیون اسید چرب با توجه به سطوح آنتی اکسیدان، متفاوت می‌باشد (جدول ۴ مربوط به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و شاخص اکسیداسیونی MDA) . با توجه به این که آنتی‌اکسیدان‌ها سبب محافظت اسید چرب ۳–n می‌شوند، این اسیدهای چرب در صورت اکسید نشدن، توانایی بروز آثار خود را دارند. ترکیب‌های فنلی موجود در عصاره‌ی پوست انار، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی زیادی می‌باشند که ممکن است در کاهش اکسیداسیون این اسیدهای چرب، کمک کنند. هم‌چنین Hosseini-Vashan و همکاران در سال۲۰۱۲، گزارش کردند که افزودن پودر زردچوبه که حاوی ترکیب‌های فنلی است، سبب افزایش میزان وزن تیموس و کاهش وزن بورس شد.

عیار پادتن IgM، IgG و آنتی‌بادی تام، ضد گلبول قرمز گوسفند در نوبت اول، تحت تأثیر افزودن عصاره‌ی پوست، پوست انار و α توکوفرول استات قرار گرفت و جوجه‌ی تغذیه شده با پوست انار، کم‌ترین و عصاره‌ی پوست و α توکوفرول استات، بیش‌ترین مقدار را نشان دادند . Torki و همکاران در سال ۲۰۰۰، برای بررسی سیستم ایمنی طیور گوشتی با استفاده از جیره‌های کتان و روغن ماهی، آزمایشی با جیره‌های با انرژی و پروتئین یکسان، انجام دادند؛ چنان‌که جیره‌های حاوی ۲/۲۵ درصد روغن ماهی، بیش‌ترین پاسخ آنتی‌بادی ضد SRBC، در مقایسه با سطوح پایین‌تر روغن ماهی و سطوح در نظر گرفته برای کتان نشان دادند. هم‌چنین Ebeid و همکاران در سال ۲۰۱۱، نتایجی مشابه در کبک با استفاده از روغن ماهی، گزارش و آثار ناشی از آن را به علت وجود اسیدهای چرب ۳–n بیان کردند؛ بدین گونه که رادیکال‌های آزاد حاصل از اکسیداسیون چربی، باعث کاهش کارآیی سیستم ایمنی هومورال می‌گردد (پوررضا و همکاران ۱۳۸۴). با توجه به شاخص MDA اندازه‌گیری شده و میزان اکسیداسیون، در نتیجه رادیکال‌های آزاد در گروه‌های حاوی عصاره و پوست انار، کاهش نشان داد. احتمالاً یکی از دلایل افزایش میزان پاسخ ثانویه، سیستم ایمنی ضد SRBC در گروه‌های آزمایشی حاوی عصاره‌ی پوست انار و α-توکوفرول استات در مقایسه با گروه شاهد و پوست انار، کاهش رادیکال آزاد ناشی از اکسیداسیون اسید چرب باشد. تانن‌هایی که از ترکیب‌های فنلی پوست انار می‌باشند، سبب کاهش پاسخ ایمنی در طیور می‌شوند. گزارش شده است که استفاده از جیره‌ی حاوی اسید تانیک (ترکیب فنلی)، سبب کاهش پاسخ اولیه و ثانویه‌ی سیستم ایمنی شده است (Marzo et al. 1990). اگر چه نحوه‌ی عمل و آثار وارد شده بر بافت لنفاوی و پاسخ ایمنی طبیعی، هنوز مشخص نشده است، دلایل

احتمالی تأثیر ترکیب‌های فنلی به خصوص تانن، بر سیستم ایمنی عبارتند از: الف) تانن‌ها جذب قند و اسید آمینه را در روده، مسدود می‌کنند (Santidrian et al. 1989). ب) قابلیت دسترسی اسیدهای آمینه در جیره‌های حاوی تانن، کاهش می‌یابد که منجر به کاهش سنتز پروتئین در بافت‌های لنفاوی می‌شود (Marzo et al. 1990). میزان تانن در جیره‌های حاوی پوست انار به میزان قابل توجهی نسبت به جیره‌های حاوی عصاره‌ی پوست انار، بیش‌تر می‌باشند (گزارش‌های در حال انتشار). از دلایل احتمالی کاهش پاسخ ایمنی در جوجه‌های تغذیه شده با پوست انار، وجود فراوان می‌باشد . Hosseini-Vashan و همکاران در سال ۲۰۱۲، تفاوت معنی‌داری در میزان پاسخ به سیستم ایمنی با استفاده از ترکیب‌های فنلی زردچوبه گزارش نکردند . دلیری و همکاران در سال ۱۳۸۷ گزارش کردند که با کاهش میزان وزن نسبی بورس، میزان تولید IgG کاهش نشان می‌دهد که دلیل آن، اکسیژن رسانی کم‌تر، گزارش شده است که با نتایج به دست آمده با این پژوهش، مشابهت دارد. کرمانشاهی و همکاران در سال ۱۳۸۷ نشان دادند که با افزایش میزان α توکوفرول استات در جیره، میزان پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی افزایش می‌یابد که نتایج گزارش شده با یافته‌های این آزمایش، مشابهت دارد.

نتایج ارزیابی حساسیت پوستی بازوفیل[1] (CBH) که برای بررسی میزان پاسخ ایمنی سلولی، مورد استفاده قرار گرفت، تفاوت معنی‌داری بین ضخامت پوست بین انگشتان پا بعد از ۲۴ ساعت چالش با فیتو هموگلوتنین، بین جوجه‌های تغذیه شده با مکمل‌های مختلف، مشاهده نشد . ویتامین E از طریق تحریک فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز، نوتروفیل‌ها و ماکروفاژهای خون، سیستم ایمنی را تقویت می‌کند. هم‌چنین باعث تحریک فعالیت لنفوسیت‌های T می‌شود. افزایش فعالیت فاگوسیتوزی و افزایش تولید آنتی‌بادی بر ضد چندین آنتی‌ژن نیز در جوجه‌هایی که ویتامین E دریافت کرده بودند، گزارش شده است (Erf et al. 1998). از طرفی، پاسخ مربوط به تورم نیز تحت تأثیر ویتامین E قرار می‌گیرد و این پاسخ، بیش‌تر وابسته به هتروفیل‌ها و ماکروفاژها که جزو اولین خط دفاعی بدن هستند، می‌باشد (Klasing 1997). واسطه‌ی اصلی تورم ها، اینترلوکین I و II، می‌باشند که باعث فعال کردن ماکروفاژها می‌شوند . این واسطه‌ها باعث ساخت و تغییر در کورتیکواسترون می‌شوند و سبب ساخت مونوسیت‌ها و هتروفیل‌ها در استخوان‌ها می‌گردند. اما نتایج بررسی حاضر با مشاهدات، فوق تناقض دارند.

دو آنزیم گلوتامیک اگزالو استیک ترانس آمیناز، (GOT) و گلوتامیک پیروویک ترانس آمیناز (GPT) تحت تأثیر افزودن α- توکوفرول استات و سطوح مختلف عصاره و پوست انار قرار نگرفتند و اختلاف معنی‌داری از نظر آماری، نشان ندادند. هم‌چنین لیپیدهای پلاسما، کلسترول و لیپوپروتئین با دانسیته‌ی کم (LDL) تحت تأثیر مکمل ذکر شده، قرار نگرفتند. افزایش میزان آنزیم‌های GOT و GPT نشان دهنده‌ی افزایش میزان صدمات کبدی می‌باشد که در این آزمایش، تفاوت معنی‌داری در گروه‌های مختلف، مشاهده نگردید . این یافته‌ها با نتایج Jung و همکاران در سال ۲۰۱۰، که گزارش کردند، اسید گالیک به همراه اسید لینولئیک، تأثیری بر آنزیم‌های کبدی ندارد، مطابقت دارد . افزودن پودر سیر به همراه α توکوفرول استات به جیره‌ی جوجه‌های گوشتی، سبب کاهش کلسترول و LDL سرم شده است که با نتایج به دست آمده در این پژوهش، متناقض است (Guo et al. 2003). نتایج کاهش میزان تری‌گلسیرید با گزارش Jung و همکاران در سال ۲۰۱۰، که از جیره‌ی حاوی چربی زیاد به همراه مکمل اسید گالیک به عنوان ترکیب‌های فنلی استفاده کرده بودند، مشابهت دارد. مصرف جیره‌ی حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع، قادر به کاهش میزان تری-گلسیرید سرم می‌باشد (Tai et al. 2005) . ترکیب‌های فنلی بعد از جذب، وارد سیستم گردش خون می‌گردند و افزایش میزان آن در خون، سبب محافظت لیپیدهای سرم در

1- Cutaneous basophil hypersensitivity assay

برابر اکسیداسیون می‌شود (Manach et al. 2004). ویتامین E و کیورسین (به عنوان یکی ترکیب فنلی) سبب کاهش میزان اکسیداسیون LDL و HDL سرم می‌گردد. نحوه‌ی عمل آن‌ها از طریق باند کردن این لیپیدها با ترکیب‌های فنلی می‌باشد (Han et al. 2007). در این آزمایش، این آثار در لیپیدهای سرم جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با مکمل پوست انار، مشاهده نشد که احتمالاً به دلیل کم بودن میزان جذب ترکیب‌های فنلی پوست انار بوده است.

افزودن α-توکوفرول استات و عصاره‌ی پوست انار به جیره، سبب تغییرهای معنی‌داری در آنزیم آنتی‌اکسیدانی SOD شد، ولی بر میزان GPx اثر معنی‌داری را نشان نداد؛ اگر چه از نظر عددی، نسبت به گروه شاهد افزایش نشان دادند. میزان MDA با افزودن مکمل‌ها دچار تغییرهای معنی‌دار گردید؛ به نحوی که میزان آن با افزودن α-توکوفرول استات و عصاره‌ی پوست انار، کاهش بسیار معنی‌داری را نشان داد و کم‌ترین میزان MDA در گروه α-توکوفرول استات مشاهده شد. افزودن α-توکوفرول استات و عصاره‌ی پوست انار به جیره، سبب تغییرهای معنی‌داری در آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نشد؛ اگر چه از نظر عددی نسبت به گروه شاهد، افزایش نشان داد. میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در جوجه‌های تغذیه شده با عصاره‌ی پوست انار، افزایش نشان داد و تفاوت معنی‌داری در مقایسه با جیره‌ی شاهد، آشکار کرد (P<۰/۰۵). میزان اکسیداسیون که با اندازه‌گیری شاخص MDA اندازه‌گیری شد، با افزودن α-توکوفرول استات و عصاره‌ی پوست انار، دچار تغییرهای معنی‌دار گردید و میزان آن کاهش نشان داد (P<۰/۰۵) از طرفی، کم‌ترین میزان MDA در جوجه‌های تغذیه شده با سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره‌ی پوست انار، مشاهده شد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، قادر به خنثی‌سازی رادیکال آزاد گونه‌های مختلف اکسیژن می‌باشند. تغذیه‌ی آب انار، سبب کاهش صدمات پروتئین و DNA به وسیله‌ی تغییر سطوح GSH و GSSG بدون تغییر در نسبت GSH/GSSG می‌گردد که احتمالاً با استفاده از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش تولید گونه‌های مختلف اکسیژن همراه است (Faria et al. 2007). دفاع آنتی‌اکسیدانی، شامل آنتی‌اکسیدان‌های صناعی (سنتتیک)، طبیعی و آنزیم‌های موجود در سیستم بیولوژیکی می‌باشد (Sies et al. 1991). افزایش میزان آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی، سبب افزایش ظرفیت پاک‌سازی رادیکال آزاد در طیور می‌گردد. میزان MDA در سرم به عنوان محصول نهایی اکسیداسیون چربی تا حد زیادی می‌تواند بیان‌گر میزان رادیکال آزاد باشد. در این آزمایش، میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با مکمل سازی آنتی‌اکسیدان‌ها افزایش نشان داد. از طرفی، با کاهش میزان MDA که نشان‌دهنده‌ی کاهش میزان اکسیداسیون چربی می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت که آنزیم برای مقابله با رادیکال آزاد، کم‌تر مورد استفاده قرار گرفته شده است و در نتیجه، میزان مورد اندازه‌گیری شده در این گروه‌ها بیش‌تر می‌باشد. استفاده از آنتی‌اکسیدان در جیره، سبب بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی، کاهش میزان رادیکال آزاد و اکسیداسیون می‌گردد.

Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۹، نتایج مشابهی با افزودن پودر گیاه کنگر حاوی ترکیب‌های فنلی، مشاهده کردند. Wang و همکاران در سال ۲۰۰۸، آثار آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی پروآنتوسیانیدین انگور را مورد بررسی قرار دادند و نتایج مشابهی در جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی گزارش کردند. از سویی، مونومر پروآنتوسیانیدین، حاوی اپی‌کاتچین و اپی‌گالوکاتچین می-باشد و استفاده از عصاره‌ی پروآنتوسیانیدین انگور در جیره، سبب افزایش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاهش مالون‌دی آلدئید در پلاسما می‌گردد.

در مجموع نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که استفاده از ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره‌ی پوست انار در جیره‌های حاوی روغن ماهی، سبب کاهش اکسیداسیون، کاهش تری‌گلیسرید و بهبود پاسخ سیستم ایمنی در جوجه‌های گوشتی می‌گردد. استفاده از عصاره‌ی پوست انار در مقایسه با خود پوست انار، نتایج بسیار بهتری را نشان داده است.

منابع

پوررضا، جواد؛ صادقی، قاسم و مهری، مهران (۱۳۸۴). تغذیه مرغ اسکات. (تألیف لیسون و سامرز) چاپ اول. انتشارات ارکان. صفحات: ۲۹۷-۲۹۵.

دلیری، رضا؛ کرمانشاهی، حسن؛ توکلافشاری، جواد؛ وکیلی، رضا (۱۳۸۷). اثرسطوح مختلف آلفاتوکوفرول بر غلظت IgY تام در سرم جوجه‌های گوشتی. سومین کنگره علوم دامی کشور.

کرمانشاهی، حسن؛ دلیریی، رضا؛ توکل‌افشاری، جواد و وکیلی، رضا (۱۳۸۷). اثرسطوح مختلف ویتامین E بر پاسخ سیستم ایمنی هومورال در جوجه‌های گوشتی. سومین کنگره علوم دامی کشور.

Al-Khalifa, H.; Givens, I.; Rymer, C. and Yaqoob, P. (2012). Effect of n-3 fatty acids on immune function in broiler chickens. Poultry Science, 91: 74-88.

Boa-Amponsem, K.; Price, S.E.H.; Dunnington, E.A. and Siegel, P.B. (2001). Effect of route of inoculation on humoral immune response of White Leghorn chickens selected for high or low antibody response to sheep red blood cells. Journal of Poultry Science, 80:1073-1078.

Brenes, A.; Viveros, A.; Gon, I.; Centeno, C.; Sayago-Ayerdy, S.G.; Arija, I. and Saura-Calixto, F. (2008). Effect of grape pomace concentrate and Vitamin E on digestibility of polyphenols and antioxidant activity in chickens. Poultry Science, 87: 307-316.

Ebeid, T.; Fayoud, A.; Abou El-Soud, S.; Eid, Y. and El-Habbak. (2011). The effect of omega-3 enriched meat production on lipid peroxidation, antioxidative status, immune response and tibia bone characteristics in Japanese quail. Czech Journal of Animals science, 56(7): 314-324.

Erf, G.F.; Bottje, W.G.; Bersi, T.K.; Headrik, M.D. and Fritts, C.A. (1998). Effects of dietary vitamin E on the immune system in broilers: altered proportions of CD4T cells in the thymus and spleen. Poultry Science. 77: 529-537.

Faria, A.; Monteiro, R.; Mateus, N.; Azevedo, I. and Calhau, C. (2007). Effect of pomegranate (*Punica granatum*) juice intake on hepatic oxidative stress. European Journal of Nutrition, 46: 271-278.

Guo, C.; Yang, J.; Wei, J.; Li, Y.; Xu, J. and Jiang, Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. Nutrition Research 23: 1719-1726.

Han, X.; Shen, T. and Lou, (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. International Journal of Molecular Science, 8: 950-988.

Hosseini-Vashan, S.J.; Golian, A.; Yaghobfar, A.; Zarban, A.; Afzali, N. and Esmaeilinasab, P. (2012). Antioxidant status, immune system, blood metabolites and carcass characteristic of broiler chickens fed turmeric rhizome powder under heat stress. African Journal of Biotechnology 11(94): 16118-16125.

Jung, S.; Choe, J.H.; Kim, B.; Yun, H.; Kruk, Z. and Jo, C. (2010). Effect of dietary mixture of gallic acid and linoleic acid on antioxidative potential and quality of breast meat from broilers. Meat Science; 86 (2): 520-526.

Kim, S.H.; Jun, C.D.; Suko, K.; Choi, B.J. and Park Lim, S. (2006). Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. Toxicology Sciences, 91(1), 123-131.

Klasing, K.C. (1997). Interaction between Nutrition and Infectious Disease.Pages73–80 in:Diseases of Poultry, B. W. Calnek, ed. Iowa State University Press, Ames, IA. Pp: 73-80.

Madrigal-Carballob, S.; Rodriguezb, G.; Kruegera, C.G.; Dreherc, M. and Reed, J.D. (2009). Pomegranate (*Punica granatum*) supplements: authenticity, antioxidant and polyphenol composition. Journal of Functional Foods.1: 324-329.

Manach, C.; Scalbert, C.; Morand, C.; Remezy, C. and Jime´nez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. The American Journal of Clinical Nutrition, 79:727-747.

Marzo, F.; Tosar, A. and Santidrian, S. (1990). Effect of tannic acid on the immune response of growing chickens. Journal Animal Science, 68: 3306-3312.

Nagendra Prasad, K.; Yang, B.; Yang, S.; Chen, M. and Ashraf, M. (2009). Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityr osinase activities from litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) seeds. Food Chemistry, 116(1) 1-7.

Rymer, C. and Givens, D.I. (2010). Effects of vitamin E and fish oil inclusion in broiler diets onmeat fatty acid composition and on the flavour of a composite sample of breastmeat. Journal of the Science of Food and Agriculture; 90: 1628-163.

Santidrian, S. and Mano, F. (1989). Effect of feeding tannic acid and kidney bean (*Phuseolus vulgmis*) on the intestinal absorption of D-galactose and L-leucine in chickens. Journal of the Sciencence Food and Agriculture. 47: 435-442.

Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. Animal Medicine Journal. 91: 31-38.

Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E. and Isambert, A. (2005). Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering, 101(2): 87-96.

Tai, E.S.; Corella, D.; Demissie, S.; Cupples, L.A.; Coltell, O.; Schaefer, E.J. et al. (2005). Polyunsaturated fatty acids interact with the PPARA-L162V polymorphism to affect plasma triglyceride and apolipoprotein C-III concentrations in the Framingham Heart Study. The Journal of Nutrition. 135: 397-403.

Thompson, D.L.; Elgert, K.D.; Gross, W.B. and Siegel, P.B. (1980). Cell mediatedimmunity in marek's disease virus infected chickens genetically selection for highand low concentrations of plasma corticostrone. American Journal of Veterinary Research. 41: 91-96.

Torki, M.; Golian, A.; Arshami1, J. and Tavakkoli, J. (2000). Effect of dietary fat source and fatty acid composition on immune responses of male growing broiler chicks.PSA Annual Meeting. Pp: 15.

Wang, S.Y. and Lin, H.S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 140-146.

Wang, L.; Piao, X.L.; Kim, S.W.; Piao, X.S.; Shen, Y.B. and Lee, H.S. (2008). Effects of Forsythia suspensa extract on growth performance, nutrient digestibility, and antioxidant activities in broiler chickens under high ambient temperature. Poultry Science, 87: 1287-1294.

Yasoubi, P.; Barzegar, M.; Saha, M.A. and Azizi, M.H. (2007). Total phenolic contents and antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Extracts. Journal Agricultural Science Technology, 9: 35-42.

Zhang, G.F.; Yang, Z.B.; Wang, Y.; Yang, W.R.; Jiang, S.Z. and Gai, G.S. (2009). Effects of ginger root (*Zingiber officinale*) processed to different particle sizes on growth performance, antioxidant status, and serum metabolites of broiler chickens. Poultry Science. 88: 2159-2166.

Effects of natural antioxidant on the immune response, antioxidant enzymes and hematological broilers chickens

Saleh, H.[1]; Golian, A.[2]; Kermanshahi, H.[2]; Taher Mirakzehi, M.[1] and Agah, M.J.[3]

Received: 06.08.2014 Accepted: 23.02.2015

Abstract

This study was carried out to evaluate the effects of dietary α-tocopherol (α-Toc), pomegranate peel extract (PPE) and pomegranate peel (PP) on humoral and cellular immune response, antioxidant enzymes and hematological in broiler chickens. Three hundred and eighty four 1-d-old male broiler chickens (Ross 308) were randomly allocated to 8 groups (4 replicate pens of 12 birds per each), and fed for 42 days. Eight dietary treatments were including; control diet without supplement, control diet mixed with 200 mg/kg α-Toc, and 100, 200 and 300 mg/kg PPE, and 1, 2 and 3 g/kg PP. For evaluation of changes in the immune system, variations of antibody titer by injection of sheep red blood cells were measured at 26 and 32 days ages. At of 28 days of ages, two birds per each experimental group were challenged by phytohemagglutinin and the response was determined to evaluate the cellular immune system. At 41 days of ages, 2 birds per each replicate were bled for assessing cholesterol, triglycerides, LDL blood serum and liver enzymes AST. The oxidation was evaluated by measuring of malondialdehyde MDA and antioxidant enzymes. The results showed that the humoral immune response in chickens fed diets containing α-tocopherol acetate and pomegranate extract peel was improved ($p<0.05$). However, cellular immune response did not effect by phytohemagglutinin challenge ($p>0.05$). Antioxidant enzymes Activity, triglycerides, and MDA were influenced by supplementation of diets with α-tocopherol acetate and extract pomegranate peel ($p>0.05$). Whereas, other hematologic parameters and liver enzymes were not affected. In conclusion, dietary supplementation with 200 and 300 mg/kg pomegranate peel extract PPE may improve immune system response, reducing oxidation and triglyceride levels of broiler chickens.

Key words: Fatty Acid, Antioxidant, Peel pomegranate, Phenolic compound

1- Assistant Professor, Department of Animal Science, Higher Educational of Saravan, Iran
2- Professor, Department of Animal Science, Excellence Center for Animal Sciences Research, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
3- Assistant Professor, Agriculture and Natural Resources Research Center of Fars Province, Iran
Corresponding Author: Saleh, H., E-mail: saleh_tmu@yahoo.com