

## اثر تغذیه روغن سویای اکسید شده در تقابل با نقش آنتی‌اکسیدانی هسته انار بر فیزیولوژی و متابولیسم بزهای سانن در دوره انتقال

سید احسان غیائی<sup>1\*</sup> - رضا ولی زاده<sup>2</sup> - عباسعلی نصریان<sup>2</sup>

تاریخ دریافت: 1392/02/07

تاریخ پذیرش: 1392/10/13

### چکیده

به منظور بررسی اثر روغن سویای اکسید شده در تقابل با نقش آنتی‌اکسیدانی هسته انار بر متابولیسم و فیزیولوژی بزهای سانن در دوره انتقال، تعداد 18 راس بز شیری سانن با میانگین وزنی  $9 \pm 47$  کیلوگرم، در قالب طرح کاملاً تصادفی با نمونه برداری‌های تکرار شده در زمان، در بازه زمانی 21 روز قبل از زایش مورد بررسی قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی شامل 1) جیره پایه و 4 درصد روغن خام تازه سویا، 2) جیره پایه و 4 درصد روغن خام اکسید شده سویا و 3) جیره پایه و به ترتیب 4 و 8 درصد روغن خام اکسید شده سویا و هسته انار بر مبنای ماده خشک بود. نتایج نشان داد که قابلیت هضم ریز مغذی‌ها، نیتروژن آمونیاکی شکمبه و مصرف اختیاری خوراک در اثر تیمارهای 2 و 3 نسبت به سایر تیمارها به ترتیب به طور معنی‌داری کاهش و افزایش یافت. شاخص اسیدیته ادرار به طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) در اثر تیمار 3 کاهش و حجم ادرار در اثر تیمار 2 افزایش ( $P < 0/05$ ) یافت. رطوبت و حجم گلوله مدفوع در اثر تیمار 2 کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) نشان داد. غلظت هورمون  $T_3$  و کراتینین در اثر تیمارهای 2 و 3 به طور معنی‌داری نسبت به تیمار 1 کاهش ( $P < 0/05$ ) و غلظت گلوکز به ترتیب در تیمار 2 نسبت به 1 کاهش ( $P < 0/05$ ) و در تیمار 3 نسبت به 2 افزایش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) داشت. متابولیسم انواع کلسترول در اثر تیمارهای 2 و 3 نسبت به تیمار 1 تغییرات معنی‌داری نشان داد. به طور کلی روغن اکسید شده باعث استرس اکسیداتیو و هسته انار با دو مکانیسم آنتی‌اکسیدانی و هورمونی باعث بهبود فراسنجه‌های متابولیکی و فیزیولوژیکی گردید.

**واژه‌های کلیدی:** بز سانن، روغن اکسید شده، فیزیولوژی، متابولیسم، هسته انار.

### مقدمه

رادیکال‌های آزاد ناشی از پراکسیداسیون اسیدهای چرب ضروری در چربی‌های غشایی می‌تواند باعث تخریب سلول و اختلال در تولید و سلامت حیوان شود (38). بنابراین استرس اکسیداتیو یکی از مهمترین عوامل توسعه التهاب، حساسیت به بیماری‌ها و مشکلات سیستم ایمنی در دوره انتقال است (55) که می‌تواند تحت شرایط مختلف تغذیه ای، محیطی و فیزیولوژیکی تشدید شود (16 و 34).

از طرفی دام‌های شیری در دوره انتقال، متحمل تغییرات قابل توجهی در متابولیسم گلوکز، اسیدهای چرب و مواد معدنی می‌شوند. برای تأمین نیاز متابولیکی در این دوره، استراتژی‌های تغذیه ای متفاوتی به کار گرفته شده است. از جمله می‌توان به تغذیه حداقلی ریزمغذی‌ها در اوایل دوره خشکی و افزایش آن در انتهای این دوره اشاره کرد (42). در همین راستا تغذیه کربوهیدرات‌های غیر فیبری و چربی در جیره و یا کاهش درصد چربی شیر در ابتدای شیردهی از طریق برخی اسیدهای چرب خاص (10) به منظور کاهش تقاضای انرژی در اوایل شیردهی مورد استفاده قرار گرفته است. بر این اساس استفاده از چربی در جیره (21) به ابزاری مدیریتی در کنترل وقایع

دوره انتقال دام‌های آبستن یکی از حساس‌ترین بازه‌های زمانی از لحاظ سلامت، تولید مثل و مدیریت تغذیه است (13). در فرآیند متابولیسم سلولی حیوانات، پیوسته ظرفیت تولید درون زادی آنتی‌اکسیدان‌ها متناسب با تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشد. از این رو بر هم خوردن این تعادل باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در حیوان می‌گردد (67). در هنگام افزایش نرخ متابولیسم هوازی به دلیل ورود حیوان به گامه‌هایی نظیر تکامل بافتی قبل از زایمان و تولید شیر، نیاز به اکسیژن مولکولی و تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی افزایش می‌یابد (16 و 60). اکسیژن فعال اضافی موجود در خون محیطی می‌تواند با افزایش شدت استرس اکسیداتیو، دفاع آنتی‌اکسیدانی را در هم بشکند (16). همچنین تولید

1- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند،

2- استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

\* - نویسنده مسئول: (Email: s.e.ghiasi@birjand.ac.ir)

سانن (57) در دوره خشکی تهیه شد. جیره ها بر مبنای ماده خشک حاوی 57 درصد علوفه و 43 درصد کنسنتره بوده و با افزودن 4 درصد روغن سویای خام تازه یا اکسید شده متوازن گردید (جداول 1 و 2). روغن سویای خام بر اساس روش "AOCS: cd 12-57" (8) با عبور حباب های هوا از خلال روغن در دمای 92 درجه سلیسیوس به مدت 24 ساعت اکسید شد، به صورتی که ارزش عددی مشتقات پراکسید اسید چرب تولید شده بر اساس روش "AOCS: cd 8-53" از  $0/037 \pm 1/373$  میلی اکی والان گرم در کیلوگرم روغن خام تازه تا حد  $0/045 \pm 7/066$  میلی اکی والان گرم در کیلوگرم روغن خام اکسید شده افزایش یافت. تیمارهای آزمایشی شامل: 1) کنترل مجازی شامل جیره پایه و 4 درصد جیره روغن خام تازه سویا، 2) جیره پایه و 4 درصد جیره روغن خام اکسید شده سویا و 3) جیره پایه و 4 درصد جیره، روغن خام اکسید شده سویا و 8 درصد جیره، هسته انار آسیاب شده (جایگزین با سبوس گندم) بر مبنای ماده خشک جیره بود.

#### مراحل انجام آزمایشات و جمع آوری داده ها

در این آزمایش، تعداد 18 راس بز شیری سانن 3 تا 5 شکم زایش با میانگین وزنی  $9 \pm 47$  کیلوگرم، پس از همزمان سازی فحلی با 2 تزریق عضلانی متوالی پروستاگلندین<sup>1</sup> به فاصله 13 روز و هر بار به میزان 0/5 میلی لیتر، به صورت طبیعی تلقیح شدند و آبستنی آنها در پایان ماه اول از طریق سونوگرافی با پروب شکمی مورد تایید قرار گرفت. دام ها پس از اعمال مراقبت های بهداشتی و تغذیه ای دوره آبستنی، در قالب طرح کاملاً تصادفی در بازه زمانی 3 هفته قبل از زایش تا زایمان برای مقایسه اثر تیمارها مورد بررسی قرار گرفتند. دام ها در قفس های متابولیکی انفرادی با دسترسی آزادانه به آب و خوراک تحت شرایط استاندارد، نگهداری شدند. جیره های آزمایشی در دو نوبت صبح (7:00) و بعد از ظهر (19:00) در قالب جیره کاملاً مخلوط شده در اختیار دام ها قرار گرفت.

پس از 2 هفته سازش پذیری، نمونه های مدفوع، ادرار و باقیمانده خوراک جهت بررسی قابلیت هضم مواد مغذی (61)، و فراسنجه های متابولیکی طی یک هفته به صورت متوالی جمع آوری شده و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد. نمونه برداری خون از سیاهرگ گردنی به صورت تکرار شده در زمان، در مقاطع ابتدای آزمایش (21 روز قبل از زایش پیش بینی شده) و یک هفته قبل از زایش به منظور تعیین سطوح فراسنجه های متابولیکی، هورمونی و شاخص های فیزیولوژیکی پس از اعمال 20 ساعت محدودیت غذایی صورت گرفت. نمونه های خون در لوله های آزمایش 10 میلی لیتری استریل بدون EDTA به منظور تعیین فراسنجه های سرومی بر

متابولیکی پیرامون زایش تبدیل شده است. چربی در جیره دام های شیری، معمولاً از دانه های روغنی تأمین می شود که غالباً در فرآیند های فرآوری نظیر روستینگ و اکستروڈینگ، تحت تاثیر تیمار های حرارتی، مشتقات پراکسید اسیدهای چرب در آنها افزایش می یابد (29 و 45). چربی های جیره از قبیل مکمل های چربی و دانه های روغنی در صورتی که بدون پایدار کننده و نگهدارنده به مصرف برسند می توانند یک عامل معنی دار در افزایش رادیکال های آزاد در بدن حیوان و تشدید استرس اکسیداتیو باشند (5). کاهش عملکرد، افزایش نرخ بازسازی دستگاه گوارش و پاسخ های ایمنی تقلیل یافته از عوارض تغذیه روغن های اکسید شده است (19). افزودن آنتی اکسیدان به جیره تا حدودی می تواند اثرات منفی مشتقات پراکسیداسیون اسیدهای چرب را تعدیل نماید. مطالعات اسمیت و همکاران (54) نشان داد که تغذیه آنتی اکسیدان ها قابلیت هضم فیبر را در تقابل با هر دو چربی تازه و اکسید شده افزایش می دهد. چنین اثری بر نقش مثبت آنتی اکسیدان ها در بهبود محیط رشد میکروفلورای شکمبه و خصوصاً باکتری های تجزیه کننده فیبر تاکید دارد (54). بنابراین توجه به همزمانی نقش آنتی اکسیدان ها در تغذیه چربی ها ضروری به نظر می رسد، چرا که آنتی اکسیدان ها این اثرات منفی را با خنثی کردن پراکسید ها و نیز کاهش اکسیداسیون متعادل می نمایند (27). آنتی اکسیدان های مصنوعی به طور عمده شامل ترکیبات فنولی ساده مانند بوتیلات هیدروکسی تولوئن (BHT)، و آنتی اکسیدان های پلی مری مانند آنوکسومر و یونوکس 100 هستند که به دلیل سرطان زا بودن استفاده از آنها محدود شده و گرایش به استفاده از ترکیبات طبیعی و گیاهی جهت کاربرد در مواد خوراکی افزایش یافته است (43 و 66).

عصاره هسته انار غنی از پلی فنول ها می باشد (50) که از این میان اثرات آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد التهاب ترکیباتی همچون پانیکالائزین و الاژیتانین (30) با بوتیلات هیدروکسی تولوئن تجاری برابری می کند (49). در مورد نقش آنتی اکسیدانی هسته انار بر کنترل عوارض استرس اکسیداتیو در حضور روغن های اکسید شده و تاثیر آن بر وضعیت فیزیولوژیکی و متابولیکی دام در دوره انتقال، اطلاعات زیادی در دست نیست. لذا در این مطالعه تاثیر تغذیه ای روغن سویای اکسید شده به همراه هسته انار به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی و ارگانیک، بر فراسنجه های متابولیکی و فیزیولوژیکی بز های شیری سانن در انتهای دوره خشکی مورد بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش ها

##### جیره و تیمارهای آزمایشی

جیره های آزمایشی بر اساس احتیاجات بز های شیری

1- EstroPLAN® (cloprostenol sodium) Parnell life library

اساس روش کاستیلو و همکاران (16) جمع آوری و آماده سازی شده و تا زمان انجام آزمایشات در دمای C<sup>o</sup> 20- نگهداری شد.

جدول 1- ترکیب اجزاء تشکیل دهنده و مواد مغذی جیره‌های آزمایشی (بر اساس درصد ماده خشک)

Table 1- Composition and ingredients of Experimental diets

Ingredients محتویات	تیمارها <sup>1</sup> Treatments <sup>1</sup>		
	1	2	3
یونجه خشک Alfalfa	9.87	9.87	9.87
سیلاژ ذرت Corn silage	19.74	19.74	19.74
کاه گندم Wheat straw	27.64	27.64	27.64
سبوس گندم Wheat bran	9.87	9.87	-
هسته انار Pomegranate seed	-	-	8
دانه جو Barley ground	14.81	14.81	14.81
کنجاله کانولا Canola meal	11.85	11.85	13.72
روغن سویا تازه Fresh soybean oil	4	-	-
روغن سویا اکسید شده Oxidized soybean oil	-	4	4
مکمل مواد معدنی <sup>2</sup> Mineral premix <sup>2</sup>	0.99	0.99	0.99
سنگ آهک Limestone	0.99	0.99	0.99
نمک Salt	0.25	0.25	0.25
ترکیب شیمیایی محاسبه شده (%) Calculated composition (%)			
انرژی Energy (MCal/Kg)	2.40	2.38	2.38
پروتئین خام CP	13.2	13.2	13.4
فیبر نا محلول در شوینده اسیدی ADF	30.39	30.39	31
فیبر نا محلول در شوینده خنثی NDF	48.7	48.7	49
عصاره اتری EE	6.7	6.7	7
کربوهیدرات غیر فیبری NFC	25.7	25.7	24.8
کلسیم Ca	0.87	0.87	0.80
فسفر P	0.29	0.29	0.30
خاکستر Ash	8.1	8.1	7.9

<sup>1</sup> تیمارها: 1) روغن تازه (کنترل مجازی)، تیمار 2) روغن اکسید شده و تیمار 3) روغن اکسید شده و هسته انار آسیاب شده.  
<sup>2</sup> منیزیوم، آهن، ید، مس، منگنز، سلنیوم، روی، گوگرد، کبالت، کلسیم و فسفر به ترتیب 250، 20، 1/3، 5، 6، 4، 0.4، 0.90، 6/15 و 12 میلی گرم در گرم.

<sup>1</sup>Treatments:1) control (fresh oil) 2) oxidized oil and 3) oxidized oil and pomegranate seed

<sup>2</sup> Concentration of Mg, Fe, I, Cu, Mn, Se, Zn, S, Co, Ca and P is 50, 20, 1.3, 5, 6, 40, 90, 0.6, 15 and 12 mg/g respectively.

جدول 2 - چگالی و ترکیب اندازه گیری شده اسیدهای چرب روغن سویای تازه و اکسید شده (میلی گرم در گرم)

Table 2- Density and measured fatty acid composition of oxidized and fresh soybean oil (mg/g)

Parameters	فرمول بسته Closed formula	اکسید شده Oxidized	تازه Fresh	فراسنجه‌ها
Dodecanoic	C12:0	0.459±0.01	0.074±0.00	اسید دودکانوئیک
Tetradecanoic	C14:0	1.055±0.01	0.727±0.00	اسید تترادکانوئیک
Cis-9-tetradecenoic	C14:1	4.044±0.05	1.15±0.01	اسید سیس -9- تترادکانوئیک
pentadecanoic	C15:0	0.088±0.00	0.197±0.00	اسید پنتادکانوئیک
Cis-10-pentadecenoic	C15:1	0.229±0.00	0.163±0.00	اسید سیس -10- پنتادکانوئیک
Hexadecanoic	C16:0	136.556±0.05	107.328±0.06	اسید هگزادکانوئیک
Cis-9-hexadecenoic	C16:1	0.677±0.00	0.967±0.01	اسید سیس -9- هگزادکانوئیک
Heptadecanoic	C17:0	0.838±0.01	0.947±0.01	اسید هپتادکانوئیک
Cis-10- Heptadecenoic	C17:1	0.439±0.01	0.434±0.01	اسید سیس -10- هپتادکانوئیک
Octadecanoic	C18:0	33.865±0.03	39.234±0.03	اسید اکتادکانوئیک
Cis- Octadecenoic	C18:1	207.055±0.06	218.663±0.04	اسید سیس - اکتادکانوئیک
Cis- Octadecadienoic	C18:2 cis**	509.21±0.09	525.191±0.08	اسید سیس - اکتادکا دی انوئیک**
Trans- Octadecadienoic	C18:2 trans*	0.108±0.00	5.876±0.02	اسید ترانس - اکتادکا دی انوئیک*
Cis-9,12,15- Octadecatrienoic	C18:3α	68.845±0.01	73.683±0.07	اسید سیس - 9، 12، 15 اکتادکا تری انوئیک (آلفا)
Cis-6,9,12- Octadecatrienoic	C18:3γ	0.099±0.00	1.038±0.01	اسید سیس - 6، 9، 12 اکتادکا تری انوئیک (گاما)
Eicosanoic	C20:0	1.621±0.02	2.929±0.06	اسید ایکوزانوئیک
Eicosenoic	C20:1	0.077±0.00	1.989±0.04	اسید ایکوزانوئیک
Eicosadienoic	C20:2	0.218±0.00	0.355±0.01	اسید ایکوزادی انوئیک
Cis-11,14,17- Eicosatrienoic	C20:3	-	0.295±0.00	اسید سیس - 11، 14، 17 ایکوزا تری انوئیک
Cis-5,8,11,14- Eicosatetraenoic	C20:4	0.223±0.01	0.492±0.01	اسید سیس - 5، 8، 11، 14 ایکوزا تترا انوئیک
Cis-Eicosapentaenoic	C20:5	-	0.375±0.02	اسید سیس - ایکوزا پنتا انوئیک**
Heneicosanoic	C21:0	-	0.078±0.00	اسید هنیکوزانوئیک
Docosanoic	C22:0	1.917±0.02	3.678±0.05	اسید دوکوزانوئیک
Cis-13- Docosenoic	C22:1	-	0.072±0.00	اسید سیس - 13- دوکوزانوئیک
Cis-Docosahexaenoic	C22:6	0.322±0.00	0.480±0.01	اسید سیس - دوکوزا هگزانوئیک**
Tricosanoic	C23:0	0.247±0.01	0.277±0.02	اسید تریکوزانوئیک
Tetracosanoic	C24:0	0.642±0.01	1.299±0.03	اسید تتراکوزانوئیک
Cis-Tetracosenoic	C24:1	0.117±0.00	0.147±0.01	اسید سیس تتراکوزانوئیک
Others		31.154±0.03	12.129±0.07	سایر اسیدهای چرب
Unsaturated		791.557±0.15	831.102±0.18	اسیدهای چرب غیر اشباع
Saturated		177.289±0.18	156.768±0.16	اسیدهای چرب اشباع
Oil density (g/ml)		0.897±0.05	0.859±0.06	چگالی روغن (گرم در میلی لیتر)

ترکیبات مختلف ایزومری‌های ترانس شامل: ترانس/سیس، ترانس و ترانس، سیس/ترانس.  
\*\* همه پیوند ها آرایش سیس دارند.

\* Different position of trans isomers: trans/cis, trans and trans, cis/trans.  
\*\* All bound's position are cis.

هیدروکسی بوتیرات به عنوان شاخصی از اجسام کتوننی توسط کیت Biosystem انگلیس با استفاده از دستگاه اتوانالایزر A15 مورد آنالیز قرار گرفت. غلظت هورمون‌های تری یودو تیرونین (T<sub>3</sub>)، تیروکسین (T<sub>4</sub>) و هورمون هیپوفیزی محرک تیروئید (TSH) با استفاده از کیت های تشخیصی الایزای شرکت پیشتاز طب و با

فراسنجه های سرومی گلوکز، تری گلیسرید، کلسترول کل، کلسترول متصل به لیپوپروتئین با چگالی پائین (LDL)، کلسترول متصل به لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL)، نیترژن اوره‌ای، کراتینین، بیلی روبین مستقیم، کل پروتئین خون، آلبومین، کلسیم، فسفر و منیزیم توسط کیت های تشخیصی Biosystem اسپانیا، بتا

شرکت Sigma - Aldrich و سایر مواد شیمیایی با درجه خلوص آزمایشگاهی از شرکت Merck تهیه گردید. تجزیه تقریبی مواد خوراکی و مدفوع شامل اندازه گیری ماده خشک، خاکستر، عصاره اتری و پروتئین خام، توسط روش های استاندارد AOAC (6) انجام شد. همچنین درصد فیبر نا محلول در شوینده های اسیدی و خنثی با استفاده از روش سنگر و همکاران (52) مورد آزمایش قرار گرفت به این نحو که برای تعیین میزان فیبر نا محلول در شوینده خنثی در نمونه های کنسانتره از آنزیم آلفا - آمیلاز مقاوم به حرارت (A 3306 Sigma-) بدون به کارگیری سولفیت سدیم استفاده گردید. درصد خاکستر نا محلول در اسید به عنوان مارکر داخلی جهت محاسبه قابلیت هضم اجزاء خوراک توسط روش ون کولن و همکاران (61) مورد استفاده قرار گرفت. تمام آنالیز های آزمایشگاهی با 3 تکرار و 2 اجرا به انجام رسید.

### روش های آماری

مقایسه میانگین تیمارها بر اساس ارزیابی میانگین اندازه گیری های مکرر در طول زمان در قالب طرح کاملا تصادفی با مدل آماری  $y_{ijk} = \mu + \tau_i + t_k + \delta_{ij} + (\tau \times t)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$  و با استفاده از رویه GLM و آماره هتلینگ - لاولی تریس، آزمون نرمال بودن داده ها با رویه Univariate و آماره شاپیرو - ویلک و مقایسه مرکز ثقل میانگین در فراسنجه های کمی فاقد توزیع نرمال توسط رویه NPar1Way و آماره ناپارامتری کورسکال - والیس نرم افزار آماری SAS (46) انجام شد.

در مدل فوق  $y_{ijk}$  مشاهده  $ijk$  ام،  $\mu$  میانگین و سایر اجزاء مدل به ترتیب شامل اثر تیمار  $i$ ، اثر زمان  $k$ ، کوواریانس بین اندازه گیری  $z$  در تیمار  $i$ ، اثرات متقابل زمان  $k$  و تیمار  $i$  و خطای تصادفی یا واریانس بین اندازه گیری های  $z$  در هر تیمار  $i$  در زمان  $k$  بود. جهت آزمون فراسنجه های کیفی رتبه ای و باینومیال از رویه Logistic نرم افزار SAS به روش تفاوت نسبت ODDS و معنی داری دامنه های اطمینان Wald استفاده شد، به این مفهوم که در یک مقایسه دوتایی تیمار با نسبت ODDS بالاتر، تمایل بیشتری به کسب رتبه پائین تر در فراسنجه مورد نظر داشت (2) و (46).

### نتایج و بحث

قابلیت هضم ماده خشک جیره تحت تاثیر تیمار حاوی روغن اکسید شده و هسته انار (تیمار 3) افزایش معنی داری ( $P < 0/01$ ) را نسبت به تیمار حاوی روغن اکسید شده بدون حضور آنتی اکسیدان (تیمار 2) نشان داد (جدول 3). این افزایش نسبت به تیمار

استفاده از دستگاه ایزا ریدر STAT FAX 303 Plus تعیین شد. فراسنجه های شاخص خطر قلبی عروقی (CVRI)، پروتئین گلوبولین و کلسترول متصل به لیپوپروتئین با چگالی بسیار پائین (VLDL)، با استفاده از روش آلبرجینا و همکاران (4) و مکفرسون (37) محاسبه شد. فراسنجه های مورفولوژیکی مرتبط با مدفوع نظیر ریزش مو در مخزن مدفوع (مقیاس کیفی 0 تا 5)، وجود یا عدم وجود گلوله های هیبرید یا دوتایی در مدفوع (0 یا 1) و عدم تراکم ظاهری گلوله مدفوع (مقیاس کیفی 0 تا 6)، بر اساس روش اولیورا (41) و ابعاد بیضی واره مدفوع با استفاده از کولیس به صورت نمونه برداری تصادفی مورد بررسی قرار گرفت.

موی همراه با مدفوع پس از خشک شدن در آون و قبل از انجام تجزیه شیمیایی توسط فشار باد به وسیله کمپرسور هوا جدا شد. حجم گلوله مدفوع از طریق فرمول هندسی  $v = (3/14 \times a^2 \times b) / 3$  برای یک بیضی واره محاسبه شد (17) که  $a$  و  $b$  به ترتیب قطر های بزرگ و کوچک گلوله مدفوع در نظر گرفته شد. وزن دام ها پس از 20 ساعت محدودیت غذایی و اخذ نمونه خون اندازه گیری شد. حجم ادرار جمع آوری شده در قفس متابولیکی در بازه های زمانی 12 ساعته با استفاده از استوانه مدرج اندازه گیری گردید. اسیدیته ادرار جمع آوری شده در مخزن و ادرار تازه جمع آوری شده با تحریک مجرای ادرار (44) با استفاده از pH متر Metrohm مدل 691 استاندارد شده با کالیبراتور اسیدیته Merck، اندازه گیری شد. برای تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه 8 ساعت پس از مصرف خوراک یعنی پس از عبور از نقطه اوج زیست هیدروژناسیون اسیدهای چرب (64)، نمونه گیری مایع شکمبه از طریق مری به عمل آمد. پس از افزودن 1 میلی لیتر اسید متافسفربیک 25 درصد به اژه هر 4 میلی لیتر مایع شکمبه، نمونه ها تا اندازه گیری غلظت نیتروژن آمونیاکی در فریزر  $-20^\circ\text{C}$  نگهداری شدند (12).

روغن های تازه و اکسید شده به منظور تجزیه شیمیایی اسیدهای چرب با روش متیلاسیون توصیه شده توسط کرامر و همکاران (32) مشتق سازی شد و ترکیب اسیدهای چرب آنها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی Varian مدل CP 3800 مجهز به آنجکتور FID 1177 و ستون CP-Sill 88 در آزمایشگاه تحقیقات متابولیسم عالی گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد تعیین شد. در ابتدا دمای ستون به مدت 10 دقیقه در  $50^\circ\text{C}$  قرار داشت، سپس با نرخ  $5^\circ\text{C}$  در دقیقه به دمای  $260^\circ\text{C}$  افزایش یافت و این شرایط به مدت 30 دقیقه ادامه یافت (33). از هلیوم با نرخ 1/2 میلی لیتر در دقیقه تحت فشار 355 کیلوپاسکال به عنوان گاز حامل استفاده شد. استانداردهای آزمایشگاهی به کار رفته در آزمایش از

افزایش نسبت به تیمار 1 از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. میزان این فراسنجه در تیمار 2 نسبت به تیمار 1 روند کاهشی غیرمعنی‌داری داشت که با نتایج وازکوئز آنون و همکاران (63) مطابقت دارد. استرس اکسیداتیو در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها هنگامی اتفاق می‌افتد که رادیکال‌های آزاد در سلول تجمع یافته و باعث اختلال در عملکرد صحیح سلول گردد (48).

حاوی روغن خام تازه سویا (تیمار 1) نیز مشاهده شد، هرچند از لحاظ آماری تنها میل به معنی‌داری داشت ( $P=0/07$ ). میزان این فراسنجه در تیمار 2 نسبت به تیمار 1، به طور غیرمعنی‌داری کاهش یافت. قابلیت هضم فیبر نا محلول در شوینده اسیدی در تیمار 2 نسبت به تیمار 1 کاهش غیرمعنی‌داری داشت، در حالی که در تیمار 3 نسبت به تیمارهای 1 و 2 به طور معنی‌داری ( $P<0/001$ ) افزایش یافت. همچنین قابلیت هضم فیبر نامحلول در شوینده خنثی در اثر تیمار 3 نسبت به تیمار 2 افزایش یافت ( $P<0/05$ ), هرچند این

**جدول 3-** اثر تیمارهای آزمایشی بر قابلیت هضم مواد مغذی، مصرف اختیاری خوراک، حجم و اسیدیته ادرار، فراسنجه‌های کمی مرتبط با مدفوع، تغییرات وزنی و نیتروژن آمونیاکی شکمبه، 2 هفته پس از اعمال تیمار (1 هفته قبل از زایش)<sup>1</sup>

**Table 3-** Effect of treatments on nutrient digestibility, voluntary feed intake, urine pH and volume, faces parameters, weight change and rumen ammonia nitrogen, 2 weeks after treatment (1 W before parturition)<sup>1</sup>

فراسنجه Parameters	تیمار <sup>2</sup> Treatments <sup>2</sup>			SEM	P-value <sup>3</sup>
	1	2	3		
قابلیت هضم ماده خشک (%) DM Digestibility (%)	57.05 <sup>ab*</sup>	53.04 <sup>b</sup>	63.67 <sup>at</sup>	2.55	P<0.001
قابلیت هضم فیبر نا محلول در شوینده اسیدی (%) ADF Digestibility (%)	31.52 <sup>b</sup>	26.64 <sup>b</sup>	53.15 <sup>a</sup>	4.03	P<0.001
قابلیت هضم فیبر نا محلول در شوینده خنثی (%) NDF Digestibility (%)	47.94 <sup>ab</sup>	42.45 <sup>b</sup>	53.75 <sup>a</sup>	3.20	P<0.05
قابلیت هضم عصاره اتری (%) EE Digestibility (%)	92.07 <sup>b</sup>	89.57 <sup>c</sup>	94.54 <sup>a</sup>	0.51	P<0.01
قابلیت هضم ظاهری پروتئین خام (%) CP Digestibility (%)	63.49 <sup>a</sup>	54.58 <sup>b</sup>	66.55 <sup>a</sup>	2.25	P<0.01
نیتروژن آمونیاکی شکمبه (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) <sup>4</sup> Rumen N-NH <sub>3</sub> (mg/dl) <sup>4</sup>	19.509 <sup>a*</sup>	14.264 <sup>b</sup>	23.835 <sup>at</sup>	1.651	P<0.05
قابلیت هضم خاکستر (%) Ash Digestibility (%)	26.34 <sup>b</sup>	7.40 <sup>c</sup>	43.50 <sup>a</sup>	6.08	P<0.01
مصرف اختیاری خوراک (گرم ماده خشک در روز) Voluntary feed intake (gDM/d)	1416.86 <sup>b*</sup>	1332.75 <sup>bt</sup>	1524.54 <sup>a</sup>	33.82	*P<0.05
وزن دو هفته پس از اعمال تیمار قبل از زایش (کیلوگرم) Body weight 2 weeks after treatment prior to parturition(kg)	52.295	51.546	53.348	0.836	P=0.38
مجموع وزن تولد بزغاله‌ها در هر شکم زایش (کیلوگرم) Lamb birth weight in parity (kg)	5.012	4.875	5.086	0.512	P=0.96
شاخص اسیدیته ادرار تازه Fresh urine pH	8.695 <sup>a</sup>	8.698 <sup>a</sup>	7.611 <sup>b</sup>	0.183	P<0.01
شاخص اسیدیته ادرار تجمعی (12 ساعت) Collected urine pH (in 12h)	9.281 <sup>a</sup>	9.299 <sup>a</sup>	8.981 <sup>b</sup>	0.054	P<0.01
حجم ادرار (میلی‌لیتر در روز) Urine volume (ml/d)	706.44 <sup>b</sup>	1169.77 <sup>a</sup>	871.76 <sup>b</sup>	102.50	P<0.05
درصد ماده خشک مدفوع Urine volume (ml/d)	40.23	55.78	44.84	8.90	P=0.24
حجم گلوله مدفوع (سانتیمتر مکعب) Faces ellipsoid volume (cm <sup>3</sup> )	6.544 <sup>a</sup>	5.006 <sup>b</sup>	6.181 <sup>a</sup>	1.006	P<0.01

<sup>1</sup> میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

<sup>2</sup> تیمار 1) روغن تازه (کنترل مجازی)، تیمار 2) روغن اکسید شده و تیمار 3) روغن اکسید شده و هسته انار آسیاب شده.

<sup>3</sup> تفاوت دو گروه با دو علامت متفاوت میل به معنی‌داری دارد ( $P\leq 0/08$ ).

<sup>4</sup> 8 ساعت پس از مصرف خوراک آزمایشی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر مایع شکمبه)

<sup>1</sup> Means with different alphabets are statistically different.

<sup>2</sup> Treatments: 1) control (fresh oil) 2) oxidized oil and 3) oxidized oil and pomegranate seed.

<sup>3</sup> Parameters with Latin signs just trend to be different.

<sup>4</sup> 8 h after feeding (mg/dl rumen liquor)

گوارشی در اثر تخریب با رادیکال های آزاد ناشی از استرس اکسیداتیو باشد (19). کاهش قابلیت هضم چربی به دلیل تمایل بدن در دفع ترکیبات مضر ناشی از پراکسیداسیون اسیدهای چرب، باند شدن مقادیر قابل توجهی از مواد معدنی با چربی دفعی و به طور کلی کاهش قابلیت هضم ماده خشک خوراک را می توان از عوامل خارج شدن مواد معدنی از دسترس هضم و جذب توسط دستگاه گوارش در تیمار 2 بر شمرد. همان طور که انتظار می رود نقش آنتی اکسیدانی احتمالی هسته انار در خنثی نمودن رادیکال های آزاد موجود در جیره و به تبع آن تقویت پتانسیل میکروبی شکمبه در گوارش ریزمغذی ها، علاوه بر بهبود قابلیت هضم چربی، قابلیت هضم مواد معدنی را نیز بهبود می بخشد. همچنین مطالعات واز کوئر-آن و جنکینز (64) نشان می دهد که قابلیت هضم پروتئین خام در اثر اعمال تیمار چربی اکسید شده در مقایسه با چربی تازه به شدت کاهش می یابد که در اثر افزودن آنتی اکسیدان، در این وضعیت بهبود حاصل می گردد. با توجه به کاهش معنی دار تولید نیتروژن آمونیاکی در تیمار 2 در زمان 8 ساعت پس از مصرف خوراک یعنی زمان عبور از نقطه اوج زیست هیدروژناسیون (64) که نشان دهنده کاهش هضم پروتئین خام در اثر مشتقات پراکسیداسیون (جدول 2) اسیدهای چرب به دلیل کاهش فعالیت پروتولایتیک میکروارگانیسم های شکمبه (64) می باشد و نیز افزایش معنی دار تولید نیتروژن آمونیاکی در تیمار 3 که احتمالاً بهینه بودن شرایط محیط کشت به نفع افزایش جمعیت پروتوزوایی و تجزیه بیشتر پروتئین میکروبی و نیز افزایش قابلیت هضم پروتئین را نشان می دهد (64)، می توان بر نقش مضر ترکیبات حاصل از پراکسیداسیون اسیدهای چرب روغن سویا و نقش مفید ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود در هسته انار اذعان نمود.

مطالعات نشان می دهد تغذیه گاو ها با چربی اکسید شده به دلیل بوی بد چربی مصرف خوراک را کاهش می دهد (14 و 19). اما از آنجا که قابلیت هضم مواد معدنی کاهش یافته است (جدول 3)، توجه به این نکته ضروری است که بخشی از کاهش مصرف خوراک به دلیل کاهش اشتها ناشی از کمبود عناصر مغذی موثر در اشتها، نظیر روی، رخ می دهد (58). از طرفی کاهش قابلیت هضم ماده خشک در اثر روغن اکسید شده باعث کاهش نرخ عبور و افزایش ماندگاری مواد در دستگاه گوارش می شود که مهمترین عامل در کاهش مصرف خوراک به شمار می رود (20).

شاخص اسیدیته ادرار (pH) تازه جمع آوری شده و نیز شاخص اسیدیته ادرار تجمعی 12 ساعته به طور معنی داری در اثر تیمار 3 نسبت به تیمارهای 1 و 2 کاهش یافت ( $P<0/01$ ), اما تفاوت معنی داری بین تیمارهای 1 و 2 در این فراسنجه مشاهده نشد.

میکروارگانیسم های شکمبه که عمدتاً بی هوازی بوده و سیستم آنتی اکسیدانی کمتر توسعه یافته ای نسبت به موجودات هوازی دارند (11)، در مقابل تجمع این رادیکال ها حساس ترند. بر این اساس، تغذیه چربی های اکسید شده نه تنها میزان پراکسید ها را در حیوان بالا می برد بلکه می تواند تخمیر شکمبه را نیز از طریق کاهش تولید پروتئین میکروبی و بازدهی آن تحت تأثیر منفی خود قرار دهد (64). بر اساس مطالعات انجام شده (64) تغذیه چربی اکسید شده در سیستم کشت مداوم منجر به تغییر جمعیت میکروبی به سمت افزایش باکتری های تولید کننده اسید بوتیریک می گردد که این باکتری ها بیشتر قادر به تکمیل فرآیند بیوهیدروژناسیون هستند.

همچنین والاس و همکاران (65) و مایا و همکاران (35) گزارش کردند که روغن حرارت دیده حاوی ترکیباتی است که از رشد و فعالیت فیبرولایتیک ها جلوگیری کرده و اثرات مضر خود را با کاهش قابلیت هضم فیبر و ماده خشک خوراک نشان می دهد. استفاده از آنتی اکسیدان ها در جیره این اثرات منفی را با خنثی کردن پراکسید ها و رادیکال های آزاد و نیز کاهش پراکسیداسیون اسیدهای چرب متعادل می نماید (27). در این راستا تحقیقات نشان می دهد (54)، تغذیه آنتی اکسیدان ها قابلیت هضم فیبر را در حضور چربی تازه و اکسید شده افزایش داده است که بر نقش مفید آنتی اکسیدان ها بر جمعیت میکروبی شکمبه تأکید دارد. سوق دادن جمعیت میکروبی به سمت فعالیت سلولولایتیک بیشتر و فعالیت بیوهیدروژناسیون کمتر از جمله مکانیسم های بیان شده برای بهبود در قابلیت هضم فیبر (64) و ماده آلی (54) در اثر آنتی اکسیدان ها می باشد.

قابلیت هضم عصاره اتری در اثر تیمار 2 و 3 نسبت به تیمار 1 به طور معنی داری ( $P<0/01$ ) به ترتیب کاهش و افزایش داشت. همچنین این میزان تحت تاثیر تیمار 3 افزایش معنی داری ( $P<0/01$ ) نسبت به تیمار 2 نشان داد. تیمار 2 در مقایسه با تیمار های 1 و 3 باعث کاهش معنی دار قابلیت هضم خاکستر ( $P<0/01$ ), قابلیت هضم ظاهری پروتئین خام ( $P<0/01$ ) و نیتروژن آمونیاکی شکمبه در زمان 8 ساعت پس از مصرف خوراک ( $P<0/05$ ) گردید، در حالی که این فراسنجه ها تحت تاثیر تیمار 3 به طور معنی داری نسبت به تیمار 2 و به طور قابل قبولی نسبت به تیمار 1 افزایش یافت. مصرف اختیاری ماده خشک خوراک در دام های تحت تغذیه تیمار 2 نسبت به تیمار 1 دارای روند کاهشی بود ( $P=0/08$ ), در حالی که تیمار 3 به طور معنی داری باعث افزایش مصرف خوراک نسبت به تیمارهای 1 و 2 گردید ( $P<0/05$ ). به طور کلی کاهش قابلیت هضم اجزاء خوراک در اثر حضور روغن اکسید شده می تواند تحت تاثیر دو عامل کاهش توانایی شکمبه در متابولیسم میکروبی ریزمغذی ها به دلیل بر هم خوردن تعادل جمعیت میکروبی و افزایش نرخ بازسازی دیواره لوله

**جدول 4- نسبت های ODDS<sup>1</sup> مقایسات دوتایی یک طرفه اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های کیفی مرتبط با مدفوع**

**Table 4- ODDS<sup>1</sup> ratio of one-way dual comparisons of treatments effects on qualitative faeces variables**

Variables/ treatment ranking <sup>2</sup>	3	2	تیمار <sup>3</sup> Treatments <sup>3</sup>	فراسنجه/رتبه بندی تیمارها <sup>2</sup>
The lack of apparent density of fecal pellets $b^1 > 3^{ab} > 2^a$	0.348	0.319	1	عدم تراکم ظاهری
	<sup>4</sup> P=0.06	P<0.05		گلوله مدفوع
	1.088	-	2	$1^b > 3^{ab} > 2^a$
	P=0.88	-		
Occurrence of hybrid pellets in faeces $2^b > 1^a > 3^a$	0.680	6.350	1	گلوله های هیبرید
	P=0.52	P<0.05		موجود در مدفوع
	0.107	-	2	$2^b > 1^a > 3^a$
	P<0.01	-		
The hair fall observed in faeces pool $2^b > 3^b > 1^a$	3.407	4.588	1	ریزش مو در مخزن
	P<0.05	P<0.01		مدفوع (میزان موی همراه مدفوع)
	0.743	-	2	$2^b > 3^b > 1^a$
	P =0.58	-		

<sup>1</sup> در مقایسه دوتایی تیمارهای ستون عمودی در مقابل تیمارهای ردیف افقی، تیمار با نسبت ODDS بالاتر، تمایل بیشتری به کسب رتبه پایین تر در فراسنجه مورد نظر دارد. <sup>2</sup> رتبه بندی نشان دهنده فراوانی موجود در تیمار برای فراسنجه مورد نظر می باشد و بر اساس سطوح معنی داری نسبت های ODDS، تیمارهای با حروف لاتین غیر مشترک در سطح معنی داری 0/05 یا یکدیگر متفاوتند. <sup>3</sup> تیمار 1: روغن تازه (کنترل مجازی)، تیمار 2) روغن اکسید شده و تیمار 3) روغن اکسید شده و هسته انار آسیاب شده. <sup>4</sup> تفاوت دو گروه میل به معنی داری دارد (P<0/08).

<sup>1</sup>In comparison among treatments group in vertical and horizontal columns, a group with higher ODDS ration trend to acquire lower grade in a variable. <sup>2</sup> Ranking demonstrate the frequency for each group in defend variable and different group in Latin alphabets are statistically different based on ODDS ration p-value. <sup>3</sup> Treatments:1) control (fresh oil) 2) oxidized oil and 3) oxidized oil and pomegranate seed. <sup>4</sup> groups trend to be different (p<0.08)

وزن مادر و بزغاله ها، با در نظر گرفتن هم عامل هایی نظیر سائز زایش و وزن اولیه دام در هنگام ورود به طرح، توسط آنالیز کوواریانس، تفاوت معنی داری بین تیمارهای آزمایشی نشان نداد. هر دو فراسنجه به طور غیرمعنی داری در اثر تیمار 2 نسبت به تیمارهای 1 و 3 کاهش و در اثر تیمار 3 نیز نسبت به تیمار 1 افزایش یافت. همچنین حجم ادرار در اثر تیمار 2 به طور معنی داری (P<0/05) نسبت به تیمارهای 1 و 3 افزایش یافت، در حالی که تفاوت معنی داری از این لحاظ بین تیمارهای 1 و 3 مشاهده نشد. درصد ماده خشک مدفوع در اثر تیمار 2 افزایش غیرمعنی داری را نشان داد، اما این میزان در اثر تیمار 3 نسبت به تیمارهای 2 و 1 به ترتیب با کاهش و افزایش غیرمعنی داری روبرو شد. حجم گلوله مدفوع نیز در تیمار 2 به طور معنی داری (P<0/01) نسبت به تیمارهای 1 و 3 کاهش یافت، در حالی که تیمارهای 1 و 3 از این لحاظ مشابه بودند. عدم تراکم ظاهری به عنوان یک فراسنجه کیفی از تورم گلوله مدفوع در اثر تیمار 2 نسبت به تیمار 1 به طور معنی داری کاهش یافت (P<0/05). همچنین این میزان در اثر تیمار 3 نسبت به تیمار 1 تمایل به کاهش نشان داد (P=0/06) در حالی که افزایش این فراسنجه در اثر تیمار 3 نسبت به تیمار 2 معنی دار نبود (جدول 4).

وجود گلوله های به هم چسبیده و دوتایی در مدفوع دام ها که نشان دهنده ماندگاری و فشردگی بیشتر مدفوع در روده می باشد، در اثر تیمار 2 افزایش معنی داری نسبت به تیمارهای 1 و 3 نشان داد، در صورتی که کاهش این فراسنجه در اثر تیمار 3 نسبت به تیمار 1 از لحاظ آماری مورد تأیید قرار نگرفت. وجود مو در مخزن مدفوع قفس متابولیکی به عنوان شاخصی از ریزش مو، در اثر تیمارهای 2 و 3 به طور معنی داری نسبت به تیمار 1 افزایش داشت، در حالی که مقدار این فراسنجه در اثر تیمار 3 نسبت به تیمار 2 کاهش عددی غیرمعنی داری نشان داد. از آنجا که ریزش مو معمولاً نمادی از کمبود مواد معدنی و اسیدهای آمینه ضروری، پروفیل هورمونی نامطلوب و یا واکنش های خود ایمنی القا شده توسط استرس می باشد (31)، افزایش ریزش مو با توجه به شواهدی نظیر کاهش معنی دار قابلیت هضم مواد مغذی و استرس اکسیداتیو احتمالی ناشی از ترکیبات حاصل از پراکسیداسیون اسیدهای چرب موجود در تیمار 2 دور از انتظار نبود. نیتروژن اوره ای خون در تیمار 2 نسبت به تیمارهای 1 و 3 افزایش یافت در صورتی که در اثر تیمار 3 نسبت به تیمارهای 1 و 2 کاهش غیرمعنی داری را نشان داد (جدول 5). همچنین نسبت نیتروژن اوره ای به کراتینین خون به عنوان شاخصی از دفع آب بدن (44) با



غیرمعنی داری نسبت به تیمار 1 نشان داد. افزایش غلظت بتاهدروکسی بوتیرات به عنوان شاخصی از اجسام کتون، در اثر تیمار 2 و کاهش آن نسبت به سایر تیمارها از لحاظ آماری معنی دار نبود. هورمون TSH در اثر تیمار 2 نسبت به تیمار 1 به طور قابل توجهی ( $P=0/13$ ) افزایش یافت (نمودار 1)، در حالی که افزایش و کاهش این فراسنجه در اثر تیمار 3 به ترتیب نسبت به تیمارهای 1 و 2 از لحاظ آماری معنی دار نبود. همچنین سطح هورمون  $T_3$  در اثر تیمار 2 به طور معنی داری ( $P<0/05$ ) پائین تر از تیمار 1 بود. غلظت این فراسنجه در اثر تیمار حاوی هسته انار نیز افزایش معنی داری ( $P<0/01$ ) نسبت به تیمار 1 نشان داد. غلظت هورمون  $T_4$  با روندی مشابه با هورمون  $T_3$  در اثر تیمارهای 2 و 3 نسبت به تیمار 1 و نیز در اثر تیمار 3 نسبت به تیمار 2 به طور غیرمعنی داری کاهش یافت (شکل 1).

نستل و همکاران (40) در تحقیقات خود نشان دادند که افزودن مکمل چربی به جیره بزهای شیری باعث افزایش بیوسنتز کلسترول در روده و کاهش ساخت آن در کبد می شود. همچنین آنها ثابت نمودند که میزان ساخت کلسترول در روده به شدت وابسته به نوع چربی است. از این رو افزایش میزان کلسترول در اثر تیمارهای 2 و 3 می تواند ناشی از پروفیل اسیدهای چرب روغن اکسید شده (جدول 2) باشد. الگوی قابلیت هضم عصاره اتری در اثر تیمارهای 2 و 3 به طور قابل توجهی با الگوی نوسانات غلظت تری گلیسرید مشابه بود. بر این اساس تغییرات مشاهده شده در میزان تری گلیسرید همواره می تواند تابعی از روابط متقابل بین غلظت انواع کلسترول، تری گلیسریدها و قابلیت هضم اجزای چیره باشد. VLDL نیز از دو منبع سنتز در روده باریک و کبد وارد خون می شود. اسیدهای چرب ورودی به روده پس از جذب در ژئوزنوم، در سلول های اپی تلیوم در ترکیب با آپولیپوپروتئین های AI، AII، B48، کلسترول و فسفولیپید، در قالب VLDL بسته بندی شده و پس از عبور از سیستم لنفاوی و یا به طور مستقیم، وارد جریان خون می شوند (23). از آنجا که تجزیه VLDL و آزاد سازی اسیدهای چرب از تری آسید گلیسرولها، وابسته به فعالیت آنزیم لیپوپروتئین لیپاز (LPL) بافتی در دیواره مویرگ های تغذیه کننده بافت پذیرنده و نیز کوآنزیم آپوپروتئین CII (APOC II) می باشد، عوامل موثر بر تنظیم بیان ژن مولکول های مذکور و تنظیم میزان سنتز کبدی و روده ای مولکول HDL، به عنوان عامل اتصال کوآنزیم سیگنالینگ APOC II به کمپلکس VLDL-LPL، از اهمیت بسزایی برخوردار است (22). بر اساس نتایج کاهش سنتز HDL در اثر تیمار 2 که احتمالاً منجر به کاهش تجزیه VLDL در گردش و افزایش غلظت آن نسبت به تیمارهای 1 و 3 می گردد، فرضیه فوق را اثبات می کند. از این رو انتظار می رود، LDL که محصول نهایی تجزیه VLDL می باشد، با کاهش تجزیه VLDL

افزایش غیرمعنی داری در اثر تیمار 2، گرایش دام ها به از دست دادن آب بدن در اثر مسمومیت احتمالی ناشی از مشتقات پراکسیداسیون چربی ها از قبیل آلکانال ها، آلکنال ها، دی آلدیدها و آلکانون ها (56) را تایید نمود ( $P=0/17$ ). شواهدی نظیر بالا رفتن نسبی نیتروژن اوره ای خون، حجم بالای دفع ادرار، خشکی و تراکم مدفوع و نسبت بالاتر نیتروژن اوره ای به کراتینین خون در اثر تیمار 2 این فرضیه را مورد تایید قرار می دهد که احتمالاً تخریب اکسیداتیو عضلانی منجر به بالا رفتن اوره موجود در خون شده که به تبع آن دفع کلیوی اوره برای حفظ هموستازی بدن افزایش می یابد. مطالعات فینلند و دانوویچ (25) نشان می دهد که میزان دفع اوره عامل کلیدی تعیین کننده دفع آب از طریق افزایش حجم ادرار است. مطالعات دینر و همکاران (19) نیز افزایش نرخ تخریب اکسیداتیو و بازسازی بافت های بدن در نتیجه مشتقات پراکسیداسیون اسیدهای چرب را عامل تولید متابولیت های سمی زائد و افزایش دفع کلیوی آنها به همراه آب معرفی می نماید که نتایج به دست آمده از هر دو مطالعه بالاتر بودن حجم ادرار در تیمار 2 (جدول 3) را توجیه می کند. در این شرایط انتظار می رود سیستم هموستاز بدن با افزایش جذب آب از دستگاه گوارش و افزایش ماندگاری مدفوع در روده به منظور جذب آب بیشتر، آب از دست رفته را جبران نماید. تراکم، خشکی و پیدایش گلوله های دوتایی و پیوسته در مدفوع در اثر تیمار 2 (جدول 4) این ساز و کار را تقویت می کند. بنابراین پیش نهاد می گردد، بهبود فراسنجه های مذکور در اثر تیمار 3 در نتیجه ممانعت احتمالی هسته انار از اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع قبل از جذب در دستگاه گوارش (5) و یا بهبود ظرفیت آنتی اکسیدانی حیوان به صورت سیستمیک و جلوگیری از اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع در بدن (26) باشد.

غلظت تری گلیسرید سرومی در اثر تیمارهای 2 و 3 به ترتیب کاهش و افزایش غیرمعنی داری نسبت به تیمار 1 نشان داد. همچنین غلظت کلسترول کل در اثر تیمارهای 2 و 3 نسبت به تیمار 1 به طور معنی داری ( $P<0/05$ ) افزایش یافت. افزایش غلظت LDL - کلسترول نیز در اثر تیمارهای 2 و 3 نسبت به تیمار 1 معنی داری ( $P<0/05$ ) بود، هرچند تیمارهای 2 و 3 از این لحاظ مشابه بودند. تیمار 3 باعث افزایش میزان HDL - کلسترول نسبت به تیمار 2 گردید ( $P<0/05$ ). غلظت VLDL - کلسترول نیز در اثر تیمار 2 به طور معنی داری ( $P<0/01$ ) نسبت به تیمارهای 1 و 3 افزایش و در تیمار 3 به طور غیرمعنی داری نسبت به تیمار 1 کاهش یافت (جدول 5). همچنین تیمار 2 شاخص خطر قلبی - عروقی را در مقایسه با تیمارهای 1 و 3 به طور معنی داری ( $P<0/05$ ) افزایش داد. غلظت گلوکز در اثر تیمار 2 به طور معنی داری ( $P<0/05$ ) نسبت به تیمارهای 1 و 3 کاهش یافت. همچنین در اثر تیمار 3 افزایش

عصاره اتری، متابولیسم انواع مولکول‌های کلسترول، کاهش احتمال بروز کتوزیس از طریق کاهش فاکتورهای پیش التهابی، کاهش اثر رادیکال‌های آزاد و متعادل نمودن وضعیت استرس اکسیداتیو مشهود است. به علاوه مطالعات موری-اکاموتو و همکاران (39) نشان می‌دهد که هسته انار افزون بر ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی نظیر پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها و کاروتنوئیدها، غنی از استروژن‌های گیاهی است که دارای پتانسیل اثر در بدن پستانداران می‌باشد. آیین و همکاران (3) نشان دادند که استروژن، ساخت مولکول APOC II که به عنوان کو‌آنزیم و پیام‌رسان در عمل آنزیم لیپوپروتئین لیپاز نقش دارد، راه تا 2 برابر افزایش می‌دهد. بنابراین علاوه بر اثرات ضد التهابی مذکور، نقش استروژن موجود در هسته انار نیز به عنوان مکانیسمی احتمالی در افزایش تجزیه VLDL و نیز افزایش غلظت LDL در سروم خون، تحت تاثیر تیمار 3 پیشنهاد می‌گردد. بر اساس نتایج (جدول 5)، غلظت کل پروتئین‌های خون در اثر تیمار 2 نسبت به تیمارهای 1 و 3 به طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین این میزان در اثر تیمار 3 نسبت به تیمار 1 میل به کاهش نشان داد. غلظت آلبومین در اثر تیمار 3 نسبت به تیمارهای 1 و 2 کاهش غیرمعنی‌داری را به نمایش گذاشت. غلظت پروتئین‌های گلوبولین که شامل ایمونوگلوبولین‌ها نیز می‌باشد، در اثر تیمارهای 2 و 3 به ترتیب نسبت به تیمار 1 کاهش و افزایش غیرمعنی‌داری را تجربه نمود.

همچنین نسبت آلبومین به گلوبولین در اثر تیمار 2 و 3 به ترتیب نسبت به تیمار 1 افزایش و کاهش غیرمعنی‌داری را نشان داد در حالی که کاهش این فراسنجه در اثر تیمار 3 نسبت به تیمار 2 قابل ملاحظه بود ( $P=0/14$ )، غلظت کراتینین در اثر تیمار 3 به طور معنی‌دار ( $P=0/05$ ) و غیرمعنی‌داری فراسنجه مذکور را در مقایسه با تیمارهای 1 و 2 کاهش یافت. همچنین تیمار 2 به طور غیرمعنی‌داری فراسنجه مذکور را نسبت به تیمار 1 کاهش داد. بیلی روبین مستقیم در اثر تیمار 2 نسبت به تیمار 1 افزایش غیرمعنی‌داری نشان داد، در حالی که این میزان در اثر تیمار 3 نسبت به تیمار 1 به طور غیرمعنی‌داری کاهش یافت. همچنین کاهش این فراسنجه در اثر تیمار 3 نسبت به تیمار 1 تمایل به معنی‌داری داشت ( $P=0/08$ ). غلظت کلسیم سرومی در اثر تیمار 2 نسبت به تیمار 1 میل به افزایش نشان داد در حالی که در اثر تیمار 3 نسبت به تیمار 2 روند کاهشی غیرمعنی‌داری داشت. الگوی تغییرات فسفر نیز مشابه تغییرات کلسیم در سروم بود، با این تفاوت که در اثر تیمار 3 نسبت به تیمار 1 کاهش قابل ملاحظه‌ای در مقدار این فراسنجه مشاهده گردید ( $P=0/11$ ). نسبت کلسیم به فسفر نیز در اثر تیمار 3 افزایش غیرمعنی‌داری نسبت به تیمارهای 1 و 2 نشان داد، هرچند کاهش این فراسنجه در اثر تیمار 2 نسبت به سایر تیمارها معنی‌دار نبود.

در اثر تیمار 2 و افزایش تجزیه آن در اثر تیمار 3 به ترتیب کاهش و افزایش باید (68). مطالعات نشان می‌دهد در نشخوارکنندگان بر خلاف تک‌معدده‌ای‌ها ترشح VLDL از کبد بسیار ناچیز است (24). همچنین جیره‌های پر چربی و یا وضعیتی که منجر به متحرک سازی اسیدهای چرب شود، ساخت و ترشح VLDL را در کبد کاهش می‌دهد (22). از این رو پائین بودن سطح گلوکز خون و بالاتر بودن غلظت بتا هیدروکسی بوتیرات و نیتروژن اوره‌ای خون در تیمار 2 نسبت به تیمارهای 1 و 3 شاخصی از افزایش متحرک سازی اسیدهای چرب از ذخایر چربی علامت تجزیه ذخایر پروتئینی به حساب آمده که علاوه بر نقشی که در کاهش VLDL برای آن مطرح است، نشان‌دهنده مستعد بودن دام به بروز علائم کتوزیس تحت کلینیکی می‌باشد (9). بنابراین منبع عمده تغییرات و نوسانات غلظت VLDL، آزاد سازی از منبع روده باریک به منظور بسته بندی تری‌آسیل گلیسرول‌ها و نیز نرخ تجزیه VLDL می‌باشد که این بر نقش خاص کاهش غلظت HDL بر کاهش تجزیه و انباشتن VLDL در گردش، در اثر تیمار 2 تاکید بیشتری می‌نماید.

سنتز HDL در طی افزایش نیاز به استری شدن اسیدهای چرب برای بازیابی ذخایر انرژی در مراحل پایانی آبستنی تحت القای انسولین صورت می‌گیرد (23). آزمایشات مشابه در گاو شیری نشان دهنده افزایش ظرفیت استریفیکاسیون کبد از طریق افزایش سنتز HDL و افزایش آزاد سازی آنزیم لسیتین-کلسترول آسیل ترانسفراز (LCAT) به درون پلاسما انجام می‌شود (22).

به نظر می‌رسد افزایش اجسام کتونی به عنوان علامتی از متحرک سازی اسیدهای چرب از ذخایر چربی به داخل پلاسما در تیمار 2 نسبت به تیمارهای 1 و 3، حاکی از ایجاد مقاومت انسولینی در اثر فاکتورهای پیش التهابی باشد (9) که این مقاومت مسیره‌های پیش برنده استریفیکاسیون را با اختلالاتی از جمله کاهش سنتز HDL در کبد رو برو می‌سازد. علاوه بر آن انتظار می‌رود افزایش نرخ بازسازی دیواره اپی تلیوم روده در اثر مشتقات پراکسیداسیون اسیدهای چرب، سنتز HDL در سلول‌های دیواره روده باریک را نیز کاهش دهد (19). بنابراین پایین بودن HDL سرومی در اثر تیمار 2 با ساز و کار ذکر شده هم‌خوانی دارد. از آنجا که HDL منبع اصلی انتقال بقایای زائد متابولیسم VLDL به کبد برای تبدیل آن به نمک‌های صفاوی است (22)، کاهش میزان HDL، از دو مسیر کاهش تجزیه VLDL و کمبود پیش ساز نمک‌های صفاوی و نیز کاهش انتقال این پیش‌سازها به کبد، احتمالاً می‌تواند منجر به کاهش حجم صفرا و متعاقباً کاهش قابلیت هضم عصاره اتری در اثر تیمار 2 گردد.

با توجه به مکانیسم‌های مطرح شده نقش آنتی‌اکسیدانی احتمالی هسته انار در بهبود کلی وضعیت متابولیکی دام‌ها، قابلیت هضم

**جدول 5-** اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های خونی مرتبط با متابولیسم مواد مغذی و وضعیت فیزیولوژیکی دام 2 هفته پس از اعمال تیمار (1 هفته قبل از زایش)  
**Table 5-** Effect of treatments on blood parameter related to nutrient metabolism and physiological status in 2 week after treatment<sup>1</sup>

فراسنجه‌های خونی Blood Metabolites	تیمار <sup>2</sup> Treatments <sup>2</sup>			SEM	P-value
	1	2	3		
تری گلیسرید (میلی گرم بر دسی لیتر) TG (mg/dl)	56.485	52.878	59.679	6.51	P=0.64
کلسترول کل (میلی گرم بر دسی لیتر) Total Chloestrol (mg/dl)	103.821 <sup>a</sup>	115.113 <sup>b</sup>	114.041 <sup>b</sup>	2.992	P<0.05
LDL - کلسترول (میلی گرم بر دسی لیتر) LDL (mg/dl)	23.301 <sup>a</sup>	24.820 <sup>b</sup>	27.297 <sup>b</sup>	0.750	P<0.05
HDL - کلسترول (میلی گرم بر دسی لیتر) HDL (mg/dl)	69.167 <sup>ab</sup>	61.387 <sup>a</sup>	74.863 <sup>b</sup>	2.922	P<0.05
VLDL - کلسترول (میلی گرم بر دسی لیتر) VLDL (mg/dl)	16.978 <sup>a</sup>	22.885 <sup>b</sup>	14.456 <sup>a</sup>	1.105	P<0.01
شاخص خطر قلبی عروقی <sup>3</sup> CVRI <sup>3</sup>	1.525 <sup>a</sup>	1.789 <sup>b</sup>	1.640 <sup>a</sup>	0.025	P<0.05
گلوکز (میلی گرم بر دسی لیتر) Glucose (mg/dl)	32.708 <sup>a</sup>	21.829 <sup>b</sup>	34.718 <sup>a</sup>	2.04	P<0.05
بتا هیدروکسی بوتیرات (میلی مول بر لیتر) BHBA (mMol/L)	0.632	0.723	0.590	0.074	P=0.39
پروتئین کل (گرم در لیتر) Total protein (g/L)	66.825	64.276	65.971	1.358	P=0.47
آلبومین (گرم در لیتر) Albumin (g/L)	28.431	28.407	27.614	0.645	P=0.61
گلوبولین (گرم در لیتر) Globulin (g/L)	37.356	36.913	38.350	1.050	P=0.40
نسبت آلبومین به گلوبولین Alb/Glb	0.779	0.783	0.721	0.027	P=0.21
نیترژن اوره ای خون (میلی گرم بر دسی لیتر) BUN (mg/dl)	19.273	20.988	18.210	0.407	P=0.47
کراتینین (میلی گرم بر دسی لیتر) Creatinine (mg/dl)	0.843 <sup>a</sup>	0.799 <sup>ab</sup>	0.769 <sup>b</sup>	0.019	P<0.05
نسبت نیترژن اوره ای خون به کراتینین Bun/Creatinine	23.490	27.097	23.466	1.447	P=0.17
بیلی روبین مستقیم (میلی گرم بر دسی لیتر) Bilirubin Direct (mg/dl)	0.311	0.380	0.246	0.049	P=0.45
کلسیم (میلی گرم بر دسی لیتر) Ca (mg/dl)	8.354	9.203	8.849	0.444	P=0.27
فسفر (میلی گرم بر دسی لیتر) P (mg/dl)	8.453	8.527	6.905	0.610	P=0.23
نسبت کلسیم به فسفر Ca/P	1.022	1.009	1.329	0.116	P=0.24
منیزیم (میلی گرم بر دسی لیتر) Mg (mg/dl)	2.948	2.909	2.978	0.106	P=0.90

<sup>1</sup> میانگین‌ها با حروف غیر مشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

<sup>2</sup> تیمار (1 روغن تازه (کنترل مجازی)، تیمار (2 روغن اکسید شده و تیمار (3 روغن اکسید شده و هسته انار.

<sup>3</sup> نسبت (مکفرسون، 2013).

<sup>1</sup>Means with different alphabets are statistically different.

<sup>2</sup>Treatments:1) control (fresh oil) 2) oxidized oil and 3) oxidized oil and pomegranate seed.

<sup>3</sup>Ratio (Macpherson, 2013).

بافتی کلسیم محلول قرار می‌گیرد (20). هرچند کلسیم محلول بافتی سهم اندکی در نوسانات غلظت کلسیم دارد اما در تنظیم اعمال فیزیولوژیکی عصب و عضله نقش عمده ای ایفا می‌کند (47). بر اساس نتایج، کاهش قابلیت هضم چربی ها و مواد معدنی در اثر تغذیه روغن اکسید شده می‌تواند نشان دهنده کاهش جذب روده ای مواد معدنی در اثر مسمومیت و تخریب بافتی رخ داده توسط ترکیبات پراکسید موجود در تیمار 2 و نیز رابطه آنتاگونیسمی چربی ها با جذب کلسیم باشد. کاهش احتمالی تولید نمک های صفراوی به دلیل کاهش HDL (23) و به تبع آن دفع میزان بیشتری از چربی ها از طریق مدفوع در اثر تیمار 2 نسبت به سایر تیمارها با توجه به توانایی چربی ها در باند نمودن یون های کلسیم، از دلایل احتمالی کاهش قابلیت هضم مواد معدنی در اثر تغذیه روغن های اکسید شده می‌باشد. اما با این وجود بالاتر بودن سطح کلسیم سرومی در اثر تیمار 2 در مقایسه با سایر تیمارها احتمالاً حاکی از افزایش نرخ برداشت از استخوان به دلیل کاهش در سطح هورمون های کلسیوتروفیک تحت القای افزایش نیاز به کلسیم محلول، جهت تأمین نیاز های عصبی، عضلانی و جنینی صورت می‌گیرد (44)، زیرا بر اساس نتایج، تأمین کلسیم مورد نیاز از طریق جیره به طور چشمگیری با کاهش قابلیت هضم مواد معدنی در تقابل با کاهش قابلیت هضم چربی کاهش یافته است.

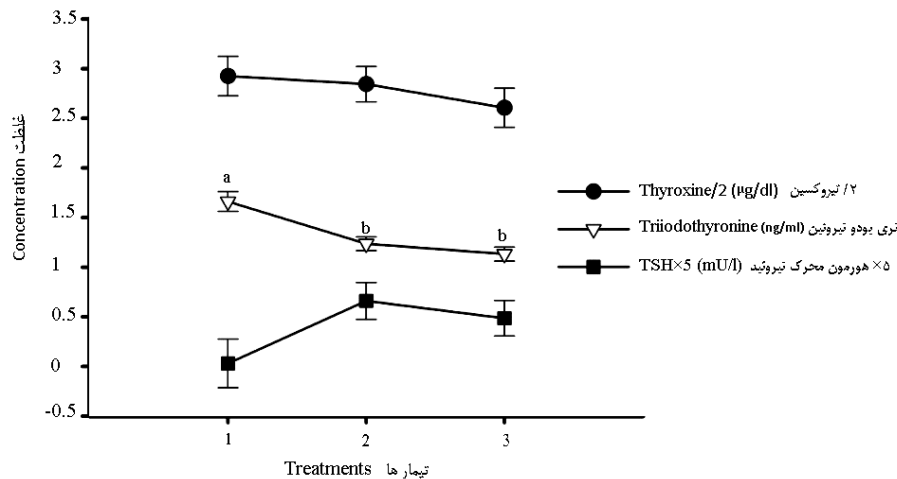
مطالعات موری - اوکاموتو و همکاران (39) نشان می‌دهد که ذخیره سازی کلسیم محلول در استخوان، تحت تاثیر هورمون کلسی تونین انجام می‌شود و میزان این هورمون در خون از طریق خوراندن هسته انار تحت القای استروژن موجود در آن افزایش می‌یابد. گناری و آگنوسدی (28) گزارش نمودند که تزریق استروژن باعث افزایش چگالی و نرخ معدنی شدن استخوان ها می‌گردد. علاوه بر آن جذب روده ای کلسیم در روده نیز تحت القای استروژن، افزایش می‌یابد.

همچنین آن ها بیان نمودند که سطح هورمون کلسی تونین خون در اثر اعمال تیمار استروژن به طور معنی داری افزایش می‌یابد، در صورتی که با حذف استروژن از طریق برداشتن تخمدان ها در موش های آزمایشگاهی جذب کلسیم از روده نسبت به موش های سالم کاهش یافته و میزان آزاد سازی کلسیم از استخوان ها و تخلخل بافت استخوان به شدت افزایش می‌یابد.

بر اساس منابع (1، 28 و 39) هر چند نقش کلسی تونین به عنوان واسطه اثر استروژن مشخص گردیده اما تزریق انفرادی کلسی تونین، به میزان تغذیه و تزریق استروژن باعث افزایش معنی دار چگالی استخوان نشده است (36) که نشان دهنده وجود واسطه های ثانویه در تاثیر هورمون استروژن بر ذخیره سازی کلسیم در استخوان می‌باشد.

ویلیامز و همکاران (69) نشان دادند که بیان ژن آلبومین در سلول های کبدی در اثر القای استروژن کاهش می‌یابد. همچنین آنها گزارش نمودند که در اثر استروژن غلظت آلبومین و نیز کل میزان پروتئین سروم کاهش می‌یابد. از طرفی تحقیقات ون لنت و لاهر (61) نشان می‌دهد که کاهش  $T_3$  با کاهش سطح آلبومین در ارتباط است. این یافته ها فرضیه ای را تقویت می‌کند که بر اساس آن احتمالاً استروژن موجود در هسته انار (39) اثر خود را بر کاهش آلبومین از طریق کاهش  $T_3$  اعمال می‌نماید. آین و همکاران (3) نشان دادند که استروژن باعث القای بیان ژن گلوبولین های خون به میزان 2 تا 3 برابر تیمار شاهد می‌گردد. همچنین آنها نشان دادند که آلبومین و گلوبولین سروم خون در اثر استروژن نسبت به تیمار کنترل به ترتیب 9 درصد کاهش و 34 درصد افزایش می‌یابد. بنابراین کاهش مشاهده شده در اثر تیمار 3 در میزان کل پروتئین سروم نسبت به تیمار 1 و نیز کاهش و افزایش رخ داده به ترتیب در غلظت آلبومین و گلوبولین سرومی نسبت به تیمارهای 1 و 2 احتمالاً به دلیل تاثیر استروژن موجود در هسته انار می‌باشد، در صورتی که کاهش میزان کل پروتئین، آلبومین و گلوبولین سرومی در اثر نوع روغن با توجه به بالارفتن نیتروژن اوره ای سروم، بیشتر بر نقش اکسیداتیو تیمار 2 صحه می‌گذارد.

بر اساس نتایج (شکل 1)، دو عامل اساسی در تغییرات هورمون های  $T_4$ ،  $T_3$  و TSH به چشم می‌خورد. عامل اول ترکیبات اکسیداتیو موجود در روغن اکسید شده است (23) که در تیمار 2 باعث کاهش غلظت هورمون های تیروئید و افزایش واضح غلظت TSH در اثر فرآیند تنظیم معکوس هیپوفیزی گردیده است (44). همانطور که انتظار می‌رود این عامل در تیمار 3 در اثر نقش آنتی اکسیدانی هسته انار به نحو موثری خنثی گردیده، چرا که غلظت TSH رو به کاهش نهاده است. اما از آنجا که بر اساس این ساز و کار روند منطقی در داده ها مشاهده نمی‌شود، فرضیه تاثیر استروژن موجود در هسته انار بر غلظت هورمون های تیروئید به عنوان عامل دوم مطرح می‌گردد (3). بنابراین کاهش غلظت  $T_3$  و  $T_4$  در اثر استفاده از هسته انار دال بر عاملی است که بر محور هیپوفیزی تنظیم هورمون های مذکور اثری نداشته است، زیرا با وجود کاهش مشاهده شده در هورمون های تیروئید، هر چند سطح هورمون TSH در اثر تیمار 3 نسبت به تیمار 2 کاهش می‌یابد، ولی این میزان همچنان نسبت به تیمار 1 بالاتر است. مطالعات نشان می‌دهد که استروژن موجود در هسته انار موجب افزایش اتصال هورمون های تیروئید به پروتئین گلوبولین می‌گردد (3). بنابراین کاهش نسبی در سطح این هورمون ها بدون توجه به تاثیری که می‌توانند بر TSH بگذارند مورد انتظار می‌باشد. غلظت کلسیم و فسفر سرومی به ترتیب اهمیت تحت تاثیر نرخ برداشت کلسیم از استخوان، جذب روده ای کلسیم و تبادلات بین



شکل 1- تاثیر تیمارهای آزمایشی (1) روغن سویای تازه، (2) روغن سویای اکسید شده و (3) روغن سویای اکسید شده و هسته انار، بر غلظت هورمون های تیروکسین، تری یودو تیرونین و هورمون محرک تیروئید

Figure 1- Effect of Treatments 1) Fresh soy oil 2) oxidized soy oil and 3) oxidized soy oil + pomegranate seed on concentration of thyroxine, triiodothyronine, and TSH

گلوامرولی است (44) که با نتایج جدول 3 مبنی بر افزایش حجم ادرار و کاهش رطوبت مدفوع در اثر تیمار 2 نسبت به سایر تیمارها و نیز افزایش نسبت نیتروژن اوره ای به کراتینین مطابقت دارد. کاهش غلظت کراتینین در اثر تیمار 3 با توجه به نقش آنتی اکسیدانی هسته انار در خنثی سازی اثرات رادیکال های پراکسید، این فرض را تقویت می کند که روند مذکور احتمالاً به دلیل کاهش تجزیه کراتینین و کراتین فسفات موجود در عضله (53) در اثر دو نقش آنتی اکسیدانی و فیتو استروژنی هسته انار رخ می دهد. از طرفی تعدیل وضعیت اکسیداتیو، باعث کاهش تخریب بافت ماهیچه ای شده و از طرف دیگر نقش استروژن در کاهش هورمون های تیروئید (شکل 1) نرخ متابولیسم در عضله را کاهش می دهد، که این فرض با نتایج به دست آمده از آنالیز نیتروژن اوره ای خون نیز هم خوانی دارد. شواهدی نظیر کاهش نسبت نیتروژن اوره ای به کراتینین، کاهش حجم ادرار و افزایش رطوبت مدفوع در اثر تیمار 3 نسبت به تیمار 2 نشان دهنده نقش تعدیل اثرات استرس اکسیداتیو، استروژن و کاهش متابولیسم بافت ماهیچه ای، در کاهش غلظت کراتینین است (39).

افزایش غلظت بیلی روبین مستقیم (کانجوگه) یا عملیاتی در اثر تیمار 2 نسبت به تیمارهای 1 و 3 با نحوه متابولیسم نمک های صفراوی در ارتباط می باشد (44). کبد توسط آنزیم گلوکورونیل ترانسفراز بیلی روبین غیر کانجوگه را به کانجوگه تبدیل نموده و آن را در ساخت نمک های صفراوی مورد استفاده قرار می دهد (44). کاهش سایر پیش سازهای نمک های صفراوی از جمله کلسترول در اثر تیمار (جدول 5) 2 باعث تجمع بیلی روبین اضافی در جریان خون و تمایل به دفع آن از طریق ادرار می گردد (53) که بخشی از افزایش

بنابراین کاهش غلظت کلسیم سرومی در اثر تیمار 3، دارای وابستگی منطقی با اثر استروژن موجود در هسته انار بر افزایش معدنی شدن استخوان ها و جذب کلسیم محلول سرومی از طریق این ساز و کار می باشد.

علاوه بر آن، انتظار می رود، افزایش HDL در اثر تیمار 3 و به تبع آن افزایش ساخت و ترشح نمک های صفراوی و جذب چربی از روده، اثر آنتاگونیسمی چربی ها بر جذب روده ای کلسیم را نیز تعدیل نماید (47) که منجر به تأمین احتیاجات کلسیم از منبع جیره و سوق یافتن متابولیسم کلسیم به سمت ذخیره سازی در استخوان ها می گردد. بنابراین انتظار می رود که بخشی از افزایش و کاهش وزن مشاهده شده به ترتیب در اثر تیمارهای 3 و 2 نسبت به تیمار 1، به دلیل افزایش و کاهش احتمالی چگالی استخوان نیز باشد. از آنجا که ذخیره سازی و جذب کلسیم به نسبت مشخصی با همراهی فسفر صورت می گیرد، نتایج الگوی مشابهی در تغییرات غلظت فسفر و کلسیم را نشان می دهد (47). از آنجا که تغییرات غلظت منیزیوم تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفته است، پیشنهاد می گردد که علاوه بر مقاومت سطح منیزیوم به مکانیسم های تشریح شده در اثر تیمار ها، مکانیسم های هموستازی بدن نیز غلظت منیزیوم سرومی را با حساسیت بیشتری نسبت به کلسیم و فسفر به نحوی تنظیم می نمایند که جز در موارد بیماری های عفونی یا استرس های حاد متابولیسمی تغییرات چندانی در غلظت سرومی آن مشاهده نمی شود (53).

کاهش کراتینین در اثر تیمار 2 نشان دهنده از دست رفتن آب بدن در اثر مسمومیت اکسیداتیو از طریق تاثیر بر فیلتراسیون

به طور کلی، روغن اکسید شده به دلیل تغییر در پروفیل اسیدهای چرب و وجود رادیکال‌های آزاد ناشی از پراکسیداسیون، وقایع متابولیکی را به سمت مسمومیت اکسیداتیو پیش می‌برد. هسته انار با دو مکانیسم آنتی‌اکسیدانی و هورمونی به ترتیب باعث خنثی‌سازی اثرات منفی حاصل از مشتقات پراکسیداسیون چربی‌ها و تغییرات مثبت فیزیولوژیک نظیر افزایش ذخیره سازی کلسیم در استخوان و بازسازی بافت پستان (15) برای ورود به گامه شیردهی می‌گردد. بنابراین استفاده از هسته انار به عنوان یک ماده مغذی طبیعی در تغذیه دام، که حاوی ترکیبات فعال زیستی می‌باشد، جهت ارتقاء سلامت و افزایش عمر اقتصادی دام توصیه می‌گردد.

حجم ادرار در اثر تیمار 2 نیز با این فرضیه قابل توجیه است. بنابراین افزایش ساخت و ترشح نمک‌های صفراوی به دلیل افزایش HDL در اثر تیمار 3، دفع بیلی‌روبین از طریق نمک‌های صفراوی را به عنوان مسیر اصلی دفع، افزایش داده (22) و منجر به کاهش سطح بیلی‌روبین کانونیک در سرور می‌گردد. همچنین مطالعات تریگونا و همکاران (59) نشان می‌دهد که آنزیم هم‌اکسیژناز 1 که مسئول تجزیه هم به بیلی‌روبین می‌باشد، در اثر استرس اکسیداتیو افزایش یافته و منجر به افزایش سطح بیلی‌روبین در خون می‌گردد. بنابراین انتظار می‌رود شرایط اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانی ناشی از تیمار‌های 2 و 3 به ترتیب باعث افزایش و کاهش غلظت آنزیم مذکور گردد.

## منابع

- 1- Agnusdei, D., R. Civitelli., A. Camporeale., and C. Gennari. 1990. Calcitonin and estrogens. *Journal of Endocrinology Investigation*, 13:625-630.
- 2- Agresti, A. 1980. Generalized odds ratios for ordinal data. *Biometrics*, 36:59-67.
- 3- Ain, K. B., S. Refetoff., D. H. Sarne., and Y. Murata. 1988. Effect of estrogen on the synthesis and secretion of thyroxine-binding globulin by a human hepatoma cell line, Hep G2. *Molecular Endocrinology*, 2:313-323.
- 4- Alberghina, D., S. Casella., I. Vazzana., V. Ferrantelli., C. Giannetto., and G. Piccione. 2010. Analysis of serum proteins in clinically healthy goats (*Capra hircus*) using agarose gel electrophoresis. *Veterinary Clinical Pathology*, 39:317-321.
- 5- Andrews, J., M. Vazquez-Anon., and G. Bowman. 2006. Fat stability and preservation of fatty acids with AGRADO\_ antioxidant in feed ingredients used in ruminant rations. *Journal of Dairy Science*. 89(Suppl. 1):60. (Abstr.)
- 6- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis, 18th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington. DC.
- 7- AOCS Official Method. 2003. Sampling and Analysis of Commercial Fats and Oils, Cd 8-53 • Peroxide Value.
- 8- AOCS Official Method. 2007. Sampling and Analysis of Commercial Fats and Oils, Cd 12-57 • Fat Stability.
- 9- Bani-Ismail, Z. A., A. M. Al-Majali., F. Amireh., and O. F. Al-Rawashdeh. 2008. Metabolic profiles in goat does in late pregnancy with and without subclinical pregnancy toxemia. *Veterinary Clinical Pathology*, 37:434-437.
- 10- Bauman, D. E., and J. M. Griinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition*. 23:203-227.
- 11- Brioukhanov, A. L., and A. I. Netrusov. 2004. Catalase and superoxide dismutase: Distribution, properties, and physiological role in cells of strict anaerobes. *Biochemistry (Moscow)*, 69:949-962.
- 12- Broderick, G. A., and J. H., Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal of Dairy Science*, 63:64-75.
- 13- Burhans, W. S., A. W. Bell., R. Nadeau., and J. R. Knapp. 2003. Factors associated with transition cow ketosis incidence in selected New England herds. *Journal of Dairy Science*. 86(Suppl. 1): 247. (Abstr.)
- 14- Cabel, M. C., P. W. Waldroup., W. D. Shermer., and D. F. Calabotta. 1988. Effects of ethoxyquin feed preservative and peroxide level on broiler performance. *Poultry Science*, 67:1725-1730.
- 15- Cannas, A., and G. Pulina. 2008. Dairy goats feeding and nutrition. CAB International, Wallingford, UK.
- 16- Castillo, C., J. Hernandez., A. Bravo., M. Lopez-Alonso., V. Pereira., and J. L. Benedito. 2005. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Veterinary Journal*, 169:286-292.
- 17- Cook, R. D., D. M. Hawkins., and S. Weisberg. 1993. Exact iterative computation of the robust multivariate minimum volume ellipsoid estimator. *Statistics and Probability Letters*, 16:213-218.
- 18- DeGroot, M. A., E. Block., P. D. French. 2010. Effect of prepartum anionic supplementation on periparturient feed intake, health, and milk production. *Journal of Dairy Science*, 93:5268-5279.
- 19- Dibner, J. J., M. L. Kitchell., C. A. Atwell., and F. J. Ivey. 1996. The effect of dietary ingredients and age on the microscopic structure of the gastrointestinal tract in poultry. *Journal of Applied Poultry Research*, 5:70-77.
- 20- Dijkstra, J., J. M. Forbes., and J. France. 2005. Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism second ed. CAB International. Wallingford. UK.
- 21- Doepel, L., H. Lapierre., and J. J. Kennelly. 2002. Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and protein intake. *Journal of Dairy Science*, 85:2315-2334.
- 22- Drackley, J. K. 2000. Lipid metabolism. In: D'Mello, J. P. F. *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. CAB International. pp, 97-119.

- 23-Durand, D., V. Scislowski., Y. Chilliard., D. Gruffat., and D. Bauchart. 2005. High fat rations and lipid peroxidation in ruminants; consequences on animal health and quality of products. In Hocquette, J. F. and S. Gigli, Indicators of Milk and Beef Quality. pp. 137-150. Wageningen. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- 24-Emery, R. S., J. S. Liesman., and T. H. Herdt. 1992. Metabolism of Long Chain Fatty Acids by Ruminant Liver, The Journal of Nutrition, 122:832-837.
- 25-Feinfeld, D. A., and Danovitch, G. M. 1987. Factors affecting urine volume in chronic renal failure. American Journal of Kidney Disease, 10:231-235
- 26-Focant, M., E. M. Mignolet., F. Marique., T. Clabots., B. D. Dalemans., and Y. Larondelle. 1998. The effect of vitamin E supplementation of cow diets containing rapeseed and linseed on the prevention of milk fat oxidation. Journal of Dairy Science, 81:1095-1101.
- 27-Frankel, E. N. 2005. Antioxidants. in Lipid Oxidation. 2nd ed. E. N. Frankel. The Oily Press, Bridgwater, UK. pp. 209-258.
- 28-Gennari, C., and D. Agnusdei. Calcitonin. 1990. estrogens and the bone. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 37:451-455.
- 29-Gonthier, C., A. F. Mustafa., D. R. Ouellet., P. Y. Chouinard., R. Berthiaume., and H. V. Petit. 2005. Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: Effects on blood parameters and milk fatty acid composition. Journal of Dairy Science. 88:748-756.
- 30-Heber, D., N. P. Seeram, H. Wyatt, S. M. Henning, Y. Zhang, L. G. Ogden, M. Dreher, and J. O. Hill. 2007. Safety and antioxidant activity of a pomegranate ellagitannin-enriched polyphenol dietary supplement in overweight individuals with increased waist size. Journal of Agricultural Food Chemistry, 55:10050-10054.
- 31-Jackson, P. G. G., and P. D. Cockcroft. 2002. Clinical examination of farm animals. Blackwell Science, UK.
- 32-Kramer, J. K. G., V. Fellner., M. E. R. Dugan., F. D. Sauer., M. M. Mossoba., and M. P. Yurawecz. 1997. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. Lipids, 32:1219-1228.
- 33-Kramer, J. K. G., C. Cruz-Hernandez., and J. Zhou. 2001. Conjugated linoleic acids and octadecenoic acids: Analysis by GC. European Journal of Lipid Science and Technology, 103: 594- 632.
- 34-Lohrke, B., T. Viergutz., W. Kanitz., B. Losand., D. G. Weiss., and M. Simko. 2005. Short communication: Hydroperoxides in circulating lipids from dairy cows: Implications for bioactivity of endogenous- oxidized lipids. Journal of Dairy Science, 88:1708-1710.
- 35-Maia, M. R., L. C. Chaudhary., L. Figueres., R. J. Wallace. 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. Antonie Van Leeuwenhoek, 91: 303-314.
- 36-Mazzuoli, G. F., S. Tabolli., F. Bigi., C. Valtorta., S. Minisola., D. Diacinti., L. Scarnecchia., G. Bianchi., M. Piolini., and S. Dell'Acqua. 1990. Effects of salmon calcitonin on the bone loss induced by ovariectomy. Calcified. Tissue International, 47:209-214.
- 37-McPherson, R. 2013. Remnant Cholesterol "Non- (HDL-C + LDL-C)" as a Coronary Artery Disease Risk Factor. Journal of the American College of Cardiology, 61:437-439.
- 38-Miller, J. K., and E. Brezeinska-Slebodizinska. 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function, Journal of Dairy Science, 76:2812-2823.
- 39-Mori-Okamoto, J., Y. Otawara-Hamamoto., H. Yamato., and H. Yoshimura. 2004. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. Journal of Ethnopharmacology, 92:93-101.
- 40-Nestal, P. J., A. Poyser., R. L. Hood., S. C. Mills., M. R. Willis., L. J. Cook., and T. W. Scott. 1978. The effect of dietary fat supplements on cholesterol metabolism in ruminants. The Journal of Lipid Research, 19:899-909.
- 41-Oliveira, R. A., C. D. Narciso., R. S. Bisinotto., M. C. Perdomo., M. A. Ballou., M. Dreher., and J. E. Santos. 2010. Effects of feeding polyphenols from pomegranate extract on health, growth, nutrient digestion, and immunocompetence of calves. Journal of Dairy Science, 93:4280- 4291.
- 42-Overton, T. R., and M. R. Waldron. 2004. Nutritional Management of Transition Dairy Cows: Strategies to Optimize Metabolic Health. Journal of Dairy Science. 87:(E. Suppl.): E105-E119.
- 43-Pratt, E., and V. Hudson. 1999. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica Granatum L.*) grown in Turkey. Journal of Food Composition and Analysis, 15:567-575.
- 44-Pugh, D. G., and A. N. Baird. 2012. Sheep and goat medicine. 2nd ed. Elsevier publication. USA.
- 45-Reddy, P. V., J. L. Morrill., and T. G. Nagaraja. 1994. Release of free fatty acids from raw or processed soybeans and subsequent effects on fiber digestibilities. Journal of Dairy Science, 77:3410-3416.
- 46-SAS. 2009. SAS User's Guide: Statistics. Ver 9.2. SAS Institute. Cary. N.C. USA.
- 47-Sauvant, D., J. Van Milgen., P. Faverdin., and N. Friggens. 2011. Modelling nutrient digestion and utilisation in farm animals, Wageningen Academic Publishers. The Netherlands.
- 48-Scandalios, J. G. 2005. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Brazilian Journal Of Medical and Biological Research, 38:995-1014.
- 49-Schubert, S., E. Lansky., and I. Neeman. 1999. Antioxidant and eicosanoid enzyme in habitation properties of

- pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, 66:11-17.
- 50-Seeram, N. P., Y. Zhang., J. D. Reed., C. G. Krueger., and J. Vaya. 2006. Pomegranate phytochemicals. in *Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine*. N. P. Seeram, R. N. Schulman, and D. Heber, ed. CRC Press, Taylor and Francis Group. BocaRaton, FL. pp.3-29.
- 51-Seifi, H. A., M. Mohri., N. Farzaneh., H. Nemati., and S. V. Nejhad. 2010. Effects of anionic salts supplementation on blood pH and mineral status, energy metabolism, reproduction and production in transition dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 89:72-77.
- 52-Senger, C. D., G. V. Kozloski., L. M. B. Sanchez., F. R. Mesquita., T. P. Alves., and D. S. Castagnino. 2008. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, 146:169-174.
- 53-Smith M. C., and D. Sherman. 2009. *Goat medicine*. 2nd ed. Wiley-Blackwell publication. Iowa. USA.
- 54-Smith, J. L., L. G. Sheffield., and D. Saylor. 2002. Impact of ethoxyquin on productivity of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 85(Suppl. 1):358. (Abstr.).
- 55-Sordillo, L. M., and S. Aitken. 2009. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128: 104-109.
- 56-Spiteller, P., W. Kern., J. Reiner., and G. Spiteller. 2001. Aldehydic lipid peroxidation products derived from linoleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1531:188-208.
- 57-SRNS. 2012. Small Ruminant Nutrition System. ver 1.9.4468. Official website: <http://nutritionmodels.com/srns.html>.
- 58-Suzuki, H., A. Asakawa., J. B. Li., M. Tsai., H. Amitani., K. Ohinata., M. Komai., and A. Inui. 2011. Zinc as an appetite stimulator - the possible role of zinc in the progression of diseases such as cachexia and sarcopenia. *Recent Patents on Food, Nutrition, and Agriculture*, 3:226-231.
- 59-Trigona, W. L., I. K. Mullarky., Y. Cao., and L. M. Sordillo. 2006. Thioredoxin reductase regulates the induction of haem oxygenase-1 expression in aortic endothelial cells. *Biochemical Journal*, 394:207-216.
- 60-Valko, M., D. Leibfritz., J. Moncol., M. T. Cronin., M. Mazur., and J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39:44-84.
- 61-Van Keulen, J. and B. A. Young. 1977. Evaluation of Acid-Insoluble Ash as a Natural Marker in Ruminant Digestibility Studies. *Journal of Animal Science*, 44:282-287.
- 62-Van Lante, F., and R. Daher. 1992. Plasma selenium concentrations in patients with euthyroid sick syndrome. *Clinical Chemistry*, 38:1885-1888.
- 63-Va'zquez-An'ón, M., J. Andrews., T. Webster, and T. Jenkins. 2006. Effects of feeding oxidised fat supplemented with antioxidant AGRADO on rumen nutrient digestibility and protein synthesis. *Journal of Dairy Science*. 89(Suppl. 1):406.
- 64-Va'zquez-An'ón, M., and T. Jenkins. 2007. Effects of feeding oxidized fat with or without dietary antioxidants on nutrient digestibility, microbial nitrogen, and fatty acid metabolism. *Journal of Dairy Science*, 90:4361-4367.
- 65-Wallace, R. J., N. McKain., K. J. Shingfield., and E. Devillard. 2007. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *Journal of Lipid Research*. 48:2247-2254.
- 66-Wanasundara, U. N., and F. Shahidi. 1998. Antioxidant and prooxidant activity of green tea extract in marine oils. *Journal of Food Chemistry*, 63: 335-342.
- 67-Weiss, W. P. 1998. Requirements of fat-soluble vitamins for dairy cows: A review. *Journal of Dairy Science*. 81:2493-2501.
- 68-Wiggins, D., and G. F. Gibbons. 1996. Origin of hepatic very-low-density lipoprotein triacylglycerol: the contribution of cellular phospholipid. *Biochemistry Journal*, 320:673-679.
- 69-Williams, D. L., S. Y. Wang, H. Klett. 1978. Decrease in functional albumin messenger-RNA during estrogen-induced vitellogenin biosynthesis in avian liver. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA*, 75:5974-5978.



## Effect of Feeding Oxidized Soybean Oil against Antioxidant role of Pomegranate Seed on Physiology and Metabolism of Periparturient Saanen Goats

S. E. Ghiasi<sup>1\*</sup>- R. Valizadeh<sup>2</sup>- A. A. Naserian<sup>2</sup>

Received: 27-04-2013

Accepted: 03-01-2014

**Introduction** Oxidative stress is metabolic and physiologic status caused by imbalance between free radical production and antioxidant defense of body. In some physiological status such as rapid growth, parturition, disease and high production rate that imbalance would occur. High producing dairy animals are suspected to oxidative stress and require to antioxidant supplementation. Negative energy balance in early lactation force the nutrition specialist to apply oil and high NFC diet to exceed the requirement of high producing dairy animals such as Holstein cows and Saanen goats. In recent years, the attention to the use of herbal or organic antioxidant in animal nutrition has increased. This study was carried out to investigate the effects of feeding oxidized soybean oil (OSO) plus pomegranate seed (PS) as a natural antioxidant, on metabolism and physiology of Preparturient Saanen Goats.

**Materials and Methods** Eighteen Saanen dairy goats with initial body weight of  $47 \pm 9$  kg were assigned to three dietary treatments in a completely randomized design with repeated measurements for 21 days before anticipated parturition. Experimental treatments including: 1) base diet and 4% fresh soybean oil (FSO), 2) base diet and 4% oxidized soybean oil (DM basis) respectively, and 3) base diet plus 4% OSO and 8% Pomegranate seed (OSO-PS). After 2 weeks of feeding trial diets, goats were sampled for blood, rumen liquor, faeces and urine for measuring parameters of blood glucose, BHBA, lipid and nitrogen profile, rumen liquor ammonia nitrogen, urine pH and volume, faeces qualitative and quantitative variables and other responses such as nutrients digestibility. The GLM procedure of SAS software v.9.2 were used for statistical analysis. Initial body weight and metabolic variables were used as covariate in the model.

**Results and discussion** All nutrients digestibility, Ruminal ammonia nitrogen and voluntary feed intake were decreased by OSO ( $p < 0.05$ ) and increased significantly by OSO-PS vs. FSO. Urinary pH was significantly decreased by OSO-PS in comparison with other treatments. Urinary volume was increased ( $p < 0.05$ ) and the faeces bolus Volume and humidity significantly reduced by OSO vs. other treatments. Triiodothyronine and creatinine concentration were significantly decreased by oxidized soybean oil (treatment 2) and OSO-PS (treatment 3) compared to sham control (FSO), and fasting glucose was significantly decreased and increased by OSO and OSO-PS vs. FSO ( $p < 0.05$ ), respectively. The metabolism of all types of Cholesterol was significantly altered by the treatments but the fluctuations of other parameters were not significantly differed among diets. This result is in accordance with other studies on herbal antioxidant feeding to ruminant, but the difference is in study situation of stimulated oxidative stress in this trial. Its might be suggested that antioxidant capacity of pomegranate seed could be an effective agent on saving turnover rate of epithelium against free radicals and other lipid peroxides.

**Conclusion** Generally, oxidative stress metabolic signs and statues were stimulated by OSO but most metabolic and physiological indices were improved by hormonal and antioxidant effects of PS. Improved nutrients digestibility, blood parameters, urine and faces variables and rumen statues regarding to the results, proposed that pomegranate seed or other derivatives, raw or processed form could have a potential effect on economical and health parameters of domestic animals. Also regarding to lowering pH potential of pomegranate seed, it's supplementation in preparturient dairy animals might be a good strategy for acidifying diet and animal body to the prevention of metabolic disorders.

**Keywords:** Metabolism, Oxidized soybean oil, Physiology, Pomegranate seed, Saanen goat.

1- Professor assistant, Department of Animal Science, University of Birjand, Iran,

2- Professor, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

(\*-Corresponding author email: s.e.ghiasi@birjand.ac.ir)