مقاله تحقیقی | مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۷، دوره ۷۳، شماره ۴، ۴۲۵-۴۱۹ | Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2018.223223.2554

تأثیر افزودن بذر، عصاره و گیاه خارمریم بر فراسنجه‌های خونی و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره آلوده به آفلاتوکسین

مجتبی افشین[1] نظر افضلی[1] محسن مجتهدی[1] عباس محمدی[2]

[1] گروه علوم دام و طیور، دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

[2] گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

(دریافت مقاله: ۲۸ فروردین ماه ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۱۹ تیر ماه ۱۳۹۷)

چکیده

زمینه مطالعه: آفلاتوکسین‌ها سموم قارچی طبیعی هستند که سبب تضعیف سیستم ایمنی و آسیب به کبد می‌گردند.

هدف: اثر پودر بذر، عصاره و پودر گیاه کامل خارمریم در کاهش اثرات منفی تغذیه جیره آلوده به آفلاتوکسین بر فراسنجه‌های خونی و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی بررسی شد.

روش کار: از ۱۹۲ قطعه خروس یک روزه سویه راس ۳۰۸ به مدت ۳۵ روز در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار، چهار تکرار و هشت قطعه پرنده در هر تکرار استفاده گردید. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: ۱) تیمار شاهد سالم، ۲) شاهد آلوده به آفلاتوکسین، ۳) شاهد آلوده + ۰/۵٪ پودر بذر خارمریم، ۴) شاهد آلوده + ۱٪ پودر گیاه خارمریم، ۵) شاهد آلوده + ۶۰۰ ppm عصاره گیاه خارمریم، ۶) شاهد آلوده + ۱۰۰۰ ppm عصاره گیاه خارمریم.

نتایج: تیمارهای آزمایشی اثر معنی‌داری بر کلسترول، لیپوپروتئین باچگالی بالا، لیپوپروتئین باچگالی پایین، آلکالین فسفاتاز، لاکتات‌دهیدروژناز، آسپارتات‌آمینوترانسفراز و ایمنوگلوبولین‌های M و G خون جوجه‌های گوشتی نداشتند. تیمار شاهد آلوده موجب افزایش معنی‌دار غلظت پلاسمایی آلانین‌آمینوترانسفراز در مقایسه با تیمار شاهد سالم گردید ($P\leq$۰/۰۵). افزودن ۰/۵٪ پودر بذر خارمریم، ۱٪ پودر گیاه خارمریم و ۱۰۰۰ ppm عصاره گیاه خارمریم به جیره آلوده سبب کاهش معنی‌دار غلظت پلاسمایی آلانین آمینوترانسفراز در مقایسه با شاهد آلوده شد ($P\leq$۰/۰۵). جیره آلوده حاوی ۱٪ پودر خارمریم موجب افزایش معنی‌دار عیار پادتن علیه چالش SRBC در مقایسه با شاهد سالم و شاهد آلوده گردید ($P\leq$۰/۰۵).

نتیجه‌گیری نهایی: براساس نتایج این پژوهش، پودر گیاه خارمریم به میزان یک درصد در مقایسه با دیگر افزودنی‌های مورد آزمایش به منظور کاهش و یا حذف عوارض منفی آفلاتوکسین بر فراسنجه‌های خونی و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی قابل توصیه است.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، آلانین‌آمینوترانسفراز، جوجه‌گوشتی، خارمریم، فراسنجه‌های خونی

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله تحقیقات دامپزشکی محفوظ است.

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۵۶-۳۲۴۶۸۰۲۷ نمابر: ۰۵۶-۳۲۲۰۲۵۱۷ Email: Mojtaba.Afshin@Birjand.ac.ir

How to Cite This Article

Afshin, M., Afzali, N., Mojtahedi, M., Mojtahedi, A. (2019). Effects of Milk Thistle Seeds, Whole Plant and Extract on Blood Parameters and Immune Response of Broiler Chickens Fed Aflatoxin Contaminated Diet, Iran. J Vet Res, 73(4), 419-425. doi: 10.22059/jvr.2018.223223.2554

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بیش از ۳۰۰ نوع مایکوتوکسین مختلف تا به حال شناسایی شده‌اند که سمومی نظیر تریکوتسین‌ها، زیرالنون، اکراتوکسین‌ها، فومونیزون و آفلاتوکسین‌ها مورد توجه ویژه‌ای هستند. بر اساس گزارشات IARC (آژانس بین المللی تحقیقات بر روی سرطان)، آفلاتوکسین‌ها موادی با پتانسیل سرطان‌زایی بالا می‌باشند. آفلاتوکسیکوزیس یا بیماری ناشی از مصرف آفلاتوکسین عمدتاً به شکل مزمن در طیور بروز می‌نماید و از مهمترین علائم آن می‌توان به کاهش وزن بدن، نامناسب شدن ضریب تبدیل خوراک، کاهش تولید تخم‌مرغ، افزایش حساسیت به بیماری‌های عفونی و در نهایت کاهش بهره‌وری واحد تولیدی اشاره کرد (۶،۷،۱۳،۱۸). به منظور حذف این قبیل اثرات نامطلوب در جوجه‌های گوشتی، روش‌های مختلفی به کارگرفته می‌شود. یکی از راهکارهای مؤثر و کاربردی استفاده از گیاهان دارویی از جمله گیاه خارمریم در تغذیه جوجه‌های گوشتی است (۲،۹).

گیاه خارمریم (Milk thistle) با نام علمی (*Silybum marianum*) از تیره کاسنیان است. ترکیبات اصلی گیاه را مخلوطی از فلاونولیگنان‌ها، با نام کلی سیلی‌مارین ($C_{25}H_{22}O_{10}$) تشکیل می‌دهد. سیلی‌مارین به عنوان آنتی‌اکسیدان و محافظ کبد شناخته شده است (۱۶). بین ترکیب‌های سازنده سیلی‌مارین، مقدار سیلی‌دیانین در ساقه گیاه بیشتر است؛ در صورتی که مقدار سایر ترکیبات در بذر بیشتر هستند (۱۱). سیلی‌مارین باعث کاهش اثرات منفی آفلاتوکسین B1 بر مصرف خوراک، وزن بدن، وزن اندام‌های داخلی و مورفولوژی کبد در جوجه‌های گوشتی می‌گردد (۹). افزودن ۶۰۰ ppm ترکیب فسفولیپید سیلی‌مارین به جیره آلوده به ۰/۸ ppm آفلاتوکسین B1 سبب پوشاندن اثرات منفی آفلاتوکسین B1 بر وزن بدن و مصرف خوراکرجوجه‌های گوشتی گردید (۱۸). جیره‌های آلوده به ۲۵۰ ppm و ۵۰۰ آفلاتوکسین B1، سبب بروز علائم غیر طبیعی مانند بزرگ، زرد و شکننده شدن کبد جوجه‌های گوشتی گردید، مطالعات نشان داد استفاده از سطوح ۰/۵ و ۱٪ پودر بذر خارمریم در جیره‌های آلوده سبب شرایط طبیعی در کبد شد (۹). کاهش معنی‌دار غلظت آنزیم آسپارت آمینوترانسفراز در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره آلوده در ترکیب با پودر بذر خارمریم گزارش شده است (۲).

هدف از این تحقیق مقایسه پودر بذر، پودر و عصاره گیاه کامل خارمریم در مهار اثرات منفی آفلاتوکسین بر فراسنجه‌های خونی و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی می‌باشد. استفاده از پودر گیاه خارمریم در مقایسه با پودر بذر که دارای مصارف انسانی است از نظر جنبه‌های اقتصادی می‌تواند قابل توصیه باشد.

مواد و روش کار

این آزمایش با استفاده از ۱۹۲ قطعه جوجه خروس گوشتی یک روزه سویه راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار، چهار تکرار و هشت قطعه جوجه در هر تکرار در سالن تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند در سال ۱۳۹۵ اجرا شد. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: ۱) تیمار شاهد سالم، ۲) شاهد آلوده به آفلاتوکسین، ۳) شاهد آلوده + ۰/۵٪ پودر بذر خارمریم (پروتئین خام ۱۷/۳۹ و انرژی خام ۵۳۱۲ کیلوکالری در کیلوگرم)، ۴) شاهد آلوده + ۱٪ پودر گیاه خارمریم (پروتئین خام ۶/۴۶ و انرژی خام ۲۷۷۴/۳۹ کیلوکالری در کیلوگرم)، ۵) شاهد آلوده + ppm ۶۰۰ عصاره گیاه خارمریم، ۶) شاهد آلوده + ppm ۱۰۰۰ عصاره گیاه خارمریم. جیره پایه بر اساس آنالیز ترکیب شیمیایی مواد خوراکی انجمن ملی تحقیقات و با استفاده از نرم‌افزار UFFDA برای دوره آغازین، رشد و پایانی تنظیم شد (جدول ۱). در مدت انجام آزمایش، جوجه‌ها به آب و خوراک دسترسی آزاد داشتند. در پایان دوره‌ی آزمایش (۳۵ روزگی)، از هر واحد آزمایشی یک قطعه جوجه بصورت تصادفی انتخاب و از ورید وداج در هنگام ذبح خونگیری شد. نمونه‌های خون درون لوله‌های دارای ماده‌ی ضد انعقاد اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید ریخته شده، سپس با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. نمونه‌های پلاسما جدا شده و تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۲۰ °C- نگهداری شدند. غلظت کلسترول (CHOL)، تری‌گلیسرید (TG)، لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا (HDL)، آلکالین‌فسفاتاز (ALP)، لاکتات‌دی-هیدروژناز (LDH)، آسپارتات‌آمینوترانسفراز (AST) و آلانین‌آمینوترانسفراز (ALT) توسط کیت‌های شرکت پارس آزمون، بر پایه‌ی روش-های استاندارد آزمایشگاهی و توسط دستگاه اتوآنالایزر جسان ایتالیا مدل ۲۰۰ (Made in Italy-۲۰۰ Chem. Gesan) اندازه‌گیری شد. همچنین غلظت لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین (LDL) با استفاده از رابطه زیر و نسبت LDL/HDL کلسترول و LDL/HDL نیز محاسبه شد.

$$LDL = TC - [HDL + TG/5]$$

به منظور بررسی ایمنوگلوبین‌های خون جوجه‌های مورد آزمایش از تست عیار پادتن بر ضد گلبول قرمز گوسفندی (SRBC) استفاده شد. برای انجام این مرحله از تست SRBC، از گوسفند خونگیری شد و خون گوسفند به لوله آزمایش حاوی ماده ضد انعقاد اضافه گردید. لوله آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد و پلاسما جدا و چندین بار با سرم فیزیولوژی نمونه خون را شسته تا گلبول‌های قرمز جدا شدند و SRBC تهیه گردید. سپس SRBC ۵ ٪ در ۱۶ روزگی و SRBC ۱۰ ٪ در ۳۰ روزگی به میزان یک سی‌سی به ۲ قطعه جوجه از هر تکرار از طریق ورید بال تزریق شد. در فاصله ۵ روز پس از هر تزریق از جوجه‌ها خونگیری به عمل آمد. خون گرفته شده از هر قطعه به لوله آزمایش اضافه گردید. پلاسما خون هر نمونه بعد از سانتریفویوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ جدا شد و نمونه‌های پلاسما تا زمان انجام مراحل آزمایشگاهی تست SRBC در دمای ۲۰ °C- نگهداری شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

مراحل آزمایشگاهی بدین صورت بود که ابتدا میکروتیوب‌های پلاسما از فریزر خارج شد و به مدت نیم تا یک ساعت در دمای ۵۵ °C قرار گرفت تا پلاسماها از حالت یخ‌زده خارج شدند. سپس بوسیله سمپلر میزان ۵۰ µl بافر در داخل چاهک‌های پلیت آزمایشگاهی ریخته شد. بعد از پر کردن همه چاهک‌ها عمل رقیق‌سازی با ۵۰ µl پلاسما صورت گرفت. در ادامه داخل همه چاهک‌ها ۵۰ µl، SRBC یک درصد ریخته شد تا حجم همه چاهک‌ها به ۱۰۰ ml رسید. بعد از قرار دادن پلیت‌ها به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ °C و تشکیل لخته خونی عمل قرائت انجام داده شد. دکمه‌ها یا لخته‌های ایجاد شده حاکی از رسوب SRBC است، که نشان دهنده ترکیب پادتن با SRBC می‌باشد. دکمه‌ها برای هر تکرار شمارش و یادداشت شد. در طی این مراحل مقدار SRBC اندازگیری شد.

برای اندازه‌گیری ایمنوگلوبولین‌های M، مراحل قبلی انجام شد با این تفاوت که به جای بافر، ۵۰ µl مرکاپتواتانول یک درصد ریخته شد. مشابه مرحله قبل بعد از دو ساعت قرار دادن رک‌ها در دمای ۳۷ °C دکمه‌ها شمارش شدند.

ایمنوگلوبولین‌های G با توجه به فرمول‌های زیر محاسبه شدند (۱).

$$SRBC = ImM + ImG$$

$$ImG = SRBC - ImM$$

تولید آفلاتوکسین به روش Shotwell انجام گرفت (۱۷). قارچ آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس (سویه NRRL ۲۹۹۹) در محیط کشت عصاره سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) تکثیر شد و به محیط کشت جدید (برنج) منتقل گردید. کشت‌های قارچی آماده شده به مدت هفت روز در دمای ۲۸ °C انکوباسیون شدند. برای انتقال قارچ به برنج در هر فلاسک ارلن‌مایر (۲۵۰ cc) ۲۵ g برنج و حدود ۱۴ cc آب مقطر ریخته شد. درب فلاسک‌ها توسط پنبه بسته شدند و روی آن فویل آلومنیومی قرار گرفت و به مدت یک ساعت نگهداری شدند. فلاسک‌ها در دمای ۱۲۱ °C و به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. پس از سرد شدن برنج‌های اتوکلاو شده، قسمتی از محیط کشت قارچ آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس درون پتری‌دیش به فلاسک حاوی برنج اضافه شد. درب فلاسک بسته و محتویاتش را تکان داده تا همه دانه‌های برنج به خوبی از یکدیگر جدا شوند و تمامی دانه‌های برنج با قارچ آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس آلوده گردند. در پایان فلاسک‌ها به مدت هفت روز انکوباسیون شدند. در این مدت به منظور جلوگیری از چسبندگی دانه‌های برنج فلاسک‌ها را با رعایت احتیاط روزانه به شدت تکان داده تا تمامی دانه‌های برنج از هم جدا شوند. فلاسک‌های حاوی برنج آلوده به قارچ آسپرژیلوس-پارازیتیکوس پس از هفت روز در دمای ۱۲۱ °C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. برنج‌ها در ظرفی تخلیه و در محیطی استریل و بدور از نور خورشید قرار داده شدند تا خشک شده و سپس آسیاب شدند. میزان آفلاتوکسین B1 تولید شده از طریق ارسال نمونه به آزمایشگاه تستا مشهد به روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد. سپس برنج‌های آسیاب شده به مقدار لازم برای تأمین سطح مورد نیاز آفلاتوکسین B1 تیمارها (۵۰۰ ppb) به جیره پایه اضافه شد (۱۳).

به منظور عصاره‌گیری، گیاه خارمریم از مزرعه آموزشی محمدیه بیرجند از قسمت‌های بالای ریشه در اوایل تیر ماه جمع‌آوری شد و سپس در تاریکی و دمای اتاق خشک و آسیاب گردید. عصاره‌گیری بصورت هیدروالکلی از طریق روش خیساندن با نسبت الکل و آب ۷۰ به ۳۰ انجام شد. با توجه به گزارشات، استخراج ماده مؤثره سیلی‌مارین در عصاره‌گیری با الکل متانول نسبت به دیگر حلال‌ها بیشتر بوده به همین دلیل از متانول به عنوان حلال جهت عصاره‌گیری استفاده گردید (۸). نمونه گیاه با نسبت ۱ g به ۵ cc با حلال خیسانده و به مدت ۴۸ ساعت در داخل همزن قرار داده شد. پس از گذشت مدت زمان مشخص محلول مورد نظر را با کاغذ صافی شماره یک صاف کرده، سپس محلول صاف شده توسط دستگاه تقطیر در خلاء (روتاری) در دمای ۶۰ °C و سرعت چرخش ۷۰ دور در دقیقه غلیظ شد. نمونه غلیظ شده در پلیت‌های شیشه‌ای ریخته و به مدت دو روز در آون با دمای ۴۰ °C قرار داده شد. بعد از حذف حلال، نمونه‌ها از سطح پلیت تراشیده شد و در یخچال در دمای ۴ °C تا زمان استفاده در جیره نگهداری گردید. برای آماده سازی پودر بذر خار مریم، بذر خارمریم آسیاب شده و میزان انرژی خام و پروتئین خام به ترتیب با بمب‌کالریمتر و کلدال اندازه‌گیری شد (پروتئین خام ۱۷/۳۹ و انرژی خام ۵۳۱۲ کیلوکالری در کیلوگرم)، و سپس در سطح مورد آزمایش بکار گرفته شد. گیاه خارمریم به مقدار کافی جمع‌آوری شد و در تاریکی و دمای اتاق خشک و آسیاب گردید و میزان انرژی خام و پروتئین خام اندازه‌گیری شد (پروتئین خام ۶/۴۶ و انرژی خام ۲۷۷۴/۳۹ کیلوکالری در کیلوگرم)، سپس پودر گیاه خارمریم در سطح مورد آزمایش در جیره آزمایشی بکار گرفته شد.

مدل آماری استفاده شده جهت آنالیز داده‌های بصورت رابطه ۱ بود.

$$Yij = \mu + Ti + \varepsilon ij \qquad (۱)$$

در این رابطه، Yij مقدار مشاهده شده، µ میانگین جامعه، Ti اثر هر تیمار و εij اثر خطای آزمایش است.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و داده‌های حاصل از آن با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۱) و با رویه GLM مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. برای مقایسه میانگین تیمارها نیز از آزمون توکی در سطح احتمال معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

جدول ۲ اثر تیمارهای مختلف آزمایشی بر غلظت پلاسمایی فراسنجه‌های خونی تری‌گلیسرید، کلسترول، لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا، لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین، آلکالین فسفاتاز، لاکتات‌دی‌هیدروژناز، آسپارتات‌آمینو ترانسفراز و آلانین‌آمینوترانسفراز جوجه‌های گوشتی در پایان دوره آزمایشی (۳۵ روزگی) نشان می‌دهد. نتایج آنالیز آماری نشان داد که

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱. ترکیب مواد خوراکی و مواد مغذی استفاده شده در طی دوره‌های آغازین، رشد و پایانی. † مکمل دوقلو خریداری شده از کارخانه دان و علوفه شرق. مکمل ویتامینی و مواد معدنی در هر کیلوگرم خوراک تامین کننده موارد زیر است: ۹۰۰۰۰۰۰ IU ویتامین A، ۴۵۰۰۰۰۰ IU ویتامین D3، ۵۰۰۰۰ IU ویتامین E، ۳ g ویتامین K3، ۲ g ویتامین B1، ۷ g ویتامین B2، ۱۴ g ویتامین B3، ۵۵ g ویتامین B5، ۳ g ویتامین B6، ۱/۷۵ g ویتامین B9، ۰/۰۱۵ g ویتامین B12، ۶۲۵ g کولین، ۱۲۰ g منگنز، ۴۰ g آهن، ۱۰۰ g روی، ۱۶ g مس، ۱/۲۵ g ید، ۰/۳ g سلنیوم.

مواد خوراکی (٪)	جیره آغازین	جیره رشد	جیره پایانی
ذرت	۵۳/۴۴	۵۷/۰۶	۵۹/۲۱
کنجاله‌سویا (۴۴ ٪ پروتئین)	۳۵/۷۰	۳۴/۰۳	۳۲/۶۲
پودرماهی	۵	۲/۵۰	-
روغن سویا	۲/۶۸	۳/۱۴	۴/۷۰
کربنات‌کلسیم	۱/۱۵	۱/۱۶	۱/۲۶
دی‌کلسیم‌فسفات	۱/۰۷	۱/۲۲	۱/۵۱
مکمل ویتامینی و مواد معدنی†	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
نمک	۰/۴۰	۰/۴۰	۰/۳۰
DL–متیونین	۰/۲۵	۰/۲۴	۰/۱۵
لیزین‌هیدروکلرید	۰/۰۶	-	-
ترکیب مواد مغذی محاسبه شده			
انرژی قابل متابولیسم (Kcal/Kg)	۳۰۰۰	۳۰۵۰	۳۱۵۰
پروتئین‌خام (٪)	۲۲	۲۱	۱۹
لیزین (٪)	۱/۴۵	۱/۳۳	۱/۱۷
متیونین + سیستین (٪)	۱/۱۵	۰/۹۹	۰/۸۳
کلسیم (٪)	۰/۹۷	۰/۹۰	۰/۹۰
فسفر قابل دسترس (٪)	۰/۴۸	۰/۴۵۰	۰/۴۵۰

تیمارهای آزمایشی اثر معنی‌داری بر LDH، ALP، LDL، HDL، CHOL و AST خون جوجه‌های گوشتی نداشتند. جیره‌های آلوده حاوی سطوح ppm ۶۰۰ و ۱۰۰۰ عصاره گیاه خارمریم نسبت به جیره شاهد سالم از نظر غلظت پلاسمایی تری‌گلیسرید خون افزایش معنی‌دار نشان دادند ($P\leq$۰/۰۵). تیمار شاهد آلوده موجب افزایش معنی‌دار غلظت پلاسمایی ALT در مقایسه با تیمار شاهد سالم گردید($P\leq$۰/۰۵). افزودن ۰/۵٪ پودر بذر خارمریم، ۱٪ پودر گیاه خارمریم و ppm ۱۰۰۰ عصاره گیاه خارمریم به جیره آلوده سبب کاهش معنی‌دار غلظت پلاسمایی ALT در مقایسه با شاهد آلوده گردید ($P\leq$۰/۰۵).

عیار ایمنوگلوبولین‌های M و G و همچنین عیار پادتن علیه چالش SRBC در ۳۵ روزگی جوجه‌های گوشتی در جدول ۳ آورده شده است. اثر تیمارهای آزمایشی تنها در عیار پادتن علیه چالش SRBC در ۳۵ روزگی جوجه‌های گوشتی به لحاظ آماری معنی‌دار بود. جیره آلوده حاوی یک درصد پودر خارمریم موجب افزایش معنی‌دار عیار پادتن علیه چالش SRBC در مقایسه با شاهد سالم و شاهد آلوده گردید ($P\leq$۰/۰۵).

بحث

یافته‌ها نشان داد تیمار شاهد آلوده موجب افزایش معنی‌دار غلظت پلاسمایی ALT در مقایسه با تیمار شاهد سالم گردید. در تأیید یافته‌های تحقیق حاضر تغذیه ppb ۵۰۰ آفلاتوکسین B1 در جوجه‌های گوشتی سبب افزایش معنی‌دار غلظت سرمی آنزیم‌های ALT و AST گردید (۲). افزایش فعالیت آنزیم‌های کبدی در نتیجه آسیب کبدی و نشت آنزیم به خون است (۳). افزودن ۰/۵٪ پودر بذر خارمریم، ۱٪ پودر گیاه خارمریم و ppm ۱۰۰۰ عصاره گیاه خارمریم به جیره آلوده بصورت معنی‌دار غلظت پلاسمایی ALT را کاهش داد. کاهش معنی‌دار غلظت پلاسمایی ALT در جیره‌های آلوده‌ی حاوی پودر بذر، عصاره و پودر گیاه خارمریم در مقایسه با جیره‌ی شاهد آلوده می‌تواند به‌دلیل تخفیف اثرات منفی آفلاتوکسین بر تخریب سلول‌های کبدی باشد. سیلی‌مارین به دلیل اینکه یک آنتی‌اکسیدان بسیار قوی است با مهار پراکسیداسیون لیپیدها مخصوصاً در سلول‌های کبدی، اختلالات متابولیسمی این سلول‌ها را مهار می‌کند (۱۹). گروهی دیگر از محققان پیشنهاد می‌کنند که تقویت سیستم‌ایمنی تضعیف شده توسط سیلی‌مارین عامل محافظت کبدی توسط آن می‌باشد، در حقیقت سیلی‌مارین بدون توجه به عوامل ایجاد کننده اختلالات در سلول‌های کبدی، سلول را در برابر هر آسیب نابود کننده حاد یا مزمن محافظت می‌کنند (۱۲). جیره‌های آزمایشی حاوی عصاره و پودر گیاه خارمریم در مقایسه با تیمار حاوی پودر بذر گیاه خارمریم اختلاف آماری معنی‌داری در فراسنجه‌های خونی مورد بررسی نشان ندادند.

بررسی عیار ایمنوگلوبولین‌های M و G و همچنین عیار پادتن علیه چالش SRBC در ۳۵ روزگی جوجه‌های گوشتی نشان داد اختلاف تیمار شاهد سالم و آلوده به لحاظ آماری معنی‌دار نبود اما جیره آلوده به آفلاتوکسین سبب کاهش عددی تیتر آنتی‌بادی علیه چالش SRBC و ایمنوگلوبولین G جوجه‌های گوشتی گردید. بررسی گزارشات محققان در

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲. تأثیر افزودن بذر، عصاره و گیاه خارمریم بر فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره آلوده به آفلاتوکسین. [۱] حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است. [۲] شاهد + ۵۰۰ µg/kg آفلاتوکسین (شاهد آلوده). [۳] شاهد آلوده + نیم درصد پودر بذر خارمریم. [۴] شاهد آلوده + یک درصد پودر گیاه خارمریم. [۵] شاهد آلوده + ۶۰۰ mg/kg عصاره گیاه خارمریم. [۶] شاهد آلوده + ۱۰۰۰ mg/kg عصاره گیاه خارمریم.

تیمارها	فراسنجه‌های خونی							
	TG (mg/dl)	CHOL (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	ALP (U/l)	LDH (U/l)	AST (U/l)	ALT (U/l)
شاهد	۶۴/۱۰ b	۱۲۷/۱۳	۴۶/۶۲	۶۷/۶۸	۲۸۸۰/۳۰	۲۰۲۴/۸۰	۲۵۴/۲۷	۲/۵۰ b
شاهد آلوده۲	۸۸/۳۰ ab	۱۴۹/۰۸	۵۵/۰۷	۷۶/۳۴	۴۲۴۷/۸۰	۲۴۹۲/۰۰	۲۹۹/۷۳	۵/۰۰ a
پودر بذر۳	۸۷/۸۰ ab	۱۲۱/۳۰	۴۴/۲۷	۵۹/۴۶	۳۰۰۲/۳۰	۲۱۵۴/۸۰	۲۴۹/۲۵	۳/۰۰ b
پودر گیاه۴	۸۵/۳۰ ab	۱۳۲/۵۳	۵۰/۷۰	۶۴/۷۶	۲۸۹۴/۳۰	۱۷۲۰/۰۰	۲۴۴/۹۵	۳/۰۰ b
mg ۶۰۰ عصاره ۵	۹۹/۶۲ a	۱۱۶/۰۵	۴۴/۹۰	۵۱/۲۲	۳۳۴۱/۳۰	۲۳۷۷/۵۰	۲۹۱/۱۵	۳/۶۵ ab
mg ۶۰۰ عصاره۶	۹۶/۳۰ a	۱۳۳/۴۳	۵۰/۴۵	۶۳/۷۱	۲۷۷۳/۸۰	۲۳۶۴/۳۰	۲۷۹/۷۰	۳/۲۵
SEM	۶/۵۷۱	۸/۶۷۱	۳/۲۹۰	۵/۹۳۰	۶۰۶/۵۵	۴۴۷/۰۲۸	۳۶/۳۷۶	۰/۳۷۱
P Value	۰/۰۱۹۹	۰/۱۷۲۸	۰/۰۶۲۰	۰/۲۶۵۳	۰/۵۴۲۷	۰/۸۳۸۰	۰/۸۳۳۷	۰/۰۰۳۱

جدول ۴. تأثیر افزودن بذر، عصاره و گیاه خارمریم بر عیار پادتن علیه چالش SRBC و عیار ایمنوگلوبولین‌ها جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره آلوده به آفلاتوکسین. [۱] حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است. [۲] شاهد + ۵۰۰ mg/kg آفلاتوکسین (شاهد آلوده). [۳] شاهد آلوده + نیم درصد پودر بذر خارمریم. [۴] شاهد آلوده + یک درصد پودر گیاه خارمریم. [۵] شاهد آلوده + ۶۰۰ mg/kg عصاره گیاه خارمریم. [۶] شاهد آلوده + ۱۰۰۰ mg/kg عصاره گیاه خارمریم.

تیمارها	عیار پادتن علیه چالش SRBC و مقادیر ایمنوگلوبولین‌های M و G		
	SRBC	IgG	IgM
شاهد	۵/۶۶ b	۴/۲۵	۱/۴۱
شاهد آلوده۲	۵/۲۵ b	۴/۵۰	۰/۷۵
پودر بذر۳	۷/۷۵ ab	۶/۲۵	۱/۵۰
پودر گیاه۴	۹/۰۰ a	۶/۲۵	۲/۷۵
mg ۶۰۰ عصاره ۵	۶/۳۲ ab	۵/۳۲	۱/۰۰
mg ۶۰۰ عصاره۶	۷/۷۵ ab	۶/۰۰	۱/۷۵
SEM	۰/۶۴۱	۰/۷۲۵	۰/۵۴۴
P Value	۰/۰۰۴۵	۰/۲۴۰۴	۰/۱۹۸۵

رابطه با اثرات سمی آفلاتوکسین بر ایمنی هومورال نشان داد که براساس غلظت و مدت زمان مصرف آفلاتوکسین ایمنی هومورال می‌تواند کاهش و یا افزایش یابد (۲۰). گزارشات نشان می‌دهد تغذیه جوجه‌های گوشتی از ۱ تا ۳۵ روزگی با جیره آلوده به ppm ۵ آفلاتوکسین، سبب افزایش تیتر آنتی‌بادی برعلیه بیماری گامبرو شد (۱۵). افزایش سطح آفلاتوکسین جیره مرغان گوشتی هوبارد از صفر تا ppm ۰/۵ تغییرات معنی‌داری را در تیتر آنتی‌بادی بر علیه بیماری نیوکاسل نشان نداد (۱۰). تغذیه مرغان تخمگذار لگهورن از ۱۲۸ تا ۲۸۰ روزگی با جیره آلوده به ppm ۰/۲ آفلاتوکسین تیتر آنتی‌بادی بر علیه بیماری گامبرو، برونشیت و نیوکاسل را کاهش داد (۴). کاهش ایمنوگلوبولین‌ها در آلودگی با سطوح بالا آفلاتوکسین اتفاق می‌افتد (۵). غلظت‌های بالای آلودگی جیره به آفلاتوکسین‌ها، سیستم‌ایمنی هومورال را سرکوب کرده و تولید ایمونوگلوبولین‌های را کاهش می‌دهد. با کاهش سطح ایمنی هومورال، پرندگان نسبت به بیماری‌ها حساسیت نشان می‌دهند.

جیره آلوده حاوی ۱٪ پودر خارمریم موجب افزایش معنی‌دار عیار پادتن علیه چالش SRBC در مقایسه با شاهد سالم و شاهد آلوده گردید. جیره آلوده حاوی ۱٪ پودر گیاه خارمریم در مقایسه با دیگر جیره‌های آزمایشی به لحاظ عددی دارای بیشترین عیار ایمنوگلوبولین‌های M و G بود. در تأیید یافته‌های تحقیق حاضر Mojahedtalab و همکاران سال ۲۰۱۳ گزارش دادند که مصرف سیلی‌مارین موجب افزایش عیار پادتن علیه چالش SRBC و ایمنوگلوبولین G شده، ولی بر ایمنوگلوبولین M تأثیری نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که پودر گیاه خارمریم در بهبود عیار پادتن علیه چالش SRBC و آنزیم‌های کبدی در جیره آلوده اثر مثبت داشت. بنابراین با درنظر گرفتن جنبه‌های اقتصادی می‌توان بیان داشت که استفاده از پودر گیاه خارمریم در مقایسه با پودر بذر خارمریم به منظور کاهش یا حذف عوارض منفی آفلاتوکسین در تغذیه جوجه‌های گوشتی قابل توصیه است.

تشکر و قدردانی

از مسئول آزمایشگاه تغذیه دام دانشکده کشاورزی بیرجند خانم مهندس سمیه یوسفی که نهایت همکاری را با ما در هر چه بهتر انجام شدن این تحقیق داشتند، بی‌نهایت سپاسگزاریم.

تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Ambrose, C.T., Donner, A. (1973). Application of the analysis of variance to hemagglutination titration. J Immunol Methods, 3(2), 165-210.
2. Amiri dumari, H., Sarir, H., Fani makki, O., Afzali, N. (2013). Effects of Milk thistle seed

Archive of SID
www.SID.ir

against aflatoxin B1 in broiler model. J Res Med Sci, 18(9), 786-790.
3. Azizpour, A., Moghadam, N. (2015). Effects of yeast glucomannan and sodium bentonite on the toxicity of aflatoxin in broilers. Braz J Poult Sci, 17, 7-13.
4. Azzam, A. H., Gabal, M. A. (1998). Aflatoxin and immunity in layer hens. Avian Pathol, 27(6), 570–577.
5. Campbell, M. L. J., May, J. D., Huff, W. E., Doerr, J. A. (1983). Evaluation of immunity of young broilers chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. Poult Sci, 62(11), 2144-2183.
6. Chen, X., Naehrer, K., Applegate, T. J. (2016). Interactive effects of dietary protein concentration and aflatoxin B1 on performance, nutrient digestibility, and gut health in broiler chicks. Poult Sci, 95, 1312–1325.
7. Daneshyar, F., Afzali, N., Farhangfar, H. (2014). Effects of different levels of date pits in broilers' feed contaminated with aflatoxin B1 on broilers' performance and carcass characteristic. Afr J Biotechnol, 13(1), 185-193.
8. Fallah Huseini, H., Yazdani, D., Amin, G., Makkizadeh, M. (2005). Milk thistle and cancer. J Med Plants, 1(1), 46-53.
9. Fani Makki, O., Afzali, N., Omidi, A. (2013). Effect of different levels of silymarin (*Silybum marianum*) on growth rate, carcass variables and liver morphology of broiler chickens contaminated with aflatoxin B1. Poult Sci J, 1(2), 105-116.
10. Giambrone, J. J., Diener, U. L., Davis, N. D., Panangala, V. S., Hoerr, F. J. (1985). Effects of purified aflatoxin on broiler chickens. Poult Sci, 64(5), 852–858.
11. Kordi, H., Aghdasi, M., Khalafi, M. (2011). An investigation on flavonolignans in different organs of *Silybium marianum* L. in Gorgan region. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 29(3), 651-665.
12. Lang, L., Nekam, K., Gonzalez-Cabello, R. (1990). Hepatoprotective and immunological effects of antioxidant drugs. Tokai J Exp Clin Med, 15(2-3), 123-127.
13. Malekinejad, P., Afzali, N., Mohammadi, A., Sarir, H. (2015). Effects of combination of different levels sodium bentonite and silybummarinum seeds on performance and carcass traits of broiler chicks fed diet contaminated with aflatoxin B1 in starter and grower period. Journal of Appl Environ Biol Sci, 5(12), 269-275.
14. Mojahedtalab, A. R., Mohammadi, M., Roostaei, M., Mehr, A., Asadi, M. (2013). Effect of Silymarin on performance and immune responses of broilers. Anim Prod Res, 2(3), 49-58.
15. Okotie-Eboh, G. O., Kubena, L. F., Chinnah, A. D., Bailey, C. A. (1997). Effects of β-carotene and canthaxanthin on aflatoxicosis in broilers. Poult Sci, 76(10), 1337–1341.
16. Schiavone, A., Righ, F., Quarantelli, A., Bruni, R., Serventi, P., Fusari, A. (2007). Use of *Silybum marianum* fruit extract in broiler chicken nutrition: influence on performance and meat quality. J Anim Physiol Anim Nutr, 91(5-6), 256-
17. 262.
Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., Stubblefield, R. D., Sorenson, W. G. (1966). Production of af-
18. latoxin on rice. Appl Microbiol, 14(3), 8-425.
Tedesco, D., Steidler, S., Galletti, S., Tameni, M., Sanzogni, O., Ravarotto, L. (2004). Efficacy of a silymarinephospholipid complex in reducing the toxicity of aflatoxin B1 in broiler chicks. Poult
19. Sci, 83(11), 1839-1843.
Vogel, G., Tuchweber, B., Trost, W., Mengs, U. (1984). Protein by silibinin against *Amanita phalloides* intoxication in Beagles. Toxicol Appl
20. Pharmacol, 73(3), 355-362.
Yunus, A.W., Razzazi-Fazeli, E., Bohm, J. (2011). Aflatoxin B1 in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: A review of history and contemporary issues. Toxins, 3(6), 566-590.

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of Milk Thistle Seeds, Whole Plant and Extract on Blood Parameters and Immune Response of Broiler Chickens Fed Aflatoxin Contaminated Diet

Mojtaba Afshin[1], Nazar Afzali[1], Mohsen Mojtahedi[1], Abbas Mohammadi[2]

[1]*Department of Animal and Poultry Sciences, College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran*
[2]*Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran*

(Received 17 April 2018, Accepted 10 July 2018)

Abstract:

BACKGROUND: Aflatoxins are natural fungal toxins that weaken the immune system and damage the liver.

OBJECTIVES: The effects of seeds and whole plant powder and extract of Milk thistle (MT) plant in reducing the negative effects of feeding aflatoxin (AF) on broiler chickens blood parameters and immune response were examined.

METHODS: 192 one-day old chicks (Ross 308) for 35 days in a completely randomized design with six treatments, four replicates and eight birds per repetition were used. The experimental treatments included: 1) control, 2) contaminated control (CC), 3) CC + 0.5 percent of MT seed powder, 4) CC + 1 percent MT plant powder, 5) CC + 600mg/kg MT plant extract, 6) CC + 1000mg/kg MT plant extract.

RESULTS: The treatments had no significant effect on plasma concentrations CHOL, HDL, LDL, ALP, LDH, AST, ImG and ImM. Feeding contaminated diet increased alanine aminotransferase enzyme compared with healthy control ($P \leq 0.05$). The addition of 0.5 percent MT seed powder, 1 percent MT plant powder and 1000mg/kg MT plant extract to the contaminated diets decreased alanine aminotransferase enzyme compared to the contaminated control ($P \leq 0.05$). Inclusion of 1 percent MT plant powder to AF infected diet significantly increased the antibody titer compared with healthy control and contaminated control ($P \leq 0.05$).

CONCLUSIONS: It was concluded that compared to other treatments, 1 percent MT plant powder was more effective in reducing the negative effects of feeding AF in broiler chickens.

Keyword:

Aflatoxin, Alanine aminotransferase, Broiler chicken, Milk thistle, Blood parameters

Archive of SID

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Ingredients and chemical composition of experimental diets. † Each kg contains 120g manganese, 40 g Iron, 100 g zinc, 16 g copper, 1.25 g iodine, 0.3 g selenium, 9000000IU of vitamin A, 4500000 IU of vitamin D3, 50000IU of vitamin E, 3 g of vitamin K3, 2 g of vitamin B1, 7 g vitamin B2, 14 g vitamin B3, 55 g vitamin B5,3g vitamin B6,1.75 g of vitamin B9,0.015g vitamin B12, 0.15 g vitamin H2, 625 g Choline Chloride.

Table 2. Average blood metabolites of AFB1 contaminated broilers fed experimental diets. [1] Values within a column with different superscripts differ significantly ($P \leq 0.05$). [2] Contaminated control (CC). [3] CC + 0.5 percent of MT seed powder. [4] CC + 1 percent MT plant powder. [5] CC + 600mg/kg MT plant extract. [6] CC + 1000mg/kg MT plant extract.

Table 3. Average antibody titer of AFB1 contaminated broilers fed experimental diets. [1] Values within a column with different superscripts differ significantly ($P \leq 0.05$). [2] Contaminated control (CC). [3] CC + 0.5 percent of MT seed powder. [4] CC + 1 percent MT plant powder. [5] CC + 600mg/kg MT plant extract. [6] CC + 1000mg/kg MT plant extract.

***Corresponding author's email: Mojtaba.Afshin@Birjand.ac.ir, Tel: 056-32468027, Fax: 056-32202517**

www.SID.ir