Archive of SID

پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، علمی ـ پژوهشی، سال هفدهم، تابستان، شماره ۲، ۱۳۹۹، ۳۲۳۶-۳۲۲۷

تاثیر سطوح مختلف اسانس روغنی میخک بر هیستوپاتولوژی و کارکرد کبدی-کلیوی، پروفایل پروتئین و ایمنی‌زایی در جوجه‌های گوشتی

سجاد امینی[۱]، فروغ محمدی[۲*]، حسین رضا شهبازی[۳]

چکیده

مطالعه کنونی با هدف ارزیابی اثرات اسانس روغنی گیاه میخک (Syzygium aromaticum L.)بر هیستوپاتولوژی و کارکرد کبدی-کلیوی و همچنین پروفایل پروتئین و ایمنی‌زایی در جوجه های گوشتی طراحی و اجرا گردید. بدین منظور، تعداد ۱۸۰ قطعه جوجه‌گوشتی نر یک روزه سویه راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار، سه تکرار و ۱۵ قطعه جوجه در هر تکرار توزیع و تا سن ٤۲ روزگی نگهداری شدند. . تیمارها شامل: ۱) تیمار شاهد (فقط جیره پایه) ، ۲) جیره پایه +۲۵۰ ppm اسانس میخک، ۳) جیره پایه +۳۵۰ ppm اسانس میخک ٤) جیره پایه +٤۵۰ ppm اسانس میخک بودند. شاخص‌های ذیل مورد ارزیابی قرار گرفت: وزن نسبی بافت‌های کبد و کلیه، شاخص‌های کارکرد کبدی و کلیوی شامل فعالیت آنزیم های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و گاماگلوتامیلترانسفراز (GGT)، اوره و کراتینین، پروفایل پروتئین شامل پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین و نهایتا ایمونوگلوبولین‌های G، A و ..Mمقاطع بافتی کلیه و کبد نیز به روش نیمه کمی مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج به دست آمده مشخص کرد که اسانس میخک به طور وابسته به دوز باعث افزایش مقادیر پروتئین‌ها و ایمونوگلوبولین ها می گردد. اما دوز بیشینه گیاه (٤۵۰ ppm)باعث ایجاد تغییرات معنی‌دار در شاخص های هیستوپاتولوژیک و کارکرد کبدی و کلیوی گردید. بعلاوه، ضایعات بافتی کبد شدیدتر از کلیه ارزیابی شد. می‌توان نتیجه گرفت که اسانس میخک اثرات سودمندی بر پروفایل پروتئین و ایمنی زایی در جوجه‌های گوشتی دارد، اما در دوزهای زیاد باعث ایجاد ضایعات کبدی و کلیوی می گردد، بنابراین باید دوزهای بهینه و بدون عوارض جانبی این گیاه تجویز شود. ***واژگان کلیدی:*** *جوجه گوشتی، میخک، کبد، کلیه، هیستوپاتولوژی، پروتئین، ایمنی‌زایی*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۱۱

مقدمه

افزودنی های خوراکی با اهداف گوناگون نظیر افزایش رشد، بهبود سیستم ایمنی و ارتقاء سیستم آنتی اکسیدانی به طور گسترده در صنعت پرورش طیور استفاده می گردند. برخلاف مزایای متنوع، این افزودنی ها ممکن است با معایبی برای انسان و حیوان همراه باشند. به عنوان مثال، شواهد موجود نشان می دهند که بقایای آنتی بیوتیکی در غذای انسان، ممکن است باعث بروز مقاومت برخی از گونه های باکتری به آنتی بیوتیک های رایج گردند و در نتیجه، مقاومت آنتی بیوتیکی، به یک بحران جهانی تبدیل خواهد شد و کل حیات را تهدید خواهد نمود(۱). در این رابطه، دانشمندان به طور مداوم در تلاش هستند تا افزودنی های مصنوعی را با ترکیبات طبیعی، سالم، کارآمد، ارزان و در دسترس جایگزین نمایند. در این بین، مشتقات گیاهی شامل پودر، عصاره و اسانس روغنی توجه بسیاری را معطوف خود ساخته‌اند و هم اکنون در صنعت طیور استفاده می شوند، چرا که ترکیبات گیاهی نه تنها مزایای فوق الذکر را دارا می باشند، بلکه می توانند به طور همزمان چندین اثر مفید را در جوجه ها القاء نمایند. به عنوان مثال Hussein و همکاران (۲۰۱۸) نشان داده اند که افزودن اسانس روغنی میخک (Syzygium aromaticum L.)به جیره بلدرچین های ژاپنی باعث افزایش عملکرد، بهبود سلامتی و کاهش پاتوژن¬های روده¬ای می-گردد(۲).

گیاه میخک متعلق به خانواده Myrtaceae است که به عنوان یک گیاه چندکاربردی قلمداد می شود. میخک منبع ارزشمندی از ویتامین (Aرتینول)، بتا-کاروتن، ویتامین K، B و C است(۳). به دلیل وجود انواع ترکیبات فعال شامل فلاونوئیدها، هیدروکسی بنزوئیک اسیدها و هیدروکسی فنیل ها، میخک دارای خواص قابل توجه ضدمیکروبی، آنتی اکسیدانی و ضد دردی می باشد(٤).

۱- دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد علوم تغذیه، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

*۲-استادیار کلینیکال پاتولوژی، گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران f.mohammadi@iauksh.ac.ir

۳- استادیار علوم تغذیه، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

سابقا، اثرات مفید گیاه میخک بر بازده رشد، کیفیت لاشه، اجزاء خون، کیفیت گوشت، تعادل میکروبی روده، پروفایل چربی، پارامترهای بیوشیمیایی زرده، و همچنین ایمنی زایی در جوجه های گوشتی و مرغ های تخمگذار به اثبات رسیده است(۲, ۳, ۵-۹). نکته مهم در مورد استفاده از مکمل های گیاهی این است که، گرچه این ترکیبات دارای اثرات سودمندی هستند، اما در صورت عدم استفاده صحیح و به خصوص استفاده بیش از مقادیر مجاز، می توانند باعث ایجاد عوارض جانبی شدید گردند. در همین راستا Hashemipour و همکاران (۲۰۱۳) نشان داده اند که استفاده از تمیول و کارواکرول با دوز ۲۰۰ mg/kg که از مشتقات اصلی گیاه پونه می باشند باعث افزایش فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و ایجاد ضایعات کبدی در جوجه¬های گوشتی می گردند(۱۰). از طرف دیگر، کبد و کلیه محل اولیه و اصلی متابولیزه شدن مواد غذایی و دارویی است. برخلاف اهمیت زیاد این دو عضو، متاسفانه هیچ یک از مطالعات فوق الذکر به بررسی اثرات میخک بر عملکرد این دو بافت حیاتی نپرداخته اند و یا حداقل مطالعات صورت گرفته بسیار محدود است. از طرفی پروفایل پروتئین نیز در این مطالعات مورد غلفت قرار گرفته است. همچنین، مطالعات مربوط به ایمنی‌زایی فقط به اندازه گیری وزن اندام¬های ایمنی، عیار حاصل از واکسن های مختلف و یا تیترآنتی بادی علیه گلبول‌های قرمز گوسفندی بسنده کرده اند و هیچ یک به اندازه گیری مقادیر ایمونوگلوبولین‌ها نپرداخته‌اند(۱۱, ۱۲). بنابراین، مطالعه کنونی، کمبودهای مذکور را هدف قرار داده است و به منظور پوشش این کاستی‌ها طراحی و اجرا می‌گردد. طی این مطالعه، انواع شاخص‌های کارکرد کبدی-کلیوی، و همچنین پروفایل پروتئین و مقادیر انواع ایمونوگلوبولین ها اندازه‌گیری می شود. نویسندگان بر این باورند که مطالعه حاضر اولین پژوهشی است به بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد و کلیه در جوجه‌های دریافت کننده مکمل میخک می پردازد و تا کنون چنین گزارشی منتشر نشده است.

مواد و روش‌کار

پرنده‌ها و تیمارهای آزمایشی

یک صد و هشتاد (۱۸۰) قطعه جوجه یک‌روزه نر گوشتی (سویه راس ۳۰۸) یکدست با میانگین وزنی ٤٠/٨٦ گرم از عامل توزیع محلی خریداری گردید. کلیه حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. طول دوره پژوهش نیز ٤٢ روز در نظر گرفته شد. احتیاجات غذایی جوجه‌های گوشتی با استفاده از ۳ نوع جیره مختلف بر پایه ذرت و سویا، برای مرحله آغازین(۱-١٤ روزگی)، مرحله رشد (۱۵-۲۹ روزگی) و مرحله پایانی (۳۰-٤٢ روز) و بر اساس رهنمودهای NRC تامین گردید(۱۳). مکمل تجاری مواد معدنی و ویتامین‌ها به جیره پایه افزوده گردید. برای جزئیات بیشتر در مورد جیره‌های مصرفی به جدول ۱ مراجعه شود. پرندگان مذکور به طور کاملا تصادفی به چهار گروه اصلی با ۳ تکرار و تعداد ۱۵ قطعه جوجه در هریک از گروه‌ها تقسیم بندی شدند: ۱) گروه شاهد (فقط جیره پایه)، ۲) جیره پایه +۲۵۰ ppm اسانس میخک، ۳) جیره پایه +۳۵۰ ppm اسانس میخک ٤) جیره پایه +٤٥٠ ppm اسانس میخک. تمامی پرندگان به‌طور منظم و به یک شکل زیر نظر دامپزشک بودند و بر طبق مقررات منطقه واکسینه شدند و هیچ‌گونه داروی خاصی در پرندگان مصرف نشد. مراقبت و نگهداری از حیوانات طبق توصیه و رهنمودهای کمیته اخلاق و نگهداری حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمانشاه، ایران صورت گرفت. به طور خلاصه، دمای محیط به تدریج از ٣٤ درجه سانتی‌گراد در روز اول به ٢٤ درجه سانتی‌گراد در روز ۲۸ رسید و سپس ثابت ماند. همچنین میزان رطوبت از بدو ورود جوجه‌ها تا ۱۵ روزگی در محدوده ٦٠ تا ۷۰

www.SID.ir

Archive of SID

درصد حفظ گردید و بعد از ۱۵ روزگی رطوبت نسبت به بستر سالن کمتر شد تا حدی که بستر خیس نشود.

اسانس گیاهی

اسانس گیاهی از شرکت باریج اسانس (کاشان-ایران) خریداری شد. شرکت مذکور، آنالیز کروماتوگرافی گازی/طیف سنجی جرمی (GC/MS) اسانس میخک را انجام داده و ترکیبات شیمیایی را شناسایی نموده است (جدول ۲).

جدول ۲: ترکیبات شناسایی شده دراسانس میخک با استفاده از روش GC/MS

ترکیب	میزان (٪)	زمان بازداری(دقیقه)
اورژنول	۷۳/۱۹	۱۲/۷۳
کاریوفیلن	۵/۷۳	۱۳/۹۱
اوژنول استات	۹/۵۷	۱۳/۳۲
سیکلوندکاترین	۸/۰٤	۱۵/۰۹
تلوئن	۱/٤٤	۳/۵۹
مجموع	٪۹۸	

نمونه گیری

در روز ٤۲، تمامی پرندگان به صورت انسانی آسان‌کشی شده و نمونه‌های خون از طریق بریدن سر اخذ گردید (تقریبا ٦ میلی لیتر) و به داخل لوله‌های حاوی هپارین و یا ژل تفکیک کننده ریخته شد. نمونه‌های سرم از لوله‌های ژل دار به دنبال سانتریفیوژ در g۱٤۰۰ در دمای ٦ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه جداسازی شده و به لوله‌های اپندورف منتقل گردیدند و در مای ۲۰- سانتی‌گراد تا زمان آغاز آزمایش‌های مربوطه، نگهداری شدند.

اندازه‌گیری پروفایل پروتئین و ایمونوگلوبولین‌ها

تمامی آزمایش‌ها بیوشیمیایی با استفاده از دستگاه آنالایزر بیوشیمیایی خودکار (BT1500) در آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی (دانشگاه آزاد اسلامی-واحد کرمانشاه) انجام گرفت. پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین با استفاده از کیت استاندارد و اختصاصی شرکت پارس آزمون-تهران و بر اساس دفترچه راهنمای داخل جعبه کیت اندازه گیری شدند. همچنین مجموع ایمونوگلوبولین‌های سرمی از طریق آزمایش‌های بیوشیمیایی (SRBC (sheep red blood cell اندازه‌گیری شدند(۱٤).

ارزیابی کارکرد کبدی- کلیوی

در پایان دوره تیمار، از هر تکرار یک پرنده با وزن نزدیک به میانگین انتخاب، توزین و برای اندازه‌گیری وزن نسبی کبد و کلیه کشتار شدند. وزن نسبی لاشه و اندام‌های درونی برحسب وزن زنده بدن محاسبه گردید (وزن اندام‌ها تقسیم بر وزن زنده بدن ضرب در ۱۰۰). مقادیر اوره و کراتینین و همچنین فعالیت آنزیم‌های کبدی شامل آلانین آمینوترانسفراز(ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و گاما گلوتامیل ترانسفراز(GGT) با استفاده از کیت استاندارد و اختصاصی شرکت پارس آزمون (تهران-ایران) و بر اساس دستوالعمل موجود در داخل جعبه و توصیه‌های شرکت سازنده اندازه گیری شدند.

آماده‌سازی مقاطع بافتی

پس از ٤۸ تا ۷۲ ساعت تثبیت نمونه‌های کبد و کلیه در داخل فرمالین ۱۰٪، مرحله آبگیری با استفاده از رقت‌های صعودی اتانول (۷۰ تا ۱۰۰٪) انجام گرفت. سپس نمونه‌ها با استفاده از گزیلول (به مدت ۱ ساعت) شفاف سازی گردیدند و در داخل واکس پارافین قالب‌گیری شده و با استفاده از دستگاه میکروتوم به ضخامت ۵ میکرون برش خوردند. مقاطع برش خورده با استفاده از هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شده و سوار اسلایدهای میکروسکوپی گردیدند.

نحوه ارزیابی بافت‌های کبد و کلیه

به‌منظور بررسی اثرات هیستوپاتولوژیک اسانس روغنی میخک ، مقاطع بافتی کبد و کلیه به دقت با استفاده از میکروسکوپ نوری(Germany, Zeiss) بررسی گردیدند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- ترکیبات جیره غذایی استفاده شده

ترکیبات جیره (g/kg ماده خشک)	دوره آغازین	دوره رشد	دوره پایانی
ذرت	٥٤١/٧	٦١٢/٩	٥٥٩/٣
گندم	٠	٠	٧٠
کنجاله سویا (٤٥٪)	٣٩٣/٢	٣٠٨/٩	٢٧٨/٩
روغن سویا	٢٥/١	٣٥/٢	٥٠/٧
ال-لیزین هیدروکلرید	١/٦	١/٧	٢/٠
دی ال-متیونین	٣/٤	٢/٨	٢/٩
دی-کلسیوم فسفات	١٥/١	١٩/٣	١٧/٨
صدف	١١/٢	١٠/٣	٩/٨
نمک طعام	٣/٧	٣/٩	٣/٦
مکمل مواد معدنی[1]	٢/٥	٢/٥	٢/٥
مکمل ویتامین‌ها[2]	٢/٥	٢/٥	٢/٥
آنالیز مواد مغذی (g/kg ماده خشک)			
انرژی قابل متابولیسم (MJ/Kg)	١٢/٣٠	١٢/٨٩	١٢/٢٨
پروتئین خام	٢٢٢/٦	١٩٠/١	١٨٠/١
لیزین	١٣/٢	١١/٢	١٠/٥
متیونین	٦/٤٩	٥/٥٠	٥/٤٢
متیونین+سیستئین	٩/٨	٨/٤	٨/٢
کلسیوم	٩/١	٩/٦	٩/١
فسفر در دسترس	٤/٢	٤/٨	٤/٥
سدیم	١/٦	١/٧	١/٦
تعادل آنیون-کاتیون(meq/kg)	٢٣٥/١٧	١٩٦/٩	١٨٤/٠٧

١- هرکیلوگرم مکمل ویتامینه سارال دارای ترکیبات زیر بود: ٣٦٠٠٠٠٠ واحد بین المللی ویتامین A، ٨٠٠٠٠٠ واحد بین المللی ویتامین D_3، ٧٢٠٠ واحد بین المللی ویتامین E، ٧٢٠ میلی‌گرم B_1، ٢٦٤٠ میلی‌گرم ویتامین B_2، ٤٠٠٠ میلی‌گرم اسید پانتوتنیک، ١٢٠٠٠ میلی‌گرم اسید نیکوتنیک، ١٢٠٠ میلی‌گرم ویتامین B_6، ٤٠٠ میلی - گرم اسید فولیک، ٦ میلی‌گرم ویتامین B_{12}، ٨٠٠ میلی‌گرم ویتامین K_3، ٤٠ میلی‌گرم بیوتین، کولین کلراید ١٠٠٠٠٠ میلی‌گرم و آنتی اکسیدانت ٤٠٠٠٠ میلی‌گرم.٢- هر کیلوگرم مکمل معدنی سارال دارای ترکیبات زیربود: ٤٠٠٠٠ میلی‌گرم منگنز، ٢٠٠٠٠ میلی‌گرم آهن، ٤٠٠٠ میلی‌گرم مس، ٤٠٠ میلی‌گرم ید، ٨٠ میلی‌گرم سلینیوم، ٣٣٨٨٠ میلی‌گرم‌روی، ١٠٠٠٠٠کولین‌کلراید.

شد که طی آن شاخص‌های نکروز و دژنراسیون سلول‌های پارانشیمی، اتساع مجاری، احتقان عروق خونی و نفوذ سلول‌های التهابی به فضای بینابینی مورد ارزیابی قرار گرفتند(15). تغییرات بافتی بر اساس یک مقیاس کیفی ٤ درجه‌ای امتیاز بندی شدند: (-) بافت نرمال، (+) تغییرات خفیف بافتی، (++) تغییرات متوسط، (+++) تغییرات وسیع. برای هر پرنده، حداقل ٣ نمونه اسلاید میکروسرکوپی تهیه شده و شاخص‌های فوق‌الذکر در ٣٠ تا ٤٥ میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی‌های ١٠٠ ، ٤٠٠ و ١٠٠٠ مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ٢٢ (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) تجزیه و تحلیل شدند. تمامی شاخص‌های مورد مطالعه بین گروه‌های کنترل و تیمار با استفاده از تحلیل یکطرفه واریانس (ANOVA) و تست تعقیبی بونفرونی (Bonferroni) مقایسه شدند. توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک (Shapiro-Wilk) بررسی گردید. تمامی داده‌های مربوط به آزمایشات بیوشیمیایی به شکل میانگین± انحراف معیار نمایش داده شدند. داده‌های مربوط به امتیازبندی پاتولوژی به شکل میانگین ± خطای استاندارد بیان شدند. امتیاز پاتولوژی هر گروه با استفاده از آزمون غیر پارامتری Mann-Whitney ارزیابی شد. همچنین داده‌ها در سطح احتمال ٥ درصد ($P<0.05$) مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

اثرات مقادیر مختلف اسانس میخک بر پروفایل پروتئین و ایمونوگلوبولین‌ها در جدول شماره ٣ درج شده است. همانطور که می توان مشاهده کرد، اسانس گیاهی باعث

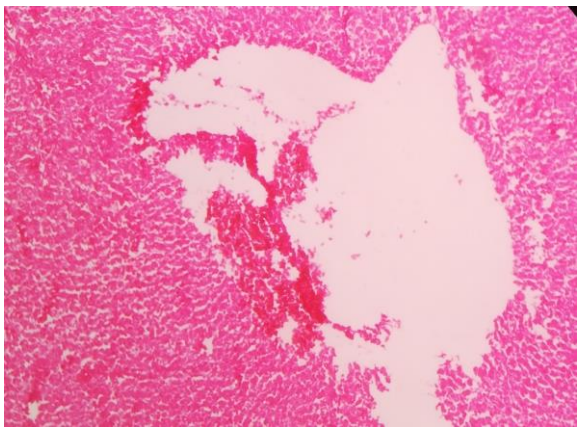
www.SID.ir

Archive of SID

افزایش مقادیر پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین به شکل وابسته به دوز شده است، اما هیچ اختلاف معنی‌داری بین دوز کمینه (۲۵۰ ppm) و گروه شاهد قابل مشاهده نیست. مقادیر هر ۳ ایمونوگلوبولین نیز به دنبال مصرف میخک رو به افزایش گذاشته است، اما دوز کمینه نتوانسته است تغییرات معنی‌دار ایجاد نماید.

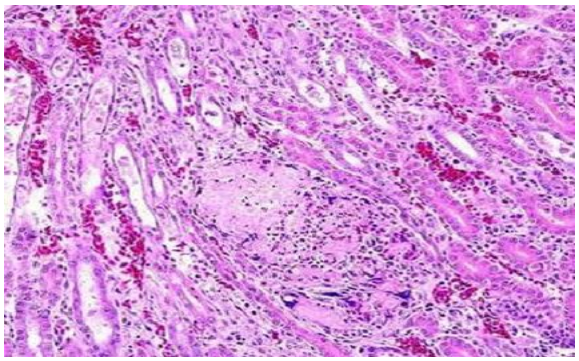
داده‌های درج شده در جدول شماره ٤ حاکی از افزایش معنی‌دار وزن نسبی کبد و کلیه به دنبال تیمار با دوز بیشینه (٤٥٠ppm) میخک در مقایسه با گروه شاهد است. اگرچه دوزهای کمینه و میانه باعث افزایش وزن نسبی هر دو ارگان شده‌اند، اما این افزایش معنی‌دار نیست. همچنین مقادیر اوره و کراتین به شکل تدریجی رو به افزایش گذاشته‌اند به طوری که دوزهای میانه و بیشینه باعث افزایش معنی‌دار این دو شاخص در مقایسه با گروه کنترل شده‌اند (جدول ٤). فعالیت آنزیم‌های کبدی نیز به دنبال مصرف مقادیر مختلف اسانس میخک دچار تغییرات چشمگیر شده‌اند. به طور کلی دوز کمینه هیچ اثر معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل در پی نداشته است، اما دوزهای میانه وبیشینه باعث افزایش فعالیت AST شده‌اند. دوز بیشینه، همچنین توانسته است فعالیت ALT را به طور معنی دار افزایش بدهد. در طرف مقابل، مکمل گیاهی باعث سرکوب فعالیت آنزیم GGT با دوزهای میانه و بیشینه شده است.

جدول شماره ۵ داده‌های به دست آمده از ارزیابی هیستوپاتولوژی بافت‌های کبد و کلیه را به روش نیمه-کمی به تصویر می کشد. همانطور که می توان مشاهده نمود، دوز بیشینه اسانس گیاهی باعث دژنراسیون سلول‌های کبدی شده است، اما سایر دوزها اثرات محسوسی را بر جای نگذاشته-اند. همچنین دوز میانه و بیشینه، به شکل چشمگیری باعث اتساع مجاری صفراوی، پرخونی و نفوذ سلول‌های التهابی شده اند (نگاره ۱). دوز کمینه نیز به شکل بسیار خفیف باعث احتقان عروق خونی و اتساع مجاری صفراوی شده است که در مقایسه با گروه کنترل معنی دار نیست.



نگاره ۱: نکروز سلول‌های کبدی، پرخونی سیاهرگ مرکزی و اتساع سینوزوئید های باف کبد در جوجه‌های دریافت کننده دوز بیشینه (٤٥٠ ppm)مشهود است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین. بزرگنمایی (x۱۰۰

دوز بیشینه (٤٥٠ ppm) اسانس میخک، باعث ایجاد نکروز گلومرولی شد که چنین ضایعاتی در دوزهای متوسط و کمینه دیده نمی شود. بعلاوه دوز بیشینه اسانس گیاهی نفوذ سلول‌های التهابی را به داخل بافت کلیه در برداشته است که سایر دوزها چنین اثراتی را برجای نگذاشته‌اند (نگاره ۲). مقایسه بین کبد و کلیه نشان می دهد که ظاهرا آسیب کبدی شدیدتر از کلیوی بوده‌است، به طوری که دوزهای میانه و بیشته باعث افزایش معنی‌دار اتساع مجاری، پرخونی و نفوذ سلول‌های التهابی با درجات بالاتر در بافت کبد شده است.



نگاره ۲: نفریت بینابینی و نفوذ سلوهای التهابی به پارانشیم کلیه در جوجه‌های دریافت کننده دوز بیشینه (٤٥٠ ppm) مشهود است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین. بزرگنمایی (x٤٠

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: تاثیر سطوح مختلف اسانس میخک بر پروفایل پروتئین و مقادیر ایمونوگلوبولین‌ها در جوجه های گوشتی.

متغییر	شاهد	تیمار ۲ (میخک ppm۲۵۰)	تیمار ۳ (میخک ppm۳۵۰)	تیمار ٤ (میخک ppm٤۵۰)
پروتئین تام (gr/dl)	۳/۷۱±۰/۰۵^{a}	۳/۹٤±۰/۱۱^{ab}	٤/۱۲±۰/۰٤^{b}	٤/۲۹±۰/۰٦^{c}
آلبومین (gr/dl)	۱/٦۸±۰/۰۳^{a}	۱/۷٦±۰/۰٤^{ab}	۱/۸٤±۰/۰۲^{b}	۱/۹۵±۰/۰۳^{c}
گلوبولین (gr/dl)	۱/۷۱±۰/۰۱^{a}	۱/۷٤±۰/۰۲^{a}	۱/۸۳±۰/۰۲^{b}	۱/۹۲±۰/۰۳^{c}
ایمونوگلوبولین A (mg/dl)	۳۷/۰۸±۱/۵۹^{a}	۳۷/۹۳±۱/۲۲^{a}	۳۹/٦٤±۱/۰۳^{ab}	٤۱/۷۹±۱/۸۱^{b}
ایمونوگلوبولین G (mg/dl)	٤۵۳/۲۲±۱۳/۰۷^{a}	٤٦۱/٦۳±۱٤/۱۹^{a}	٤۹٦/۸۹±۱۱/۱٤^{b}	۵۳۹/۳٦±۱۳/۳۱^{c}
ایمونوگلوبولین M (mg/dl)	۱۳٦/۰۷±۵/۱۲^{a}	۱٤۰/۳۵±٤/۸۸^{a}	۱۵۹/٦۲±۵/۲۳^{b}	۱٦٦/۰٤±۳/۹۱^{b}

a-b-c: در هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $p<0.05$ می باشد. ppm = قسمت در میلیون

جدول ٤: تاثیر سطوح مختلف اسانس میخک بر وزن نسبی (درصد وزن زنده) و کارکرد بافت‌های کبد و کلیه در جوجه های گوشتی.

متغییر	شاهد	تیمار ۱ (میخک ppm۲۵۰)	تیمار ۲ (میخک ppm۳۵۰)	تیمار ۳ (میخک ppm٤۵۰)
وزن کبد (g /100 g BW)	۲/۱۱±۰/۰۲^{a}	۲/۰۹±۰/۰۲^{a}	۲/۱۲±۰/۰۳^{a}	۲/۱۹±۰/۰۱^{b}
وزن کلیه (g /100 g BW)	۰/٤۹±۰/۰۲^{a}	۰/٤۹±۰/۰۱^{a}	۰/۵۱±۰/۰۲^{a}	۰/۵٦±۰/۰۱^{b}
اوره (mg/dl)	۱/٤۲±۰/۰۲^{a}	۱/٤۱±۰/۰۱^{a}	۱/٤٦±۰/۰۳^{ab}	۱/۵۲±۰/۰۲^{b}
کراتینین (mg/dl)	۰/٤۷±۰/۰۱^{a}	۰/٤۷±۰/۰۱^{a}	۰/٤۹±۰/۰۱^{b}	۰/۵٤±۰/۰۱^{c}
AST(U/L)	۱۲۳/۵۷±۳/٤۵^{a}	۱۲۵/۲۲±۲/۱۸^{a}	۱۳۱/۹۳±۱/٦۲^{b}	۱٤۳/٦۱±۲/۷۷^{c}
ALT(U/L)	۳۵/٤٤±۱/٤۹^{a}	۳۷/۰٦±۱/۵۲^{a}	۳۸/٤۷±۱/۲۲^{a}	٤٤/۹٤±۱/۳۷^{b}
GGT(U/L)	۳۸/۱۵±۱/۰۸^{a}	۳۷/۲۹±۱/۱٤^{a}	۳۵/۷۱±۱/٤٦^{ab}	۳۲/۲۸±۱/۳۳^{b}

a-b-c: در هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $p<0.05$ می باشد. AST= آسپارتات آمینوترانسفراز، ALT= آلانین آمینوترانسفراز، GGT= گاماگلوتامیل‌ترانسفراز . ppm= قسمت در میلیون

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵: تاثیر سطوح مختلف اسانس میخک بر ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک بافت کبد و کلیه (میانگین ± خطای استاندارد به ازی ۷ پرنده در هر گروه) بر اساس امتیازبندی نیمه-کمی: (-) نرمال، (+) تغییرات خفیف، (++) تغییرات متوسط، (+++) تغییرات وسیع.

	متغییر	تمار ۱ (شاهد)	تیمار ۲ (میخک ۲۵۰ppm)	تیمار ۳ (میخک ۳۵۰ppm)	تیمار ٤ (میخک ٤٥٠ ppm)
کبد	دژنراسیون هپاتوسیت‌ها	۰/۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۰/٤۳±۰/۲۰	۱/٤۳±۰/۳۰*
	اتساع مجاری صفراوی	۰/۰±۰/۰	۰/۲۹±۰/۱۸	۱/۰۰±۰/۳۱*	۱/۸٦±۰/۳٤*
	احتقان عروق خونی	۰/۰±۰/۰	۰/٤۳±۰/۲۰	۱/۵۷±۰/۲۰*	۲/۰۰±۰/٤٤*
	نفوذ سلول‌های التهابی	۰/۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۱/۱٤±۰/۲٦*	۲/۰۰±۰/۳۱*
کلیه	نکروز گلومرولی	۰/۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۰/٤۳±۰/۳۰	۱/۷۱±۰/٤۲*
	اتساع لوله‌های ادراری	۰/۰±۰/۰	۰/۲۹±۰/۱۸	۰/۷۱±۰/۲۸	۲/۱٤±۰/۳٤*
	احتقان عروق خونی	۰/۰±۰/۰	۰/۲۹±۰/۱۸	۱/٤۳±۰/۳۷*	۲/۰۰±۰/۳۱*
	نفوذ سلول‌های التهابی	۰/۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۰/۵۷±۰/۲۰	۱/۸٦±۰/۳٤*

* افزایش معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل ($p<0.05$).

بحث

طی سال‌های اخیر، تولید محصولات دامی، به خصوص با منشا طیور و ماکیان (گوشت و تخم مرغ) سرعت چشمگیری یافته است. طبق شواهد موجود، طی ۱۰ سال مابین ۱۹۹۵ تا ۲۰۰۵ میلادی مصرف و متعاقبا تولید جهانی برای گوشت مرغ، بوقلمون، مرغابی، قاز، تخم مرغ و سایر تخم ها به ترتیب ۵۳٪، ۱۳٪، ٦۷٪، ۵۳٪، ۳۹٪ و ۲۷٪ افزایش یافته است (١٦). چنین رشد فزاینده‌ای باعث بروز رقابتی سنگین و فشرده میان تولید کنندگان طیور و فرآورده های مرتبط شده است. از این جهت، تولیدکنندگان مقادیر مختلفی از انواع افزودنی‌های خوراکی را به جیره پرندگان اضافه می کنند تا عملکرد رشد و کیفیت لاشه را بهبود ببخشند و حساسیت به انواع بیماری‌ها را بکاهند. هرچند، وجود برخی از قوانین سفت و سخت، استفاده از این مکمل‌ها را به دلیل عوارض احتمالی محدود کرده است. بنابراین، پژوهش و تحقیق به دنبال ترکیبات جدید، سالم، مقرون به صرفه، طبیعی و در دسترس مطلقا ضروری به نظر می رسد. همانطور که پیشتر اشاره شد، طی چند سال اخیر اثرات سودمند گیاه میخک در جوجه‌های گوشتی و مرغ‌های تخم‌گذار به خوبی مطالعه شده است. دوز مصرفی در این مطالعات اغلب در محدوده ۵۰ تا ۵۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم جیره بوده است. گرچه مواد گیاهی اغلب ایمن و بی خطر می باشند، اما در صورت استفاده نابجا، ممکن است عوارضی را در برداشته باشند. متاسفانه هیچ یک از پژوهش های قبلی، این نکته را مد نظر قرار نداده و به بررسی اثرات سمی میخک، علی الخصوص بر روی ارگان‌های حیاتی کبد و کلیه نپرداخته‌اند. بنابراین مطالعه کنونی به منظور رفع این کمبودها طراحی و اجرا شده است. یافته‌های مطالعه کنونی به خوبی نشان می دهد که اسانس گیاهی به شکل وابسته به

www.SID.ir

Archive of SID

دوز توانسته است مقادیر انواع پروتئین‌های سرمی (آلبومین و گلوبولین) و پروتئین تام را افزایش دهد. هم‌راستا با این نتایج، سایر پژوهشگران نیز به دنبال مصرف ترکیبات گیاهی در جیره جوجه‌های گوشتی، افزایش سطوح پروتئین‌های سرمی را گزارش نموده اند(۱۷). مکانسیم دقیق دخیل در فرآیند افزایش پروتئین‌های سرمی هنوز به خوبی روشن نشده است. وجود باکتری و میکروارگانیسم‌های خطرناک در دستگاه گوارش و همچنین اکسیداسیون مولکول‌های پروتئینی باعث تخریب آمینواسیدها و متعاقبا کاهش جذب آنها می گردد(۱۸). بنابراین خواص ضد میکروبی و آنتی-اکسیدانی میخک می تواند جمعیت باکتری‌های مضر را کاهش داده و مانع از اکسیداسیون مولکول‌های پروتئینی شوند و بدین طریق جذب آمینواسیدها را بهبود بخشند. در همین راستا، نوری و همکاران (۲۰۱۸) نشان داده‌اند که استفاده از اسانس و سطوح ۲۰۰، ۱۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم نانو امولوسیون اسانس میخک در جیره جوجه‌های گوشتی باعث کاهش جمعیت باکتری‌های اشریشیاکلای محتویات سکوم شد(۱۱). طی یک پژوهش همسو، جهانی و همکاران (۲۰۱۷) پی بردند که استفاده از اسانس میخک با دوزهای ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم جیره، ارتفاع و عرض پرزهای روده را افزایش داده و همچنین از تعداد باکتری‌های اشریشیاکلی کاسته و بر تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس می افزاید(۱۹).

همانطور که در جدول شماره ۲ درج شده است، اوژنول بیشترین ترکیب تشکیل دهنده (۷۳/۱۹٪) اسانس میخک است. پژوهش های صورت گرفته نشان می دهد که این ماده دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی است. به طوری که، Adefegha و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کرده‌اند که تجویز خوراکی اوژنول به موش‌های صحرایی مبتلا به آرتریت باعث کاهش پراکسیداسیون چربی شده و استرس اکسیداتیو را در کبد این حیوانات مهار می کند (۲۰). احتمالا اوژنول با مکانیسم مشابه باعث افزایش مقادیر پروتئین‌ها طی مطالعه حاضر شده است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین‌ها حاکی از اعمال اثرات مفید اسانس میخک بر سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی است. به طوری که دوزهای ۳۵۰ و ٤٥٠ ppm باعث افزایش معنی‌دار هر سه ایمونوگلوبولین شده است. این یافته با پژوهش قبلی همخوانی کامل دارد. به طوری که نوری و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کرده‌اند که استفاده از اسانس میخک باعث افزایش وزن بورس فابریسیوس به شکل وابسته به دوز شده است(۱۱). در مغایرت با مطالعه حاضر، محمدی و همکاران (۲۰۱٤) به دنبال استفاده از دوزهای ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرمی از اسانس میخک در هر کیلوگرم جیره جوجه‌های گوشتی هیچ تغییری را در وزن طحال و تیتر نیوکاسل مشاهده نکرده‌اند(۲۱). توجیه احتمالی برای این عدم تطابق می تواند تفاوت در سایر اجزای جیره و یا تفاوت در برنامه واکسیناسیون و نحوه استفاده از آنها باشد. اسانس میخک احتمالا به دلیل اثرات ضدویروسی و ضدباکتریایی باعث افزایش مقادیر ایمونوگلوبولین‌ها طی مطالعه کنونی شده است.

افزایش وزن نسبی بافت‌های کبد و کلیه بهمراه افزایش شاخص‌های زیستی این دو ارگان، حاکی از اثرات سمی اسانس میخک بر این دو عضو حیاتی بدن است. افزایش وزن ناشی از مصرف دوز بیشینه اسانس گیاهی می تواند به دلیل پرخونی و التهاب در بافت‌های مذکور باشد، به طوری که یافته‌های هیستوپاتولوژی از این فرضیه حمایت می کند. افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های AST و ALT به دنبال دریافت دوز بیشینه (٤٥٠ ppm) به خوبی حاکی از اثرات مخرب اساس گیاهی بر کبد است. همانطور که پیشتر اشاره شد، هاشم پور و همکاران (۲۰۱۳) اثرات سمی مشتقات گیاهی بر کبد جوجه‌های گزارش کرده‌اند. نکته حائز اهمیت این است که AST عمدتاً در کبد یافت می‌شود اما مقداری از آن نیز در کلیه‌ها، قلب، ماهیچه‌های اسکلتی، گلبول‌های قرمز و مغز وجود دارد. پس هر نوع افزایش در AST را نمی

www.SID.ir

Archive of SID

توان مستقیما به ضایعات کبدی ربط داد. با این وجود، طبق مطالعه مذکور فعالیت آنزیم کراتین کیناز تغییری نیافت، پس هیچ آسیب عضلانی در جوجه‌ها رخ نداده است و افزایش فعالیت آنزیم AST ناشی از استرس کبدی می باشد(۱۰). بعلاوه عصاره های گیاهی، به سرعت در کبد متابولیزه می شوند که این امر فشار کاری زیادی را به کبد اعمال کرده و استرس ایجاد شده، دلیل افزایش آنزیم AST در سرم است(۲۲). ضایعات کبدی و کلیوی مشاهده شده در این مطالعه می تواند به دلیل استفاده نابجا و بیش از حد از اوژنول (ماده اصلی موثر اسانس میخک) باشد. به این ترتیب که ادعا شده است اوژنول دارای خاصیت دوگانه بوده که هم می تواند اثرات آنتی اکسیدانی داشته باشد و هم می تواند باعث القاء استرس اکسیداتیو شود(۲۳). هم راستا با مطالعه حاضر، گزارش شده است که مصرف مقادیر مختلف تورمریک (Turmeric)، یکی از مشتقات اصلی گیاه زنجبیل باعث بروز ضایعات کبدی در جوجه‌های گوشتی همانند آنچه در مطالعه حاضر مشاهده شد، می گردد(۲٤). همچنین، Emiola و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کرده اند که مصرف لوبیای خام و بدون سبوس (*Phaseolus vulgaris*) در جوجه‌های گوشتی باعث احتقان گلومرولی و اتساع عروق خونی همراه با ترومبوزهای متعدد می شود(۲۵).

به طور کلی یافته‌های این پژوهش نشان می دهند که استفاده از مقادیر مختلف اسانس میخک در جیره جوجه‌های گوشتی باعث افزایش پروتئین‌ها و بهبود سیستم ایمنی می شود، اما در دوز بیشینه اسانس گیاهی با عوارض کبدی و کلیوی همراه بود. بنابراین، حین استفاده از اسانس میخک، باید دوز بهینه که بیشترین اثرات مفید و کمترین عوارض ناخواسته را دربر دارد مد نظر قرار گیرد.

فهرست منابع

1- Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. Pharmacy and Therapeutics. 2015;40(4):277.

2- Hussein MM, Abd El-Hack ME, Mahgoub SA, Saadeldin IM, Swelum AA. Effects of clove (Syzygium aromaticum) oil on quail growth, carcass traits, blood components, meat quality, and intestinal microbiota. Poult Sci. 2018;98(1):319-29.

3- Al-Mufarrej S, Al-Baadani H, Fazea E. Effect of level of inclusion of clove (Syzygium aromaticum) powder in the diet on growth and histological changes in the intestines and livers of broiler chickens. S Afr J Anim Sci. 2019;49(1):166-75.

4- Cortés-Rojas DF, de Souza CRF, Oliveira WP. Clove (Syzygium aromaticum): a precious spice. Asian Pacific journal of tropical biomedicine. 2014;4(2):90-6.

5- Alizadeh MR, Mahdavi A, Rahmani H, Jahanian E. Effects of different levels of clove bud (syzygium aromaticum) on yolk biochemical parameters and fatty acids profile, yolk oxidative stability, and ovarian follicle numbers of laying hens receiving different n-6 to n-3 ratios. Animal Feed Science Technology 2015;206:67-75.

6- Dalkiliç B, Güler T. The effects of clove extract supplementation on performance and digestibility of nutrients in broilers. Fırat University Veterinary Journal of Health Sciences. 2009;23(3):161-6.

7- Gandomani VT, Mahdavi A, Rahmani H, Riasi A, Jahanian E. Effects of different levels of clove bud (Syzygium aromaticum) on performance, intestinal microbial colonization, jejunal morphology, and immunocompetence of laying hens fed different n-6 to n-3 ratios. Livestock Science. 2014;167(1):236-48.

8- Mehr MA, Hassanabadi A, Moghaddam HN, Kermanshahi H. Supplementation of clove essential oils and probiotic to the broiler's diet on performance, carcass traits and blood components. Iranian Journal of Applied Animal Science. 2014;4(1):117-22.

9- Mohammadi Z, Ghazanfari S, Moradi MA. Effect of supplementing clove essential oil to the diet on microflora population, intestinal morphology, blood parameters and

www.SID.ir

Archive of SID

performance of broilers. Europian Poultry Science. 2014;78:1-11.
10- Hashemipour H, Kermanshahi H, Golian A, Khaksar V. Effects of carboxy methyl cellulose and thymol + carvacrol on performance, digesta viscosity and some blood metabolites of broilers. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2014;98(4):672-9.
11- Nouri M, Ghorbani MR, Tatar A, Mehrnia MA. Effect of clove essential oil nanoemulsion on performance of broiler chickens fed diet based on wheat. Anim Prod. 2018;20(2):315-27.
12- Ghazanfari S, Mohammadi Z, Adibmoradi M. Effects of clove essential oil on growth performance, carcass characteristics and immune system in broiler chicken. Vet J. 2014(102):67-76.
13- NRC. Nutrient Requirements of Poultry. 9th ed: National Academy Press, Washington DC.; 1994.
14- Fani makki O, Ebrahimzadeh A, Ansari nik H, Ghazaghi M. Effect of Milk thistle (Silybum marianum L.) and Thyme (Thymus vulgaris L.) herbs on immunity and some blood metabolites in broiler chicks. J Vet Clin Pathol 2013;7(26):1837-906.
15- Karami M, Asri-Rezaei S, Dormanesh B, Nazarizadeh A. Comparative study of radioprotective effects of selenium anoparticles and sodium selenite in irradiation-induced nephropathy of mice model. Int J Radiat Biol. 2018;94(1):17-27.
16- Scanes CG. The Global Importance of Poultry. Poultry Science. 2007;86(6):1057-8.
17- fanimakki o, ebrahimzade a, ansarinik h, ghazaghi m. Effect of Milk thistle (Silybum marianum L.) and Thyme (Thymus vulgaris L.) herbs on immunity and some blood metabolites in broiler chicks. Scientific Journal Management System. 2013;7(2 (26) Summer):1836-43.
18- Nobakht A, Norani J, Safamehr A. The effects of different amounts of Mentha pulegium L.(pennyroyal) on performance, carcass traits, hematological and blood biochemical parameters of broilers. Journal of Medicinal Plants Research. 2011;5(16):3763-8.
19- Jahani H, Mazhari M, Ziaiee N, Mirmahmoudi R. Comparison of the effect of Dianthus extract, Protexin probiotic and Virginamycin on performance, blood metabolites, microbial community and intestine histopathology of broilers. Animal Sciences Journal. 2017;30(114):113-28.
20- Adefegha SA, Oyeleye SI, Okeke BM, Oboh G. Influence of eugenol on oxidative stress biomarkers in the liver of carrageenan-induced arthritis rats. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2018;30(2):185-93.
21- Mohammadi Z, Ghazanfari S, Adibmoradi M. Effects of clove essential oil on growth performance, carcass characteristics and immune system in broiler chicken. Veterinary Researches & Biological Products. 2014;27(1):67-76.nanoparticles and sodium selenite in irradiation-induced nephropathy of mice model. Int J Radiat Biol. 2018;94(1):17-27.
22- Hashemipour H, Kermanshahi H, Golian A, Khaksar V. Effects of carboxy methyl cellulose and thymol+ carvacrol on performance, digesta viscosity and some blood metabolites of broilers. J Anim Physiol Anim Nutr. 2014;98(4):672-9.
23- Bezerra DP, Militao GCG, de Morais MC, de Sousa DP. The Dual Antioxidant/Prooxidant Effect of Eugenol and Its Action in Cancer Development and Treatment. Nutrients. 2017;9(12).
24- Alsultan S, A.A G. Histopathological Changes in the Livers of Broiler Chicken Supplemented with Turmeric (Curcuma longa). International Journal of Poultry Science. 2004;3.
25- Emiola IA, Ologhobo AD, Gous RM. Performance and histological responses of internal organs of broiler chickens fed raw, dehulled, and aqueous and dry-heated kidney bean meals. Poult Sci. 2007;86(6):1234-40.

www.SID.ir