

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

برای انسان و حیوان همراه باشند. به عنوان مثال، شواهد موجود نشان می‌دهند که بقایای آنتی بیوتیکی در غذای انسان، ممکن است باعث بروز مقاومت برخی از گونه‌های باکتری به آنتی بیوتیک‌های 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 افزودنی‌های 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 هم‌اکنون در صنعت طیور استفاده می‌شوند، چرا که ترکیبات گیاهی نه تنها مزایای فوق‌الذکر را دارا می‌باشند، بلکه می‌توانند به طور همزمان چندین اثر مفید را در جوجه‌ها القاء نمایند. به عنوان مثال Hussein و همکاران (۲۰۱۸) نشان داده‌اند که افزودن اسانس روغنی میخک (*Syzygium aromaticum* L.) جیره بلدرچین‌های ژاپنی باعث افزایش عملکرد، بهبود سلامتی و کاهش پاتوژن‌های روده‌ای می‌گردد (۲).

گیاه میخک متعلق به خانواده Myrtaceae است که به عنوان یک گیاه چندکاربردی قلمداد می‌شود. میخک منبع ارزشمندی از ویتامین (A رتینول)، بتا-کاروتن، ویتامین B، K و C است (۳). به دلیل وجود انواع ترکیبات فعال شامل فلاونوئیدها، هیدروکسی بنزوئیک اسیدها و هیدروکسی فنیل‌ها، میخک دارای خواص قابل توجه ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضد دردی می‌باشد (۴).

مطالعه کنونی با هدف ارزیابی اثرات اسانس روغنی گیاه میخک (*Syzygium aromaticum* L.) هیستوپاتولوژی و کارکرد کبدی-کلیوی و همچنین پروفایل پروتئین و ایمنی‌زایی در جوجه‌های 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 ۴۲ 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 (۴) جیره پایه + ۴۵۰ ppm اسانس میخک بودند. شاخص‌های ذیل مورد ارزیابی قرار گرفت: وزن نسبی بافت‌های کبد و کلیه، شاخص‌های کارکرد کبدی و کلیوی شامل فعالیت آنزیم‌های آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و گاماگلوتامیلترانسفراز (GGT)، اوره و کراتینین، پروفایل پروتئین شامل پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین و نهایتاً ایمونوگلوبولین‌های A، G و M. مقاطع 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 ایمونوگلوبولین‌ها می‌گردد. اما دوز بیشینه گیاه (۴۵۰ ppm) باعث ایجاد تغییرات معنی‌دار در شاخص‌های 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 ایمنی‌زایی در جوجه‌های گوشتی دارد، اما در دوزهای زیاد باعث ایجاد ضایعات کبدی و کلیوی می‌گردد، 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

افزودنی‌های خوراکی با اهداف گوناگون نظیر افزایش رشد، بهبود سیستم ایمنی و ارتقاء سیستم آنتی‌اکسیدانی به طور گسترده در صنعت پرورش طیور استفاده می‌گردند. برخلاف مزایای متنوع، این افزودنی‌ها ممکن است با معایبی

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

کلیه در جوجه‌های دریافت کننده مکمل میخک می پردازد و تا کنون چنین گزارشی منتشر نشده است.

مواد و روش کار

پرنده‌ها و تیمارهای آزمایشی

یک صد و هشتاد (۱۸۰) قطعه جوجه یک‌روزه نر گوشتی (سویه راس ۳۰۸) یک‌دست با میانگین وزنی ۴۰/۸۶ گرم از عامل توزیع محلی خریداری گردید. کلیه حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. طول دوره پژوهش نیز ۴۲ روز در نظر گرفته شد. احتیاجات غذایی جوجه‌های گوشتی با استفاده از ۳ نوع جیره مختلف بر پایه ذرت و سویا، برای مرحله آغازین (۱-۱۴ روزگی)، مرحله رشد (۱۵-۲۹ روزگی) و مرحله پایانی (۳۰-۴۲ 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 کاملاً تصادفی به چهار گروه اصلی با ۳ تکرار و تعداد ۱۵ قطعه جوجه در هر یک 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 (۴) جیره پایه + ۴۵۰ 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 ۳۴ درجه سانتی‌گراد در روز اول به ۲۴ درجه سانتی‌گراد در روز ۲۸ رسید و سپس ثابت ماند. همچنین میزان رطوبت از بدو ورود جوجه‌ها تا ۱۵ روزگی در محدوده ۶۰ تا ۷۰

سابقاً، 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 جوجه‌های گوشتی و مرغ‌های تخمگذار به اثبات رسیده است (۲، ۳، ۵-۹). نکته مهم در مورد استفاده از مکمل‌های 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، می‌تواند باعث ایجاد عوارض جانبی شدید گردند. در همین راستا Hashemipour و همکاران (۲۰۱۳) نشان داده‌اند که استفاده از تیمول و کارواکرول با دوز ۲۰۰ mg/kg که از مشتقات اصلی گیاه پونه می‌باشند باعث افزایش فعالیت آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و ایجاد ضایعات کبدی در جوجه‌های گوشتی می‌گردند (۱۰). از طرف دیگر، کبد و کلیه محل اولیه و اصلی متابولیسم مواد غذایی و دارویی است. برخلاف اهمیت زیاد این دو عضو، متأسفانه هیچ یک از مطالعات فوق‌الذکر به بررسی اثرات میخک بر عملکرد این دو بافت حیاتی نپرداخته‌اند و یا حداقل مطالعات صورت گرفته بسیار محدود است. از طرفی پروفایل پروتئین نیز در این مطالعات مورد غفلت قرار گرفته است. همچنین، مطالعات مربوط به ایمنی‌زایی فقط به اندازه‌گیری وزن اندام‌های ایمنی، عیار حاصل از واکنش‌های مختلف و یا تیترانتی بادی علیه گلبول‌های قرمز گوسفندی بسنده کرده‌اند و هیچ یک به اندازه‌گیری 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 ایمونوگلوبولین‌ها اندازه‌گیری می‌شود. نویسندگان بر این باورند که مطالعه حاضر اولین پژوهشی است به بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد و

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/طیف‌سنجی جرمی (GC/MS) اسانس میخک را انجام داده و ترکیبات شیمیایی را شناسایی نموده است (جدول ۲).

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

| ترکیب | میزان (%) | زمان بازداری (دقیقه) |
|---------------|-----------|----------------------|
| اورژنول | ۷۳/۱۹ | ۱۲/۷۳ |
| کاربوفیلین | ۵/۷۳ | ۱۳/۹۱ |
| اورژنول استات | ۹/۵۷ | ۱۳/۳۲ |
| سیکلونداکترین | ۸/۰۴ | ۱۵/۰۹ |
| تلوئن | ۱/۴۴ | ۳/۵۹ |
| مجموع | | ۹۸٪ |

انجام گرفت. پروتئین تام، آلومین و گلوبولین با استفاده از کیت استاندارد و اختصاصی شرکت پارس آزمون-تهران و بر اساس دفترچه راهنمای داخل جعبه کیت اندازه‌گیری شدند. همچنین مجموع ایمونوگلوبولین‌های سرمی از طریق آزمایش‌های بیوشیمیایی (SRBC (sheep red blood cell) اندازه‌گیری شدند (۱۴).

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)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و گاما گلوتامیل ترانسفراز (GGT) با استفاده از کیت استاندارد و اختصاصی شرکت پارس آزمون (تهران-ایران) و بر اساس دستورالعمل موجود در داخل جعبه و توصیه‌های شرکت سازنده اندازه‌گیری شدند.

آماده‌سازی مقاطع بافتی

پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت تثبیت نمونه‌های کبد و کلیه در داخل فرمالین ۱۰٪، مرحله آبیگری 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

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

نمونه‌گیری

در روز ۴۲، تمامی پرندگان به صورت انسانی آسان‌کشی شده و نمونه‌های خون از طریق بریدن سر اخذ گردید (تقریباً ۶ 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 ۱۴۰۰g در دمای ۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه جداسازی شده و به لوله‌های اپندورف منتقل گردیدند و در دمای ۲۰- سانتی‌گراد تا زمان آغاز آزمایش‌های مربوطه، نگهداری شدند.

اندازه‌گیری پروفایل پروتئین و ایمونوگلوبولین‌ها

تمامی آزمایش‌ها بیوشیمیایی با استفاده از دستگاه آنالیزر بیوشیمیایی خودکار (BT1500) در آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی (دانشگاه آزاد اسلامی-واحد کرمانشاه)

جدول ۱- ترکیبات جیره غذایی استفاده شده

| ترکیبات جیره (g/kg ماده خشک) | دوره آغازین | دوره رشد | دوره پایانی |
|----------------------------------|-------------|----------|-------------|
| ذرت | ۵۴۱/۷ | ۶۱۲/۹ | ۵۵۹/۳ |
| گندم | ۰ | ۰ | ۷۰ |
| کنجاله سویا (۴۵٪) | ۳۹۳/۲ | ۳۰۸/۹ | ۲۷۸/۹ |
| روغن سویا | ۲۵/۱ | ۳۵/۲ | ۵۰/۷ |
| ال-لیزین هیدروکلرید | ۱/۶ | ۱/۷ | ۲/۰ |
| دی ال-متیونین | ۳/۴ | ۲/۸ | ۲/۹ |
| دی-کلسیوم فسفات | ۱۵/۱ | ۱۹/۳ | ۱۷/۸ |
| صدف | ۱۱/۲ | ۱۰/۳ | ۹/۸ |
| نمک طعام | ۳/۷ | ۳/۹ | ۳/۶ |
| مکمل مواد معدنی ^۱ | ۲/۵ | ۲/۵ | ۲/۵ |
| مکمل ویتامین‌ها ^۲ | ۲/۵ | ۲/۵ | ۲/۵ |
| آنالیز مواد مغذی (g/kg ماده خشک) | | | |
| انرژی قابل متابولیسم (MJ/Kg) | ۱۲/۳۰ | ۱۲/۸۹ | ۱۲/۲۸ |
| پروتئین خام | ۲۲۲/۶ | ۱۹۰/۱ | ۱۸۰/۱ |
| لیزین | ۱۳/۲ | ۱۱/۲ | ۱۰/۵ |
| متیونین | ۶/۴۹ | ۵/۵۰ | ۵/۴۲ |
| متیونین-سیستئین | ۹/۸ | ۸/۴ | ۸/۲ |
| کلسیوم | ۹/۱ | ۹/۶ | ۹/۱ |
| فسفر در دسترس | ۴/۲ | ۴/۸ | ۴/۵ |
| سدیم | ۱/۶ | ۱/۷ | ۱/۶ |
| تعادل آنیون-کاتیون (meq/kg) | ۲۳۵/۱۷ | ۱۹۶/۹ | ۱۸۴/۰۷ |

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 ۴ درجه‌ای امتیاز بندی شدند: (-) بافت نرمال، (+) تغییرات خفیف بافتی، (++) تغییرات متوسط، (+++) تغییرات وسیع. برای هر پرنده، حداقل ۳ نمونه اسلاید میکروسکوپی تهیه شده و شاخص‌های فوق‌الذکر در ۳۰ تا ۴۵ میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی‌های ۱۰۰، ۴۰۰ و ۱۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفت.

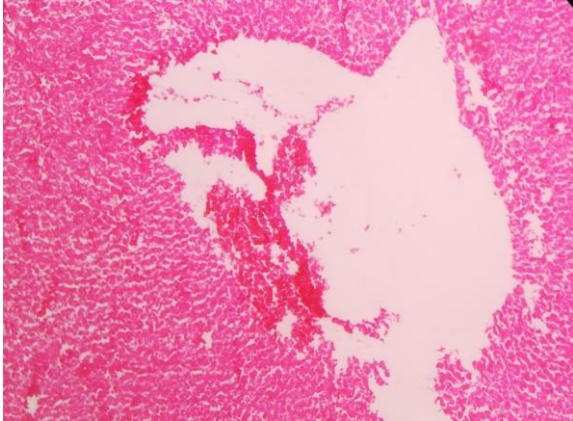
تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۲ (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 \pm انحراف معیار نمایش داده شدند. داده‌های مربوط به امتیازبندی پاتولوژی به شکل میانگین \pm خطای استاندارد بیان شدند. امتیاز پاتولوژی هر گروه با استفاده از آزمون غیر پارامتری Mann-Whitney ارزیابی شد. همچنین داده‌ها در سطح احتمال ۵ درصد ($P < 0.05$) مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

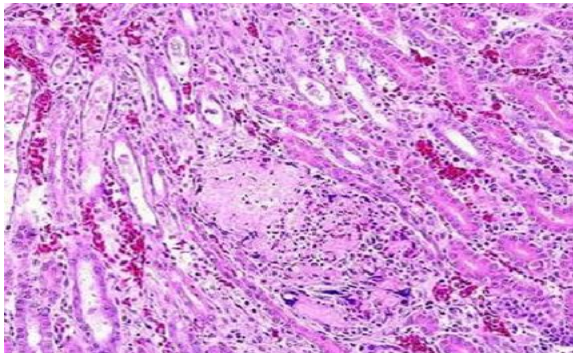
اثرات مقادیر مختلف اسانس میخک بر پروفایل پروتئین و ایمونوگلوبولین‌ها در جدول شماره ۳ درج شده است. همانطور که می‌توان مشاهده کرد، اسانس گیاهی باعث

۱- هر کیلوگرم مکمل ویتامینه سالار دارای ترکیبات زیر بود: ۳۶۰۰۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۸۰۰۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D₃، ۷۲۰۰ واحد بین المللی ویتامین E، ۷۲۰ میلی‌گرم B₁، ۲۶۴۰ میلی‌گرم ویتامین B₂، ۴۰۰۰ میلی‌گرم اسید پانتوتنیک، ۱۲۰۰۰ میلی‌گرم اسید نیکوتینیک، ۱۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین B₆، ۴۰۰ میلی - گرم اسید فولیک، ۶ میلی‌گرم ویتامین B₁₂، ۸۰۰ میلی‌گرم ویتامین K₃، ۴۰ میلی‌گرم بیوتین، کولین کلراید ۱۰۰۰۰۰ میلی‌گرم و آنتی اکسیدانت ۴۰۰۰۰ میلی‌گرم. ۲- هر کیلوگرم مکمل معدنی سالار دارای ترکیبات زیر بود: ۴۰۰۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۲۰۰۰۰



نگاره ۱: نکروز سلول‌های کبدی، پرخونی سیاهرگ مرکزی و اتساع سینوزوئید های باف کبد در جوجه‌های دریافت کننده دوز بیشینه (۴۵۰ ppm) مشهود است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین. بزرگنمایی $\times 100$)

دوز بیشینه (۴۵۰ ppm) اسانس میخک، باعث ایجاد نکروز گلوبرولی شد که چنین ضایعاتی در دوزهای متوسط و کمینه دیده نمی‌شود. 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 می‌دهد که ظاهراً آسیب کبدی شدیدتر از کلیوی بوده‌است، به طوری که دوزهای میانه و بیشتر باعث افزایش معنی‌دار اتساع مجاری، پرخونی و نفوذ سلول‌های التهابی با درجات بالاتر در بافت کبد شده است.



نگاره ۲: نفرت بینابینی و نفوذ سلول‌های التهابی به پارانشیم کلیه در جوجه‌های دریافت کننده دوز بیشینه (۴۵۰ ppm) مشهود است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین. بزرگنمایی $\times 40$)

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 ۴ حاکی از افزایش معنی‌دار وزن نسبی کبد و کلیه به دنبال تیمار با دوز بیشینه (۴۵۰ ppm) 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 ۴). 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 و بیشینه باعث افزایش فعالیت AST شده‌اند. دوز بیشینه، همچنین توانسته است فعالیت ALT را به طور معنی‌دار 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 می‌کشد. همانطور که می‌توان مشاهده نمود، دوز بیشینه اسانس گیاهی باعث دژنراسیون سلول‌های کبدی شده است، اما سایر دوزها اثرات محسوسی را بر جای نگذاشته‌اند. همچنین دوز میانه و بیشینه، به شکل چشمگیری باعث اتساع مجاری صفراوی، پرخونی و نفوذ سلول‌های التهابی شده‌اند (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 معنی‌دار نیست.

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

| متغیر | شاهد | تیمار ۲ (میخک ۲۵۰ ppm) | تیمار ۳ (میخک ۳۵۰ ppm) | تیمار ۴ (میخک ۴۵۰ ppm) |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| پروتئین تام (gr/dl) | ۳/۷۱±۰/۰۵ ^a | ۳/۹۴±۰/۱۱ ^{ab} | ۴/۱۲±۰/۰۴ ^b | ۴/۲۹±۰/۰۶ ^c |
| آلبومین (gr/dl) | ۱/۶۸±۰/۰۳ ^a | ۱/۷۶±۰/۰۴ ^{ab} | ۱/۸۴±۰/۰۲ ^b | ۱/۹۵±۰/۰۳ ^c |
| گلوبولین (gr/dl) | ۱/۷۱±۰/۰۱ ^a | ۱/۷۴±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 | ۳۹/۶۴±۱/۰۳ ^{ab} | ۴۱/۷۹±۱/۸۱ ^b |
| ایمونوگلوبولین G (mg/dl) | ۴۵۳/۲۲±۱۳/۰۷ ^a | ۴۶۱/۶۳±۱۴/۱۹ ^a | ۴۹۶/۸۹±۱۱/۱۴ ^b | ۵۳۹/۳۶±۱۳/۳۱ ^c |
| ایمونوگلوبولین M (mg/dl) | ۱۳۷/۰۷±۵/۱۲ ^a | ۱۴۰/۳۵±۴/۸۸ ^a | ۱۵۹/۶۲±۵/۲۳ ^b | ۱۶۶/۰۴±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 ۴: تاثیر سطوح مختلف اسانس میخک بر وزن نسبی (درصد وزن زنده) و کارکرد بافت‌های کبد و کلیه در جوجه های گوشتی.

| متغیر | شاهد | تیمار ۱ (میخک ۲۵۰ ppm) | تیمار ۲ (میخک ۳۵۰ ppm) | تیمار ۳ (میخک ۴۵۰ ppm) |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 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) | ۰/۴۹±۰/۰۲ ^a | ۰/۴۹±۰/۰۱ ^a | ۰/۵۱±۰/۰۲ ^a | ۰/۵۶±۰/۰۱ ^b |
| اوره (mg/dl) | ۱/۴۲±۰/۰۲ ^a | ۱/۴۱±۰/۰۱ ^a | ۱/۴۶±۰/۰۳ ^{ab} | ۱/۵۲±۰/۰۲ ^b |
| کراتینین (mg/dl) | ۰/۴۷±۰/۰۱ ^a | ۰/۴۷±۰/۰۱ ^a | ۰/۴۹±۰/۰۱ ^b | ۰/۵۴±۰/۰۱ ^c |
| AST (U/L) | ۱۲۳/۵۷±۳/۴۵ ^a | ۱۲۵/۲۲±۲/۱۸ ^a | ۱۳۱/۹۳±۱/۶۲ ^b | ۱۴۳/۶۱±۲/۷۷ ^c |
| ALT (U/L) | ۳۵/۴۴±۱/۴۹ ^a | ۳۷/۰۶±۱/۵۲ ^a | ۳۸/۴۷±۱/۲۲ ^a | ۴۴/۹۴±۱/۳۷ ^b |
| GGT (U/L) | ۳۸/۱۵±۱/۰۸ ^a | ۳۷/۲۹±۱/۱۴ ^a | ۳۵/۷۱±۱/۴۶ ^{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 = آسپاراتات آمینوترانسفراز، ALT = آلانین

آمینوترانسفراز، GGT = گاماگلوبولین ترانسفراز. ppm = قسمت در میلیون

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

| متغیر | تیمار ۱ (شاهد) | تیمار ۲ (میخک ۲۵۰ ppm) | تیمار ۳ (میخک ۳۵۰ ppm) | تیمار ۴ (میخک ۴۵۰ ppm) |
|-------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| کبد | دژنراسیون هپاتوسیت‌ها | ۰/۰±۰/۰ | ۰/۰±۰/۰ | ۰/۴۳±۰/۳۰* |
| | اتساع مجاری صفراوی | ۰/۰±۰/۰ | ۰/۲۹±۰/۱۸ | ۱/۰۰±۰/۳۱* |
| | احتقان عروق خونی | ۰/۰±۰/۰ | ۰/۴۳±۰/۲۰ | ۲/۰۰±۰/۴۴* |
| | نفوذ سلول‌های التهابی | ۰/۰±۰/۰ | ۰/۰±۰/۰ | ۱/۱۴±۰/۲۶* |
| کلیه | نکروز گلوبولینی | ۰/۰±۰/۰ | ۰/۰±۰/۰ | ۱/۷۱±۰/۴۲* |
| | اتساع لوله‌های ادراری | ۰/۰±۰/۰ | ۰/۲۹±۰/۱۸ | ۲/۱۴±۰/۳۴* |
| | احتقان عروق خونی | ۰/۰±۰/۰ | ۰/۲۹±۰/۱۸ | ۲/۰۰±۰/۳۱* |
| | نفوذ سلول‌های التهابی | ۰/۰±۰/۰ | ۰/۰±۰/۰ | ۱/۸۶±۰/۳۴* |

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

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 مطلقاً ضروری به نظر می‌رسد. 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 بی‌خطر می‌باشند، اما در صورت استفاده نابجا، ممکن است عوارضی را در برداشته باشند. متأسفانه هیچ یک از پژوهش‌های قبلی، این نکته را مد نظر قرار نداده و به بررسی اثرات سمی میخک، علی‌الخصوص 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 می‌دهد که اسانس گیاهی به شکل وابسته به

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 متعاقباً تولید جهانی برای گوشت مرغ، بوقلمون، مرغابی، قاز، تخم مرغ و سایر تخم‌ها به ترتیب ۰.۵۳٪، ۰.۱۳٪، ۰.۶۷٪، ۰.۵۳٪، ۰.۳۹٪ و ۰.۲۷٪ افزایش یافته است (۱۶). چنین رشد فزاینده‌ای باعث بروز رقابتی سنگین و فشرده میان تولیدکنندگان طیور و فرآورده‌های مرتبط شده است. از این جهت، تولیدکنندگان مقادیر مختلفی از انواع افزودنی‌های خوراکی را به جیره پرنده‌گان اضافه می‌کنند 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

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 ۴۵۰ 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 (۲۰۱۴) 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 تیتیر نیوکاسل مشاهده نکرده‌اند (۲۱). توجیه احتمالی برای این عدم تطابق می‌تواند تفاوت در سایر اجزای جیره و یا تفاوت در برنامه واکسیناسیون و نحوه استفاده از آنها باشد. اسانس میخک احتمالاً 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 می‌تواند به دلیل پرخونی و التهاب در بافت‌های مذکور باشد، به طوری که یافته‌های هیستوپاتولوژی از این فرضیه حمایت می‌کند. افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های AST و ALT به دنبال دریافت دوز بیشینه (۴۵۰ ppm) به خوبی حاکی از اثرات مخرب اسانس گیاهی بر کبد است. همانطور که بیشتر 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

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 نموده‌اند (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 متعاقباً کاهش جذب آنها می‌گردد (۱۸). بنابراین خواص ضد میکروبی و آنتی-اکسیدانی میخک می‌تواند 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 نانوامولوسیون 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 اشریشیاکلای کاسته و بر تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس می‌افزاید (۱۹).

همانطور که در جدول شماره ۲ درج شده است، اوژنول بیشترین ترکیب تشکیل دهنده (۷۳/۱۹٪) اسانس میخک است. پژوهش‌های صورت گرفته نشان می‌دهد که این ماده دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی است. به طوری که، Adefegha و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کرده‌اند که تجویز خوراکی اوژنول به موش‌های صحرائی مبتلا به آرتروز باعث کاهش پراکسیداسیون چربی شده و استرس اکسیداتیو را در کبد این حیوانات مهار می‌کند (۲۰). احتمالاً اوژنول با مکانسیم مشابه باعث افزایش مقادیر پروتئین‌ها طی مطالعه

- 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- Dalkılıç 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

توان مستقیماً 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 (۲۴). همچنین، Emiola و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کرده اند که مصرف لوبیای خام و بدون سبوس (*Phaseolus vulgaris*) در جوجه‌های گوشتی باعث احتقان گلوامرولی 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.

- performance of broilers. *European 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 nanoparticles 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 Moraes 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.

