

تأثیر عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم بر برخی از فراسنجه‌های بیوشیمیایی در موش‌های صحرایی آلوده شده با آفلاتوکسین B₁

افسانه ریالی^۱ هادی سریر^{۱*} محسن مجتهدی^۱ حسین ابطی^۲

(۱) گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

(۲) گروه علوم پایه دانشکده علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران

(دریافت مقاله: ۷ بهمن ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۳۰ فروردین ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: آفلاتوکسین‌ها گروهی از میکوتوکسین‌ها هستند که توسط قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس تولید شده و عامل مهمی در آسیب اکسیداتیو کلیه و کبد می‌باشد. **هدف:** هدف از این مطالعه بررسی تأثیر عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم در کاهش آسیب‌های کلیوی و کبدی ناشی از آفلاتوکسین B₁ می‌باشد. **روش کار:** در این آزمایش که به مدت ۴ هفته طول کشید ۶۴ سر موش صحرایی نر به طور تصادفی در قالب ۸ تیمار آزمایشی و به روش فاکتوریل تقسیم شدند که تیمارها شامل: شاهد، آفلاتوکسین (AF)، عصاره زردچوبه (TE)، بنتونیت سدیم (BS)، عصاره زردچوبه + بنتونیت سدیم، آفلاتوکسین + عصاره زردچوبه، آفلاتوکسین + بنتونیت سدیم، آفلاتوکسین + (عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم) بودند. در پایان دوره آزمایش خونگیری از قلب انجام شد و برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون بررسی گردید. **نتایج:** در موش‌های صحرایی آلوده شده با آفلاتوکسین B₁، میزان آلانین آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز، LDL و کراتینین به صورت معنی‌داری ($p < 0/05$) و مقدار اسید اوریک به طور عددی ($p = 0/056$) در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. درمان گروه‌های آلوده به آفلاتوکسین با عصاره ی زردچوبه یا بنتونیت به تنهایی باعث کاهش معنی‌دار میزان آلانین آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز، کراتینین و اسید اوریک در مقایسه با تیمار آفلاتوکسین شد ($p < 0/05$) و استفاده از ترکیب این دو باعث تقویت اثر و کاهش بیشتر فراسنجه‌های فوق گردید. گروه‌هایی که به تنهایی عصاره زردچوبه و بنتونیت دریافت کرده بودند در میزان آنزیم‌های کبدی آن‌ها تغییر معنی‌داری حاصل نشد. **نتیجه‌گیری نهایی:** با توجه به نتایج تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد که عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم به تنهایی اثرات مخرب آفلاتوکسین B₁ را کاهش می‌دهد و ترکیب این دو ممکن است اثر هم افزایی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین B₁، عصاره زردچوبه، بنتونیت سدیم، فراسنجه‌های خونی، موش صحرایی

مقدمه

که عامل ایجاد رنگ زرد در پودر زرد چوبه است، جزء فعال بیولوژیکی آن بوده و یک آنتی‌اکسیدان و ضدالتهاب بسیار قوی می‌باشد (۸). همچنین کورکومین موجود در زردچوبه اثرات محافظتی در برابر آفلاتوکسین B₁ را دارد (۲۶). کورکومین از تغییر آفلاتوکسین B₁ به آفلاتوکسیکول در کبد جلوگیری می‌کند (۱۵). گروه فنلی کورکومین جهت فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال‌های آزاد الزامی است و حضور گروه متوکسی فعالیت این مواد را جهت پاکسازی و حذف رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. کورکومین حلقوی (Cyclocurcumin) موجود در زردچوبه با دارا بودن سه باقیمانده متیونین نقش عمده‌ای در محافظت از عوامل اکسیداتیو داشته و هیچ‌گونه مسمومیتی در سلول ایجاد نمی‌کند (۲۷). استفاده از مواد جاذب غیر مغذی مانند ژئولیت طبیعی، بنتونیت، آلومینیوسیلیکات هیدراته سدیم-کلسیم، دیواره سلولی مخمر و زغال فعال با آفلاتوکسین ایجاد پیوند نموده و جذب آن‌ها را از دستگاه گوارش کاهش می‌دهند (۶، ۷). بنتونیت‌ها ترکیبات نانوساختار و نانوحفره رسی هستند که ساختار کریستالی لایه‌ای داشته و در جذب میکوتوکسین‌ها و به‌ویژه آفلاتوکسین‌ها کاربرد دارند. استفاده از بنتونیت در جیره غذایی حیوانات موجب افزایش وزن و کارایی تبدیل غذایی و کاهش بار میکروبی روده و کاهش اثرات نامناسب میکوتوکسین‌ها

آلودگی با سموم قارچی یکی از مشکلات عمده در صنعت پرورش دام و طیور است که نه تنها بر بازده دام و طیور تأثیر دارد بلکه به طور غیر مستقیم برای انسان خطر آفرین می‌باشد. آفلاتوکسین‌ها از جمله مهم‌ترین میکوتوکسین‌ها می‌باشند که به طور عمده توسط دو سویه قارچ آسپرژیلوس به نام‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس تولید می‌شوند (۲۸) که در بین انواع آن آفلاتوکسین B₁ و بیشترین و سمی‌ترین می‌باشد (۳۰) که موجب تضعیف سیستم دفاعی بدن و بروز سرطان، ایجاد جهش و آسیب‌های کبدی و کلیوی می‌گردد.

برای مقابله با اثرات سوئی آفلاتوکسین روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها بکار گرفته شده است (۵). زردچوبه از خانواده زنجبیل با نام علمی کورکومالانگا و نام انگلیسی تورمیریک شناخته می‌شود که در طب سنتی برای درمان اختلالات تنفسی، کبدی، روماتیسم و زخم‌های دیابتی از آن استفاده می‌شود (۱۴). بر اساس شرایط خاک و منشأ زردچوبه دارای ۹-۲٪ کورکومینوئیدهای مختلف مانند دی‌متوکسی کورکومین، بیس-دی‌متوکسی کورکومین و کورکومین حلقوی است که در بین آن‌ها کورکومین بیشترین مقدار را دارد (۲۲). کورکومین



و با استفاده از بسته نرم افزاری SAS مورد آنالیز آماری قرار گرفت و جهت مقایسه میانگین گروه‌های آزمایشی از آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ استفاده شد.

نتایج

نتایج اثرات متقابل و اصلی آفاتوکسین، عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم بر میانگین آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی نر در جدول ۱، ۲ و ۳ آورده شده است.

بررسی اثرات متقابل دو طرفه و سه طرفه نشان داد که آفاتوکسین B₁، میزان ALT سرم موش‌های صحرایی را به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهد ($p < 0/05$). در اثرات متقابل دو طرفه، بنتونیت سدیم و عصاره زردچوبه، توانست میزان ALT افزایش یافته در اثر آفاتوکسین B₁ را به طور معنی‌داری کاهش دهد ($p < 0/05$). در اثرات متقابل سه طرفه، درمان موش‌های مسموم شده با آفاتوکسین B₁ به وسیله عصاره زردچوبه به تنهایی، بنتونیت سدیم به تنهایی و ترکیب این دو سبب کاهش معنی‌داری ($p < 0/05$) در ALT سرم گردید و بیشترین کاهش معنی‌دار در میزان ALT مربوط به ترکیب عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم می‌باشد. در اثرات متقابل دو طرفه، موش‌های صحرایی که عصاره ی زردچوبه و بنتونیت سدیم دریافت کردند، میزان AST در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0/05$). هم چنین، در اثرات اصلی، موش‌های صحرایی که $100 \mu\text{g/kg}$ آفاتوکسین B₁ دریافت کردند، سطح سرمی AST به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0/05$). میزان AST در سطح 100 mg/kg عصاره زردچوبه به صورت معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0/05$). نتایج اثرات متقابل دو طرفه و سه طرفه نشان داد که آفاتوکسین B₁، میزان آلکالین فسفاتاز را به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهد ($p < 0/05$). در اثرات متقابل دو طرفه، عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم، توانست میزان آلکالین فسفاتاز را به طور معنی‌داری کاهش دهد ($p < 0/05$). هم چنین در اثرات متقابل سه طرفه، درمان موش‌های مسموم شده با آفاتوکسین B₁ به وسیله عصاره زردچوبه به تنهایی، بنتونیت سدیم به تنهایی و ترکیب آن دو توانست سطوح سرمی آنزیم آلکالین فسفاتاز را به طور معنی‌داری کاهش دهد ($p < 0/05$) که در اثر ترکیب عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم بیشترین کاهش معنی‌دار در میزان آلکالین فسفاتاز سرم مشاهده شد.

همانطور که در جدول ۴ و ۵ مشاهده می‌شود در اثرات متقابل دو طرفه و سه طرفه، تأثیر معنی‌داری در میزان کلسترول خون مشاهده نشد. در بررسی اثرات اصلی، سطح 100 mg/kg عصاره زردچوبه، میزان کلسترول خون را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد ($p < 0/05$). در اثرات متقابل دو طرفه و سه طرفه، میزان LDL در موش‌های صحرایی آلوده شده با آفاتوکسین B₁ در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت

می‌گردد. از طرفی بنتونیت حامی و محافظ غشاء روده است به طوری که به باکتری‌های پاتوژن چسبیده و آن‌ها را به صورت انتخابی دفع می‌کند (۲۹). با توجه به مطالعات انجام شده بر روی زرد چوبه و بنتونیت سدیم هدف از انجام این بررسی یافتن اثر هر یک به تنهایی و نیز یافتن اثر هم افزایی بین آن‌ها در به حداقل رساندن اثرات زیان بار آفاتوکسین B₁ می‌باشد.

مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (در محدوده وزنی $276-300 \text{ g}$) استفاده شد. حیوانات تحت شرایط کنترل شده دمایی محیط (25°C) و دوره نوری ۱۲ ساعته نگهداری می‌شدند. در طول آزمایش، موش‌های صحرایی به وسیله غذای آماده به فرم پلت و با آب آشامیدنی شهر بیرجند تغذیه شدند. تکثیر و پرورش حیوانات در محل آزمایشگاه تشریح فیزیولوژی دام دانشگاه بیرجند انجام شد. موش‌های صحرایی به صورت کاملاً تصادفی در ۸ گروه ۸ تایی در قالب طرح فاکتوریل $2 \times 2 \times 2$ ، مورد استفاده قرار گرفتند که شامل گروه کنترل، آفاتوکسین B₁ (AFB₁)، عصاره ی زردچوبه، بنتونیت سدیم، عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم، AFB₁ و عصاره زردچوبه، AFB₁ و بنتونیت سدیم، AFB₁ و (عصاره زردچوبه + بنتونیت سدیم) تقسیم شدند. در این بررسی جهت تولید سم AFB₁ از قارچ آسپرژیلوس فلاووس سویه (۵۰۰۴ IR ۱۱۱) PTCC No: تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) استفاده گردید که بطور خلاصه ابتدا با کشت آن بر روی محیط کشت PDA تکثیر و سپس با کشت بر روی برنج در دمای 34°C به مدت ۷ روز سم AFB₁ تولید و خالص سازی گردید. برای تهیه عصاره زردچوبه، 125 g پودر زردچوبه را در یک لیتر اتانول 80° (Merck) اضافه کرده و به مدت ۴۸ ساعت در ظرف در بسته که به طور دائم در حال تکان خوردن بود، نگهداری گردید و سپس از کاغذ صافی (واتمن شماره ۲) عبور و برای حذف حلال در دمای 40°C نگهداری شد تا کاملاً خشک گردد. سپس پودر به دست آمده تا زمان مصرف در فریزر نگهداری شد. مقدار AFB₁ ($100 \mu\text{g/kg}$)، عصاره زردچوبه (mg/kg) و مقدار مصرفی بنتونیت سدیم (DMI ۲۵/۰) بود که به صورت گاوآبه موش‌ها خورنده شد ($6, 13, 30$). ۱۲ ساعت بعد از آخرین مصرف خوراک توسط موش‌های صحرایی و خارج ساختن غذا از دسترس آن‌ها، در روز ۲۸ دوره آزمایش، موش‌های صحرایی باکتامین بیهوش شده و پس از باز کردن حفره صدری، خونگیری از قلب انجام شد. خون در داخل لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری و مقادیر آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز، کلسترول، LDL، اسید اوریک و کراتینین، توسط کیت‌های آزمایشگاهی تهیه شده توسط شرکت پارس آزمون با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر به روش آنزیمی اندازه گیری شد. داده‌های بدست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی و به روش فاکتوریل



جدول ۱. اثرات متقابل دو طرفه (آفلاتوکسین، عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم) بر آنزیم‌های کبدی. در هر ستون میانگین‌های دارای بند واژه (های) غیر مشترک^{a, b} نشانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

اثرات دو طرفه	آفلاتوکسین B ₁	آلآنین آمینوترانسفراز mg/dl	آسپاراتات آمینوترانسفراز mg/dl	آلکالین فسفاتاز U/l
بنتونیت سدیم	آفلاتوکسین B ₁	۱۳۹/۷۶ ^b	۸۶/۰۰	۴۶۷/۴۱ ^{bc}
	۰			
	۱۰۰	۱۸۷/۳۶ ^a	۹۳/۱۶	۸۸۹/۵۰ ^a
	۰	۱۵۵/۲۲ ^{ab}	۷۶/۵۰	۳۹۳/۰۰ ^c
	۱۰۰	۱۴۲/۸۵ ^b	۸۵/۵۸	۵۵۶/۷۵ ^b
خطای استاندارد میانگین		۹/۵۸	۳/۵۵	۲۹/۷۸
سطح معنی‌داری		۰/۰۰۷۵	۰/۷۸۸۸	۰/۰۰۰۱
بنتونیت سدیم	آفلاتوکسین B ₁	۱۴۷/۰۶ ^b	۸۳/۱۶	۴۶۷/۹۱ ^b
	۰			
	۱۰۰	۱۸۲/۱۲ ^a	۹۲/۶۶	۱۰۰۳/۵۸ ^a
	۰	۱۵۳/۹۳ ^{ab}	۷۹/۳۳	۳۸۶/۵۰ ^b
	۱۰۰	۱۴۲/۱۰ ^b	۸۶/۰۸	۴۴۲/۶۶ ^b
خطای استاندارد میانگین		۹/۵۸	۳/۵۵	۰/۲۹۷۸
سطح معنی‌داری		۰/۰۰۷۸	۰/۷۰۰۸	۰/۰۰۰۱
زردچوبه	بنتونیت سدیم	۱۶۷/۱۸	۸۸/۵۸ ^a	۹۱۵/۰۳ ^a
	۰			
	۰/۲۵	۱۵۳/۹۵	۹۰/۵۸ ^a	۴۳۵/۰ ^c
	۰	۱۵۶/۰۰	۸۷/۲۵ ^{ab}	۵۵۵/۵۸ ^b
	۰/۲۵	۱۴۲/۰۷	۷۴/۸۳ ^b	۳۹۴/۱۶ ^c
خطای استاندارد میانگین		۹/۵۸	۳/۵۵	۲۹/۷۸
سطح معنی‌داری		۰/۹۷۱۱	۰/۰۴۹۲	۰/۰۰۰۱

جدول ۲. اثرات متقابل سه طرفه (آفلاتوکسین، عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم) بر آنزیم‌های کبدی. در هر ستون میانگین‌های دارای بند واژه (های) غیر مشترک^{a, b} نشانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

اثرات سه طرفه	آفلاتوکسین B ₁	آلآنین آمینوترانسفراز mg/dl	آسپاراتات آمینوترانسفراز mg/dl	آلکالین فسفاتاز U/l	
بنتونیت سدیم	زردچوبه	آفلاتوکسین B ₁	۱۲۰/۶۵ ^b	۸۴/۳۳	۵۲۸/۸۳ ^{bc}
	۰	۰			
	۰	۱۰۰	۲۱۳/۷۲ ^a	۹۲/۸۳	۱۳۰۳ ^a
	۱۰۰	۰	۱۶۷/۴۸ ^{ab}	۸۲	۴۰۷ ^c
	۰	۰	۱۵۸/۸۸ ^{ab}	۸۷/۶۶	۳۹۴ ^c
	۰/۲۵	۰	۱۴۸/۹۷ ^b	۷۱	۳۷۹ ^c
	۰/۲۵	۱۰۰	۱۵۰/۵۳ ^b	۹۲/۵	۷۰۴ ^b
	۰	۱۰۰	۱۴۹/۰۲ ^b	۹۳/۵	۴۷۶ ^c
	۰/۲۵	۱۰۰	۱۳۵/۱۸ ^b	۷۸/۶۶	۴۰۹ ^c
	۰/۲۵	۱۰۰		۵/۰۲	۴۲/۱۲
خطای استاندارد میانگین			۱۳/۵۵		
سطح معنی‌داری			۰/۰۱۲۷	۰/۹۹۰۷	۰/۰۰۰۹

تأثیر معنی‌داری در میزان کراتینین خون نداشت (جدول ۴)، در حالی که در تیمار (آفلاتوکسین B₁ × بنتونیت سدیم)، موش‌های صحرایی آلوده شده با آفلاتوکسین B₁، میزان کراتینین خون را در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد (p < ۰/۰۵) و بنتونیت سدیم توانست میزان کراتینین خون را به طور معنی‌داری کاهش دهد (p < ۰/۰۵). در اثرات متقابل سه طرفه، آفلاتوکسین B₁ (جدول ۵)، میزان کراتینین خون

(p < ۰/۰۵)، در اثرات متقابل دو طرفه، در تیمار (آفلاتوکسین B₁ × بنتونیت سدیم)، بنتونیت سدیم توانست میزان LDL سرم موش‌های صحرایی را به طور معنی‌داری کاهش دهد (p < ۰/۰۵). در اثرات متقابل سه طرفه، عصاره زردچوبه، بنتونیت سدیم و ترکیب عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم تفاوت معنی‌داری را در میزان LDL سرم موش‌های صحرایی ایجاد نکردند. در اثرات متقابل دو طرفه، تیمار (آفلاتوکسین B₁ × عصاره زردچوبه)



جدول ۳. اثرات اصلی آفلاتوکسین، عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم بر آنزیم‌های کبدی. در هر ستون میانگین‌های دارای بند واژه (های) غیر مشترک^{a, b} نشانگر اختلاف معنی دار می‌باشد.

آلکالین فسفاتاز U/l	آسپاراتات آمینوترانسفراز mg/dl	آلانین آمینوترانسفراز mg/dl	آفلاتوکسین B ₁ (µg/kg)
۴۲۷/۲۱ ^b	۸۷/۲۵ ^b	۱۴۷/۴۹	۰
۷۲۴/۱۳ ^a	۸۹/۳۷ ^a	۱۶۲/۱۱	۱۰۰
۲۷/۰۶	۲/۵۱	۶/۷۷	خطای استاندارد میانگین‌ها
۰/۰۰۰۱	۰/۰۲۷۶	۰/۱۳۵۲	سطح معنی داری
			زردچوبه (mg/kg)
۶۷۵/۴۶ ^a	۸۹/۵۸ ^a	۱۶۰/۵۶	۰
۴۷۴/۸۸ ^b	۸۷/۰۴ ^b	۱۴۹/۰۴	۱۰۰
۲۷/۰۶	۲/۵۱	۶/۷۷	خطای استاندارد میانگین‌ها
۰/۰۰۰۱	۰/۰۲۰۹	۰/۲۳۶۳	سطح معنی داری
			بنتونیت سدیم (DMI)
۷۳۵/۷۵ ^a	۸۷/۹۱	۱۶۷/۵۹	۰
۴۱۴/۵۸ ^b	۸۲/۷۰	۱۴۸/۰۱	۰/۲۵
۲۷/۰۶	۲/۵۱	۶/۷۷	خطای استاندارد میانگین‌ها
۰/۰۰۰۱	۰/۱۵۰۵	۰/۱۶۴۲	سطح معنی داری

جدول ۴. اثرات متقابل دو طرفه (آفلاتوکسین، عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم) بر نیمرخ چربی و شاخص‌های عملکردی کلیه. در هر ستون میانگین‌های دارای بند واژه (های) غیر مشترک^{a, b} نشانگر اختلاف معنی دار می‌باشد.

اسید اوریک mg/dl	کراتینین mg/dl	LDL mg/dl	کلسترول تام mg/dl	اثرات دو طرفه
				بنتونیت سدیم
۲/۲۷	۰/۷۶	۲۸/۷۵	۶۵/۰۸	آفلاتوکسین B ₁
۲/۵۳	۰/۹۰	۳۵/۸۷	۷۳/۱۴	۰
۲/۲۸	۰/۷۹۵	۳۷/۱۶	۷۹/۵۳	۱۰۰
۷/۹۶	۰/۷۹۸	۳۶/۷۵	۸۴/۵۸	۰
۰/۱۷	۰/۰۴۴	۷/۲۳	۵/۵۸	۱۰۰
۰/۱۰۵۳	۰/۱۲۷۹	۰/۵۳۷۴	۰/۷۸۹۱	خطای استاندارد میانگین‌ها
				سطح معنی داری
				آفلاتوکسین B ₁
۲/۲۴ ^{ab}	۰/۷۶ ^b	۲۹/۸۳ ^b	۷۴/۷۴	۰
۲/۶۵ ^a	۰/۹۶ ^a	۳۹/۸۷ ^a	۷۸/۶۷	۱۰۰
۲/۳۱ ^{ab}	۰/۷۹ ^b	۳۰/۰۸ ^b	۶۹/۸۷	۰
۷/۸۴ ^b	۰/۷۳ ^b	۳۲/۷۵ ^b	۷۹/۰۵	۱۰۰
۰/۱۷	۰/۰۴۴	۷/۲۳	۵/۵۸	خطای استاندارد میانگین‌ها
۰/۰۱۶۴	۰/۰۰۶۸	۰/۰۰۴۹	۰/۶۴۱۵	سطح معنی داری
				بنتونیت سدیم
۲/۵۱	۰/۸۹	۳۳/۲۰	۶۵/۳۵	۰
۲/۲۹	۰/۷۷	۳۷/۴۱	۷۲/۸۶	۰/۲۵
۲/۳۸	۰/۸۳	۳۶/۵۰	۸۸/۰۵	۰
۷/۸۶	۰/۷۶	۳۷/۴۱	۷۶/۰۵	۰/۲۵
۰/۱۷	۰/۰۴۴	۷/۲۳	۵/۵۸	خطای استاندارد میانگین‌ها
۰/۴۰۴۴	۰/۵۵۶۱	۰/۱۹۱۶	۰/۰۸۸۵	سطح معنی داری
				زردچوبه
۲/۵۱	۰/۸۹	۳۳/۲۰	۶۵/۳۵	۰
۲/۲۹	۰/۷۷	۳۷/۴۱	۷۲/۸۶	۰/۲۵
۲/۳۸	۰/۸۳	۳۶/۵۰	۸۸/۰۵	۰
۷/۸۶	۰/۷۶	۳۷/۴۱	۷۶/۰۵	۰/۲۵
۰/۱۷	۰/۰۴۴	۷/۲۳	۵/۵۸	خطای استاندارد میانگین‌ها
۰/۴۰۴۴	۰/۵۵۶۱	۰/۱۹۱۶	۰/۰۸۸۵	سطح معنی داری

و یا ترکیب با عصاره زردچوبه باعث کاهش معنی دار ($p < 0.05$) کراتینین گردید. در تحقیق حاضر، نتایج اثرات متقابل دو طرفه و سه طرفه نشان داد (جدول ۴-۵) که آفلاتوکسین B₁، میزان اسید اوریک خون را افزایش

موش‌های صحرایی را به طور معنی داری افزایش می‌دهد ($p < 0.05$). درمان موش‌های مسموم شده با آفلاتوکسین B₁ به وسیله عصاره زردچوبه تأثیری بر میزان کراتینین نداشت، اما استفاده از بنتونیت سدیم به تنهایی



جدول ۵. اثرات متقابل سه طرفه (آفلاتوکسین، عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم) بر نیمرخ چربی و شاخص‌های عملکردی کلیه. در هر ستون میانگین‌های دارای بند واژه (های) غیر مشترک^{a, b} نشانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

اسید اوریک mg/dl	کراتینین mg/dl	LDL mg/dl	کلسترول تام mg/dl	اثرات سه طرفه		
				آفلاتوکسین B ₁	زردچوبه	بنتونیت سدیم
۲/۰۹ ^{ab}	۰/۷۲ ^b	۲۷/۶۶ ^c	۶۴/۶۶	۰	۰	۰
۲/۹۳ ^a	۱/۰۵ ^a	۳۸/۷۵ ^{ab}	۶۶/۰۵	۱۰۰	۰	۰
۲/۳۸ ^{ab}	۰/۸ ^{ab}	۳۲ ^{bc}	۸۴/۸۱	۰	۱۰۰	۰
۲/۴۴ ^{ab}	۰/۷۹ ^{ab}	۹/۸۳ ^c	۶۵/۵	۰	۰	۰/۲۵
۲/۱۸ ^{ab}	۰/۷۹ ^{ab}	۳۰/۳۳ ^c	۷۴/۲۵	۰	۱۰۰	۰/۲۵
۲/۳۸ ^{ab}	۰/۸۶ ^{ab}	۴۱ ^a	۹۱/۳۰	۱۰۰	۱۰۰	۰
۲/۱۴ ^{ab}	۰/۷۴ ^b	۳۳ ^{bc}	۸۰/۲۳	۱۰۰	۰	۰/۲۵
۷۵۵ ^b	۰/۷۳ ^b	۳۲/۵ ^{bc}	۷۷/۸۶	۱۰۰	۱۰۰	۰/۲۵
۰/۲۴	۰/۰۶۲	۷۷۵	۷/۹	خطای استاندارد میانگین		
۰/۰۳۵۱	۰/۰۱۲۲	۰/۰۰۰۱	۰/۴۷۲۲	سطح معنی‌داری		

جدول ۶. اثرات اصلی آفلاتوکسین، عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم بر نیمرخ چربی و شاخص‌های عملکردی کلیه. در هر ستون میانگین‌های دارای بند واژه (های) غیر مشترک^{a, b} نشانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

اسید اوریک mg/dl	کراتینین mg/dl	LDL mg/dl	کلسترول تام mg/dl	آفلاتوکسین B ₁ (µg/kg)	
۲/۲۷	۰/۷۷	۲۹/۹۵ ^b	۷۲/۳۰	۰	۰
۲/۲۵	۰/۸۴	۳۶/۳۱ ^a	۷۸/۸۶	۱۰۰	۱۰۰
۰/۱۲	۰/۳۱	۰/۸۷	۳/۹۵	خطای استاندارد میانگین‌ها	
۰/۸۶۹۲	۰/۱۱۰۹	۰/۰۰۰۱	۰/۲۴۷۷	سطح معنی‌داری	
زردچوبه (mg/kg)					
۲/۴	۰/۸۳	۳۲/۳۱	۶۹/۱۱ ^b	۰	۰
۲/۱۲	۰/۷۹	۳۳/۹۵	۸۲/۰۵ ^a	۱۰۰	۱۰۰
۰/۱۲	۰/۳۱	۰/۸۷	۳/۹۵	خطای استاندارد میانگین‌ها	
۰/۱۲۶۱	۰/۴۴۹۸	۰/۱۹۱۶	۰/۰۲۵۷	سطح معنی‌داری	
بنتونیت سدیم (DMI)					
۲/۴۴ ^a	۰/۸۶ ^a	۳۴/۸۵ ^a	۷۶/۷	۰	۰
۲/۰۸ ^b	۰/۷۶ ^b	۳۷/۴۱ ^b	۷۴/۴۶	۰/۲۵	۰/۲۵
۰/۱۲	۰/۳۱	۰/۸۷	۳/۹۵	خطای استاندارد میانگین‌ها	
۰/۰۴۳۲	۰/۰۳۸۶	۰/۰۰۸۴	۰/۶۸۹۸	سطح معنی‌داری	

می‌باشد.

در ارزیابی آسیب کبد، سنجش سطوح آنزیم‌هایی نظیر آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز به طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد. وقوع نکروز و یا آسیب به غشای سلول باعث رها شدن این آنزیم‌ها به گردش خون می‌شود. افزایش سطح سرمی این آنزیم‌ها نشان دهنده آسیب به بافت کبد می‌باشد (۲۳). افزایش فعالیت سرمی آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز در سرم موش‌های آلوده شده با آفلاتوکسین B₁ حکایت از بروز آسیب در سلول‌های کبدی دارد، این یافته‌ها با نتایج محققان همخوانی دارد (۲، ۹، ۱۳). در تحقیق حاضر درمان با عصاره زردچوبه به تنهایی و بنتونیت سدیم به تنهایی و ترکیب این دو در جیره غذایی موش‌های آلوده

می‌دهد ولی از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد. در اثرات متقابل دوطرفه بنتونیت سدیم توانست اسید اوریک افزایش یافته در اثر مسمومیت با آفلاتوکسین B₁ را به طور معنی‌داری کاهش دهد ($P < 0/05$). همانگونه که در جدول ۵ نشان داده شده است، در اثرات متقابل سه طرفه، درمان موش‌های آلوده به آفلاتوکسین B₁ با عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم به تنهایی تأثیر معنی‌داری بر مقدار اسید اوریک نداشت، در حالی که استفاده همزمان این دو باعث کاهش معنی‌دار اسید اوریک می‌گردد ($P < 0/05$).

بحث

نتایج حاصل از بررسی‌های بیوشیمیایی در مطالعه حاضر حاکی از آسیب دیدگی بافت کلیه و کبد موش‌های صحرایی آلوده شده با آفلاتوکسین B₁



کراتینین، آسیب‌های گلوامرولی و یا توبولی کلیه می‌باشد (۱۸). بررسی‌ها نشان داده است که مقدار کراتین و کراتینین در خرگوش‌های آلوده شده با آفاتوکسین در اثر آسیب وارده به عضلات اسکلتی و کلیه‌ها افزایش می‌یابد (۹) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

استفاده از بنتونیت سدیم به تنهایی باعث کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) کراتینین گردید، که با نتایج بدست آمده از تحقیقات پیشین همسو است (۵). میزان اسید اوریک خون در موش‌های صحرایی آلوده شده با آفاتوکسین B۱ در مقایسه با گروه شاهد اگرچه معنی‌دار نبود ($p = 0.056$) اما افزایش عددی داشت (۲/۹۲ در برابر ۲/۰۹ mg/dl) که این یافته‌ها با مطالعات پیشین مطابقت دارد (۱۱). هر تغییر در میزان اسید اوریک و کراتینین در سرم نشان دهنده کاتابولیسم پروتئین و یا اختلال در عملکرد کلیه می‌باشد (۴، ۱۱). میزان اسید اوریک افزایش یافته در موش‌های صحرایی آلوده شده با آفاتوکسین B۱ در اثر درمان با عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم به تنهایی تأثیر معنی‌داری در مقایسه با گروه آفاتوکسین نداشت اما ترکیب آن‌ها مقدار اسید اوریک را به طور معنی‌داری کاهش داد که نشان دهنده اثر تقویتی این دو ماده با یکدیگر است.

بررسی نتایج آنزیم‌های کبدی نشان می‌دهد که عصاره زردچوبه و بنتونیت، بر مسمومیت کبدی ناشی از آفاتوکسین B۱ اثر مثبتی داشته است، و ترکیب آن‌ها باعث کاهش بیشتر آنزیم‌های افزایش یافته در اثر آفاتوکسین می‌گردند. هم چنین ثابت شده است که عصاره زردچوبه در بهبود مسمومیت کبدی ناشی از بتا گالاکتوز آمین و آهن نیز تأثیر دارد و باعث کاهش نکروز و پراکسیداسیون چربی در کبد می‌شود (۲۴، ۱۶). Abdel-Wahhab و همکاران در سال ۱۹۹۸ گزارش کردند که هیدرات سدیم کلسیم آلومینوسیلیکات و بنتونیت سدیم در محافظت در برابر آفاتوکسین B۱ و جلوگیری از اثرات سمی آن‌ها مؤثر می‌باشند (۴). در پژوهش دیگری گزارش شده است که مکانیسمی برای اتصال آفاتوکسین B۱ به بنتونیت سدیم وجود دارد که طبق آن، ساختار شیمیایی آفاتوکسین B۱ در ایجاد اتصالات قوی بین یون‌های موجود در بنتونیت سدیم و بتاکربونیل موجود در آفاتوکسین B۱ دخیل می‌باشد (۲۰).

مطالعه حاضر بیانگر آن است که احتمالاً ترکیب عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم با تقویت اثر یکدیگر تأثیر بهتری از استفاده هر کدام به تنهایی در آسیب‌های کبدی و کلیوی ناشی از آفاتوکسین B۱ در موش صحرایی دارند.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام در گروه آموزشی علوم دامی دانشگاه بیرجند است. نگارنده مقاله بر خود لازم می‌داند از همکاری خانم‌ها ذاکریان و ایرانمش تشکر نماید.

شده با آفاتوکسین B۱ توانست میزان آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز سرم را به طور معنی‌داری کاهش دهد ($p < 0.05$)، که با نتایج بدست آمده از تحقیقات پیشین همسو می‌باشد (۵، ۱۳، ۱۷). عصاره زردچوبه دارای ترکیبات شیمیایی مختلفی می‌باشد که مهمترین آن‌ها کورکومین است. اگرچه کورکومین به سرعت تجزیه می‌گردد اما زمانی که به لیپیدها، لیپوزوم، آلبومین، سورفاکتانت و بسیاری دیگر از ماکرومولکول‌ها متصل می‌گردد، به شدت مقدار تجزیه آن کاهش می‌یابد (۲۱). اثرات درمانی کورکومین موجود در زردچوبه احتمالاً از طریق عمل آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی و تنظیم آنزیم‌های کبدی می‌باشد (۱۹). کورکومین می‌تواند تولید و ترشح صفرا را افزایش دهد و لذا می‌توان پیشنهاد نمود که کورکومین دفع صفرا را افزایش داده و آن هم به نوبه خود پاکسازی متابولیت‌های سمی را از بدن تسریع می‌نماید (۱۲). نتایج نشان داده است که مواد جاذب همانند بنتونیت سدیم از تخریب بافت کبد توسط آفاتوکسین B۱ جلوگیری می‌کند. این یافته‌ها نشان داد که اتصال آفاتوکسین B۱ به بنتونیت سدیم منجر به کاهش آفاتوکسین B۱ در مجاری گوارشی می‌شود (۵). Arafat و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند که زردچوبه با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود می‌تواند میزان کلسترل سرم موش‌های صحرایی را کاهش دهد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت ندارد (۷). در مطالعه حاضر میزان LDL، در سرم موش‌های صحرایی مسموم شده با آفاتوکسین B۱ افزایش یافت، که با یافته‌های Abdel-Wahhab و همکاران در سال ۲۰۱۰ مطابقت دارد (۳). افزایش LDL در سرم موش‌های آلوده شده با آفاتوکسین B۱ احتمالاً با انسداد صفراوی و آسیب حاد کبدی در ارتباط است. آسیب کبدی یکی از دلایل ممکن برای افزایش میزان LDL به علت اختلال در متابولیسم کلسترول توسط سلول‌های کبدی می‌باشد (۳، ۱۰). در اثرات متقابل دوطرفه، بنتونیت سدیم سبب کاهش معنی‌دار در میزان LDL، سرم موش‌های آلوده شده با آفاتوکسین B۱ گردید که با نتایج تحقیقات پیشین مطابقت دارد (۱). بنتونیت سدیم، جذب LDL در روده را از طریق کاهش انتشار در مجاری گوارشی و یا اختلال در متابولیسم نمک‌های صفراوی و جلوگیری از تشکیل میسل، مهار می‌کند و سبب کاهش میزان LDL سرم می‌گردد.

در مطالعه حاضر میزان کراتینین سرم موش‌های صحرایی در اثر مسمومیت با آفاتوکسین B۱ افزایش یافت که با یافته‌های Mathuria و Verma در سال ۲۰۰۸ همسو می‌باشد (۱۷). کراتین پس از سنتز در کبد توسط خون به عضلات رفته و تبدیل به کراتین فسفات شده که به عنوان منبع انرژی عمل می‌کند. کراتینین در اثر کاتابولیسم کراتین بدست آمده و اگرچه هر دو با تصفیه گلوامرولی وارد توبول‌های کلیه می‌شوند اما کراتینین باز جذب شده ولی کراتینین قادر به باز جذب نبوده و از طریق ادرار دفع می‌گردد. مقادیر افزایش یافته کراتینین سرم موش‌های آلوده شده با آفاتوکسین ممکن است در اثر افزایش تبدیل فسفو کراتین عضلانی به



References

- Abbès, S., Salah-Abbès, J. B., Ouanes, Z., Houas, Z., Othman, O., Bacha, H., Abdel-wahhab, M.A., Oueslati, R. (2006) Preventive role of phyllosilicate clay on the Immunological and Biochemical toxicity of zearalenone in Balb/c mice. *Int Immunopharmacol.* 6: 1251-8.
- Abdel-Wahhab, M. A., Ahmed, H., Hagazi, M. M. (2006) Prevention of aflatoxin B1-initiated hepatotoxicity in rat by marine algae extracts. *J Appl Toxicol.* 26: 229-38.
- Abdel-Wahhab, M. A., Hassan, N. S., El-Kady, A. A., Khadrawy, Y. A., El-Nekeety, A. A., Mohamed, S. R. Sharaf, H.A., Mannaa, F.A. (2010) Red ginseng extract protects against aflatoxin B1 and fumonisins-induced hepatic pre-cancerous lesions in rats. *Food Chem Toxicol.* 48: 733-42.
- Abdel-Wahhab, M. A., Nada, S. A., Farag, I. M., Abbas, N. F., Amra, H. A. (1998) Potential protective effect of HSCAS and bentonite against dietary aflatoxicosis in rat: with special reference to chromosomal aberrations. *Nat Toxins.* 6: 211-8.
- Abdel-Wahhab, M., Nada, S., Khalil, F. (2002) Physiological and toxicological responses in rats fed aflatoxin-contaminated diet with or without sorbent materials. *Anim Feed Sci Technol.* 97: 209-19.
- Maisanaba, S., Pichardo, S., Puerto, M., Gutiérrez-Praena, D., Cameán, A.M., Jos, A. (2015) Toxicological evaluation of clay minerals and derived nanocomposites: A review. *Enviro Res.* 138: 233-254.
- Arafa, H.M. (2005) Curcumin attenuates diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Medical science monitor: Int Med J Exp Clin Res.* 11: 228-34.
- Babu, P. S., Srinivasan, K. (1997) Hypolipidemic action of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in streptozotocin induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 166: 169-75.
- Banu, G.S., Kumar, G., Murugesan, A. (2009) Effect of ethanolic leaf extract of *Trianthema portulacastrum* L. on aflatoxin induced hepatic damage in rats. *Indian J Clin Biochem.* 24: 250-256.
- Brinda, R., Vijayanandraj, S., Uma, D., Malathi, D., Paranidharan, V., Velazhahan, R. (2013) Role of *Adhatoda vasica* (L.) Nees leaf extract in the prevention of aflatoxin-induced toxicity in Wistar rats. *J Sci Food Agric.* 93: 2743-2748.
- Darwish, H., Omara, E., Abdel-Aziz, K., Farag, I., Nada, S., Tawfek, N. (2011) *Saccharomyces cerevisiae* modulates Aflatoxin-induced toxicity in male Albino mice. *Rep Opinion.* 3: 32-43.
- Deshpande, U., Gadre, S., Raste, A., Pillai, D., Bhide, S., Samuel, A. (1998) Protective effect of turmeric (*Curcuma longa* L.) extract on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Indian J Exp Biol.* 36: 573-7.
- El-Agamy, D. S. (2010) Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B1-induced liver injury in rats. *Arch Toxicol.* 84: 389-96.
- Lal, J. (2012) Turmeric, curcumin and our life: a review. *Bull Environ Pharmacol Life Sci.* 1: 11-17.
- Lee, S. E., Campbell, B. C., Molyneux, R. J., Hasegawa, S., Lee, H. S. (2001) Inhibitory effects of naturally occurring compounds on aflatoxin B1 biotransformation. *J Agric Food Chem.* 49: 5171-7.
- Lin, S. C. (1996) Protectine and trapeutic effect of *Curcuma longa* on B-D-Galactoseamin induced liver damage. *Pharmacol Res.* 10: 131-5.
- Mathuria, N., Verma, R. J. (2008) Ameliorative effect of curcumin on aflatoxin-induced toxicity in serum of mice. *Acta Pol Pharm.* 65: 339-343.
- Mc Lauchlan, D. M. (1988) Creatinine, urate and urea. In: *Varleys Practical Clinical Biochemistry.* Gowenlock, A.D. (ed.). Heinemann Medical Books. London. p. 350.
- Nayak, S., Sashidhar, R. (2010) Metabolic intervention of aflatoxin B1 toxicity by curcumin. *J Ethnopharmacol.* 127: 641-4.
- Phillips, T. D. (1999) Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease. *Toxicol Sci.* 52: 118-26.
- Priyadarsini, K. L. (2009) Photophysics, Photochemistry and Photobiology of Curcumin: Stud-



- ies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *J. Photochem. Photobiol. C*. 10: 81-96.
22. Priyadarsini, K. L. (2014) The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*. 19: 20091-112.
23. Recknagel, R. O., Glende Jr, E. A., Dolak, J. A., Waller, R. L. (1989) Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Therapeutics*. 43: 139-54.
24. Reddy, A., Lokesh, B. (1996) Effect of curcumin and eugenol on iron-induced hepatic toxicity in rats. *Toxicol*. 107: 39-45.
25. Richard, J.L. (2007) Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *Int J Food Microbiol*. 119: 3-10.
26. Soni, K., Lahiri, M., Chackradeo, P., Bhide, S., Kuttan, R. (1997) Protective effect of food additives on aflatoxin-induced mutagenicity and hepatocarcinogenicity. *Cancer Lett*. 115: 129-33.
27. Srinivas, L., Shalini, V., Shylaja, M. (1992) Turmerin: A water soluble antioxidant peptide from turmeric *Curcuma longa*. *Arch Biochem Biophys*. 292: 617-23.
28. Stroka, J., Anklam, E., Jörissen, U., Gilbert, J. (2000) Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. *J AOAC Int*. 83: 320-40.
29. Trckova, M., Matlova, L., Dvorska, L. (2004) Kaolin, bentonite, and zeolites as feed supplements for animals: health advantages and risks. *Vet Med-Czech*. 49: 389-9.
30. Verma, R., Raval, P. (1997) Nephrotoxicity during aflatoxicosis. *Med Science Res*. 25: 655-57.



The effect of turmeric extract and sodium bentonite on some biochemical parameters in rats contaminated with Aflatoxin B1

Rialy, A.¹, Sarir, H.^{1*}, Mojtahedi, M.¹, Abtahi H.²

¹Department of Animal Science, University of Birjand, Birjand, Iran

²Department of Basic Sciences, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

(Received 26 January 2017, Accepted 19 April 2017)

Abstract:

BACKGROUND: Aflatoxins are a group of mycotoxins produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* and are an important factor in oxidative damage to the kidney and liver. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to evaluate the effects of turmeric extract and/or sodium bentonite against renal and hepatic damage induced by aflatoxin B1. **METHODS:** In this experiment, which lasted for four weeks, 64 male Wistar rats were randomly assigned to eight groups including: control, aflatoxin (AF), turmeric extract (TE), sodium bentonite (SB), TE+SE, AF+TE, AF+SB, AF+(TE+SB). At the end of experiment blood samples were taken from heart and some biochemical analyses were performed. **RESULTS:** In the AF group, the levels of alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), low density lipoprotein (LDL) and creatinine ($p < 0.05$) significantly increased and uric acid numerically increased ($p = 0.056$) compared to control group. Treatment of AF contaminated group with TE or SB alone remarkably decreased the levels of ALT, ALP, creatinine and uric acid. TE and SB in normal rats had no significant effect on the levels of liver enzyme compared to the control group. **CONCLUSIONS:** According to the present research, it seems that TE and SB alone decrease the harmful effects of Aflatoxin B1 and the combination of them has a potentiating effect.

Keyword: aflatoxin B1, turmeric extract, sodium bentonite, blood factors, rats

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Two-way interaction effects (aflatoxin B1, turmeric extract and sodium bentonite) on liver enzymes.

Table 2. Three-way interaction effects (aflatoxin B1, turmeric extract and sodium bentonite) on liver enzymes.

Table 3. The main effects of aflatoxin B1, turmeric extract and sodium bentonite on liver enzymes.

Table 4. Two-way interaction effects (aflatoxin B1, turmeric extract and sodium bentonite) on lipid profile and kidney function indicators.

Table 5. Three-way interaction effects (aflatoxin B1, turmeric extract and sodium bentonite) on lipid profile and kidney function indicators.

Table 6. The main effects of aflatoxin B1, turmeric extract and sodium bentonite on lipid profile and kidney function indicators. Means within a column that do not have a common superscript are significantly different ($p < 0.05$).



*Corresponding author's email: hsarir@birjand.ac.ir, Tel: 056-32254041, Fax: 056-32254050

J. Vet. Res. 72, 3, 2017