مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۳، ۳۶۳-۳۵۵
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2017.115307.2221

تأثیر عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم بر برخی از فراسنجه‌های بیوشیمیایی در موش‌های صحرایی آلوده شده با آفلاتوکسین B۱

افسانه ریالی[۱] هادی سریر[۱*] محسن مجتهدی[۱] حسین ابطحی[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 مایکوتوکسین‌ها 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 B۱ می‌باشد. **روش کار:** در این آزمایش که به مدت ۴ هفته طول کشید۶۴ سر موش صحرایی نر به طور تصادفی در قالب ۸ تیمارآزمایشی 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 B۱، میزان آلانین آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز LDL و کراتینین به صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) و مقدار اسید اوریک به طور عددی ($p=۰/۰۵۶$) 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 ($p<۰/۰۵$) 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 B۱را کاهش می‌دهد و ترکیب این دو ممکن است اثر هم افزایی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین B۱، عصاره زردچوبه، بنتونیت سدیم، فراسنجه‌های خونی، موش صحرایی

مقدمه

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 مهم ترین مایکوتوکسین‌ها می‌باشند که به طور عمده توسط دو سویه قارچ آسپرژیلوس به نام‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتکوس تولید می‌شوند (۲۸) که در بین انواع آن آفلاتوکسین B۱ و بیشترین و سمی‌ترین می‌باشد (۳۰) که موجب تضعیف سیتم دفاعی بدن و بروز سرطان، ایجاد جهش و آسیب‌های کبدی و کلیوی می‌گردد.

برای مقابله با اثرات سوئ آفلاتوکسین روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و استفاده از آنتی اکسیدان‌ها بکار گرفته شده است (۵). زردچوبه از خانواده زنجبیل با نام علمی کورکومالانگا و نام انگلیسی تورمریک 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 دی متوکسی کورکومین، بیس-دی متوکسی کورکومین و کورکومین حلقوی است که در بین آن‌ها کورکومین بیشترین مقدار را دارد (۲۲). کورکومین 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 B۱ را دارد (۲۶). کورکومین از تغییر آفلاتوکسین B۱ به آفلاتوکسیکول در کبد جلوگیری می‌کند (۱۵). گروه فنلی کورکومین جهت فعالیت حذف کنندگی رادیکال‌های آزاد الزامی است و حضور گروه متوکسی فعالیت این مواد را جهت پاکسازی وحذف 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 هیچ گونه مسمومیتی در سلول ایجاد نمی‌کند (۲۷). استفاده از مواد جاذب غیر مغذی مانند زئولیت طبیعی، بنتونیت، آلومینیوسیلیکات هیدراته سدیم-کلسیم، دیواره سلولی مخمر و زغال فعال با آفلاتوکسین ایجاد پیوند نموده و و جذب آن‌ها را از دستگاه گوارش کاهش می‌دهند (۶،۷). بنتونیت‌ها ترکیبات نانوساختار و نانوحفره رسی هستندکه ساختار کریستالی لایه‌ای داشته و در جذب مایکوتوکسین‌ها و به‌ویژه آفلاتوکسین‌ها کاربرد دارند. استفاده از بنتونیت درجیره غذایی حیوانات موجب افزایش وزن وکارایی تبدیل غذایی وکاهش بارمیکروبی روده وکاهش اثرات نامناسب مایکوتوکسین‌ها

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۵۶-۳۲۲۵۴۰۴۱، نمابر: ۰۵۶-۳۲۲۵۴۰۵۰ Email: hsarir@birjand.ac.ir

می‌گردد. ازطرفی بنتونیت حامی و محافظ غشاء روده است به طوری که به باکتری‌های پاتوژن چسبیده وآن‌ها 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 آفلاتوکسین B۱ می‌باشد.

مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (در محدوده وزنی g ۳۰۰-۲۷۶) استفاده شد. حیوانات تحت شرایط کنترل شده دمایی محیط (۲۵°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 ۸گروه ۸ تایی در قالب طرح فاکتوریل ۲×۲×۲، مورد استفاده قرار گرفتند که شامل گروه کنترل، آفلاتوکسین B۱ (AFB۱)، عصاره ی زردچوبه، بنتونیت سدیم، عصاره زردچوبه و بنتونیت سدیم، AFB۱ و عصاره زردچوبه، AFB۱ و بنتونیت سدیم، AFB۱ و (عصاره زردچوبه + بنتونیت سدیم) تقسیم شدند. در این بررسی جهت تولید سم AFB۱ از قارچ آسپرژیلوس فلاووس سویه (۵۰۰۴ PTCC No: (IR۱۱۱ (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 ۳۴°C به مدت ۷ روز سم AFB۱ تولید و خالص سازی گردید. برای تهیه عصاره زردچوبه، ۱۲۵گرم پودر زردچوبه را در یک لیتر اتانول ۸۰° (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 ۴۰°C نگهداری شد تا کاملاً خشک گردد. سپس پودر به دست آمده تا زمان مصرف در فریزر نگهداری شد. مقدار AFB۱ (۱۰۰ μg/kg)، عصاره زردچوبه (mg/ ۱۰۰ kg) و مقدار مصرفی بنتونیت سدیم (۰/۲۵ DMI) بود که به صورت گاواژ به موش‌ها خورانده شد (۶،۱۳،۳۰). 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 بازکردن حفره صدری، خونگیری از قلب انجام شد. خون در داخل لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری و مقادیر آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات 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 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 آفلاتوکسین، 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 آفلاتوکسین B۱، میزان ALT سرم موش‌های صحرایی را به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهد ($p<0/05$). در اثرات متقابل دوطرفه، بنتونیت سدیم و عصاره زردچوبه، توانست میزان ALT افزایش یافته در اثر آفلاتوکسین B۱ را به طور معنی‌داری کاهش دهد ($p<0/05$). در اثرات متقابل سه طرفه، درمان موش‌های مسموم شده با آفلاتوکسین B۱ 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، دراثرات اصلی، موش‌های صحرایی که ۱۰۰ μg/kg آفلاتوکسین B۱ دریافت کردند، سطح سرمی AST به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<0/05$). میزان AST در سطح ۱۰۰ mg/kg عصاره زردچوبه به صورت معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/05$). نتایج اثرات متقابل دو طرفه و سه طرفه نشان داد که آفلاتوکسین B۱، میزان آلکالین فسفاتاز را به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهد ($p<0/05$). در اثرات متقابل دو طرفه، عصاره زردچوبه وبنتونیت سدیم، توانست میزان آلکالین فسفاتاز را به طور معنی‌داری کاهش دهد ($p<0/05$). هم چنین در اثرات متقابل سه طرفه، درمان موش‌ها ی مسموم شده با آفلاتوکسین B۱ 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 ۱۰۰ 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 آفلاتوکسین B۱ در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت

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		آلانین آمینوترانسفراز mg/dl	آسپارتات امینوترانسفراز mg/dl	آلکالین فسفاتاز U/l
بنتونیت سدیم	آفلاتوکسین B۱			
۰	۰	۱۳۹/۷۶ [b]	۸۶/۰۰	۴۶۱/۴۱ [bc]
۰	۱۰۰	۱۸۱/۳۶ [a]	۹۳/۱۶	۸۸۹/۵۰ [a]
۱۰۰	۰	۱۵۵/۲۲ [ab]	۷۶/۵۰	۳۹۳/۰۰ [c]
۱۰۰	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 B۱			
۰	۰	۱۴۱/۰۶ [b]	۸۳/۱۶	۴۶۷/۹۱ [b]
۰	۱۰۰	۱۸۲/۱۲ [a]	۹۲/۶۶	۱۰۰۳/۵۸ [a]
۰/۲۵	۰	۱۵۳/۹۲ [ab]	۷۹/۳۳	۳۸۶/۵۰ [b]
۰/۲۵	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			
۰	۰	۱۶۷/۱۸	۸۸/۵۸ [a]	۹۱۵/۰۳ [a]
۰	۰/۲۵	۱۵۳/۹۵	۹۰/۵۸ [a]	۴۳۵/۰ [c]
۱۰۰	۰	۱۵۶/۰۰	۸۷/۲۵ [ab]	۵۵۵/۵۸ [b]
۱۰۰	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			آلانین آمینوترانسفراز mg/dl	آسپارتات امینوترانسفراز mg/dl	آلکالین فسفاتاز U/l
بنتونیت سدیم	زردچوبه	آفلاتوکسین B۱			
۰	۰	۰	۱۲۰/۶۵ [b]	۸۴/۳۳	۵۲۸/۸۳ [bc]
۰	۰	۱۰۰	۲۱۳/۷۲ [a]	۹۲/۸۳	۱۳۰۳ [a]
۰	۱۰۰	۰	۱۶۱/۴۸ [ab]	۸۲	۴۰۷ [c]
۰/۲۵	۰	۰	۱۵۸/۸۸ [ab]	۸۷/۶۶	۳۹۴ [c]
۰/۲۵	۱۰۰	۰	۱۴۸/۹۷ [b]	۷۱	۳۷۹ [c]
۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۵۰/۵۳ [b]	۹۲/۵	۷۰۴ [b]
۰/۲۵	۰	۱۰۰	۱۴۹/۰۲ [b]	۹۳/۵	۴۷۶ [c]
۰/۲۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۳۵/۱۸ [b]	۷۸/۶۶	۴۰۹ [c]
خطای استاندارد میانگین			۱۳/۵۵	۵/۰۲	۴۲/۱۲
سطح معنی‌داری			۰/۰۱۲۷	۰/۹۹۰۷	۰/۰۰۰۹

($p<۰/۰۵$). در اثرات متقابل دو طرفه، در تیمار (آفلاتوکسین B۱× 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 B۱× عصاره زردچوبه) تأثیر معنی‌داری در میزان کراتینین خون نداشت (جدول ۴)، در حالی که در تیمار (آفلاتوکسین B۱× بنتونیت سدیم)، موش‌های صحرایی آلوده شده با آفلاتوکسین B۱، 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 B۱ (جدول ۵)، میزان کراتینین خون

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 معنی‌دار می‌باشد.

	آلانین آمینوترانسفراز mg/dl	آسپارتات امینوترانسفراز mg/dl	آلکالین فسفاتاز U/l
آفلاتوکسین B۱ (µg/kg)			
۰	۱۴۷/۴۹	۸۱/۲۵ [b]	۴۲۷/۲۱ [b]
۱۰۰	۱۶۲/۱۱	۸۹/۳۷ [a]	۷۲۳/۱۳ [a]
خطای استاندارد میانگین‌ها	۶/۷۷	۲/۵۱	۲۱/۰۶
سطح معنی‌داری	۰/۱۳۵۲	۰/۰۲۷۶	۰/۰۰۰۱
زردچوبه (mg/kg)			
۰	۱۶۰/۵۶	۸۹/۵۸ [a]	۶۷۵/۴۶ [a]
۱۰۰	۱۴۹/۰۴	۸۱/۰۴ [b]	۴۷۴/۸۸ [b]
خطای استاندارد میانگین‌ها	۶/۷۷	۲/۵۱	۲۱/۰۶
سطح معنی‌داری	۰/۲۳۶۳	۰/۰۲۰۹	۰/۰۰۰۱
بنتونیت سدیم (DMI)			
۰	۱۶۱/۵۹	۸۷/۹۱	۷۳۵/۷۵ [a]
۰/۲۵	۱۴۸/۰۱	۸۲/۷۰	۴۱۴/۵۸ [b]
خطای استاندارد میانگین‌ها	۶/۷۷	۲/۵۱	۲۱/۰۶
سطح معنی‌داری	۰/۱۶۴۲	۰/۱۵۰۵	۰/۰۰۰۱

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 معنی‌دار می‌باشد.

اثرات دو طرفه		کلسترول تام mg/dl	LDL mg/dl	کراتینین mg/dl	اسید اوریک mg/dl
بنتونیت سدیم	آفلاتوکسین B۱				
۰	۰	۶۵/۰۸	۲۸/۷۵	۰/۷۶	۲/۲۷
۰	۱۰۰	۷۳/۱۴	۳۵/۸۷	۰/۹۰	۲/۵۳
۱۰۰	۰	۷۹/۵۳	۳۱/۱۶	۰/۷۹۵	۲/۲۸
۱۰۰	۱۰۰	۸۴/۵۸	۳۶/۷۵	۰/۷۹۸	۱/۹۶
خطای استاندارد میانگین		۵/۵۸	۱/۲۳	۰/۰۴۴	۰/۱۷
سطح معنی‌داری		۰/۷۸۹۱	۰/۵۳۷۴	۰/۱۲۷۹	۰/۱۰۵۳
بنتونیت سدیم	آفلاتوکسین B۱				
۰	۰	۷۴/۷۴	۲۹/۸۳ [b]	۰/۷۶ [b]	۲/۲۴ [ab]
۰	۱۰۰	۷۸/۶۷	۳۹/۸۷ [a]	۰/۹۶ [a]	۲/۶۵ [a]
۰/۲۵	۰	۶۹/۸۷	۳۰/۰۸ [b]	۰/۷۹ [b]	۲/۳۱ [ab]
۰/۲۵	۱۰۰	۷۹/۰۵	۳۲/۷۵ [b]	۰/۷۳ [b]	۱/۸۴ [b]
خطای استاندارد میانگین		۵/۵۸	۱/۲۳	۰/۰۴۴	۰/۱۷
سطح معنی‌داری		۰/۶۴۱۵	۰/۰۰۴۹	۰/۰۰۶۸	۰/۰۱۶۴
زردچوبه	بنتونیت سدیم				
۰	۰	۶۵/۳۵	۳۳/۲۰	۰/۸۹	۲/۵۱
۰	۰/۲۵	۷۲/۸۶	۳۱/۴۱	۰/۷۷	۲/۲۹
۱۰۰	۰	۸۸/۰۵	۳۶/۵۰	۰/۸۳	۲/۳۸
۱۰۰	۰/۲۵	۷۶/۰۵	۳۱/۴۱	۰/۷۶	۱/۸۶
خطای استاندارد میانگین		۵/۵۸	۱/۲۳	۰/۰۴۴	۰/۱۷
سطح معنی‌داری		۰/۰۸۸۵	۰/۱۹۱۶	۰/۵۵۶۱	۰/۴۰۴۴

موش‌های صحرایی را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد ($p< ۰/۰۵$). درمان موش‌های مسموم شده با آفلاتوکسین B۱ به وسیله عصاره زردچوبه تأثیری بر میزان کراتینین نداشت، اما استفاده از بنتونیت سدیم به تنهایی و یا ترکیب با عصاره زردچوبه باعث کاهش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) کراتینین گردید. در تحقیق حاضر، نتایج اثرات متقابل دو طرفه و سه طرفه نشان داد (جدول ۴-۵) که آفلاتوکسین B۱، میزان اسید اوریک خون را افزایش

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.

اثرات سه طرفه			کلسترول تام mg/dl	LDL mg/dl	کراتینین mg/dl	اسید اوریک mg/dl
بنتونیت سدیم	زردچوبه	آفلاتوکسین B۱				
۰	۰	۰	۶۴/۶۶	۲۷/۶۶ [c]	۰/۷۲ [b]	۲/۰۹ [ab]
۰	۰	۱۰۰	۶۶/۰۵	۳۸/۷۵ [ab]	۱/۰۵ [a]	۲/۹۲ [a]
۰	۱۰۰	۰	۸۴/۸۱	۳۲ [bc]	۰/۸ [ab]	۲/۳۸ [ab]
۰/۲۵	۰	۰	۶۵/۵	۹/۸۳ [c]	۰/۷۹ [ab]	۲/۴۴ [ab]
۰/۲۵	۱۰۰	۰	۷۴/۲۵	۳۰/۳۳ [c]	۰/۷۹ [ab]	۲/۱۸ [ab]
۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۱/۳۰	۴۱ [a]	۰/۸۶ [ab]	۲/۳۸ [ab]
۰/۲۵	۰	۱۰۰	۸۰/۲۳	۳۳ [bc]	۰/۷۴ [b]	۲/۱۴ [ab]
۰/۲۵	۱۰۰	۱۰۰	۷۷/۸۶	۳۲/۵ [bc]	۰/۷۳ [b]	۱/۵۵ [b]
خطای استاندارد میانگین			۷/۹	۱/۷۵	۰/۰۶۲	۰/۲۴
سطح معنی‌داری			۰/۴۷۲۲	۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۲۲	۰/۰۳۵۱

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.

	کلسترول تام mg/dl	LDL mg/dl	کراتینین mg/dl	اسید اوریک mg/dl
آفلاتوکسین B۱ (µg/kg)				
۰	۷۲/۳۰	۲۹/۹۵ [b]	۰/۷۷	۲/۲۷
۱۰۰	۷۸/۸۶	۳۶/۳۱ [a]	۰/۸۴	۲/۲۵
خطای استاندارد میانگین‌ها	۳/۹۵	۰/۸۷	۰/۳۱	۰/۱۲
سطح معنی‌داری	۰/۲۴۷۷	۰/۰۰۰۱	۰/۱۱۰۹	۰/۸۶۹۲
زردچوبه (mg/kg)				
۰	۶۹/۱۱ [b]	۳۲/۳۱	۰/۸۳	۲/۴
۱۰۰	۸۲/۰۵ [a]	۳۳/۹۵	۰/۷۹	۲/۱۲
خطای استاندارد میانگین‌ها	۳/۹۵	۰/۸۷	۰/۳۱	۰/۱۲
سطح معنی‌داری	۰/۰۲۵۷	۰/۱۹۱۶	۰/۴۴۹۸	۰/۱۲۶۱
بنتونیت سدیم (DMI)				
۰	۷۶/۷	۳۴/۸۵ [a]	۰/۸۶ [a]	۲/۴۴ [a]
۰/۲۵	۷۴/۴۶	۳۱/۴۱ [b]	۰/۷۶ [b]	۲/۰۸ [b]
خطای استاندارد میانگین‌ها	۳/۹۵	۰/۸۷	۰/۳۱	۰/۱۲
سطح معنی‌داری	۰/۶۸۹۸	۰/۰۰۸۴	۰/۰۳۸۶	۰/۰۴۳۲

می‌دهد ولی از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد. در اثرات متقابل دوطرفه بنتونیت سدیم توانست اسید اوریک افزایش یافته در اثر مسمومیت با آفلاتوکسین B۱ 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 B۱ 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 B۱ می‌باشد.

در ارزیابی آسیب کبد، سنجش سطوح آنزیم‌هایی نظیر آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات 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، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز در سرم موش‌های آلوده شده با آفلاتوکسین B۱ 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

شـده با آفلاتوکسین B1 توانسـت میزان آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسـفاتاز سـرم را به طور معنی‌داری کاهش دهـد (p<۰/۰۵)، که با نتایج بدست آمده از تحقیقات پیشین همسو می‌باشد (۵،۱۳،۱۷). عصاره زردچوبه دارای ترکیبات شـیمیایی مختلفی می‌باشد که مهمترین آن‌ها کورکومین است. اگرچه کورکومین به سرعت تجزیه می‌گردد اما زمانی که به لیپیدها، لیپوزوم، آلبومین، سـورفاکتانت و بسیاری دیگر از ماکرومولکول‌ها متصل می‌گردد، به شـدت مقـدار تجزیه آن کاهش می‌یابـد (۲۱). اثرات درمانی کورکومیـن موجـود در زردچوبه احتمالاً از طریق عمل آنتی‌اکسـیدانی و ضدالتهابی و تنظیم آنزیم‌های کبدی می‌باشـد (۱۹). کورکومین می‌تواند تولید و ترشح صفرا را افزایش دهد و لذا می‌توان پیشنهاد نمود که کورکومین دفع صفـرا را افزایش داده و آن هم به نوبه خود پاکسـازی متابولیت‌های سمی را از بدن تسریع می‌نماید (۱۲). نتایج نشان داده است که مواد جاذب همانند بنتونیت سدیم از تخریب بافت کبد توسط آفلاتوکسین B1 جلوگیری می‌کنـد. این یافته‌ها نشـان داد که اتصال آفلاتوکسـین B1 به بنتونیت سدیم منجر به کاهش آفلاتوکسـین B1 در مجاری گوارشی می‌شود (۵). Arafa و همکاران در سـال ۲۰۰۵ گزارش کردند که زردچوبه با خاصیت آنتی‌اکسـیدانی 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 آفلاتوکسین B1 افزایش یافت، که با یافته‌های Abdel-Wahhab و همکاران در سـال ۲۰۱۰ مطابقـت دارد (۳). افزایش LDL در سـرم موش‌های آلوده شـده با آفلاتوکسین B1 احتمالاً با انسـداد 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 به آفلاتوکسین B1 گردید که با نتایج تحقیقات پیشین مطابقت دارد (۱). بنتونیت سـدیم، جذب LDL در روده را از طریق کاهش انتشـار در مجاری گوارشـی و یا اختلال در متابولیسـم نمک‌های صفراوی و جلوگیری از تشکیل میسل، مهار می‌کند و سبب کاهش میزان LDL سرم می‌گردد.

در مطالعـه حاضر میزان کراتینین سـرم موش‌هـای صحرایی در اثر مسمومیت با آفلاتوکسین B1 افزایش یافت که با یافته‌های Mathuria و Verma در سـال ۲۰۰۸ همسـو می‌باشـد (۱۷). کراتین پس از سنتز در کبد توسـط خون به عضلات رفته و تبدیل به کراتین فسـفات شده که به عنوان منبع انرژی عمل می‌کند. کراتینین در اثر کاتابولیسم کراتین بدست آمده و اگرچه هر دو با تصفیه گلومرولی وارد توبول‌های کلیه می‌شـوند اما کراتین باز جذب شده ولی کراتینین قادر به باز جذب نبوده و از طریق ادرار دفع می‌گردد. مقادیر افزایش یافته کراتینین سـرم موش‌های آلوده شده با آفلاتوکسـین ممکن است در اثر افزایش تبدیل فسفوکراتین عضلانی به کراتینین، آسـیب‌های گلومرولی و یا توبولی کلیه می‌باشد (۱۸). بررسی‌ها نشان داده اسـت که مقدار کراتین و کراتینین در خرگوش‌های آلوده شده با آفلاتوکسـین در اثر آسـیب 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<۰/۰۵) کراتینین گردید، که با نتایج بدست آمده ازتحقیقات پیشین همسو است (۵). میزان اسید اوریک خون در موش‌های صحرایی آلوده شده با آفلاتوکسین B1 در مقایسه با گروه شـاهد اگرچه معنی‌دار نبود (p=۰/۰۵۶) اما افزایش عـددی داشـت (۲/۹۲ در برابر ۲/۰۹ mg/dl) کـه این یافته‌ها با مطالعات پیشـین مطابقت دارد (۱۱). هر تغییر در میزان اسـید 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 بـا آفلاتوکسـین B1 در اثر درمان با عصاره زردچوبه و بنتونیت سـدیم به تنهایی تأثیر معنی‌داری در مقایسه با گروه آفلاتوکسین نداشت اما ترکیب آن‌ها مقدار اسیداوریک را به طور معنی‌داری کاهش داد که نشان دهنده اثر تقویتی این دو ماده با یکدیگر است.

بررسـی نتایج آنزیم‌های کبدی نشـان می‌دهد که عصاره زردچوبه و بنتونیت، بر مسـمومیت کبدی ناشـی از آفلاتوکسین B1 اثر مثبتی داشته اسـت، و ترکیب آن‌ها باعث کاهش بیشتر آنزیم‌های افزایش یافته در اثر آفلاتوکسـین می‌گردند. هم چنین ثابت شده است که عصاره زردچوبه در بهبود مسـمومیت کبدی ناشـی از بتا گالاکتوز آمین و آهن نیز تأثیر دارد و باعث کاهش نکروز و پراکسیداسـیون چربی در کبد می‌شـود (۱۶،۲۴). Abdel-Wahhab و همکاران در سال ۱۹۹۸ گزارش کردند که هیدرات سدیم کلسـیم آلومینوسـیلیکات و بنتونیت سـدیم در محافظت در برابر آفلاتوکسـین B1 و جلوگیری از اثرات سـمی آن‌ها مؤثر می‌باشند (۴). در پژوهش دیگری گزارش شده است که مکانیسمی برای اتصال آفلاتوکسین B1 به بنتونیت سدیم وجود دارد که طبق آن، ساختار شیمیایی آفلاتوکسین B1 در ایجـاد اتصـالات قـوی بین یون‌های موجود در بنتونیت سـدیم و بتاکربونیل موجود در آفلاتوکسین B1 دخیل می‌باشد (۲۰).

مطالعه حاضر بیانگر آن اسـت که احتمـالاً ترکیب عصاره زردچوبه و بنتونیت سـدیم با تقویت اثر یکدیگر تأثیر بهتری از اسـتفاده هر کدام به تنهایی درآسـیب‌های کبدی و کلیوی ناشـی از آفلاتوکسین B1 در موش صحرایی دارند.

تشکر و قدردانی

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

References

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Arafa, H.M. (2005) Curcumin attenuates diet-induced hypercholesterolemia in rats. Medical science monitor: Int Med J Exp Clin Res. 11: 228-34.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. El-Agamy, D. S. (2010) Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B1-induced liver injury in rats. Arch Toxicol. 84: 389-96.
14. Lal, J. (2012) Turmeric, curcumin and our life: a review. Bull Environ Pharmacol Life Sci. 1: 11-17.
15. 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.
16. Lin, S. C. (1996) Protectine and trapeutic effect of Curcumea longa on B-D-Galactoseamin induced liver damage. Pharmacol Res. 10: 131-5.
17. Mathuria, N., Verma, R. J. (2008) Ameliorative effect of curcumin on aflatoxin-induced toxicity in serum of mice. Acta Pol Pharm. 65: 339-343.
18. Mc Lauchlan, D. M. (1988) Creatinine, urate and urea. In: Varleys Practical Clinical Biochemistry. Gowenlock, A.D. (ed.). Heinemann Medical Books. London. p. 350.
19. Nayak, S., Sashidhar, R. (2010) Metabolic intervention of aflatoxin B1 toxicity by curcumin. J Ethnopharmacol. 127: 641-4.
20. Phillips, T. D. (1999) Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease. Toxicol Sci. 52: 118-26.
21. 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]

[1]*Department of Animal Science, University of Birjand, Birjand, Iran*
[2]*Department 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 bentonit (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**