بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی دانه‌ی کتان و تأثیر آن بر متابولیسم و سیستم ایمنی گوسفند با استفاده از مدل برون‌تنی و درون‌تنی

جواد امینی[۱]، محسن دانش مسگران[۲*]، سیّد علیرضا وکیلی[۲]، علیرضا هروی موسوی[٤]

۱.دانشجوی دکتری تغذیه‌ی نشخوارکنندگان، گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد ۲. به ترتیب استاد و دانشیار تغذیه‌ی دام گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد ۲. پژوهشگر سازمان تحقیقات سرطان بریتیش کلمبیای کانادا و دانشیار سابق فیزیولوژی دام گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد

نویسنده مسئول: danesh@um.ac.ir

چکیده

مطالعه‌ای برای بررسی تأثیر افزودن دانه‌ی کتان فرآوری شده به جیره‌ی غذایی برّه‌های پرواری بر وضعیت آنتی‌اکسیدانی، متابولیسم و سیستم ایمنی انجام شد. بیست و هشت رأس برّه‌ی بلوچی ٦ ماهه به دو گروه تقسیم و به مدت ٦ هفته با جیره‌ی شاهد (فاقد کتان)، یا جیره حاوی ۱۰ درصد دانه‌ی کتان تغذیه شدند. در ابتدای دوره‌ی آزمایش و روز ٤۲، نمونه‌ی خون از هر یک از برّه‌ها برای تعیین فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون شامل: گلوکز، پروتئین تام (TP)، تری‌گلیسریدها (TG)، کراتینین سرم، نیتروژن اوره‌ای خون (BUN)، سوپراکسید دسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)، کاتالاز (CAT) و ترکیبات واکنش دهنده با تیوباربیتوریک اسید (TBARS) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم (TAC) اخذ شد. همچنین، پاسخ ایمنی همورال پس از تزریق زیرجلدی اووآلبومین در روز نخست و ۱۵ آزمایش، و اندازه‌گیری غلظت ایمونوگلوبولین G و نسبت آلبومین به گلبولین سرم در پایان دوره، بررسی شد. پاسخ ایمنی سلولی لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها پس از جداسازی سلول‌ها از خون محیطی، در شرایط درون‌تنی بررسی شد. با تغذیه‌ی دانه‌ی کتان، غلظت آنزیم‌های SOD و GPx خون به طور معنی‌داری افزایش یافت (به ترتیب ۱۱۲۰/٦٦، ۱۰۱۳/۲۲ و ٦٥/۲٦، ٤٦/۹۷ واحد به ازای گرم هموگلوبین، برای شاهد و تیمار کتان). و از سوی دیگر غلظت TBARS کاهش یافت (P <۰/۰۵). همچنین افزودن دانه‌ی کتان به جیره منجر به بهبود بهبود متابولیسم، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم خون و پاسخ ایمنی همورال و سلولی شد (P <۰/۰۵).

واژه های کلیدی: برّه بلوچی، دانه‌ی کتان، پاسخ ایمنی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی خون

مقدمه

دانه‌ی کتان (*Linum usitatissimum*) که از دانه‌های روغنی به شمار می‌رود؛ غنی‌ترین منبع گیاهی اسیدهای چرب غیر اشباع امگا-۳ لینولنیک (بیش از ۵۰ درصد اسیدهای چرب دانه) و یکی از منابع سرشار از ترکیبات شبه‌استروژنی از جمله لیگنان‌ها است. دانه‌ی کتان به‌ویژه غنی از لیگنان دی‌گلیکوزید سکوایزولاریسی‌رزینول[۱] (SDG) می‌باشد، که پیش‌ساز لیگنان‌های پستانداران، اِنترودیول[۲] و اِنترولاکتون[۳]، است؛ این لیگنان‌ها در بدن حیوانات خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، تنظیم‌کننده‌ی سیستم ایمنی را بروز می‌دهند (۵).

[1] Secoisolariciresinol Diglycoside
[2] Entrolactone
[3] Entrodiol

اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه (PUFA) جیره می‌توانند ترکیب و عملکرد سلول‌های سیستم ایمنی را با سرکوب تزاید[1] لنفوسیت‌ها، فعالیت سلول‌های کشنده‌ی طبیعی[2]، برخی از عملکردهای ماکروفاژی و تولید سیتوکین‌های التهابی توسط ماکروفاژها تنظیم کنند. تجویز اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه شده به شکل دانه‌ی کتان به گاوهای شیری، سبب حفظ سطح تزاید لنفوسیت در دماهای محیطی بالا می‌شود (۲).

مطالعات نشان می‌دهد افزودن دانه‌ی کامل کتان، که منبع غنی اسیدهای چرب امگا-۳ است، منجر به تغییر در ترشح سیتوکین‌ها و بهبود پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال، در گاوها و میش‌های شده‌است (۱ و ۲). این مطالعه به منظور بررسی اثر تغذیه‌ی دانه‌ی کتان فرآوری‌شده بر عملکرد، پاسخ ایمنی سلولی و هومورال و برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون برّه‌های بلوچی صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

دانه کتان کامل تهیه و تحت تیمارهای اکسترود نمودن (۱۲ ثانیه در ۱۵۰ درجه سانتیگراد)، تابش میکروویو (در اجاق مایکروفر خانگی به مدت ۱۲۰ ثانیه با قدرت ۹۰۰ وات)، آسیاب نمودن (۲ میلی‌متر) قرار گرفت. سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های کتان فرآوری شده، پس از استخراج ترکیبات فنولی (٦)، به روش میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH[3] و همچنین، روش توان احیای آهن[4] (FRAP) و بر مبنای استاندارد ترولکس (Trolox) ارزیابی شد:

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = \frac{(\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل})}{(\text{جذب شاهد} - \text{جذب کنترل})} * ۱۰۰$$

که در این ضابطه جذب کنترل: جذب محلول ۰/۱ میلی‌مولار $DPPH^{\cdot}$ در متانول در ۵۱۹ نانومتر؛ جذب نمونه: جذب نمونه مورد بررسی همراه با محلول ۰/۱ میلی‌مولار $DPPH^{\cdot}$ در متانول؛ جذب شاهد: جذب حلال متانول خالص، می‌باشد.

همچنین محتوای کل ترکیبات فنلی نمونه‌های کتان فرآوری شده، به روش فولین شیکالتو (Folin–Ciocalteu) برآورد شد. از گالیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد و نتایج به صورت معادل میلی‌گرم گالیک اسید (Gallic acid equivalent) در گرم ماده خشک، بیان گردید (۵).

آزمایشی به مدت ٤۲ روز در واحد گوسفنداری ایستگاه تحقیقات دامپروری دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شد. سی رأس برّه‌ی (نر و ماده) بلوچی ٦ ماهه در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی به دو گروه (شاهد و تیمار جیره‌ی حاوی کتان فرآوری شده)، تقسیم شدند. در ابتدای دوره‌ی آزمایش و روز ٤۲، نمونه‌ی خون از هر یک از برّه‌ها برای تعیین متابولیت‌های خون اخذ شد. سنجش فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون شامل گلوکز، پروتئین تام، تری‌گلیسرید، کراتینین، نیتروژن اوره‌ای، آلبومین و گلبولین سرم به روش رنگ‌سنجی و با استفاده از کیت‌های تجاری انجام شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسمای خون با روش

[1] Proliferation
[2] Natural killer cells
[3] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay
[4] Ferric reducing ability of plasma

سطح مالون دی آلدئید (MDA) سرم خون، به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها، بر پایه واکنش با تیوباربیتوریک اسید (TBARS) انجام شد (٤). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی خون، شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) و کاتالاز (CAT)، در همولیزات خون، توسط کیت‌های تجاری اختصاصی (Fortress Diagnostics Ltd.، بریتانیا) اندازه‌گیری شد. همچنین غلظت آلبومین سرم به روش اسپکتروفتومتری، آنالیز شد. تعیین نسبت آلبومین به گلبولین‌های سرم خون به روش الکتروفورز موئین منطقه‌ای (Sebia Capillarys™ 2، ایالات متحده) انجام شد. پاسخ ایمنی همورال با تزریق زیرجلدی اووآلبومین در روز نخست و ١٥ آزمایش و ارزیابی سطح ایمونوگلبولین G سرم خون روز ٤٢ با کیت اختصاصی گوسفند به روش ELISA، ارزیابی شد (١). وضعیت ایمنی سلولی نیز پس از جداسازی سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی[1] (PBMC) با استفاده از فایکول[2] جداسازی و در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا خون هپارینه با ١٠ml محیط کشت RPMI-1640 رقیق شد. خون رقیق شده به آرامی بر روی فایکول (با حجم برابر خون رقیق نشده) اضافه شد. مجموع خون رقیق شده و فایکول با سرعت ٨٠٠ *g* به مدت ١٥ دقیقه سانتریفوژ گردید. سلول های PBMC که در حد فاصل فایکول و خون رقیق شده قرار گرفته بود به آرامی جمع‌آوری گردید. به دست آمده به منظور حذف فایکول همراه آن، با محیط کشت RPMI-1640 مخلوط و با سرعت ٤٥٠ *g* به مدت ١٠ دقیقه سانتریفوژ گردید. سلول‌های حاصل مجدداً با محیط کشت RPMI-1640 مخلوط و این بار به منظور حذف پلاکت همراه PBMC با سرعت ٢٠٠ *g* به مدت ١٠ دقیقه سانتریفوژ گردید. تعداد و میزان سلول‌های تک‌هسته ای خون محیطی به دست آمده، با استفاده از رنگ تری پان بلو تعیین شد. سپس در محیط کشت تعداد 10^7 سلول PBMC برای هر کدام از فلاسک T25 به‌همراه محیط کشت و آنتی‌بیوتیک و FBS اضافه گردید. میزان نوتروفیل‌ها بررسی شد.

نتایج

محتوای کل ترکیبات فنلی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی برای دانه کتان بدون فرآوری، اکسترود شده و تحت تابش میکروویو به ترتیب ٣/٧، ٢/٦ و ٢/٨ معادل میلی‌گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک تعیین شد. حرارت دادن سبب کاهش معنی‌دار در محتوای کل ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول شد (P <٠/٠٥).

افزودن دانه‌ی کتان فرآوری شده به جیره، سبب کاهش معنی‌دار (P <٠/٠٥) در غلظت آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز خون و همچنین، مالون دی آلدئید سرم و از سوی دیگر افزایش معنی‌دار (P <٠/٠٥) ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما شد (جدول ٢). غلظت مالون دی آلدئید سرم، که از شاخص‌های استرس اکسیداتیو است، و تحت تنش افزایش می‌یابد (٣). دامنه‌ی طبیعی غلظت آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز خون گوسفندان دنبه‌دار ایرانی به ترتیب ٨٠/٩١ ± ٩٨٤/٥٨، ٧/٥٤ ± ١٩٣/٥٤ واحد به ازای گرم هموگلوبین و ٨/٤٨ ± ١١٢/٢١ کاتال به ازای گرم هموگلوبین و غلظت مالون دی آلدئید سرم ٠/٠٠٩ ± ٠/٥٧ نانومول در میلی‌لیتر گزارش شده‌است (٤). افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما با مصرف دانه‌ی کتان که حاوی سطوح بالایی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است مرتبط است (٢). افزایش غلظت نیتروژن اوره‌ای خون و کراتینین، در نتیجه‌ی برداشت اسیدهای آمینه از عضلات به منظور گلوکونئوژنز، در حیوانات تحت تنش گرمایی مشاهده شده است (٨). در حالیکه با افزودن دانه‌ی کتان به جیره‌ی میش‌ها، بهبود متابولیسم، بهبود پاسخ ایمنی و تنظیم دمایی بدن و تعدیل

[1] Peripheral Blood Mononuclear Cell
[2] Ficoll-Hypaque

اثرات تنش گرمایی گزارش شده است (۵). در پژوهش حاضر نیز بهبود پاسخ‌های ایمنی همورال با افزایش تیتر ایمونوگلوبولین G سرم مشاهده شد (P <۰/۰۵). کاهش نسبت آلبومین به گلبولین سرم، همراه با عدم تغییر در غلظت آلبومین، هم به معنی افزایش غلظت گلبولین‌های سرم خون است. بنابراین به طور کلی، اثرات افزودن دانه‌ی کتان به جیره بر پاسخ ایمنی و فراسنجه‌های بیوشیمیایی برّه‌ها مورد مطالعه، در توافق با پژوهش‌های پیشین، مثبت ارزیابی می‌گردد.

جدول ۲- تأثیر تغذیه‌ی جیره‌ی حاوی دانه‌ی کتان بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون برّه‌ها در پایان آزمایش

فراسنجه	شاهد	کتان کامل	تیمار			خطای استاندارد میانگین
			اکسترود شده	میکروویو	آسیاب شده	
گلوکز (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۶۰/۶۰	۶۳/۵۲	۶۵/۸۸	۶۲/۵۲	۶۱/۶۱	۲/۵۳۱۲
پروتئین تام سرم (گرم در لیتر)	۷۲/۰۹	۷۱/۳۹	۷۲/۴۷	۷۲/۰۹	۷۱/۴۰	۱/۶۱۶۸
تری‌گلیسرید (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۳۲/۰۴	۳۱/۰۷	۳۱/۲۲	۳۴/۴۵	۲۸/۶۵	۳/۱۶۱۴
کراتینین (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۰/۷۲[a]	۰/۶۰[b]	۰/۷۰[a]	۰/۷۰[a]	۰/۶۲[b]	۰/۰۲۵۲
نیتروژن اوره‌ای خون (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۳۲/۸۴[a]	۲۶/۱۸[b]	۲۵/۰۰[b]	۲۴/۳۷[b]	۳۶/۶۵[b]	۱/۲۲۹۹
سوپراکسید دسموتاز خون (واحد به ازای گرم هموگلوبین)	/۶۶[a]	/۲۲[b]	/۳۱[a]	/۳۱[a]	/۵۷[b]	۴۵/۷۹۸۰
گلوتاتیون پراکسیداز خون (واحد به ازای گرم هموگلوبین)	۶۵/۲۶[a]	۴۶/۹۷[b]	۷۷/۵۸[a]	۷۱/۵۸[a]	۴۰/۶۵[b]	۶/۴۶۰۳
کاتالاز خون (کاتال به ازای گرم هموگلوبین)	۱۱۰/۸۵	۱۳۰/۰۶	۱۲۳/۴۴	۱۲۱/۶۸	۱۱۹/۲۳	۹/۴۹۸۸
مالون دی آلدئید سرم (نانومول در میلی‌لیتر)	۱/۲۹[a]	۰/۹۵[b]	۱/۲۰[a]	۱/۳۱[a]	۰/۹۴[b]	۰/۱۱۲۴
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما (میلی‌مول معادل ترولکس در لیتر)	۸۹/۲۸[b]	۹۶/۳۰[a]	۹۷/۳۱[a]	۹۷/۳۱[a]	۸۸/۲۷[b]	۲/۶۳۰۰
آلبومین سرم (گرم در لیتر)	۴۱/۰۶	۳۴/۹۵	۳۷/۹۵	۳۷/۴۶	۳۸/۵۵	۲/۷۱۶۴
نسبت آلبومین به گلبولین سرم	۱/۳۷۶[a]	۰/۹۵۹[b]	۱/۰۲۶[b]	۱/۰۵۶[b]	۱/۲۷۸[a]	۰/۱۱۸۳
ایمونوگلوبولین G سرم (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	۱۴/۰۳[b]	۱۶/۷۶[a]	۱۵/۳۸	۱۶/۵۹	۱۴/۲۰	۱/۱۶۸۳

[a, b]: حروف غیر مشابه در هر ردیف نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

منابع

1. Janero, D.R. 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radical Biology and Medicine. 9: 515-540.
2. Landete, J. 2012. Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. Food Research International. 46: 410-424.
3. Marai, I.F.M., A.A. El-Darawany, A. Fadiel and M.A.M. Abdel-Hafez. 2007. Physiological traits as affected by heat stress in sheep—a review. Small Ruminant Research. 71: 1-12.
4. Nazifi, S., N. Ghafari, F. Farshneshani, M. Rahsepar and S.M. Razavi. 2010. Reference values of oxidative stress parameters in adult Iranian fat-tailed sheep. Pakistan Veterinary Journal. 30: 13-16.
5. Pérez-Jiménez, J., S. Arranz, M. Tabernero, M.E. Díaz-Rubio, J. Serrano, I. Goñi and F. Saura-Calixto. 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. Food Research International. 41(3): 274-285.

Antioxidant activity of linseed products: effects on metabolism and immune responses using in vitro and in vivo model systems

Abstract

A study was conducted to investigate the effects of processed linseed supplementation to the diet of fattening lambs under heat stress. Twenty-eight 6-month-old Baluchi lambs were randomly allocated into either treatment (10% processed linseed) or Control (no linseed) groups and fed for 6 weeksAt the beginning of the experiment (0 d) and on 42 d, Individual blood samples (10 mL) were collected from the jugular vein and analyzed for blood biochemical parameters (*i.e.*, glucose, total protein (TP), triglycerides (TG), creatinine, blood urea nitrogen (BUN), blood superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and total antioxidant capacity (TAC) of serum). The humoral immune response was evaluated by measurement of immunoglobulin G (IgG) antibody titer following subcutaneous immunization with 1 ml of 4 mg/mL ovalbumin OVA antigen on 0 and 15 d. Serum albumin to globulin (A/G) ratio was determined. Blood levels of SOD and GPx enzymes activities were significantly higher (1120.66 vs 1013.22 and 65.26 vs 46.97 U/g Hb, in the control vs treatment group, respectively). Furthermore, the concentration of TBARS decreased ($P<0.05$). Linseed supplementation improved metabolism, blood serum antioxidant capacity and the humoral and cellular immune response ($P<0.05$).

Keywords: Baluchi lamb, linseed, heat stress, immune response, blood total antioxidant status