

اثر پسماند گیاهان دارویی بر فراسنجه‌های خونی، صفات کیفی تخم مرغ و پاسخ‌های ایمنولوژیک مرغ‌های تخم‌گذار تغذیه شده با نسبت‌های متفاوت اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳

سیده اسماء موسوی^۱، سید امیرحسین مهدوی^{۲*}، احمد ریاسی^۲ و حسین حسینی^۳

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۱

^۱ کارشناس ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

^۲ دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

^۳ دانشجوی دکتری گیاهان دارویی و مسئول گروه تحقیقات کشاورزی، شرکت داروسازی باریج اسانس

*مسئول مکاتبه: Email: mahdavi@cc.iut.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: استفاده از پسماند گیاهان دارویی می‌تواند در جیره‌های مستعد پراکسیداسیون لیپیدی مفید واقع شود. **هدف:** این آزمایش به منظور بررسی اثر سطوح مختلف مخلوط پسماند گیاهان دارویی (تایموسولگاریس، منتا پیریتا، رزمارینوس افیسینالیس و آنتوم گراوئولنس) در جیره‌های غذایی با نسبت‌های متفاوت اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ بر فراسنجه‌های خونی، پایداری اکسیداتیو، صفات کیفی تخم مرغ و پاسخ‌های ایمنی مرغ‌های تخم‌گذار انجام پذیرفت. **روش کار:** در این پژوهش از ۱۲۰ قطعه مرغ تخم‌گذار لگهورن سویه‌های W-36 (در سن ۴۰ هفتگی) استفاده شد. مرغ‌ها به صورت تصادفی بین ۶ تیمار آزمایشی، متشکل از ۴ تکرار و ۵ قطعه مرغ در هر تکرار و در قالب یک آزمایش فاکتوریل ۲×۳ بر پایه طرح کاملاً تصادفی اختصاص یافتند. **نتایج:** استفاده از جیره‌های با نسبت پایین اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳، موجب افزایش غلظت مالون دی‌آلدهید سرم و شاخص رنگ زرده تخم‌مرغ ($P < 0.05$) و نیز کاهش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ($P < 0.01$)، غلظت تری‌گلیسرید پلاسما ($P < 0.05$) و کلسترول زرده تخم‌مرغ ($P < 0.01$) گردید. تغذیه پرندگان با جیره‌های حاوی پسماندهای گیاهی، شمار لنفوسیت‌ها، تیترا آنتی‌بادی علیه ویروس بیماری نیوکاسل و نیز شاخص رنگ زرده، استحکام پوسته تخم‌مرغ و واحد‌ها را به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) بهبود بخشید. شمار هتروفیل‌ها، میزان کلسترول و تری‌گلیسرید پلاسما ($P < 0.05$) و فعالیت آنزیم‌های گلوتامیک پیرووات ترانس آمیناز و آلکالین فسفاتاز در سرم پرندگانی که باجیره حاوی پنج درصد مخلوط پسماند تغذیه شده بودند کاهش یافت ($P < 0.05$). **نتیجه‌گیری نهایی:** هرچند تغذیه نسبت پایین اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ موجب کاهش سطح کلسترول و تری‌گلیسرید پلاسما، کلسترول تخم‌مرغ و فعالیت آنزیم‌های کبدی گردید، اما امکان بروز فساد اکسیداتیو را افزایش داد. با این وجود بهره‌گیری از سطح پنج درصد پسماند گیاهان دارویی توانست موجب بهبود شاخص‌های آنزیمی سلامت کبد، پاسخ‌های ایمنی سلولی و استحکام پوسته تخم‌مرغ شود.

واژگان کلیدی: اسیدهای چرب، پاسخ‌های ایمنی، پسماند گیاهان دارویی، فراسنجه‌ها خونی، کیفیت تخم‌مرغ، مرغ تخم‌گذار

مقدمه

اسیدهای چرب از مهمترین ترکیبات موجود در غشاهای بیولوژیکی بوده و با توجه به وجود یا نبود پیوند دوگانه، به ترتیب به اسیدهای چرب غیراشباع و اشباع دسته بندی می‌شوند. اسیدهای چرب غیر اشباع، سهم عمده‌ای را در سیالیت غشا به عهده دارند (جامپ ۲۰۰۲). اسیدهای چربی که بیشتر از یک پیوند دوگانه داشته باشند را اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه می‌گویند. اسیدهای چرب بر اساس اولین پیوند دوگانه نسبت به گروه متیل به زیردسته هایی نظیر امگا-۳، امگا-۶ و امگا-۹ تقسیم می‌شوند. ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) مهمترین و اثرگذارترین اسیدهای چرب امگا-۳ با چند پیوند دوگانه هستند که به مقدار زیادی در روغن ماهی وجود دارند. اسیدهای چرب امگا-۳ وظایفی مانند بهبود شاخص‌های سلامت سیستم قلبی-عروقی (سیدیگویی و همکاران ۲۰۰۸)، کاهش غلظت تری‌گلیسریدها، کلسترول و LDL سرم و نیز افزایش غلظت HDL خون (چریان و حیات ۲۰۰۹)، اثرات ضد التهابی (جامپ ۲۰۰۲)، رشد مطلوب مغز و بهبود فعالیت‌های ذهنی (گادوس ۲۰۰۸) و تعدیل سیستم ایمنی (کن و فرنانتز ۲۰۰۱) را بر عهده دارند. به دلیل تاثیرات مثبتی که استفاده از اسیدهای چرب امگا-۳ بر شاخص‌های سلامت انسان دارند، در سال‌های اخیر تحقیقات فراوانی به منظور توسعه محصولات غنی شده حیوانی نظیر گوشت و تخم مرغ غنی شده با این منابع اسیدچرب انجام شده است. چرا که پروفیل اسیدهای چرب این محصولات، به ویژه اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه، به خوبی می‌تواند تحت تاثیر پروفیل اسیدهای چرب جیره پرندگان تغییر کند (لويس و همکاران ۲۰۰۰). از سوی دیگر، مکمل نمودن خوراک پرندگان با منابع اسیدهای چرب امگا-۳ و به‌خصوص اسیدهای چرب

بلند زنجیر بسیار غیر اشباع موجود در روغن ماهی، به طور کلی خطر توسعه فساد اکسیداتیو را به شکل قابل ملاحظه‌ای در خون، بافت‌ها و نیز محصولات پرندگان افزایش می‌دهند (گالدین و همکاران ۲۰۰۷). این امر بهره‌گیری از منابع آنتی‌اکسیدانی همچون اسانس‌ها و یا فرآورده‌های گیاهان دارویی که دارای قدرت‌های آنتی-اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای، به منظور به حداقل رساندن سطح اکسیداسیون لیپیدی را دارا می‌باشند، بسیار ضروری می‌سازد (بوتسوگلو و همکاران ۲۰۰۵). بهره‌گیری از گیاهانی نظیر آویشن، رزماری، نعناع فلفلی و شوید به دلیل فراوانی، سهولت دسترسی و دارا بودن خواص قابل ملاحظه آنتی‌اکسیدانی (یانگ-شاین و همکاران ۱۹۹۹)، کاهندگی چربی خون (کوبو ۱۹۹۳)، محرک سیستم ایمنی (آواد و همکاران ۲۰۱۰) و بهبود شاخص‌های سلامت کبد (فرناندز و همکاران ۱۹۹۴) می‌توانند به شکل ویژه‌ای مورد توجه قرار گیرند. بر اساس مطالعات صورت گرفته در رابطه با بروز اثرات بیولوژیک بسیاری از گیاهان دارویی، استفاده از مخلوط آنها به دلیل بروز اثرات هم‌افزایی، پتانسیل بسیار قوی‌تری را نسبت به استفاده از تک تک آنها نشان داده است (آلمیدا و همکاران ۲۰۱۱). در این رابطه نتایج مطالعات قبلی نشان داده است که غلظت کلسترول و کل لیپید سرمی بلدرچین‌های ژاپنی تغذیه شده با گل‌های گیاهان بابونه و آویشن به‌صورت معنی‌داری کاهش یافته (جندی سالوا و زولی ۲۰۰۳) و استفاده از مخلوط عصاره گیاهان مرزه، سنجد و نعناع موجب تقویت سیستم ایمنی هومورال جوجه‌های گوشتی شده است (لاوینیا و همکاران ۲۰۰۹). از آنجا که در طی استخراج مواد موثره گیاهی مقدار قابل ملاحظه‌ای از مواد زیست فعال در پسماندهای دورریز، باقی مانده و با عنایت به قابلیت تغذیه سطوح حاشیه‌ای فیبر در پرندگان بالغ تخمگذار، می‌توان از این

هفتگی قرار داشتند. جیره‌های آزمایشی بر اساس توصیه‌های کاتالوگ سویه مربوطه به‌صورت هم‌انرژی و هم‌پروتئین تنظیم گردیدند. برای این منظور در ابتدای آزمایش، از مواد خوراکی مورد استفاده در جیره‌های آزمایشی (ذرت، کنجاله سویا، سبوس و مخلوط پسماند) به‌طور تصادفی نمونه‌برداری شد و آنالیز شیمیایی آنها بر اساس روش‌های توصیه شده (AOAC ۲۰۰۶) انجام پذیرفت. جیره‌ها هر هفت روز یکبار تهیه و در سطل‌های درب‌داری که برای هر قفس به‌طور جداگانه در نظر گرفته شده بودند ریخته و در اختیار مرغ‌ها قرار گرفت. آب و خوراک به صورت آزاد در اختیار مرغ‌ها قرار داشت و برنامه نوری نیز به صورت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت خاموشی در نظر گرفته شد.

منابع ارزشمند و ارزان دارویی در جیره‌های با نسبت‌های بالای اسیدهای چرب امگا-۳، که احتمال فساد اکسیداتیو بالاتری دارند، به خوبی استفاده نمود. بنابراین هدف از آزمایش حاضر، بررسی اثر سطوح مختلف مخلوط پسماند گیاهان آویشن، رزماری، شویید و نعناع فلفلی در جیره‌های با نسبت‌های مختلف اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ بر تغییرات چربی‌های خونی، آنزیم‌های کبدی، میزان مالون دی‌آلدئید موجود در سرم، شمارش تفکیکی گلبول‌های سفید، پاسخ‌های ایمنی هومورال و صفات کیفی تخم‌مرغ مرغ‌های تخم‌گذار بود.

مواد و روش‌ها

کلیات طرح، تیمارهای آزمایشی و جیره‌های غذایی

در پژوهش حاضر تعداد ۱۲۰ قطعه مرغ تخم‌گذار لگهورن سفید سویه‌های-لاین W36 در قالب یک آزمایش فاکتوریل ۳×۲ بر پایه طرح کاملاً تصادفی با دونسبت اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ (۱۵/۱۲ و ۱/۶۵) و سه سطح مخلوط پسماند گیاهان دارویی (صفر، ۲/۵ و ۵ درصد جیره) و با ۴ تکرار (۵ پرنده در هر تکرار) مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). مخلوط پسماند شامل ترکیب بقایای حاصل از فرآیند اسانس‌گیری برگ و ساقه چهار گیاه دارویی آویشن، رزماری، شویید و نعناع فلفلی به نسبت مساوی بود که به دلیل پتانسیل قابل ملاحظه آنتی‌اکسیدانی و نیز قابلیت دسترسی به این منابع ارزشمند انتخاب گردیدند. جهت آغاز آزمایش اصلی، رکوردبرداری مقدماتی به مدت ۱۰ روز، به‌منظور بررسی تولید تخم‌مرغ و عادت‌پذیری مرغ‌ها در نظر گرفته شد. سپس ۲۴ قفس در محدوده تولید یکسان انتخاب و به‌طور تصادفی بین تیمارها توزیع گردیدند. طول دوره آزمایش ۷۰ روز بود و مرغ‌ها در شروع آزمایش در سن ۴۰

جدول ۱- مواد خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره های پایه

Table 1- Composition and nutrient content of basal diets

مواد خوراکی (%)	بدون پسماند	۲٪/۵ پسماند	۵٪ پسماند
Ingredients (%)	Without byproduct	2.5% byproduct	5% byproduct
ذرت	55.47	55.54	55.60
Corn			
کنجاله سویا	21.94	22.54	23.15
Soybean meal			
روغن (سویا یا ماهی)	3.00	3.00	3.00
Oil (soybean or fish)			
پسماند ^۱	0.00	2.50	5.00
Byproduct ¹			
سبوس گندم	6.26	3.13	0.00
Wheat bran			
مونوکلسیم فسفات	1.58	1.59	1.59
Monocalcium phosphate			
کربنات کلسیم	10.56	10.52	10.48
Calcium carbonate			
نمک طعام	0.27	0.27	0.27
Common salt			
بیکربنات سدیم	0.20	0.20	0.20
NaHCO ₃			
ال لیزین هیدرو کلراید	0.02	0.02	0.02
L-Lysine			
دی ال متیونین	0.17	0.17	0.17
DL-Methionine			
ال ترئونین	0.02	0.02	0.02
L-Threonine			
مکمل معدنی و ویتامینه ^۲	0.50	0.50	0.50
Vitamin and Mineral premix ²			
ترکیب شیمیایی			
Nutrient composition			
انرژی قابل سوخت و ساز (کیلوکالری بر کیلوگرم)	2700	2700	2700
Metabolizable energy (Kcal/kg)			
پروتئین خام (درصد)	15.25	15.25	15.25
Crude protein (%)			
فیبر خام (درصد)	3.44	3.72	3.99
Crude fiber (%)			
کلسیم (درصد)	4.35	4.35	4.35
Calcium (%)			
فسفر قابل دسترس	0.46	0.46	0.46
Available phosphorous (%)			
لیزین (درصد)	0.78	0.78	0.78
Lysine (%)			

0.43	0.43	0.43	متیونین (درصد)
			Methionine (%)
0.67	0.67	0.68	متیونین+سیستین (درصد)
			Methionine + Cysteine (%)
0.59	0.59	0.59	ترئونین (درصد)
			Threonine (%)

^۱مواد مغذی آنالیز شده برای مخلوط پسماند: انرژی قابل متابولیسم ۱۰۳۷ کیلوکالری بر کیلوگرم (با بهره‌گیری از روش سیبالد ۱۹۸۶)، ۲/۹۵ درصد چربی خام، ۶/۸ درصد پروتئین خام، ۳۲/۶۶ درصد فیبر خام، ۶/۲۶ درصد خاکستر، ۰/۷۸۱ درصد کلسیم، ۰/۲ درصد فسفر.

^۱Analyzed composition of the byproduct mixture: AME_n= 1073 kcal/kg; Crude protein= 6.8%; Crude fiber=33.66%; Fat= 2.95%; Total phosphorus= 0.2%; Calcium= 0.781.

^۲مقدار مواد معدنی و ویتامین تامین شده توسط مکمل در هر کیلو خوراک: A: ۸۸۰۰ IU، D3: ۲۵۰۰ IU، E: ۱۱ IU، K3: ۲/۲ میلی‌گرم؛ B1: ۱/۵ میلی‌گرم؛ B2: ۴ میلی‌گرم؛ B3: ۸ میلی‌گرم؛ B5: ۲۵ میلی‌گرم؛ B6: ۲/۵ میلی‌گرم؛ B9: ۰/۵ میلی‌گرم؛ B12: ۰/۰۱ میلی‌گرم؛ H2: ۰/۱۵ میلی‌گرم؛ کولین کلراید، ۴۶۶ میلی‌گرم؛ آنتی‌اکسیدان، ۱ میلی‌گرم. اکسید منکنز، ۷۵ میلی‌گرم؛ اکسید روی، ۶۵ میلی‌گرم؛ سولفات آهن، ۷۵ میلی‌گرم؛ سولفات مس، ۶ میلی‌گرم؛ یدات کلسیم، ۰/۸۷۵ میلی‌گرم؛ سلنیوم، ۰/۲ میلی‌گرم.

^۲Vitamin and mineral premix provided the following per kilogram of diet: vitamin A (from vitamin A acetate), 8,800 IU; cholecalciferol, 2,500 IU; riboflavin, 4 mg; nicotinamide, 35 mg; calcium pantothenate, 8 mg; menadione, 2.2 mg; folic acid, 0.50 mg; thiamine, 1.5 mg; pyridoxine, 2.5 mg; choline chloride, 466 mg; and ethoxyquin, 1 mg; Mn, 75 mg; Zn, 65 mg; Fe, 75 mg; Cu, 6 mg; I [from Ca(IO3)2·H2O], 0.875 mg; and Se, 0.20 mg.

تعیین الگوی اسیدهای چرب خوراک

ابتدا کل محتوای چربی نمونه‌های خوراک با استفاده از مخلوط کلروفرم: متانول (۱:۲، حجم:حجم) استخراج شد و سپس برای تولید متیل استر اسیدهای چرب از روش گلی و همکاران (۲۰۰۹) استفاده گردید. به منظور تعیین پروفیل اسیدهای چرب ابتدا استانداردهای اسید چرب شامل اسید میریستیک، اسید پالمیتیک، اسیداستئاریک، اسید اولئیک، اسید لینولئیک و اسید لینولنیک (Sigma 6K15, Laboratory Centrifuges, Germany) تهیه و پس از رقیق سازی به دستگاه کروماتوگرافی گازی (گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی اصفهان) تزریق شد. برای تعیین اسیدهای چرب جیره، ۵۰ میکرولیتر از روغن به دست آمده در ۱ میلی‌لیتر هگزان حل شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از متوکسید سدیم متانولی ۰/۵ نرمال به آن اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق تکان داده شد. در انتها نمونه متیله شده در تماس با سولفات سدیم بدون آب قرار گرفت تا رطوبت آن خارج شود. ستون

مورد استفاده برای سنجش اسیدهای چرب بلند زنجیر از نوع HP-88 به طول ۱۰۰ متر، قطر ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت فاز ثابت ۰/۲۰ میکرومتر بود و از گاز نیتروژن به عنوان گاز حامل با جریان ۱/۱ میلی لیتر بر دقیقه استفاده شد. برنامه دمایی ستون به گونه ای طراحی شد که در دمای ۱۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه ثابت ماند، سپس با سرعت ۵ درجه سانتیگراد در دقیقه به دمای ۱۹۰ درجه سانتیگراد رسید و به مدت ۲ دقیقه در این دما باقی ماند. سپس با سرعت ۵ درجه سانتیگراد در دقیقه به دمای ۲۴۰ درجه سانتیگراد رسید و به مدت ۸ دقیقه دیگر در این دما نگاه داشته شد. آشکارساز دستگاه از نوع FID با دمای ۲۵۰ درجه سانتیگراد، دمای تزریق ۱۵۰ درجه سانتیگراد و حجم تزریق ۱ میکرولیتر با Split ۱ به ۳۰ بود.

فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون

در پایان دوره آزمایش، دو پرندۀ از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و خون‌گیری از سیاهرگ بال آنها به عمل آمد. برای جداسازی سرم، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس تا زمان انجام آزمایشات، نمونه‌های سرم به صورت منجمد در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در نهایت بررسی فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم هم‌چون غلظت کلسترول تام، تری‌گلیسریدها و لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا (HDL) و نیز فعالیت آنزیمهای گلوتامیک پیرووات ترانس آمیناز (SGPT)، گلوتامیک اگزالواسستیک ترانس آمیناز (SGOT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) با بهره‌گیری از کیت‌های استاندارد شرکت پارس آزمون (تهران، ایران) انجام پذیرفت.

سنجش غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) سرمی

غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) سرم پرندگان نیز در روز ۷۰ آزمایش با بهره‌گیری از روش بادروری و همکاران (۲۰۰۹) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر سرم با ۳/۷۵ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۰/۴۴ مولار و ۱/۲۵ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۶۷ درصد مخلوط گردید و به مدت ۱ ساعت در بِن‌ماری ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از آن، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه داخل آب سرد قرار گرفتند. سپس با سانتریفیوژ ۴۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و میزان جذب آنها در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Ultramicroplate Reader, ELx808, Bio-Tek USA) خوانده شد. در نهایت غلظت مالون دی آلدهید با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد.

شمارش تفکیکی گلبول‌های سفید خون

جهت شمارش تفکیکی گلبول‌های سفید خون، در روز پایانی آزمایش، از هر تکرار دو پرندۀ به طور تصادفی انتخاب و خون‌گیری از سیاهرگ بال انجام گرفت. نمونه‌های خون در لوله‌های آزمایش حاوی هپارین ریخته شد و پس از تهیه اسلایدهای میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی با رنگ رایت- گیمسا، درصد لنفوسیت‌ها، هتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها، بازوفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها با بهره‌گیری از روش استدمن و همکاران (۲۰۰۱) برآورد گردیدند.

تیترا آنتی‌بادی علیه ویروس عامل بیماری نیوکاسل و گلبول قرمز گوسفندی (SRBC)

برآورد تیترا آنتی‌بادی علیه ویروس بیماری نیوکاسل و گلبول قرمز گوسفندی (SRBC) طبق توصیه لشکینسکی و کلاسینگ (۲۰۰۱) انجام شد. بدین منظور پرندگان در روز ۴۱ آزمایش، واکسن نیوکاسل را به صورت تزریق در عضله ران دریافت نمودند. ۷ روز پس از دریافت واکسن، نمونه‌های خون از سیاهرگ بال دو پرندۀ از هر تکرار جمع‌آوری گردید. سرم نمونه‌های خون، با ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه جدا گردید و تا انجام آزمایش تعیین تیترا آنتی‌بادی، به صورت منجمد در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس برای اندازه‌گیری تیترا آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل تست مهار هماگلوتیناسیون انجام پذیرفت و تیتراهای آنتی‌بادی به دست آمده به صورت لگاریتم بر پایه ۲ بیان گردیدند. همچنین در روزهای ۴۸ و ۵۸ آزمایش، به دو قطعه پرندۀ از هر تکرار، ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون ۷ درصد گلبول قرمز گوسفندی (SRBC) از طریق عضله ران (۰/۵ میلی‌لیتر در هر عضله) تزریق شد و ۶ روز پس از تزریق اول و ۱۲ روز پس از تزریق دوم، جهت بررسی پاسخ‌های ایمنی اولیه و ثانویه هومورال، فرآیند خون‌گیری از دو قطعه پرندۀ به ازاء هر قفس صورت

گرفته شد. واحد هاو نیز به عنوان معیار کیفی سفیده با استفاده از فرمول ذیل محاسبه گردید:

$$- \text{ارتفاع سفیده} + 7/5 \log [100 \times \text{واحد هاو}]^{0.77} = (\text{تخم مرغ}) (1/7)$$

غلظت کلسترول و تری‌گلیسرید زرده تخم‌مرغ

برای سنجش غلظت کلسترول و تری‌گلیسرید زرده تخم‌مرغ نیز ابتدا عصاره کلروفرم-متانولی زرده استخراج گردید و سپس غلظت کلسترول آن با استفاده از روش لیبرمن-بوشارد اندازه‌گیری شد (بکا و همکاران ۲۰۱۴). برای این منظور ابتدا مقدار یک گرم زرده با ۱۵ میلی لیتر محلول ۲:۱ کلروفرم-متانول مخلوط گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و لایه زیرین یا فاز کلروفرمی به عنوان عصاره زرده تخم‌مرغ استخراج شد. پس از آن مقدار ۰/۱ میلی لیتر عصاره زرده با ۲/۵ میلی لیتر محلول رنگزا (شامل دو حجم انیدریداستیک خالص و یک حجم اسید استیک غلیظ) مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در آب سرد قرارداده شدند. سپس میزان ۰/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ به نمونه‌ها اضافه شد و پس از مخلوط نمودن، به مدت ۱۰ دقیقه در آب سرد و محیط تاریک قرار داده شد. درپایان با بهره‌گیری از دستگاه اسپکتروفتومتر و نمونه‌های شاهد (آب مقطر) و استاندارد (۲۰۰ میلی‌گرم پودر خالص کلسترول در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال)، مقدار جذب نوری نمونه‌های عصاره زرده در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت و غلظت کلسترول در هر گرم زرده محاسبه گردید.

برای برآورد غلظت تری‌گلیسرید تخم مرغ نیز با توجه به سطح بسیار بالای آن در زرده، ابتدا عصاره زرده به نسبت ۱:۱۰ با محلول PBS رقیق شد و سپس با بهره‌گیری از کیت اندازه‌گیری تری‌گلیسرید شرکت پارس آزمون (تهران، ایران) مورد سنجش واقع گردید.

پذیرفت. سرم نمونه‌های خون با ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه جدا گردید و تا زمان برآورد عیار آنتی‌بادی، به صورت منجمد در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تیترهای آنتی‌بادی علیه SRBC با بهره‌گیری از سنجش هم‌آگلوتیناسیون اندازه‌گیری گردیدند و تیترها به صورت لگاریتم پایه ۲ عکس بالاترین رقتی که در آن آگلوتیناسیون کامل اتفاق افتاده بود، بیان شدند.

صفات کیفی تخم مرغ

در روز ۳۵ و ۷۰ آزمایش از هر قفس سه تخم‌مرغ به صورت تصادفی انتخاب و صفات کیفی آنها بر اساس روش‌های پیشنهادی هوپلاهای و همکاران (۲۰۰۷) ارزیابی گردیدند. هر تخم‌مرغ، ابتدا توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم توزین و سپس استحکام پوسته آن توسط دستگاه استحکام‌سنج (FHK, Fujihira Industry Co., Tokyo, Japan) با دقت ۰/۱ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع، اندازه‌گیری گردید. پس از آن، محتویات داخلی تخم‌مرغ بر روی سطح شیشه‌ای مخصوص منتقل شد و با استفاده از میکرومتر سه‌پایه، ارتفاع سفیده غلیظ در سه نقطه به فواصل یکسان از زرده و با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری و میانگین آنها به عنوان ارتفاع سفیده تعیین شد. جهت برآورد شاخص زرده، بزرگ‌ترین قطر و بلندترین ارتفاع زرده توسط کولیس با دقت ۰/۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد و از تقسیم ارتفاع زرده به قطر آن، شاخص زرده محاسبه گردید. شدت رنگ زرده نیز با بهره‌گیری از مقایسه با نوارهای رنگی استاندارد (Roche) (Yolk Color Fan, DSM Co., Switzerland) تعیین شد. قطر پوسته در سه محل (انتهای باریک، مرکز و انتهای پهن) به کمک ضخامت‌سنج با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر (FHK, Fujihira Industry Co., Tokyo, Japan) اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها به عنوان شاخص ضخامت پوسته در نظر

طرح آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها

کلیه داده‌های به دست آمده پس از ثبت و ویرایش با استفاده از رویه GLM نرم افزار آماری SAS (۲۰۰۱) و در قالب یک آزمایش فاکتوریل 2×3 بر پایه طرح کاملاً تصادفی تحت تاثیر ۶ تیمار با ۵ تکرار و ۴ مشاهده در هر تکرار مورد آنالیز قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. مدل آماری که جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت به صورت زیر بود $X_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + e_{ijk}$ که در آن X_{ijk} مقدار عددی هر مشاهده، μ = میانگین مشاهدات، A_i = اثر سطوح مختلف مخلوط پسماند گیاهان دارویی، B_j = اثر نسبت‌های مختلف اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳، AB_{ij} = اثر متقابل سطوح مختلف مخلوط پسماند گیاهان دارویی و نسبت‌های مختلف اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ و e_{ijk} = اثر اشتباه آزمایشی می‌باشند.

نتایج و بحث

بهره‌گیری از نسبت پایین اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ سبب کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) غلظت تری‌گلیسرید پلاسما و فعالیت آنزیم ALP و نیز تمایل به کاهش غلظت سرمی کلسترول ($P = 0.09$) و فعالیت آنزیم‌های SGPT ($P = 0.07$) و SGOT ($P = 0.05$) گردید (جدول ۲). این در حالی بود که تغذیه این نسبت، سبب افزایش سطح مالون-دی‌آلدهید خون شد ($P < 0.05$). این یافته‌ها با نتایج تحقیقات الداراجی و همکاران (۲۰۱۰) مبنی بر اثرات کاهش دهنده نسبت پایین اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ بر غلظت تری‌گلیسرید و کلسترول پلاسما و نیز کاهش فعالیت آنزیم‌های ALP و SGOT که بیشتر به عنوان شاخص‌های سلامت کبدی در نظر گرفته می‌شوند در تطابق است. همسو با یافته‌های شیدلر و همکاران (۱۹۹۷)، افزایش غلظت مالون‌دی‌آلدهید سرمی در این گروه‌ها، احتمال

بروز لیپید پراکسیداسیون سلولی و یا بافتی را تقویت نموده که این امر ضرورت به‌کارگیری ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی در جیره‌های دارای منابع غیراشباع اسیدهای چرب را بیش از پیش نمایان می‌کند.

از سوی دیگر، استفاده از بالاترین سطح مخلوط پسماند گیاهان دارویی موجب کاهش معنی‌دار غلظت کلسترول و تری‌گلیسرید پلاسما شد ($P < 0.05$). هرچند نتایج برخی از پژوهش‌ها (یالسن و همکاران ۲۰۰۹) بیانگر نبود تاثیر گیاهان دارویی و یا عصاره‌های حاصل از آنها بر تغییرات چربی‌های خونی است، اما همسو با یافته‌های حاضر، نتایج چادهری و همکاران (۲۰۰۲) و اسکوتوا و همکاران (۲۰۰۴) نشان دهنده آن است که بهره‌گیری از ترکیبات گیاهی می‌تواند سبب کاهش قابل ملاحظه غلظت کلسترول و یا تری‌گلیسرید پلاسما در مرغ‌های تخم‌گذار و یا پستانداران کوچک شود. بر اساس بررسی‌های صورت گرفته، کاهش غلظت کلسترول، به دلیل ویژگی کاهش‌دهندگی کلسترول عصاره‌های گیاهی، از طریق مهار سیستم آنزیمی ۳- هیدروکسی، ۳- متیل گلووتاریل کوآنزیم A ردوکتاز (آنزیم محدود کننده سنتز کلسترول) بروز می‌نماید (اسکوتوا و همکاران ۲۰۰۴).

علاوه بر این، استفاده از سطح ۵ درصد مخلوط پسماند گیاهان دارویی سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های سرمی SGPT و ALP ($P < 0.05$) و نیز تمایل به کاهش غلظت مالون دی‌آلدهید سرمی گردید ($P = 0.10$). بروز این پاسخ‌ها می‌تواند به دلیل حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در پسماندها و اعمال ویژگی‌های منحصر به فرد مواد زیست فعال باقیمانده در آنها باشد (آکیلا و همکاران ۱۹۹۸). چراکه بیشتر افزایش فعالیت این آنزیم‌ها به عنوان نشانگری برای تظاهر آسیب‌های کبدی شناخته شده و بهره‌گیری از ترکیب‌ها و مواد موثره فنولیک گیاهی می‌تواند با کاهش سطح تیوباربیتوریک اسید کبدی

متقابل بین سطوح مختلف مخلوط پسماند گیاهان دارویی و نسبت‌های مختلف اسیدهای چرب بر شمارش تفکیکی گلبول‌های سفید و نیز نسبت هتروفیل به لنفوسیت معنی‌دار نبود، به‌طوری که در هر نسبتی از اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳، به دنبال مصرف بالاترین سطح پسماند، نسبت هتروفیل به لنفوسیت کاهش یافت. نسبت هتروفیل به لنفوسیت همواره به عنوان معیار ارزشمندی جهت برآورد شرایط عملکرد ایمنی سلولی پرنده در زمان بروز بسیاری از تنش‌های محیطی و یا آلودگی‌های میکروبی با حضور اندوتوکسین‌های باکتریایی (مانند لیپوپلی ساکاریدها) در نظر گرفته می‌شود. به‌طوری که در شرایطی که حیوان تحت تنش است، درصد هتروفیل افزایش و شمار لنفوسیت‌ها کاهش می‌یابد (شینی و همکاران ۲۰۰۸).

موجبات نگهداری بیشتر کبد را فراهم آورد (آکیلا و همکاران ۱۹۹۸ و یانگ-شاین و همکاران ۱۹۹۹)؛ در مطالعه حاضر نیز کاهش فعالیت آنزیم‌های پلاسمایی کبد قابل مشاهده بود.

نکته جالب توجه دیگر آن است که بر اساس تحقیقات فلوروپانری و همکاران (۲۰۰۵)، استفاده از این گیاهان دارویی توانسته است سطح پراکسیداسیون لیپیدهای تخم-مرغ را نیز در طی دوره نگهداری به تأخیر انداخته و موجبات کاهش سطح مالون‌دی‌آلدهید موجود در تخم‌مرغ را فراهم آورد. این امر بیانگر آن است که ترکیبات زیست فعال گیاهی نه تنها در بافت سیال بدن (خون) می‌توانند اثربخش باشند، بلکه قدرت انتقال به بافت‌های احشایی (همچون کبد یا تخمدان) را نیز داشته و به شکل موثری می‌توانند منجر به القای اثرات فیزیولوژیک خود شوند. یافته‌های مربوط به اثرات متقابل منابع مختلف روغن و سطوح مختلف مخلوط پسماند‌های گیاهی نیز بر هیچ یک از فراسنجه‌های خونی معنی‌دار نبود.

استفاده از نسبت های متفاوت اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ تأثیری بر شمارش تفکیکی زیر جمعیت های گلبول‌های سفید خونی نداشت (جدول ۳). با این وجود یافته‌های برخی دیگر از مطالعات نشان دهنده کاهش تکثیر لنفوسیتی در خون و یا بافت‌هایی همچون طحال، تیموس و گره‌های لنفی و نیز کاهش تولید سایتوکین‌ها به دنبال تغذیه سطوح بالای روغن ماهی و یا اسیدهای چرب EPA و DHA در موش (یاگوب و کالدر ۱۹۹۵) و انسان (میدانی و همکاران ۱۹۹۳) است.

از سوی دیگر، استفاده از سطح ۵ درصد مخلوط پسماند گیاهان دارویی موجب کاهش معنی‌دار شمار هتروفیل‌ها، افزایش تعداد لنفوسیت‌ها ($P < 0.05$) و در نهایت تمایل به کاهش نسبت هتروفیل به لنفوسیت ($P = 0.06$) شد؛ هرچند بر شمار دیگر گروه‌های لوکوسیتی تأثیری نداشت. اثرات

جدول ۲- تاثیر سطوح مختلف پسماند گیاهان دارویی در جیره های با نسبت های متفاوت اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ بر فراسنجه های خونی مرغهای تخمگذار (n=۸)

Table 2- Effects of different levels of byproduct mixture in hens fed different omega-6 to omega-3 ratio on blood biochemical parameters (n=8)

MDA (μmol/L)	ALP (IU/L)	SGPT (IU/L)	SGOT (IU/L)	HDL (mg/dl)	تری‌گلیسرید Triglycerides (mg/dl)	کلسترول Cholesterol (mg/dl)	
20.12 ^b	1695.1 ^a	207.75	18.98	21.57	1291.67 ^a	151.04	نسبت n-۶/n-۳ n-6 to n-3 ratio
20.44 ^a	1276.2 ^b	192.58	18.21	26.79	1226.50 ^b	141.85	بالا High
0.08	18.37	5.65	0.43	4.65	11.13	2.86	پایین Low
							SEM
							پسماند (%)
20.49	1675.00 ^a	208.75 ^a	19.11	26.65	1301.00 ^a	154.75 ^a	Byproduct (%)
							صفر
20.17	1571.88 ^{ab}	207.12 ^a	18.49	28.88	1283.75 ^a	148.51 ^{ab}	0.0
							۲/۵
20.13	1452.63 ^b	184.62 ^b	18.20	21.98	1192.50 ^b	126.11 ^b	2.5
							۵
0.07	16.58	3.71	0.48	4.58	14.31	2.47	5.0
							SEM
							پسماند (%)
20.37	1640.00	213.25	19.25	28.25	1357.5	165.17	Byproduct (%)
							صفر
19.98	1686.25	211.00	18.79	31.25	1300.00	152.00	0.0
							۲/۵
19.98	1594.00	199.00	18.92	35.22	1217.5	136.00	2.5
							۵
20.60	1710.00	204.25	18.97	24.53	1244.50	144.32	5.0
							High
20.35	1457.50	203.25	18.20	26.52	1267.50	145.02	صفر
							پایین
20.33	1311.25	170.25	17.47	28.75	1167.5	136.22	0.0
							Low
0.09	23.41	5.40	0.46	4.61	13.34	2.91	۲/۵
							پایین
0.04	0.02	0.07	0.05	0.21	0.03	0.09	2.5
							Low
0.10	0.02	0.04	0.16	0.51	0.01	0.02	۵
							پایین
0.89	0.06	0.50	0.44	0.95	0.50	0.26	5.0
							Low
							SEM
				P-value			
				0.21	0.03	0.09	نسبت n-۶/n-۳
							n-6 to n-3 ratio
							پسماند (%)
							Byproduct (%)
							اثر متقابل
							Interaction

a-b: میانگینهای با حروف غیر مشابه اختلاف معنی داری به لحاظ آماری دارند (P<۰.۰۵).

^{a-b}Means with no common superscript are significantly (P<0.05) different.

جدول ۳-تاثیر سطوح مختلف پسماند گیاهان دارویی در جیره های با نسبت های متفاوت اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ بر شمارش تفکیکی گلبول‌های سفید خونی (درصد، n=۸)

Table 3- Effects of different levels of byproduct mixture in hens fed different omega-6 to omega-3 ratio on differential circulating leukocyte count (% , n=8)

لنفوسیت/هتروفیل Heterophile: Lymphocyte	بازوفیل Basophile	ائوزینوفیل Eosinophile	مونوسیت Monocyte	لنفوسیت Lymphocyte	هتروفیل Heterophile	
						نسبت ۶-۳/۶-۳ n-۶/n-3
						n-6 to n-3 ratio
0.38	0.20	0.79	1.54	70.50	26.95	بالا
						High
0.33	0.16	0.45	1.20	73.87	24.29	پایین
						Low
0.06	0.16	0.20	0.23	1.55	1.42	SEM
						پسماند (%)
						Byproduct (%)
0.39	0.12	0.81	1.06	70.18 ^b	27.25 ^a	صفر
						0.0
0.40	0.18	0.68	1.62	70.12 ^b	27.93 ^a	۲/۵
						2.5
0.28	0.25	0.37	1.43	76.25 ^a	21.68 ^b	۵
						5.0
0.03	0.18	0.23	0.25	1.49	1.25	SEM
						نسبت ۶-۳/۶-۳ × پسماند (%)
						Byproduct×n-6 to n-3 ratio
0.31	0.12	0.87	1.75	68.87	28.38	صفر
						0.0
						High
0.43	0.12	1.00	1.25	68.37	29.25	۲/۵
						2.5
						High
0.31	0.37	0.50	1.62	74.25	23.25	۵
						5.0
						High
0.37	0.12	0.75	1.50	71.50	26.12	صفر
						0.0
						Low
0.37	0.25	0.37	0.87	71.87	26.62	۲/۵
						2.5
						Low
0.26	0.12	0.50	1.25	78.25	20.12	۵
						5.0
						پایین
						Low
0.05	0.15	0.19	0.22	1.55	1.17	SEM
			P-value			
0.23	0.74	0.05	0.08	0.11	0.21	نسبت ۶-۳/۶-۳ n-۶/n-3
						n-6 to n-3 ratio
0.06	0.72	0.10	0.06	0.04	0.04	پسماند (%)
						Byproduct (%)
0.98	0.47	0.44	0.94	0.96	0.98	اثرات متقابل
						Interaction

a-b: میانگینهای با حروف غیر مشابه اختلاف معنی داری به لحاظ آماری دارند (P<۰/۰۵).

^{a-b}Means with no common superscript are significantly (P<0.05) different.

جدول ۴-تاثیر سطوح مختلف پسماند گیاهان دارویی در جیره های با نسبت های متفاوت اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ بر عیار

آنتی بادی علیه گلیول قرمز گوسفندی و ویروس بیماری نیوکاسل ($n=8, Log_2$)

Table 4- Effects of different levels of byproduct mixture in hens fed different omega-6 to omega-3 ratio on the antibody production titers against sheep red blood cell (SRBC) and Newcastle ($n=8, Log_2$)

گلیول قرمز گوسفندی Sheep red blood cells		ویروس بیماری نیوکاسل Newcastle disease virus	
پاسخ اولیه Primary response	پاسخ ثانویه Secondary response		
			n-6 to n-3 ratio / نسبت n-۶/n-۳
5.29	4.45	8.40	High/ بالا
4.79	5.08	8.26	Low/ پایین
0.52	0.59	0.14	SEM
			پسماند (%)
			Byproduct (%)
5.12	4.56	7.80 ^b	0.0
5.43	4.86	8.30 ^b	2.5
4.56	4.87	8.90 ^a	5.0
0.56	0.62	0.11	SEM
			نسبت n-۶/n-۳ × پسماند (%)
			Byproduct × n-6 to n-3 ratio
5.37	4.75	8.20	0.0 High/ بالا
5.87	4.12	7.80	2.5 High/ بالا
4.62	4.50	9.20	5.0 High/ بالا
4.87	4.37	8.40	0.0 Low/ پایین
5.00	5.62	7.80	2.5 Low/ پایین
4.50	5.25	8.60	5.0 Low/ پایین
0.55	0.59	0.16	SEM
		P-value	
0.27	0.02	0.67	نسبت n-۶/n-۳
			n-6 to n-3 ratio
0.39	0.83	0.02	پسماند (%)
			Byproduct (%)
0.79	0.29	0.56	اثرات متقابل
			Interaction

a-b: میانگینهای با حروف غیر مشابه مختلف معنی داری به لحاظ آماری دارند ($P<0.05$).

^{a-b}Means with no common superscript are significantly ($P<0.05$) different.

تغذیه جیره‌های با نسبت پایین اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ موجب بهبود شاخص رنگ زرده در پایان ۳۵ روز اول آزمایش ($P < 0.05$) و افزایش ضخامت پوسته تخم‌مرغ ($P = 0.08$) و نیز کاهش کلسترول زرده ($P < 0.01$) در روز ۷۰ مطالعه شد (جدول ۵). از سوی دیگر، تغذیه سطح پنج درصد مخلوط پسماند گیاهان دارویی، موجب افزایش استحکام پوسته تخم‌مرغ و واحد هاو در ۳۵ روز اول گردید ($P < 0.05$). علاوه بر این، استفاده از این سطح سبب بهبود استحکام و ضخامت پوسته ($P < 0.05$ و $P = 0.07$) و نیز افزایش شاخص رنگ و واحد هاو ($P < 0.05$ و $P = 0.09$) در پایان دوره آزمایشی شد.

استحکام پوسته تخم‌مرغ به دو عامل کیفیت بخش معدنی پوسته و ماتریکس پروتئینی پوسته بستگی دارد. در همین راستا نادیا و همکاران (۲۰۰۸) گزارش نمودند که ترکیبات زیست فعال گیاهی با اثرات مثبت آنتی‌اکسیدانی که بر عملکرد سلول‌های رحمی می‌گذارند، سبب بهبود رسوب کلسیم و تشکیل پوسته گردیده‌هاو از سوی دیگر با بهبود قابلیت جذب پروتئین و نیز ترشح آنزیم‌های پانکراسی موجبات استحکام ماتریکس پروتئینی پوسته را فراهم می‌نمایند. همچنین، از آنجا که واحد هاو که بیشترین عنوان شاخص کیفیت سفیده در نظر گرفته می‌شود، همبستگی بالایی با ارتفاع، قوام و میزان پروتئین سفیده دارد (فلوروپانری و همکاران ۲۰۰۵) این احتمال وجود دارد که مواد موثره گیاهی با اثرات قابل ملاحظه‌ای که بر شاخص‌های سلامت کبد بر جای گذاشته‌اند، موجب تولید و حضور مقادیر بیشتر آلبومین در سفیده گردیده‌اند.

هرچند همسو با نتایج موریتا و همکاران (۲۰۰۳) تغذیه نسبت‌های مختلف اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ تأثیری بر محتوای تری‌گلیسرید زرده تخم‌مرغ نداشت، اما بهره‌گیری از نسبت پایین اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ توانست سبب کاهش سطح کلسترول زرده تخم‌مرغ

با توجه به کاهش این نسبت و اثرات مثبت مواد موثره گیاهی (به دلیل ویژگی‌های آنتی اکسیدانی) و یا آنتی اکسیدان‌های سنتتیک بر شاخص‌های ایمنونولوژیک سلولی همچون بهبود فعالیت و تکثیر لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها و نیز تولید واسطه‌های سایتوکینی و نیتریک اکساید در پرندگان (آواد و همکاران ۲۰۱۰)، توانایی القای سطوح بالای لنفوسیتی جهت بهبود پاسخ های ایمنی سلولی توسط ترکیب گیاهی حاضر، بدون بروز اثرات التهابی سیستمیک (کاهش هتروفیلی) تقویت می‌شود.

همان گونه که در جدول ۴ ارائه شده است استفاده از نسبت‌های مختلف اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳، تأثیری بر پاسخ‌های ایمنی هومورال علیه آنتی ژن های مورد آزمون نداشت. اما بهره‌گیری از بالاترین سطح مخلوط پسماند گیاهان دارویی توانست تیترا آنتی‌بادی علیه ویروس بیماری نیوکاسل را بهبود بخشد ($P < 0.05$). این بهبود پاسخ می‌تواند به دلیل اثرات سودمند ترکیبات آنتی‌اکسیدانی باقیمانده در مخلوط پسماند بر حفظ هموستاز و عملکرد مطلوب ایمنونولوژیک سلول‌های دخیل در سیستم ایمنی باشد (آواد و همکاران ۲۰۱۰). چرا که این سیستم چه به لحاظ تعداد سلول درگیر و چه به لحاظ سطح فعالیت های متابولیک دارای گستره وسیعی بوده و لذا به دلیل تولید واسطه های رادیکالی حاصل، نیاز به منابع آنتی‌اکسیدانی ضروری است (وال پرسو و همکاران ۲۰۰۵). در توافق با یافته‌های حاضر، بهره‌گیری از ترکیبات گیاهی مختلفی توانسته است موجبات افزایش عیار آنتی بادی علیه ویروس بیماری نیوکاسل را فراهم آورد (وال پرسو و همکاران ۲۰۰۵). علاوه بر این، اثرات متقابل بین نسبت‌های متفاوت اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ و سطوح مختلف مخلوط پسماند گیاهی بر عیار آنتی‌بادی علیه گلوبول قرمز گوسفندی و نیز ویروس نیوکاسل معنی‌دار نبود.

گردد. این یافته‌ها مشابه نتایج به دست آمده توسط کهویی و همکاران (۲۰۰۴) و صالح (۲۰۱۳) است که گزارش نمودند استفاده از روغن ماهی می تواند به خوبی میزان کلسترول زرده تخم‌مرغ را کاهش دهد. این محققان کاهش سطح VLDL تولید شده در کبد و نیز سطح پایین‌تر منابع خونی کلسترول، به دنبال مصرف اسیدهای چرب بسیار غیر اشباع EPA و DHA را عامل بروز این اثر می دانند. با این وجود اثرات متقابل بین سطوح مختلف مخلوط پسماند گیاهان دارویی و نسبت های مختلف اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ بر کلسترول زرده تخم‌مرغ معنی‌دار نبود و به دنبال افزایش سطح پسماند گیاهان دارویی در نسبت‌های مختلف اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳، سطح کلسترول تخم‌مرغ کاهش یافت ($P=0/10$). به عنوان یک نتیجه‌گیری کلی، هرچند تغذیه نسبت پایین اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ موجب کاهش سطح کلسترول و تری گلیسرید پلاسما، کلسترول تخم‌مرغ و فعالیت آنزیم‌های کبدی گردید، اما احتمال بروز فساد اکسیداتیو را افزایش داد. با این وجود بهره‌گیری از سطح پنج درصد پسماند گیاهان دارویی توانست موجب بهبود شاخص های آنزیمی سلامت کبد، پاسخ های ایمنی سلولی و استحکام پوسته تخم مرغ را فراهم آورد.

جدول ۵- تاثیر سطوح مختلف پسماند گیاهان دارویی در جیره های با نسبت های متفاوت اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ بر صفات کیفی تخم مرغ

Table 5- Effects of different levels of byproduct mixture in hens fed different omega-6 to omega-3 ratio on egg quality traits

تری‌گلیسرید (mg/g) Yolk Triglyceride	کلسترول (mg/g) Yolk Cholesterol	واحد هاو Haugh unit		رنگ زرده Yolk color		شاخص زرده Yolk index		شاخص شکل Shape index		استحکام پوسته (kg/cm ²) Eggshell strength (kg/cm ²)		ضخامت پوسته (میکرو متر) Eggshell thickness (μm)		وزن پوسته (گرم) Eggshell weight (g)		نسبت n-۶/n-۳ n-6 to n-3 ratio/
		35-70	0-35	35-70	0-35	35-70	0-35	35-70	0-35	35-70	0-35	35-70	0-35	35-70	0-35	
229.25	14.05 ^a	79.20	85.46	7.57	7.57 ^b	0.39	0.49	0.77	0.75	2.48	2.59	42.57	44.62	8.85	8.40	High / بالا
233.08	13.17 ^b	77.09	87.31	7.86	8.11 ^a	0.40	0.39	0.77	0.76	2.62	2.54	43.11	43.99	8.73	8.29	Low / پایین
6.41	0.12	2.32	1.31	0.28	0.28	0.01	0.06	0.01	0.02	0.17	0.16	1.15	1.78	0.28	0.29	SEM
پسماند(%) / Byproduct (%)																
226.25	13.82	74.84	81.63 ^b	7.21 ^b	7.60	0.39	0.38	0.77	0.76	2.33 ^b	2.40 ^b	42.03	42.94	8.52	8.19	0.0
234.25	13.77	77.54	83.63 ^{ab}	7.76 ^{ab}	7.79	0.39	0.54	0.77	0.75	2.55 ^{ab}	2.56 ^{ab}	43.41	44.46	8.80	8.30	2.5
233.00	13.25	81.97	85.90 ^a	8.20 ^a	8.10	0.40	0.40	0.76	0.75	2.76 ^a	2.74 ^a	44.47	45.44	9.13	8.56	5.0
6.32	0.13	2.42	1.35	0.23	0.26	0.02	0.05	0.01	0.01	0.18	0.12	1.19	1.75	0.30	0.31	SEM
نسبت n-۶/n-۳ × پسماند (%) / Byproduct × n-6 to n-3 ratio/ (%)																
229.75	13.95	79.20	83.64	6.57 ^c	7.56	0.39	0.39	0.76	0.75	2.32	2.48	42.41	43.49	8.51	8.71	بالا/High
225.00	14.17	80.39	85.82	7.60 ^b	7.20	0.39	0.68	0.78	0.758	2.43	2.54	42.54	45.22	8.82	8.22	0.0
233.00	14.05	78.01	87.00	8.57 ^a	7.95	0.41	0.40	0.76	0.75	2.66	2.76	42.75	45.02	9.24	8.25	2.5
222.75	13.70	75.64	83.61	7.85 ^b	7.64	0.40	0.38	0.79	0.78	2.34	2.31	41.59	42.38	8.54	8.39	5.0
243.50	13.37	83.77	85.98	7.87	8.42	0.40	0.40	0.76	0.75	2.66	2.58	44.40	43.59	8.77	8.17	0.0
233.00	12.45	69.77	92.95	7.87 ^b	8.26	0.39	0.39	0.76	0.76	2.94	2.72	47.23	45.86	8.96	8.35	2.5
6.27	0.18	2.35	1.36	0.26	0.25	0.01	0.08	0.01	0.01	0.17	0.13	1.17	1.73	0.29	0.27	5.0
SEM																
P-value																
0.46	0.005	0.34	0.31	0.34	0.01	0.89	0.19	0.92	0.18	0.23	0.62	0.08	0.64	0.70	0.68	نسبت n-۶/n-۳ n-6 to n-3 ratio

نشریه پژوهش‌های علوم دامی / جلد ۲۷ شماره ۴ / سال ۱۳۹۶																۵۰ موسوی، مهدوی و ...
0.40	0.20	0.09	0.04	0.02	0.48	0.82	0.17	0.75	0.47	0.04	0.05	0.07	0.34	0.22	0.43	پسماند (%)
0.13	0.10	0.28	0.40	0.03	0.25	0.43	0.22	0.26	0.40	0.73	0.75	0.13	0.73	0.88	0.75	Byproduct (%)
																اثرات متقابل Interaction

a-c : میانگینهای با حروف غیر مشابه مختلف معنی داری به لحاظ آماری دارند ($P < 0.05$).

^{a-c}Means with no common superscript are significantly ($P < 0.05$) different.

منابع مورد استفاده

- Akila G, Rajakrishnan V, Viswanathan P, Rajakrishnan KN and Menon VP, 1998. Effect of curcumin on lipid profile and lipid peroxidation status in experimental hepatic fibrosis. *Hepatology Research* 11: 147-157.
- Al-Daraji HA, Al-Hassani AS, Al-Mashadani HA, Al-Hayani WK and Mirza HA, 2010. Effect of dietary supplementation with sources of omega-3 and omega-6 fatty acids on certain blood characteristics of laying quail. *International Journal of Poultry Science* 9: 689-694.
- Almeida IMC, Barreira JCM, Oliveira MBPP and Ferreira ICFR, 2011. Dietary antioxidant supplements: benefits of their combined use. *Food and Chemical Toxicology* 49: 3232-3237.
- Alparslan G and Zdogan M, 2006. The effect of diets containing fish oil on some blood parameters and the performance values of broilers and cost efficiency. *International Journal of Poultry Science* 5: 415-419.
- AOAC. 2006. Official methods of analysis. AOAC International, Arlington, VA.
- Awaad MHH, Abdel-Alim GA, Sayed Kawkab KSS, Ahmed A, Nada AA, Metwalli ASZ and Alkhalaf AN, 2010. Immunostimulant effects of essential oils of peppermint and eucalyptus in chickens. *Pakistan Veterinary Journal* 30: 61-66.
- Babu PS and Srinivasan K, 1997. Hypolipidemic action of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in streptozotocin induced diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 166: 169-175.
- Badraoui R, Blouin S, Moreau MF, Gallois Y, Rebai T, Sahnoun Z, Basle M and Chappard D, 2009. Effect of alpha tocopherol acetate in Walker 256/B cells-induced oxidative damage in a rat model of breast cancer skeletal metastases. *Chemico-Biological Interactions* 182: 98-105.
- Baucells MD, Crespo N, Barroeta AC, Lopes S and Groshorn AM, 2000. Incorporation of different polyunsaturated fatty acids into eggs. *Poultry Science* 79: 51-59.
- Boka J, Mahdavi AH, Samie AH and Jahanian R, 2014. Effect of different levels of black cumin (*Nigella sativa* L.) on performance, intestinal *Escherichia coli* colonization and jejunal morphology in laying hens. *Animal Physiology and Animal Nutrition* 98: 373-383.
- Botsoglou N, Florou-Paneri P, Botsoglou E, Dots V, Giannenas I, Koidis A and Mitrakos P, 2005. The effect of feeding rosemary, oregano, saffron and alpha-tocopheryl acetate on hen performance and oxidative stability of eggs. *S African Journal of Animal Science* 35: 143-151.
- Cherian G and Hayat Z, 2009. Long-term effects of feeding flaxseeds on hepatic lipid characteristics and histopathology of laying hens. *Poultry Science* 88: 2555-2561.
- Chowdhury SR, Chowdhury SD and Smith TK, 2002. Effects of dietary garlic on cholesterol metabolism in laying hens. *Poultry Science* 81: 1856-1862.
- Fernandez A, Verde MT, Gascon M, Ramos JJ, Gomez J, Lucoand DF and Chavez G, 1994. Variation of clinical biochemical parameters of laying hens and broiler chicks fed aflatoxin containing feed. *Avian Pathology* 23: 37-47.
- FlorouPaneri P, Nikolakakis L, Giannenas L, Koidis A, Botsoglou E, Dots V and Mistsopoulos L, 2005. Hen performance and egg quality as affected by dietary oregano essential oil and α -tocopherol acetate supplementation. *International Journal of Poultry Science* 4: 449-454.
- Gadoth N, 2008. On fish oil and omega-3 supplementation in children: The role of such supplementation on attention and cognitive dysfunction. *Brain and Development* 30: 309-312.
- Galdine C, Morand C, Rock E, Bauchart D and Durand D, 2007. Plant extracts rich in polyphenols (PERP) are efficient antioxidants to prevent lipoperoxidation in plasma lipids from animals fed n-3 PUFA supplemented diets. *Animal Feed Science and Technology* 136: 281-296.
- GenedySalwa G and Zeweil HS, 2003. Evaluation of using medicinal plants as feed additives in growing Japanese quail diets. The 68 Scientific Conference of Polish Animal Production Society, 9-12 September 2003, Krakov, Poland.

- Goli SA, Miskanda MS, Kadivar M and Keramat J, 2009. The production of an experimental table margarine enriched with conjugated linoleic acid (CLA): physical properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 110: 1102-1108.
- Hayat Z, Cherian G, Pasha TN, Khattak FM and Jabbar MA, 2010. Oxidative stability and lipid components of eggs from flax-fed hens: Effect of dietary antioxidants and storage. *Poultry Science* 89: 1285-1292.
- Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M and Schade R, 2007. *Bioactive Egg Compounds*. Springer-Verlag, Berlin.
- Jirovetz L, Buchbauer G, Stoilova I, Stoyanova A, Krastanova A and Schmidt E, 2006. Chemical composition and antioxidant properties of the clove leaf essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 6303-6307.
- Jump DB, 2002. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* 227: 8755-8758.
- Kehn P and Fernanetes G, 2001. The importance of omega-3 fatty acids in the attenuation of immune-mediated diseases. *Journal of Clinical Immunology* 21: 99-101.
- Kehui O, Wenjun W, Mingshen X, Yan J and Xinchun S, 2004. Effects of different oils on the production, performance and polyunsaturated fatty acids and cholesterol level of yolk in hens. *Asian-Australas Journal of Animal Science* 17: 843-847.
- Kubow S, 1993. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. *Nutrition Reviews* 51: 33-40.
- Lavinia S, Gabil D, Drinceanuy D, Stef D, Daniella M, Julean C, Ramona T and Coriconivoschi N, 2009. The effect of medicinal plants and plant extracted oils on broiler duodenum morphology and immunological Profile-Rom. *Biotechnology Letters* 14: 4606-4614.
- Leshchinsky TV and Klasing KC, 2001. Relationship between the level of dietary vitamin E and the immune response of broiler chickens. *Poultry Science* 80: 1590-1599.
- Lewis N, Seburg S and Flanagan N, 2000. Enriched eggs as a source of omega-3 PUFA for humans. *Poultry Science* 79: 971-974.
- Meydani SN, Lichtenstein AH, Cornwall S, Meydani M, Goldin BR, Rasmussen H, Dinarello SA and Schaefer EJ, 1993. Immunologic effects of national cholesterol education panel step-2 diets with and without fish-derived n-3 fatty acid enrichment. *Journal of Clinical Investigation* 92: 105-113.
- Morita T, Jinno K, Kawagishi H, Arimoto Y, Suganuma H, Inakuma T and Sugiyama K, 2003. Hepatoprotective effect of myristicin from nutmeg (*Myristica fragrans*) on lipopolysaccharide/ Dgalactosamine-induced liver injury. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1560-1565.
- Nadia LR, Hassan RA, Qota EM and Fayek HM, 2008. Effect of natural antioxidant on oxidative stability of eggs and productive and reproductive performance of laying hens. *International Journal of Poultry Science* 7: 134-150.
- Saleh AA, 2013. Effects of fish oil on the production performance, polyunsaturated fatty acids and cholesterol levels of yolk in hens. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 25: 605-612.
- SAS, 2001. *Procedures Guide*, Version 9, 3rd ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Scheideler SE, Froning G and Cuppett S, 1997. Studies of consumer acceptance of high omega-3 fatty acid-enriched eggs. *Journal of Applied Poultry Research* 6: 137-146.
- Shini S, Kaiser P, Shini A and Bryden WL, 2008. Differential alterations in ultrastructural morphology of chicken heterophils and lymphocytes induced by corticosterone and lipopolysaccharide. *Vet Journal of Immunology and Immunopathology* 122: 83-93.
- Siddiqui RA, Harvey KA and Zalog GP, 2008. Modulation of enzymatic activities by n-3 polyunsaturated fatty acids to support cardiovascular health. *Journal of Nutritional Biochemistry* 19: 417-437.

- Skottova N, Kazdova L, Oliyarnyk O, Vecera R, Sobolova L and Ulrichova J, 2004. Phenolics-rich extracts from *Silybummarianum* and *Prunella vulgaris* reduce a high surcorse diet induce oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats. *Pharmacology Research* 50:123-130.
- Srinivasan K, 2004. Spices as influencers of body metabolism: an overview of three decades of research. *Food Research International* 38: 77–86.
- Stedman NL, Brown TP, Brooks RL and Bounous DI, 2001. Heterophil function and resistance to staphylococcal challenge in broiler chickens naturally infected with avian leukosis virus subgroup. *Journal of Veterinary Pathology* 38: 519–527.
- Taheri-Gandomani V, Mahdavi AH, Rahmani HR, Riasi A and Jahanian E, 2014. 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* 167: 236–248.
- ValleParaso MGR, Vidamo PJS, Anuciadoand RVP and Lapitan AM, 2005. Effects of Aloe vera (*Aloebarbadensis*) on the white blood cell count and antibody titre of broiler chickens vaccinated agains New castle disease. *Philipp Journalof Veterinary Medicine* 42:49-52.
- Washburn KW and Nix DF, 1974. A rapid technique for extraction of yolk cholesterol. *Poultry Science* 53: 1118-1122.
- Yalcin S, Yalcin S, Erol H, Bugdayci KE, Ozsoy B and Caki S, 2009. Effects of dietary black cumin seed (*Nigella sativa* L.) on performance, egg traits, egg cholesterol content and egg yolk fatty acid composition in layinghens. *Journal of the science of food and Agriculture* 89: 1737–1742.
- Yaqoob P and Calder PC, 1995. The effects of dietary lipid manipulation on the production of murine T -cell-derived cytokines. *Cytokine*7: 548- 553.
- Yung-Shin S, Jau-Tien L, Yuan-Tsung C, China-Jung C and Deng-Jue Y, 1999.Evaluation of antioxidant ability of ethanolic extract from dill (*Anethum graveolens* L.) flower. *Food Chemistry*115:515-521.

Effects of medicinal plants' by-product mixture on blood parameters, egg quality and immunological responses of laying hens fed diets with different Omega-6 to Omega-3 ratios

A Mousavi¹, AH Mahdavi^{2*}, A Riasi² and H Hosseini³

Received: November 4, 2015

Accepted: January 30, 2017

¹MSc Student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

²Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

³ Researcher and PhD Student, Barij Essence Pharmaceutical Company, Iran

*Corresponding author: mahdavi@cc.iut.ac.ir

Introduction: It has been demonstrated that an enhancement in n-3 polyunsaturated fatty acids of the eggs can suppress the saturated fatty acids, and therefore it causes to production of eggs with better lipid profile as well as nutritional contents (Hayat et al., 2010); however, the eggs containing higher levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids make them more susceptible to lipid peroxidation (Baucells et al., 2000). Nowadays, the scientists utilize the medicinal plants or their byproducts as beneficial natural antioxidants (Jirovetz et al., 2006). Therefore, the current study was carried out to assess the effect of different levels of herbal by-product mixture on some blood parameters, immunological responses and egg quality of laying hens received different omega-6 to omega-3 ratios.

Material and methods: A total of 120 laying hens, 40 weeks of age, were assigned to 6 experimental diets with 4 replicates and 5 birds in each replication. Dietary treatments consisted of three levels of medicinal plants' by-product (0, 2.5 and 5%) and two omega-6 to omega-3 ratios (15.12 and 1.65) in a 2×3 factorial arrangement based on completely randomized design. The experiment lasted for a total of 80-d including 10 d for adaptation and 70 d as main recording period. Birds were housed in a windowless hall containing battery cages (45 × 50 cm²) with the light program of 16L: 8D. Hens had free access to water and to the experimental diets. Body weights were recorded at the beginning and at the end of the experimental period. Three eggs were collected from each replicate on days 35 and 70, and egg quality indices including shape index, yolk index, Haugh unit, yolk color, eggshell weight, eggshell thickness, and eggshell breaking strength were measured. Yolk cholesterol of three eggs per replicate was extracted by the Folch method, with consideration of the modifications done by Washburn and Nix (1974) at the end of study and estimated by the colorimetric Libermann-Burchard method. Blood samples of two hens per replicate were collected at the final trial day and centrifuged (3000×g for 15 min). Sera samples were harvested and stored (−20°C) until further analysis for concentrations of serum cholesterol, triglycerides and HDL, and also the enzymatic activity of serum glutamic pyruvic transaminase, serum glutamic-oxaloacetic transaminase, and alkaline phosphatase by using turbidometric method as described by Hosseini-Vashan et al. (2012). The concentration of malondialdehyde (MDA) was assessed by the method of Badraoui et al. (2009) with minor modifications. On d 70 of trial, 500 µl of serum was mixed by 3.75 ml of 0.44 mol/l phosphoric acid, 1.25 ml 0.67% thiobarbitic acid, and 2.5 ml distilled water. The mixture was incubated at 100 °C for 1 h. After cooling, it was centrifuged at 4,000×g for 10 min and the absorbance was measured at 532 nm using an automated spectrophotometer. On d 41 of the trial, Newcastle vaccine was sprayed and three hens of each cage were randomly selected after one week and bled from wing vein. Sera were separated by centrifugation (5000 × g for 10 min) and antibody titers against Newcastle disease virus were

measured by Hemagglutination halter test using commercially available V-form ELISA plates according to the manufacturer's instructions. Two randomly selected birds 70 days of age from each pen were bled and differential counts of leukocytes were performed by screening a Gimsa-stained slide. The different subpopulations of leukocytes were enumerated and the heterophil:lymphocyte ratio was calculated as described by Stedman et al. (2001).

Results and discussion: Feeding low dietary ratio of omega-6 to omega-3 led to a significant increase in serum malondialdehyde concentration ($P<0.05$) and egg colour index ($P<0.05$), and also a remarkable decrease in serum alkaline phosphatase enzyme activity ($P<0.05$), serum triglyceride, ($P<0.05$) and yolk cholesterol concentrations ($P<0.01$). As indicated by Al-Daraji et al. (2010), serum enzymes activities were decreased in laying quail received supplemental fish oil; however, Alparslan and Zdogan (2006) showed that serum glutamic-oxaloacetic transaminase was higher in broilers fed fish oil. Moreover, herbal by-product mixture caused an improvement in antibody titer against Newcastle disease virus ($P<0.05$) and lymphocytes percentage ($P<0.05$) as well as egg yolk colour index ($P<0.01$), eggshell hardness ($P<0.05$) and Haugh unit ($P<0.05$). Improvement in humoral immune responses by medicinal plants, such as rosemary, thyme, oregano and clove bud (Nadia et al. 2008; Taheri Gandomani et al. 2014) in layers has been seen due to the remarkable antioxidant activities of these bioactive compounds (Labban, 2014). In addition, level of 5% herbal by-product mixture in diet was led to a reduction in heterophil percentage ($P<0.05$), blood cholesterol and triglyceride concentrations ($P<0.05$), and alkaline phosphatase and serum glutamic pyruvic transaminase enzyme activities ($P<0.05$). A decrease in serum cholesterol concentration could be related to hypocholesteromic activity of herbal essential oils via hepatic 3- hydroxyl -3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase inhibition, the rate-limiting enzyme of cholesterol biosynthesis in smooth endoplasmic reticulum (Srinivasan, 2004), and also stimulation of hepatic cholesterol-7-hydroxylase converting cholesterol to bile acids leading to facilitate the biliary cholesterol extraction (Babu and Srinivasan, 1997).

Conclusion: Our results indicated that though feeding low dietary ratio of omega-6 to omega-3 decreased serum triglyceride and cholesterol concentrations, yolk cholesterol content and liver enzymes activities, it increased the probability of lipid peroxidation. Furthermore, supplementation of the highest level of herbal by-product blend could improve the liver health indexes, cellular immunity responses and eggshell hardness.

Keywords: Blood parameters, Egg quality, Fatty acids, Immunological responses, Laying hens, Medicinal plants' by-product