نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد نهم، شماره دوم، ۱۴۰۰
http://ejrr.gau.ac.ir
۷۳-۹۲
DOI: 10.22069/ejrr.2021.18611.1773

اثرات استروژنیک تفاله هسته انار بر فراسنجه‌های خونی و آنتی‌اکسیدانی بزهای ماده سانن

فاطمه سادات ثالثی[۱]، *سیداحسان غیاثی[۲]، محسن مجتهدی[۲] و سیدجواد حسینی واشان[۳]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، [۲]استادیار و [۳]دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

تاریخ دریافت: ۹۹/۹/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۱۱

چکیده

سابقه و هدف: تفاله هسته انار (*Punica granatum*) یکی از پس‌ماندهای صنایع تبدیلی است که در سال‌های اخیر به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی در تغذیه دام به طور فزآینده‌ای به کار می‌رود. تفاله هسته انار حاوی ترکیبات پلی فنولی است که عمدتاً شامل اسید الاژیک، پونیکالاژین و پونیکالین بوده که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند و از پراکسیداسیون چربی‌ها و فعالیت رادیکال‌های آزاد ممانعت می‌کند. دانه‌های انار علاوه بر ترکیبات پلی‌فنولی در بردارنده استروژن‌های "استرادیول، استرون و استریول" و با غلظت کمتری حاوی تستوسترون، بتاسیتوسترول و کامسترول نیز می‌باشند که گزارشات زیادی پیرامون اثرات جانبی آن بر فیزیولوژی و متابولیسم نشخوارکنندگان در دست نیست. با توجه به نقش استروژن‌ها در متابولیسم لیپیدها ممکن است تفاله هسته انار به عنوان منبع گیاهی غنی از استروژن قادر به تقلید نقش تنظیمی استروژن‌های اندوژنوس بر متابولیسم و تولید مثل باشد. در این مطالعه اثرات استروژنیک تفاله هسته انار بر غلظت استرادیول سرم خون و سایر فراسنجه‌های خونی و آنتی‌اکسیدانی بزهای خشک غیرآبستن سانن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این آزمایش از ۱۸ رأس بز سانن خشک غیر آبستن ۳ تا ٤ شکم زایش با میانگین وزنی ۵/۱٦ ±٤٤/۸۵ کیلوگرم، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار و ٦ تکرار استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱) تیمار شاهد ۲) جیره پایه + ۱۲ درصد تفاله هسته انار ۳) جیره پایه+ ۱۲ درصد تفاله هسته انار و گاز ازون (عامل حذف استروژن از انار) بود. فراسنجه‌های خونی هورمون استرادیول، آلبومین، بیلی روبین مستقیم، بیلی‌روبین کل، کراتینین، گلوکز، بتاهیدرکسی بوتیرات، اوره، اسید اوریک، نیتروژن اوره‌ای خون، آلکالین فسفاتاز، آسپارتات و آلانین آمینوترانسفراز، کلسیم، فسفر، کلسترول، تری‌گلیسرید، لیپوپروتئین با چگالی بالا، لیپوپروتئین با چگالی کم و متغییرهای آنتی‌اکسیدانی مالون دی آلدهید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما مورد اندازه گیری قرار گرفت. داده‌های آزمایش با نرم افزار SAS و با رویه مخلوط به صورت داده‌های تکرار دار در زمان مورد آنالیز آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: بر اساس نتایج میزان فراسنجه‌های غلظت استرادیول استاندارد و سطح زیر منحنی غلظت استرادیول سرم خون در طول چرخه فحلی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمار ۲ افزایش (به‌ترتیب: $pg\ ml^{-1}$ ۳۳/۳٦ و cm^2 ٦۰۵/۱۲) یافت ($P<۰/۰۵$). تیمار حاوی گاز ازون به طور معنی داری این متغییرها را نسبت به تیمار دوم کاهش داد (۲۸/۱۳ و ۵٤۳/۹۱) و تفاوت معنی داری با

*نویسنده مسئول: s.e.ghiasi@birjand.ac.ir

شاهد (۲۵/۵۶ و ۵۱۵/۱۲) نداشت. سایر فراسنجه‌های خونی به جز فسفر و برخی متغییرهای آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر معنی‌دار تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت که نشان دهنده کافی نبودن دریافت استروژن برای بر هم زدن هموستاز فراسنجه‌های خونی در سطح ۱۲ درصد جایگزینی تفاله هسته انار با سبوس گندم می‌باشد.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی سطح ۱۲ درصد تفاله هسته انار در گامه فیزیولوژیکی مورد مطالعه اثر منفی معنی‌داری بر فراسنجه‌های متابولیکی طبیعی بزهای سانن نداشت. حذف اثر استروژن در تیمار ۱۲ درصد تفاله هسته انار و گاز ازون نشان می‌دهد که گاز ازون قادر است اثر فیتواستروژن‌های جیره را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، بز ماده سانن، تفاله هسته انار، فراسنجه‌های خونی

مقدمه

افزودن آنتی‌اکسیدان به جیره می‌تواند باعث خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد و تعدیل اثرات منفی مشتقات پراکسیداسیون اسیدهای چرب گردد. از آنجا که مصرف آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی به‌دلیل نگرانی‌هایی که بر روی سلامت دارند روند رو به کاهشی دارد، کشت و استفاده از محصولات طبیعی سرشار از ملکول‌هایی زیست فعال به عنوان یک استراتژی تغذیه‌ای برای بهبود کیفیت محصولات نشخوارکنندگان از طریق افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و به منظور کاهش هزینه‌های تولید مطرح می‌باشد (۱۰ و ۵۲). تفاله هسته انار یکی از پس‌ماندهای باغی و صنایع تبدیلی کشور است که به دلیل خواص دارویی و آنتی‌اکسیدانی در تغذیه بز به طور فزآینده‌ای به کار می‌رود (۱۴، ۱۵ و ۱۶). تفاله هسته انار حاوی ترکیبات پلی فنولی است که عمدتاً شامل اسید الاژیک و مشتقات آن، پونیکالاژین و پونیکالین بوده که به‌ترتیب استرهای اسید الاژیک و اسید گالیک محسوب می‌شوند و خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند (۴۲ و ۴۵). مهمترین ترکیبات حاوی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تفاله هسته انار ایزومرهای پونیکالاژین هستند، که از پراکسیداسیون چربی‌ها و فعالیت رادیکال‌های آزاد ممانعت می‌کند و در حفظ و سلامت دام‌ها بسیار مؤثرند (۴۷). فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای انار مربوط به ترکیبات پلی فنولی آن است، که پراکسیداسیون لیپید را به وسیله شکستن رادیکال پراکسیل مهار می‌کند و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کبد، خون، گوشت و شیر را در بزغاله‌ها، بره‌های پرواری و گاو شیری بهبود می‌بخشد (۱۶، ۲۷ و ۴۷). نقش عصاره انار به عنوان یک ماده موثر در برابر ویروس‌ها و در سرکوب تکثیر سلول‌های سرطانی احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات فلاونوئیدی از جمله آنتوسیانین‌ها، اسیدهای فنولی و تانن است (۵۴، ۲۸، ۲۵ و ۲).

هسته انار با محتوای پلی‌فنول بالا و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در تقابل با رادیکال‌های آزاد جایگزین مناسبی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک نظیر بوتیلات هیدروکسی تولوئن و آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌مری مانند یونوکس ۱۰۰ می‌باشد که به دلیل سرطان‌زا بودن استفاده از آنها محدود شده است (۳۳). بر طبق گزارش کیم و همکاران (۲۰۰۲) دانه‌های انار علاوه بر ترکیبات پلی‌فنولی و آنتی‌اکسیدانی در بردارنده استروژن‌های "استرادیول، استرون و استریول" هستند و با غلظت کمتری حاوی تستسترون، بتاسیتوسترول و کامسترول نیز می‌باشند که گزارشات زیادی پیرامون اثرات جانبی آن بر فیزیولوژی و متابولیسم نشخوارکنندگان در دست نیست (۲۶). با توجه به نقش استروژن‌ها در متابولیسم لیپیدها ممکن است

عصاره انار به عنوان منبع گیاهی غنی از استروژن قادر به تقلید نقش تنظیمی استروژن‌های اندوژنوس بر متابولیسم باشد (۲٤).

بر اساس گزارش حشمتی و همکاران (۲۰۰۲) استروژن در متابولیسم کلسیم و تبادل آن بین استخوان و سایر مخازن، موثر بوده و می تواند از پوکی استخوان جلوگیری کند (۲۰). ویلیامز و همکاران (۱۹۷۸) نشان دادند که بیان ژن آلبومین در سلول‌های کبدی در اثر القای استروژن کاهش می‌یابد (٥٦). همچنین آنها گزارش نمودند که در اثر استروژن غلظت آلبومین و نیز کل میزان پروتئین سرم کاهش می‌یابد. مطالعات نشان می‌دهد که استروژن موجود در هسته انار موجب اتصال هورمون‌های تیروئید به پروتئین گلوبولین می‌گردد (۱). مطالعات موری-اوکاموتو و همکاران (۲۰۰٤) نشان می‌دهد که ذخیره سازی کلسیم محلول در استخوان، تحت تأثیر هورمون‌های کلسی تونین انجام می‌شود و میزان این هورمون در خون از طریق خوراندن هسته انار تحت القای استروژن موجود در آن افزایش می‌یابد (۳۸). هسته انار با مکانیسم هورمونی باعث تغییرات مثبت فیزیولوژیک نظیر افزایش ذخیره سازی کلسیم در استخوان برای ورود به گامه شیردهی می‌گردد (۱٥). اثرات پیش‌گیرنده عصاره گل و برگ انار توسط تعدادی از محققین روی سطح گلوکز خون، چربی سرم خون میزان کلسترول کل، لیپوپروتین باچگالی پایین[1]، پراکسیداسیون چربی لوزالمعده و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی در موش‌های دیابتی مورد بررسی قرار گرفته است (۲۲ و ۳۱). صفری و همکاران (۲۰۱۸)، گزارش کردند که تغذیه ٤۰۰ گرم هسته انار در روز به ازای هر گاو در دوره انتقال باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، کاهش غلظت گلوکز و مقاومت انسولینی و کاهش تری گلیسرید خون شده است (٤٦). بنابراین تفاله هسته انار به دلیل اثرات مثبت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی در تغذیه دام به‌عنوان یک خوراک جدید مورد توجه قرار گرفته، بدون اینکه اثرات استروژنیک آن بر وضعیت فیزیولوژیکی دام مورد بررسی قرار گیرد. لذا هدف از این آزمایش بررسی اثرات استروژنیک، تغذیه تفاله هسته انار بر غلظت استروژن و سایر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون بزهای سانن خشک غیرآبستن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سالن تحقیقات متابولیک دام سبک دانشکده کشاورزی بیرجند انجام شد. در این آزمایش ۱۸ رأس بز شیری خشک غیر آبستن سانن با ۳ تا ٤ شکم زایش با میانگین وزنی ٤٤/٨٥±٥/۱٦ مورد استفاده قرار گرفت. دام‌ها در باکس‌های انفرادی به ابعاد۲×۱/٥ متر با استفاده از شرایط نور طبیعی و به‌صورت آزادانه تغذیه شدند.

شرایط نگهداری، تغذیه، نمونه برداری و آسایش حیوانات منطبق با مصوبه کمیته اخلاق پژوهش‌زیستی گروه علوم دامی دانشگاه بیرجند فراهم گردید. تفاله هسته انار استفاده شده در این آزمایش مجموعه‌ای از ارقام بومی استان یزد بود که از کارخانه آبمیوه‌گیری در این استان به صورت تازه تهیه و در سایه خشک گردید. تیمارهای آزمایشی با ترکیب و اجزاء مندرج در جدول ۱ به ترتیب شامل گروه‌های زیر بود:

۱) تیمار شاهد ۲) جیره پایه با ۱۲ درصد تفاله هسته انار ۳) جیره پایه با ۱۲ درصد تفاله هسته انار و گاز ازون.

1- Low Density Lipoprotein (LDL)

جدول۱- ترکیب مواد خوراکی، ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی در بزهای غیر آبستن خشک سانن

Table 1. Feed ingredient and chemical composition of experimental diets in non-pregnant Saanen goats

جیره پایه با ۱۲٪ تفاله هسته انار+ گاز ازون Basal diet +12% pomegranate seed pulp + ozone gas	جیره پایه با ۱۲٪تفاله هسته انار Basal diet +12% Pomegranate seed Pulp	شاهد Control	مواد خوراکی Ingredient
31.05	31.05	31.00	ذرت Corn
0.00	0.00	12.00	سبوس گندم Wheat bran
12.00	12.00	0	تفاله هسته انار[1] Pomegranate seed pulp[1]
0.75	0.75	0.96	کربنات کلسیم Calcium carbonate
0.21	0.21	0.21	نمک Salt
0.43	0.43	0.43	مکمل معدنی و ویتامین[2] Minerals and Vitamins[2]
37.43	37.43	37.35	سیلاژ ذرت Corn Silage
10.70	10.70	10.67	کاه گندم Wheat straw
7.49	7.49	7.47	یونجه Alfalfa
	ترکیب جیره Composition		
2.32	2.32	2.29	انرژی قابل متابولیسم Metabolizable energy (Mcal kg^{-1})
3.30	3.30	2.20	چربی EE (%)
10.20	10.20	10.40	پروتئین خام Crude protein (%)
46.00	46.00	44.30	فیبر نامحلول در شوینده خنثی NDF (%)
34.70	34.80	36.90	کربوهیدرات غیر فیبری NFC (%)
7.70	7.70	8.10	خاکستر Ash (%)
1.38	1.38	1.36	کلسیم Calcium (%)
0.47	0.47	0.49	فسفر Phosphorous (%)

[1] Pomegranate proximate analysis (DM basis):DM:99.8%, GE(KCal/KgDM): 4720.9, NDF:5.8%, ADF:10.92%, CP:13.77%, EE:11.05%, Ash:2.49%, Ca: 1.53%, P: 0.23%, total tannins (as tannic acid equivalent):0.66% [2] Supplied per kg of diets: Vitamin A, 15,000 IU; Vitamin D, 2,000 IU; Vitamin E, 55 IU; Fe, 50 mg; Co, 0.2 mg; Cu. 12.0 mg; Se, 0.5 mg; Mn, 50 mg; I, 0.55 mg; Zn, 25 mg

استفاده از گاز ازون به عنوان تجزیه کننده عوامل استروژنیک در ٤ مرحله صورت گرفت: ۱) ابتدا تفاله هسته انار را داخل میکسر ریخته و پیوسته گاز ازون به داخل میکسر تزریق شد. ۲) تفاله هسته انار را پهن نموده و با آب حاوی گاز ازون محلول روی آن ریخته شد. ۳) تفاله هسته انار را در پلاستیک ریخته و

در داخل پلاستیک به فاصله ۲۰ دقیقه با ۵ بار تکرار گاز ازون تزریق شد. ٤) تفاله هسته انار به مدت یک روز در سایه خشک شد (۳۰). برای ارزیابی اثر گاز ازون دستگاه ازون ساز برقی ساخت ایران با مدل OX-237 دو رقم انار یزدی و کاشمری با روش فوق در معرض گاز ازون قرار گرفته و سپس عصاره متانولی (۱۰ گرم ماده خشک تفاله هسته انار در ۱۰۰ میلی لیتر متانول با استفاده از همزن چرخشی در دمای اتاق به مدت ۱۲ ساعت) آن جهت اندازه گیری میزان استروژن به روش الایزا استفاده شد. تیمارهای آزمایشی پس از یک دوره سازگار پذیری (۱ هفته) تا انتهای دوره آزمایش (دو چرخه فحلی) مورد تغذیه قرار گرفت. بزهای خشک سانن پس از همزمان‌سازی فحلی با استفاده از ۲ تزریق متوالی عضلانی پروستاگلاندین به فاصله ۱۱ روز هر بار به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به صورت تصادفی وارد طرح شدند (۵۵). به‌منظور اطمینان از همزمانی در چرخه فحلی بعدی، همزمان سازی فحلی مجددا با همان پروتکل سیکل اول انجام شده و روز اول چرخه مبنای روزهای نمونه برداری بعدی در چرخه فحلی دوم قرار گرفت جیره‌های آزمایشی پس از اولین همزمان‌سازی در دو نوبت صبح (۸:۰۰) و بعد از ظهر (۱٦:۰۰) در قالب جیره کاملاً مخلوط به‌صورت آزادانه در اختیار دام قرار گرفت. در چرخه دوم فحلی تنها در روزهای نمونه‌برداری خون، جیره بعد از ظهر به دلیل حذف اثر تغذیه بر نمونه برداری خون روز بعد پس از ۲ ساعت جمع‌آوری شد. نمونه‌گیری خون از سیاهرگ گردنی برای اندازه‌گیری هورمون استروژن در سرم در طول چرخه فحلی دوم به مدت ۲۱ روز و در روزهای صفر، ۱، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲، ١٤، ۱۵، ١٦، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱برای پایش سطح استروژن خون قبل از جیره صبحگاهی انجام شد. نمونه خون روزهای ٤، ١٦ و ۱۷ به دلیل کمترین نوسان غلظت استروژن در میان دام‌های آزمایشی بعداً به‌صورت آنالیز تکرار دار در زمان برای سنجش اثر تیمارها بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون و ارتباط آن با سطح استروژن مورد استفاده قرار گرفت (۳۹). نمونه‌های خون در لوله آزمایش ۱۰ میلی‌لیتری استریل بدون اتیلن دی آمین[1] ترا استیک اسید برای تهیه سرم و با **اتیلن دی آمین ترا استیک اسید** برای تهیه پلاسما به روش کاستیلو و همکاران (۲۰۰۵) جمع‌آوری شد (۷). نمونه‌های خون با نیروی ۱۵۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سرم و پلاسما در دمای ^{o}C ۲۰- تا زمان ارزیابی در چند نسخه پشتیبان نگهداری شد. فراسنجه‌های سرمی گلوکز، تری‌گلیسرید، کلسترول‌کل، آلکالین‌فسفاتاز، آسپارتات‌آمینوترانسفراز، آلانین آمینو ترانسفراز، کلسترول متصل به لیپوپروتئین با چگالی بالا، کلسترول متصل به لیپوپروتئین با چگالی پایین، پروتئین کل خون، آلبومین، کلسیم، فسفر، بتاهیدروکسی بوتیرات، بیلی روبین کل، بیلی روبین مستقیم، کراتینین، اوره، اوریک اسید با استفاده از کیت‌های تشخیصی شرکت پیشتاز طب و با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر Gesan chem 200 مورد آنالیز قرار گرفت.

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و مالون دی آلدهید در نمونه پلاسما پس از آماده‌سازی نمونه‌ها به‌ترتیب به روش بنزی و استرین (۱۹۹٦) و لاپنا و همکاران (۲۰۰۱) با دستگاه الایزا ریدر Tecan Sunrise انجام شد (٤ و۲۹). غلظت استروژن سرم و عصاره متانولی تفاله هسته انار با استفاده از کیت تشخیصی شرکت بایوکم و دستگاه الایزا ریدر تعیین شد. همچنین فراسنجه استرادیول استاندارد با آماره Z نرمال جهت استاندارد سازی و کاهش خطاهای درون گروهی و نیز سطح زیر منحنی استرادیول و استرادیول

1. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

استاندارد و نیز تداوم غلظت استرادیول (به مفهوم تعداد روزهایی که استرادیول بین دو نقطه حداقل غلظت در طول یک چرخه فحلی قرار داشته) محاسبه شد. سطح صفر متغییرها به‌عنوان کواریت در نظر گرفته شده و اثر تیمارهای آزمایشی و زمان با روش آنالیز داده‌های تکرار دار و با استفاده از رویه مخلوط نرم‌افزار SAS (V9.2) (۲۰۱۰) و آماره توکی- کرامر در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مدل آماری طرح به صورت زیر است که y_{ijk} مقدار متغییر مشاهده شده، μ میانگین کلی مشاهده، τi اثر ثابت تیمار، δ_{ij} کوواریانس بین اندازه گیری‌ها در هر حیوان، t_k اثر زمان، $(\tau^*t)_{ik}$ اثر متقابل زمان و تیمار، ε_{ijk} خطای تصادفی می باشد:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \delta_{ij} + t_k + (\tau^*t)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

نتایج و بحث

داده‌های تجزیه بیوشیمیایی استرادیول موجود در عصاره متانولی هسته انار به روش الایزا مربوط به دو رقم انار در جدول ۲ آمده است که نشان می‌دهد استرادیول موجود در دو رقم ۱ و ۲ قابل توجه بوده و اعمال تیمار گاز ازون توانسته به‌طور میانگین غلظت استرادیول را ۴۱ تا ۵۲ درصد در تفاله هسته انار در طی فرآوری کاهش دهد.

جدول ۲- آنالیز بیوشیمی استرادیول ($pg\ ml^{-1}$) موجود در عصاره متانولی (۱۰ گرم ماده خشک تفاله هسته انار در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول) تفاله هسته دو رقم انار با و بدون اعمال گاز ازون به روش الایزا.

Table 2. Biochemical analysis of estradiol ($pg\ ml^{-1}$) in methanolic extract (10 g of dry matter of pomegranate seed pulp in 100 ml of methanol) Core pulp of two pomegranate cultivars with and without ozone gas by ELISA method

ماده مورد آزمایش Experimental substances	رقم ۱ (کاشمری) Type 1 (Kashmari)	رقم ۲ (یزدی) Type 2 (Yazdi)
تفاله هسته انار Pomegranate seed pulp	252.069±0.951	174.703±0.870
تفاله هسته انار + گاز ازون Pomegranate seed pulp + ozone gas	118.707±1.081	101.880±0.996

نتایج مربوط به اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت استرادیول سرم بر اساس داده های تکراردار در زمان و نیز فراسنجه های کمی محاسبه شده بر اساس غلظت استرادیول در طول چرخه فحلی (پس از همزمان سازی فحلی دوم) در جدول ۳ نشان داده شده است. بر این اساس، مقدار استرادیول استاندارد در بین تیمارها از اختلاف معنادار برخوردار بود ($P<0/05$) در حالی که تفاوت غلظت استرادیول بین تیمارهای آزمایشی تمایل به معنی‌داری داشت ($P=0/07$). بیشترین مقدار استرادیول استاندارد در تیمار دوم (حاوی تفاله هسته انار بدون ازون) مشاهده شد. همچنین مقدار سطح زیر منحنی استرادیول و سطح زیر منحنی استرادیول استاندارد در تیمار دوم در مقایسه با سایر تیمارها به طور معنی داری بیشتر بود ($P<0/05$) علاوه بر این تداوم غلظت استرادیول (به مفهوم تعداد روزهایی که استرادیول بین دو نقطه حداقل غلظت در طول یک چرخه فحلی قرار داشته و از سطح پایه بالاتر است) در تیمار مربوط به تفاله هسته انار بدون ازون در مقایسه با سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری بالاترین مقدار را داشت ($P<0/05$).

جدول ۳- اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت استرادیول سرم براساس داده‌های تکرار دار در زمان و نیز فراسنجه‌های کمی محاسبه شده براساس غلظت استرادیول در طول چرخه فحلی (پس از همزمان سازی فحلی دوم)

Table 3. Effect of experimental treatments on estradiol and related calculated parameters during the estrus cycle (after second synchronization)

سطح معنی‌داری P-value	جیره پایه با ٪۱۲تفاله هسته انار+ گاز ازون BD +12% pomegranate seed pulp + ozone gas	جیره پایه با ٪۱۲تفاله هسته انار BD +12% Pomegranate seed Pulp	شاهد Control (Basal Diet (BD))	متغییرها variables
0.072	22.221±2.401	33.648±2.401	24.897±2.401	استرادیول[۲] Estradiol[2] (pg ml^{-1})
0.008	28.131±1.538[b]	33.366±1.538[a]	25.566±1.538[b]	استرادیول استاندارد[۶] Standard Estradiol [6]
0.001	543.913±15.747 [b]	605.121±15.747 [a]	515.125±15.747 [b]	سطح زیر منحنی استرادیول (سانتی‌متر مربع)[۳] Area (Cm^2) under the estradiol curve[3]
0.002	689.478±20.107[b]	781.779±20.107[a]	674.426±20.107[b]	سطح زیر منحنی استرادیول استاندارد Area (cm^2) under the standard estradiol curve
0.0001	11.802±0.406[b]	17.421±0.406[a]	16.540±0.406[a]	تداوم غلظت استرادیول (روز) Estradiol concentration persistency (day)[٤]

۱میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف در سطح ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی دار می باشند. ۲-به صورت تکرار شده در زمان در روزهای چرخه فحلی. ۳-بر اساس غلظت استرادیول در روزهای (۱، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲، ١٤، ١٥، ١٦، ١٧، ١٨، ١٩، ٢٠، ٢١) چرخه فحلی. ٤_ فاصله دو مینیمم غلظت استرادیول در چرخه فحلی (برحسب روز). ٥- تفاله هسته انار ٦- غلظت استرادیول نرمال شده با آماره نرمال استاندارد Z.

1-Averages with non-similar letters in each row have a significant difference (0.05). 2-Repeated measurements in days of estrus cycle. 3- Base on estradiol analysis in days of:1,2,4,6,8,10,12,14,15,16,17,18, 19, 20,21 in estrus cycle. 4- Distance of two minimums in estradiol concentration diagram for each treatment. 5-Pomegranate seed pulp 6- Normalized estradiol by Z.

هفتمن و همکاران (۱۹٦٦) نشان دادند که دانه‌های انار حاوی استروژن، استرون و استرادیول‌اند که مشابه با ترکیبات شیمیایی بیوسنتز شده بدن پستانداران عمل می‌کنند (۱۹). بر اساس گزارش کیم و همکاران (۲۰۰۰) استروژن هسته انار شامل دیگر استروئیدها مثل تستسترون، بتا-سیتوسترول، استیگما استرول، استریول و کامسترول نیز می‌شود (۲٦). بنابراین به نظر می‌رسد استروژن موجود در تفاله هسته انار توانسته غلظت استرادیول اندازه‌گیری شده سرم خون را در طول چرخه فحلی به‌صورت افزایشی تغییر دهد که این یافته با نظر موری- اوکاموتو و همکاران (۲۰۰٤) مبنی بر توانایی استروژنیک هسته انار مطابقت دارد (۳۸). بر اساس مطالعه وو و همکاران (۲۰۱۹) فیتواستروژن‌های غیراستروئیدی با ساختار شیمیایی ایزوفلاون‌ها[۱] (جنستئین[۲]، دیادزین[۳]) فلاون‌ها[٤] و کومستان‌ها[٥] نیز بر کاهش باروری در پستانداران موثرند و قادرند نقش استروژن طبیعی را تقلید نمایند (۵۸).

ووکلاوک- پوتوکا و همکاران (۲۰۱۳) بیان کردند که مراتع شبدر سرشار از استروژن‌های گیاهی باعث ناباروری در گوسفند شده است. همچنین در گاوهایی که با شبدر قرمز تغذیه شده بودند اختلال در باروری

1. Isoflavone
2. Genistein
3. Diadzein
4. Flavone
5. Coumestrol

گزارش شده است (۵۷). استروژن‌های محیطی اثرات خود را از طریق مسیرهای ژنومی یا غیرژنومی اعمال می‌کنند و با توجه به شباهت آنها به هورمون‌های درون زاد، این ترکیبات می‌توانند به گیرنده‌های هسته ای متصل شوند. بنابراین بسته به نوع فعالیت آگونیست یا آنتاگونیست می‌توانند در عملکرد ۱۷-بتا استرادیول حضور داشته باشند (۴۳).

ماتیسون و کینز (۱۹۸۰) اتصال فیتواستروژن‌ها به گیرنده استرادیول در غده هیپوفیز و هیپوتالاموس را مورد مطالعه قرار دادند. این نویسندگان اظهار داشتند که فیتواستروژنها می‌توانند در مکانیسم استرادیول که هورمون LH را در میش آزاد می‌کند تداخل ایجاد کنند، با این حال تأثیر فیتواستروژنها بر ترشح LH وابسته به نوع فیتواستروژن، وضعیت تولیدمثلی و فصل است (۳۴). ورواردو و همکاران (۲۰۱۴) غلظت ترکیبات فیتواستروژن فعال در روغن هسته ۱۷ رقم مختلف انار را اندازه‌گیری نموده و نشان دادند که به ترتیب سیتوسترول، دلتا-۵- اوناسترول[1] و کامسترول بیشترین غلظت فیتواستروژن‌ها را به خود اختصاص می دهند (۵۳). چاتوپادی و همکاران (۲۰۰۵) و بن سعید و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که سیتواسترول موجود در ترکیبات گیاهی قادر است از تحرک اسپرم بز و بلوغ تخمک در تخمدان بزهای ماده جلوگیری کند (۸ و ۵). با این وجود بررسی این اثرات احتمالی نیازمند مطالعات بیشتری می باشد.

بر اساس نتایج (جدول ۳) هر سه متغییر استرادیول استاندارد و سطح زیر منحنی استرادیول و استرادیول استاندارد در تیمار حاوی ازون به‌طور معنی‌دار و غلظت استرادیول سرم به‌صورت عددی نسبت به تیمار دوم کاهش یافت. متغییر تداوم غلظت استرادیول در طول چرخه فحلی که به طول دوره ترشح استرادیول اشاره دارد، در تیمار دوم نسبت به کنترل افزایش عددی و در تیمار سوم به طور معنی داری نسبت به سایر تیمارها کاهش یافت. هوبر و همکاران (۲۰۰٤) گزارش کردند ازون به عنوان یک ضد عفونی کننده قادر به حذف ترکیبات دارویی و استروئیدها است (۲۳). بنابراین کاهش استرادیول در تیمار ۳ و نیز در آزمایش گزارش شده در جدول ۲ بر روی هسته دو رقم انار می‌تواند ناشی از نقش ضد فیتواستروژنی ازون در ترکیب جیره باشد. در جدول ٤ نتایج مربوط به تأثیر تیمارهای آزمایشی بر متغیرهای تغذیه‌ای و خونی مرتبط با پروتئین و انرژی در روزهای ٤، ١٦ و ١٧ چرخه فحلی به صورت آنالیز تکرار شده در زمان در بزهای خشک غیر آبستن سانن نشان داده شده است. بر اساس نتایج، جایگزینی تفاله انار با سبوس در سطح ۱۲ درصد جیره علی رغم نوسانات مشاهده شده و تأثیر معنی‌دار بر مصرف خوراک، تأثیر معنی‌داری بر متغیرهای بیوشیمیایی خون ندارد. با توجه به اینکه تفاله انار و گاز ازون به‌ترتیب به‌عنوان افزاینده و کاهنده حاشیه‌ای استرادیول سرم در تیمارهای ۲ و ۳ نسبت به شاهد عمل نموده اند و این تغییرات در سطح زیر منحنی استرادیول در یک چرخه فحلی مانیتور شده، از لحاظ آماری معنی‌دار است، به نظر می رسد تأثیر بر پارامترهای خونی دارای سامانه‌های هموستازی مستقل، به عنوان نتایج ثانویه نیازمند سطوح بالاتری از تغییرات استرادیول باشد.

لازم به ذکر است که این عدم معنی داری نمی‌تواند بی اثر بودن استرادیول ناشی از فیتواستروژن افزایش یافته ناشی از جایگزینی تفاله هسته انار را بر فراسنجه‌های هورمونی تایید کند، چرا که یافته‌های مکرری دال بر مسیرهای مولکولی موثر بر تنظیم بیان ژن هورمون‌های تولید مثلی برای فیتواستروژن‌ها گزارش شده است. برای مثال تزریق برخی

1. Δ5 -Avenasterol

فیتواستروژن‌ها درصد بیان ژن هورمون محرک رشد فولیکول را افزایش داده است (٤٤).

مصرف ماده خشک خوراک به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمار ۲ با بالاترین سطح استروژن کاهش یافته است. گوتش (۲۰۱۹) بیان کرد افزایش هورمون استروژن و نسبت استروژن به پروژسترون در بزهای سانن دو قلو آبستن یک از دلایل هورمونی کاهش مصرف خوراک می‌باشد (١٦). بوترا (۲۰۱۰) گزارش کرد که اثر افزایشی گرلین بر اشتها توسط تیمار نمودن رت‌های بدون تخمدان با استرادیول بنزوات بی اثر می‌گردد. همچنین در تیمار بدون گرلین نیز استفاده از استرادیول باعث کاهش شدید اشتها می‌گردد (٦). در گزارش نیکخواه (۲۰۱۸) نیز بر اثر کاهشی استروژن بر مصرف خوراک در نشخوارکنندگان و تک معده‌ای‌ها تاکید شده است (٤٠).

بنابراین افزایش معنی دار غلظت استروژن سرم در تیمار ۲ در اثر تفاله انار احتمالاً می‌تواند یکی از دلایل کاهش مصرف خوراک در بزهای سانن مورد آزمایش باشد. براساس یافته‌های آزمایش قابلیت هضم ماده خشک تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت. استنلی و همکاران (۱۹۹۳) تغییرات قابل توجه غلظت استرادیول پیرامون زایش در گاو شیری بر قابلیت هضم ماده خشک جیره را همانند مطالعات قبلی بر روی بره‌های پرواری در معرض ترکیبات استروژنیک بی اثر گزارش نمودند (٤٩ و ٥٠).

گلوکز در تیمار ۲ به لحاظ عددی (P=۰/٥٤) نسبت به تیمار ۳ و ۱ کاهش یافته است. بتا هیدروکسی بوتیرات در تیمار ازون نسبت به تیمار شاهد و تیمار تفاله هسته انار به‌طور عددی کاهش نشان می‌دهد، هر چند تفاوت بین تیمارها از لحاظ آماری معنی‌دار نیست. همان طور که انتظار می‌رود رابطه منطقی و معکوسی میان سطح گلوکز سرم و کتون بادی بتا هیدروکسی بوتیرات برقرار است. موایس- جرویس و همکاران (۲۰۱۳) بیان نمودند، استروژن با افزایش حساسیت به انسولین منجر به کاهش گلوکز خون می گردد (۳۵). گرومر و همکاران (۱۹۹۰) نشان دادند که سطح بتا هیدروکسی بوتیرات در گاوهای خشک تیمار شده با ۱۵ میلی‌گرم در روز استروژن به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (۱۷). براساس آنالیز استروژن تفاله هسته انار و بر اساس مصرف خوراک روزانه و درصد تفاله در جیره بزهای سانن در آزمایش حاضر در تیمار ۲ در حدود ۰/۱۲ میکرو گرم در روز استروژن از منبع تفاله هسته انار دریافت نموده اند که در مقایسه با دوز بالای مطالعه گرومر و همکاران (۱۹۹۰) بسیار ناچیز است (۱۷)، اما الگوی تغییرات غیر معنی‌دار مشاهده شده کتون بادی و گلوکز در مطالعه حاضر با آزمایش فوق الذکر مطابقت دارد. بر همین اساس حذف استروژن از جیره توسط گاز ازون در تیمار ۳ توانسته کتون بادی را کاهش و گلوکز را افزایش دهد که این الگو در حذف فیتواستروژن ها می تواند به‌عنوان راه کاری در کاهش عوارض فیتواستروژن‌ها در جیره‌های صنعتی مورد استفاده قرار گیرد. تغییرات آلبومین نیز در بین تیمار ها تفاوت معنی داری نشان نداد، هر چند از لحاظ عددی تیمار ۲ پایین‌ترین مقدار را به خود اختصاص داده است. مرادی و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که آلبومین با استرادیول باند می‌شود و غلظت آلبومین در حضور استرادیول بالا کاهش می‌یابد (۳۷). ویلیامز و همکاران (۱۹۷۸) نشان دادند که بیان ژن آلبومین در سلول‌های کبدی در اثر القای استروژن کاهش می یابد، که احتمالاً با کاهش آلبومین در تیمار ۲ با وجود استروژن سرمی بالاتر در ارتباط باشد (٥٦). تغییرات گلوبولین نیز مانند سایر فراسنجه‌های خونی از لحاظ آماری معنی دار نیست هرچند این متغییر در تیمار ۲ بالاترین مقدار را به

خود اختصاص داده است که احتمالاً بـه دلیـل وجـود اسـتروژن بـالای موجـود در ایـن تیمـار باشـد. بـر اساسگزارش میچل-هارمن و همکاران (۲۰۱۳) انتظـار می‌رود که استروژن باعث تحریک سـاخت گلوبـولین شود (۳۶).

جدول ٤- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر متغییرهای تغذیه ای پایان دوره و فراسنجه‌های خونی مرتبط با انرژی، پروتئین و مواد معـدنی در روزهای (٤، ١٦ و ١٧) چرخه فحلی به صورت آنالیز تکرار شده در زمان در بزهای خشک غیر آبستن سانن

Table 4. Effect of treatments on final nutritional variables and energy, protein, and mineral associated blood parameters in non-pregnant dry Saanen goats as repeated measurements

سطح معنی-داری P-value	جیره پایه با ٪۱۲تفاله هسته انار+ گاز ازون pomegranate BD[3] +12% seed pulp + ozone gas	جیره پایه با ٪۱۲تفاله هسته انار BD[3] +12% Pomegranate seed Pulp	شاهد (جیره پایه) Control (BD[3])	متغییرها[1] Variables[1]
0.05	0.618±0.016[ab]	0.587±0.014[b]	0.643±0.016[a]	مصرف ماده خشک روزانه (kg) Dry matter intake (kg)
0.95	55.82±4.76	55.25±4.39	54.05±4.76	قابلیت هضم ماده خشک (٪) DM digestibility (%)
0.54	97.08±3.52	92.91±2.97	96.97±3.00	گلوکز (میلی گرم در دسی لیتر) Glucose (mg dl^{-1})
0.32	0.073±0.035	0.148±0.029	0.135±0.030	بتاهیدروکسی بوتیرات BHBA[2] (mmol dl^{-1})
0.7	3.48±0.10	3.36±0.08	3.40±0.08	آلبومین (گرم در دسی لیتر) Albumin (g dl^{-1})
0.54	1.94±0.18	2.23±0.15	2.05±0.16	گلوبولین globulin (g dl^{-1})
0.42	5.36±0.14	5.57±0.12	5.55±0.14	پروتئین کل Total protein (mg dl^{-1})
0.67	14.75±1.49	12.94±1.37	13.77±1.48	اوره Urea (mg dl^{-1})
0.67	6.88±0.70	6.04±0.64	6.43±0.69	نیتروژن اوره‌ای خون BUN (mg gl^{-1})
0.54	0.88±0.05	0.93±0.05	0.85±0.05	کراتینین Creatinine (mg dl^{-1})
0.41	10.36±2.14	6.64±1.90	7.58±2.07	کراتینین / نیتروژن اوره‌ای خون BUN/ Creatinine
0.30	0.087±0.009	0.079±0.008	0.069±0.009	بیلی روبین مستقیم Direct bilirubin (mg dl^{-1})
0.22	0.320±0.013	0.292±0.012	0.322±0.013	بیلی روبین کل Total bilirubin (mg dl^{-1})
0.74	2.46±1.37	3.05±1.27	3.98±1.37	اوریک اسید Uric acid (mg dl^{-1})
0.81	1.66 ± 0.08	1.72 ± 0.08	1.65 ± 0.09	کلسیم Calcium (mg dl^{-1})
0.05	1.94 ± 0.10[a]	1.62 ± 0.10[b]	1.75 ± 0.10[ab]	فسفر Phosphorus (mg dl^{-1})

[1] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵).

[1]Means within same row with different Latin alphabets differ significantly (P<0.05). [2] BHBA= Beta-hydroxy butyrate [3] BD= Basal Diet

پروتئین کل در تیمار تفاله هسـته انـار نسـبت بـه تیمارها از لحـاظ آمـاری اخـتلاف معنـی‌داری وجـود تیمار ۱ و خصوصا تیمار ۳ بالاتر بـود هـر چنـد بـین

نداشت (P=۰/۴۲). الجندی و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند مکانیسم عمل استروژن برای سنتز پروتین حیاتی است و استروژن به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم سنتز پروتین را تحریک می کند. بنابراین انتظار می‌رود بالاترین پروتئین کل در تیمار ۲ و کمترین مقدار در تیمار ۳ مشاهده گردد (۱۲). نتایج نشان داد که اوره و نیتروژن اوره‌ای خون در تیمار ۲ کمترین مقدار و در تیمار تحت تأثیر ازون بیشترین مقدار را نسبت به سایر تیمارها به خود اختصاص دادند، هرچند این تغییرات از لحاظ آماری معنی دار نبود. مطالعه الجندی و همکاران (۲۰۱۹) نشان می‌دهد تیمار نمودن رت‌های بدون تخمدان با استرادیول منجر به کاهش اوره و نیتروژن اوره ای خون می گردد که احتمالاً به دلیل نقش استرادیول در ممانعت از اکسیداسیون پروتئین‌ها و بهبود عملکرد کلیه می باشد (۱۲). گزارش ترنکل (۱۹۷۶) نشان می دهد که نقش آنابولیک استروژن منجر به کاهش تجزیه پروتئین می گردد (۵۱). بنابراین افزایش عددی فراسنجه‌های مذکور در تیمار ۳ می تواند احتمالاً ناشی از تخریب و حذف استروژن باشد.

کراتینین در بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. نسبت نیتروژن اوره‌ای خون به کراتینین شاخصی از دفع آب بدن یا آسیب کلیوی است که در اثر تیمار ۳ به صورت عددی و غیر معنی‌دار افزایش نشان می‌دهد (۴۱). گرایش دام‌ها به دفع آب بدن در اثر مسمومیت ناشی از پراکسیداسیون چربی‌ها از قبیل آلکانال‌ها، آلکنال‌ها معمولاً رخ می‌دهد (۴۸). گاز ازون یک عامل اکسیداتیو بالقوه است که احتمالاً قادر است چربی‌های موجود در جیره را به مشتقات پراکسیداسیون لیپیدی تبدیل نماید. هرچند اثر تیمارهای آزمایشی بر میزان مالون دی آلدهید معنی‌دار نیست (جدول ۶) اما در تیمار ۳ بالاترین مقدار را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه تفاله هسته انار حاوی مقادیر قابل توجهی از روغن‌های غیراشباع می‌باشد، انتظار می‌رود در تقابل با ازون مستعد به پراکسیداسیون باشد.

شواهدی نظیر بالا رفتن نیتروژن اوره‌ای خون، نسبت بالاتر نیتروژن اوره‌ای خون به کراتینین در تیمار ازون احتمالاً به این دلیل است که تخریب اکسیداتیو عضلانی منجر به بالا رفتن اوره موجود در خون شده که به تبع آن دفع کلیوی اوره برای حفظ هموستازی بدن افزایش می‌یابد. مطالعات فینفلد و دانوویچ (۱۹۸۷) نشان می‌دهد که میزان دفع اوره عامل کلیدی تعیین کننده دفع آب از طریق افزایش حجم ادرار است (۱۳). مطالعات دیبنر و همکاران (۱۹۹۶) نیز افزایش نرخ تخریب اکسیداتیو و باز سازی بافت‌های بدن در نتیجه مشتقات پراکسیداسیون اسیدهای چرب را عامل تولید متابولیت‌های سمی زائد و افزایش دفع کلیوی آن‌ها به همراه آب معرفی می‌نمایید که در میزان نسبت نیتروژن اوره ای به کراتینین افزایش یافته در تیمار ۳ به صورت غیر معنی دار مشاهده می‌گردد (۱۱). همین موضوع نیز احتمالاً به‌دلیل تصفیه کلیوی بالاتر نرخ شستشو و ناپدید شدن اسید اوریک از خون را نیز می تواند افزایش دهد (۲۱). بنابراین انتظار می‌رود غلظت اسید اوریک در تیمار ۳ کاهش یابد، هرچند این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نیست. بیلی‌روبین مستقیم و کل در بین تیمارهای آزمایشی تغییرات و رویه معنی داری را نشان نمی‌دهد.

جدول ۵- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر پارامترهای خونی مرتبط با چربی در روزهای (٤، ١٦ و ١٧) چرخه فحلی بـه صـورت آنـالیز تکرار شده در زمان در بزهای خشک غیرآبستن سانن.

Table 5.Effect of Experimental treatments on the blood metabolites associated with fat and cholesterol in non-pregnant dry Saanen goats as repeated measurements

متغییرها variables	شاهد(جیره پایه) Control (BD[1])	جیره پایه با ٪۱۲تفاله هسته انار BD[1] +12% Pomegranate seed Pulp	جیره پایه با ٪۱۲تفاله هسته انار+ گاز ازون BD[1] +12% pomegranate seed pulp + ozone gas	سطح معنی-داری P-value
کلسترول Cholesterol (mg dl^{-1})	61.67 ± 4.25	69.06 ± 3.93	68.80 ± 4.25	0.39
لیپوپروتئین با چگالی بالا HDL (mg dl^{-1})	26.48 ± 1.98	27.70 ± 1.82	27.26 ± 1.99	0.89
لیپوپروتئین با چگالی پایین LDL (mg dl^{-1})	30.92 ± 2.02	33.71 ± 1.85	34.11 ± 2.02	0.43
تری گلیسرید Triglyceride (mg dl^{-1})	24.83 ± 2.98	29.92 ± 2.76	34.88 ± 2.99	0.08
نسبت کلسترول به HDL Cholesterol/HDL	2.36 ± 0.09	2.51 ± 0.08	2.55 ± 0.09	0.34

[1] BD=Basal Diet

بـر اسـاس نتـایج (جـدول ٤) کلسـیم نوسـانات معنی‌داری در اثر تیمارهای آزمایشـی نـدارد. گـرایش افزایشی کلسیم سـرمی در تیمـار ۲ و بازگشـت آن در تیمار ۳ می تواند با غلظت اسـترادیول در گـروه‌هـای مذکور در ارتبـاط باشـد.هانسـن و همکـاران (۲۰۰٤) نشان دادند هورمون استرادیول با اثـر بـر بیـان بیشـتر گیرنده‌های کلسیمی روده و باز جـذب بیشـتر کلسـیم دفعی می تواند باعث افـزایش سـطح کلسـیم در بـدن گردد (۱۸). فسفر در تیمار ۳ نسبت به تیمـار ۲ دارای افزایش معنی‌داری بود (P<۰/۰۵). همچنین فسـفر در تیمار ۲ نسبت به شاهد روند کاهشی نشان مـی دهـد. از آنجایی که در تیمار ۲ فسفر روند کاهشی و کلسـیم روند افزایشی نشان می دهد می‌توان نتیجه گرفت کـه احتمالاً اثرات استروژنیک در تغییرات دخیل باشد.

وایـدال و همکـاران (۲۰۰۳) گـزارش کردنـد کـه استفاده از عصاره هیدروالکلی کل میوه انار بـا غلظـت ۰/٤ تا ۷ میلـی‌گـرم در کیلـوگرم وزن بـدن رت‌هـای ویستار به‌ترتیـب باعـث افـزایش و کـاهش کلسـیم و فسفر خون به صورت غیر معنی دار شد کـه بـا رونـد نتـایج حاصـل از ایـن آزمـایش مطابقـت دارد (٥٤).

بانسـال و همکـاران (۲۰۱۳) گـزارش کردنـد کـه استروژن باعث افزایش تراکم مـواد معـدنی اسـتخوان می‌شود و تأثیر مهمی بر هموستازی متابولیسم کلسـیم و فسفر دارد، از جمله استروژن دفع کلسـیم از طریـق ادرار را کاهش و دفع فسفر از ادرار را تحریک می‌کند که این گزارش با یافته‌هـای حاصـل از ایـن آزمـایش مطابقت دارد. همچنین حـذف اثـرات اسـتروژنیک در تیمار ۳ می‌تواند افزایش فسفر سـرمی را توجیـه کنـد (۳). در جـدول ۵ تـأثیر تیمارهـای آزمایشـی بـر پارامترهـای خـونی مـرتبط بـا چربـی و کلسـترول در روزهای (٤، ١٦ و ١٧) چرخه فحلی به صورت تکرار شده در زمان نشان داده شده اسـت. بـر اسـاس نتـایج تفـاوت معنـی‌داری بـین تیمـارهـای آزمایشـی در متغیرهای لیپیدی خون بزهای سانن خشک غیر آبستن مشاهده نشد. این در حـالی اسـت کـه هـر دو گـروه دریافت کننده تفاله هسـته انـار در اثـر جـایگزینی بـا سبوس به ناچار از ۱ درصـد عصـاره اتـری بـالاتر در جیره برخوردار بودند که این موضوع خود را در روند افزایشی غیر معنـی‌دار متغیـرهـا در تیمـارهـای ۲ و ۳ نسبت به شاهد نشان می دهد.

جدول ٦- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر پارامترهای خونی مرتبط با فراسنجه‌های آنتی اکسیدانی و آنزیم‌های کبدی در روزهای (٤، ١٦ و ١٧) چرخه فحلی به صورت آنالیز تکرار شده در زمان در بزهای خشک غیرآبستن سانن

Table 6. Effect of Experimental treatments on the blood metabolites associated with hepatic antioxidant and enzymatic parameters in non-pregnant dry Saanen goats as repeated measurements

سطح معنی‌داری P-value	جیره پایه با ٪۱۲تفاله هسته انار+ گاز ازون BD[1] +12% pomegranate seed pulp + ozone gas	جیره پایه با ٪۱۲تفاله هسته انار BD[1] +12% Pomegranate seed Pulp	شاهد(جیره پایه) Control (BD[1])	متغییرها variables
0.12	74.47 ± 26.07	105.96 ± 24.36	135.71 ± 26.49	آلکالین فسفاتاز (واحد در لیتر) ALP (U l^{-1})
0.45	242.63 ± 10.08	257.09 ± 9.20	259.29 ± 9.94	آسپارتات آمینو ترانسفراز AST (U l^{-1})
0.19	66.20 ± 5.29	79.19 ± 4.92	69.06 ± 5.29	آلانین آمینو ترانسفراز ALT (U l^{-1})
0.77	3.81± 0.50	3.45 ± 0.42	3.34 ± 0.44	مالون دی آلدهید Malone DiAldehyde
0.56	1953.34 ± 186.72	1914.68 ± 174.01	2153.41 ± 186.71	ظرفیت آنتی اکسیدانی کل Total Antioxidant Capacity

[1] BD=Basal Diet

این وضعیت در متغییر تری گلیسرید از الگوی متفاوتی پیروی می کند، به این نحو که این متغییر در تیمار ۲ نسبت به تیمار ۳ روند کاهشی نشان می‌دهد. موویس- جرویس و همکاران (۲۰۱۳) بیان کردند که استروژن با افزایش حساسیت به انسولین منجر به کاهش تجمع تری گلیسیرید در سرم می گردد که روند کاهشی مشاهده شده در تیمار ۲ نسبت به تیمار ۳ را توجیه می‌کند (۳۵). همین رویه در نسبت کلسترول تام به کلسترول با چگالی بالا که نشان دهنده ریسک بیماری‌های قلبی و عروقی است نیز مشاهده می گردد (۳۲).

در جدول ٦ تأثیر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های خونی مرتبط با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های کبدی در روزهای (٤، ١٦ و ١٧) چرخه فحلی به روش آنالیز داده‌های تکرار شده در زمان نشان داده شده است. بر اساس نتایج هیچ تفاوت معنی داری در میان تیمار ای آزمایشی در متغییرهای گزارش شده در جدول ٦ مشاهده نشد. آلکالین فسفاتاز و آسپارتات آمینو ترانسفراز در هر دو تیمار حاوی تفاله هسته انار نسبت به تیمار شاهد روندی کاهشی نشان دادند که می تواند به دلیل نقش آنتی اکسیدانی ترکیبات پلی فنولی هسته انار باشد. روند افزایشی آلانین آمینو ترانسفراز در تیمار تفاله هسته انار احتمالاً می تواند به دلیل وجود استروژن موجود در تفاله هسته انار باشد. از آنجا که آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز به طور اختصاصی تر به سلامت کبدی ارجاع داده می شود روند افزایشی مشاهده شده است. در مطالعه زوکزاک-درابارکزیک و همکاران (۲۰۱۳) گزارش شده که ۱۷ بتا استرادیول با ایجاد استرس اکسیداتیو قادر به تخریب اسیدهای نوکلئیک می‌باشد (۵۹). از آنجا که سلول‌های کبدی در برابر این تخریب حساس هستند، یافته مذکور را می توان با بالاتر بودن غلظت سرمی استرادیول در این تیمار مرتبط دانست.

همانطور که قبلا اشاره شد مالون دی آلدهید در تیمار حاوی هسته انار و گاز ازن نسبت به تیمار هسته انار افزایش غیر معنی‌داری را نشان می‌دهد. از آنجایی که تیمار ۲ و ۳ حاوی۱٪ روغن است این

احتمال وجود دارد که ازون موجود در تیمار ۳ باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و باعث افزایش مالون دی آلدهید به عنوان شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدی شده باشد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمار ۲ نسبت به تیمار شاهد و تیمار ۳ روندی غیر معنی دار و کاهشی نشان می دهد در حالی که انتظار می رود ترکیبات پلی فنولی هسته انار این میزان را افزایش دهد. فاکتورهایی که بر روی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل اثر مثبت می‌گذارند شامل آلبومین، بیلی‌روبین کل و اسید اوریک است که دارای روند کاهشی در تیمار ۲ بوده اند (٤). این احتمال وجود دارد که بخشی از کاهش مشاهده شده در ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در تیمار ۲ ناشی از کاهش این سه فراسنجه و بخشی مرتبط با اثرات اکسیداتیو استروژن بر اندام‌ها و غشاهای بدن باشد که منجر به مصرف توان احیای آهن پلاسما گردیده است (۹).

نتیجه گیری کلی

بر اساس نتایج، برآیند سه اثر در رفتار تیمارهای آزمایشی در خصوص فراسنجه‌های آنتی اکسیدانی و لیپیدی مشاهده می گردد که بسته به نوع فراسنجه مورد مطالعه و مکانیسم تأثیر بر فراسنجه، تفسیر متفاوتی را می توان ارایه داد. ۱- افزایش ۱ درصدی عصاره اتری در دو تیمار حاوی تفاله هسته انار نسبت به تیمار شاهد و پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از ازون در تیمار ۳ به عنوان یک اثر قابل مشاهده است. ۲- بالاتر بودن ترکیبات پلی فنولی دارای نقش آنتی اکسیدانی در هر دو تیمار دارای تفاله انار یکی از عوامل موثر بر نتایج است. ۳- اثرات استروژنیک تیمار ۲ نسبت به سایر تیمارها بر رفتار متغییرها موثر است. به طور کلی سطح ۱۲ درصد تفاله هسته انار در جیره بزهای سانن در گامه فیزیولوژیکی مورد مطالعه اثر منفی بارزی بر فرآیندهای طبیعی دام نداشته است. لذا پیشنهاد می گردد سطوح بالاتر تفاله هسته انار در مراحل مختلف فیزیولوژیکی بزهای سانن و نیز سایر گونه‌های پرورشی جهت تعیین دامنه ایمن استفاده از این ترکیب حاوی فیتواستروژن مورد مطالعه قرار گیرد.

منابع

1. Ain, K.B., Refetoff, S., Sarne, D.H. and Murata, Y. 1988. Effect of estrogen on the synthesis and secretion of thyroxine-binding globulin by a human hepatoma cell line, Hep G2. Molecular Endocrinology. 2 (4):313-323.
2. Artik, N. 1998. Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. Fruit Processing, 8:492-499.
3. Bansal, N., Katz, R., de Boer, I.H., Kestenbaum, B., Siscovick, D.S., Hoofnagle, A.N. and Li, D. 2013. Influence of estrogen therapy on calcium, phosphorus, and other regulatory hormones in postmenopausal women: the MESA study. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 98 (12):4890-4898.
4. Benzie, I.F. and Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Analytical biochemistry. 239 (1):70-76.
5. Bin Sayeed, M.S., Karim, S., Sharmin, T. and Morshed, M.M. 2016. Critical analysis on characterization, systemic effect, and therapeutic potential of beta-sitosterol: a plant-derived orphan phytosterol. Medicines (Basel). 3(4):29-54.
6. Butera, P.C. 2010. Estradiol and the control of food intake. Physiology and Behavior. 99(2):175-180.
7. Castillo, C.,J. Hernandez., A. Bravo., M. Lopez-Alonso., V. Pereira. and J.L. Benedito. 2005. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. Veterinary Journal. 169:286-292.
8. Chattopadhyay, D., Dungdung, S.R., Mandal, A.B. and Majumder, G.C. 2005. A potent

sperm motility-inhibiting activity of bioflavonoids from an ethnomedicine of Onge, Alstonia macrophylla Wall ex A. DC, leaf extract. Contraception. 71(5):372-378.
9. Cornelli, U., Belcaro, G., Cesarone, M.R. and Finco, A. 2013. Analysis of oxidative stress during the menstrual cycle. Reproductive Biology and Endocrinology. 11(1):74.
10. Coronado, S.A., Trout, G.R., Dunshea, F.R. and Shah, N.P. 2002. Antioxidant effects of rosemary extract and whey powder on the oxidative stability of wiener sausages during 10 months frozen storage. Meat Science. 62(2):217-224.
11. Dibner, J.J., Atwell, C.A., Kitchell, M.L., Shermer, W.D. and Ivey, F.J. 1996. Feeding of oxidized fats to broilers and swine: effects on enterocyte turnover, hepatocyte proliferation and the gut associated lymphoid tissue. Animal Feed Science and Technology. 62(1):1-13.
12. El-Gendy, A.A., Elsaed, W.M. and Abdallah, H.I. 2019. Potential role of estradiol in ovariectomy-induced derangement of renal endocrine functions. Renal failure. 41 (1):507-520.
13. Feinfeld, D.A, Danovitch, G.M.1987. Factors affecting urine volume in chronic renal failure. American Journal of Kidney Disease. 10(3):231-5.
14. Ghiasi, S.E., Valizadeh, R. and Naserian, A.A. 2016a. Effect of feeding oxidized soybean oil with pomegranate seed on the blood antioxidant capacity, enzyme activity and inflammatory factors of periparturient saanen goats. Journal of Animal Science. 29(111):191-210. (In Persian)
15. Ghiasi, S., Valizadeh, R. and Naserian, A. 2016b. Effect of feeding oxidized soybean oil against antioxidant role of pomegranate seed on physiology and metabolism of periparturient saanen goats. Iranian Journal of Animal Science. 8 (1):1-17. (In Persian).
16. Goetsch, A.L. 2019. Recent research of feeding practices and the nutrition of lactating dairy goats. Journal of Applied Animal Research. 47 (1):103-114.
17. Grummer, R.R., Bertics, S.J., Lacount, D.W., Snow, J.A., Dentine, M.R. and Stauffacher, R.H. 1990. Estrogen induction of fatty liver in dairy cattle. Journal of Dairy Science. 73(6): 1537-1543.
18. Hansen, K.K., Beck, M.M., Scheideler, S.E. and Blankenship, E.E. 2004. Exogenous estrogen boosts circulating estradiol concentrations and calcium uptake by duodenal tissue in heat-stressed hens. Journal of Poultry Science. 83(6):895-900.
19. Heftmann, E., Ko, S.T. and Bennett, R.D. 1966. Identification of estrone in pomegranate seeds. Phytochemistry. 5 (6):1337-1339.
20. Heshmati. H.M. Khosla. S. Robins. S.P. O'Fallon. W.M. Melton. L.J. and Riggs. B.L. 2002. Role of low levels of endogenous estrogen in regulation of bone resorption in late postmenopausal women. Journal of Bone and Mineral Research. 17(1):172-178.
21. Howard, S.C., Pui, C.H. and Ribeiro, R.C. 2014. Tumor lysis syndrome. In Renal Disease in Cancer Patients. Academic Press. Pp:39-64.
22. Huang.T.H.W. Peng, G. Kota, B.P. Li, G.Q. Yamaha, J. Roufogalis. B.D. and Li. Y. 2005. Pomegranate flower improves cardiac lipid metabolism in a diabetic rat model: role of lowering circulating lipids. British Journal of Pharmacology. 145(6):767-774.
23. Huber. M.M. Ternes. T.A. and Von Gunten. U. 2004. Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of 17α-ethinylestradiol. Environmental Science and Technology. 38(19):5177-5186.
24. Jones, M.E., Thorburn, A.W., Britt, K.L., Hewitt, K.N., Wreford, N.G., Proietto, J. and Simpson, E.R. 2000. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 97 (23):12735-12740.
25. Jeune, M. L., Kumi-Diaka, J. and Brown, J. 2005. Anticancer activities of pomegranate extracts and genistein in human breast cancer cells. Journal of Medicinal Food. 8(4):469-475.
26. Kim, N.D., Mehta, R., Yu, W., Neeman, I., Livney, T., Amichay, A. and Mansel, R. 2002. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment. 71 (3):203-217.
27. Kotsampasi, B., Christodoulou, V., Zotos, A., Liakopoulou-Kyriakides, M., Goulas, P.,

Petrotos, K. and Bampidis, V.A. 2014. Effects of dietary pomegranate by-product silage supplementation on performance, carcass characteristics and meat quality of growing lambs. Animal Feed Science and Technology. 197:92-102.
28. Lansky, E.P., Harrison, G., Froom, P. and Jiang, W.G. 2005.Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel™. Investigational New Drugs. 23(2):121-122.
29. Lapenna, D., Ciofani, G., Pierdomenico, S.D., Giamberardino, M.A. and Cuccurullo, F. 2001. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxidesin human plasma. Free Radical Biology and Medicine. 31(3):331-335.
30. Lassonde, G., Nasuhoglu, D., Pan, J.F., Gaye, B., Yargeau, V. and Delbes. G. 2015. Ozone treatment prevents the toxicity of an environmental mixture of estrogens on rat fetal testicular development. Reproductive Toxicology. 58:85-92.
31. Lei, F., Zhang, X.N., Wan, W., Xing, D.M., Xie, W.D., Su, H. and Du, L.J. 2007. Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. International Journal of Obesity. 31 (6):1023-1029.
32. Lemieux, I., Lamarche, B., Couillard, C., Pascot, A., Cantin, B., Bergeron, J. and Després, J. P. 2001. Total cholesterol/HDL cholesterol ratio vs LDL cholesterol/HDL cholesterol ratio as indices of ischemic heart disease risk in men: the Quebec Cardiovascular Study. Archives of Internal Medicine. 161(22):2685-2692.
33. Lourenço, S.C., Moldão-Martins, M. and Alves, V.D. 2019. Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. Molecules (Basel, Switzerland). 24 (22):4132.
34. Mathieson. R.A. and Kitts. W.D. 1980. Binding of phyto-oestrogen and oestradiol-17β by cytoplasmic receptors in the pituitary gland and hypothalamus of the ewe. Journal of Endocrinology. 85(2):317-325.
35. Mauvais-Jarvis, F., Clegg, D.J. and Hevener, A.L. 2013. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. Endocrine Reviews. 34 (3):309-338.
36. Mitchell-Harman, S., Louvet, J.P., and Ross, G.T. 1975. Interaction of estrogen and gonadotrophins on follicular atresia. Endocrinology. 96 (5):1145-1152.
37. Moradi, N., Ashrafi-Kooshk, M.R., Chamani, J., Shackebaei, D. and Norouzi, F. 2018. Separate and simultaneous binding of tamoxifen and estradiol to human serum albumin: Spectroscopic and molecular modeling investigations. Journal of Molecular Liquids. 249: 1083-1096.
38. Mori-Okamoto, J., Otawara-Hamamoto, Y., Yamato, H. and Yoshimura, H. 2004.Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. Journal of Ethnopharmacology. 92(1):93-101.
39. Moroni, P., Pisoni, G., Savoini, G., Van Lier, E., Acuna, S., Damian, J.P. and Meikle, A. 2007. Influence of estrus of dairy goats on somatic cell count, milk traits, and sex steroid receptors in the mammary gland. Journal of Dairy Science. 90 (2):790-797.
40. Nikkhah A. 2018. Hormones and feed intake regulation: ruminant and rat Models. Austin J Biotechnol Bioeng. 5(3):1098-1099.
41. Pugh, D.G. and Baird, N.N. 2012. Sheep and goat medicine-E-Book. Elsevier Health Sciences.
42. Reed, J.D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. Journal of Animal Science. 73(5):1516-1528.
43. Reinhart. K.C. Dubey. R.K., Keller, P.J., Lauper, U. and Rosselli, M. 1999. Xeno-oestrogens and phyto-oestrogens induce the synthesis of leukaemia inhibitory factor by human and bovine oviduct cells. Molecular Human Reproduction. 5(10):899-907.
44. Rosselli, M., Reinhart, K., Imthurn, B. Keller., P.J. and Dubey, R.K. 2000. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. Human Reproduction Update. 6(4):332-350.
45. Sadeghi, N., Jannat, B., Oveisi, M.R., Hajimahmoodi, M. and Photovat, M. 2010.Antioxidant activity of Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) seed extracts.

Journal of Agricultural Science and Technology. 11:633-638.
46. Safari, M., Ghasemi, E., Alikhani, M. and Ansari-Mahyari, S. 2018. Supplementation effects of pomegranate by-products on oxidative status, metabolic profile, and performance in transition dairy cows. Journal of Dairy Science. 101 (12):11297-11309.
47. Shabtay, A., Nikbachat, M., Zenou, A., Yosef, E., Arkin, O., Sneer, O. and Miron, J. 2012. Effects of adding a concentrated pomegranate extract to the ration of lactating cows on performance and udder health parameters. Animal Feed Science and Technology. 175(1): 24-32.
48. Spiteller, P., Kern., W,. Reiner, J. and G. Spiteller. 2001. Aldehydic lipid peroxidation products derived from linoleic acid. Biochimica et Biophysica Acta. 1531:188-208.
49. Stanley, T.A., Cochran, R.C., Vanzant, E.S., Harmon, D.L. and Corah, L. R. 1993. Periparturient changes in intake, ruminal capacity, and digestive characteristics in beef cows consuming alfalfa hay. Journal of Animal Science. 71(3):788-795.
50. Story, C.D. 1954. Estrogenic substances in certain livestock feeds and their influence upon the nutrition of growing and fattening lambs. Retrospective Theses and Dissertations. Available in: https://lib.dr.iastate.edu/rtd/15272.
51. Trenkle, A. 1976. The anabolic effect of estrogens on nitrogen metabolism of growing and finishing cattle and sheep. Environmental quality and safety. Supplement. (5):79-88.
52. Vasta, V. and Luciano, G. 2011. The effects of dietary consumption of plants secondary compounds on small ruminants' products quality. Small Ruminant Research. 101(1):150-159.
53. Verardo, V., Garcia-Salas, P., Baldi, E., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. and Caboni M.F. 2014. Pomegranate seeds as a source of nutraceutical oil naturally rich in bioactive lipids, Food Research International. 65:445-452
54. Vidal, A., Fallarero, A., Peña, B.R., Medina, M. E., Gra, B., Rivera, F. and Vuorela, P.M. 2003. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. Journal of Ethnopharmacology. 89 (2):295-300.
55. Whitley, N. C., and Jackson, D. J. 2004. An update on estrus synchronization in goats: a minor species. Journal of Animal Science, 82 (suppl_13): E270-E276.
56. Williams. D. L. Wang. S. Y. and Klett, H. 1978. Decrease in functional albumin mRNA during estrogen-induced vitellogenin biosynthesis in avian liver. Proceedings of the National Academy of Sciences, 75 (12): 5974-5978.
57. Wocławek-Potocka, I., Mannelli, C., Boruszewska, D., Kowalczyk-Zieba, I., Waśniewski, T. and Skarżyński, D.J. 2013. Diverse effects of phytoestrogens on the reproductive performance: cow as a model. International Journal of Endocrinology. 2013:650-672.
58. Wu, G., Wei, Q., Yu, D. and Shi, F. 2019. Neonatal genistein exposure disrupts ovarian and uterine development in the mouse by inhibiting cellular proliferation. The Journal of Reproduction and Development. 65(1):7–17.
59. Zowczak-Drabarczyk, M.M., Murawa, D., Kaczmarek, L., Połom, K. and Litwiniuk, M. 2013. Total antioxidant status in plasma of breast cancer patients in relation to ERβ expression. Contemporary Oncology. 17(6):499-503.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 9(2), 2021
http://ejrr.gau.ac.ir

Estrogenic effects of pomegranate seed pulp on blood and antioxidant variables in Saanen female goats

F.S. Salesi[1], *S.E. Ghiasi[2], M. Mojtahedi[2] and S. J. Hosseini Vashan[3]
[1]M.Sc. Graduated, [2]Assistant Prof., and [3]Associate Prof., Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran
Received: 12/12/2020; Accepted: 03/01/2021

Abstract

Background and objectives: Pomegranate (*Punica granatum*) seed pulp is one of the agricultural alterant industries wastes. During recent years there has been an increase in its application in animal nutrition due to its antioxidant properties. Pomegranate seed pulp contains polyphenolic compounds that mainly contain ellagic acid, punicalagin and punicallin. These have antioxidant properties and prevent the peroxidation of fats and the activity of free radicals. In addition to polyphenolic compounds, pomegranate seeds contain estrogens such as "estradiol, estrone and estriol" and in lower concentrations also contain testosterone, beta-sitosterol and coumestrol. However, there are many reports about its side effects on the physiology and metabolism of ruminants. Due to the role of estrogens in lipid metabolism, pomegranate seed pulp as an estrogen-rich plant source may be able to mimic the regulatory role of endogenous estrogens on metabolism and reproduction. In this study, the estrogenic effects of pomegranate seed pulp were investigated on serum estradiol concentration and other blood and antioxidant variables of dry non-pregnant Saanen goats.

Materials and Methods: In this experiment, 18 non-pregnant dry Saanen goats in 3rd to 4th lactation number and an average weight of 44.85 ± 5.16 kg were used in a completely randomized design with 3 treatments and 6 replications. Experimental treatments included: 1) control treatment 2) Basal diet with 12% of pomegranate seed pulp 3) Basal diet with 12% of pomegranate seed pulp + ozone gas (estrogen removal agent from pomegranate). Blood parameters such as estradiol, albumin, direct bilirubin, total bilirubin, creatinine, glucose, betahydroxybutyrate, urea, uric acid, blood urea nitrogen, alkaline phosphatase, aspartate and alanine aminotransferase, Triglycerides, HDL, LDL and plasma antioxidant factors of MDA and TAC were measured. Experimental data were statistically analyzed using SAS software with the mixed procedure as repeated data over time.

Results: Based on the results, the parameters of standard estradiol concentration and the area under the serum estradiol concentration curve increased (33.36 pg.ml^{-1} and 605.12 cm^2 respectively) significantly during the estrus cycle affected by treatment 2 ($p < 0.05$). Ozone gas in treatment 3 significantly reduced these variables (28.13 and 543.91) compared to treatment 2 and was not significantly different from the control (25.56 and 515.12). Blood parameters other than phosphorus and some antioxidant variables were not significantly affected by experimental treatments, indicating insufficient estrogen intake to disrupt the homeostasis of blood parameters at a level of 12% Replacement of pomegranate seed pulp with wheat bran.

Conclusion: Generally, the level of 12% of pomegranate seed pulp in the studied physiological stage, did not have significant negative effects on the normal metabolic parameters of Saanen

*Corresponding author; s.e.ghiasi@birjand.ac.ir

goats. Elimination of the effect of estrogen in treatment 3 indicates that ozone gas is able to diminish the effect of dietary phytoestrogens.

***Keywords*:** Antioxidant, Blood variables, Pomegranate seed pulp, Saanen goats,