

مجله دامپزشکی ایران

صاحب امتیاز: دانشگاه شهید چمران اهواز

مدیرمسئول: دکتر منصور میاحی

سر دبیر

دکتر محمدرحیم حاجی حاجیکلائی

کارشناس مجله

منا عباسی

اعضاء هیأت تحریریه (به ترتیب حروف الفبا)

دکتر معصومه احمدی زاده، استاد سم شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
دکتر بهارک اختر دانش، استاد بیماری‌های داخلی دام‌های کوچک، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
دکتر علی بنی آدم، دانشیار جراحی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
دکتر مهدی پور مهدی بروجنی، دانشیار اپیدمیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
دکتر عباس جلودار، دانشیار ژنتیک ملکولی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
دکتر محمدرحیم حاجی حاجیکلائی، استاد بیماری‌های داخلی دام‌های بزرگ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
دکتر حسین حمیدی نجات، استاد انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
دکتر محمد راضی جلالی، استاد کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
دکتر رضا رنجبر، دانشیار علوم تشریحی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
دکتر شیمیا شاهین دوران، استاد بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه مهمت آکیف ترکیه
دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری، استاد ویروس شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
دکتر ملیحه عباسعلی پور کبیره، استاد بیوشیمی بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
دکتر محمد کاظم غریب ناصری، استاد فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
دکتر مهری غفوریان بروجردنیا، استاد ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
دکتر مسعود قربانپور، استاد میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
دکتر گیتی کریم، استاد بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
دکتر راگونات کوهلی، استاد جراحی و سر دبیر مجله انجمن ملی علوم دامپزشکی هندوستان
دکتر حسن مروتی، استاد بافت شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
دکتر ثریا نائم، استاد انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
دکتر حسین نجف زاده ورزی، استاد فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل
دکتر فرید همت زاده، دانشیار ویروس شناسی، دانشکده علوم دامپزشکی، دانشگاه آدلاید، استرالیا

هیأت مشاورین علمی

اعضاء هیأت علمی کلیه دانشکده‌های دامپزشکی و دیگر دانشکده‌ها و مراکز تحقیقاتی زیربند کشور

آدرس پستی سر دبیر

اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، سر دبیر مجله علمی، کد پستی ۶۱۳۵۵، صندوق پستی ۱۴۵

تلفن و دورنگار: ۳۳۳۳۶۳۱۲ (۰۶۱)

E-mail: ivj@scu.ac.ir

- این مجله به استناد نامه شماره ۵۴۵/۲۹۱۰ مورخ ۸/۵/۸۴ کمیسیون برر سی نشریات وزارت علوم، تحقیقات و فناوری دارای درجه علمی - پژوهشی می‌باشد.
- این مجله در فهرست نشریات علمی پژوهشی معتبر ISC که دارای ضریب تأثیر (IF) می‌باشند، قرار دارد. این اعتبار از سوی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری تعیین شده است و در آئین‌نامه ارتقای مرتبه علمی دانشگاه‌ها و موسسات آموزشی مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد.
- متن کامل مقالات در پایگاه استنادی علوم جهان اسلام (ISC) قابل دسترسی می‌باشد.

چاپ و صحافی

مرکز منطقه‌ای اطلاع‌رسانی علوم و فناوری و پایگاه استنادی جهان اسلام

بسم الله الرحمن الرحيم

مجله دامپزشکی ایران

فهرست مطالب

عنوان

صفحه

- راهنمای تدوین مقاله
۱
- ارزیابی ایمنی‌زایی اختصاصی واکسن خوراکی بایوفیلیم آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی
امیر آرامون، مجتبی علیشاهی، مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری و مسعود قربانپور
۵
- مطالعه تأثیر جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس بر ساختار هیستومورفومتريک و هیستولوژیک بافت بیضه رت مواجهه شده با نانوذرات اکسید آهن
عباس پیرزاده، حسن مروتی و محسن عباسی
۱۶
- مقایسه رقیق کننده حاوی پلاسماي زرده تخم کبوتر، مرغ و ترکیب آن‌ها جهت نگهداری منی قوچ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد
علیرضا حمیدی، محسن اسلامی، حامد اسماعیلی، فرهاد فرخی‌اردبیلی و سینا بهمنی
۲۷
- مطالعه و شناسایی سلول‌های زایای اولیه در گناد جنین قرقاول ماده (*Phasianus colchicus*) با استفاده از تکنیک‌های مختلف بافت‌شناسی
زهرا خداپرست و ابوالقاسم نبی‌پور
۳۹
- اثر کنه وارواآ، (*Varroa destructor*)، روی ویژگی‌های ریخت‌شناختی و تغذیه‌ای زنبور عسل نژاد ایرانی (*Apis mellifera meda*)
مهدی طوسی، آرش راسخ، معصومه ضیایی، پرویز شیشه‌بر و غلامحسین طهماسبی
۵۰
- تأثیر فرمولاسیون (قطر ذرات) واکسن غیرفعال دوگانه (AI+ND) بر پایداری و ایمنی‌زایی آن در جوجه‌های SPF و گوشتی
محمد عباس‌نیا، علی شیرازی‌نژاد، نادر قلعه‌گلاب‌بهبهان، منصور میاچی و سیدسبحان عمادی‌جمالی
۶۴
- بررسی میزان همبستگی بین ابعاد و حجم کلیه‌ها در اولتراسونوگرافی با مقادیر واقعی آن‌ها در سگ
علیرضا غدیری، رضا آویزه، علی بنی‌آدم و شهرزاد صمیمی
۷۵
- مطالعه اثرات فراکسیون‌های سم عقرب همی‌اسکورپیوس لپتوروس بر مقادیر گلوکز و هورمون‌های انسولین، گلوکاکون و کورتیزول در رت
نوید کوشکی، محمد راضی‌جلالی، سیدرضا فاطمی‌طباطبایی و هدیه جعفری
۸۲
- بررسی اثر ژل رویال بر تغییرات هیستوپاتولوژیک و بیوشیمیایی ریه موش‌های صحرایی متعاقب مسمومیت با آرسنیک تری‌اکساید
حسین محمدی، بابک محمدیان، حسین نجف‌زاده‌ورزی و علی شهریاری
۹۲
- ارزیابی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در سرم متعاقب دریافت مکمل‌های نانوذرات سلنیم، سلنیت سدیم و ویتامین E در بره‌های شیرخوار
سامان محمدی‌راد، احسان عناصری، علیقلی رامین و سیامک عصری‌رضایی
۱۰۲
- ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژی بافت بیضه و اپیدیدیم در سگ‌های تحت درمان با هورمون‌های استانوزولول و ناندرولون دکانوات
بهمن مصلی‌نژاد، سعد گورانی‌نژاد، آناهیتا رضایی، سیدرضا فاطمی‌طباطبایی، هادی ایمانی‌راستابی و سامان سلمانی
۱۱۵
- ردیابی میزان آنتی‌بادی و بررسی شیوع سرمی علیه اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال در سرم بوقلمون‌های کشتار شده در استان خوزستان با استفاده از الایزای خانگی
صدیقه یوسفی‌نژاد، محمد خسروی، داریوش غریبی، منصور میاچی و مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری
۱۲۸
- خلاصه انگلیسی مقاله‌ها
۱۳۹

راهنمای تدوین مقاله جهت چاپ در نشریه دامپزشکی ایران

ب) مقاله پژوهشی کوتاه

این مقاله از جهت نوع کار و نحوه تدوین همانند مقاله پژوهشی است ولی با توجه به اهمیت و نتایج حاصل از پژوهش، مقاله بصورت فشرده و حداکثر در ۶ صفحه مجله ارائه گردد. همچنین لازم است بترتیب دارای عنوان، خلاصه فارسی، کلمات کلیدی، مقدمه، مواد و روش کار، نتایج، بحث، فهرست منابع و خلاصه انگلیسی باشد.

ج) گزارش درمانگاهی

این گزارش‌ها، موارد نادر و آموزنده درمانگاهی و آزمایشگاهی را در بر گرفته و بترتیب دارای عنوان، خلاصه فارسی، کلمات کلیدی، مقدمه، تاریخچه، روش تشخیص، بحث و نتیجه‌گیری، فهرست منابع و خلاصه انگلیسی می‌باشند و نباید از ۴ صفحه مجله تجاوز نمایند.

نکات ضروری جهت تدوین و ارسال مقاله

۱- عنوان مقاله، رسا و در حد امکان مختصر و در برگیرنده کل مطالب مقاله باشد.
عنوان مقاله، نام و نام خانوادگی نویسنده یا نویسندگان با ذکر رتبه علمی یا دانشگاهی به دو زبان فارسی و انگلیسی همراه با نشانی کامل پستی، شماره تلفن همراه یا ثابت، دورنما و آدرس الکترونیکی نویسنده مسئول در صفحه جداگانه‌ای (صفحه اول) درج گردد.

هدف از انتشار مجله دامپزشکی ایران، چاپ مقالات تحقیقاتی - پژوهشی در رشته‌های مختلف دامپزشکی، پزشکی، زیست‌شناسی و دیگر علوم مرتبط با کاربرد علمی و عملی در دامپزشکی و پزشکی، می‌باشد. مقالاتی در این نشریه به چاپ خواهند رسید که حاوی یافته‌های جدید در رشته‌های تخصصی دامپزشکی باشند. گزارش درمانگاهی (Case report) نیز در این مجله قابل چاپ می‌باشد. مقالات دریافت شده پس از بررسی اولیه و داوری توسط متخصصین مربوطه و با تصویب هیأت تحریریه به چاپ خواهند رسید. تمام یا قسمتی از مقاله ارسال نباید قبلاً در نشریه‌ای به چاپ رسیده و یا اینکه همزمان به نشریه‌ای دیگر ارسال شده باشد. در صورتیکه مقاله‌ای قبلاً در کنگره و یا همایش علمی ارائه شده باشد، مشخصات کامل کنگره یا همایش مربوطه ذکر گردد. این مجله به صورت فصل‌نامه سالانه در چهار شماره چاپ و منتشر می‌گردد.

مقالات قابل چاپ

الف) مقاله پژوهشی

مقاله پژوهشی، نتیجه کار پژوهشی نویسنده یا نویسندگان بوده و بترتیب دارای عنوان، خلاصه فارسی، کلمات کلیدی، مقدمه، مواد و روش کار، نتایج، بحث، فهرست منابع و خلاصه انگلیسی می‌باشد و نباید از ۱۲ صفحه تجاوز نماید.

۲- **خلاصه مقاله:** با توجه به این که، مراجعه کنندگان به مقاله، در ابتدا از خلاصه مقاله جهت ارزیابی استفاده می‌کنند، و نظر به این که معمولاً خلاصه مقاله توسط مراکز و مؤسسات اطلاع رسانی علمی منتشر می‌گردد، لذا این قسمت از مقاله باید دقیق، روان و حداقل ۲۰۰ و حداکثر ۳۰۰ کلمه را در بر گرفته و بیانگر مسئله، هدف، روش کار، نتایج و نتیجه‌گیری کلی آن تحقیق باشد.

۳- **کلمات کلیدی** به عنوان معرف و راهنمای مقاله محسوب می‌شوند، حداقل در ۴ و حداکثر در ۸ کلمه از عنوان مقاله، انتخاب و در انتهای خلاصه فارسی آورده شوند.

۴- **مقدمه** در برگزیده مطالبی در خصوص اهمیت تحقیق و سابقه علمی کار انجام شده می‌باشد.

۵- **مواد و روش کار** شامل شرح دقیق و کامل مواد مصرفی، تعداد، نوع و مشخصات نمونه‌ها، دستگاه‌هایی که اختصاصاً برای انجام پژوهش بکار رفته با ذکر مشخصات کامل آنها و روش اجرای کار می‌باشد. در صورتی که از روش‌های متداول استفاده شده باشد از شرح آنها خودداری و به ذکر مأخذ اکتفا گردد، ولی چنانچه از روش جدیدی استفاده شده باشد، شرح کامل آن روش همراه با ذکر اسامی علمی و منابع تهیه مواد مصرفی ضروری است. روش‌های آماری مورد استفاده به شیوه قابل درک و با استناد به مأخذ معتبر ارائه گردد.

۶- **نتایج** حاصل از تحقیق را می‌توان به صورت **جدول** با همه خطوط، نمودار و تصویر همراه با توضیحات

لازم ارائه نمود. تصاویر، جداول و نمودارها باید کاملاً روشن و براحتی قابل درک و در عین حال بیانگر واقعی نتایج حاصل از آزمایشات باشند. تصاویر و نمودارهای ارسالی واضح و از ارسال کپی آنها خودداری گردد. محورهای نمودار کاملاً تعریف شده باشد و از ذکر هرگونه توضیحات غیرضروری اجتناب گردد. هر کدام از جداول، نمودارها و تصاویر با شماره در متن مشخص و توضیحات جداول در بالای جدول و توضیحات نمودارها در زیر نمودار ارائه گردد. کلیه تصاویر، جداول و نمودارها در متن مقاله و در جای مناسب گنجانده شوند. داده‌های ارائه شده در جداول و یا تصاویر نباید در این بخش مورد بحث و تفسیر قرار گیرند. نتایج ارائه شده در جداول نباید به صورت دیگری مانند نمودار و یا متن نوشتاری در مقاله تکرار گردند.

۷- **در قسمت بحث**، نتایج ارائه شده باید مورد تجزیه و تحلیل و تفسیر قرار گیرند و توجه خواننده را به موضوع اصلی تحقیق، فرضیه‌های مطرح شده در بخش مقدمه و نتایج بدست آمده از تحقیق جلب نمایند. در این قسمت می‌توان در مورد روابط بین عوامل تاثیر گذار و یا کاستی‌های علمی و طرح پیشنهادات و نظرات جدید بحث کرد. حتی المقدور موارد اتفان نظر و یا اختلاف نتایج این تحقیق با تحقیقات انجام شده در این زمینه مورد بررسی قرار گیرد و بالاخره بر کاربردهای علمی و نظری دستاوردهای این تحقیق و استنتاج اساسی از این مطالعه تاکید نموده و از تکرار نتایج خودداری گردد.

۸- نویسنده یا نویسندگان می‌توانند از کمک‌های دیگران در انجام پژوهش و یا تهیه مقاله بنحو مقتضی تشکر و قدردانی نمایند. لازم به ذکر است، در صورت برخورداری از حمایت مالی و استفاده از وسایل آزمایشگاهی می‌توان محل تحقیق و نام آن مؤسسه و یا افراد مرتبط را ذکر نمود.

۹- خلاصه انگلیسی کاملاً مطابق با خلاصه فارسی مقاله باشد و حداکثر در ۳۰۰ کلمه ارائه گردد. ذکر مشخصات کامل نویسنده یا نویسندگان همانند بخش فارسی ولی به زبان انگلیسی در صفحه اول، ضروری است.

۱۰- فهرست منابع صرفاً شامل کتب و مقالات علمی معتبر می‌باشد و از پایان‌نامه‌ها، مقالات ارائه شده در همایش‌ها و کنگره‌های علمی و سایت‌های اینترنتی استفاده نگردد.

نحوه درج منابع در متن مقاله

لازم است تمام منابع مورد استفاده در متن مقاله با ذکر نام نویسنده یا نویسندگان به شرح ذیل مورد استفاده قرار گیرند:

در صورت ذکر منبع در انتهای پاراگراف مربوطه، روش اشاره به آن در انتهای پاراگراف و در داخل پرانتز به شکل مثال‌های ذیل می‌باشد:

اگر یک نفر نویسنده باشد، (Mellor 2005)، اگر دو نفر نویسنده باشند، (Arthur and Noakes) (2011) و بیش از دو نفر نویسنده، (Pearson et al. 2012).

در صورت ذکر منبع در شروع پاراگراف مربوطه، روش اشاره به آن در ابتدای پاراگراف و بدون پرانتز به شکل مثال‌های ذیل می‌باشد:

اگر دو نفر نویسنده باشند Arthur و Noakes در سال ۲۰۱۱، گزارش نمودند که... و بیش از دو نفر نویسنده Pearson و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش نمودند که...

نحوه ارائه فهرست منابع

کلیه منابع مورد استفاده در متن مقاله می‌بایست در فهرست منابع آورده شوند.

ضمناً کلیه منابع می‌بایست به زبان انگلیسی در فهرست منابع براساس حروف الفبا و بدون ذکر شماره نگاشته شوند. لازم به ذکر است که در خصوص منابع فارسی معادل انگلیسی آن آورده شده و در انتهای آن در درون پرانتز in persian آورده شود.

استفاده از پایان‌نامه، کنگره، کنفرانس، پروتکل و سایت در منابع قابل قبول نمی‌باشد.

نحوه نوشتن منابع در فهرست منابع مانند مثال‌های زیر است:

1- Arthur, G.H.; Noakes, D.E.; Pearson, H. and Parkinson, T.J. (1996). Veterinary Reproduction and Obstetrics. 7th ed. Saunders, London, Pp: 634-645.

2- Herbert, R.; Nanney, J. and Spano, J.S. (1986). Erythrocyte distribution in ducks. American Journal of Veterinary Research, 50 (2): 958-960.

ضمناً نام مجلات در قسمت منابع به طور کامل نوشته شود و از ذکر حروف اختصاری خودداری گردد. در

ارسال مقاله

مقالات از طریق سامانه الکترونیکی مجله به آدرس <http://www.ivj.ir> ارسال گردد.

مسئولیت مقاله

مسئولیت علمی و اخلاقی مقاله بر عهده نویسنده یا نویسندگان آن می‌باشد.

ارسال مقاله چاپ شده (Reprint)

به تعداد نویسندگان از مقاله چاپ شده برای نویسنده اول جهت توزیع بین دیگر نویسندگان مقاله، توسط پایگاه استنادی علوم جهان اسلام (ISC) ارسال می‌گردد.

صورتی که تعداد نویسندگان مقاله از ۶ نفر بیشتر باشند بعد از نفر ششم با *et al.* ختم شود.

در صورتی که منبع، قسمتی از کتاب باشد نام خانوادگی نویسنده یا نویسندگان آن فصل کتاب همراه با حروف اول اسم، عنوان فصل، عنوان کتاب، نام خانوادگی نویسنده یا نویسندگان کتاب همراه با حروف اول اسم نویسنده، سال انتشار، شماره چاپ کتاب، محل انتشار کتاب و شماره صفحات ذکر گردد، مثال:

Macneely, M. Renal function. In: Gonnemwirth, A. and Jarret, L. (1988). *Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*. 8th ed. London, Mosby, Pp: 504-509.

قابل توجه همکاران محترم

با توجه به این که نشریه دامپزشکی ایران براساس مصوبه هیأت تحریریه مورخ ۱۳۹۸/۲/۱۸ تصمیم دارد که یک شماره در سال را به زبان انگلیسی منتشر نماید، لذا جهت آگاهی از نحوه تنظیم و ارسال مقاله به زبان انگلیسی خواهشمند است به قسمت *Guide for Authors* در سایت نشریه به آدرس www.ivj.ir، مراجعه نمایید.

ارزیابی ایمنی‌زایی اختصاصی واکسن خوراکی بایوفیلیم آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی

امیر آرامون^{۱*}، مجتبی علیشاهی^۲، مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری^۳ و مسعود قربانپور^۴

^۱ دانش آموخته دکترای تخصصی بهداشت و بیماری آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۳ استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۴ استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران و گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۹/۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۲۲

چکیده

یکی از روش‌های محافظت و آهسته رهش نمودن آنتی‌ژن‌های واکسنی استفاده از پلیمرهای طبیعی زیست تخریب‌پذیر مثل کیتین در بستر بایوفیلیم باکتریایی می‌باشد. باکتری به صورت مجتمع در آمده و توسط بستر پلیمری در شرایط دستگاه گوارش محافظت می‌شود و نهایتاً آنتی‌ژن‌های واکسنی سالم‌تر و با توان ایمنی‌زایی بهتر در اختیار سیستم ایمنی مخاطی ماهی قرار داده می‌شود. در این روش واکسن بایوفیلیم باکتری آئروموناس هیدروفیلا، با کشت باکتری در محیط کشت TSB (۲۲۵/۰ درصد W/V) به همراه کیتین (۰/۳ درصد W/V) به مدت چهار روز در انکوباتور شیکر دار قرار داده شد. باکتری سپس با PBS استریل شستشو گردیده و با حرارت غیرفعال شد. تعدادی ماهی کپور معمولی 11 ± 22 گرمی، به ۵ تیمار مساوی و هر تیمار در سه تکرار به صورت زیر تقسیم شدند: تیمار اول تا چهارم به ترتیب با واکسن بایوفیلیم، باکترین، کیتین+ محیط کشت و کیتین، به روش خوراکی طی ده روز ایمن شدند، تیمار پنجم بدون تجویز واکسن به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. نمونه‌گیری از سرم ماهیان در روزهای صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ صورت گرفت. عیار آنتی‌بادی ضد باکتری در نمونه‌ها با آزمایش الایزا و توسط آنتی‌بادی مونوکلونال ارزیابی گردید. نتایج نشان داد عیار آنتی‌بادی ضد باکتری آئروموناس هیدروفیلا در تیمار بایوفیلیم خوراکی در روز ۲۰ نسبت به بقیه تیمارها معنی‌دار بوده است اما در روز ۴۰ و ۶۰ معنی‌دار نبوده است.

کلمات کلیدی: واکسن خوراکی، بایوفیلیم، آئروموناس هیدروفیلا، کپور معمولی

مقدمه

اختیاری، گرم منفی، اکسیداز و کاتالاز مثبت هستند که در خانواده آئروموناداسه قرار داشته و از دو گروه مجزای غیرمتحرک سرمادوست و گروه متحرک مزوفیلیک تشکیل شده‌اند (Swaminathan et al, 2004). این باکتری عامل

عفونت‌های باکتریایی یکی از عوامل مهم تلفات در مزارع پرورش ماهی محسوب می‌شود و آئروموناس هیدروفیلا یکی از مهم‌ترین عامل بیماری‌زا در ماهی کپور می‌باشد (Tavakoli et al, 2015). آئروموناس‌ها بی‌هوایی

* نویسنده مسئول: امیر آرامون، دانش آموخته دکترای تخصصی بهداشت و بیماری آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

E-mail: aramoon.haser@gmail.com



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

یک بستر مناسب که معمولاً از پلیمرهای طبیعی زیست تخریب پذیر می باشد، باکتری به صورت مجتمع در آمده و توسط بستر پلیمری در شرایط دستگاه گوارش محافظت می شود و نهایتاً آنتی ژن های واکنشی سالم تر و با توان ایمنی زایی بهتر در اختیار سیستم ایمنی مخاطی ماهی قرار داده می شود. در تشکیل بایوفیلم علاوه بر این که لایه گلیکوکالیکس در اطراف باکتری را فرا می گیرد، باعث تجمع لایه های متعدد باکتری در یک پارانشیم کیتینی می گردد که عوامل تخریب آنتی ژنی، به ویژه اسید معده و آنزیم های گوارشی فقط توانایی تأثیر بر لایه یا لایه های سطحی بایوفیلم را داشته و لایه های میانی با عبور از معده و ابتدای روده، با حفظ ویژگی آنتی ژنیک به محل جذب آنتی ژن های روده می رسند. لذا در روده توسط سلول های فاگوسیت کننده سیستم ایمنی جذب شده و باعث القای ایمنی مؤثرتری نسبت به واکنش های معمولی خوراکی می شوند (Nayak et al, 2004; Siriyappagounder et al, 2014). چسبندگی باکتری ها به سطوح به حالت برگشت ناپذیر با تولید مواد خارج سلولی پلیمریک یا EPS همراه است، که این حالت باعث تحریک پروتئین های حسی سلول های غشاء باکتریایی می شود (Chakrabarty and Boyd, 1995)، که اجازه می دهد برای توسعه ارتباط سلول به سلول پل ایجاد شود که به نوبه خود، باکتری ها را به سطح می چسباند. به عنوان مثال Landry و همکاران (۲۰۰۶)، نشان دادند که بایوفیلم های باکتری *aeruginosa* که به صورت اجتماع بزرگ سلولی روی سطوح با موکوز گلیکوپروتئین رشد کرده اند، در مقایسه با بایوفیلم های روی شیشه و پوشش داده شده با آکتین و DNA تحمل شان به آنتی بیوتیک توبرامایسین بیش تر شده است. علاوه بر مقاومت آنتی بیوتیکی، باکتری های بایوفیلم در برابر قرار گرفتن در معرض نور ماوراء بنفش، سمیت فلزی، تماس با اسید، کمبود آب و فاگوسیتوز نیز بسیار

بیماری زا در ماهیان آب شیرین و گاهی آب شور است و در کپور ماهیان، مارماهی، شیر ماهی، گربه ماهی، تیلاپیا، قزل آلاهی رنگین کمان، سپتی سمی هموراژیک ایجاد می کند (Vijavabaskar et al, 2012; Tokmechi et al, 2008). با توجه به نتایج Ahangarzadeh و همکاران (۲۰۱۵)، که در مجموع ۱۵/۵ درصد از سپتی سمی های باکتریایی کپور ماهیان را سپتی سمی ناشی از *اثروموناس هیدروفیلا* شناسایی کردند و همچنین ۶۲/۵ درصد نقش *اثروموناس* ها در بیماری زایی کپور ماهیان استان خوزستان را تشکیل داده اند، به همین دلیل یکی از مهم ترین بیماری های شایع در ماهیان بیماری با کتریایی *اثروموناس هیدروفیلا* در این استان می باشد.

لذا تلاش های متعددی برای تولید واکنش (به ویژه واکنش های منطفه ای) برای جلوگیری از این عفونت *اثروموناسی* در کپور ماهیان صورت گرفته است (Azad et al, 2000). به طور قطع کم استرس ترین روش تجویز واکنش، تجویز خوراکی است، ولی تغییرات آنتی ژن های واکنش در لوله گوارش ماهی به خاطر ترشحات آن ها باعث کارایی پایین این روش تجویز شده است. لذا تجویز با این روش کم هزینه و بدون عوارض جانبی است (Plant and LaPatra, 2011). به خاطر وجود این مزایا، در حال حاضر چندین واکنش خوراکی برای استفاده در صنعت آبی- پروری ثبت شده اند. به عنوان مثال، ۱۷ واکنش موجود به صورت تجاری در برابر ویروس ها ساخته شده است که ۲ مورد آن در مورد واکنش خوراکی می باشد (Dhar et al, 2014). یکی از روش های محافظت از آنتی ژن های واکنشی در شرایط دستگاه گوارش ماهی، استفاده از تکنیک بایوفیلم می باشد. همچنین جذب واکنش بایوفیلم *اثروموناس هیدروفیلا* در مقایسه با واکنش معمولی راحت تر جذب می شوند و احتمالاً به دلیل پوشش گلیکوکالیکس بایوفیلم می باشد (Azad et al, 2000). در این روش با استفاده از

- 1- Local
- 2- Biodegradable
- 3- Extracellular Polymeric Substances

باکتری روی بایوفیلیم کیتین کاملاً مستقر گردد. سپس این بایوفیلیم با سانتریفیوژ ۳۰۰۰ دور به مدت ده دقیقه از محیط کشت جدا شده و با بافر نمک فسفات (PBS 0.1 M, pH 7.2) شستشو و ترکیب گردید. بعد از شمارش باکتری در بایوفیلیم، کیفیت بایوفیلیم واکسن *آئروموناس هیدروفیلا* با میکروسکوپ فازکتراست بررسی گردید.

برای غیرفعال کردن باکتری بایوفیلیم به مدت ۵۰ دقیقه در حمام آب جوش ۱۰۰ درجه و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محصول نهایی به عنوان واکسن بایوفیلیم *آئروموناس هیدروفیلا* در خوراک ماهی کپور (خریداری شده از شرکت کیمیاگران تغذیه) مورد استفاده قرار گرفت. به علت این که کیتین مانع اسپری شدن واکسن روی غذا می‌شد، واکسن بایوفیلیم به صورت یکنواخت روی غذا ریخته و مخلوط شد تا یکنواخت گردد و با روغن خوراکی پوشش‌دار شد. برای تهیه واکسن *آئروموناس هیدروفیلا* بدون بایوفیلیم (بایوفیلیم تشکیل نشده) به این صورت که محیط کشت و کیتین بدون اضافه نمودن باکتری به مدت ۴ روز با شرایط مشابه انکوبه گردید و تمام روند آماده‌سازی واکسن بایوفیلیم هم در مورد آن‌ها اعمال گردید. برای تهیه باکترین *آئروموناس هیدروفیلا* نیز، ابتدا باکتری‌ها به مدت ۱ روز در محیط TSB کشت شده و با دور ۳۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد با بافر استریل PBS 0.1 M, pH 7.2 سه بار شستشو شده و نهایتاً در غلظت 10^1 ml^{-1} در PBS استریل آماده گردید. باکتری‌های آزاد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد غیرفعال گردیدند (Azad et al, 1999; 2000). کیفیت واکسن بایوفیلیم *آئروموناس هیدروفیلا* قبل از غیر فعال شدن باکتری‌ها با دما با میکروسکوپ فاز کتراست بررسی گردید. واکسن بایوفیلیم و واکسن معمولی به صورت یکنواخت روی خوراک ریخته (ذکر شده در موارد بالا) و در طی دوره واکسیناسیون استفاده گردید.

مقاوم هستند (Hall-Stoodley et al, 2004). کیتین علاوه بر ایجاد بستر برای بایوفیلیم خاصیت ادجوانی نیز دارد. Dong و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند که کیتین باعث افزایش سیتوکین‌هایی از قبیل: IL-1, IL-12, IL-18، TNF α و IFN α به صورت مستقیم و افزایش سلول‌های کشته‌شده طبیعی (NK cells) به صورت غیر مستقیم می‌گردد. علاوه بر این، تغییرات در فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند تحت تأثیر رفتار تغذیه، ترکیب بیوشیمیایی غذا، سن میزبان، دما و فصل باشد (Kuzmina et al, 1996; Zambonino Infante and cahu, 2001). به طور کلی واکسن خوراکی بایوفیلیم در ماهیان علف‌خوار و همه‌چیز خوار تیترا آنتی‌بادی بیشتری نسبت به گوشت‌خواران دارد زیرا ترشحات معده حاصل از فعالیت پپسی‌ناژ گسترده‌تر است که باعث تخریب آنتی‌ژنی بیشتری می‌گردد (Manjakasy et al, 2011; Siriyappagouder et al, 2014). لذا در این تحقیق سعی بر آن بود با تولید واکسن بایوفیلیم خوراکی و تجویز آن به ماهی کپور تیترا آنتی‌بادی و میزان ایمنی آن‌ها به دست آید.

مواد و روش کار

جهت تهیه واکسن بایوفیلیم ابتدا استوک باکتریایی جدا شده از منطقه خوزستان و آزمایشگاه بهداشت و بیماری آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه چمران اهواز تهیه شد. همچنین کیتین از شرکت تولید و فراوری کیتین و کیتوزان گلمکانی در مشهد خریداری شد. آماده‌سازی واکسن بایوفیلیم *آئروموناس هیدروفیلا* بر طبق روش Azad و همکاران (۱۹۹۹) صورت گرفت. به طور خلاصه در این روش باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* بر روی سوبسترای کیتین (۰/۳w/v درصد) در محیط TSB (۰/۲۲۵w/v درصد) اتوکلاو شده کشت گردید. باکتری‌های بایوفیلیمی به مدت ۴ روز و هر روز ۶ ساعت در دستگاه شیکر^۱ با دور ۱۲۰ بار در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا

تکرار ماهیان بیهوش شده با ۳۰ ppm ماده تریکائین متان سولفانات (MS222) و خون‌گیری انجام شد. سرم ماهی‌ها جدا شده و به روش الیزا با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال (تهیه شده در بخش ویروس‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز) عیار آنتی‌بادی ضد *Aeromonas hydrophila* در نمونه‌های سرمی مشخص گردید.

اندازه‌گیری عیار آنتی‌بادی به روش الیزای غیرمستقیم

۱- فرآینده سونیکاسیون باکتری *Aeromonas hydrophila* برای کوت آنتی‌ژن باکتری کف گوده‌های الیزا، ابتدا باکتری با کشت در محیط TSA خالص گردید و سه کلنی خالص شده به ۱ سی‌سی آب مقطر اضافه گردید و ۶ بار فریز دفراست روی آن صورت گرفت. بعد از این مرحله با دستگاه سونیکاتور و سیکل ۱۰ بار سونیکیشن (دو دقیقه سونیکاسیون با فاصله زمانی دو دقیقه) صورت گرفت. سپس با دور ۳۵۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و برای ایجاد غلظت مناسب آنتی‌ژن (در هر ۱۰۰ میکرولیتر استفاده شده در پلیت الیزا ۰/۱ میکروگرم دیواره باکتری) با آب مقطر به نسبت ۱ به ۲۵ رقیق گردید (Kaur et al, 2021).

۲- آزمون نهایی الیزا برای تست سرم‌های ماهی

بعد از سونیکه کردن باکتری آزمایشات پایلوت انجام شد و مقادیر بهینه آنتی‌ژن، بلاکر، سرم، پادتن مونوکلونال و کونژوگه، مشخص گردید.

در کف گوده‌های پلیت الیزا (Nunc-Immuno 96 well solid plates) (MicroWell) آنتی‌ژن (باکتری سونیکه شده)، به میزان ۱ به ۲۰ با کوتینگ بافر رقیق شد و به میزان ۵۰ میکرولیتر کف گوده‌ها کوت گردید. بعد از یک روز در یخچال نگهداری شد و سپس محلول رویی پلیت‌های الیزا دور ریخته و ۳ بار با PBS توئین شستشو گردید. سپس با شیر خشک پس چرخ ۱ درصد حاوی PBS توئین به میزان ۳۰۰ میکرولیتر جایگاه‌هایی که آنتی‌ژن نیچسبیده بود بلاک گردید و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور

جهت تیماربندی ماهی‌ها، تعداد ۳۷۵ قطعه ماهی کپور معمولی با وزن متوسط 11 ± 32 گرم به صورت زیر به ۵ تیمار در سه تکرار ۲۵ تایی تقسیم‌بندی شدند:

۱- تیمار ایمن شده با واکسن بایوفیلیم (کیتین+باکتری)

۲- تیمار ایمن شده با باکترین (بدون کیتین)

۳- تیمار ایمن شده با کیتین

۴- تیمار ایمن شده با کیتین و محیط کشت TSB (بدون تشکیل بایوفیلیم)

۵- تیمار کنترل غیر ایمن (کنترل)

ماهی‌های کپور از مرکز پرورش آبزیان شوشتر در استان خوزستان خریداری گردید و با رعایت شرایط انتقال با استفاده از وانت مخصوص انتقال بچه ماهی به دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران منتقل شد. بعد از انتقال ماهی و ضدعفونی ماهیان با فرمالین ۱۰۰ ppm به مدت یک ساعت، ۱۰ روز سازگاری ماهیان به آب کارگاه آبزیان دانشکده دامپزشکی شهید چمران اهواز انجام شد. شرایط فیزیوشیمیایی آب محل تحقیق به شرح زیر بود: منبع آب کارگاه از آب لوله کشی شهری به مدت یک هفته هوادهی شده با دمای 1 ± 27 درجه سانتی‌گراد و شوری 0.1 ± 0.8 گرم بر لیتر، میزان نیتریت و آمونیاک کمتر از ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر و نیترات کم‌تر از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، pH بین ۷/۸ تا ۸/۴ و میزان غذادهی بین ۲ تا ۳ درصد بایومس، روزی دو بار و بر اساس اشتهای ماهی با خوراک تجاری (شرکت کیمیاگران تغذیه)، میزان ۱۲ ساعت روشنایی و تعویض آب به صورت سیفون ۶۰ تا ۸۰ درصد آب آکواریوم و هر سه روز یک بار انجام شد.

بعد از سازگاری ماهیان به آب کارگاه، ایمن‌سازی ماهی‌ها با خوراک حاوی واکسن بایوفیلیم (۱۰^{۱۰} باکتری به ازای هر گرم ماهی در روز) باکترین با همین غلظت، تیمار کیتین و بایوفیلیم تشکیل نشده هم به میزان کیتین استفاده شده در واکسن بایوفیلیم به مدت ۱۰ روز انجام شد (Abhiman, 2000; Azad et al, 1999; 2014).

جهت نمونه‌گیری، تیمارها به مدت ۶۰ روز پرورش داده شدند و در روزهای صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ سه نمونه از هر

استفاده شد و جهت بررسی توزیع نرمال داده‌ها، از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف و برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها از آزمون دانکن استفاده گردید ($P < 0.05$).

نتایج

بررسی بایوفیلیم در زیر میکروسکوپ

بعد از تولید بایوفیلیم (کشت باکتری در محیط TSB به همراه کیتین)، از تمام مراحل قبل شستشو بایوفیلیم، بعد شستشو بایوفیلیم و ورتکس شدیداً با میکروسکوپ فاز کنتراست عکس‌برداری صورت گرفت (Figure 1).

نتایج تیتراژ آنتی‌بادی سرم ماهی‌های تیمار شده

سرم ماهیان تمام تیمارهای واکسن خوراکی در روزهای صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ جدا گردید و با آنتی‌بادی مونوکلونال بر ضد زنجیره سنگین IgM ماهی کپور معمولی (تولید شده در بخش ویروس‌شناسی گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)، مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در Figure 2 مشاهده می‌گردد واکسن‌های خوراکی موفقیت نسبی داشته‌اند. عیار آنتی-بادی فقط در تیمار بایوفیلیم روز ۲۰ افزایش معنی‌داری داشته است. ولی در بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری با تیمار کنترل مشاهده نگردید ($P < 0.05$).

۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۳ بار شستشو با بافر شستشو انجام شد و سرم‌های ماهی از هر تیمار به میزان ۱ به ۴۰۰ در PBS توئین و شیر ۰/۵ درصد رقیق و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. پلیت به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق ۲۵ درجه سانتی‌گراد و روی شیکر قرار گرفت و سپس محلول دور ریخته و ۴ بار شستشو گردید و آنتی-بادی مونوکلونال ضد زنجیره سنگین IgM تولید شده در موش به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق شده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. بعد از ۶۰ دقیقه در دمای اتاق، محلول دور ریخته و سه بار شستشو گردید و آنتی‌بادی ثانویه ضد موشی تولید شده در بز (Goat anti mouse) به صورت کنژوگه (Bio-Rad, USA, 170-6516)، رقیق شده به نسبت ۱ به ۳۰۰۰ به میزان ۵۰ میکرولیتر در هر چاهک اضافه گردید. بعد از ۴۰ دقیقه محلول دور ریخته و ۳ بار شستشو گردید. سوبسترای کروموزن ۵۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه گردید پس از ۵ تا ۱۰ دقیقه محلول متوقف کننده اضافه گردید. OD مربوط به هر چاهک در دستگاه الایزا ریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد (Kaur et al, 2021).

برای آنالیز نتایج عیار آنتی‌بادی در بین تیمارها از آنالیز واریانس یک‌طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۹

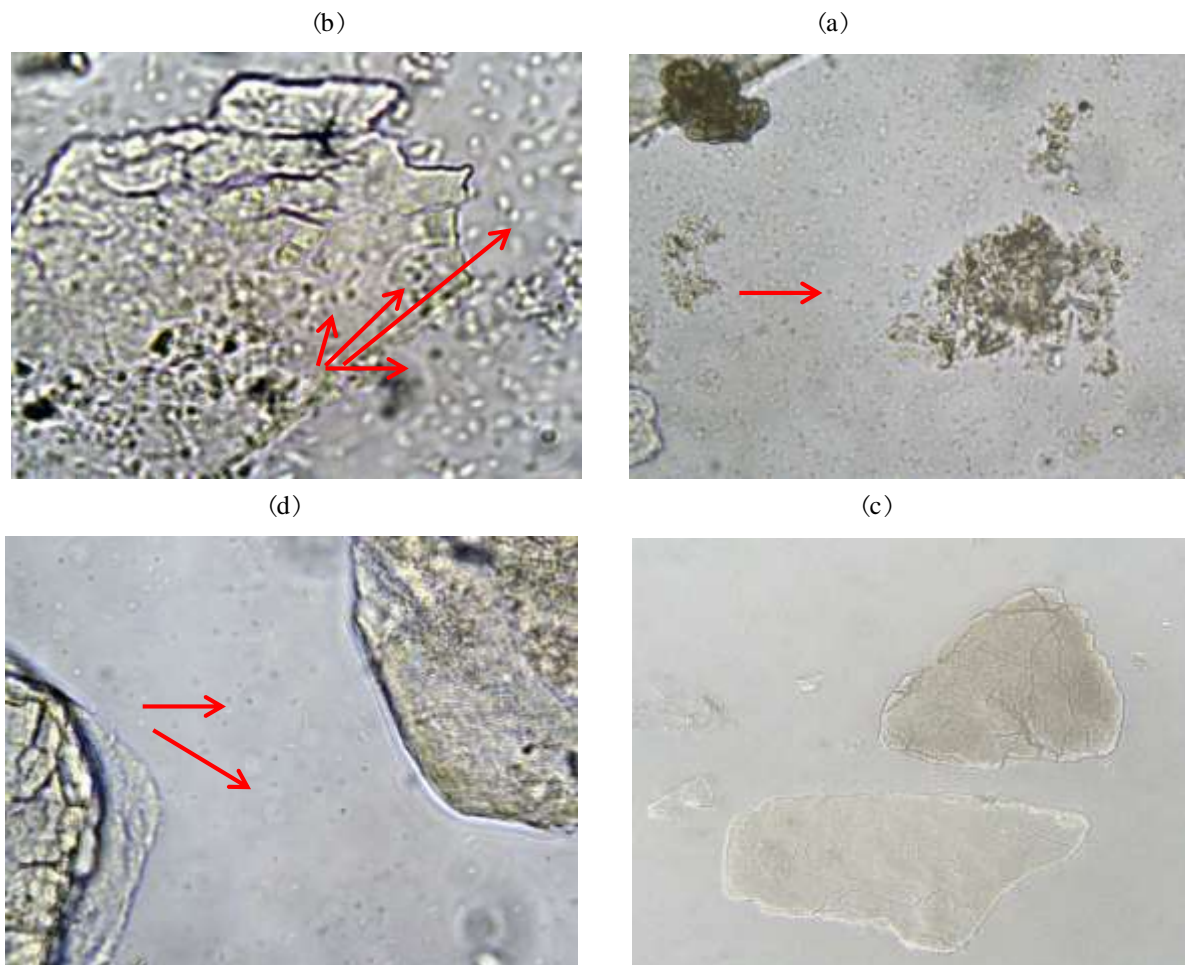


Figure 1: a) X400 phase contrast microscope of bacteria and chitin in the culture medium before the washing process. b) Phase contrast microscope X1000 of bacteria and chitin in the culture medium before the washing process. c) X100 phase contrast microscope of chitin flakes. d) Phase contrast microscope. (Arrowhead X400 bacteria and chitin in the culture medium after washing and vigorous vortexing indicates of the bacteria).

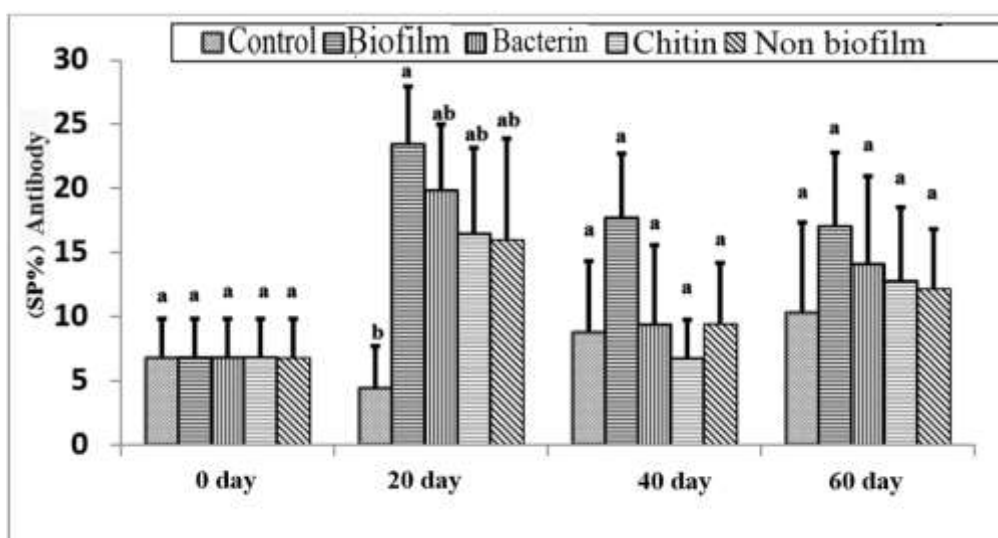


Figure 2: Comparison of antibody titer (based on SP percentage) of Biofilm, Bacterin, Chitin and Non biofilm in the common carp.

بحث

قابل انجام در سطح صنعتی بوده و می‌توان از آن به عنوان گزینه‌ای برای تولید واکسن بایوفیلیم استفاده کرد. نتایج مربوط به عیار آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهیان ایمن شده با واکسن بایوفیلیم و واکسن معمولی (باکترین) به روش خوراکی نشان داد که تفاوت معنی‌داری در تیتراژ آنتی‌بادی ماهیان ایمن شده با تیمار کنترل به جز روز ۲۰ مشاهده نگردید ($P > 0.05$). هر چند گزارشاتی از افزایش عیار آنتی‌بادی بعد از تجویز واکسن خوراکی وجود دارد (Nayak et al, 2004). ولی برخی گزارشات نیز حاکی از عدم تغییر عیار آنتی‌بادی در ماهیان واکسینه شده به روش خوراکی است که تا روز ۴۰ هیچ تیتراژ آنتی‌بادی مشاهده نشد (Azad et al, 1999). اما در مطالعه Abhiman (۲۰۱۴) واکسن بایوفیلیم خوراکی *آئروموناس هیدروفیلا* را با روش مشابه مطالعه حاضر (۰/۳ درصد کیتین و ۰/۲۲۵ درصد محیط کشت TSB) تولید نمود و در ماهی کپور معمولی حدود ۴۰ گرم و دوز باکتری 10^{10} CFU/g و به مدت ۱۰ روز خوراکی واکسن، همانند مطالعه حاضر تجویز شد. در مطالعه Azad و همکاران (۱۹۹۹) نیز واکسن بایوفیلیم خوراکی (۰/۳ درصد کیتین و ۰/۲۲۵ درصد محیط کشت TSB) به روش مشابه مطالعه حاضر تولید گردید و بر روی بچه ماهی‌های روهو (*Labeo rohita* Ham.) و ماهی کاتلا (*Catla catla* Ham.) و ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio* Lin.) با وزن‌های ۳ تا حدود ۵ گرم با دوز باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* 10^7 ، 10^{10} ، 10^{13} (CFU/g) و به مدت ۱۵ روز غذایی و ۵ درصد وزن بدن صورت گرفت. تیتراژ آنتی‌بادی در این سه گونه در دوز 10^{10} CFU/g و 10^{13} به طور معنی‌داری بیش‌تر از تیمار 10^7 CFU/g بود. هر چند که تیتراژ آنتی‌بادی تیمار 10^{13} CFU/g تفاوت چندانی با تیمار 10^{10} CFU/g نداشته است. با افزایش روزها میزان تیتراژ آنتی‌بادی افزایش پیدا کرده است و این میزان افزایش در ماهی کاتلا تا روز ۹۰، در روهو تا روز ۵۰ و در کپور معمولی تا روز ۶۰ بوده است. در ماهی کاتلا تیتراژ آنتی

سلول‌های بایوفیلیم در برابر قرار گرفتن در معرض نور ماوراء بنفش، سمیت فلزی، تماس با اسید، کمبود آب و فاگوسیتوزیس نیز بسیار مقاوم است (Hall-Stoodley et al, 2004). همچنین بایوفیلیم در صنعت پزشکی و داروسازی به عنوان مقاومت دهنده به باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به کار می‌روند. همچنین برای مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در استفاده از داروها از بایوفیلیم استفاده می‌گردد (Lindsay and von Holy, 2006). استفاده از بایوفیلیم باکتریایی برای تولید واکسن خوراکی توسط برخی محققین استفاده شده است (Abhiman, 2014; Azad et al, 2014; Siriyappagouder et al, 2014; al, 1999; 2000). به عنوان مثال Azad و همکاران (۱۹۹۹) از بایوفیلیم باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* برای ایمنی‌سازی ماهی کپور معمولی استفاده کردند. به غیر از بایوفیلیم *آئروموناس هیدروفیلا* بایوفیلیم برخی باکتری‌ها نیز برای تولید واکسن خوراکی استفاده گردیده است. در مطالعه‌ای مشابه از بایوفیلیم باکتری *Vibrio alginolyticus* روی میگو برای تولید واکسن خوراکی استفاده گردید که باعث افزایش ایمنی شد (Sharma et al, 2010a). همچنین بایوفیلیم *Vibrio alginolyticus* روی میگوی *Penaeus monodon* باعث افزایش مقاومت به بیماری و ایمنی میگو شد (Sharma et al, 2010b). Azad و همکاران (۱۹۹۹ و ۲۰۰۰) در مورد بایوفیلیم نیز از همین روش برای غیر فعال نمودن واکسن بایوفیلیم *آئروموناس هیدروفیلا* استفاده کردند. ولی در تحقیقات دیگر از روش‌های متفاوت استفاده شده است، مثلاً Lee و همکاران (۲۰۱۷) از یون‌ها برای غیر فعال نمودن بایوفیلیم *Pseudomonas aeruginosa* استفاده کردند. به نظر می‌رسد روش حرارت دادن، علاوه بر کارایی مناسب و کم هزینه بودن، در تسهیل عرضه آنتی‌ژن در روده نیز مؤثر باشد (Azad et al, 1999; 2000). همچنین به نظر می‌رسد روش به کار رفته در این تحقیق برای تولید بایوفیلیم باکتریایی، علاوه بر مؤثر و کارا بودن، روشی ساده، ارزان و

بادی تمام تیمارها (10^7 ، 10^{10} ، 10^{13} CFU/g) به جز گروه شاهد از روز ۱۰ شروع گردید، همچنین در ماهی روهو تیترا آنتی‌بادی همه تیمارها به جز گروه شاهد از روز ۲۰ شروع گردید به جز تیمار واکسن بایوفیلیم با غلظت 10^7 CFU/g که از روز ۳۰ شروع شد. همچنین ماهی کپور معمولی به طور تعجب‌آوری تیترا آنتی‌بادی تیمار (10^{10} ، 10^{13} CFU/g) از روز ۴۰ شروع به افزایش کرد به جز تیمار 10^7 CFU/g که از روز ۳۰ افزایش داشت. همچنین در روز ۱۵۰ در ماهیان کاهش تیترا آنتی‌بادی داشت و در کپور تیترا آنتی‌بادی به صفر رسید. از آن جا که در مطالعه حاضر افزایش تیترا معنی‌دار فقط در روز ۲۰ مشاهده شد، با نتایج تحقیق فوق هم‌خوانی ندارند. با توجه به این که وزن ماهیان این تحقیق حاضر به جای ۴ گرم 32 گرم بوده است به نظر می‌رسد تأثیر وزن ماهیان بر روی تیترا آنتی‌بادی تأثیرگذار بوده است. علاوه بر این در مطالعه Siriyappagouder و همکاران (۲۰۱۴)، واکسن خوراکی بایوفیلیم در ماهی *Channa striatus* به روش مشابه مطالعه حاضر ($0/3$ درصد کیتین و $0/225$ درصد محیط کشت TSB) تولید گردید. در این تحقیق وزن ماهی $15 \pm 0/35$ گرم با دوز باکتری *Aeromonas hydrophila* 10^{10} CFU/g و به مدت ۲۰ روز غذادهی و ۵ درصد وزن بدن صورت گرفت. نتایج عیار آنتی‌بادی نشان داد که تیمار بایوفیلیم اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشته است، میزان OD خوانده شده از دستگاه الایزا در واکسن خوراکی بایوفیلیم از روز ۱۰ تا ۶۰ معنی‌دار بوده است، لذا از این نظر با نتایج حاضر که در روز ۲۰ تیترا آنتی‌بادی معنی‌دار بوده است هم‌خوانی دارد.

در مطالعه Vinay و همکاران (۲۰۱۳) تحقیق بر روی واکسن خوراکی بایوفیلیم *Aeromonas hydrophila* بر روی ماهی ۱۵ گرمی روهو (*Labeo rohita*) را انجام دادند. واکسن بایوفیلیم بر طبق روش حاضر ($0/3$ درصد کیتین و $0/225$ درصد محیط کشت TSB) تولید گردید. دوز واکسن نیز مشابه روش مطالعه حاضر (10^{10} CFU/g) مورد آزمایش قرار گرفت و به مدت ۲۰ روز و ۲ درصد وزن بدن

ماهیان غذادهی صورت گرفت. نتایج حاصل نشان داد که ماهیان شاهد تیترا آنتی‌بادی از روز صفر تا ۶۰ به میزان متوسط $0/1$ و ماهیان تجویز خوراکی باکترین به میزان متوسط بین $0/15$ تا $0/2$ و ماهیان واکسن خوراکی بایوفیلیم تیترا بین $0/4$ تا $0/7$ داشته‌اند، که نشان می‌دهد تیترا آنتی‌بادی ۴ تا ۷ برابر شده است، در مقایسه با مطالعه حاضر البته بر روی ماهی کپور معمولی و ۱۰ روز تجویز واکسن خوراکی بایوفیلیم تیترا آنتی‌بادی روز ۲۰ در مقایسه با گروه شاهد بیش از ۵ برابر شده است که هم‌خوانی دارد اما در روز ۴۰ و ۶۰ با این مطالعه هم‌خوانی ندارند. Aramoon و همکاران (۲۰۱۸) با نتایج چالش باکتریایی در ادامه این تحقیق بعد از روز ۶۰ و مدت زمان ۱۰ روز تجویز خوراکی واکسن بایوفیلیم *Aeromonas hydrophila* به ماهی کپور معمولی افزایش بقای ($22/5$ درصد) معنی‌داری نسبت به تیمار ایمن شده با باکتری معمولی خوراکی ($12/5$ درصد) نشان دادند که واکسن بایوفیلیم اثر مثبتی بر ایمنی ماهی کپور داشته است. علاوه بر این بر اساس درصد بازماندگی در گروه کیتین خوراکی و کیتین+محیط کشت خوراکی با یکدیگر برابر بوده‌اند و اما از گروه شاهد میزان بازماندگی بالاتر بوده است، که به نظر می‌رسد کیتین نیز در ایمنی و سلامت ماهی مؤثر بوده هر چند این تأثیر از نظر آماری معنی‌دار نبود. همچنین بالا بودن تیترا آنتی‌بادی و افزایش معنی‌دار عیار آنتی‌بادی در تیمار واکسن بایوفیلیم در روز ۲۰ نسبت به واکسن معمولی خوراکی، نشان داد که واکسن بایوفیلیم به طور مؤثری با محافظت آنتی‌ژن واکسنی در شرایط لوله گوارش، باعث تغییر کم‌تر آنتی‌ژن‌های واکسنی شده و سیستم ایمنی میزبان واکنش مناسب‌تری در برابر آنتی‌ژن نشان خواهد داد. در تحقیق Abhiman (۲۰۱۴) و Azad و همکاران (۲۰۰۰) نیز روش تولید واکسن بایوفیلیم باکتری *Aeromonas hydrophila* با استفاده از کیتین مشابه تحقیق حاضر انجام شد، آن‌ها نیز با تولید واکسن بایوفیلیم باکتری *Aeromonas hydrophila* کارایی مناسب این روش پوشش دهی واکسن را گزارش نمودند.

مؤثر بوده و نقش ادجوانی برای آنتی‌ژن واکسنی دارد. همچنین ماهی کاتلا ایمنی بیش‌تری نسبت به کپور معمولی و روهو داشته است. به نظر می‌رسد تفاوت در میزان ایمنی ماهیان به واکسن بایوفیلیم به نوع گونه ماهی، رژیم غذایی، دمای نگهداری ماهی، تجویز مدت زمان بیش‌تر واکسن و نوع بستر بایوفیلیم یا احتمالاً سویه باکتری نقش دارد. لذا با توجه به نتایج حاضر می‌توان نتیجه گرفت که واکسن خوراکی توانایی در افزایش ایمنی در ماهی را دارد. هرچند از نظر تیتراژ آنتی‌بادی ایمنی بالایی مشاهده نشد اما ایمنی نسبی مشاهده شد که به نظر می‌رسد با توجه به این که در برخی مطالعات تجویز ۲۰ روز واکسن خوراکی لحاظ گردیده است و افزایش ایمنی مشاهده شده است، پیشنهاد می‌گردد دوره ۱۰ روزه تجویز خوراکی واکسن به ۲۰ روز ارتقا یابد.

در مطالعه Kaur و همکاران (۲۰۲۱) واکسن بایوفیلیم خوراکی را در ماهی روهو بررسی کردند به مدت ۲۰ روز غذایی واکسن انجام شد و همانند مطالعه حاضر از کیتین به عنوان بستر بایوفیلیم استفاده کردند که از روز ۱۰ به بعد افزایش ایمنی داشته است که با روز ۲۰ تحقیق حاضر همخوانی دارد. علاوه بر این در تحقیق Gopalakannan و Arul (۲۰۰۶) با بررسی کیتین و کیتوزان در غذای ماهی کپور معمولی این دو ماده را محرک ایمنی ذاتی معرفی نمودند که به طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت لیزوزیم می‌گردند. همچنین گلوبول‌های سفید (WBC) به طور معنی‌داری در گروه کیتین بیش‌تر از گروه کیتوزان و شاهد بود همان طور که در گزارشات فوق مشخص است، تولید بایوفیلیم کیتین علاوه بر محافظت واکسن در تجویز خوراکی، تأثیر این پلیمر طبیعی زیست تخریب‌پذیر بر بیان سایتوکین‌های گوارشی نیز در بهبود ایمنی مخاطی ماهی

تشکر و قدردانی

از مسئولین آزمایشگاه بهداشت و بیماری آبزیان و مسئول آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز که در انجام این تحقیق یاری رساندند صمیمانه قدردانی می‌نماییم.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافی ندارند.

منابع مالی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه دکتری تخصص آقای امیر آرامون بوده است و منابع مالی آن توسط گرنیت اساتید راهنما و مشاور تأمین شده است.

منابع

Abhiman, M.F.Sc, (2014). Effect of *Aeromonas hydrophila* biofilm oral vaccine on gut immunity of carps. PhD Thesis Karnataka Veterinary, Animal and Fisheries Sciences University, Bidar. P 86.

Ahangarzadeh, Gurbanpour Najafabadi, Massoud, Peighan, Sharif Rouhani, & Soltani. (2015). The role of *Aeromonas hydrophila* in bacterial septicemia of farmed carp fish in Khuzestan

province. *Iranian Veterinary Journal*, 11(3), 5-16. (In Persian)

Aramoon, A., Alishahi, M., Seifi Abad Shapouri, M. R., & Ghorbanpour, M. (2018). Immunogenicity evaluation of *Aeromonas hydrophila* biofilm vaccine on the fingerling Common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Animal Environment*, 10(3), 207-212. (In Persian)

- Azad, I.S Shankar K.M, Mohan C.V And, Kalita, B. (2000). Uptake and processing of biofilm and free-cell vaccines of *Aeromonas hydrophila* in Indian major carps and common carp following oral vaccination antigen localization by a monoclonal antibody. *Disease of Aquatic Organisms*. 43: 103–108.
- Azad, I.S Shankar K.M, Mohan C.V And, Kalita, B. (1999). Biofilm vaccine of *Aeromonas hydrophila*– standardization of dose and duration for oral vaccination of carps. *Fish and shellfish immunology*, 519-528.
- Boyd A, Chakrabarty AM. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *J Indust Microbiol*, 15:162-168.
- Dhar AK, Manna SK, Thomas Allnut FC. (2014). Viral vaccines for farmed finfish. *Virusdisease*, 25(1):1–17.
- Dong, L., Wichers, H. J., & Govers, C. (2019). Beneficial health effects of chitin and chitosan. *Chitin and chitosan: Properties and applications*, 145-167.
- Gopalakannan, A. and Arul, V. (2006). Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*, 255,179–187.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2:95-108.
- Kaur, B., Kumar, B. N., Tyagi, A., Holeyappa, S. A., & Singh, N. K. (2021). Identification of novel vaccine candidates in the whole-cell *Aeromonas hydrophila* biofilm vaccine through reverse vaccinology approach. *Fish & Shellfish Immunology*, 114, 132-141.
- Kuzmina, V.V., Golovanova, I.L., Izvekova, G.I. (1996). Influence of temperature and season on some characteristics of intestinal mucosa carbohydrases in six freshwater fishes. *Comp Biochem Physiol*, 113: 255-60.
- Landry, R.M., An, D., Hupp, J.T., et al. (2006). Mucin–*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol Microbiol*; 59:142–151.
- Lee, H.J., Seo, J., Kim, M. S., Lee, Ch. (2017). Inactivation of biofilms on RO membranes by copper ion in combination with norspermidine. *Desalination*, 424, 95–101.
- Lindsay, D., von Holy, A. (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection*, 64, 313-325.
- Manjakasy JM, Farr I, Hansen MJ, Tibbetts IR. (2011). Enzymatic digestion in stomach less fishes: how a simple gut accommodates both herbivory and carnivory. *J Comp Physiol B*;181:603e13.
- Nayak DK, Asha A, Shankar KM, Mohan CV. (2004). Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Clarias batrachus* da carnivore model. *Fish & Shellfish Immunology*. 16, 613-619.
- Plant, K. P., & LaPatra, S. E. (2011). Advances in fish vaccine delivery. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1256-1262.
- Siriyyappagouder, P., Shankar, K. M., Kumar, B. N., Patil, R., & Byadgi, O. V. (2014). Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Channa striatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 581-585.
- Sharma, K.S.R., Shankar, K.M., Sathyanarayana, M.L., Patil, R.R., Swamy, N. and Rao, S. (2010a). Development of biofilm of *Vibrio alginolyticus* for oral immunostimulation of shrimp. *Aquacul. Intl.*, 19:421–430.
- Sharma, K.S.R., Shankar, K.M., Sathyanarayana, M.L., Sahoo, A.K, Swamy, N. and Rao, S. (2010b). Evaluation of immune response and resistance to diseases in tiger shrimp, *Penaeus monodon* fed with biofilm of *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol*, 29:724–732.
- Swaminathan, T.R.; Rathore, G.; Abidi, R. and Kapoor, D. (2004). Detection of *Aeromonas hydrophila* by polymerase chain reaction. *Indian Journal of Fisheries*, 51(2): 251-254.
- Tavakoli, H., Akhlaghi, M. (2015). Evaluation of changes in lysozyme, immunoglobulins, cells and blood hematocrit cultivated rainbow trout after experimental infection with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Biological Journal of Microorganism*; 4(13): 93-104.
- Tokmechi A., Shamci H., Meshkini S., Delshad R., Ghasemimaghanjoghi A. Dietary administration of vitamin C and *Lactobacillus rhamnosus* in combination enhanced the growth and innate immune response of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Iranian Fisheries* 2012; 21(2): 13-22.

Vijavabaskar, P., Somasundaram, S. (2008). Isolation of bacteriocin producing lactic acid bacteria from fish gut and probiotic against common fresh water fish pathogen. *Aeromonas hydrophila*. *Biotechnology*; 7(1): 124-128.

Vinay TN, Rajreddy P, Suresh Babu PP, Rajesh R and Shankar KM. (2013). Evaluation of the Efficiency of *Aeromonas hydrophila* Biofilm Vaccine in *Labeo rohita* Employing Monoclonal

Antibody based ELISA. *Open Access Scientific Reports*. 1-4.

Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L. (2001). Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp Biochem Physiol*; 130: 477-87.

Received: 13.09.2023

Accepted: 26.11.2023

مطالعه تأثیر جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس بر ساختار هیستومورفومتریک و هیستولوژیک بافت بیضه رت مواجهه شده با نانوذرات اکسید آهن

عباس پیرزاده^۱، حسن مروتی^{۲*} و محسن عباسی^۳

^۱ دانشجوی دکتری تخصصی بافت‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲ استاد گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۳ دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۹/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۹

چکیده

مواجهه مکرر با نانوذرات اکسید آهن می‌تواند منجر به اختلالات ساختاری در بیضه شده و اثرات منفی بر عملکرد تولید مثلی فرد داشته باشد. در مقابل جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس با دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی و منبع ویتامینی فراوان می‌تواند این اثرات را کاهش دهد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثرات جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس بر تغییرات بافتی بیضه موش‌های صحرایی القاء شده با استفاده از نانوذرات اکسید آهن بود. تعداد ۳۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار پس از سازگاری به صورت تصادفی به ۶ گروه زیر تقسیم شدند. گروه اول: کنترل، گروه دوم: ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نانوذرات اکسید آهن، گروه سوم: ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس، گروه چهارم: ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نانوذرات اکسید آهن و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به صورت هم‌زمان، گروه پنجم: ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نانوذرات اکسید آهن به مدت ۱۴ روز سپس ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس، گروه ششم: ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به مدت ۱۴ روز سپس ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نانوذرات اکسید آهن. نمونه برداری پس از ۶۰ روز انجام و مقاطع بافتی بیضه پس از آماده‌سازی به منظور مطالعات هیستولوژی و هیستومتری توسط هماتوکسیلین-ائوزین (H & E) رنگ شد. مطالعه مقاطع بافتی بیضه در رت‌های مواجهه شده با نانوذرات اکسید آهن نشان دهنده کاهش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز، کاهش تعداد سلول‌های سرتولی و تعداد سلول‌های لیدیگ در مقایسه با گروه کنترل بود، در حالی که مواجهه با جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز را افزایش داد. درمان با جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس لیک در گروه‌های مواجهه شده با نانوذرات اکسید آهن، موجب بهبود تغییرات بافتی ایجاد شده در بیضه گردید و از کاهش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، ضخامت اپیتلیوم زایا، تعداد سلول‌های لیدیگ و سرتولی جلوگیری کرد. نتایج نشان داد که تجویز خوراکی جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در موش‌های صحرایی نر موجب بهبود اختلالات ساختاری در بیضه و اصلاح تغییرات بافتی ناشی از القاء توسط نانوذرات اکسید آهن می‌شود.

کلمات کلیدی: جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس، نانوذرات اکسید آهن، بیضه، موش صحرایی

مقدمه

نانوذرات اکسید آهن به علت خواص مغناطیسی، اندازه کوچک و اثر سریع، به عنوان ماده کنتراست در MRI (تصویربرداری تشدید مغناطیسی) و NMRI (تصویربرداری تشدید مغناطیسی هسته‌ای) جهت تشخیص سرطان، در

* نویسنده مسئول: حسن مروتی، استاد گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

E-mail: hmarovvati@ut.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

در میان مدل‌های حیوانی، موش‌های صحرایی به عنوان یک مدل مناسب تعریف شده جهت تعیین عوامل زیربنایی اختلالات سیستم‌های مختلف بدن شناخته می‌شوند (Maneesh et al, 2005). مطالعات بالینی و تجربی نشان داده‌اند که بیماری‌های مرتبط با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند بر ترشح تستوسترون از سلول‌های لیدیگ و نقش حمایتی سلول‌های سرتولی آسیب وارد نموده و موجب تغییرات مورفوتریک و هیستولوژیک در بافت بیضه شوند (Afkhami-Ardakani et al, 2017). با این حال، علی‌رغم اهمیت دستگاه تولیدمثلی، مطالعات اندکی در مورد نقش محافظتی جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس بر اثرات سوء ناشی از تجویز نانوذرات اکسید آهن بر روی بافت بیضه و سلول‌های جنسی وجود دارد.

جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به عنوان یک ماده غذایی تأثیرگذار غنی از پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، اسیدهای چرب غیر اشباع، استرول‌ها و برخی عناصر حیاتی مانند روی، منگنز، آهن، کلسیم، منیزیم و سلنیوم می‌باشد. این منبع غذایی همچنین سرشار از ویتامین B12، ویتامین E، ویتامین C، توکوفرول‌ها، و طیف کاملی از ترکیبات طبیعی کاروتن و فیتوپیگمنت‌های زانتوفیل است (Belay, 2002). طیف گسترده‌ای از اثرات بیولوژیک اسپرولینا از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و محافظ شیمایی گزارش شده است (Deng and Chow, 2010; Pak et al, 2012). اسپرولینا قادر به مهار استرس اکسیداتیو می‌باشد (Yang et al, 2014). همچنین مشخص شده است که جلبک اسپرولینا دارای اثرات محافظتی در مقابل آسیب‌های وارده به DNA سلول‌ها بوده و با داشتن رنگدانه فیکوسیانیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی گسترده‌ای دارد (Park et al, 2011). استفاده از ترکیبات طبیعی، ایمن، مؤثر و مقرون به صرفه جهت مدیریت بهتر عوارض ناشی از تجویز نانوذرات اکسید آهن از جمله اثرات مخرب آن بر روی بیضه ضروری به نظر می‌رسد. دامنه وسیعی از اثرات جلبک اسپرولینا در مطالعات بالینی و تجربی مورد بررسی قرار گرفته اما در هیچ‌کدام از منابع، مطالعه‌ای مبنی بر بررسی اثر جلبک

صنایع، کشاورزی، تصفیه آب و زیست پزشکی استفاده می‌شوند. چنین کاربردهای وسیعی سبب می‌شود افراد هر روزه در معرض این ماده قرار بگیرند (Hussain et al, 2009; Lewinski et al, 2008; Maurer-Jones et al, 2009).

نانوذرات به ویژه نانوذرات فلزی توانایی عبور از سد‌های فیزیولوژیک مختلف از جمله دستگاه تولید مثلی موش‌ها را دارا می‌باشند و به راحتی می‌توانند از غشای سلولی عبور کرده و سبب اختلال در مسیر خون‌رسانی به بیضه‌ها شوند (Gopinath et al, 2008; Lan and Yang, 2012). این نانوذرات می‌توانند سبب تغییر در مورفولوژی بافت بیضه به ویژه در سلول‌های لیدیگ شوند و میزان تستوسترون را کاهش دهند (Yoshida et al, 2009). بیضه‌ها به عنوان مراکز حیاتی در تولید سلول‌های جنسی نقش شناخته شده‌ای را بر عهده دارند، اعتقاد بر این است که بافت بیضه به آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو و گونه‌های فعال اکسیژن، حساسیت بالایی داشته از این رو در مدل‌های حیوانی، به عنوان بافت هدف جهت بررسی تغییرات مرتبط با گونه‌های فعال اکسیژن و اثر آن‌ها بر روی سلول‌های جنسی در نظر گرفته می‌شوند (Mari et al, 2001). اثرات سمی نانوذرات اکسید آهن بر دستگاه تولید مثلی نر مورد بررسی قرار گرفته شده است (Brissot et al, 2012). این عوارض می‌توانند در نتیجه ایجاد تغییر در اسیدیته و غلظت سرم، همچنین افزایش تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) باشد (Naqvi et al, 2010) که منجر به تغییرات ساختاری، عملکردی در بافت بیضه به ویژه تغییر در سلول‌های لیدیگ می‌شوند (Yoshida et al, 2009). این تغییرات زیربنای اختلالات تولید مثلی و کاهش میزان تستوسترون به شمار می‌آیند (Xu et al, 2014). اگر چه مکانیسم‌های کاملی از واسطه‌گری اثرات نانوذرات آهن بر دستگاه تولید مثلی مشخص نشده است، به نظر می‌رسد مواجهه با آن سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد شده و این امر منجر به افزایش آسیب غشای سلولی (پراکسیداسیون لیپیدی) و آغاز مسیرهای سیگنالینگ مرگ سلولی می‌شود (Aitken and Baker, 2013).

گروه پنجم: تیمار ۱۵ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن نانوذرات اکسید آهن به مدت ۲ هفته و سپس آغاز دریافت روزانه ۳۰۰ میلی گرم به کیلوگرم وزن جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به مدت ۶۰ روز.

گروه ششم: تیمار با ۳۰۰ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به مدت ۲ هفته و سپس آغاز دریافت ۱۵ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن نانوذرات اکسید آهن به مدت ۶۰ روز.

در طول آزمایش به منظور ایجاد شرایط یکسان به گروه کنترل یک میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر به روش دهانی خورنده شد. در خاتمه پژوهش و پس از آسان‌کشی موش-ها توسط داروی کتامین-زایلازین، بیضه‌های چپ و راست آن‌ها خارج شده و وزن، و ابعاد آن اندازه‌گیری شد.

نمونه‌هایی به ضخامت حداکثر ۰/۵ سانتی‌متر تنها از بیضه چپ تهیه و در فرمالین ۱۰ درصد پایدار گردید. پس از آماده‌سازی بافت به روش معمول، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و توسط H&E رنگ‌آمیزی شدند. مطالعات بافت‌شناسی و میکرومتری با استفاده از میکروسکوپ نوری و لنز دیجیتال Dino-Lite و نرم افزار Dino Capture، از نظر تغییرات بافتی، ارتفاع اپی‌تلیوم زایا، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، ضخامت کپسول بیضه، تعداد سلول‌های لیدیک، اندازه سلول‌های لیدیک و تعداد سلول-های سرتولی مورد بررسی قرار گرفتند.

برای آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ (version 24, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شد. از آزمون One-way ANOVA و پس از آزمون Tukey برای مقایسه تیمارها استفاده شد. در تمامی موارد $P < 0/05$ به عنوان حداقل اختلاف آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

روزانه همه موش‌ها جهت سمیت احتمالی به واسطه جذب نانوذرات اکسید آهن و جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس مشاهده شدند. در بین موش‌های صحرائی گروه‌های

اسپروولینا بر تغییرات ساختاری بیضه حیوانات دریافت‌کننده نانوذرات اکسید آهن در دسترس نمی‌باشد، بنابراین مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر جلبک اسپروولینا بر تغییرات بافت‌شناسی و شاخص‌های هیستومورفومتری در بیضه موش‌های نر صحرائی دریافت‌کننده نانوذرات اکسید آهن طراحی و اجرا شد.

مواد و روش کار

در این پژوهش موش‌های صحرائی نر از نژاد ویستار با میانگین وزنی ($4/81 \pm 280/13$) گرم از خانه حیوانات انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه گردید. به منظور سازگاری موش‌ها به مدت یک هفته در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و تغذیه کافی نگهداری شدند. در مدت سازگاری، دما بین ۲۴-۲۶ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۴۰-۵۰ درصد حفظ شد. غلظت مواجهه نانوذرات بر اساس Vidia و Chitra (۲۰۱۹) به میزان ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و میزان جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس بر اساس Karadebiz و همکاران (۲۰۰۹)، ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در نظر گرفته شد. سپس رت‌ها به طور تصادفی به ۶ گروه تقسیم شدند:

گروه اول: تیمار کنترل، تنها با رژیم غذایی پایه تغذیه شدند.

گروه دوم: تیمار با ۱۵ میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن نانوذرات اکسید آهن به مدت ۶۰ روز، علاوه بر رژیم غذایی به صورت روزانه نانوذرات اکسید آهن دریافت کردند.

گروه سوم: تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به مدت ۶۰ روز، علاوه بر غذای پایه روزانه جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس دریافت کردند.

گروه چهارم: تیمار ۱۵ میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن نانوذرات اکسید آهن به همراه ۳۰۰ میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به صورت همزمان به مدت ۶۰ روز.

۱۴ روز نانوذرات اکسید آهن و ۶۰ روز جلبک (G5) افزایش معنی داری نشان دادند ($P < 0.05$).

Table 1: The results of the weight difference of the studied rats

| Weight difference (gr) | group |
|-------------------------|-------|
| 48±0.57 ^d | G1 |
| 13.67±0.82 ^a | G2 |
| 54.33±0.38 ^e | G3 |
| 25±0.57 ^b | G4 |
| 51.67±0.68 ^e | G5 |
| 42±0.57 ^c | G6 |

Dissimilar letters show a significant difference ($p < 0.05$)

نتایج مربوط به وزن بیضه رت

مقایسه وزن بیضه‌های راست و چپ موش‌های صحرائی نشان داد که اختلاف معنی داری بین وزن آن‌ها در گروه‌های ذکر شده وجود نداشت.

مختلف کنترل و تیمار تغییری در مصرف غذا و آب آشامیدنی مشاهده نشد. ظاهر موش‌ها حالت طبیعی داشت و در کالبد گشایی نیز علائم غیر طبیعی در اندام‌های داخلی مشاهده نگردید.

مقایسه اختلاف وزن بدن بین گروه‌های مختلف مورد مطالعه مقایسه اختلاف وزن موش‌های صحرائی در گروه‌های مورد آزمایش در Table 1 نشان داده شده است. بررسی اختلاف وزن موش‌ها نشان داد که در گروه دریافت کننده نانوذرات اکسید آهن ۶۰ روزه (G2)، گروه همزمان جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس و نانوذرات اکسید آهن (G4) و گروه دریافت کننده ۱۴ روز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس و ۶۰ روز نانوذرات اکسید آهن (G6) در مقایسه با گروه کنترل (G1) کاهش معنی دار و در گروه‌های دریافت کننده جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس ۶۰ روزه (G3) و گروه دریافت کننده

Table 2: The results of the weight of the right and left testicles of the studied rats

| Left (gr) | Right (gr) | group |
|-----------|------------|-------|
| 1.47±0.04 | 1.41±0.09 | G1 |
| 1.41±0.10 | 1.39±0.03 | G2 |
| 1.41±0.02 | 1.40±0.01 | G3 |
| 1.53±0.08 | 1.52±0.09 | G4 |
| 1.62±0.02 | 1.59±0.03 | G5 |
| 1.68±0.05 | 1.51±0.06 | G6 |

نتایج هیستومتری

لیدیگ، تفاوت‌های قابل توجهی با گروه کنترل و سایر گروه‌ها وجود دارد. به طوری که قطر، تراکم سلولی لوله‌ها، ارتفاع اپی‌تلیوم آن‌ها و تعداد سلول‌های سرتولی و تعداد اندازه سلول‌های لیدیگ در گروه دریافت کننده نانوذرات اکسید آهن کم‌تر از گروه کنترل می‌باشد (Figures 1A, 1B, 1C, 1D). ساختار بافتی لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه موش‌های گروه دریافت کننده نانوذرات اکسید آهن در

مقایسه نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری قطر کپسول بیضه، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، ارتفاع اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز، تعداد سلول‌های لیدیگ و سرتولی در گروه‌های مختلف ذکر شده در Table 3 نشان داد که مابین ساختار بافتی لوله‌های اسپرم‌ساز موش‌های گروه دریافت کننده نانوذرات اکسید آهن از نظر قطر، ارتفاع اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز، تراکم سلول‌های اسپرماتوژنیک، سرتولی و

تصاویر مشاهده می‌گردد، ساختار بافتی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه‌های دریافت کننده نانوذرات اکسید آهن و جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* به صورت همزمان در مقایسه با گروه کنترل تفاوت قابل توجهی نشان نمی‌دهد.

مقایسه با سایر گروه‌ها دارای تراکم سلولی و ارتفاع اپی-تلیوم کم‌تری بودند، همچنین در این گروه سلول‌های اسپرماتوژنیک دیواره لوله‌ها بسیار پراکنده‌تر و دارای آرایش نامنظمی بودند (Figures 1A, 1B, 1C, 1D) قطر کپسول بیضه در گروه‌های مختلف دارای اختلاف معنی-داری نمی‌باشد (Figures 1A, 1B, 1C, 1D) همچنان که در

Table 3: (Mean \pm SEM) results of some histomorphometrical parameters in the tested groups

| size of Leydig cells(μ m) | number of Leydig cells | number of Sertoli cells | germinal epithelium thickness(μ m) | spermatogenic tubules iameter (μ m) | capsule thickness (μ M) | groups |
|--------------------------------|------------------------|-------------------------|---|--|------------------------------|--------|
| 10.64 \pm 1.10 | 29.76 \pm 4.33 | 20.56 \pm 2.01 | 96.1 \pm 2.13 | 264.28 \pm 15.46 | 34.17 \pm 0.83 | G1 |
| 6.10 \pm 1.43* | 17.37 \pm 3.36* | 13.89 \pm 1.12* | 64.16 \pm 5.30* | 189.46 \pm 5.36* | 30.36 \pm 5.17 | G2 |
| 10.68 \pm 0.65 | 30.86 \pm 6.45 | 21.20 \pm 1.76 | 112.63 \pm 2.36* | 301.52 \pm 10.33* | 34.28 \pm 3.36 | G3 |
| 9.42 \pm 1.34 | 29.58 \pm 5.38 | 18.33 \pm 0.70 | 89.24 \pm 2.40 | 256.63 \pm 6.37 | 33.27 \pm 8.47 | G4 |
| 8.40 \pm 1.70 | 27.43 \pm 4.34 | 18.64 \pm 1.36 | 87.16 \pm 2.56 | 238.63 \pm 7.13 | 32.46 \pm 4.46 | G5 |
| 9.65 \pm 0.60 | 30.82 \pm 6.64 | 19.30 \pm 0.63 | 91.34 \pm 2.26 | 254.34 \pm 9.46 | 35.66 \pm 6.38 | G6 |

*significant difference with the control group (G1)

آن در گروه دریافت کننده نانوذرات اکسید آهن مشاهده شد. همچنین در ۳ گروه آخر Table 3 تعداد سلول‌های سرتولی در لوله‌های اسپرم‌ساز بسیار نزدیک به گروه کنترل بوده و تفاوت آماری معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نگردید. تعداد سلول‌های لیدیک نیز در هر مقطع از لوله‌های اسپرم‌ساز بسته به گروه متفاوت بود، به طوری که بیش‌ترین تعداد در دو گروه کنترل و دریافت کننده جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* و کم‌ترین آن‌ها در گروه دریافت کننده نانوذرات اکسید آهن مشاهده شد. تعداد این سلول‌ها در گروه نانوذرات اکسید آهن نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) کاهش یافت (Table 3).

نتایج هیستولوژی

بررسی‌های بافت‌شناسی برش‌های بیضه گروه کنترل ساختار بافتی نرمال با ردیف سلول‌های سرتولی پشتیبان، سلول‌های اسپرماتوژنیک و اسپرماتوژنز فعال را نشان داد (Figure 1A). در گروه القاء شده با نانوذرات اکسید آهن (G2)، دژنه شدن سلول‌های اسپرماتوژنیک شامل کنده

ساختار بافتی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه (G5) مشابه گروه کنترل بود و نسبت به گروه نانوذرات اکسید آهن (G2)، تراکم سلولی و ارتفاع اپی‌تلیوم بیشتری داشت. یافته‌ی اخیر نمایانگر افزایش قابل توجه تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک، سرتولی و لیدیک در گروه دریافت کننده نانوذرات اکسید آهن ۱۴ روزه و جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* و نانوذرات اکسید آهن ۶۰ روزه در مقایسه با گروه دریافت کننده نانوذرات اکسید آهن می‌باشد (Figures 1A, 1B, 1C, 1D). ضخامت کپسول در گروه اخیر نیز همانند گروه کنترل بود (Table 3). لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه (G6) دارای تعداد سلول‌های لیدیک و سرتولی بیش‌تر و آرایش سلولی نسبتاً منظم‌تری نسبت به گروه دریافت کننده نانوذرات اکسید آهن بود (Figures 1A, 1B, 1C, 1D). علاوه بر این، قطر کپسول بیضه در این گروه ضخامتی هم اندازه با گروه کنترل داشت (Table 3). میانگین تعداد سلول‌های سرتولی و لیدیک در لوله‌های اسپرم‌ساز بسته به گروه متفاوت بود، به طوری که بیش‌ترین تعداد مربوط به گروه دریافت کننده جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* و کم‌ترین

همراه نانوذرات اکسید آهن کم تر قابل مشاهده بود و بررسی های بافت شناسی نشان داد که مصرف جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس موجب بهبود اختلالات ناشی از نانوذرات اکسید آهن شد به طوری که سازمان دهی بافتی نرمال، ساختار لوله های اسپرم ساز با سلول های اسپرماتوژنی و تولید اسپرم نرمال در مقایسه با گروه دریافت کننده نانوذرات اکسید آهن مشهود بود (Figure 1D).

شدن، بروز پراکندگی سلولی، افزایش فضا های واکوئله در اپی تلیوم لوله های اسپرم ساز، ادم بافت بینابینی و کاهش سلول های لیدیگ در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید (Figure 1B). در گروه دریافت کننده جلبک اسپیرولینا (G3) لوله های اسپرم ساز و بافت بینابینی همانند گروه کنترل دارای ساختار طبیعی بود (Figure 1C). تغییرات بافتی در گروه های دریافت کننده جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به

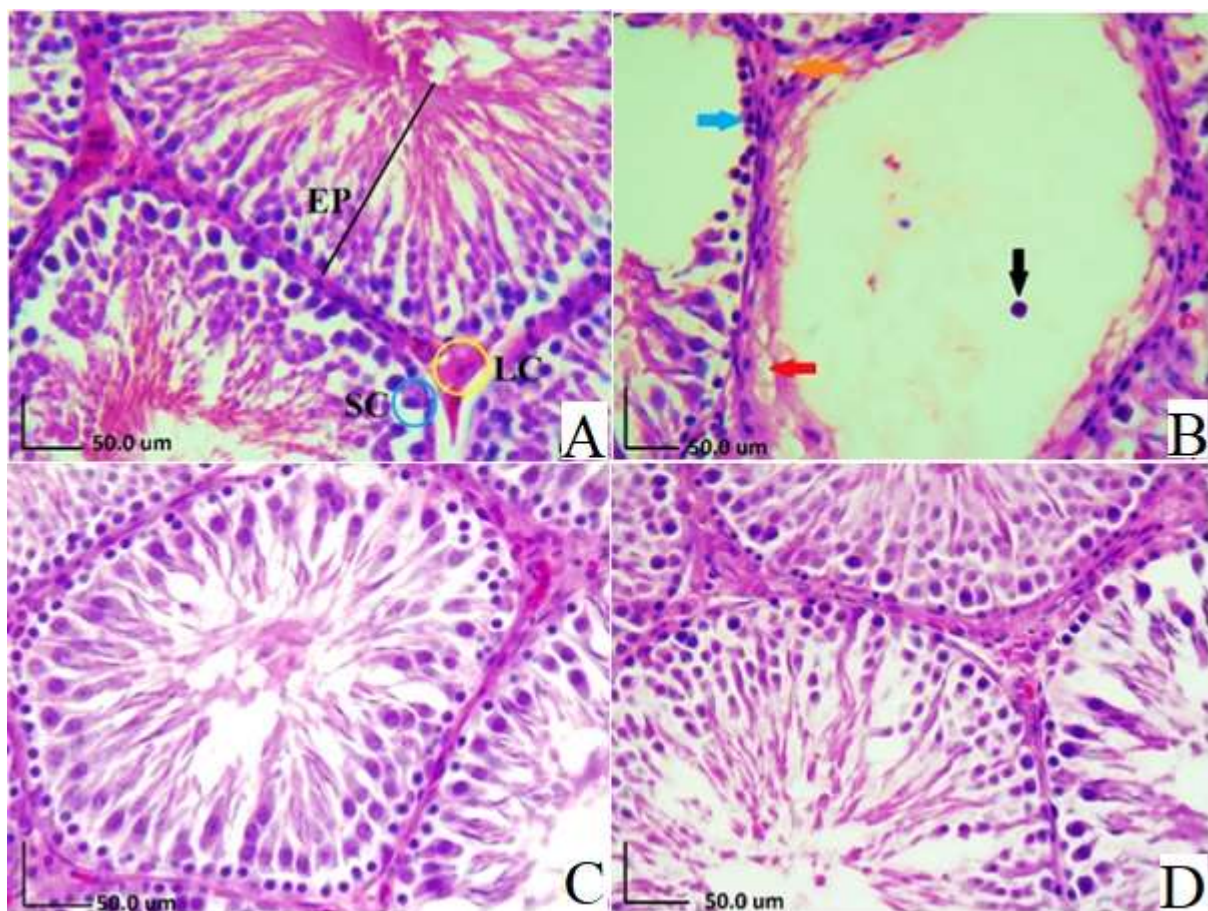


Figure 1: Microscopic structure of rat testis tissue in the studied groups (H&E, 40x). a) Regular arrangement of epithelium cells of spermatogenic tubules, black line, Sertoli cell (SC), Blue circle and Leydig cells (Lc), yellow circle, in the control group. b) Cellular discontinuity (blue arrow), vacuolization of germinal epithelium (red arrow), giant spermatids (black arrow) and interstitial tissue edema (orange arrow) can be seen in the testicular tissue of the group receiving iron oxide nanoparticles. c) The receiving group Spirulina produced spermatogenic tubes and interstitial tissue with normal structure. d) The combined groups of iron oxide nanoparticles + spirulina have complete spermatogenesis, healthy sperm tubes and more regular cell arrangement compared to the group of iron oxide nanoparticles.

بحث

بیضه و عملکرد تولید مثل می‌شوند (Park and Park, 2007; Tang et al, 2009).

مطابق تحقیقی که در سال ۲۰۱۱ انجام گرفت، از ۴ دوز مختلف نانوذرات ۴، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم که به صورت تزریق داخل وریدی استفاده شد. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که نانوذرات در دوزهای کم‌تر از ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم برای کاربردهای زیست پزشکی بی‌خطر هستند و هیچ‌گونه عوارض جانبی ندارند، اما دوزهای بیش از ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم سمی هستند (Lucian et al, 2011). این مطالعه با یافته‌های ما هم‌خوانی دارد. ذکر این نکته ضروری است که علاوه بر دوز و اندازه نانوذرات، مدت زمان قرار گرفتن در معرض آن‌ها و همچنین نحوه تجویز نانوذرات مسئول تغییرات زیادی در بافت بیضه و سمیت آن‌ها در مطالعات مختلف می‌باشد (Fairoze, 2007).

در مطالعه حاضر جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس موجب معکوس کردن تغییرات هیستولوژیک و هیستومتریکی نظیر قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و تعداد سلول‌های سرتولی و لیدیگ شد. در نتایج مشابه با یافته‌های ما، گزارش شده است که مصرف خوراکی جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به مدت ۱۶ روز در موش‌های دریافت‌کننده نانوذرات اکسید آهن با استفاده از روش داخل صفاقی موجب کاهش آسیب‌های ناشی از سمیت اکسید آهن در بافت‌های کبد و کلیه می‌شود (Poormoosavi et al, 2019). مطالعات بالینی نیز پیشنهاد کرده‌اند که مصرف جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در موش‌های دریافت‌کننده اکسید آهن به مدت ۱۶ روز می‌تواند موجب کاهش نواحی التهابی در بافت‌های کلیه و کبد شود (Poormoosavi et al, 2019). نشان داده شده است که جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس / می‌تواند اثرات ناشی از کلرید جیوه را در بیضه موش صحرائی کاهش داده و سبب توقف یا کاهش ارتفاع اپی‌تلیوم شود (Belfield and Goldberg, 1971) که با نتایج این تحقیق مشابهت داشت. به طور خلاصه مکانیسم‌های پیشنهادی اثر جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در مدیریت سمیت ناشی از دریافت نانوذرات

نتایج حاصل از بررسی‌های هیستومتری و هیستولوژی این مطالعه نشان داد که تجویز نانوذرات اکسید آهن موجب واکنش شدن و ناپیوستگی لایه زایا و کاهش پارامترهایی نظیر قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، ارتفاع اپی‌تلیوم، تعداد سلول‌های سرتولی و لیدیگ در بافت بیضه موش‌های صحرائی در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. در مقابل مصرف جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس همراه با نانوذرات اکسید آهن اختلالات ساختاری فوق را بهبود می‌بخشد.

اثرات سمی نانوذرات اکسید آهن بر سلول‌ها و بافت بیضه در موش قبلاً گزارش شده و این گونه بیان شده است که نانوذرات اکسید آهن سبب کاهش قابل توجه در ارتفاع اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز، تعداد کل سلول‌های لیدیگ، سرتولی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و اسپرماتوگونیا در مقایسه با گروه کنترل می‌شود و همچنین می‌تواند موجب کاهش قابل توجه تراکم اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز شود (Mirzaei Varzeghani et al, 2018). پیشنهادی در توجیه اثرات نانوذرات اکسید آهن عبارتند از نوع، اندازه، پتانسیل زتا، وضعیت پراکندگی یا آگلومراسیون، و همچنین برهم‌کنش بالقوه با مولکول‌های زیستی که بر سمیت این ذرات و در نتیجه اثرات آن‌ها بر روی انسان و حیوانات تأثیر می‌گذارند. نانوذرات دارای قابلیت و توانایی ورود، جابجایی در درون بدن و آسیب به موجودات زنده می‌باشند و این توانایی، عمدتاً به خاطر اندازه کوچک آن‌هاست که اجازه نفوذشان به موانع فیزیولوژیک و عبور به داخل سیستم گردش خون میزبان را می‌دهد (Park et al, 2011). در این راستا مطالعات انجام شده دیگر نشان داده‌اند که نانوذرات طلا و اکسید آهن (Fe_2O_3 و Fe_3O_4) می‌توانند سبب استرس اکسیداتیو، تولید ROS و آسیب میتوکندری ایجاد کنند که منجر به تجمع اتوفازوزوم‌ها و اتوفازی سلولی می‌شود. به نظر می‌رسد که این مکانیسم‌ها احتمالاً در سمیت نانوذرات اکسید آهن دخیل هستند. همچنین گزارش شده است که نانوذرات اکسید آهن باعث ایجاد تغییرات مورفولوژیکی در بافت

مطالعه حاضر، ممکن است به خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و همچنین محافظتی آن مربوط شود.

گزارش شده است که نانوذرات اکسید آهن باعث آسیب به بافت بیضه در موش‌ها می‌شود، از این آسیب‌ها می‌توان به جدا شدن و واکنش شدن سلول‌های حاضر در لوله‌های منی‌ساز اشاره نمود (Gundersen et al, 1988; Negahdary et al, 2015). مشاهدات فراساختاری توسط میکروسکوپ الکترونی حاکی از آن است که در بافت بیضه حیوانات قرار گرفته در معرض نانوذرات، سلول‌های زاینده اعم از اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها دچار آپوپتوز شده‌اند. آپوپتوز سلول‌های زاینده که در اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه رخ می‌دهد به عنوان یک علت اصلی برای کاهش جمعیت سلول‌های زاینده در حیوانات تحت درمان با نانوذرات معرفی شده است. نانوذرات فلزات عملکرد غشای پایه، سلول‌های سرتولی و سلول‌های اسپرماتوگونی را تحت تأثیر قرار داده یا مختل می‌کنند که منجر به کاهش تعداد سلول‌های زاینده از طریق آپوپتوز یا مرگ سلولی می‌شود (Mesbah et al, 2008).

در مطالعه حاضر، جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس موجب شد که نانوذرات اکسید آهن از بافت‌های بدن از جمله بیضه‌ها دفع شده و همچنین سبب بهبود تغییرات ایجاد شده در بافت بیضه نظیر ارتفاع اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز، قطر لوله‌ها، تعداد سلول‌های سرتولی، تعداد سلول‌های لیدیک و اندازه این سلول‌ها در بافت بیضه مربوط به نانوذرات اکسید آهن شد. پیشنهاد شده است که درمان با جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس می‌تواند از طریق کیلاسیون موثر آهن را از بدن دفع می‌کند. یکی دیگر از مکانیسم‌های پیشنهادی برای کاهش نانوذرات اکسید آهن پس از درمان با جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس، محتوای بالای متالوتونین‌ها است که پروتئین‌هایی هستند که قادر به اتصال به فلزات سنگین و دفع آن‌ها از بدن هستند (El Shanshory et al, 2017). در این راستا گزارش شده است که بقا و سلامت سلول‌ها ممکن است توسط اثرات مخرب نانوذرات بر روی گیرنده‌های غشایی یا مکانیسم‌های انتقال سیگنال سلولی

اکسید آهن در بافت‌های بدن از طریق افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی (SOD) و کاهش فعالیت MAD و CAT در بافت‌ها از جمله کبد بیان گردیده است (Reitman and Frankel, 1957).

مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها به طور کلی می‌تواند آسیب سلولی مرتبط با استفاده از نانوذرات اکسید آهن را کاهش دهد. مصرف آنتی‌اکسیدان چه قبل از مواجهه با نانوذرات اکسید آهن یا همزمان با تجویز آن می‌تواند از آسیب‌های عروقی و بافتی جلوگیری نماید (Romay et al, 1998; Salazar et al, 1998).

جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به دلیل داشتن مواد موثره و فیکوسیانین قابل توجه، بتا کاروتن (رنگدانه نارنجی که وضعیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد)، توکوفرول، سلنیوم و ترکیبات فنلی که به داشتن آنتی‌اکسیدان موثر شناخته شده است، توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس دارای اثرات ضد التهابی است، به عنوان مثال، فایکوسیانین یک آنتی‌اکسیدان اصلی محلول در آب است که در جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به وفور یافت می‌شود، این ماده ۲۰ برابر موثرتر از ویتامین C است (Ismail et al, 2015). ترکیبات فعال جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس قادرند با هم افزایی برای اعمال اثرات آنتی‌اکسیدانی شدید وارد عمل شوند.

اثرات محافظتی جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در سمیت ایجاد شده توسط سیکلوفسفامید که سبب کاهش باروری بیضه می‌شود از طریق کاهش مواردی نظیر مالون دی‌آلدئید و افزایش سطح سرمی گلووتاتیون پراکسیداز و همچنین با داشتن مکانیسم آنتی‌اکسیدانی که به عنوان یک مدل مناسب تعریف شده در مطالعات پیش بالینی در نظر گرفته می‌شود نیز نشان داد که جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس از طریق محافظت از عملکرد و ساختار سلول و همچنین افزایش سوپراکسید دیسموتاز و گلووتاتیون پراکسیداز در این سلول‌ها دارای اثرات محافظتی می‌باشد (Sanoka et al, 1997). بهبود تغییرات ساختاری مربوط به تجویز نانوذرات اکسید آهن در بافت بیضه توسط جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در

فعال جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس قادرند با هم افزایی برای اعمال اثرات آنتی اکسیدانی شدید وارد عمل شوند و آسیب‌های بافتی در اثر سمیت ایجاد شده توسط نانو ذرات فلزات را کاهش دهد.

در مجموع، یافته‌های مطالعه حاضر مؤید بهبود تغییرات ساختاری بافت بیضه و لوله‌های اسپرم‌ساز موش‌های صحرایی دریافت کننده نانو ذرات اکسید آهن به دنبال مصرف جلبک اسپیرولینا در سطح قابل قبول می‌باشد. هرچند مطالعات تکمیلی جهت روشن شدن مکانیسم‌های زیربنایی این تغییرات مورد نیاز می‌باشد.

مورد تهدید واقع شود (El Shanshory et al, 2017). نشان داده شده است که جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس موجب جلوگیری از کاهش سلول‌های اسپرماتوزنز در نواحی مختلف لوله‌های اسپرم ساز بیضه موش‌های صحرایی دریافت کننده کلرید جیوه می‌شود (El-Desoky et al, 2013). علاوه بر این Bermejo و همکاران نیز نشان دادند که درمان با جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس موجب جلوگیری از آتروفی شدن و بهبود تغییرات بافتی در موش‌های صحرایی دریافت کننده نانو ذرات اکسید آهن توسط دفع آهن از بافت‌ها می‌شود (Bermejo et al, 2008). ترکیبات

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر نتیجه بخشی از پایان‌نامه آقای عباس پیرزاده دانشجوی دکتری تخصصی (PhD) می‌باشد. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران جهت تأمین اعتبار مالی تشکر می‌شود.

تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی ندارند.

منابع مالی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و امتنان خود را از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران که هزینه این تحقیق را در قالب پژوهانه از طریق هزینه کرد پایان نامه‌های دانشجویان (پایان‌نامه دکتری تخصصی بافت‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) فراهم نموده‌اند، اعلام می‌دارند.

منابع

- Afkhami-Ardakani, M., Hassanzadeh, S., Shahrooz, R., Asadi-Samani, M., Latifi, E., & Luther, T. (2017). Phytotherapy and phytopharmacology for reduction of cyclophosphamide-induced toxicity in the male urinary system. *Journal of Renal Injury Prevention*, 6(3): 164-170.
- Aitken, R. J., & Baker, M. A. (2013). Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *International Journal of Developmental Biology*, 57(2-3-4): 265-272.
- Belay, A. (2002). The Potential Application of Spirulina (Arthrospira) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management. *Journal of the American Nutraceutical Association*, (5): 27-48.
- Belfield, A., & Goldberg, D. M. (1971). Revised assay for serum phenyl phosphatase activity using 4-amino-antipyrine. *Enzyme*, 12: 561-573.
- Brissot, P., Ropert, M., Le Lan, C., & Loréal, O. (2012). Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(3): 403-410.
- Deng, R., & Chow, T. J. (2010). Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae Spirulina. *Cardiovascular therapeutics*, 28(4): e33-e45.

- El Shanshory, M. R., Awad, M. A., El Shafey, R. A., Soliman, H. H., & Alsharkawy, A. A. (2017). Evaluation of liver iron concentrations in children with beta thalassemia infected with hepatitis C virus before and after spirulina therapy by magnetic resonance imaging. *Arch Blood Transfus Disord*, 5(4): 1-9.
- El-Desoky, G. E., Bashandy, S. A., Alhazza, I. M., Al-Othman, Z. A., Aboul-Soud, M. A., & Yusuf, K. (2013). Improvement of mercuric chloride-induced testis injuries and sperm quality deteriorations by *Spirulina platensis* in rats. *PLoS one*, 8(3): e59177.
- Fairoze, K. I. (2007). Histological and ultra structural studies on the testis of rat after treatment with aluminum chloride. *Aust J Basic Appl Sci*, 1(1): 63-72.
- Gopinath, P., Gogoi, S. K., Chattopadhyay, A., & Ghosh, S. S. (2008). Implications of silver nanoparticle induced cell apoptosis for in vitro gene therapy. *Nanotechnology*, 19(7): 075104.
- Gundersen, H. J. G., Bagger, P., Bendtsen, T. F., Evans, S. M., Korbo, L. X. M. N., Marcussen, N., ... & West, M. J. (1988). The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*, 96(7-12): 857-881.
- Hussain, S. M., Braydich-Stolle, L. K., Schrand, A. M., Murdock, R. C., Yu, K. O., Mattie, D. M., ... & Terrones, M. (2009). Toxicity evaluation for safe use of nanomaterials: recent achievements and technical challenges. *Advanced Materials*, 21(16): 1549-1559.
- Ismail, M., Hossain, M., Tanu, A. R., & Shekhar, H. U. (2015). Effect of spirulina intervention on oxidative stress, antioxidant status, and lipid profile in chronic obstructive pulmonary disease patients. *BioMed research international*, 2015: 1-7.
- Lan, Z., & Yang, W. X. (2012). Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier. *Nanomedicine*, 7(4): 579-596.
- Lewinski, N., Colvin, V., & Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *small*, 4(1): 26-49.
- Hritcu, L., Stefan, M., Ursu, L., Neagu, A., Mihasan, M., Tartau, L., & Melnig, V. (2011). Exposure to silver nanoparticles induces oxidative stress and memory deficits in laboratory rats. *Open Life Sciences*, 6(4): 497-509.
- Maneesh M., Jayalekshmi H., Sanjiba Dutta, Amit Chakrabarti and Vasudevan D.M. (2005). Experimental the rapeutical intervention with ascorbic acid in ethanol induced testicular injuries in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43: 172-176.
- Mari M., Wu D., Nieto N. and Cederbaum A.I. (2001). CYP2E1- Dependent Toxicity and UpRegulation of Antioxidant Genes. *Journal of Biomedical, Science*, 8 (1): 52-56.
- Maurer-Jones MA, Bantz KC, Love SA, Marquis BJ, Haynes CL. (2009). Toxicity of therapeutic nanoparticles. *Nanomedicine*, 4: 219-241.
- Mesbah S, Shokri S, Doust S, Mirkhani, H. (2008). Effects of nandrolone decanoate on the ultrastructure of testis in adult male rats. *IJMS*, 32(2): 94-100.
- Mirzaei Varzeghani, S., Parivar, K., Abdollahifar, M. A., & Karamian, A. (2018). Effects of iron oxide nanoparticles on mouse sperm parameters and testicular tissue. *Iranian Journal of Toxicology*, 12(6): 39-44.
- Naqvi, S., Samim, M., Abdin, M. Z., Ahmed, F. J., Maitra, A. N., Prashant, C. K., & Dinda, A. K. (2010). Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *International journal of nanomedicine*, 6: 983-989.
- Negahdary, M., Arefian, Z., Dastjerdi, H. A., & Ajdary, M. (2015). Toxic effects of Mn2O3 nanoparticles on rat testis and sex hormone. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 6(2): 335-9.
- Pak, W., Takayama, F., Mine, M., Nakamoto, K., Kodo, Y., Mankura, M., ... & Mori, A. (2012). Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of spirulina on rat model of non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 51(3): 227-234.
- Park E-J, Park K (2007) Induction of reactive oxygen species and apoptosis in BEAS-2B cells by mercuric chloride. *Toxicol In Vitro* 21: 789-790
- Park, E. J., & Park, K. (2007). Induction of reactive oxygen species and apoptosis in BEAS-2B cells by mercuric chloride. *Toxicology in vitro*, 21(5): 789-794.
- Park, K., Park, E. J., Chun, I. K., Choi, K., Lee, S. H., Yoon, J., & Lee, B. C. (2011). Bioavailability and toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats. *Archives of pharmacal research*, 34(1): 153-158.
- Poormoosavi, S. M., Behmanesh, M. A., & Najafzadehvarzi, H. (2019). Effects of *Spirulina platensis* on the Improvement of Hepatorenal Toxicity Induced by Iron Oxide in Wistar Rats Using Biochemical and Histological Methods. *Shiraz E-Medical Journal*, 20(8).

- Reitman, S., & Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American journal of clinical pathology*, 28(1): 56-63.
- Romay, C. H., Armesto, J., Ramirez, D., González, R., Ledon, N., & Garcia, I. (1998). Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. *Inflammation research*, 47(1): 36-41.
- Salazar, M., Martinez, E., Madrigal, E., Ruiz, L. E., & Chamorro, G. A. (1998). Subchronic toxicity study in mice fed *Spirulina maxima*. *Journal of ethnopharmacology*, 62(3): 235-241.
- Sanoka D, Miesel R, Jedzejczak R, et al. (1997). Oxidative stress and male fertility. *J Androl*, 12(1): 2434-2436.
- Tang, J., Xiong, L., Wang, S., Wang, J., Liu, L., Li, J., ... & Xi, T. (2009). Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 9(8): 4924-4932.
- Xu, Y., Wang, N., Yu, Y., Li, Y., Li, Y. B., Yu, Y. B., ... & Sun, Z. W. (2014). Exposure to silica nanoparticles causes reversible damage of the spermatogenic process in mice. *PLoS one*, 9(7): e101572.
- Yang, F., Wong, K. H., Yang, Y., Li, X., Jiang, J., Zheng, W., ... & Chen, T. (2014). Purification and in vitro antioxidant activities of tellurium-containing phycobiliproteins from tellurium-enriched *Spirulina platensis*. *Drug design, development and therapy*, 8: 1789-1800.
- Yoshida, S., Hiyoshi, K., Ichinose, T., Takano, H., Oshio, S., Sugawara, I., ... & Shibamoto, T. (2009). Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice. *International journal of andrology*, 32(4): 337-342.

Received: 06.12.2022

Accepted: 08.02.2023

مقایسه رقیق کننده حاوی پلاسمای زرده تخم کبوتر، مرغ و ترکیب آن‌ها جهت نگهداری منی قوچ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

علیرضا حمیسی^۱، محسن اسلامی^{۲*}، حامد اسماعیلی^۳، فرهاد فرخی‌اردبیلی^۴ و سینا بهمنی^۳

^۱ دانشجوی دکتری تخصصی مامایی و بیماری‌های تولید مثل دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۲ دانشیار گروه مامایی و بیماری‌های تولید مثل دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۳ دانش‌آموخته دکتری تخصصی مامایی و بیماری‌های تولیدمثل دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۴ دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱/۹

چکیده

مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر پلاسمای زرده تخم کبوتر و مرغ در مقایسه با ترکیب پلاسمای زرده کبوتر+ مرغ در رقیق کننده تریس-اسید سیتریک-فروکتوز جهت حفظ کیفیت منی قوچ به صورت مایع-سرد انجام شد. نمونه‌های منی با استفاده از واژن مصنوعی از چهار قوچ نژاد قزل دویار در هفته جمع‌آوری شد و در صورتی که معیارهای مورد نظر را داشت با هم مخلوط و در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت. رقیق کننده تریس-سیتریک اسید-فروکتوز با استفاده از پلاسمای زرده تخم کبوتر (۲۸ درصد، حجمی/حجمی)، تخم مرغ (۲۸ درصد) و ترکیب پلاسمای زرده تخم کبوتر (۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۱ درصد) و مرغ (۲۱، ۱۴ و ۷ درصد) تهیه و جهت آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. متعاقب رقیق‌سازی نمونه‌ها، شاخص‌های حرکت کلی و پیشرونده رو به جلو اسپرم (توسط سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم)، زنده‌مانی و انسجام غشای اسپرم در ساعات صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مطالعه بعد از سرد کردن (۴ درجه سانتی‌گراد)، ارزیابی شد. همچنین، مقدار مالون‌دی‌آلدهید، به عنوان شاخص اکسیداتی در ساعت‌های مذکور اندازه‌گیری شد. نتایج آزمایش نشان داد که حرکت پیشرونده رو به جلو (در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲) و زنده‌مانی (در ساعت ۷۲) در رقیق کننده حاوی ۲۸ درصد پلاسمای زرده تخم کبوتر به طور معنی‌دار بالاتر از گروه‌های دریافت کننده ترکیب پلاسمای زرده تخم کبوتر+مرغ بود. همچنین انسجام غشای پلاسمایی اسپرم در گروه دریافت کننده ۲۸ درصد پلاسمای زرده تخم کبوتر در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ بالاتر از گروه‌های ترکیبی با غلظت ۱۴ و ۲۱ درصد پلاسمای تخم مرغ بود. غلظت مالون‌دی‌آلدهید بین گروه‌های مطالعه اختلاف معنی‌دار نشان نداد. در نتیجه ترکیب پلاسمای تخم مرغ و کبوتر به اندازه رقیق کننده حاوی پلاسمای زرده تخم کبوتر و پلاسمای زرده تخم مرغ (هر کدام به تنهایی) جهت نگهداری منی قوچ به صورت مایع-سرد کارا نمی‌باشد.

کلمات کلیدی: پلاسمای زرده تخم کبوتر، قوچ، اسپرم‌اتوزوآ، مالون‌دی‌آلدهید

مقدمه

تلقیح مصنوعی تکنیکی مؤثر در موفقیت و افزایش بهره‌وری صنعت دامپروری است (Ongun et al, 1997). موفقیت در برنامه تلقیح مصنوعی بستگی به مدیریت صحیح در جمع‌آوری، نگهداری و استفاده از منی دارد. ذخیره کردن منی مهم‌ترین مرحله در تلقیح مصنوعی است. به دنبال اخذ و نگهداری منی در دمای یخچال، اختلال در

* نویسنده مسئول: محسن اسلامی، دانشیار گروه تریولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

E-mail: m.eslami@urmia.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

(Manjunath, 2006). تحقیقات نشان داده که لیپوپروتئین با دانسیته پایین موجود در زرده تخم مرغ مهم ترین فاکتور محافظت کننده از اسپرم در برابر شوک سرمایی می باشد. این ترکیب به عنوان یک عامل مداخله گر (Vishwanath et al, 1992) با پروتئین های منی ترکیب شده و یا مانع اتصال آن ها به غشای پلاسمایی اسپرم خواهد شد (Hu et al, 2010; Bucak et al, 2008; Jiang et al, 2007; Bergeron et al, 2005; Amirat et al, 2004; Watson & Martin, 1975). با این حال زرده کامل تخم می تواند معایبی همچون اختلال در تنفس اسپرم، خطر آلودگی به پاتوژن ها، اختلال در ارزیابی مارکرهای بیوشیمیایی اسپرم، کاهش حرکت اسپرم و اختلال در ارزیابی حرکت اسپرم توسط نرم افزار کاسا را داشته باشد (Pillet et al, 2011; Moussa et al, 2002). پلازما ماده ای شفاف است و بخشی از زرده کامل می باشد. با سانتریفیوژ کردن زرده تخم می توان پلازما را از گرانول های آن جدا نمود. مطالعات نشان دادند که پلاسمای زرده تخم مرغ در نگهداری و باروری منی گاو میش و نریان بهتر از زرده کامل تخم مرغ بوده است (Pillet et al, 2011; Hussain Shah et al, 2017). اخیراً مطالعه ای بهبود حرکت پیشرونده رو به جلو در نگهداری منی شتر را در پلاسمای زرده تخم کبوتر در مقایسه با پلاسمای زرده تخم مرغ نشان داد (Panahi et al, 2017). علی رغم این که زرده تخم پرندگان مختلف من جمله اردک، بلدرچین و مرغ تشابهات زیادی در میزان رطوبت، پروتئین و چربی تام دارند (Bathgate et al, 2006)، منتها از نظر میزان فسفولیپید، کلسترول و اسیدهای چرب با هم دیگر متفاوت می باشند، که همین تفاوت منجر به تفاوت در توان حفاظتی آن ها در برابر شوک سرمایی از اسپرم می شود (Bathgate et al, 2006; Trimeche et al, 1997; Graham and Foote, 1987; Bair and Marion, 1978). مشخص شده است که میزان کلسترول به ازای هر گرم زرده تخم در کبوتر بیش تر از اردک، بلدرچین و مرغ می باشد (Bair and Marion, 1978). میزان بالای کلسترول در تخم کبوتر می تواند در نگهداری اسپرم در محیط خارج از بدن مؤثرتر از زرده دیگر پرندگان باشد (Panahi et al,

انسجام غشای اسپرم و کاهش خواص حیاتی مثل تحرک و باروری مشاهده می شود (Salamon and Maxwell, 1993; De Lamirande and Gagnon, 2000). از عوامل عمده کاهش باروری اسپرم های نگهداری شده در دماهای پایین می توان به نقص های مورفولوژیک، غیرطبیعی بودن اکروزوم، تولید آنیون سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون های لیپیدهای غشای اسپرم اشاره کرد (Alvarez and Storey, 1983; 1995). پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم باعث کاهش باروری و آسیب غیرقابل برگشت در حرکت اسپرم خواهد شد (Maxwell and Watson, 1996; Aitken and Fischer, 1994; De Lamirande and Gagnon, 1992). سیستم های آنزیمی آنتی اکسیدانی پلاسمای منی شامل گلوتاتیون (GSH)، گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-PX)، کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز بوده که این ها در روندهای جلوگیری از پراکسیداسیون نقش مهمی دارند، ولی این مجموعه آنتی-اکسیدانی اغلب کفایت لازم در جلوگیری از بروز پراکسیداسیون لیپید جهت نگهداری منی در محیط خارج از بدن را ندارد (Aurich et al, 1997). مشخص شده است که نگهداری در شرایط سرد، باعث کاهش فعالیت مواد آنتی اکسیدانی موجود در اسپرم گاو و انسان می شود (Alvarez and Storey, 1989; Jones et al, 1979). مطالعات مختلفی جهت یافتن رقیق کننده با ترکیب مناسب برای بهبود نگهداری منی در حیوانات انجام گرفته شده است.

زرده تخم مرغ یک جزء اصلی رقیق کننده مورد استفاده برای ذخیره سرد-مایع و انجماد منی حیوانات می باشد و با تأثیر بر غشای سلولی، اسپرم را در برابر شوک سرما محافظت می کند (Bucak et al, 2008; Bergeron and Manjunath, 2006; Purdy, 2006; Wall and Foote, 1997; Holt, 1999). پلاسمای منی دارای پروتئین هایی به نام BSP است که سبب خارج شدن فسفولیپیدها و کلسترول از غشاء اسپرم شده در نتیجه باعث افزایش حساسیت اسپرم به شوک سرمایی می شود (Bergeron and

نمونه‌های منی پس از جمع‌آوری بلافاصله به آزمایشگاه فیزیولوژی منتقل و در آب گرم 37°C قرار داده شدند. در آزمایشگاه ابتدا ارزیابی‌های اولیه اعم از حجم، غلظت و حرکت انجام گرفت. نمونه‌هایی که حجم آن‌ها $2-0.75$ میلی‌لیتر، حداقل غلظت اسپرم $10^9 \times 2/5$ میلی-لیتر/اسپرماتوزوآ، حرکت توده‌ای ≤ 4 و حرکت پیشرونده رو به جلو بیش از 70 درصد را دارا بودند، از هر قوچ انتخاب شده و در حجم مساوی با هم مخلوط شده و جهت انجام مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند (Bucak et al, 2008).

برای ارزیابی حرکت توده‌ای اسپرم، مقدار 25 میکرولیتر از نمونه‌های خام را روی لام قرار داده (بدون لامل) و با استفاده از بزرگ‌نمایی 10 میکروسکوپ سه چشمی فازکنتراست (Labomed, Labomed Inc., Culver City, CA, USA) مجهز به دوربین فیلم برداری متصل به کامپیوتر ارزیابی گردید. برای این تحقیق از نمونه‌هایی استفاده شد که حرکت توده‌ای آن‌ها خوب یا خیلی خوب (درجه 4 یا 5) بود. همچنین برای شمارش تعداد اسپرم از لام هموسایتومتر استفاده شد.

در این مطالعه رقیق کننده منی شامل تریس (هیدروکسی متیل آمینومتان) $3/63$ گرم، فروکتوز $0/5$ گرم، اسید سیتریک $1/99$ گرم، 100000 واحد بین‌المللی پنی سیلین جی سدیم، 100 میلی‌گرم استرپتومایسین به همراه پلاسمای زرده (28 درصد) تخم مرغ/تخم کبوتر بود که با آب مقطر به حجم 100 سی‌سی رسانده شد (Salamon and Maxwell, 2000). منی به میزانی با رقیق کننده مخلوط شد که در هر سی‌سی پانصد میلیون اسپرم وجود داشته باشد. رقیق کننده و منی هر دو در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با یکدیگر مخلوط شدند. در آزمایش حاضر گروه‌های مورد مطالعه شامل: ۱- گروه دریافت کننده ترکیب پلاسمای زرده تخم مرغ (21 درصد) با پلاسمای زرده تخم کبوتر (7 درصد)، ۲- گروه دریافت کننده ترکیب پلاسمای زرده تخم مرغ (14 درصد) با پلاسمای زرده تخم کبوتر (14 درصد)، ۳- گروه دریافت کننده ترکیب پلاسمای زرده تخم مرغ (7 درصد) با پلاسمای زرده تخم کبوتر (21 درصد)، ۴- گروه

(2017). علی‌رغم مؤثرتر بودن پلاسمای زرده تخم کبوتر در مقایسه با زرده تخم مرغ، عدم دسترسی راحت، فصلی بودن تولید آن و مشکل در تهیه تخم کبوتر تازه از عوامل محدود کننده استفاده از آن جهت تهیه رقیق کننده منی می‌باشد. تا به حال مطالعه جامع در مورد اثر مقایسه‌ای پلاسمای زرده تخم مرغ، پلاسمای زرده تخم کبوتر و ترکیب پلاسمای زرده تخم مرغ و کبوتر در رقیق کننده منی قوچ انجام نشده است. بنابراین در مطالعه حاضر اثر مقایسه‌ای پلاسمای زرده تخم مرغ، پلاسمای زرده تخم کبوتر و ترکیب پلاسمای زرده تخم مرغ و کبوتر (در غلظت 28 درصد) در رقیق کننده تریس جهت نگهداری منی قوچ در دمای یخچال مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت. هدف اصلی مطالعه حاضر بررسی اثر استفاده از مقادیر کم‌تر پلاسمای زرده تخم کبوتر و ترکیب آن با پلاسمای زرده تخم مرغ جهت افزایش کیفیت رقیق کننده (در مقایسه با پلاسمای زرده تخم مرغ) در نگهداری منی قوچ به صورت مایع-سرد می‌باشد.

مواد و روش کار

این آزمایش در طی پاییز و زمستان در گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه واقع در 11 کیلومتری شمال غرب ارومیه انجام گرفت. در این مطالعه از 4 راس قوچ نژاد قزل ($2-3$ ساله) جهت اخذ منی و دو راس میش فحل جهت کمک به اخذ منی استفاده شد. در طول انجام مطالعه شرایط تغذیه‌ای حیوانات ثابت و یکسان و شامل یونجه با کیفیت و جو بود.

هفته‌ای دوبار از قوچ‌ها نمونه منی با استفاده از واژن مصنوعی (Paulenz et al, 2002) در حضور میش فحل اخذ شد. برای ایجاد فحلی در میش‌ها از اسفنج داخل واژنی حاوی مدروکسی پروژسترون استات (Sponjavet, Hipra, Spain) به مدت حداقل یک هفته استفاده شد و در هنگام خارج کردن آن $0/5$ میلی‌لیتر استرادیول بنزوات (ابوریحان، ایران) به همراه آنالوگ پروستاگلاندین اف دو آلفا (دی-کلوپروستنول، ابوریحان، ایران) تزریق شد.

forward) و حرکت پیشرونده رو به جلو (total motility) و حرکت پیشرونده رو به جلو (progressive motility) بود.

جهت تعیین درصد اسپرم‌های زنده و مرده، رنگ‌آمیزی ائوزین - نگرزین بر روی نمونه‌ها تحت مطالعه در ساعت‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مطالعه انجام گرفت. محلول ائوزین - نگرزین طبق پروتکل (Evans and Maxwell, 1987) تهیه شد و به منظور انجام رنگ‌آمیزی، میزان ۴۰ میکرولیتر از رنگ درون یک میکروتیوب قرار داده شد و ۲۰ میکرولیتر از منی رقیق شده به آن اضافه شد، سپس کاملاً با هم مخلوط شد. طی ۱۰ ثانیه، یک قطره از مخلوط را روی لام گذاشته و گسترش تهیه کرده و لام را در مجاورت هوا قرار داده تا خشک شود. با بزرگ-نمایی ۱۰۰ تعداد حداقل ۲۰۰ اسپرم (صورتی یا ارغوانی به عنوان مرده و بی‌رنگ به عنوان زنده تلقی شد) در فیلدهای مختلف هر گسترش با میکروسکوپ نوری مورد شمارش قرار گرفت.

برای ارزیابی انسجام غشای پلاسمایی اسپرم (Hypo-osmotic Swelling Test: HOST)، محلول HOS به صورت تازه و روزانه طبق پروتکل (Correa & Zovos, 1994) تهیه شد. جهت انجام آزمایش، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول HOS را در لوله‌های آزمایش ریخته و ۲۰ میکرولیتر از نمونه منی رقیق شده را به محلول HOS افزودیم. بعد از گذشت ۳۰-۶۰ دقیقه انکوباسیون (دمای ۳۷ درجه در بن ماری)، یک قطره از این مخلوط را روی یک لام میکروسکوپی گرم (۳۷ درجه) ریخته و یک لامل روی آن قرار داده و با میکروسکوپ فازکنتراست (Labomed, Labomed Inc., Culver City, CA, USA) حداقل تعداد ۲۰۰ اسپرم مورد ارزیابی و شمارش قرار گرفت. اسپرم‌هایی که دم صاف داشتند، غشایشان ناسالم و آن‌هایی که دم پیچ خورده داشتند، غشای آن‌ها سالم تلقی شد.

بعد از ارزیابی حرکت، زنده مانی و انسجام غشای اسپرم، نمونه‌های مورد مطالعه با استفاده از هموژنایزر برقی مخصوص سلول و با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه هموژن شدند تا غشای پلاسمایی اسپرم شکسته شده و هموژنیت

دریافت کننده پلاسمای زرده تخم مرغ (۲۸ درصد) و ۵-گروه دریافت کننده پلاسمای زرده تخم کبوتر (۲۸ درصد) بود که این گروه‌های درمانی به مدت ۷۲ ساعت در دمای یخچال نگهداری شده و شاخصه‌های حرکتی اسپرم و دیگر فاکتورهای مد نظر در ساعت‌های ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مطالعه ارزیابی شدند.

پلاسمای زرده تخم مرغ و کبوتر طبق پروتکل پیشنهادی با اندکی تغییر تهیه شد (Pillet et al, 2011). بدین صورت که بعد از جدا کردن و حذف کردن سفیده، زرده تخم با رقیق کننده حاوی تریس، سیتریک اسید، فروکتوز و آنتی-بیوتیک با غلظت ذکر شده در بالا (Mortazavi et al, 2020)، به نسبت یک به یک مخلوط شده (حجمی به حجمی) و به مدت یک ساعت در دمای ۵-۲ درجه سانتی-گراد روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. در ادامه دو مرحله سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی-گراد (Hettich, Germany) انجام شد و مایع رویی به عنوان پلاسمای زرده در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت. پلاسمای زرده تهیه شده، حداکثر تا مدت ۷۲ ساعت در یخچال نگهداری شد و در آزمایشات مطالعه مذکور مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور تعیین حرکت کلی و پیشرونده رو به جلوی اسپرم با استفاده از سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم (Computer-Assisted Sperm Analysis; CASA)، ۱۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده روی لام قرار داده شد و یک لامل ۲۲×۲۲ بر روی آن قرار گرفت و سپس با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست (Labomed, Labomed Inc., Culver City, CA, USA) مجهز به صفحه گرم و دوربین دیجیتال (M-Shot MD50-T) و متصل به کامپیوتر دارای نرم‌افزار کاسا (Test Sperm 3.2; Videotest, St. Petersburg, Russia) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای هر نمونه بیش از بیست فیلد آنالیز و تصویر برداری شد و خصوصیات حرکتی حداقل ۲۰۰ اسپرماتوزوآ مورد بررسی قرار گرفت. متغیرهای مورد ارزیابی شامل حرکت کلی

بقیه گروه‌های آزمایش بود، همچنین در ساعات ۴۸ و ۷۲ مطالعه در گروه پلاسمای زرده تخم کبوتر (۲۸ درصد) بالاتر از هر سه گروه ترکیبی بود (Table 1، $P < 0/05$). تغییرات داخل گروهی نشان دهنده کاهش معنی‌دار در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ نسبت به ساعت صفر مطالعه بود (Table 1، $P < 0/05$).

درصد زنده‌مانی بین گروه‌های مختلف آزمایش در ساعات‌های صفر، ۲۴ و ۴۸ مطالعه تفاوت معنی‌دار نشان نداد (Table 2، $P > 0/05$). در ساعت ۷۲ مطالعه در گروه دریافت کننده پلاسمای زرده تخم کبوتر (۲۸ درصد)، درصد زنده‌مانی بالاتر از گروه‌های ترکیبی بود (Table 2، $P < 0/05$). همچنین درصد زنده‌مانی در تمام گروه‌های آزمایش در ساعات ۴۸ و ۷۲ مطالعه کم‌تر از ساعت صفر بود (Table 2، $P < 0/05$).

درصد اسپرم با غشای پلاسمایی سالم در گروه پلاسمای زرده تخم کبوتر (۲۸ درصد) در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مطالعه بالاتر از گروه‌های پلاسمای زرده تخم مرغ (۱۴ درصد) + پلاسمای زرده تخم کبوتر (۱۴ درصد) و پلاسمای زرده تخم مرغ (۲۱ درصد) + پلاسمای زرده تخم کبوتر (۷ درصد) بود (Table 3، $P < 0/05$). آنالیز داخل گروهی نشان داد که درصد اسپرم با غشای پلاسمایی سالم در ساعات ۴۸ و ۷۲ مطالعه در تمام گروه‌های مطالعه کم‌تر از ساعت صفر مطالعه بود (Table 3، $P < 0/05$).

غلظت مالون دی‌آلدئید بین گروه‌های مختلف آزمایش در ساعات صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مطالعه تفاوت معنی‌دار نشان نداد (Table 4، $P > 0/05$). تغییرات داخل گروهی نشان داد که غلظت مالون دی‌آلدئید در ساعت ۲۴ مطالعه بالاتر از ساعت صفر، و در ساعت ۷۲ بالاتر از ساعات صفر و ۲۴ مطالعه بود (Table 4، $P > 0/05$).

اسپرم-رقیق کننده حاصل شود. سپس نمونه‌های هموژنیت اسپرم-رقیق کننده تا زمان اندازگیری مالون‌دی‌آلدئید در فریزر ۲۲- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدئید در هموژنیت اسپرم-رقیق کننده از استاندارد استفاده شد (Fredrick et al, 2000). ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه با دو میلی‌لیتر از معرف مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه داخل بن ماری جوش قرار داده شد. پس از خنک کردن، لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۲۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. در نهایت جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر در مقابل بلانک قرائت گردید. غلظت مالون‌دی‌آلدئید به صورت میکرومول در لیتر در نمونه‌ها گزارش شد.

برای هر زمان در هر گروه آزمایش ۷ بار تکرار در نظر گرفته شد. اثر درمان، زمان و برهم کنش بین درمان و زمان با استفاده از آنالیز واریانس دوطرفه با استفاده از نرم‌افزار SigmaStat مورد ارزیابی آماری قرار گرفت. در مطالعه مذکور تست تعقیبی Holm-Sidak مورد استفاده قرار گرفت. داده‌ها به صورت Least square means ارائه شد. $P \text{ value} < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

درصد حرکت کلی بین گروه‌های مختلف آزمایش در ساعات‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مطالعه تفاوت معنی‌دار نشان نداد (Table 1، $P > 0/05$). آنالیز داخل گروهی نشان داد که درصد حرکت کلی در تمام گروه‌های آزمایش در ساعت ۲۴ کم‌تر از ساعت صفر و در ساعات ۴۸ و ۷۲ مطالعه کم‌تر از ساعت ۲۴ بود (Table 1، $P < 0/05$).

درصد حرکت پیشرونده رو به جلو در گروه پلاسمای زرده تخم کبوتر (۲۸ درصد) در ساعت ۲۴ مطالعه بالاتر از

Table 1: Percentage of total and forward progressive motility of ram spermatozoa (least square mean) in the extender containing pigeon plasma egg yolk (PPEY), chicken plasma egg yolk (CPEY), and combinations of the PPEY+CPEY during cold storage up to 72 h at 4°C.

| Parameter | Experimental groups | Time of Storage (h) | | | |
|--|-------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| | | 0 | 24 | 48 | 72 |
| Percentage of total motility | PPEY (28%) | 88.11 ^a | 80.01 ^b | 73.21 ^c | 63.82 ^d |
| | CPEY (28%) | 86.78 ^a | 78.92 ^b | 72.45 ^c | 64.59 ^d |
| | CPEY (7%) + PPEY (21%) | 86.80 ^a | 77.71 ^b | 71.91 ^c | 66.81 ^c |
| | CPEY (14%) + PPEY (14%) | 88.10 ^a | 78.44 ^b | 69.33 ^c | 64.59 ^c |
| | CPEY (21%) + PPEY (7%) | 84.55 ^a | 79.51 ^b | 69.70 ^c | 65.13 ^c |
| Percentage of forward progressive motility | PPEY (28%) | 80.70 ^{Aa} | 62.34 ^{Bb} | 55.16 ^{Ac} | 50.19 ^{Ad} |
| | CPEY (28%) | 81.81 ^{Aa} | 54.18 ^{Ab} | 47.82 ^{ABc} | 44.34 ^{ABd} |
| | CPEY (7%) + PPEY (21%) | 82.52 ^{Aa} | 52.33 ^{Ab} | 44.79 ^{BCc} | 39.15 ^{BCd} |
| | CPEY (14%) + PPEY (14%) | 81.68 ^{Aa} | 51.36 ^{Ab} | 42.18 ^{Cc} | 35.17 ^{Cc} |
| | CPEY (21%) + PPEY (7%) | 80.70 ^{Aa} | 51.58 ^{Ab} | 42.67 ^{BCc} | 38.59 ^{BCd} |

^{A,B,C} different superscripts indicates a significant difference among treatment groups at any time points regarding each parameter.

^{a,b,c,d} different superscripts indicate a significant difference among different time points within the experimental group.

The standard error of the mean for the index of total and forward progressive motility is 4.41 and 3.18, respectively.

Table 2: Viability of ram spermatozoa in the extender containing pigeon plasma egg yolk (PPEY), chicken plasma egg yolk (CPEY), and combinations of the PPEY+CPEY during cold storage up to 72 h at 4°C.

| Parameter | Experimental groups | Time of Storage (h) | | | |
|---------------|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| | | 0 | 24 | 48 | 72 |
| Viability (%) | PPEY (28%) | 90.23 ^a | 82.80 ^b | 80.12 ^b | 76.18 ^{Ab} |
| | CPEY (28%) | 90.17 ^a | 82.09 ^b | 79.51 ^b | 70.78 ^{ABb} |
| | CPEY (7%) + PPEY (21%) | 89.13 ^a | 78.19 ^b | 77.22 ^{bc} | 66.19 ^{Bc} |
| | CPEY (14%) + PPEY (14%) | 92.10 ^a | 77.91 ^{ab} | 78.32 ^{bc} | 66.21 ^{Bc} |
| | CPEY (21%) + PPEY (7%) | 91.72 ^a | 81.73 ^{ab} | 76.90 ^b | 67.78 ^{Bc} |

^{A,B} different superscripts indicates a significant difference among treatment groups at any time points regarding each parameter.

^{a,b,c} different superscripts indicate a significant difference among different time points within the experimental group.

The standard error of the mean for the index of viability is 3.55 .

Table 3: Percentage of intact plasma membrane of ram spermatozoa in the extender containing pigeon plasma egg yolk (PPEY), chicken plasma egg yolk (CPEY), and combinations of the PPEY+CPEY during cold storage up to 72 h at 4°C.

| Parameter | Experimental groups | Time of Storage (h) | | | |
|--|-------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| | | 0 | 24 | 48 | 72 |
| Percentage of plasma membrane integrity of spermatozoa | PPEY (28%) | 81.26 ^{Aa} | 79.26 ^{Aab} | 70.00 ^{Abc} | 67.22 ^{Ac} |
| | CPEY (28%) | 80.22 ^{Aa} | 70.22 ^{ABab} | 67.05 ^{ABb} | 65.04 ^{ABb} |
| | CPEY (7%) + PPEY (21%) | 77.25 ^{Aa} | 72.75 ^{ABab} | 66.17 ^{ABbc} | 60.62 ^{ABc} |
| | CPEY (14%) + PPEY (14%) | 79.48 ^{Aa} | 67.82 ^{Bb} | 61.72 ^{Bbc} | 57.60 ^{Bc} |
| | CPEY (21%) + PPEY (7%) | 77.75 ^{Aa} | 65.25 ^{Bb} | 60.05 ^{Bb} | 56.82 ^{Bb} |

^{A,B} different superscripts indicates a significant difference among treatment groups at any time points regarding each parameter.

^{a,b,c} different superscripts indicate a significant difference among different time points within the experimental group.

The standard error of the mean for the above-mentioned index is 3.79.

Table 4: Amounts of Malondialdehyde ($\mu\text{mol/lit}$) in the diluent-sperm homogenate upon preservation in the extender containing pigeon plasma egg yolk (PPEY), chicken plasma egg yolk (CPEY), and combinations of the PPEY+CPEY during cold storage up to 72 h at 4°C.

| Parameter | Experimental groups | Time of Storage (h) | | | |
|---|-------------------------|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | | 0 | 24 | 48 | 72 |
| Malondialdehyde ($\mu\text{mol/lit}$) | PPEY (28%) | 3.12 ^a | 3.60 ^b | 3.90 ^{bc} | 4.33 ^c |
| | CPEY (28%) | 2.88 ^a | 3.76 ^b | 3.82 ^{bc} | 4.17 ^c |
| | CPEY (7%) + PPEY (21%) | 2.95 ^a | 3.53 ^b | 4.09 ^{bc} | 4.28 ^c |
| | CPEY (14%) + PPEY (14%) | 3.08 ^a | 3.81 ^b | 3.94 ^{bc} | 4.44 ^c |
| | CPEY (21%) + PPEY (7%) | 3.17 ^a | 3.75 ^b | 4.10 ^{bc} | 4.39 ^c |

There was no significant difference between the experimental groups in the studied time points.

^{a,b,c} different superscripts indicate a significant difference among different time points within the experimental group.

The standard error of the mean for the malondialdehyde levels is 0.16.

بحث

پایه زرده کامل تخم مرغ شد (Mehdipour et al, 2018). مطالعه پیشین نیز نشان داد که رقیق کننده قوچ ساخته شده با پلاسمای زرده تخم مرغ با غلظت ۲۸ درصد، حرکت کلی بالاتری پس از انجماد-ذوب (۳۵/۳۰ درصد) در مقایسه با رقیق کننده حاوی زرده کامل تخم مرغ (۱۹/۲۲ درصد) داشت (Mortazavi et al, 2020). به نظر می‌رسد حذف مواد معدنی، گرانول‌ها و لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا از زرده کامل تخم منجر به بهبود بیشتر کیفیت و نقش حفاظتی پلاسمای زرده به دست آمده، برای نگهداری سرد یا منجمد اسپرم گونه‌های مختلف حیوانی و پرندگان می‌شود. بنابراین در مطالعه حاضر، رقیق کننده پلاسمای زرده با غلظت ۲۸ درصد، به عنوان رقیق کننده استاندارد تهیه شده و جهت نگهداری نمونه منی قوچ در طول آزمایش حاضر مورد استفاده قرار گرفت.

مطالعات در زمینه یافتن رقیق کننده با ترکیب مناسب جهت بهبود نگهداری منی در حیوانات مختلف انجام گرفته است. زرده کامل تخم پرندگان از قدیم به عنوان ماده حفاظت کننده از شوک سرمایی جهت حفظ و نگهداری منی در دمای یخچال مورد استفاده قرار گرفته است (Bucak et al, 2008; Bergeron and Manjunath, 2006; Purdy, 2006; Wall and Foote, 1999; Holt, 1997). زرده کامل تخم پرندگان جدا از این‌که می‌تواند به عنوان یک منشا آلودگی با میکروب‌های مختلف مطرح باشد، مشخص شده است که این ترکیب منجر به اختلال در تنفس

هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی اثر پلاسمای زرده تخم کبوتر و مرغ و ترکیب پلاسمای تخم کبوتر و مرغ در رقیق کننده تریس-سیتریک اسید-فروکتوز روی حرکت کلی و پیشرونده رو به جلو اسپرم، درصد زنده‌مانی، انسجام غشای پلاسمایی اسپرم و مقدار مالون‌دی‌آلدهید منی قوچ طی نگهداری در دمای یخچال بود.

مطالعه پیشین نشان داد که متغیرهای مختلف اسپرم گاومیش از جمله متغیرهای حرکتی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، میزان آکروزوم سالم و یکپارچگی DNA، با جایگزینی پلاسمای زرده تخم مرغ به جای زرده کامل تخم مرغ بهبود یافت (Hussain Shah et al, 2017). علاوه بر این، نتایج Pillet و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که میزان باروری مادبان‌های تلقیح شده با منی منجمد شده با رقیق کننده پلاسمای زرده تخم مرغ استریل، در مقایسه با زرده کامل تخم مرغ (۶۹ درصد در مقابل ۶۰ درصد) بیش‌تر بود. همچنین مطالعه روی سگ نشان داد که متغیرهای مختلف اسپرم منجمد-ذوب شده مانند تحرک، یکپارچگی غشاء و واکنش آکروزوم در رقیق کننده پلاسمای زرده تخم مرغ در مقایسه با رقیق کننده تهیه شده بر پایه زرده کامل تخم مرغ برتری دارد (Corcine et al, 2016). علاوه بر این، رقیق-سازی منی خروس در رقیق کننده حاوی پلاسمای زرده تخم مرغ (۲۰ درصد)، منجر به افزایش حرکت کلی، حرکت پیشرونده رو به جلو، یکپارچگی غشاء، زنده‌مانی و فعالیت میتوکندری بعد از ذوب در مقایسه با رقیق کننده بر

پرندگان مختلف، توان نگهداری و حفاظت آن‌ها در برابر شوک سرمایی از اسپرم متفاوت می‌باشد (Trimeche et al, 2006; Bathgate et al, 1997). در مطالعات اخیر پلاسمای زرده تخم مرغ در نگهداری و باروری منی گاو میش و نریان بهتر از زرده کامل تخم مرغ بوده است (Pillet et al, 2011; Hussain Shah et al, 2017). همچنین مطالعه در شتر نشان داده است که پلاسمای زرده تخم کبوتر اثرات محافظتی بیش‌تری در مقایسه با پلاسمای زرده تخم مرغ دارد (Panahi et al, 2017). در مطالعه حاضر، پلاسمای زرده تخم کبوتر با غلظت ۲۸ درصد منجر به بهبود حرکت پیشرونده رو به جلو اسپرم در مقایسه با گروه‌های ترکیبی پلاسمای زرده تخم کبوتر + مرغ شد. نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا با مطالعات قبلی در این زمینه می‌باشد (Panahi et al, 2017; Gholami et al, 2012; Su et al, 2008). علاوه بر این درصد زنده‌مانی در گروه دریافت کننده ۲۸ درصد پلاسمای زرده تخم کبوتر، به طور معنی‌دار بالاتر از گروه‌های ترکیبی (پلاسمای زرده تخم کبوتر + مرغ) بود. در همین راستا ترکیب پلاسمای زرده تخم مرغ با کبوتر نتوانست به اندازه پلاسمای زرده تخم کبوتر در حفظ انسجام غشای پلاسمایی مؤثر باشد. در این زمینه، مطالعات نشان دادند که علیرغم این‌که زرده تخم پرندگان مختلف من جمله اردک، بلدرچین و مرغ تشابهاتی زیادی در میزان رطوبت و پروتئین و چربی تام دارند (Bathgate et al, 2006)، منتها از نظر میزان فسفولیپید، کلسترول و اسیدهای چرب با هم- دیگر متفاوت می‌باشند (Bathgate et al, 2006; Trimeche et al, 1997; Graham and Foote, 1987; Bair and Marion, 1978). مشخص شده است که میزان کلسترول به ازای هر گرم زرده تخم در کبوتر بیش‌تر از اردک، بلدرچین و مرغ می‌باشد (Bair and Marion, 1978). میزان بالای کلسترول در تخم کبوتر می‌تواند در نگهداری اسپرم در محیط خارج از بدن مؤثر باشد (Panahi et al, 2017). در تأیید یافته فوق مطالعات مختلف نشان دادند که اضافه نمودن کلسترول به رقیق کننده منی در حیوانات مختلف باعث افزایش کیفیت منی متعاقب نگهداری در دمای

اسپرم، اختلال در حرکت اسپرم، اختلال در ارزیابی مارکرهای بیوشیمیایی اسپرم و به دلیل وجود ذرات متعدد منجر به اختلال در ارزیابی حرکت اسپرم با کاسا می‌شود (Wall and Foote, 1999; Moussa et al, 2002; Pillet et al, 2011). بنابراین در سال‌های اخیر تلاش جهت جایگزین نمودن زرده کامل با دیگر ترکیبات مشابه یا قسمتی از زرده که منجر به حفاظت از شوک سرمایی می‌شود انجام شده است (Bahmani et al, 2022; Panahi et al, 2014; Gharibi et al, 2017). مشخص شده است که مهم‌ترین جزء زرده تخم که منجر به حفاظت از شوک سرمایی می‌شود، لیوپروتئین‌ها با دانسیته پایین می‌باشند (Hu et al, 2010; Jiang et al, 2007; Amirat et al, 2004; Watson and Martin, 1975). در زرده تخم مرغ لیوپروتئین‌ها حدود دو سوم ماده خشک را به خود اختصاص داده و لیوپروتئین‌ها با دانسیته پایین یک سری ذرات کروی بوده که حدود سی و پنج نانو متر قطر داشته که در مرکز آن‌ها تری گلسیرید، کلسترول و کلستریل استرها قرار دارند. لیوپروتئین‌ها با دانسیته پایین از راه‌های مختلف مانند تثبیت غشای پلاسمایی اسپرم، تشکیل لایه روی سطح اسپرم، جایگزین شدن در فسفولیپیدهای غشای اسپرم و کاهش دمای تغییر فاز غشای پلاسمایی اسپرم اثر خود را اعمال می‌کنند (Graham and Foote, 1987; Foulkes et al, 1980; Quinn et al, 1980; Watson, 1975). در چند سال گذشته پلاسمای زرده تخم پرندگان به عنوان جایگزین لیوپروتئین‌ها با دانسیته پایین مطرح شده است که دلیل آن هم تهیه ساده و راحت پلاسمای زرده در مقایسه با لیوپروتئین‌ها با دانسیته پایین و اثربخشی مشابه لیوپروتئین‌ها با دانسیته پایین می‌باشد (Hussain Shah et al, 2011; Panahi et al, 2017; Pillet et al, 2011). زرده تخم پرندگان مختلف در مطالعات سال‌های گذشته جهت حفظ و نگهداری منی گاو نر، شتر و نریان مورد استفاده قرار گرفته است (Su et al, 2008; Clulow et al, 2007). نتایج مطالعات قبلی نشان دادند که به دلیل تفاوت در غلظت فسفولیپیدها، اسیدهای چرب و کلسترول زرده تخم

آسیب ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدها را در طول ذخیره‌سازی منی به صورت مایع خنثی کند. بنابراین ترکیب رقیق کننده مناسب و مؤثر جهت جلوگیری از پراکسیداسیون لیپید و کاهش عملکرد اسپرم لازم می‌باشد (Alvarez and Storey, 1989; Jones et al, 1979). مالون‌دی‌آلدئید محصول پایدار و نهایی پراکسیداسیون در زمان وجود استرس اکسیداتیو می‌باشد (Sterbauer et al, 1991). تحقیقات قبلی ارتباط منفی بین غلظت مالون‌دی‌آلدئید و کیفیت منی در طول ذخیره‌سازی را نشان دادند (Eslami et al, 2017; Bucak et al, 2010; Lewis et al, 1995). در مطالعه حاضر مقدار مالون‌دی‌آلدئید در طی ذخیره‌سازی در تمام گروه‌های آزمایش افزایش یافت و همزمان شاخص‌های حرکتی، زنده‌مانی و انسجام غشای پلاسمایی در طول نگهداری کاهش یافت که این یافته هم‌راستا با دیگر مطالعات بود (Moradi et al, 2013; Gundogan et al, 2010; Bucak et al, 2010).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب پلاسمای زرده تخم مرغ+کبوتر، نسبت به پلاسمای زرده تخم کبوتر و مرغ مؤثر نمی‌باشد. همچنین پلاسمای زرده تخم کبوتر به عنوان منبع لیپوپروتئین‌ها با دانسیته پایین جهت نگهداری منی قوچ در دمای یخچال پیشنهاد می‌شود.

یخچال یا پس از فرایند انجماد-ذوب می‌شود (Crichton et al, 2014; Hartwing et al, 2014; Mocé et al, 2010; Moore et al, 2005; Purdy and Graham, 2004). همچنین مشخص شده است که متعاقب فرایند سرد کردن تغییر در ترکیب غشای پلاسمایی اسپرم اتفاق می‌افتد که آن تغییرات منجر به کاهش سیالیت غشای اسپرم می‌شود، و دلیل احتمالی این اتفاق را مرتبط با میزان کلسترول در غشای اسپرم می‌دانند (Buhr et al, 1994). به نظر می‌رسد که بهبود کیفیت متعاقب نگهداری منی در رقیق کننده حاوی پلاسمای زرده تخم کبوتر در مقایسه با گروه‌های ترکیبی (پلاسمای زرده تخم مرغ + کبوتر) مرتبط با میزان بالاتر کلسترول در زرده این گونه باشد.

میزان اسیدهای چرب غیراشباع چند گانه در غشای اسپرم در نشخوارکنندگان کوچک نسبت به سایر گونه‌ها بالاتر است. غشای اسپرم از فسفولیپیدها تشکیل شده که آن‌ها را مستعد واکنش ردوکس با سوپر اکسیدها می‌کند، به این فرایند پراکسیداسیون لیپید می‌گویند. بنابراین اسپرم نشخوارکنندگان کوچک حساسیت بالاتری به استرس اکسیداتیو در طول ذخیره‌سازی دارد، که به دنبال آسیب اکسیداتیو طی ذخیره‌سازی، کیفیت منی کاهش خواهد یافت (Gandini et al, 2000; Aitken and Fischer, 1994). به واسطه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پایین، اسپرم نمی‌تواند

تشکر و قدردانی

نویسندگان از شرکت دانش بنیان دام زیست کارای سبز جهت فراهم نمودن امکانات جهت انجام مطالعه حاضر قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافی ندارند.

منابع مالی

منابع مالی این پژوهش توسط شرکت دانش بنیان دام زیست کارای سبز تأمین گردیده است.

- Aitken, R.J., & Fischer, H. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa the balance of benefit and risk. *International Journal of Bioassays*, 16, 259–267.
- Alvarez, J.G., & Storey, B.T. (1995). Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 42, 334-346.
- Alvarez, J.G., & Storey, B.T. (1989). Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Research*, 23, 77-90.
- Alvarez, J.G., & Storey, B.T. (1983). Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biology of Reproduction*, 29, 548-555.
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gérard, O., Courtens, J. L., & Anton, M. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61(5), 895-907.
- Aurich, J. E., Schönherr, U., Hoppe, H., & Aurich, C. (1997). Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, 48(2), 185-192.
- Bahmani, S., Eslami, M., Farrokhi-Ardabili, F., Imani, M., & Batavani, R. A. (2023). Evaluation of chicken egg yolk plasma and low-density lipoprotein alone or enriched with ewe or cow skim milk in tris-citric acid-based diluent for cryostorage of ram semen. *Biopreservation and Biobanking*, 21(4), 346-35.
- Bair, C. W., & Marion, W. W. (1978). Yolk cholesterol in eggs from various avian species. *Poultry Science*, 57(5), 1260–1265.
- Bathgate, R., Maxwell, W. M., & Evans, G. (2006). Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(1), 68–73.
- Bergeron, A., & Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 1338-1344.
- Bergeron, A., Villemure, M., Lazure, C., & Manjunath, P. (2005). Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development*, 71(4), 461–470.
- Bucak, M.N., Sariozkan, S., Barbaros Tuncer, P., Sakin, F., Atessahin, A., Kulaksiz, R., & Cevik, M. (2010). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircusancryrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*, 89, 24-30.
- Bucak, M.N., Atessahin, A., & Yuce, A. (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research*, 75, 128-134.
- Buhr, M. M., Curtis, E. F., & Kakuda, N. S. (1994). Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, 31(3), 224–238.
- Clulow, J. R., Maxwell, W. M., Evans, G., & Morris, L. H. (2007). A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Australian Veterinary Journal*, 85(6), 232–235.
- Corcini, C. D., Goularte, K. L., Bongalhardo, D. C., Lucia, T., Jr, Jardim, R. D., & Varela Junior, A. S. (2016). Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. *Andrologia*, 48(1), 114–115.
- Correa, J. R., & Zavos, P. M. (1994). The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, 42(2), 351–360.
- Crichton, E.G., Pukazhenth, B., Billah, M., & Skidmore, J.A. (2014). Cholesterol addition aids the cryopreservation of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) spermatozoa. *Theriogenology*, 83(2), 168-174.
- De Lamirande, E., & Gagnon, C. (1993). A positive role for superoxide anions in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 16, 21–25.
- De Lamirande, E., & Gagnon, C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *International Journal of Andrology*, 13, 368–378.
- Eslami, M., Ghasemiyan, H., & Zadeh Hashem, E. (2017). Semen supplementation with palmitoleic acid promotes kinematics, microscopic and antioxidative parameters of ram spermatozoa during liquid storage. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(1), 49–59.
- Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1987). *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworth Scientific, Sydney: Sydney.
- Frederick, S. (2010). HepG2 Hepatocyte Lipid Peroxidation Assay. Version 1.1. NCL Method GTA- 4.

- Foulkes, J. A., Sweasey, D., & Goodey, R. G. (1980). Fertility of bull spermatozoa in egg-yolk diluents of varied lipid fatty acid composition. *Journal of Reproduction and Fertility*, 60(1), 165–169.
- Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caponecchia, L., Familiari, G., Verlengia, C., Dondero, F., & Lenzi, A. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction* (Oxford, England), 15(4), 830–839.
- Gharibi, S., Niasari-Naslaji, A., Poursasan, N., & Moosavi-Movahedi, A.A. (2014). Replacement of salamon with shotor diluent and egg yolk with low density lipoprotein for chilled storage of ram semen. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 15, 279–284.
- Gholami, M., Faraji, Z., & Zamiri, M.J. (2012). Effect of egg yolk of four avian species on the cryopreserved ram spermatozoa. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 13, 23–27.
- Graham, J. K., & Foote, R. H. (1987). Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 24(1), 42–52.
- Gundogan, M., Yeni, D., Avdatek, F., & Fidan, A. F. (2010). Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, 122(3-4), 200–207.
- Hartwig, F. P., Lisboa, F. P., Hartwig, F. P., Monteiro, G. A., Maziero, R. R., Freitas-Dell'Aqua, C. P., Alvarenga, M. A., Papa, F. O., & Dell'Aqua, J. A., Jr (2014). Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology*, 81(2), 340–346.
- Holt W. V. (1997). Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reproduction, Fertility, and Development*, 9(3), 309–319.
- Hu, J. H., Li, Q. W., Zan, L. S., Jiang, Z. L., An, J. H., Wang, L. Q., & Jia, Y. H. (2010). The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science*, 117(1-2), 11–17.
- Hussain Shah, S. A., Hassan Andrabi, S. M., Ahmed, H., & Qureshi, I. Z. (2017). Chicken egg yolk plasma in tris-citric acid extender improves the quality and fertility of cryopreserved water buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Theriogenology*, 89, 32–40.
- Jiang, Z. L., Li, Q. W., Hu, J. H., Li, W. Y., Zhao, H. W., & Zhang, S. S. (2007). Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobiology*, 54(3), 301–304.
- Jones, R., Mann, T., & Sherins, R. (1979). Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*, 31(5), 531–537.
- Lewis, S. E., Boyle, P. M., McKinney, K. A., Young, I. S., & Thompson, W. (1995). Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*, 64(4), 868–870.
- Maxwell, W.M.C., & Watson, P.F. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 42, 55–65.
- Mehdipour, M., Daghigh Kia, H., Moghaddam, G., & Hamishehkar, H. (2018). Effect of egg yolk plasma and soybean lecithin on rooster frozen-thawed sperm quality and fertility. *Theriogenology*, 116, 89–94.
- Mocé, E., Purdy, P. H., & Graham, J. K. (2010). Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, 118(2-4), 236–247.
- Moore, A. I., Squires, E. L., & Graham, J. K. (2005). Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, 51(3), 241–249.
- Moradi, A.R., Malekinejad, H., Farrokhi Ardabili, F., & Bernousi, I. (2013). Royal Jelly improves the sperm parameters of ram semen during liquid storage and serves as an antioxidant source. *Small Ruminant Research*, 113, 346–352.
- Mortazavi, S. H., Eslami, M., & Farrokhi-Ardabili, F. (2020). Comparison of different carrier-compounds and varying concentrations of oleic acid on freezing tolerance of ram spermatozoa in tris-citric acid-egg yolk plasma semen diluent. *Animal Reproduction Science*, 219, 106533.
- Moussa, M., Marinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695–1706.
- Ongun, U., Kinet, H., Cevik, M., & Cetinkoya, S. (1997). Fertility obtained from frozen ram semen with different extenders containing varied antioxidants. *Theriogenology*, 58, 744–753.
- Panahi, F., Niasari-Naslaji, A., Seyedasgari, F.S., Ararooti, A., Razavi, K., & Moosavi-Movahedi, A.A. (2017). Supplementation of tris-based extender with plasma egg yolk of six avian species and camel skim milk for chilled preservation of dromedary camel semen. *Animal Reproduction Science*, 184, 11–19.

- Paulenz, H., Söderquist, L., Pérez-Pé, R., & Berg, K. A. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, 57(2), 823–836.
- Pillet, E., Duchamp, G., Batellier, F., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., & Magistrini, M. (2011). Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*, 75(1), 105–114.
- Purdy, P.H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63(3), 215-225.
- Purdy, P. H., & Graham, J. K. (2004). Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biology of Reproduction*, 71(2), 522–527.
- Quinn, P. J., Chow, P. Y., & White, I. G. (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility*, 60(2), 403–407.
- Salamon, S., & Maxwell, W.M.C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1), 77-111.
- sterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine*, 11(1), 81–128.
- Su, L., Li, X., Quan, J., Yang, S., Li, Y., He, X., & Tang, X. (2008). A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Animal Reproduction Science*, 104(2-4), 212–219.
- Trimeche, A., Anton, M., Renard, P., Gandemer, G., & Tainturier, D. (1997). Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology*, 34(4), 385–393.
- Vishwanath, R., Shannon, P., & Curson, B. (1992). Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. *Animal Reproduction Science*, 29, 185-194.
- Wall, R.J., & Foote, R.H. (1999). Fertility of bull semen frozen and store in clarified egg yolk–Tris–glycerol extender. *Journal of Dairy Science*, 82, 817–821.
- Watson P. F. (1975). The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. *Journal of Reproduction and Fertility*, 42(1), 105–111.
- Watson, P. F., & Martin, I. C. (1975). Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences*, 28(2), 153–159.

Received: 29.03.2023

Accepted: 05.10.2023

مطالعه و شناسایی سلول‌های زایای اولیه در گناد جنین قرقاول ماده (*Phasianus colchicus*) با استفاده از تکنیک‌های مختلف بافت‌شناسی

زهرا خداپرست^۱ و ابوالقاسم نبی‌پور^{۲*}

^۱ دانشجوی دکتری تخصصی بافت‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۲ استاد گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۹

چکیده

هدف از این تحقیق شناسایی و بررسی حضور سلول‌های زایای اولیه در سنین مختلف جنینی در بافت تخمدان قرقاول بود. این سلول‌ها تنها سلول‌های در حال رشد رویان هستند که توانایی انتقال اطلاعات ژنتیکی از طریق گامتوزیس به نسل بعدی را دارند. به منظور مطالعه در این خصوص، پرندگان به دلیل ویژگی‌های رشدی خود ارزش فوق‌العاده‌ای دارند. از طرفی قرقاول از جمله پرندگانی است که دارای خواص بسیار مفیدی است اما متأسفانه این گونه نادر در خطر انقراض قرار دارد. در این مطالعه، تعداد ۲۸ عدد تخم نطفه‌دار قرقاول مورد استفاده قرار گرفت و گندهای جنین ماده با توجه به عدم تقارن آن‌ها متمایز و در روزهای ۲۴-۹ جنینی استخراج شدند. مقاطع بافتی به صورت سریال سکشن تهیه شدند و شناسایی سلول‌های زایای اولیه با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین-اوتوزین، پریودیک اسید شیف و همچنین تهیه مقاطع نیمه نازک و رنگ‌آمیزی آن‌ها با تولوئیدین بلو انجام گرفت. سپس با استفاده از تکنیک‌های استریولوژی، تعداد، حجم سلول و حجم هسته سلول‌های زایای اولیه محاسبه گردید. سلول‌های زایای اولیه در برش‌های پارافینی و رزینی در روزهای ۹ تا ۱۴ جنینی به دلیل ویژگی‌های خاص شامل اندازه بزرگ هسته و سیتوپلاسم کم شناسایی شدند. ضمناً پاسخ این سلول‌ها در تمام سنین به رنگ‌آمیزی پاس منفی بود. با توجه به نتایج مربوط به مطالعه استریولوژی، مشخص شد با افزایش سن از تعداد سلول‌های زایای اولیه کاسته می‌شود به طوری که در ۱۸ روزگی این سلول‌ها مشاهده نشدند. در حالی که حجم سلول‌های زایای اولیه و حجم هسته این سلول‌ها با افزایش سن افزایش یافته بود. یافته‌های این مطالعه نشان داد که سلول‌های زایای اولیه در بافت تخمدان جنین‌های قرقاول در تمام سنین آزمایش شده به رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف پاسخ منفی دادند در حالی که مشخص شد رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اوتوزین و استفاده از مقاطع نیمه نازک برای تشخیص میکروسکوپی این سلول‌ها مناسب هستند. از نظر مورفولوژی این سلول در قرقاول تفاوت خاصی با سایر پرندگان نداشت اما از نظر هیستوشیمی پاسخ این سلول به رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف منفی بود که با بعضی از گونه‌های پرندگان متفاوت است.

کلمات کلیدی: سلول‌های زایای اولیه، جنین قرقاول، گناد ماده، برش نیمه نازک، استریولوژی

مقدمه

تخمدان جنینی به طور نامتقارن رشد می‌کنند، در حالی که رشد غدد جنسی نر جنین پرندگان به یک مدل مطلوب در زیست‌شناسی تکوین و زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی

جنین پرندگان به یک مدل مطلوب در زیست‌شناسی تکوین و زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی تبدیل شده است (Intarapat and Stern, 2013). غدد جنسی ماده و مجرای

* نویسنده مسئول: ابوالقاسم نبی‌پور، استاد گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

E-mail: nabipour@um.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

تبدیل شده است (Intarapat and Stern, 2013). غدد جنسی ماده و مجرای تخمدان جنینی به طور نامتقارن رشد می‌کنند، در حالی که رشد غدد جنسی نر متقارن است (Smith and Sinclair, 2004).

قرقاول یک گونه شکاری و نادر می‌باشد که از اهمیت زیادی برخوردار است. گوشت قرقاول دارای ارزش بیولوژیکی فراوانی است، زیرا منبع غنی از پروتئین و ریز عناصر است و حاوی مقادیر کمی چربی با مقدار کمی اسیدهای چرب اشباع شده است. از این رو از نظر اقتصادی پرندهای با ارزش به حساب می‌آید (Adamski and Kuźniacka, 2006). فرآیند تولید غدد جنینی به عنوان "گنادوژنز" شناخته می‌شود. گنادوژنز در مهره‌داران با مهاجرت سلول‌های زایای اولیه (Primordial Germ Cells (PGCs) آغاز می‌شود. سلول‌های زایای اولیه در پستانداران از سلول‌های اندودرم کیسه زرده روده خلفی منشا می‌گیرند. در حالی که، سلول‌های زایای اولیه پرندگان، از ناحیه مرکزی بلاستودیسک شروع می‌شوند و از ناحیه قدامی به ناحیه خارج جنینی معروف به «هلال زایا» حرکت می‌کنند. سپس از ناحیه خارج جنینی جدا شده، به رگ‌های خونی وارد شده و از طریق حرکات آمیبی با استفاده از فرآیندهای شبه کاذب (Filopodia) به سمت ستیغ تناسلی (Genital ridge) رفته و در آن‌جا مستقر می‌شوند سپس در غدد جنسی در حال رشد، سلول‌های زایای اولیه با کمک اپیتلیوم سلومیک و مزونفروس انواع مختلف سلول‌ها را به وجود می‌آورند (Intarapat and Satayalai, 2014).

سلول‌های زایای اولیه و سلول‌های سوماتیک اطراف آن‌ها باعث ایجاد غدد جنسی بی‌تفاوت (Indifferent gonads) یا تمایز نیافته در غدد جنسی در حال رشد می‌شوند (Carlson and Stahl, 1985). در نهایت غدد جنسی تمایز یافته به عنوان غدد جنسی بالغ، گامت‌های عملکردی تولید می‌کنند (Clinton and Haines, 2001). سلول‌های زایای اولیه سلول‌های پایه‌گذار گامت‌های بالغ هستند، این سلول‌های جاودانه حاملی هستند که اطلاعات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی افراد را به نسل‌های بعدی منتقل

می‌کنند. از قرن نوزدهم، گونه‌های مختلف پرندگان از جمله جوجه (Kim and Han 2018, Meng et al, 2022)، شتر مرغ (Hassanzadeh et al, 2019)، بولمون (Hosseini et al, 2020) و چند گونه دیگر به طور گسترده برای تحقیقات سلول‌های زایای اولیه مورد استفاده قرار گرفته‌اند. همچنین با توجه به این که این سلول‌ها نقش حیاتی در اصلاح ژنتیکی و درمان ناباروری دارند، می‌توانند یک سیستم ایده‌آل در زیست‌شناسی تکوینی ارائه دهند (Mathan et al, 2023). بنابراین، مطالعه و شناسایی سلول‌های زایای اولیه برای حفظ ذخایر ژنتیکی که در تحقیقات بیولوژیکی پایه مورد استفاده قرار می‌گیرد به عنوان یک هدف مهم در نظر گرفته می‌شود. از طرف دیگر سلول‌های زایای اولیه یکی از بهترین منابع سلول‌های پیش‌ساز هستند که می‌توانند برای حفظ و تکثیر نژادهای پرندگان در حال انقراض مورد استفاده قرار گیرند.

اگرچه سلول‌های زایای اولیه در پرندگان در برخی زمینه‌ها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند اما مطالعه دقیقی از نظر تعداد و حجم سلول‌های زایای اولیه به روش استریولوژی در گناد ماده صورت نگرفته است. لذا در مطالعه حاضر از روش استریولوژیک بی‌طرفانه استفاده شد. مطالعه حاضر با هدف شناسایی و بررسی سلول‌های زایای اولیه در گناد ماده قرقاول در طی فرآیند رشد جنینی و همچنین تغییرات استریولوژیکی در تعداد و اندازه و حجم این سلول‌ها در سنین مختلف جنینی تا زمان هچ (جوجه ۱ روزه) انجام گرفت. نتایج این تحقیق اطلاعات جدیدی را در مورد تعداد و حجم سلول‌های زایای اولیه در مراحل جنینی تخمدان قرقاول ارائه می‌دهد که می‌تواند برای درک و شناخت بیش‌تر بیولوژی سلول‌های زایای اولیه موجود در گناد مورد استفاده محققان قرار گیرد. علاوه بر این، نتایج این پژوهش می‌تواند مبنایی برای مطالعات آینده به منظور تعیین مرحله مناسب جهت جداسازی سلول‌های زایای اولیه در گناد ماده قرقاول مورد استفاده متخصصین و دانش‌پژوهان ذیربط قرار گیرد.

مواد و روش کار

جداسازی جنین و تخمدان

تعداد ۲۸ عدد تخم نطفه‌دار قرقاول (*Phasianus colchicus*) از یک مزرعه تجاری در مشهد تهیه شد. تخم‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ درصد به مدت ۲۴ روز انکوبه شدند. یک دستگاه جوجه‌کشی هر ۶۰ دقیقه تخم‌ها را می‌چرخاند تا از چسبیدن جنین به پوسته آن جلوگیری کند. در همین راستا، هدف این تحقیق این بود که سلول‌های زایای اولیه در روزهای جنینی ۹، ۱۴، ۱۸ و ۲۴ شناسایی و ویژگی‌های آن‌ها بررسی شود. جنین‌ها در سنین فوق‌الذکر استخراج شدند و پس از جداسازی از زرده، در فیکساتور قرار گرفتند و با استفاده از استریومیکروسکوپ با دقت تشریح شدند و تخمدان خارج شد. سپس تخمدان‌های جدا شده در پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۲۴ ساعت ثابت شدند و پس از آن مراحل آماده‌سازی بافت با استفاده از دستگاه اتوتکنیکون انجام گرفت. آب‌گیری نمونه‌ها با استفاده از غلظت‌های مختلف اتانول و شفاف‌سازی آن‌ها با استفاده از زایلن انجام شد. سپس قالب‌گیری نمونه‌ها با استفاده از پارافین مذاب (Merck، آلمان) انجام شد. برش نمونه‌ها به صورت سریال سکشن (ضخامت ۵ میکرومتر) نیز توسط میکروتوم چرخان (Leica RM 2145، آلمان) انجام گرفت. ضمناً در هر سن تعداد ۵ عدد گناد ماده چپ آماده‌سازی، قالب‌گیری و برش داده شد.

در خصوص تهیه مقاطع نیمه نازک رزینی در هر سن جنینی، نمونه‌گیری از ۲ تخمدان به عمل آمد و ثبوت اولیه این نمونه در گلو تار آلدئید ۲ درصد (انگلستان TAAB Laboratories Equipment Ltd، تهیه شده با بافر ۰/۱ مولار کاکودیلات با $\text{PH}=7/4$ و ثبوت ثانویه آن در محلول تروکسید اسمیموم ۱ درصد (انگلستان، TAAB) انجام شد. پس از آن با استفاده از فرآیند کاهش تدریجی دما و اتانول آبیگری شدند. شفاف‌سازی نمونه‌ها نیز توسط پروپیلن اکسید (Propylene oxide) (انگلستان، TAAB) انجام شد. سپس مراحل آغشته‌سازی و قالب‌گیری نمونه‌ها توسط

رزین اپوکسی (انگلستان، TAAB) انجام گرفت. پس از آن، با استفاده از دستگاه اولترامیکروتوم (Leica، اتریش) برش‌هایی نیمه نازک به ضخامت ۱ میکرومتر به وسیله تیغ شیشه‌ای تهیه شد و این مقاطع با رنگ تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی شدند.

تشخیص بافت‌شناسی

مقاطع پارافینی با رنگ‌های هماتوکسیلین و اتوزین Hematoxylin & Eosin (H&E) و پریودیک اسید شیف Periodic Acid Schiff (PAS) (Merck-آلمان) رنگ‌آمیزی شدند. رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف به منظور شناسایی وجود احتمالی گرانول‌های گلیکوژن در سیتوپلاسم سلول‌های زایای اولیه و شناسایی این سلول‌ها انجام گرفت (Suvarna et al, 2018). در نهایت از مقاطع پارافینه و مقاطع نیمه نازک توسط میکروسکوپ نوری (Olympus BX51، ژاپن) مجهز به دوربین (Olympus DP12، ژاپن) فتوگرافی به عمل آمد.

آماده‌سازی بافت‌ها جهت مطالعات استریولوژیک

جهت انجام مراحل استریولوژی، برای به دست آوردن مقاطع تصادفی یکنواخت سیستماتیک از روش جهت‌گیری (Orientation) بلوک‌ها استفاده شد (Howard and Reed, 2004). سپس از کل بافت تخمدان به صورت سریال و پشت سر هم برش‌گیری انجام شد. از برش‌های مذکور با استفاده از روش نمونه‌گیری سیستماتیک تصادفی یکنواخت از ابتدا تا انتهای بافت به صورت فیلد بای فیلد شمارش انجام شده است (SUR) Systematic Uniform Random (Neisy et al, 2023) در مجموع ۱۲ برش از تخمدان انتخاب و با هماتوکسیلین و اتوزین رنگ‌آمیزی شدند و سپس به وسیله میکروسکوپ نوری (Nikon E200، ژاپن) با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند.

تخمین تعداد سلول‌های زایای اولیه

جهت شمارش تعداد سلول‌ها، از نرم‌افزار استریولوژی Unbiased Counting Frame استفاده شد. سپس با روش

$\pi = 3.14$ ، نشان دهنده حجم متوسط سلول زایای اولیه و هسته آن می باشد (Dastghaib et al, 2022).

نتایج

مطالعه حاضر نشان داد که تخمدان‌ها در بخش فوقانی حفره شکمی و در تماس با سطح شکمی-میانی کلیه مزونفروس قرار دارند و عدم تقارن در تخمدان چپ و راست در جنین‌های سنین ۲۴-۹ روزه به خوبی قابل مشاهده بود. به طوری که موقعیت تخمدان راست کمی مورب‌تر از تخمدان چپ نسبت به محور میانی بدن جنین بود. ویژگی عدم تقارن در همه سنین مورد مطالعه، مشاهده گردید و مشخص شد که در طی روند تکوین جنینی تخمدان سمت راست تحلیل رفته و اندازه آن بسیار کوچک می‌گردد (Figure 1A).

در این مطالعه مشخص شد سلول‌های زایای اولیه در جنین‌های ۹ تا ۱۴ روزه هم در مقاطع پارافینی رنگ‌آمیزی شده با H&E و هم در مقاطع نیمه نازک رزینی رنگ‌آمیزی شده با تولوئیدین بلو به دلیل موفولوژی خاص آن‌ها به راحتی قابل شناسایی هستند (Figures 1B and 1C). سلول‌های زایای اولیه به دلیل داشتن هسته بزرگ‌تر و سیتوپلاسم شفاف‌تر نسبت به سایر سلول‌ها قابل تمایز بودند. به لحاظ هیستوشیمی، واکنش سلول‌های زایای اولیه با رنگ PAS بسیار ضعیف بود (Figure 1D). لازم به ذکر است جهت مقایسه و راستی آزمایشی واکنش‌های رنگی انجام گرفته از نمونه بافتی رکتوم بلدرچین به عنوان کنترل مثبت برای رنگ‌آمیزی PAS استفاده شد (Figure 1E). تعداد سلول‌های زایای اولیه در تخمدان جنین ۱۴ روزه نسبت به جنین ۹ روزه کاهش چشمگیری داشت (Figures 2A-2C). همچنین در مقاطع نیمه نازک رنگ‌آمیزی شده با تولوئیدین بلو در تخمدان جنین ۱۴ روزه مشخص شد هسته سلول‌های زایای اولیه به صورت محدود در وضعیت تقسیم میتوزی فعال قرار دارند (Figure 2D).

اپتیکال دایسکتور (Optical dissector) تعداد سلول‌ها محاسبه گردید. شاخص اندازه‌گیری تعداد سلول، هسته بود. برای جلوگیری از سوگیری، همه هسته‌ها فارغ از شکل و اندازه شمارش شدند. برای اندازه‌گیری تعداد هسته‌ها، برش Optical در محور Z به سمت پایین حرکت داده شد و برای پیش‌گیری از سوگیری شمارش، یک Guard zone در نظر گرفته می‌شد. هر هسته‌ایی که در ارتفاع Dissector دیده شود و در قاب شمارش (Counting frame) یا در تماس با خطوط مجاز برای شمارش (Inclusion borders) باشد انتخاب گردید. سپس تراکم عددی در واحد حجم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$Nv = \frac{\sum_{i=1}^n Q}{\sum_{i=1}^n P \times h \times \left(\frac{a}{f}\right)}$$

در فرمول ذکر شده، $\sum_{i=1}^n Q$ مجموع تعداد هسته‌های شمارش شده در ارتفاع dissector، $\sum_{i=1}^n P$ مجموع تعداد فریم‌های شمارش شده، a/f مساحت کل فرم در تمام فیلدهای میکروسکوپی و h ارتفاع dissector می‌باشد. برای محاسبه تعداد کل سلول‌ها، تراکم عددی در واحد حجم در فرمول $N = NV \times V_{final}$ محاسبه شد (Neisy et al, 2023).

برآورد حجم سلول‌های زایای اولیه

برای تخمین حجم سلول‌های زایای اولیه و حجم هسته این سلول‌ها از فرمول زیر و روش نوکلئیتور (Nucleator) استفاده شد.

$$V = \frac{4}{3} \pi L_n^{-3}$$

در این فرمول L بیان‌گر متوسط شعاع‌های سلول زایای اولیه از مرکز هسته می‌باشد که با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$L_n^{-3} = \frac{L_1^3 + L_2^3 + L_3^3 + L_4^3 + \dots}{4}$$

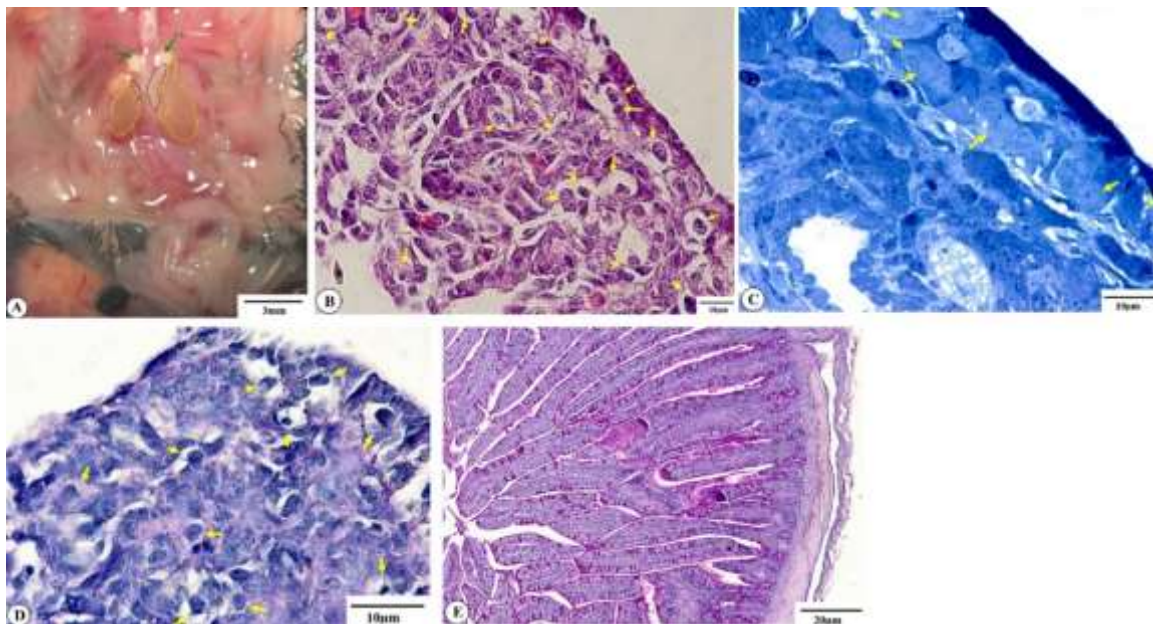


Figure 1: (A): Picture of a female pheasant embryo's abdominal cavity. The ovaries (dashed black line) are positioned on the ventral surface of the mesonephros kidney (dashed yellow line). Asymmetry can be detected in both the left and right ovaries. A green arrow denotes the right (RA) and left (LR) adrenal glands. (B) H&E staining identify pheasant PGCs in the ovarian tissue of a 9-day-old embryo (yellow arrow). (C) Identification of ovarian PGCs in semithin sections stained with toluidine blue (yellow arrow). (D) PAS staining identifies PGCs (yellow arrow). (E) Positive control sample for PAS staining was intestinal tissue. Images A-D have 100X magnification, whereas image E has 40X magnification.

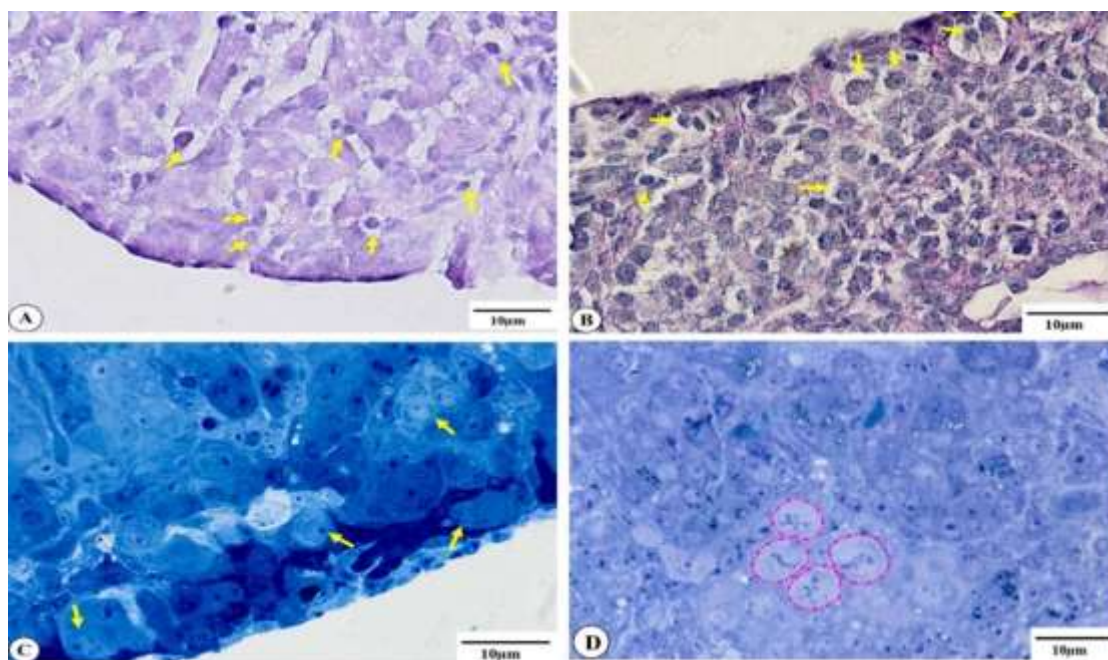


Figure 2: Ovarian tissue structure in a 14-day embryo, PGCs in pheasants (yellow arrow). (A): H&E staining, (B): PAS staining. (C): Toluidine blue staining. (D): Semithin section with toluidine blue staining, pay attention to the start of mitosis at this age. Images A-D have 100X magnification.

میتوز به سلول‌های زایا (GC) یا سلول‌های
پیش‌ساز اووگونی و سلول‌های سوماتیک (که نسبت به

در مطالعه مقاطع پارافینی و رزینی در سن ۱۸ روزگی
جنینی، مشخص شد سلول‌های زایای اولیه بر اثر تقسیم

در هر سه مرحله یا سن جنینی مورد مطالعه، سلول‌های زایای اولیه واکنش منفی نسبت به رنگ‌آمیزی PAS نشان دادند (Figure 3C).

سلول‌های زایا کوچک‌تر و هرمی شکل بوده و در اطراف سلول زایا قرار داشتند (متمايز شده بودند (Figures 3A) (and 3B).

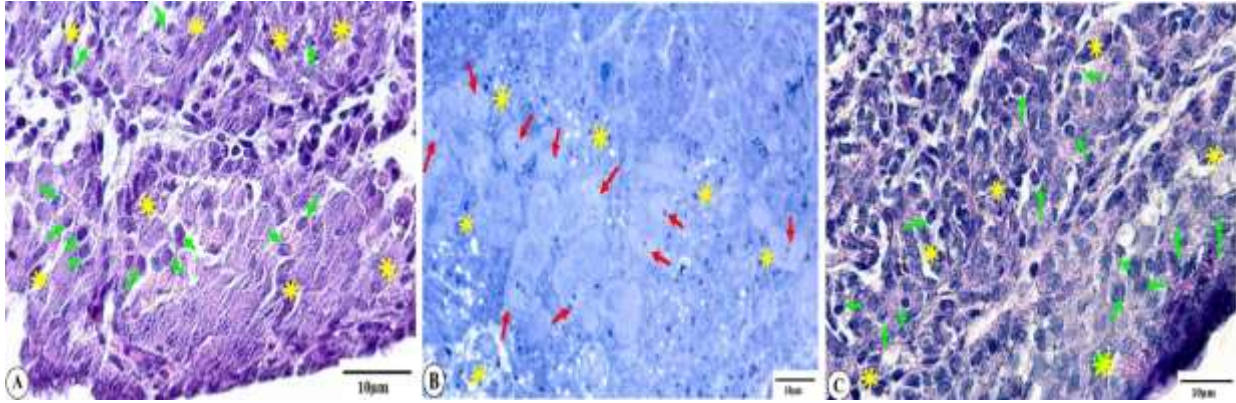


Figure 3: Pheasant embryo ovary tissue structure at 18 days, (A): Germ cells (green arrow) and somatic cells (yellow star), H&E staining. (B): Semithin section stained with toluidine blue; germ cells (red arrow) and somatic cells (yellow star) surround the germ cells. (C): Germ cells (green arrow) and somatic cells (yellow star) surround them, with PAS staining. Images A-C have 100X magnification.

با توجه به برآورد نتایج استریولوژیک، تعداد کل سلول‌های زایای اولیه در جنین ۹ روزه از ۹۴۴۳ به ۱۰۴۶ عدد در جنین ۱۴ روزه کاهش یافته بود که این نتیجه حکایت از کاهش ۹۰ درصدی تعداد این سلول‌ها داشت. همچنین بررسی نتایج حجم سلول‌های زایای اولیه و حجم هسته این سلول‌ها نشان از افزایش ۱/۵ برابری حجم سلول و افزایش ۱/۳ برابری حجم هسته سلول در جنین ۱۴ روزه نسبت به جنین ۹ روزه داشت (Table 1).

در ادامه روند مطالعه، مشخص شد تعداد سلول‌های زایای موجود در تخمدان در روز ۲۴ جنینی به طور چشم‌گیری افزایش یافته بود و گرانول‌های بیشتری در سیتوپلاسم آن‌ها وجود داشت (Figures 4A-4C). بنابر نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، سلول‌های زایای اولیه در بافت تخمدان در سنین ۹ و ۱۴ روز جنینی حضور داشتند اما با افزایش سن جنین و شروع تمايز سلولی این سلول‌ها در سن ۱۸ روزگی مشاهده نشدند.

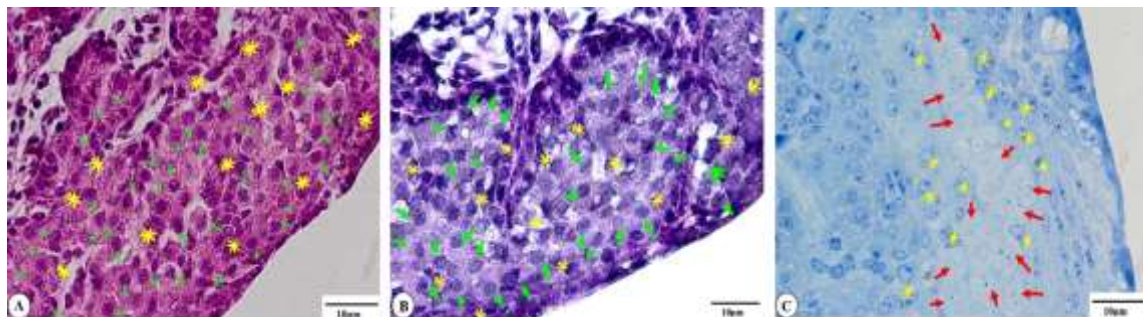


Figure 4: The histological structure of a 24-day-old pheasant embryo's ovary, (A): Germ cells (green arrow) and somatic cells (yellow star), H&E staining. (B): Germ cells (green arrow) and somatic cells (yellow star) surround them, PAS staining. (C): Semithin section with toluidine blue staining of germ cells (red arrow) and somatic cells (yellow star). Images have 100X magnification.

Table 1: In pheasant embryos, the results related to the number of primordial germ cells, the volume of these cells, and the volume of their nuclei

| Time | Number of PGCs | Volume of the Nucleus of PGCs (μm^3) | Volume of the PGC (μm^3) |
|----------------------|----------------|---|---------------------------------------|
| 9 th day | 9443 | 20.02 | 368.93 |
| 14 th day | 1046 | 27.6 | 558.400 |
| 18 th day | 0 | 0 | 0 |
| 24 th day | 0 | 0 | 0 |

تکثیر سلولی و همچنین از دست دادن پاسخ به استروژن در تخمدان راست می‌شود (Intarapat and Stern, 2014; Mohamed et al, 2017; Guioli and Lovell-Badge, 2007; Johnson, 2015).

نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های زایای اولیه در تخمدان جنین ۹ روزه قرقاول با رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین و ائوزین و تولوئیدین‌بلو به دلیل مورفولوژی خاص آن‌ها به راحتی قابل تشخیص می‌باشند. این سلول‌ها بزرگ، کروی یا بیضی شکل بودند که دارای هسته بزرگ خارج مرکز و حاوی یک یا دو هستک مجزا بودند و سیتوپلاسم آن‌ها رنگ‌پذیری ضعیفی داشت. یافته‌های مشابهی توسط سایر محققان که بر روی جنین پرندگانی همچون جوجه (González-Morán, 2017; Sopiya et al, 2011)، جنین جوجه نژاد مصری (Mohamed Alsafy et al, 2017)، شترمرغ (Mohammadi et al, 2019) و قرقاول نر (Hassanzadeh et al, 2019) به ثبت رسیده است که با نتایج حاضر هم‌خوانی دارد.

برای مطالعه دقیق‌تر سلول‌های زایای اولیه، به رنگ‌ها یا آنتی‌بادی‌های خاصی برای شناسایی مطمئن‌تر این سلول‌ها نیاز می‌باشد. رنگ‌آمیزی PAS یک نشان‌گر هیستوشیمیایی برای تمایز سلول‌های زایای اولیه از سلول‌های سوماتیک مجاور است (Chojnacka-Puchta et al, 2012; Macdonald et al, 2010). Fujimoto و همکاران در سال (۱۹۷۶) گزارش کردند سلول‌های زایای اولیه جنین جوجه به دلیل گلیکوژن فراوان PAS مثبت هستند. Mohamed و همکاران (۲۰۱۷) اعلام کردند سلول‌های زایای اولیه با تکنیک رنگ‌آمیزی PAS به دلیل وجود گرانول‌های

بنابراین با توجه به نتایج مربوط به مطالعه استریولوژی می‌توان نتیجه گرفت که تعداد کل سلول‌های زایای اولیه شمارش شده در تخمدان، در ۹ روزگی بیش‌ترین افزایش را داشت اما در مراحل پیشرفته‌تر رشد، از تعداد این سلول‌ها کاسته شد به طوری که در ۱۸ روزگی این سلول‌ها وجود نداشتند. همچنین حجم سلول‌های زایای اولیه و حجم هسته این سلول‌ها از ۹ روزگی و با ازدیاد سن افزایش یافت به طوری که در ۱۴ روزگی به حداکثر افزایش خود رسید.

بحث

در مطالعه حاضر تفاوت در اندازه بین تخمدان چپ و راست در تمام سنین مورد بررسی به خوبی مشاهده شد که تخمدان راست بسیار کوچک‌تر از تخمدان چپ بود. نتایج مشابهی از عدم تقارن گناد در جنین‌های ماده توسط سایر پژوهشگران به ثبت رسیده است که گزارش شده که تنها گناد چپ تکوین می‌یابد و این گناد بسیار بزرگ‌تر از گناد سمت راست می‌باشد، زیرا گناد راست در طی روند تکوین پسرفت کرده یا تحلیل می‌رود. همچنین آن‌ها سلول‌های زایای جنین ماده را در تخمدان‌های در حال تکوین شناسایی کردند (Intarapat and Stern, 2014; Mohamed et al, 2017; Kheirabadi et al, 2015; Rosenthal et al, 2010). برخی از محققین گزارش کرده‌اند علت این رشد نامتقارن به بیان متفاوت ژن‌ها در تخمدان‌های چپ و راست مرتبط می‌باشد. در جنین مرغ، چندین گزارش الگوی نامتقارن بیان گیرنده استروژن آلفا (ESR1) و بیان ژن PITX2 در تخمدان سمت چپ گزارش شده است. در نتیجه این فرایند تفاوت ژنی، غدد جنسی منجر به مهار

در سیتوپلاسم سلول‌های زایای اولیه مشخص بودند. در مقاطع نیمه نازک تخمدان جنین‌های ۹ تا ۱۴ روزه قرقاول، سلول‌های زایای اولیه با توجه به اندازه بسیار بزرگ، هسته کروی بزرگ و سیتوپلاسم کم‌رنگ شناسایی شدند. چند مطالعه دیگر نتایج مشابهی در این خصوص گزارش کرده‌اند (Kheirabadi et al, 2015; Hassanzadeh et al, 2019;) (Mohammadi Gheshlagh et al, 2023). در مقاطع نیمه نازک در سن ۱۸ روزگی جنینی هیچ سلول زایای اولیه‌ای مشاهده نشد. دلیل آن این است که سلول‌های زایای اولیه بر اثر تقسیم میتوز به سلول‌های زایا یا سلول‌های پیش‌ساز اوگونیا متمایز می‌شوند. لازم به ذکر است اولین نشانه‌های تقسیم میتوز در ۱۴ روزگی به صورت محدود مشاهده شد. نتایج مشابهی با یافته‌های این مطالعه به ثبت رسیده است که این سلول‌ها در طول رشد دچار تقسیم میتوز می‌شوند (Mohamed et al, 2017).

تعداد سلول‌های زایای اولیه در تخمدان جنین‌های ۹ و ۱۴ روزه قرقاول با استفاده از تکنیک استریولوژی و به روش اپتیکال دایسکتور تخمین زده شد. تعداد این سلول‌ها در جنین ۹ روزه به طور آشکاری بیش‌تر از جنین ۱۴ روزه بود در صورتی که حجم سلول زایای اولیه و حجم هسته آن در جنین ۱۴ روزه بیش‌تر از جنین ۹ روزه بود. دلیل این افزایش حجم سلول و هسته می‌تواند در نتیجه شروع تقسیم میتوز و تبدیل سلول زایای اولیه به سلول زایا باشد. مطالعه استریولوژی چندانی در خصوص تعیین و برآورد تعداد سلول‌های زایای اولیه و تخمین حجم این سلول‌ها و حجم هسته آن‌ها در سنین جنینی در پرندگان انجام نشده است. اما بر اساس گزارش Mohamed Alsafy و همکاران تعداد سلول‌های زایای اولیه جوجه مصری با پیشرفت سن افزایش می‌یابد (Mohamed et al, 2017). همچنین طبق تحقیقی که Sopiya و همکاران (۲۰۱۷) بر روی جوجه اندونزیایی طی روزهای ۶ تا ۹ جنینی انجام دادند مشخص شد تعداد سلول زایای اولیه گناد در روز هفتم انکوباسیون به اوج خود رسیده و با افزایش سن جنین از تعداد سلول‌های مذکور کاسته می‌شود. تعدادی از

گلیکوژن در سیتوپلاسم واکنش مثبت نشان دادند. همچنین در پژوهشی در سال ۱۹۹۳ تأیید شد که سلول‌های زایای اولیه در جوجه در هلال زایا با استفاده از رنگ‌آمیزی PAS قابل شناسایی هستند. در این مطالعه مشخص شد رنگ‌آمیزی PAS تکنیکی مناسب برای تشخیص سلول‌های زایای اولیه در تخمدان جنین‌های ۹ روزه قرقاول می‌باشد. ولی به نظر می‌رسد محتوای گلیکوژنی سلول‌های زایای اولیه از روز ۹ تا ۱۴ جنینی روند نزولی چشم‌گیری پیدا می‌کند به طوری که در روزهای ۱۴، ۱۸ و ۲۴ جنینی هیچ واکنش مثبتی در سلول‌های زایای اولیه با این رنگ‌آمیزی مشاهده نشد. Hassanzadeh و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند رنگ‌آمیزی PAS تکنیک مناسبی برای تشخیص سلول‌های زایای اولیه در گناد جنین شترمرغ می‌باشد که با نتیجه این مطالعه مطابقت ندارد. Jung و همکاران (۲۰۰۵) سلول‌های زایای جوجه را با استفاده از رنگ‌آمیزی PAS شناسایی کردند که به رنگ‌آمیزی واکنش مثبت نشان دادند. طبق مشاهدات Fujimoto و همکاران (۱۹۷۶) و Pardanaud و همکاران (۱۹۸۷) سلول‌های زایای اولیه در جنین جوجه PAS مثبت بودند زیرا سلول‌های زایا دارای میزان بالای گلیکوژن هستند که با نتیجه مطالعه حاضر به دلیل محتوای پایین گلیکوژن در سیتوپلاسم سلول‌های زایای تخمدان قرقاول متفاوت است. یافته‌های این تحقیق با مطالعه Naeemipour و همکاران (۲۰۱۳) روی سلول‌های زایای اولیه جوجه، در تضاد است. در حالی که با نتایج Armengol و همکاران (۲۰۰۷) مشابه است که گزارش کردند که سلول‌های زایای اولیه بلدرچین به دلیل عدم وجود گلیکوژن در سیتوپلاسم به PAS واکنش منفی نشان دادند. همچنین نتایج این تحقیق با مطالعه Mohammadi و همکاران (۲۰۲۳) که روی سلول‌های زایای اولیه گناد نر قرقاول صورت گرفته است، همخوانی دارد.

در مطالعه حاضر با تهیه مقاطع نیمه نازک و رنگ‌آمیزی این مقاطع با رنگ تولوئیدن‌بلو جهت شناسایی دقیق‌تر سلول‌های زایای اولیه استفاده شد که گرانول‌های گلیکوژن

دلیل میزان کم ذخایر گرانول‌های گلیکوژن در سیتوپلاسم این سلول‌ها یا کمبود کربوهیدرات در سطح سلول می‌باشد. این مطالعه با توجه به اندازه بزرگ‌تر سلول‌های زایای اولیه و هسته آن‌ها نسبت به سایر سلول‌ها نشان داد که رنگ‌آمیزی روتین هماتوکسیلین و ائوزین و استفاده از تکنیک تهیه برش‌های نیمه نازک برای تشخیص بافتی این سلول‌ها مناسب هستند.

در مطالعه حاضر تعداد سلول‌های زایای اولیه، حجم این سلول‌ها و حجم هسته آن‌ها در جنین قرقاول برای اولین بار توسط تکنیک استریولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت که بر اساس نتایج حاصله سلول‌های زایای اولیه در تخمدان جنین این پرنده تا سن ۱۴ روزگی قابل تشخیص هستند و پس از آن دچار تمایز سلولی و تقسیم میتوز می‌شوند و به سلول‌های زایا تبدیل می‌شوند.

محققین گزارش کرده‌اند غدد جنسی در مراحل اولیه تکوین حاوی تعداد کمی سلول زایای اولیه می‌باشند که با افزایش سن تعداد این سلول‌ها زیاد می‌شود و با ادامه روند رشد مجدداً از تعداد آن‌ها کاسته می‌شود که این نتایج با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت دارد (Mohamed et al, 2001; D'Costa et al, 2017). همچنین بر اساس تحقیقات انجام شده به نظر می‌رسد تعداد سلول‌های زایای اولیه گناد ماده تحت تأثیر سن رشد جنینی است که این نتایج نیز با داده‌های مطالعه حاضر همسو می‌باشد. علت کاهش تعداد سلول‌های زایای اولیه ممکن است به دلیل شروع تمایز سلولی این سلول‌ها و علت افزایش حجم این سلول‌ها به دلیل تقسیم میتوز در جنین ماده باشد (Mohamed et al, 2017; Sopiya et al, 2017). سلول‌های زایای اولیه تخمدان جنین قرقاول در تمام سنین مورد مطالعه به تکنیک هیستوشیمیایی PAS واکنش منفی نشان دادند که احتمالاً به

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از آقای قاسم پورادیبی تکنیسین محترم بخش بافت‌شناسی دانشکده دامپزشکی تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

کد اخلاق

تأییدیه اخلاقی این تحقیق توسط کمیته اخلاق دانشگاه فردوسی مشهد تصویب و با کد IR.UM.REC.1399.137 صادر گردیده و تمام آزمایش‌ها بر اساس دستورالعمل‌ها و مقررات مربوطه انجام شده است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

منابع مالی

منابع مالی این پژوهش در قالب رساله دکتری تخصصی و طی اعتبار تحقیقاتی شماره ۳/۵۵۷۶۴ توسط حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تأمین شده است.

منابع

Adamski, M., & Kuźniacka, J. (2006). The effect of age and sex on slaughter traits of pheasants

(*Phasianus colchicus* L.). *Animal Science Papers and Reports*, 24(Supplement 2), 11-18.

- Armengol, C., Carretero, A., Nacher, V., Ruberte, J., & Navarro, M. (2007). Carbohydrate characterization of quail primordial germ cells during migration and gonadal differentiation. *Journal of Anatomy*, 210(1), 98-111
- Carlson, N. (1985). Origin of the somatic components of chick embryonic gonads. *Archives d'anatomie microscopique et de morphologie experimentale*, 74(1), 52-59.
- Chojnacka-Puchta, L., Kasperczyk, K., Plucienniczak, G., Sawicka, D., & Bednarczyk, M. (2012). Primordial germ cells (PGCs) as a tool for creating transgenic chickens. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 15(1), 181-188.
- Clinton, M., & Haines, L. C. (2001). An overview of factors influencing sex determination and gonadal development in birds. *Genes and Mechanisms in Vertebrate Sex Determination*, (91), 97-115.
- Dastghaib, S., Gholizadeh, F., Mokaram, P., & Noorafshan, A. (2022). Stevia aquatic extract protects the pancreas from streptozocin (STZ) induced damage: A stereological study. *Indian Journal of Experimental Biology (IJEB)*, 60(05), 299-307.
- D'Costa, S., Pardue, S. L., & Petite, J. N. (2001). Comparative development of avian primordial germ cells and production of germ line chimeras. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 12(4), 151-168.
- England, M. A., & Matsumura, G. (1993). Primordial germ cells in the primitive streak stages chick embryo as studied by scanning electron microscopy. *Journal of anatomy*, 183(Pt 1), 67-73.
- Fujimoto, T., Ukeshima, A., & Kiyofuji, R. (1976). The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo. *The Anatomical Record*, 185(2), 139-153.
- González-Morán, M. G. (2011). Histological and stereological changes in growing and regressing chicken ovaries during development. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 294(5), 893-904.
- Guioli, S., & Lovell-Badge, R. (2007). PITX2 controls asymmetric gonadal development in both sexes of the chick and can rescue the degeneration of the right ovary. *Development*, 134(23), 4199-4208.
- Hassanzadeh, B., Nabipour, A., & Dehghani, H. (2019). Ostrich (*Struthio camelus*) primordial germ cells in embryonic blood and presumptive gonad: characterization by PAS and immunohistochemistry. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 20(4), 299-303.
- Hosseini, A., Nabipour, A., & Dehghani, H. (2020). Characterizing Primordial Germ Cells in the Turkey (Meleagris Gallopavo) Embryo. *Anatomical Sciences Journal*, 17(2), 63-72.
- Howard, V., & Reed, M. (2004). *Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy*. Garland Science.
- Intarapat, S., & Stern, C. D. (2013). Chick stem cells: current progress and future prospects. *Stem Cell Research*, 11(3), 1378-1392.
- Intarapat, S., & Stern, C. D. (2014). Left-right asymmetry in chicken embryonic gonads. *The Journal of Poultry Science*, 51(4), 352-358.
- Intarapat, S., & Satayalai, O. (2014). Microanatomical study of embryonic gonadal development in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Anatomy Research International*, 2014(168614), 1-9.
- Jung, J. G., Kim, D. K., Park, T. S., Lee, S. D., Lim, J. M., & Han, J. Y. (2005). Development of novel markers for the characterization of chicken primordial germ cells. *Stem Cells*, 23(5), 689-698.
- Johnson, A. L. (2015). Reproduction in the female. In *Sturkie's avian physiology* (pp. 635-665). Academic Press.
- Kheirabadi, M., Nabipour, A., Behnam Rassouli, M., & Dehghani, H. (2015). Morphological development of ovaries in ostrich (*Struthio camelus*) embryo. *Comparative Clinical Pathology*, 24, 1185-1191.
- Kim, Y. M., & Han, J. Y. (2018). The early development of germ cells in chicken. *International Journal of Developmental Biology*, 62(1-2-3), 145-152.
- Macdonald, J., Glover, J. D., Taylor, L., Sang, H. M., & McGrew, M. J. (2010). Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PloS one*, 5(11), e15518.
- Mathan, Zaib, G., Jin, K., Zuo, Q., Habib, M., Zhang, Y., & Li, B. (2023). Formation, Application, and Significance of Chicken Primordial Germ Cells: A Review. *Animals*, 13(6), 1096.
- Meng, L., Wang, S., Jiang, H., Hua, Y., Yin, B., Huang, X., & Zhu, G. (2022). Oct4 dependent chromatin activation is required for chicken primordial germ cell migration. *Stem Cell Reviews and Reports*, 18(7), 2535-2546.

- Mohamed A.M. Alsafy, Samir A, El-Gendy, Ashraf A, Karkoura, Doha Shokry. (2017). Pre-Hatching Development of the Alexandria Chicken Ovaries. *Academia Anatomica International*, 3(2), 34-43.
- Mohamed, G. K., Selim, A. A., Abdelhafeez, H. H., & Mo-hamed, M. B. (2017). Histomorphological Developmental Studies of the Left Ovary in the Japanese quail (*Coturnix Coturnix Japonica*). *MJ Cyto*, 1 (1): 002.
- Mohammadi Gheshlagh, F., Hosseini, A., & Nabipour, A. (2023). The identification of the primordial germ cells in the male gonads of pheasant (*Phasianus colchicus*) embryos using histochemical and immunostaining techniques. *Iranian Veterinary Journal*, 19(1), 52-60.
- Naeemipour, M., & Bassami, M. (2013). Isolation, culture and characterization of chicken primordial germ cells. *Journal of Cell and Molecular Research*, 5(2), 48-53.
- Nakamura, Y., Kagami, H., & Tagami, T. (2013). Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells. *Development, growth & differentiation*, 55(1), 20-40.
- Neisy, A., Koohpeyma, F., Khorchani, M. J., Karimi, F., & Zal, F. (2023). Quercetin modulates ovarian autophagy-related molecules and stereological parameters in a rat model of PCOS. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 13(1), 9.
- Pardanaud, L., Altmann, C., Kitos, P., Dieterlen-Lievre, F., & Buck, C. A. (1987). Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development*, 100(2), 339-349.
- Rosenthal, N. F., Ellis, H., Shioda, K., Mahoney, C., Coser, K. R., & Shioda, T. (2010). High-throughput applicable genomic sex typing of chicken by TaqMan real-time quantitative polymerase chain reaction. *Poultry science*, 89(7), 1451-1456.
- Smith, C. A., & Sinclair, A. H. (2004). Sex determination: insights from the chicken. *Bioessays*, 26(2), 120-132.
- Sopiyana, S., Setiadi, M. A., Fahrudin, M., & Supriatna, I. (2017). Isolation and number of gonadal primordial germ cells (gonadal PGCs) on the stages of early embryonic development of KUB chicken. *Media Peternakan*, 40(1), 1-6.
- Suvarna, K. S., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2018). *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. Elsevier health sciences.
- Szczerba, A., Kuwana, T., & Bednarczyk, M. (2021). Concentration and total number of circulating primordial germ cells in Green-legged Partridge-like chicken embryos. *Poultry science*, 100(1), 319-324.

Received: 17.07.2023

Accepted: 01.10.2023

اثر کنه واروآ، (*Varroa destructor*)، روی ویژگی‌های ریخت‌شناختی و تغذیه‌ای زنبور عسل نژاد ایرانی (*Apis mellifera meda*)

مهدی طوسی^۱، آرش راسخ^{۲*}، معصومه ضیایی^۳، پرویز شیشه‌بر^۲ و غلامحسین طهماسبی^۴

^۱ دانشجوی دکتری گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ استاد گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۳ دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۴ استاد مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، رییس جامعه زنبورعسل ایران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۹/۵

چکیده

زنبور عسل در بقا و گرده‌افشانی بسیاری از گیاهان نقش مهمی را ایفا می‌کند. یکی از مهم‌ترین آفاتی که زنبور عسل را مورد حمله قرار می‌دهد، کنه واروآ می‌باشد. این کنه به عنوان انگل خارجی، عمدتاً از خون لاروها، شفیره‌ها و حشرات کامل زنبور عسل تغذیه می‌کند. در این تحقیق، تأثیر آلودگی زنبور عسل نژاد ایرانی به تراکم‌های مختلف کنه در مرحله شفیرگی، روی ویژگی‌های زیستی و ریخت‌شناختی حشرات کامل زنبور کارگر مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور کنه‌های ماده از کندوهای آلوده جدا شده و سپس بسته به تراکم مورد نظر کنه، درون هر سلول حاوی پیش‌شفیره یک، دو و سه کنه قرار گرفت. پس از ظهور، ویژگی‌های تغذیه‌ای حشرات کامل زنبور هر سه روز یک بار و به مدت ۱۲ روز بررسی گردید و پس از آن زنبورها جهت بررسی مساحت آسینی‌های غدد هیپوفارینژال تشریح شدند. نتایج مربوط به ویژگی‌های زیستی و ریخت‌شناختی نشان داد که افزایش تراکم کنه تأثیری در طول دوره شفیرگی زنبورها نداشت، اما به طور معنی‌داری باعث کاهش وزن، طول بدن، مساحت بال‌های جلو، عقب و ساق پای عقب زنبورهای کارگر شد. از طرفی زنبورهای کاملی که در دوران شفیرگی حامل سه کنه بودند، بیش‌ترین مرگ و میر را داشتند و به همین دلیل نیز امکان بررسی ویژگی‌های تغذیه‌ای آن‌ها وجود نداشت. نتایج مربوط به ویژگی‌های تغذیه‌ای نشان داد که با افزایش تراکم کنه از میزان مصرف شربت و آب زنبورها کاسته شد، اما در میزان مصرف گرده اختلافی را نشان نداد. از سویی شاخص مصرف مواد غذایی زنبورهای فاقد کنه و زنبورهای حامل دو کنه در دوره شفیرگی نسبت به زنبورهای دارای یک کنه بیش‌تر بود، اما نرخ رشد و مساحت آسینی‌های تیمارها تفاوتی نشان نداد. امید می‌رود که نتایج مطالعه حاضر با ارایه اطلاعات بیش‌تر در خصوص چگونگی تأثیر کنه واروآ روی زنبورها، زمینه‌ای را برای کنترل این کنه فراهم سازد.

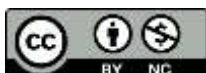
کلمات کلیدی: تراکم کنه واروآ، شاخص مصرف، نرخ رشد، ویژگی‌های مرفولوژیکی

مقدمه

گیاهانی که به کمک جانوران گرده‌افشانی می‌شوند در مقایسه با گیاهانی که گرده‌افشانی آن‌ها با باد انجام می‌شود، از تنوع بیش‌تری برخوردارند، به طوری که حدود ۲۴۰۰۰۰ گونه گیاه گل‌دار برای گرده‌افشانی به ۱۰۰۰۰۰ گونه حشره

* نویسنده مسئول: آرش راسخ، استاد گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

E-mail: a.rasekh@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

تابستان‌گذرانی خوب و جمع‌آوری زیاد بره موم می‌باشد که در مجموع باعث تمایز این نژاد از سایر نژادها می‌شود. زنبورهای این نژاد دارای رفتار تهاجمی بالا و عملکرد نسبتاً پایین بوده، ولی با توجه به ویژگی‌های ارابه شده، پرورش این نژاد برای زنبورداران اقتصادی است (Tahmasbi et al, 2013). گرده‌افشانی و تولید محصولات کندو ممکن است به وسیله عوامل بیماری‌زا و انگل‌ها تحت تأثیر قرار گیرند (Tu et al, 2010). یکی از مهم‌ترین چالش‌های زنبورداری امروز، کنه واروآ، (*Varroa destructor* Anderson & Trueman (Parasitiformes: Varroidae) می‌باشد و یافتن راه‌حلهایی برای کنترل این انگل از اهمیت زیادی برخوردار است (Coby, 2009). کنه واروآ، انگل خارجی نوزادان و حشرات کامل زنبورعسل است و با چشم غیر مسلح به خوبی دیده می‌شود. کنه ماده بالغ، تخم مرغی شکل و مسطح، به طول ۱/۱ تا ۱/۲ میلی‌متر و به عرض ۱/۵ تا ۱/۷ میلی‌متر بوده و به رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز می‌باشد که پس از ورود به حجره نوزادان، با بسته شدن درب آن‌ها شروع به تخم‌ریزی می‌کند. کنه‌های نر از کنه‌های ماده کوچک‌تر بوده (به طول ۰/۷۶ میلی‌متر و به عرض ۰/۷۱ میلی‌متر) و به رنگ زرد روشن تا خاکستری روشن می‌باشند. کنه در انتهای پنجه پاهای خود دارای اندام بادکش‌مانند (Sucker-like) بوده و قادر است به موهای بدن حشرات کامل زنبور چسبیده، به طوری که زنبور به سختی قادر به جدا کردن آن از بدن خود می‌باشد (Mossadegh and Komeili-Birjandi, 1991). کنه واروآ جهت تغذیه از بالغین زنبورعسل، محل اتصال حلقه‌های بدن به خصوص سر و حلقه اول سینه و همچنین محل اتصال سینه به شکم را انتخاب کرده و با فرو کردن قطعات دهانی خود به مقدار کم و به دفعات زیاد از همولنف و چربی میزبان تغذیه می‌کند. میزان رشد جمعیت یک کلنی زنبورعسل علاوه بر شرایط محیطی و نژاد زنبورعسل، به میزان قابل توجهی به میزان آلودگی کندو به کنه واروآ بستگی دارد (DeGrandi-Hofman and Curry, 2004; Frey and Rosenkranz, 2014). کنه واروآ با تغذیه مستقیم از

و جانور وابسته هستند (Dafni, 1992). همچنین محصولات غذایی مورد استفاده بشر مانند گوشت قرمز و لبنیات که قسمت مهمی از رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهند، در نتیجه مصرف گیاهانی مانند یونجه، شبدر و دانه‌های روغنی است که عمده گرده‌افشانی آن‌ها توسط حشرات صورت می‌گیرد (Dafni, 1992). با توجه به توضیحات بالا و بررسی گزارش‌های موجود، بین ۳۰ تا ۵۰ درصد کل رژیم غذایی بشر به طور مستقیم و غیرمستقیم وابسته به حشرات گرده‌افشان است (Dafni, 1992; Sigel et al, 2012). اهمیت دیگر گرده‌افشانی به خاطر تأثیر آن روی کیفیت و کارایی تولید محصول است، به طوری که گرده‌افشانی ناکافی نه تنها منجر به کاهش تولید محصول می‌شود، بلکه دیررس شدن محصول و همچنین کاهش مرغوبیت میوه را نیز به همراه خواهد داشت (Pimentel et al, 1997). از دیدگاه اقتصادی نیز حدود یک سوم اقتصاد جهانی تولیدات کشاورزی وابسته به گرده‌افشانی گیاهان توسط حشرات گرده‌افشان است (Nabhan, 1996). به طوری که کمبود حشرات گرده‌افشان در اکوسیستم‌های کشاورزی منجر به کاهش امنیت غذایی و اقتصادی خواهد شد (Braulio et al, 1999).

در میان حشرات گرده‌افشان، زنبورعسل معمولی یا اروپایی، (*Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)) بیش‌ترین سهم را در بین جانداران گرده‌افشان به عهده دارد به طوری که این گونه مسئول گرده‌افشانی ۸۵ درصد محصولات جهانی می‌باشد (Sigel et al, 2012). در یک کلنی زنبورعسل فعالیت‌های مختلف توسط زنبورهای کارگر و به اقتضای سن آن‌ها انجام می‌شود و زنبورهای کارگر از ۲۰ روزگی به بعد، وظیفه چرا و گرده‌افشانی را به عهده دارند (Ebadi and Ahmadi, 2004). زنبورعسل نژاد ایرانی، (*Apis mellifera meda* Skorikov)، یکی از ۴۲ نژاد زنبورعسل موجود در دنیا است که علاوه بر ایران، در شمال عراق و جنوب شرقی ترکیه و حتی در شمال سوریه نیز وجود دارد. نژاد ایرانی از نظر زیستی دارای ویژگی‌هایی نظیر قدرت باروری زیاد، قدرت زمستان‌گذرانی و

بررسی اثر آلودگی به تراکم‌های مختلف کنه واروا در مرحله شفیرگی زنبورعسل کارگر نژاد ایرانی روی ویژگی‌های ریخت‌شناختی و زیستی حشرات کامل زنبور کارگر است. نتایج مطالعه حاضر می‌تواند به عنوان یک شاخص برای تعیین آستانه‌ای از تراکم کنه که منجر به خسارت جدی روی زنبورعسل می‌گردد، باشد و زمینه کنترل به موقع جمعیت آفت را فراهم آورد.

مواد و روش کار

جهت انجام آزمایش‌ها، از کندوهای مستقر در مزرعه تحقیقاتی گروه گیاه‌پزشکی واقع در دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز استفاده شد. این کلنی‌ها شامل زنبورعسل نژاد ایرانی بودند. با نمونه‌برداری اولیه در فروردین ماه ۱۴۰۱، آلودگی یک کندو به کنه واروا مشخص شد و از روی زنبورهای کارگر این کندو، کنه‌های واروای بالغ زنده جمع‌آوری شد. برای جمع‌آوری کنه از گاز کربن‌دی‌اکسید استفاده شد، بدین صورت که در هر بازدید، ۱۰۰ الی ۲۰۰ عدد حشره کامل زنبور کارگر مستقر در یک یا دو قاب، در داخل وسیله مخصوص جمع‌آوری کنه ریخته شد. این وسیله شامل دو ظرف است که یکی در داخل دیگری قرار می‌گیرد. تمام دیواره‌ها و درب ظرف داخلی (به ابعاد ۵×۱۰×۱۵ سانتی‌متر) از جنس توری فلزی (۱۰ مش) بود. زنبورها در ظرف داخلی ریخته شده و سپس درب آن گذاشته شد. این ظرف به همراه زنبورها داخل ظرف بزرگ‌تر دیگری (به ابعاد ۱۰×۲۵×۳۰ سانتی‌متر) که تمام دیواره‌ها و درب آن از جنس پلاستیک است، قرار گرفته و سپس درب این ظرف بسته شد. در قسمت کناری ظرف خارجی سوراخی تعبیه شده که لوله گاز به داخل آن وارد شود. برای گازدهی از کپسول استوانه‌ای ۴ لیتری گاز کربن‌دی‌اکسید استفاده شد. زنبورها به مدت پنج دقیقه تحت تأثیر گاز قرار می‌گرفتند و پس از این مدت زنبورها و کنه‌های روی آن‌ها بیهوش می‌شدند. سپس اتصال ظرف خارجی با کپسول گاز قطع شده و با تکان دادن شدید ظرف و در نتیجه برخورد زنبورها به هم و دیواره ظرف داخلی،

همولنف باعث کاهش میزان آب و پروتئین زنبورها شده که این امر باعث کاهش طول عمر و میزان فعالیت آن‌ها می‌گردد (Annoscia et al, 2012; Bowen-Walker and Gunn, 2001). از طرف دیگر، افزایش تراکم کنه در حشره نوزادان منجر به تشدید تغذیه از همولنف نوزادان شده و ضمن افزایش احتمال مرگ آن‌ها، کاهش اندازه و وزن، تغییر شکل یا از بین رفتن بال‌ها، عدم توسعه شکم و غدد هیپوفارینژال را در حشرات کامل زنده مانده به دنبال خواهد داشت (Boecking and Spivak, 1999; Bowen-Walker et al, 1999; De Jong et al, 1982; Mondet et al, 2014; Yang et al, 2005). علاوه بر این، کنه واروا برای فراهم نمودن شرایط مطلوب‌تر برای خود از جمله افزایش رشد و تولیدمثل، برخی تغییرات رفتاری را در زنبور میزبان موجب می‌شود، به عنوان مثال تغییر در رفتار جستجوگری زنبورهای عسل آلوده به کنه واروا مشاهده شده است (Kralj and Fosch, 2006). این تغییر رفتار زنبور می‌تواند روی اکوسیستم محیط و زنجیره‌های غذایی تأثیر به‌سزایی بر جای گذارد (Otterstatter et al, 2005). زنبورعسل در برابر کنه واروا بی‌دفاع نبوده و از مکانیزم‌های مقاومتی مختلفی بهره می‌برد که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به رفتار بهداشتی (Hygienic behavior) و رفتار تیمارگری (Grooming behavior) اشاره کرد. رفتار بهداشتی خود فرآیندی دو مرحله‌ای شامل درپوش‌برداری و تخلیه شفیره‌های آلوده می‌باشد. در طی درپوش‌برداری، زنبورهای پرستار (Nurse bees) اقدام به شناسایی سلول‌های سر بسته حاوی شفیره آلوده به کنه نموده و در مرحله بعد در طی فرآیند تخلیه اقدام به خارج کردن شفیره‌ها از این حشره‌ها می‌نمایند (Perez-Sato et al, 2009). رفتار تیمارگری فرآیند دیگری جهت مقاومت به کنه واروا است که در طی این رفتار زنبورهای کارگر توسط آرواره‌های خود، کنه‌های واروا چسبیده به بدن خود (رفتار خود تیمارگری) یا کنه‌های بدن سایر زنبورهای درون کلنی (رفتار دگرتیماری) را جدا کرده، جویده و به کف کندو می‌اندازند (Pritchard, 2016). هدف از مطالعه حاضر،

کنه‌های بیهوش شده از توری ظرف داخلی عبور کرده و در کف ظرف خارجی می‌افتادند. در انتها، درب این ظرف باز شده و به وسیله آسپیراتور، کنه‌های بالغ بیهوش شده برای استفاده در آزمایش‌ها جمع‌آوری می‌شدند. علاوه بر این در یک کندوی سالم و عاری از کنه، یک قاب حاوی نوزادان کارگر تا زمان بسته شدن درب حجره‌ها و رفتن به مرحله پیش شفیرگی، تحت نظر قرار گرفتند. سپس این قاب به آزمایشگاه و درون ژرمیناتور تاریک با شرایط دمایی $(\pm 1) 34/5$ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی $(\pm 5) 75$ درصد منتقل گردید. ۱۵ ساعت پس از بسته شدن درب حجره‌ها، قاب از ژرمیناتور خارج و درپوش حجره‌ها برداشته شد و روی هر حجره حاوی پیش شفیره یک کپسول خوراکی ژلاتینی (به حجم ۱/۵ میلی‌لیتر) قرار گرفت و سپس این قاب به مدت ۲ الی ۵ ساعت به صورت افقی، به گونه‌ای درون ژرمیناتور قرار گرفت که پیش شفیره‌ها به مرور زمان و توسط نیروی جاذبه به داخل کپسول‌ها سر بخورند. سپس بسته به تراکم مورد نظر کنه، درون هر کپسول حاوی پیش شفیره، یک، دو یا سه کنه ماده قرار گرفت و درب کپسول‌ها که حاوی سه سوراخ ریز جهت تهویه بود، بسته شد. کپسول‌ها جهت طی شدن مرحله شفیرگی زنبور در ژرمیناتور قرار گرفتند. در تیمار شاهد (بدون آلودگی)، در داخل کپسول تنها شفیره زنبور قرار داده شد. با گذشت ۱۱ الی ۱۲ روز و همزمان با ظاهر شدن حشرات کامل زنبور کارگر، از این زنبورها در آزمایش‌ها استفاده گردید.

کنه‌های بیهوش شده از توری ظرف داخلی عبور کرده و در کف ظرف خارجی می‌افتادند. در انتها، درب این ظرف باز شده و به وسیله آسپیراتور، کنه‌های بالغ بیهوش شده برای استفاده در آزمایش‌ها جمع‌آوری می‌شدند. علاوه بر این در یک کندوی سالم و عاری از کنه، یک قاب حاوی نوزادان کارگر تا زمان بسته شدن درب حجره‌ها و رفتن به مرحله پیش شفیرگی، تحت نظر قرار گرفتند. سپس این قاب به آزمایشگاه و درون ژرمیناتور تاریک با شرایط دمایی $(\pm 1) 34/5$ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی $(\pm 5) 75$ درصد منتقل گردید. ۱۵ ساعت پس از بسته شدن درب حجره‌ها، قاب از ژرمیناتور خارج و درپوش حجره‌ها برداشته شد و روی هر حجره حاوی پیش شفیره یک کپسول خوراکی ژلاتینی (به حجم ۱/۵ میلی‌لیتر) قرار گرفت و سپس این قاب به مدت ۲ الی ۵ ساعت به صورت افقی، به گونه‌ای درون ژرمیناتور قرار گرفت که پیش شفیره‌ها به مرور زمان و توسط نیروی جاذبه به داخل کپسول‌ها سر بخورند. سپس بسته به تراکم مورد نظر کنه، درون هر کپسول حاوی پیش شفیره، یک، دو یا سه کنه ماده قرار گرفت و درب کپسول‌ها که حاوی سه سوراخ ریز جهت تهویه بود، بسته شد. کپسول‌ها جهت طی شدن مرحله شفیرگی زنبور در ژرمیناتور قرار گرفتند. در تیمار شاهد (بدون آلودگی)، در داخل کپسول تنها شفیره زنبور قرار داده شد. با گذشت ۱۱ الی ۱۲ روز و همزمان با ظاهر شدن حشرات کامل زنبور کارگر، از این زنبورها در آزمایش‌ها استفاده گردید.

همراه با ظهور حشرات کامل در هر یک از تیمارها، طول دوره رشدی (مرحله شفیرگی) یک‌یک آن‌ها به دست آمد. در ادامه این آزمایش‌ها حشرات کامل توسط بخار الکل (۹۶ درصد) کشته و وزن تر، وزن خشک، طول بدن، مساحت ساق پای عقب، و مساحت بال‌های جلو و عقب یک‌یک زنبورها تعیین شد. برای تعیین وزن خشک، زنبورهای مرده به مدت ۹۰ دقیقه در آون با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. برای توزین زنبورها از ترازوی بسیار دقیق (A&D® Analytical Balance, Model GR-202) (با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم) استفاده شد. برای اندازه‌گیری شاخص‌های ریخت‌شناختی، از هر یک از اندام‌ها با استفاده از استریومیکروسکوپ مجهز به دوربین دیجیتال (با بزرگ‌نمایی ۱۶ برابر) عکس‌برداری شد. این عکس‌ها به کامپیوتر منتقل شده و اندازه این شاخص‌ها توسط نرم‌افزار ImageJ (با دقت ۰/۰۰۳) تعیین گردید.

انجام آزمایش جهت بررسی تأثیر آلودگی به تراکم‌های مختلف کنه واروآ، روی ویژگی‌های تغذیه‌ای حشرات کامل

برای ساخت قفس‌های آزمایش از لیوان‌های پلاستیکی یکبار مصرف و شفاف (به ارتفاع ۹ سانتی‌متر، قطر دهانه لیوان در بالا ۶/۵ و در پایین ۴ سانتی‌متر) استفاده شد. دهانه لیوان با تور پارچه‌ای پوشانیده شد و جهت جلوگیری از خروج زنبورها از لیوان، اطراف آن با کش پلاستیکی محکم شد. لیوان‌ها به صورت وارونه قرار داده شدند به طوری که دهانه آن‌ها رو به پایین باشد. جهت تهویه سه سوراخ در بالا و ۱۰ ردیف سوراخ ریز در دیواره لیوان ایجاد گردید. درون هر لیوان یک تکه برگه موم (۷×۲ سانتی‌متر) جهت

بزرگنمایی ۱۰۰ عکس برداری صورت گرفت. سپس این عکس‌ها به کامپیوتر منتقل شده و مساحت هر غده توسط نرم‌افزار Digimizer محاسبه گردید.

قبل از آنالیز داده‌ها، نرمال بودن آنها از طریق آزمون گولموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) بررسی گردید. جهت مقایسه میانگین داده‌های مربوط به ویژگی‌های ظاهری و زیستی حشرات کامل از آزمون آماری تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و تعیین اختلاف بین گروه‌ها، از آزمون تکمیلی توکی (Tukey's post-hoc) (در سطح ۰/۰۵) استفاده شد. برای بررسی تأثیر تراکم کنه روی میزان مرگ و میر شفیره‌ها از آزمون مربع کای پیرسون (Pearson's chi-square test) (χ^2) استفاده شد. جهت آنالیز داده‌های مربوط به تغییرات وزن و تغییرات میزان مصرف مواد غذایی و همچنین نرخ رشد، نظر به وجود دو متغیر مستقل، یعنی تراکم کنه واروا در مرحله شفیرگی (شفیره‌های حاوی صفر، یک و دو کنه) و سن زنبور (زنبورهای سه، شش، نه و دوازده روزه)، از آزمون آماری تجزیه واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) استفاده شد. با توجه به این که برهم‌کنش این دو متغیر مستقل معنی‌دار نبود، داده‌های مربوط به سنین مختلف زنبور در هم جمع شده و تیمارهای مربوط به سطوح مختلف آلودگی شفیره به کنه، دوباره آنالیز شد. همچنین جهت آنالیز داده‌های مربوط به تغییرات وزن و تغییرات میزان مصرف مواد غذایی در طی سنین مختلف زنبور، از آزمون آماری تجزیه واریانس یک طرفه سنجش تکراری (One-way ANOVA Repeated Measures) و آزمون تکمیلی بون فرونی (Bonferroni's post-hoc) استفاده شد. تمامی نتایج توسط نرم افزار SPSS V.24 آنالیز شدند (SPSS, 1998).

زنبورعسل شامل سه تیمار ($n=12$)، بر حسب میزان آلودگی شفیره‌های زنبورعسل به تراکم‌های مختلف کنه بود. حشرات کامل تیمارهای مختلف در طول دوره شفیرگی خود حامل یک و یا دو کنه ماده و نتاج آنها بودند. در تیمار چهارم (شاهد) نیز از حشراتی که در طول دوره نوزادی عاری از کنه بودند، استفاده شد. با توجه به این که مطابق با نتایج آزمایش قبلی، تراکم سه کنه ماده و نتاج آنها، منجر به مرگ اکثر زنبورها شده و تعداد اندک حشرات کامل ظاهر شده نیز حشراتی ناقص بودند، این تیمار از این آزمایش حذف شد.

با ظهور زنبورها در هر یک از تیمارهای بالا به منظور بررسی ویژگی‌های تغذیه‌ای، حشرات به طور جداگانه به قفس‌های آزمایش منتقل شدند تا میزان تغذیه از شربت شکر، گرده، آب و همچنین تغییرات وزن تر، در روزهای سوم، ششم، نهم و دوازدهم پس از انتقال به قفس‌ها، تعیین شود. این قفس‌ها به ژرمیناتور تاریک با شرایط دمایی (± 1) ۳۴/۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی (± 5) ۷۵ درصد منتقل شدند. قبل از اندازه‌گیری وزن تر با توجه به لزوم ثابت بودن زنبورها روی ترازو، زنبورها به مدت یک دقیقه در دمای ۲- تا ۵- درجه سلسیوس قرار گرفتند. بر اساس یک پیش‌آزمایش، مشخص شد که زنبورها طی این مدت در شرایط دمایی پایین دچار آسیب نمی‌شوند. همچنین میزان تغذیه از مواد غذایی مذکور و شاخص مصرف مواد غذایی و نرخ رشد زنبور در هر قفس به مدت ۱۲ روز و هر ۳ روز یکبار بررسی شد. در ادامه شاخص مصرف (وزن غذای خورده شده تقسیم بر وزن تر زنبور) و نرخ رشد (افزایش وزن تر زنبور تقسیم بر وزن غذای خورده شده) در روزهای نمونه‌برداری به روش Rasekh و Osawa (۲۰۲۰) تعیین شد.

در پایان آزمایش‌ها، زنبورهای ۱۲ روزه توسط بخار الکل کشته و در زیر استریومیکروسکوپ جهت تعیین مساحت آسینی‌های غدد هیپوفارینژال تشریح شدند. برای اندازه‌گیری مساحت آسینی‌ها در هر زنبور، تعداد ده آسینی به طور تصادفی انتخاب و در زیر میکروسکوپ با

نتایج

از طرفی وزن تر و خشک زنبورهای کامل نیز تحت تاثیر تراکم کنه قرار گرفت و با افزایش تراکم کنه از وزن زنبورهای کامل کاسته شد (Table 2).

بررسی تاثیر آلودگی به تراکم‌های مختلف کنه واروا روی ویژگی‌های تغذیه‌ای حشرات کامل زنبورعسل اثرات اصلی مربوط به تراکم کنه (صفر، ۱ و ۲ کنه) و سن زنبور (روزهای ۳، ۶، ۹ و ۱۲) و اثرات متقابل آنها روی میزان مصرف آب و مواد غذایی در Table 3 آورده شده است.

بر اساس نتایج به دست آمده، میزان مصرف شربت شکر زنبورها در سنین مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان داد، این در حالی بود که این میزان در هر تیمار در طی روزهای مختلف دستخوش تغییر معنی‌داری نشد (Table 4).

بررسی تاثیر آلودگی به تراکم‌های مختلف کنه واروا، روی ویژگی‌های ظاهری و زیستی حشرات کامل زنبورعسل بر اساس نتایج این آزمایش، همراه با افزایش تعداد کنه در حجره شفیرگی، مرگ و میر شفیره‌ها به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد، به طوری که شفیره‌هایی که حاوی سه کنه بودند بیش‌ترین مرگ و میر را داشتند ($P=0/005$ ، $\chi^2_{3,11}=12/7$) و همچنین کاهش معنی‌دار طول بدن، مساحت بال‌های جلو و عقب و همچنین مساحت ساق پای عقب زنبورهای کارگر بین سطوح مختلف آلودگی به کنه مشاهده شد (Table 1). حشرات کاملی که در دوران شفیرگی حامل سه کنه مادر بودند، به دلیل وجود بال‌های ناقص، توانایی پرواز نداشتند. این در حالی است که طول دوره شفیرگی در حجره‌ها (به ترتیب برای سه تیمار و شاهد: ۲۸۲/۴۱، ۲۸۲/۱، ۲۸۲/۳۳ و ۲۸۳/۶ ساعت) دستخوش تغییر نشد ($F_{3,29}=1/18$; $P=0/16$).

Table 1: Mean (\pm SE) of morphological characteristics of *Apis mellifera meda* worker bees infected with different densities of *Varroa destructor* in the pupal stage. In each row, Means followed by same letter are not significantly different from each other (Tukey's post-hoc, $P>0.05$)

| | Different densities of infection | | | | |
|------------------------------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-----------------------------------|
| | No mite | One mite | Two mites | Three mites | |
| Body length (mm) | 12.08 \pm 0.2 a | 12 \pm 0.2 a | 9.33 \pm 0.3 b | 9 \pm 0.3 b | $F_{3,29}=32.03$, $P<0.001$ |
| Forewing area (mm ²) | 16.05 \pm 0.07a | 16.01 \pm 0.06 a | 13.45 \pm 0.29 b | 2.21 \pm 0.18 c | $F_{3,29}=1755.61$, $P<0.001$ |
| Hind wing area (mm ²) | 6.77 \pm 0.07 a | 6.52 \pm 0.06 a | 5.93 \pm 0.06 b | 1.15 \pm 0.06 c | $F_{3,29}=876.52$, $P<0.001$ |
| Hind tibia area (mm ²) | 2.4 \pm 0.004 a | 2.39 \pm 0.006 a | 2.24 \pm 0.02 b | 2 \pm 0.03 c | $F_{3,29}=133.42$, $P<0.001$ |

Table 2: Mean (\pm SE) of wet and dry weight (mg) of *Apis mellifera meda* worker bees infected with different densities of *Varroa destructor* in the pupal stage. In each row, Means followed by same letter are not significantly different from each other (Tukey's post-hoc, $P>0.05$)

| | Different densities of infection | | | | |
|------------|----------------------------------|----------------|----------------|----------------|-------------------------------|
| | No mite | One mite | Two mites | Three mites | |
| Wet weight | 129 \pm 1 a | 127 \pm 1 a | 78 \pm 1 b | 77 \pm 2 b | $F_{3,29}=347.46$, $P<0.001$ |
| Dry weight | 18 \pm 0.1 a | 17 \pm 0.2 a | 16 \pm 0.2 b | 16 \pm 0.2 b | $F_{3,29}=21.73$, $P<0.001$ |

Table 3: Mean (\pm SE) of sugar syrup consumption (ml) by *Apis mellifera meda* adult workers on the 3rd, 6th, 9th, and 12th days old, that were infected with different densities of *Varroa destructor* in the pupal stage. Means within each row (Bonferroni's post-hoc) bearing the same upper case letter, and means within each column (Tukey's post-hoc) bearing the same lower case letter, are not significantly different ($P>0.05$)

| | The age of adult bees | | | | |
|-----------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| | 3 rd day | 6 th day | 9 th day | 12 th day | |
| No mite | 0.436 \pm 0.03 Aa | 0.355 \pm 0.02 Aa | 0.445 \pm 0.02 Aa | 0.418 \pm 0.03 Aa | $F_{2,21,22,14}$ =2.41, $P=0.1$ |
| One mite | 0.32 \pm 0.03 Aab | 0.27 \pm 0.02 Ab | 0.31 \pm 0.01 Ab | 0.32 \pm 0.02 Aab | $F_{2,44,21,96}$ =0.75, $P=0.5$ |
| Two mites | 0.28 \pm 0.03 Ab | 0.24 \pm 0.02 Ab | 0.28 \pm 0.02 Ab | 0.28 \pm 0.02 Ab | $F_{2,21,8,85}$ =0.47, $P=0.65$ |
| | $F_{2,23}$ =4.78, $P=0.01$ | $F_{2,23}$ =6.85, $P=0.005$ | $F_{2,23}$ =15.13, $P<0.001$ | $F_{2,23}$ =5.37, $P=0.01$ | |

Table 4: Two-way ANOVA of effects of *Varroa destructor* density (0, 1, and 2 mites) and bee age (3, 6, 9, and 12 days old) and their interaction, on food consumption of *Apis mellifera meda* adult workers

| Source of variation | Sugar syrup | | | Pollen | | | Water | | |
|---------------------------------|-------------|------|--------|--------|------|------|-------|------|--------|
| | df | F | P | df | F | P | df | F | P |
| <i>Varroa</i> mite density | 2 | 20.6 | <0.001 | 2 | 1.25 | 0.3 | 2 | 8.6 | <0.001 |
| Bee age | 3 | 0.87 | 0.46 | 3 | 3.38 | 0.02 | 3 | 2.58 | 0.06 |
| Interaction between two factors | 6 | 0.87 | 0.52 | 6 | 1.1 | 0.37 | 6 | 0.75 | 0.6 |
| Residual d.f. | 92 | | | 92 | | | 92 | | |

مطابق با Table 5، افزایش تراکم کنه در زمان شفیرگی در خصوص مصرف آب نیز تنها در روزهای نهم و دوازدهم بین تیمارها اختلاف معنی داری مشاهده شد. منجر به افزایش مصرف کرده در حشرات کامل نشد. (Table 6).

Table 5: Mean (\pm SE) of water consumption (ml) by *Apis mellifera meda* adult workers on the 3rd, 6th, 9th, and 12th days old, that were infected with different densities of *Varroa destructor* in the pupal stage. Means within each row (Bonferroni's post-hoc) bearing the same upper case letter, and means within each column (Tukey's post-hoc) bearing the same lower case letter, are not significantly different ($P>0.05$)

| | The age of adult bees | | | | |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| | 3 rd day | 6 th day | 9 th day | 12 th day | |
| No mites | 0.14 \pm 0.03 Aa | 0.22 \pm 0.02 Aa | 0.2 \pm 0.02 Aa | 0.15 \pm 0.02 Aa | $F_{2,3,23,08}$ =2.23, $P=0.12$ |
| One mite | 0.15 \pm 0.01 Aa | 0.17 \pm 0.04 Aa | 0.1 \pm 0.03 Aab | 0.11 \pm 0.04 Aab | $F_{2,69,24,23}$ =1.25, $P=0.31$ |
| Two mites | 0.08 \pm 0.02 Aa | 0.12 \pm 0.03 Aa | 0.08 \pm 0.02 Ab | 0.02 \pm 0.02 Ab | $F_{1,99,7,98}$ =2.42, $P=0.15$ |
| | $F_{2,23}$ =1.52, $P=0.23$ | $F_{2,23}$ =1.82, $P=0.18$ | $F_{2,23}$ =5.04, $P=0.01$ | $F_{2,23}$ =3.19, $P=0.04$ | |

Table 6: Mean (\pm SE) of pollen consumption (ml) by *Apis mellifera meda* adult workers on the 3rd, 6th, 9th, and 12th days old, that were infected with different densities of *Varroa destructor* in the pupal stage. Means within each row (Bonferroni's post-hoc) bearing the same upper case letter, and means within each column (Tukey's post-hoc) bearing the same lower case letter, are not significantly different ($P>0.05$)

| | The age of adult bees | | | | |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| | 3 rd day | 6 th day | 9 th day | 12 th day | |
| No mite | 0.023 \pm 0.001 Aa | 0.022 \pm 0.001 Aa | 0.024 \pm 0.001Aa | 0.027 \pm 0.001Aa | $F_{1.73,17.30}=2.54$, $P=0.11$ |
| One mite | 0.024 \pm 0.001 Aa | 0.024 \pm 0.001 Aa | 0.023 \pm 0.0008Aa | 0.028 \pm 0.001Aa | $F_{1.81,16.35}=2.98$, $P=0.08$ |
| Two mites | 0.021 \pm 0.001 Aa | 0.023 \pm 0.001 Aa | 0.024 \pm 0.001Aa | 0.023 \pm 0.001Aa | $F_{1.63,6.55}=0.46$, $P=0.61$ |
| | $F_{2,23}=0.72$, $P=0.49$ | $F_{2,23}=0.67$, $P=0.52$ | $F_{2,23}=0.38$, $P=0.68$ | $F_{2,23}=2.2$, $P=0.13$ | |

Table 8 آورده شده است. وزن تر تیمارهای مختلف در تمامی روزها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشت و در هر تیمار نیز در طی دوازده روز سیر صعودی قابل توجهی را نشان داد (Table 9).

شاخص مصرف مواد غذایی (Table 10) و نرخ رشد (Table 11) نیز در روز ششم و نهم بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری داشت. همچنین تنها در زنبورهای کامل فاقد کنه، شاخص مصرف و نرخ رشد با گذشت زمان تفاوت معنی‌داری را نشان داد.

با توجه به عدم معنی‌دار بودن اثرات متقابل تراکم کنه و سن زنبور روی میزان مصرف مواد غذایی مذکور و آب، تجزیه واریانس یک طرفه انجام شد، نتایج نشان داد که میزان مصرف شربت شکر و آب تیمارها در مجموع دوازده روز با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشت به طوری که با افزایش تراکم کنه از میزان مصرف شربت و آب کاسته شد در حالی که میزان مصرف گرده تغییری نکرد (Table 7). اثرات اصلی مربوط به تراکم کنه (صفر، ۱ و ۲ کنه) و سن زنبور (روزهای ۳، ۶، ۹ و ۱۲) و اثرات متقابل آن‌ها روی وزن، شاخص مصرف و نرخ رشد مواد غذایی در

Table 7: Mean (\pm SE) of sugar syrup (ml), water (ml) and pollen (g) consumption by *Apis mellifera meda* adult workers on the all sampling days, which were infected with different densities of *Varroa destructor* in the pupal stage. In each column, Means followed by same letter are not significantly different from each other (Tukey's post-hoc; $P>0.05$)

| | sugar syrup | water | Pollen |
|-----------|-------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| No mite | 0.41 \pm 0.01 a | 0.18 \pm 0.01 a | 0.024 \pm 0.0007 a |
| One mite | 0.3 \pm 0.01 b | 0.13 \pm 0.01 ab | 0.024 \pm 0.0006 a |
| Two mites | 0.3 \pm 0.01 b | 0.08 \pm 0.01 b | 0.023 \pm 0.0007 a |
| | $F_{2,101}=20.25$, $P<0.001$ | $F_{2,101}=8.32$, $P<0.001$ | $F_{2,101}=1.1$, $P=0.33$ |

Table 8: Two-way ANOVA effects of *Varroa destructor* density (0, 1, and 2 mites) and bee age (3, 6, 9, and 12 days) and their interaction, on weight, consumption index and growth rate of *Apis mellifera meda* adult workers

| Source of variation | Weight | | | Consumption index | | | Growth rate | | |
|-----------------------------|--------|--------|--------|-------------------|-------|--------|-------------|------|-------|
| | df | F | P | df | F | P | df | F | P |
| <i>Varroa</i> mite density | 2 | 377.07 | <0.001 | 2 | 11.46 | <0.001 | 2 | 3.38 | 0.04 |
| Bee age | 3 | 51.4 | <0.001 | 3 | 3.9 | 0.01 | 2 | 5.42 | 0.006 |
| Interaction between factors | 6 | 0.52 | 0.79 | 6 | 0.9 | 0.5 | 4 | 2.14 | 0.09 |
| Residual d.f. | 92 | | | 92 | | | 69 | | |

Table 9: Mean (\pm SE) of wet weight (mg) of *Apis mellifera meda* adult workers on the 3rd, 6th, 9th, and 12th days, which were infected with different densities of *Varroa destructor* in the pupal stage. Means within each row (Bonferroni's post-hoc) bearing the same upper case letter, and means within each column (Tukey's post-hoc) bearing the same lower case letter, are not significantly different ($P>0.05$).

| | The age of adult bees | | | | |
|-----------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|--|
| | 3 rd day | 6 th day | 9 th day | 12 th day | |
| No mite | 83.6 \pm 0.7 Da | 87.4 \pm 0.8 Ca | 91.8 \pm 0.8 Ba | 100.2 \pm 1 Aa | $F_{1.43,14.35}=80.9$, $P<0.001$ |
| One mite | 80.7 \pm 1 Da | 85.8 \pm 1 Ca | 90.4 \pm 1 Ba | 96.2 \pm 1 Aa | $F_{2.35,21.23}=258.34$, $P<0.001$ |
| Two mites | 54.7 \pm 2 Bb | 58.1 \pm 2 Bb | 62.9 \pm 2 Ab | 67 \pm 3 Ab | $F_{1.92,7.71}=59.51$, $P<0.001$ |
| | $F_{2,23}=103.91$ $P<0.001$ | $F_{2,23}=100.52$ $P<0.001$ | $F_{2,23}=107.81$ $P<0.001$ | $F_{2,23}=78$ $P<0.001$ | |

Table 10: Mean (\pm SE) of consumption index (mg/mg) of *Apis mellifera meda* adult workers on the 3rd, 6th, 9th, and 12th days, which were infected with different densities of *Varroa destructor* in the pupal stage. Means within each row (Bonferroni's post-hoc) bearing the same upper case letter, and means within each column (Tukey's post-hoc) bearing the same lower case letter, are not significantly different ($P>0.05$).

| | The age of adult bees | | | | |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| | 3 rd day | 6 th day | 9 th day | 12 th day | |
| No mites | 7.25 \pm 0.45 AaB | 6.92 \pm 0.34 AaBb | 7.4 \pm 0.38 Aa | 6 \pm 0.43 Ba | $F_{2.73,27.31}=3.9$, $P=0.02$ |
| One mite | 6.13 \pm 0.44 Aa | 5.45 \pm 0.59 Ab | 4.84 \pm 0.57 Ab | 4.8 \pm 0.58 Aa | $F_{2.21,19.92}=1.81$, $P=0.18$ |
| Two mites | 7.07 \pm 1.07 Aa | 7.9 \pm 0.88 Aa | 6.5 \pm 0.49 Aab | 5.45 \pm 0.74 Aa | $F_{2.18,8.73}=1.48$, $P=0.28$ |
| | $F_{2,23}=1.28$, $P=0.29$ | $F_{2,23}=4.51$, $P=0.02$ | $F_{2,23}=7.71$, $P=0.003$ | $F_{2,23}=1.46$, $P=0.25$ | |

Table 11: Mean (\pm SE) of growth rate (mg/mg/d) of *Apis mellifera meda* adult workers on the 3rd, 6th, 9th, and 12th days, which were infected with different densities of *Varroa destructor* in the pupal stage. Means within each row (Bonferroni's post-hoc) bearing the same upper case letter, and means within each column (Tukey's post-hoc) bearing the same lower case letter, are not significantly different ($P>0.05$).

| | The age of adult bees | | | |
|-----------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| | 6 th day | 9 th day | 12 th day | |
| No mite | 0.0065 \pm 0.0008 Bb | 0.0064 \pm 0.0007 Bb | 0.014 \pm 0.0022 Aa | $F_{1.34,13.49}=9.71$, $P=0.005$ |
| One mite | 0.012 \pm 0.0012 Aa | 0.012 \pm 0.0021 Aab | 0.013 \pm 0.0014 Aa | $F_{1.58,14.27}=0.36$, $P=0.65$ |
| Two mites | 0.0072 \pm 0.0018 Ab | 0.012 \pm 0.0013 Aa | 0.012 \pm 0.0026 Aa | $F_{1.16,4.63}=1.38$, $P=0.3$ |
| | $F_{2,23}=6.88$, $P=0.005$ | $F_{2,23}=4.15$, $P=0.03$ | $F_{2,23}=0.33$, $P=0.71$ | |

کنه، کاهش وزن حشرات کاملی است که در دوران شفیرگی به کنه واروا آلوده بوده‌اند (De Jong et al, 1982)، این کاهش وزن رابطه مستقیمی با تعداد کنه‌های موجود در حجره و همچنین نرخ تولید مثل آن‌ها دارد (Kotwal and Abrol, 2009). نتایج این پژوهش نیز با این گزارش‌ها همسو بود به طوری که با افزایش تراکم کنه در حجره شفیرگی به طور محسوسی از وزن تر و خشک حشرات کامل کاسته شد. سایر مطالعات انجام شده نشان داد که وجود حتی یک کنه در حجره شفیرگی موجب کاهش ۷ درصدی وزن حشرات کامل ظهور یافته می‌شود (Schatton-Gadelmayer and Engels, 1998). همچنین با افزایش تعداد کنه در هر حجره، کاهش بیش از ۱۰ درصدی وزن زنبورعسل در مرحله شفیرگی و بالغ مشاهده شده است (Gueler and Kaftanoglu, 1999). مطالعات De Jong و همکاران (۱۹۸۲) نشان داد که به ازای هر دو ساعت تغذیه کنه از همولنف شفیره، به میزان ۱ تا ۲ درصد از وزن حشرات کامل ظاهر شده کاسته خواهد شد. همچنین نتایج آن‌ها نشان داد که وزن حشرات کامل زنبورعسل آلوده به کنه واروا در مقایسه با وزن حشرات سالم ۶/۳ تا ۲۵ درصد کم‌تر بوده است که دلیل آن را می‌توان به کاهش میزان پروتئین موجود در همولنف لاروها نسبت داد. از طرفی، کنه‌های بالغ ماده موجود روی شفیره‌ها و حشرات کامل با تغذیه از همولنف میزبان، باعث کاهش طول عمر زنبورها و افزایش تعداد زنبوران ناقص‌الخلقه و ضعیف می‌شود که در نتیجه پرورش نوزادان در کندو کاهش یافته و کلنی مستعد ابتلا به بیماری‌های عفونی مختلف شده و در نتیجه کلنی ضعیف می‌گردد (De Jong et al, 1982). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزایش تراکم کنه در دوره شفیرگی، موجب مرگ و میر بیش‌تر حشرات کامل ظاهر شده و همچنین به وجود آمدن حشرات کامل کوچک‌تر ناقص‌الخلقه می‌گردد. همسو با این مطالعه، تحقیقات Ghasemi و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که بیش‌تر زنبورهای کاملی که در طی مراحل شفیرگی خود به کنه واروا آلوده بودند، ناهنجاری‌های ریخت‌شناختی مختلفی

نظر به عدم معنی‌داری اثرات متقابل تراکم کنه و سن زنبور روی وزن زنبورها و همچنین شاخص مصرف و نرخ رشد آن‌ها، تجزیه واریانس یک طرفه نشان داد که بین وزن تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود دارد، به طوری که با افزایش تراکم کنه در دوره شفیرگی از وزن حشرات کامل (به ترتیب برای شاهد و دو تیمار: ۹۰/۷، ۸۸/۳، ۶۰/۶ میلی‌گرم) کاسته شد ($F_{2,101} = 135/3$; $P < 0/001$). در خصوص شاخص مصرف مواد غذایی نیز تفاوت معنی‌داری دیده شد، به گونه‌ای که شاخص مصرف مواد غذایی زنبورهای فاقد کنه و زنبورهای حامل دو کنه در دوره شفیرگی (به ترتیب ۶/۹۰ و ۶/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌گرم) نسبت به زنبورهای دارای یک کنه (۵/۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌گرم) به نحو معنی‌داری بیش‌تر بود ($P < 0/001$); این در حالی است که نرخ رشد (به ترتیب برای شاهد و دو تیمار: ۰/۰۰۹، ۰/۰۱۲، ۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌گرم بر روز) دستخوش تغییر نشد و تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($F_{2,75} = 2/74$; $P = 0/1$).

در انتها با تشریح و اندازه‌گیری مساحت آسینی‌های غدد هیپوفارینژال در تیمارهای مختلف مشخص شد که با افزایش تراکم کنه، علی‌رغم سیر نزولی مساحت آسینی‌ها (به ترتیب برای شاهد و دو تیمار: ۴/۸۳۳، ۴/۷۶۰، ۴/۷۰۷ $\times 10^{-3}$ میلی‌متر مربع)، تفاوت معنی‌داری بین تیمارها وجود نداشت ($F_{2,257} = 0/5$; $P = 0/6$).

بحث

کنه واروا در کلنی‌های زنبورعسل در حجره‌های شفیرگی زاد و ولد کرده و با تغذیه از همولنف و بافت چربی لاروها، شفیره‌ها و حشرات کامل به ترتیب در دوران مسافری (Phoretic) و تولیدمثلی خود، باعث ایجاد اختلالات فیزیولوژیکی در حشره میزبان می‌شود (Donze et al, 1998)، از طرفی این کنه با انتقال عوامل بیماری‌زای مختلف به خصوص ویروس‌ها، اثرات مخرب قابل توجهی روی زنبورعسل ایجاد می‌کند (De Jong et al, 1982; Baily and Ball, 1991). یکی از مهم‌ترین اثرات مخرب

توسط کنه‌ها به زنبور عسل منتقل می‌شوند را در نظر گرفت (Liu, 1996; Shabanov, 1984). از دیگر اثرات کنه واروآ بر فیزیولوژی زنبور عسل می‌توان آسیب به اجسام چربی و همچنین کاهش رشد غدد هیپوفارینژال در زنبورهای آلوده اشاره کرد (Schatton-Gademayer and Engels, 1998). در مطالعه حاضر نیز با افزایش تراکم کنه در حجره شفیرگی، علی‌رغم وجود روندی کاهشی، اختلاف معنی‌داری در مساحت آسینی‌های حشرات کامل دیده نشد که علت آن ممکن است به دلیل متفاوت بودن نژاد زنبور عسل مورد بررسی باشد.

ارتباط بین تغذیه و رشد در همه موجودات به خصوص زنبورهای عسل، به طرز چشم‌گیری به سلامت زنبورها وابسته است. نتایج مطالعه حاضر در خصوص میزان تغذیه حشرات کامل آلوده به تراکم‌های مختلف کنه واروآ در دوره شفیرگی نشان داد که با افزایش تراکم کنه میزان تغذیه از شربت و آب کاهش پیدا کرد، اما علی‌رغم این که از گرده غنی به عنوان یکی از عوامل مؤثر در مقاومت زنبور در برابر کنه یاد شده (Dolezal et al, 2016)، تفاوت معنی‌داری در مصرف گرده بین تیمارها مشاهده نشد. مطالعات قبلی نشان داده که شفیره‌های آلوده به کنه و حشرات کامل ظاهر شده، دارای سطح پایین‌تری از پروتئین و سطح بالاتری از اسید آمینه آزاد نسبت به شفیره‌ها و حشرات کامل غیرآلوده می‌باشند، چرا که فرآیند تولید پروتئین‌های مورد نیاز جهت هضم غذا و رشد در زنبورهای آلوده کند و یا به کلی متوقف می‌شود (Aronstein et al, 2012). مطابق با نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد که حشرات کامل برای جبران کمبود پروتئین ناشی از تغذیه کنه در دوره شفیرگی، تغییری در میزان مصرف گرده از خود نشان ندادند. از طرفی ویروس‌هایی که از طریق کنه واروآ به زنبور منتقل می‌شوند نیز می‌توانند در کاهش تغذیه زنبور مؤثر باشند. Chen و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که برخی از این ویروس‌ها از راه روده به میزبان خود نفوذ کرده و موجب اختلال در فیزیولوژی روده، هضم و یا جذب مواد مغذی می‌شوند. با این حال، تا کنون مطالعات نسبتاً کمی در خصوص

مانند فتیله شدن بال‌ها، کوتاه شدن شکم و تیره شدن رنگ بدن را به همراه داشتند. همچنین مشخص شده که با افزایش تراکم کنه در زمان شفیرگی، محتوای آب بدن زنبور کامل ظهور یافته به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد به گونه‌ای که به ازای وجود هر کنه در حجره شفیرگی، به میزان ۳ درصد از آب بدن حشرات کامل ظهور یافته کاسته خواهد شد (Bowen-Walker and Gunn, 2001). این محققین نشان دادند که غلظت پروتئین موجود در سر و شکم و همچنین میزان کربوهیدرات موجود در شکم زنبورهای کامل آلوده به کنه در زمان شفیرگی به میزان قابل توجهی کم‌تر از زنبورهای سالم بود که این امر موجب افزایش مرگ و میر در حشرات کامل آلوده می‌شد. در اثر تغذیه کنه واروآ و تغییرات ظاهری ایجاد شده در حشرات کامل زنبور عسل شامل بال‌های ناقص، شکم کوتاه شده و کاهش وزن بدن دیده شده (De Jong et al, 1982) و در نهایت موجب مرگ کلنی طی ۳ الی ۵ سال پس از شروع آلودگی می‌شود (Korpela et al, 1992). Daly و همکاران (۱۹۸۸) معتقدند که این تغییرات ظاهری به دلیل کاهش فشار هیرواستاتیکی در طی رشد شفیره و کاهش میزان پروتئین‌های لازم جهت رشد طبیعی حشره ایجاد می‌شوند. با افزایش تراکم کنه در کلنی، احتمال ظهور ناهنجاری‌های ظاهری در کلنی افزایش می‌یابد (De Jong et al, 1982). مطالعات Marcangeli و همکاران (۱۹۹۲) نشان داد که حشرات کامل ظهور یافته از شفیره‌های آلوده به تعداد بسیار کم کنه واروآ نیز مانند حشرات کامل ظهور یافته از شفیره‌های شدیداً آلوده، دارای نواقص ظاهری فراوانی هستند. از طرفی آن‌ها در مواردی مشاهده کردند که برخی از حشرات کامل حاصله از شفیره‌های شدیداً آلوده هیچ گونه علائمی از بدشکلی از خود نشان نمی‌دهند. این گزارش‌ها نشان می‌دهد که تنها تعداد کنه موجود در طول دوره شفیرگی زنبورها نمی‌تواند دلیلی برای بدشکلی‌های ظاهری حشرات کامل باشد و باید دلایل احتمالی دیگر مانند مقاومت زنبورها به کنه (Rosenkranz et al, 2010) و همچنین نقش و فعالیت میکروارگانیزم‌های بیماری‌زایی که

ایرانی اصلاح شده زنبورهای عسل، مقاوم در برابر کنه واروا استفاده نمود. از طرفی پیشنهاد می‌شود در مبارزه با این کنه، تغذیه مصنوعی کلنی توسط مکمل‌ها مخصوصا مکمل‌های حاوی گرده طبیعی و ویتامین‌ها که تأثیر به سزایی در افزایش مقاومت زنبور عسل دارند را مد نظر قرار داد. زیرا این مکمل‌ها باعث افزایش تخم‌ریزی ملکه، جمعیت کلنی و همچنین افزایش زنبورهای چراگر می‌شود که در پی آن میزان شهد و گرده طبیعی موجود در کندو افزایش پیدا می‌کند. افزایش این فرآورده‌ها می‌تواند زنبور را از عوامل تنش‌زای محیطی مانند عوامل بیماری‌زا محافظت کند.

پیامدهای فیزیولوژیکی عفونت‌های ویروسی در زنبورهای عسل صورت گرفته است و هنوز مکانیسم عمل کنه-ویروس بر کاهش تغذیه زنبور عسل کاملا روشن نشده است (Janmaat and Winston, 2000). اما بررسی مطالعات انجام شده تا امروز حاکی از آن است که بیش‌تر عوامل بیماری‌زا و آفات مهم زنبور عسل می‌توانند تأثیرات منفی بر تغذیه زنبور داشته باشند (Chen et al, 2014). در کل با توجه به نتایج این پژوهش مبنی بر خسارت جبران-ناپذیر کنه واروا و همچنین از بین رفتن تعداد زیادی از کلنی‌های زنبور عسل ایرانی در اثر آلودگی به کنه واروا در کشور و محدودیت در استفاده از کنه‌کش‌ها، پیشنهاد می‌شود از روش‌های مؤثر پیش‌گیری مانند استفاده از نژاد

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت آقای مهندس رکنی و آقای عباسی‌مقدم جهت تأمین قسمتی از کندوهای مورد نیاز برای انجام آزمایش‌های این مقاله قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی ندارند.

منابع مالی

این پژوهش با استفاده از اعتبار تحقیقاتی شماره SCU.AP.1401.437 معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شد.

منابع

- Annoscia, D., Del Piccolo, F., & Nazzi, F. (2012). How does the mite *Varroa destructor* kill the honeybee *Apis mellifera*? Alteration of cuticular hydrocarbons and water loss in infested honeybees. *Journal of Insect Physiology*, 58, 1548-1555.
- Aronstein, K. A., Saldivar, E., Vega, R., Westmiller, S., & Douglas, A. E. (2012). How *Varroa* Parasitism Affects the Immunological and Nutritional Status of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Insects*, 3, 601-615.
- Bailey, L., & Ball, B. V. (1991). *Honey Bee Pathology*. London, United Kingdom: Academic Press.
- Boecking, O., & Spivak, M. (1999). Behavioral defenses of honey bee against *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apidologie*, 30, 141-158.
- Bowen-Walker, P. L., & Gunn, A. (2001). The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 101, 207-217.
- Bowen-Walker, P. L., Martin, S. J., & Gunn, A. (1999). The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis mellifera* L.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73, 101-106.

- Braulio, S. F., Dias, A., Raw, V., & Imperatri – Fonseca, L. (1999). *The Sãopaulo declaration on pollinators*. Report on the recommendations of the workshop on the conservation and sustainable use of pollinators in agriculture with emphasis on bee. Brazilian Ministry of the Environment.
- Chen, Y. P., Pettis, J. S., Corona, M., Chen, W. P., Li, C. J., Spivak, M., Visscher, P. K., DeGrandi-Hoffman, G., Boncristiani, H., Zhao, Y., Delaplane, D., Solter, K., Drummond, L., Kramer, F., Lipkin, M., Palacios, W. I., Hamilton, G., Smith, M. C., Huang, B., Zheng, S. K., Li, H. Q., Zhang, J. L., Zhou, X., Wu, A. F., Zhou, L. Y., Lee, J. Z., Teixeira, M. L., Li, E. W., & Evans, Z. G. (2014). Israeli acute paralysis virus: epidemiology, pathogenesis and implications for honey bee health. *Plos Pathogens*, 10(7), e1004261.
- Coby, S. (2009). The new world carniolan program. *Journal of the Beekeepers Quarterly*, 2, 1-6.
- Dafni, A. (1992). *Pollination ecology: a practical approach*. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.
- Daly, H. V., De Jong, D., & Stone, N. D. (1988). Effect of parasitism by *Varroa jacobsoni* on morphometrics of Africanized worker honeybees. *Journal of Apiculture Research*, 27(2), 126-130.
- De Jong, D., De Jong, P. H., & Goncalves, L. S. (1982). Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa Jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, 21(3), 165-167.
- DeGrandi-Hofman, G., & Curry, R. (2004). A mathematical model of Varroa mite (*Varroa destructor* Anderson and Trueman) and honeybee (*Apis mellifera* L.) population dynamics. *International Journal of Acarology*, 30, 259-274.
- Dolezal, A. G., Carrillo-Tripp, J., Miller, W. A., Bonning, B. C., Toth, A. L. (2016). Intensively cultivated landscape and *Varroa* mite infestation are associated with reduced honey bee nutritional state. *Plos One*. 11(4), e0153531.
- Donze, G., Fluri, P., & Imdorf, A. (1998). A look under the cap: The reproductive behavior of Varroa in the capped brood of the honey bee. *American Bee Journal*, 138, 528-533.
- Ebadi, R., & Ahmadi, A. (2004). *Honey bee culture*. Isfahan, Iran: Arkane Danesh Press.
- Frey, E., & Rosenkranz, P. (2014). Autumn invasion rates of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) into honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies and the resulting increase in mite populations. *Journal of Economic Entomology*, 107, 508-515.
- Ghasemi, v., Tahmasbi, G. H., & Khoshnood-Yazdi, A. (2011). Effect of *Varroa destructor* on physical, physiological and biological parameters of european honey bee, *Apis mellifera*. *Iranian Honey Bee Science and Technology*, 2 (5), 16-23.
- Gueler, A., & Kaftanoglu, O. (1999). Determination of performances of some important races and ecotypes of Turkish honeybees (*Apis mellifera* L.) under migratory beekeeping conditions. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 23, 577-581.
- Janmaat, A. F., & Winston. M. L. (2000). Removal of *Varroa jacobsoni* infested brood in honey bee colonies with differing pollen stores. *Apidologie*, 31, 377-385.
- Korpela, S., Aarhus, A., Fries, I., & Hansen, H. (1992). *Varroa jacobsoni* Oud. In cold climates: Population growth, winter mortality and influence on the survival of honey bee colonies. *Journal of Apiculture Research*, 31(3), 157-164.
- Kotwal, S., & Abrol, D. P. (2009). Impact of *Varroa destructor* infestation on the body weight of developing honey bee brood and emerging adults. *Pakistan Entomologist*, 31(1), 67-71.
- Kralj, J., & Fosch, S. (2006). Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. *Apidologie*, 37, 577-587.
- Liu, T. P. (1996). Varroa mites as carriers of honeybee chalk brood. *American Bee Journal*, 136(9), 655.
- Marcangeli, J., Monetti, L., & Fernandez, N. (1992). Malformations produced by *Varroa jacobsoni* on *Apis mellifera* in the province of Buenos Aires, Argentina. *Apidologie*, 23, 399-402.
- Mondet, F., de Miranda, J. R., Kretzschmar, A., Le Conte, Y., & Mercer, A. R. (2014). On the front line: Quantitative virus dynamics in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies along a new expansion front of the parasite *Varroa destructor*. *Plos Pathogens*. 10, e1004323.
- Mossadegh, M. S., & Komeili-Birjandi, E. (1991) *Mites of honey bees* (3rd ed.), Ahvaz, Iran: Shahid Chamran University publisher.
- Nabhan, G. P. (1996). *Pollinator redbook: Global list of treated vertebrate wildlife species serving as pollinators for crops and wild plants*. Arizona-Sonora desert museum and forgotten pollinators campaign monographs. Tucson, Arizona, 3 (1) 235-242.

- Otterstatter, M. C., Gegear, R. J., Colla, S. R., & Thomson, J. D. (2005). Effect of parasitic mite and protozoa on flower constancy and foraging rate of bumble bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 58, 383-389.
- Perez-Sato, J. A., Chaline, N., Martin, S. J., Hughes, W. H. O., & Ratnieks, F. L.W. (2009). Multi-level selection for hygienic behaviour in honey bees. *Journal of Heredity*, 102, 609-615.
- Pimentel, D., Wilson, C., McCullum, C., Huang, R., Dwen, P., Flack, J., Tran, Q., Saltman, T., & Cliff, B. (1997). Economics and environmental benefits of biodiversity. *Bioscience*, 47 (11), 747-757.
- Pritchard, D. J. (2016). Grooming by honey bees as a component of varroa resistant behavior. *Journal of Apicultural Research*, 55(1), 38-48.
- Rasekh, A., & Osawa, N. (2020). Direct and indirect effect of cannibalism and intraguild predation in the two sibling Harmonia ladybird beetles. *Ecology and Evolution*, 10(12), 5899-5912.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 96-119.
- Schatton-Gadelmayer, K., & Engels, W. (1988). Blood proteins and body weights of newly-emerged worker honeybees with different levels of parasitization of brood mites. *Entomologia Generalis*, 14, 93-101.
- Shabanov, M. (1984). Role of *Varroa jacobsoni* Oud. in the bee family as a carrier of microorganisms. *Acta microbiologica Bulgarica*, 15, 78-82.
- Sigel, A. J., Freedman, C., & Page Jr, R. (2012). Ovarian Control of Nectar Collection in the Honey Bee (*Apis mellifera*). *Plos One*, 7(4), e33465.
- SPSS. (1998). *SPSS 8.0 for Windows*. New Jersey, USA: Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Tahmasbi, Z., Tahmasbi, G. H., Osfoori, R., Ebrahimi, Ma., & Babaei, M. (2013). Foraging and pollen gathering behavior of worker bees in high and low honey production colonies of Iranian honeybee (*Apis mellifera meda*). *Journal of Animal Science Research*, 23(2), 61-72. (In Persian).
- Tu, S., Qiu, X., Cao, L., Han, R., Zhang, Y., & Liu, X. (2010). Expression and characterization of the chitinases from *Serratia marcescens* GEI strain for the control of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. *Journal of Invertebrate Pathology*, 104(2), 75-82.
- Yang, X., & Cox-Foster, D. L. (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Journal of Proceeding National Academy Sciences United States of American*, 102(11), 7470-7475.

Received: 08.07.2023

Accepted: 26.11.2023

تأثیر فرمولاسیون (قطر ذرات) واکسن غیرفعال دوگانه (AI+ND) بر پایداری و ایمنی زایی آن در جوجه‌های SPF و گوشتی

محمد عباس نیا^{۱*}، علی شیرازی نژاد^۲، نادر قلعه‌گلاب بهبهان^۳، منصور میاحی^۴ و سیدسبحان عمادی‌جمالی^۱

^۱ دانش‌آموخته بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

^۲ دانش‌آموخته میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

^۳ استادیار گروه بیماری‌های طیور مؤسسه تحقیقات سرم و واکسن‌سازی رازی، شعبه شیراز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

^۴ استاد گروه بهداشت دام، طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۶

چکیده

روغن‌های معدنی متداول‌ترین اجزای هستند که در ساخت واکسن‌های بر پایه امولسیون آب در روغن برای ایجاد پاسخ مناسب و طولانی آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن واکسن در پرندگان استفاده می‌شوند. خصوصیات ساختاری واکسن از قبیل اندازه ذرات و فرمولاسیون آن بر پایداری و ایمنی‌زایی نیازمند بررسی و اطلاعات بیشتری است تا تولیدکنندگان واکسن بتوانند محصولات خود را طبق شیوه‌های کارآمدتری تولید کنند. در این مطالعه، تأثیر قطر ذرات واکسن امولسیون آب در روغن بر دو عامل پایداری و ایمنی‌زایی، مورد بررسی قرار گرفت. امولسیون‌های مختلفی از واکسن بر اساس زمان‌های مختلف هموزنی‌سازی توسط آنتی‌ژن‌های ویروس آنفلوانزا H9N2 و ویروس نیوکاسل V4 تکثیر شده در تخم‌مرغ جنین‌دار ۹ روزه و اجزای مختلف ساخته شد. سه واکسن فرموله شده (واکسن‌های A، B و C به ترتیب ۳، ۶ و ۱۲ دقیقه هموزن کردن) به همراه دو نمونه خارجی (واکسن‌های D و E به ترتیب واکسن‌های دوگانه کشته آنفلوانزا-نیوکاسل شرکت ایزو و سوا) متداول در بازار در جوجه‌های عاری از بیماری خاص (SPF) و جوجه گوشتی از جهت میزان و مدت تولید آنتی‌بادی، مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان دوز تزریقی واکسن‌ها، ۰/۲ میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ بعد از واکسیناسیون، میزان عیار آنتی‌بادی توسط مهار هم‌آگلوتیناسیون (HI) سنجش شد میزان آنتی‌بادی ضد ویروس نیوکاسل در جوجه‌های SPF، در واکسن‌های B و C در روزهای ۷ و ۲۱ بعد از واکسیناسیون از سایر گروه‌ها به صورت معنی‌داری بیشتر بود. اما تفاوت معنی‌داری بین سایر گروه‌ها مشاهده نشد. میزان آنتی‌بادی ضد ویروس نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی در گروه‌های B و C در روز ۷ و ۲۱ و در گروه E در روز ۲۱ به صورت معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها بود. میزان آنتی‌بادی سرم علیه ویروس آنفلوانزا جوجه‌های SPF در گروه C، نسبت به سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری، بیشتر بود. میزان تیتر آنتی‌بادی (آنفلوانزا) در روزهای ۷ و ۱۴ بعد از واکسیناسیون، به جز گروه D، در سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت. میزان ایمنی‌زایی واکسن در زمان‌های بیشتر هموزنی‌سازی، بالاتر بود. بر اساس داده‌های حاصل، افزایش زمان هموزنی‌سازی، ذرات امولسیون با قطر کوچک‌تری تولید می‌کند که در تولید سریع‌تر آنتی‌بادی، مؤثر است. قطر کوچک‌تر ذرات واکسن باعث پاسخ سریع و مناسب سیستم ایمنی می‌شود که میزان ایمنی‌زایی در جوجه‌های SPF و گوشتی را افزایش می‌دهد.

کلمات کلیدی: قطر ذرات، اجزای، آب در روغن، ایمنی‌زایی، واکسن غیرفعال

مقدمه

در ایران به خصوص در سال‌های اخیر بیماری آنفلوانزا عفونت‌های دستگاه تنفسی و کاهش تولید تخم‌مرغ در ناشی از H9N2، به عنوان عامل اولیه یا ثانویه در ایجاد پرنده‌گان مطرح است. عامل این بیماری سبب توقف

* نویسنده مسئول: محمد عباس نیا، متخصص بیماری‌های طیور، گروه بیماری‌های طیور مؤسسه تحقیقات سرم و واکسن‌سازی رازی، شعبه شیراز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

E-mail: Abasnia2011@gmail.com



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

ایجاد می‌کنند (Zhao et al, 2020). انتخاب وپروس برای ساخت واکسن باید به شکلی باشد که بتواند به خوبی در تخم مرغ جنین‌دار رشد کرده و آنتی‌ژن کافی تولید کند. این نوع واکسن را به وسیله تزریق داخل عضلانی یا زیر جلدی به کار می‌برند. استفاده از این واکسن به خصوص در گله‌هایی که عوارض تنفسی داشته‌اند، مؤثر است و خسارات حاصل از آن را کم کرده و ایمنی یکتواخت‌تری در گله فراهم می‌کند (Alexander, 2003). بر اساس مطالعات گذشته، قطر ذرات واکسن با اندازه ۱۰۰-۲۰۰ نانومتر، به طور مؤثری توسط سلول‌های دندریتیک جذب شده و سیستم ایمنی را تحریک می‌کند (Ott et al, 1995). بر اساس نتایج بررسی Iyer و همکاران (۲۰۱۵) روی فرمولاسیون و قطر ذرات اجوانت امولسیون روغن در آب، هرچقدر قطر ذرات کوچک‌تر (۸۰ نانومتر) باشد، میزان ایمنی‌زایی آن بیشتر است. تاکنون بررسی دقیقی بر روی فرمولاسیون و قطر ذرات اجوانت امولسیون آب در روغن که پایه تولید واکسن‌های غیرفعال پرندگان در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز به شمار می‌رود، صورت نگرفته است. این مطالعه به منظور تأثیر قطر ذرات و زمان مناسب هم‌وزن‌نیزاسیون بر افزایش ایمنی واکسن غیرفعال دوگانه *آنفلوانزا H9N2* و نیوکاسل انجام گرفت.

مواد و روش کار

از جدایه‌های مورد استفاده در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز جهت تولید واکسن غیرفعال دوگانه وپروس نیوکاسل *V4* و *آنفلوانزا H9N2* در این مطالعه استفاده شد. دو میلی‌لیتر مایع آلتوییک حاوی هر وپروس (هر کدام به صورت مجزا) با یک میلی‌لیتر آنتی-بیوتیک حاوی پنی‌سیلین-استرپتومایسین (۳۰۰۰ واحد پنی‌سیلین + ۳۰۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین در یک میلی-لیتر) مخلوط گردید و پس از آماده‌سازی، هر کدام از وپروس‌ها با تیتراژ ۱۱ واحد هم‌اگلوتیناسیون به صورت مجزا در تخم مرغ جنین‌دار ۹ روزه تلقیح شد و پس از نگهداری

حرکت مژه‌ای و تخریب بافت پوششی مخاط تنفسی می‌شود (Abbasnia et al, 2020). این عامل بیماری‌زا همراه با سایر عوامل پاتوژن نظیر باکتری‌های *اشریشیا کلای*، *مایکوپلاسما* فرصت ایجاد کمپلکس‌های تنفسی را فراهم نموده و در نتیجه منجر به افزایش سطح تلفات در گله‌های گوشتی می‌شود (Jackwood and Wit, 2020). علی‌رغم بیماری‌زایی پایین وپروس *آنفلوانزا H9N2* شیوع آن در خاورمیانه، منجر به خسارات اقتصادی زیادی به صنعت طیور شده است که خسارت حاصله را می‌توان به عفونت‌های ثانویه متعاقب ابتلا به آن، نسبت داد (Peacock et al, 2019). در بسیاری از کشورها از جمله ایران، که وپروس *آنفلوانزا H9N2* به صورت اندمیک درآمده است، از واکسیناسیون به عنوان ابزاری جهت کاهش خسارات ناشی از بیماری استفاده می‌شود (Chio et al, 2008) اما علی‌رغم واکسیناسیون گسترده، تداوم تلفات به دنبال ابتلا به این بیماری گزارش شده است (Hassan et al, 2017).

بیماری نیوکاسل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های وپروسی پرندگان در سراسر دنیا می‌باشد. عامل این بیماری در بین گونه‌های مختلف پرندگان اهلی، وحشی، آبی و مهاجر در دنیا ایجاد بیماری می‌نماید (Mayahi et al, 2015). ژنوم وپروس به صورت خطی پوشش‌دار و از RNA تک رشته-ای با سنس منفی تشکیل شده است (Shengqing et al, 2002). واکسیناسیون مؤثر یکی از مؤثرترین روش‌های پیش‌گیری از این بیماری و ابزاری قدرتمند برای کمک به رشد اقتصادی به شمار می‌رود (Teresa et al, 2021; Fenner, 1993). واکسن‌ها عمدتاً به صورت پاتوژن ضعیف شده و یا غیرفعال هستند (Vogel, 2009). واکسن‌های غیرفعال و کشته از کشت وپروس در جنین تخم مرغ و یا کشت غیرفعال بافت تهیه می‌شوند؛ سپس با موادی مثل فرمالدئید و یا بتا پروپیولاکتون غیرفعال می‌شوند و برای طولانی کردن اثر ایمنی‌بخشی همراه با مواد دیرجذب مثل هیدروکسید آلومینیوم و یا روغن‌های معدنی به کار می‌روند. استفاده از آجوانت‌ها با خاصیت ایمنی‌زایی که دارند، میزان مصرف واکسن را کاهش داده و محافظت ایمنی بهتری

فرمولاسیون رایج در شعبه شیراز، واکسن روغنی با نسبت ۳۰:۷۰ آنتی‌ژن به روغن مونتانااید به سه روش توسط دستگاه هموژنایزر ساخته شد و دو واکسن نمونه خارجی نیز برای ارزیابی مقایسه‌ای انتخاب گردید (Table 1). در واکسن A سه دقیقه هموژنیزاسیون به صورتی که با توالی یک دقیقه هموژن و سپس ۳۰ ثانیه استراحت صورت گرفت. هموژنیزاسیون واکسن‌های B و C نیز به ترتیب با ۶ دقیقه هموژن کردن (با توالی ۲ دقیقه هموژن کردن و ۳۰ ثانیه استراحت) و ۱۲ دقیقه هموژن کردن (با توالی ۴ دقیقه هموژن کردن و ۳۰ ثانیه استراحت) صورت گرفت. در هر دز واکسن میزان EID_{50} $10^{8.6}$ و $10^{7.8}$ و $V4$ و $10^{7.8}$ و EID_{50} آنفلوانزا $H9N2$ وجود دارد.

تخم مرغ‌ها در دمای ۳۶/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، از دستگاه انکوباتور خارج و پس از سرد کردن، مایع آلانتوئیک آن‌ها برداشت شد. جهت تأیید حضور ویروس آنفلوانزا و نیوکاسل از روش آگلوتیناسیون سریع استفاده شد. آنتی‌ژن‌ها توسط فرمالین ۳۷ درصد با میزان ۰/۲ درصد و در گرمخانه ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت، غیرفعال شد. جهت اطمینان از غیرفعال شدن ویروس، سه پاساژ متوالی در تخم مرغ جنین‌دار ۹ روزه انجام شد و پس از تأیید نهایی غیرفعال شدن ویروس، برای ساخت واکسن استفاده شد. تیتراژ مایع استحصال شده برای ساخت واکسن قبل از فرمولاسیون سنجش و ۱۱ واحد هماگلوتینین برای ویروس نیوکاسل و آنفلوانزا ثبت گردید. بر اساس

Table 1: Experimental formulated vaccines

| Vaccine ¹ | Homogenization time |
|----------------------|--|
| A | 3 minute with 12000 RPM/min speed |
| B | 6 minute with 12000 RPM/min speed |
| C | 12 minute with 12000 RPM/min speed |
| D | Killed bivalent Newcastle-Influenza vaccine (Izovac ND-FLU) [®] |
| E | Killed bivalent Newcastle-Influenza vaccine (CEVAC [®] NEW FLU H9 K) [®] |

¹- Vaccine name and group is same

طرح آزمایش

سن ۹ روزگی پرورش و به ۶ گروه مجزا و هر گروه ۱۰ جوجه، تقسیم شدند. واکسیناسیون به صورت متداول پرورش در مزرعه، در سن ۹ روزگی صورت گرفت. به جوجه‌های گروه شاهد (F) در این آزمون نیز، PBS استریل به روش زیر پوستی تزریق گردید. تست‌های کنترل کیفی واکسن از قبیل تست پایداری، ویسکوزیته واکسن و استریلیتی طبق پروتکل‌های رایج شعبه رازی شیراز، انجام شد. تست پایداری با قرار دادن فالکون حاوی ۱۵ میلی‌لیتر واکسن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ماه انجام می‌شود و حفظ ساختار واکسن و عدم دو فازی شدن و جدا نشدن فاز آبی از روغن شرط تأیید صحت پایداری واکسن خواهد بود. تست استریلیتی واکسن با فیلتراسیون واکسن از فیلترهای سلولزی

واکسن‌های انتخاب شده جهت ارزیابی در جوجه SPF و گوشتی تجاری سویه راس در دو فاز مجزا انجام گردید. در فاز اول مطالعه، ۱۰۰ عدد تخم مرغ SPF در انکوباتور قرار داده شد و جوجه‌های تفریخ شده از تخم به سالن‌های پرورش منتقل گردید. جوجه‌ها تا سن ۹ روزگی پرورش یافته و به طور کاملاً تصادفی به ۶ گروه مجزا و هر گروه ۱۰ جوجه، تقسیم‌بندی شده و هر گروه، واکسن مربوط به خود را به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر دریافت نمود. به جوجه‌های گروه شاهد (F)، PBS استریل به روش زیر پوستی تزریق گردید. جهت انجام مرحله دوم، تعداد ۶۰ قطعه جوجه یک روزه گوشتی (مخلوط از هر دو جنس) از سویه راس خریداری و به مؤسسه رازی شعبه شیراز منتقل گردید و تا

نتایج

آزمون پایداری، استریلیتی و ویسکوزیته

واکسن از نظر پایداری بررسی و پس از مطلوب بودن نتایج، برای کارآزمایی بالینی استفاده شد. تست استریلیتی واکسن‌های تهیه شده نیز در محیط آگار خونی، براس و سابورو دکستروز آگار بررسی شد و در تمام محیط کشت‌ها در زمان‌های ذکر شده، هیچ‌گونه ارگانسمی رشد نکرد. میزان ویسکوزیته واکسن‌های A، B و C به ترتیب ۲۳/۵، ۲۳/۴ و ۲۳/۲ بود و در واکسن D و E نیز ۳۲/۲ و ۳۲/۳ ثبت شد. در Figure 1-5، سنجش قطر و پراکندگی ذرات واکسن در هر ۵ گروه واکسن توسط دستگاه DLS ارایه شده است. میزان قطر ذرات با افزایش زمان هموژنیزاسیون کاهش می‌یابد به طوری که در واکسن B و C، که زمان هموژن کردن به ترتیب ۲ و ۳ برابر واکسن A است، قطر ذرات به طور میانگین کمتر از ۱۰۰ نانومتر است در حالی که در واکسن A و واکسن‌های خارجی (گروه D و E) ذرات واکسن به طور میانگین بالای ۱۰۰ نانومتر بوده و گاهی قطر ذرات تا ۵۰۰ نانومتر نیز می‌رسد.

و کشت در محیط آگار خونی (۷۲ ساعت)، براس (۱۴ روز) و سابورو دکستروز آگار، رشد باکتری و قارچ‌ها ارزیابی می‌گردد. سنجش قطر و پراکندگی ذرات واکسن در هر ۵ گروه واکسن توسط دستگاه آنالیزور اندازه نانوذرات (NANOTRAC WAVE II، ساخت کشور ایالات متحده آمریکا) DLS اندازه‌گیری شد (Figure 1-5). میزان ویسکوزیته توسط دستگاه Brook Field DV-II+por ساخت کشور ایالات متحده آمریکا و بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام شد.

در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ بعد از واکسیناسیون، تعداد ۵ قطعه جوجه از هر گروه آزمایشی، از ورید بال خون‌گیری شدند. به منظور حذف تأثیر جنس بر پاسخ ایمنی (Leitner et al, 1989)، در هر مرحله از نمونه‌گیری تعداد مساوی از هر دو جنس (بر اساس خصوصیات ظاهری) انتخاب شدند. سرم‌های حاصله با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس سرم‌های شفاف و عاری از هرگونه گلبول قرمز در درون میکروتیوب تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

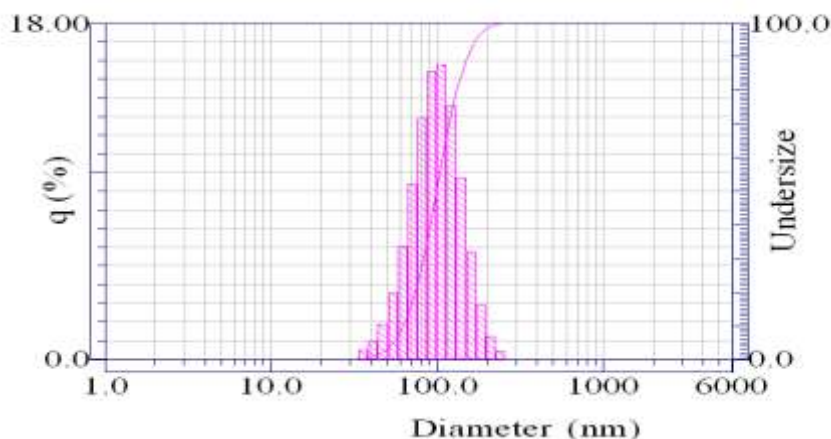


Figure 1: Analyzing Real Particle Size Distributions of vaccine A.

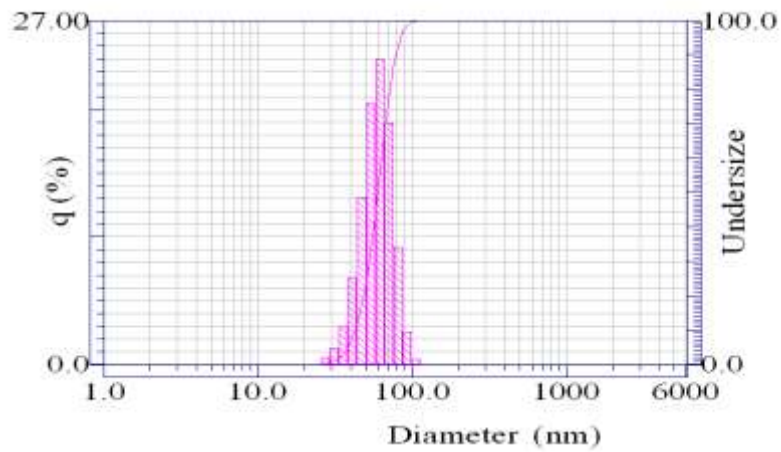


Figure 2: Analyzing Real Particle Size Distributions of vaccine B by DLS.

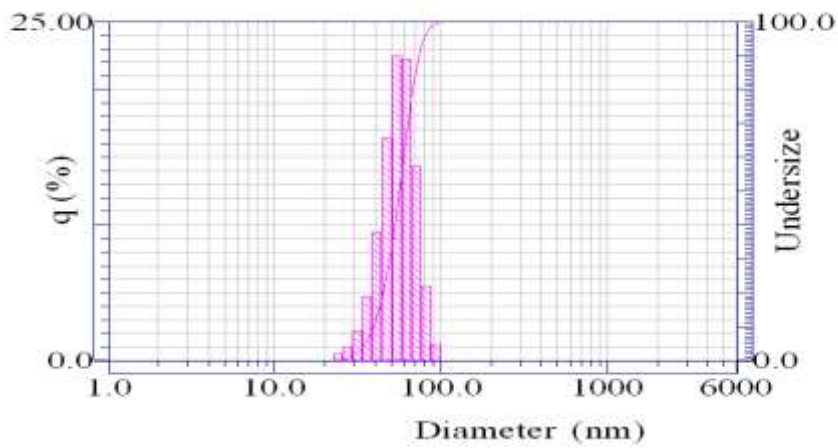


Figure 3: Analyzing Real Particle Size Distributions of vaccine C by DLS.

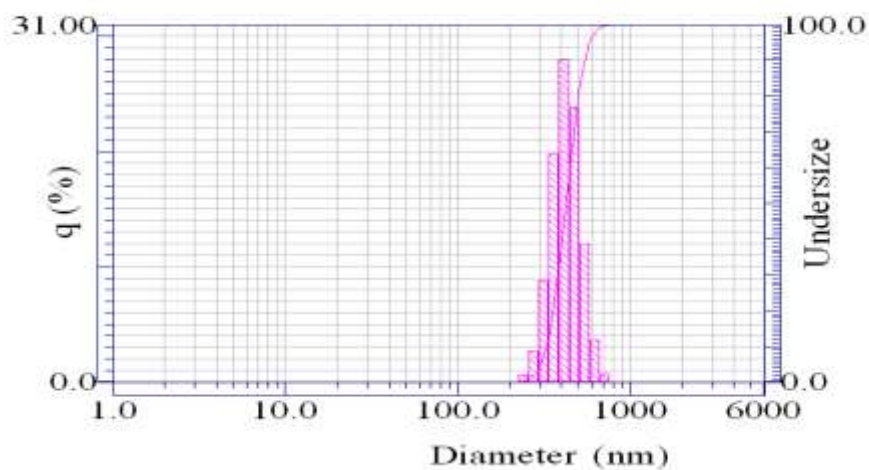


Figure 4: Analyzing Real Particle Size Distributions of vaccine D by DLS.

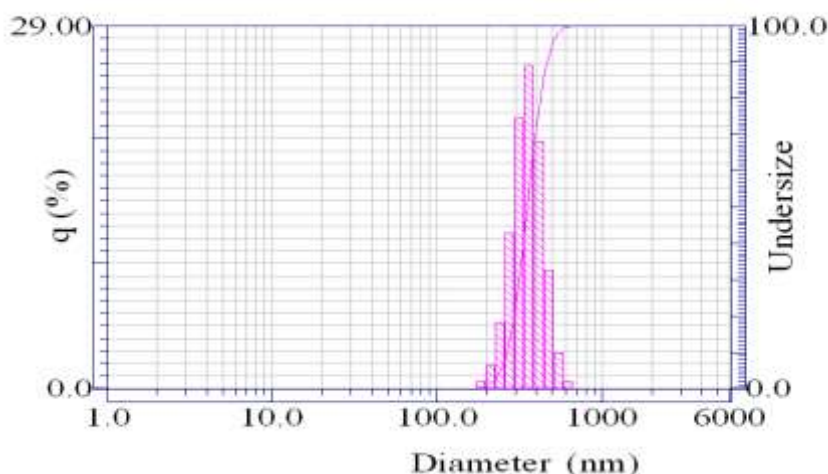


Figure 5: Analyzing Real Particle Size Distributions of vaccine E by DLS.

واکسیناسیون به طور معنی داری کم تر از سایر گروه ها بود ($P < 0.05$). میزان تیتر پادتن ضد هر دو ویروس در روزهای بعد از واکسیناسیون به صورت معنی داری افزایش یافت (Table 2). بیشترین میزان افزایش تیتر پادتن نیوکاسل در گروه B و C مشاهده شد که به طور معنی داری از گروه A و D بیش تر بود ($P < 0.05$). میزان تیتر پادتن ضد آنفلوانزا حاصل از گروه D در روز ۲۱ بعد از واکسیناسیون، بطور قابل توجهی کم تر از سایر گروه ها بود ($P < 0.05$). میزان تیتر پادتن در گروه شاهد (F) در طول آزمایش ثابت و هیچ گونه افزایشی نداشت (Table 2).

عیار پادتن ممانعت کننده از هماگلوتیناسیون (HI) سرم خون سطح پادتن ممانعت کننده هماگلوتیناسیون در گروه های مختلف آزمایشی جوجه های SPF و گوشتی به ترتیب در Table 2 & 3 ذکر شده است. سطح پادتن سرم در جوجه های SPF گروه C در طول آزمایش روند صعودی داشت و در مقایسه با سایر گروه ها در روز ۲۱ بعد از واکسیناسیون به بالاترین میزان خود رسید ($P < 0.05$). پادتن های سرم حاصل از واکسن های تزریقی در سنین ۱۴ و ۲۱ بعد از واکسیناسیون در گروه B و C، به طور معنی داری بیش تر از سایر گروه ها بود ($P < 0.05$). عیار سرم خون جوجه های گروه E در روز ۱۴ و ۲۱ بعد از

Table 2: Mean \pm SD of AI and ND HI titers of SPF chickens on days post vaccination.

| Groups | Days post vaccination | | | | | |
|--------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | AI antibody titer | | | ND antibody titer | | |
| | 7 | 14 | 21 | 7 | 14 | 21 |
| A | 4.33 \pm 0.57 ^{Aa} | 6 \pm 1.73 ^{Ba} | 7.33 \pm 1.33 ^{Ca} | 4.66 \pm 2.3 ^{Aa} | 7 \pm 1 ^{Ba} | 6 \pm 1 ^{Ca} |
| B | 4.33 \pm 0.57 ^{Aa} | 6.2 \pm 1.3 ^{Ba} | 7.66 \pm 1.15 ^{Ca} | 5.4 \pm 0.89 ^{Ab} | 6 \pm 1.72 ^{Ab} | 7 \pm 1 ^{Bb} |
| C | 4.66 \pm 0.57 ^{Aa} | 6.33 \pm 1.5 ^{Ba} | 8.33 \pm 0.57 ^{Cb} | 5.66 \pm 1.7 ^{Ab} | 6.6 \pm 1.15 ^{Bab} | 7.33 \pm 0.57 ^{Bb} |
| D | 4 \pm 1 ^{Aa} | 3 \pm 1 ^{Bb} | 1.66 \pm 0.57 ^{Cc} | 3 \pm 0.57 ^{Ac} | 4.33 \pm 1.5 ^{Bc} | 6 \pm 1 ^{Ca} |
| E | 4 \pm 0.57 ^{Aa} | 6 \pm 1.73 ^{Ba} | 7.33 \pm 1.33 ^{Ca} | 4 \pm 1 ^{Aa} | 6 \pm 1 ^{Bb} | 6.66 \pm 0.57 ^{Bb} |
| F | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

^{a-d}: The values with different and dissimilar superscript letters in a column are significantly different ($P < 0.05$).

A-C: Different superscript letter in a row indicates significant difference ($P < 0.05$).

D، در روزهای مختلف به طور قابل توجهی کم تر از سایر گروه‌های واکسن بود. میزان تیتر آنتی بادی در گروه شاهد نیز روند ثابتی داشته و افزایشی نداشت (Table 3).

میزان آنتی بادی ضد ویروس نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی در گروه‌های B و C در روز ۷ و ۲۱ و در گروه E در روز ۲۱ به صورت معنی داری بیش تر از سایر گروه‌ها بود ($P < 0.05$). میزان تیتر آنتی بادی ضد آنفلونزا در گروه

Table 3: Mean±SD of AI and ND HI titers of broiler chickens on days post vaccination

| Groups | Days post vaccination | | | | | |
|--------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | AI antibody titer | | | ND antibody titer | | |
| | 7 | 14 | 21 | 7 | 14 | 21 |
| A | 3±1.58 ^{Aa} | 4.4±1.14 ^{Ba} | 6±0.83 ^{Ca} | 3±2.3 ^{Aa} | 5±1.22 ^{Ba} | 5.4±0.89 ^{Ca} |
| B | 3.6±1.34 ^{Aa} | 4±0.7 ^{Ba} | 6.6±1.3 ^{Ca} | 4.2±0.35 ^{Ab} | 5.4±1.14 ^{Aa} | 6.6±0.54 ^{Ba} |
| C | 3.6±1.14 ^{Aa} | 4.6±0.89 ^{Ba} | 6.4±0.7 ^{Ca} | 4±0.7 ^{Ab} | 5.4±0.55 ^{Ba} | 6.8±0.83 ^{Bb} |
| D | 2.8±1 ^{Aa} | 2±1.23 ^{Bb} | 1.6±0.89 ^{Cb} | 3±1.58 ^{Aa} | 4±1.58 ^{Bb} | 5±2 ^{Ca} |
| E | 3.4±1.14 ^{Aa} | 4.2±1.1 ^{Ba} | 6±1.23 ^{Ca} | 3.2±1.3 ^{Aa} | 4.8±0.84 ^{Ba} | 6.2±0.84 ^{Ba} |
| F | 1.7±0.22 ^{Ab} | 1.7±0.22 ^{Ac} | 1.7±0.22 ^{Ac} | 1.7±0.22 ^{Ac} | 1.4±0.21 ^{Ac} | 1.7±0.18 ^{Ac} |

a-d: The values with different superscript letters in a column are significantly different ($P < 0.05$).

A-C: Different superscript letter in a row indicates significant difference ($P < 0.05$).

بحث

اما ذرات بزرگ تر، محتوای بیش تر آنتی ژنی را به سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن ارایه می کنند (Shima et al, 2013). ذرات نانومتری (از ۱۰۰-۶۰۰ نانومتر) در مقایسه با ذرات میکرومتری سلول‌های دندریتیک بیش تری را فعال می کنند (توسط سنجش میزان بیان CD80) که در نتیجه، سلول‌های CD8+ اختصاصی آنتی ژن بیش تری ایجاد شده و میزان IgG2a بیشتری تولید می شود (Naomi et al, 2016). ذرات با قطر کم تر از ۱۰۰ نانومتر، مشابه مکانیسم مورد استفاده ویروس‌ها و از طریق سیستم منافذ کلاترین جذب می شوند که سلول‌های پاسخ ایمنی Th1^۲ قوی تری ایجاد می کند (Mottram et al, 2007). ذرات با قطر بزرگ تر از ۵۰۰ نانومتر به فاگوزوم‌ها تحویل داده شده و متعاقباً با اندوزوم-های اولیه متصل می شوند، در حالی که ذرات کوچک تر از ۲۰۰ نانومتر به اندوزوم‌های انتهایی متصل شده و با لیزوزوم امتزاج می یابند. سیستم سازگاری نسجی^۳ کلاس II با مشارکت دو مسیر، فرآیند عرضه آنتی ژن را انجام می دهد.

واکسیناسیون با آموزش سیستم ایمنی در شناخت و پاسخ مناسب به پاتوژن‌های بیماری‌زا عمل می کند (Rodrigues and Plotkin, 2020). متداول ترین امولسیون به عنوان اجوانت، امولسیون آب در روغن می باشد در جایی که آب به عنوان حل شونده در فاز روغنی امولسیون می شود و ریز قطرات مجزایی شکل می گیرد که توسط امولسیفایرها پایدار می شود. یکی از خصوصیات فیزیکی-شیمیایی واکسن، قطر ذرات واکسن است که در ایمنی‌زایی آن مؤثر است (Benne et al, 2016). Shima و همکاران (۲۰۱۳)، نشان دادند که ذرات (گاما-گلوتامیک اسید) با قطر ۴۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانومتر به طور قابل توجهی در تجویز زیر پوستی توسط سلول‌های دندریتیک جذب می شوند. ذرات با قطر ۴۰ نانومتر توسط سلول‌های دندریتیک دو برابر بیش تر از ذرات با قطر ۲۰۰ نانومتر جذب می شوند در حالی که محتوای آنتی ژنی ذرات ۲۰۰ نانومتری، حدود ۳ برابر بیش تر از ذرات ۴۰ نانومتری است. بنابراین، ذرات با قطر کوچک تر جذب مؤثرتری دارند

- 1- Cluster of differentiation 80
- 2- T helper 1
- 3- Major Histocompatibility Complex class II

ذرات با قطر بزرگتر از ۵۰۰ نانومتر در مقایسه با ذرات کوچکتر، بیش تر سلول های CD4+ T را تحریک می کنند (Brewer et al, 2004). تجمع نانوذرات درون لیزوزوم باعث القای بار اضافی بر لیزوزوم شده و تجزیه لیزوزومی را دچار اختلال می کند و این مسئله می تواند توجه کننده کاهش ظرفیت عرضه آنتی ژنی سیستم سازگاری نسجی کلاس II باشد (Seydoux et al, 2014). بر اساس فیزیولوژی سازوکار جذب واکسن های کشته روغنی نیوکاسل و آنفلوانزا و هدف از کاربرد در پرندگان، تولید آنتی بادی کافی برای مقابله با بیماری است و تولید پادتن نیز از طریق فعال شدن ایمنی همورال و توسط لئوسیت های B صورت می گیرد. با وجود عرضه متقاطع، ذرات با قطر نانومتری، توسط سیستم سازگاری نسجی کلاس I عرضه شده و مسیر فاگوزوم-سیتوزول را القا می کنند، در حالی که ذرات با قطر میکرومتری از طریق مسیر واکتولی پردازش می شوند که نهایتاً سیستم سازگاری نسجی کلاس I کمتری را خواهیم داشت (Mant et al, 2014). بنابراین بر اساس مطالعات انجام شده، شواهد متقنی درباره تأثیر وابسته به قطر ذرات لیپوزومی و غیر لیپوزومی در پردازش و عرضه آنتی ژن اندوزومی وجود دارد. ذرات با قطر کم تر از ۱۰۰ نانومتر، پایداری بیشتری از خود نشان می دهند. امولسیون واکسن با ریز قطرات کم تر از ۸۰ میکرون قطر، پاسخ ایمنی و سلولی با شدت بیشتری تحریک می شود (Iyer et al, 2015). در این بررسی، میزان قطر ذرات امولسیون واکسن های خارجی (D و E) مشابه (بزرگ تر از ۵۰۰ نانومتر) و از واکسن های B و C بیشتر بود، در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ بعد از واکسیناسیون میزان تیتراژ پایین تری نشان دادند. افزایش اولیه تیتراژ پادتن علیه هر دو ویروس در واکسن های B و C، در روز ۷ بعد از واکسیناسیون، نشان دهنده آن است که با کاهش قطر ریز ذرات امولسیون واکسن، میزان افزایش تیتراژ پادتن نیز سرعت بیشتری خواهد داشت و با نتایج بررسی های گذشته، مطابق است. بر اساس آنالیز به دست آمده از سنجش قطر ریز

ذرات امولسیون واکسن های مختلف در این بررسی، افزایش زمان هموژنیزاسیون تا زمان مشخصی می تواند اندازه ریز ذرات را کاهش دهد. میزان قطر ذرات امولسیون واکسن های خارجی حتی از واکسن A که کم ترین زمان هموژنیزاسیون را داشته است نیز بزرگ تر می باشد. نتایج تیتراژ ضعیف ضد آنفلوانزا در واکسن D احتمالاً با کیفیت ضعیف آنتی ژن در مرحله فرآوری واکسن بوده است. با توجه به محدودیت فاز آبی در امولسیون کردن با اجزای روغنی، در صورت پایین بودن میزان HA آنتی ژن نیوکاسل از میزان حداقل لازم، در زمان فرمولاسیون باید حجم بیشتری از آن استفاده شود. افزایش حجم آنتی ژن نیوکاسل با توجه به محدودیت فاز آبی، استفاده کافی از آنتی ژن آنفلوانزا را محدود می سازد که در نهایت تیتراژهای آنتی بادی حاصله در پرندگانه کاهش می یابد. نتایج این پژوهش نیز با یافته های Iyer و همکاران (۲۰۱۵) مطابق است و با کاهش قطر ریز ذرات واکسن به زیر ۱۰۰ نانومتر، جذب آنها توسط سلول های عرضه کننده آنتی ژن تسهیل می شود (Fenner, 1993). میزان تیتراژ ضد ویروس نیوکاسل و آنفلوانزا حاصل از واکسیناسیون جوجه های SPF توسط واکسن های فرموله شده در مقایسه با دو واکسن خارجی، نشان دهنده کیفیت مطلوب واکسن های فرموله شده می باشد.

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، هموژنیزاسیون به مدت ۶ و ۱۲ دقیقه، بهترین تیتراژ پادتن را به همراه داشت و میزان یکنواختی و افزایش تیتراژ علیه ویروس نیوکاسل و آنفلوانزا از سایر گروه ها بیشتر بود. با توجه به ارزیابی ایمنی زایی واکسن های ساخته شده در شعبه شیراز با نمونه های خارجی غالب در بازار، میزان تولید آنتی بادی واکسن های ساخته شده مطلوب و به طور قابل توجهی بهتر بود. بنابراین با پیش فرض استفاده از آنتی ژن با کیفیت و تیتراژ مناسب، فرمول زمانی ارائه شده برای ساخت واکسن برای افزایش کیفیت واکسن های تولیدی در کشور، مطلوب به نظر می رسد.

1- Antigen Presenting Cells

تشکر و قدردانی

از کارشناسان بخش تولید واکسن‌های ویروسی به خصوص جناب آقای مهندس رحیمیان جهت ساخت و فرمولاسیون واکسن‌های مورد نظر، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافع ندارند.

منابع مالی

هزینه‌های این تحقیق توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، شعبه شیراز تأمین گردیده است.

منابع

- Abbasnia, M., Mosleh, N., Dadras, H., Rezaeianzadeh, G., & Boroomand, Z. (2020). Effect of different herbal preparations on experimental viral respiratory complex of broilers: clinical, pathological and ciliary activity aspects. *Journal of Hermed Pharmacology*, 9(3): 277-285.
- Alexander, D.J. (2003). Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections. In: Diseases of Poultry, ed. Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson, J.R., Fadly A.M., McDougald L.R., & Swayne D.E. 11th ed., pp. 64-87. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Benne, N., van Duijn, J., Kuiper, J., Jiskoot, W., & Slütter, B (2016). Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines. *Journal of Controlled Release*. 234, p: 124-134.
- Brewer, M., Pollock, K.G., Tetley, L., & Russell, D.G. (2004). Vesicle size influences the trafficking, processing, and presentation of antigens in lipid vesicles, *Journal of Immunology*, 173, 6143-6150.
- Choi, J.G., Lee, Y.J., Kim, Y.J., Lee, E.K., Jeong, O.M., Sung, H.W., Kim, J.H., & Kwon J.H. (2008). An inactivated vaccine to control the current H9N2 low pathogenic avian influenza in Korea. *Journal of Veterinary Science*, 9: 67-74.
- Fenner, F. Smallpox: emergence, global spread, and eradication (1993). *History and Philosophy of the Life Sciences*. 15(3): 397-420; PMID: 7529932.
- Hassan, K.E., Ali A., Shany, S.A.S., & El-Kady, M.F. (2017). Experimental co-infection of infectious bronchitis and low pathogenic avian influenza H9N2 viruses in commercial broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, 115:356-362.
- Iyer, V., Cayatte C., Guzman, B., Schneider-Ohrum, K., Matuszak, R., Snell, A., Manohar Rajani, G., McCarthy, M.P., & Muralidhara, B. (2015). Impact of formulation and particle size on stability and immunogenicity of oil-in-water emulsion adjuvants. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 11(7): 1853-1864.
- Jackwood, M., & Wit, S.D. (2020). Infectious Bronchitis. In: Disease of Poultry. Edited by Swayne D.E., Boulianne M., Logue C.M., McDougald L.R., Nair V., and Suarez D.L. Diseases of Poultry, 14th edition, PP: 167-181.
- Leitner, G., Dan Heller, E., & Friedman, A. (1989). Sex-related differences in immune response and survival rate of broiler chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 21 (3-4): 249-260.
- Mant, A., Chinnery, F., Elliott, T., & Williams, A.P. (2012). The pathway of cross presentation is influenced by the particle size of phagocytosed antigen. *Immunology*, 136: 163-175.
- Mayahi, M., SefiAbad Shapouri, M.R., Jafary, R., & Khosravi Farsani, M. (2015). Isolation and molecular diagnostic of pigeon paramyxovirus-1 from suspected pigeons to Newcastle disease in Ahvaz, Iran. *Iranian Veterinary Journal*, 11(2):102-112.
- Mottram, P.L., Leong, D., Crimeen-Irwin, B., Gloster, S., Xiang, S.D., Meanger, J., Ghildyal, R., Vardaxis, N. & Plebanski, M. (2007). Type 1 and 2 immunity following vaccination is influenced by nanoparticle size: formulation of a model vaccine for respiratory syncytial virus. *Molecular Pharmacology*, 4: 73-84.

- Naomi, B., Janine van, D., Johan, K., Wim, J. & Bram, (2016). S. Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines. *Journal of Controlled Release*, 234:124-34. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.05.033
- Ott, G., Barchfeld, G.L., Chernoff, D., Radhakrishnan, R., Van Hoogevest, P., & Van Nest, G. (1995). Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. *Pharmaceutical Biotechnology*, 6, p: 277-96; PMID: 7551221; <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-1823-5-10>.
- Peacock, T.H.P., James, J., Sealy, J.E., & Iqbal, M. (2019). A global perspective on H9N2 avian influenza virus. *Viruses*, 11(7). Pii: E 620.doi:10.3390/v11070620.
- Rodrigues, C.M.C., & Plotkin, S.A. (2020). Impact of Vaccines; Health, Economic and Social Perspectives. *Front. Microbiology*, 11: 1526.
- Seydoux, E., Rothen-Rutishauser, B., Nita, I.M., Balog, S., Gazdhar, A., Stumbles, P.A., Petri-Fink, A., Blank, F., & von Garnier, C. (2014). Size-dependent accumulation of particles in lysosomes modulates dendritic cell function through impaired antigen degradation, *International Journal of Nanomedicine*, 9: 3885-3902.
- Shengqing, Y., Shinya, K., Otsuki, K., Ito, H., & Ito, T. (2002). Isolation of myxoviruses from migratory waterfowls in San-in district, western Japan in winters of 1997–2000. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64: 1049-1052.
- Shima, F., Uto, T., Akagi, T., Baba, M., & Akashi, M. (2013). Size effect of amphiphilic poly (γ -glutamic acid) nanoparticles on cellular uptake and maturation of dendritic cells in vivo. *Acta Biomaterialia*, 9: 8894-8901.
- Silva, A.L., Rosalia, R.A., Varypataki, E., Sibuea, S., Ossendorp, F., & Jiskoot, W. (2015). Poly-(lactic-co- glycolic-acid)-based particulate vaccines: Particle uptake by dendritic cells is a key parameter for immune activation. *Vaccine*, 33, 847-854.
- Teresa, C., Giraldo, C., López-Abán J., Muro A., Patarroyo, M.A., & Román, R. M. (2021). Nanovaccines against Animal Pathogens: The Latest Findings. *Vaccines (Basel)* 9(9): 988. Doi: 10.3390/vaccines9090988.
- Vogel, F.R., Caillet, C., Kusters, I.C., & Haensler, J. (2009). Emulsion based adjuvants for influenza vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 8(4): 483-92; PMID: 19348563; <http://dx.doi.org/10.1586/erv.09.5>.
- Zhao, L., Zhu, Z., Ma, L., & Li, Y. (2020). O/W Nanoemulsion as an Adjuvant for an Inactivated H3N2 Influenza Vaccine: Based on Particle Properties and Mode of Carrying. *International Journal of Nanomedicine*, 15: 2071-2083. Doi: 10.2147/IJN.S232677.

Received: 28.08.2023

Accepted: 31.01.2024

بررسی میزان همبستگی بین ابعاد و حجم کلیه‌ها در اولتراسونوگرافی با مقادیر واقعی آن‌ها در سگ

علیرضا غدیری^{۱*}، رضا آویزه^۱، علی بنی‌آدم^۲ و شهرزاد صمیمی^۳

^۱ استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۳ دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۶/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۹

چکیده

هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان صحت محاسبه حجم کلیه با استفاده از دستگاه اولتراسونوگرافی در مقایسه با حجم واقعی آن بود که در ده قلاده سگ بومی کاندید مرگ آسان به دلیل جراحات بسیار شدید ناشی از تصادف انجام شد. علاوه بر این میزان ارتباط و همبستگی بین ابعاد کلیه شامل طول، عرض و ارتفاع در اولتراسونوگرافی با مقادیر واقعی آن‌ها تعیین شد. ابتدا ابعاد کلیه‌های چپ و راست در اولتراسونوگرافی تعیین شد. حجم کلیه به دو روش خودکار، با استفاده از گزینه تعیین حجم دستگاه اولتراسونوگرافی و با استفاده از فرمول حجم بیضوی کشیده (طول×عرض×ارتفاع×۰/۵۲۳) محاسبه شد. ابعاد واقعی (استاندارد طلایی) کلیه هنگام لاپاراتومی و بعد از کالبدگشایی تعیین و حجم واقعی نیز به روش غوطه‌ورسازی مشخص شد. به منظور تعیین ارتباط و همبستگی بین ابعاد و حجم کلیه در اولتراسونوگرافی با مقادیر واقعی از روش آنالیز همبستگی و رگرسیون خطی استفاده شد. نتایج نشان داد که ابعاد و حجم کلیه‌ها، در هر دو روش تعیین حجم، در اولتراسونوگرافی، نسبت به مقادیر واقعی کوچک‌تر بود. حجم کلیه در اولتراسونوگرافی همبستگی مستقیم و معنی‌داری با حجم واقعی آن داشت. ضریب همبستگی (r) در روش حجم محاسبه شده با فرمول بیش‌تر از روش حجم خودکار و میانگین آن به میانگین حجم واقعی نزدیک‌تر بود. همچنین ابعاد کلیه در اولتراسونوگرافی همبستگی مستقیم و معنی‌داری با ابعاد واقعی داشت. هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین ابعاد واقعی کلیه‌ها در دو روش اندازه‌گیری لاپاراتومی و کالبدگشایی مشاهده نشد. یافته‌های این تحقیق نشان داد که دستگاه اولتراسونوگرافی ابعاد و حجم کلیه‌ها را کم‌تر از مقدار واقعی آن‌ها محاسبه می‌کند و روش استفاده از تعیین حجم با فرمول، دقیق‌تر از روش خودکار است.

کلمات کلیدی: اولتراسونوگرافی، ابعاد کلیه، حجم کلیه، سگ

مقدمه

اندازه‌گیری ابعاد و حجم اعضای بدن در پزشکی و دامپزشکی برای تشخیص بیماری‌ها و بررسی روند درمان اهمیت زیادی دارد. به طور کلی تعیین ابعاد و حجم هر

ساختار در هر کدام از روش‌های تصویربرداری تشخیصی، بایستی دارای صحت و دقت کافی، سرعت و هزینه مناسب داشته و عوارض جانبی آن کم باشد. اولتراسونوگرافی

* نویسنده مسئول: علیرضا غدیری، استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

E-mail: alighadiri@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

دستگاه‌های اولتراسونوگرافی جدید امکان تعیین محیط، سطح مقطع و حجم نیز وجود دارد. بدین منظور برای تعیین حجم یک عضو یا یک ناحیه خاص مانند یک کلیه یا یک کیست، پس از تعیین محدوده به صورت بیضوی یا کروی، حجم آن را به صورت خودکار محاسبه و به سانتی-متر مکعب ارائه می‌کنند. اطلاعات دقیقی در خصوص صحت و میزان ارتباط هر کدام از دو روش تعیین حجم کلیه با حجم واقعی در سگ‌های سالم در دسترس نیست. بنابراین هدف اصلی مطالعه حاضر بررسی میزان صحت و درستی محاسبه حجم به دست آمده از کلیه‌ها با استفاده از دستگاه اولتراسونوگرافی (به دو روش خودکار و با استفاده از فرمول حجم بیضوی) در مقایسه با حجم واقعی آن در سگ‌های سالم از نظر ساختارهای محوطه شکمی بود. علاوه بر این میزان ارتباط و همبستگی بین طول، عرض و ارتفاع کلیه در اولتراسونوگرافی با مقادیر واقعی آن‌ها تعیین و با یکدیگر مقایسه گردید.

مواد و روش کار

این تحقیق روی ۱۰ قلاده سگ بومی سالم بالغ انجام گرفت که به دلیل جراحات بسیار شدید ناشی از تصادف با وسیله نقلیه موتوری کاندید مرگ آسان و بدون درد بودند. برای اطمینان از سلامتی آن‌ها به خصوص دستگاه ادراری، از روش‌های معاینه بالینی، آزمایشگاهی، رادیوگرافی و اولتراسونوگرافی استفاده شد. اجازه انجام کالبدگشایی از صاحبان تمامی آن‌ها از قبل گرفته شد. اولتراسونوگرافی به وسیله دستگاه سرفونیکس ساخت کشور کانادا و ترانسدیوسر محدب ۵ مگاهرتزی صورت گرفت. طول، عرض و ارتفاع کلیه‌های چپ و راست در اولتراسونوگرافی در حالت گماری خوابیده به پشت، تعیین و یادداشت شد (Figure 1a, Figure 1b). حجم کلیه به دو روش اندازه‌گیری شد. در روش اول با استفاده از گزینه تعیین حجم دستگاه اولتراسونوگرافی پس از مشخص نمودن محدوده کلیه به

تکنیکی غیر تهاجمی، سریع، بی‌خطر و نسبتاً ارزان است که اغلب اهداف یاد شده را در بر دارد. ساده‌ترین روش تخمین حجم در این روش، اندازه‌گیری ابعاد و استفاده از فرمول یک حجم هندسی مناسب است که می‌توان با استفاده از ضرایب ثابت مناسب (حاصل از معادلات رگرسیون خطی) آن را اصلاح کرد (Gilja et al, 1999). اولتراسونوگرافی سه بعدی نسبت به دو بعدی برای تعیین حجم، دقت و صحت بیشتری داشته ولی گران‌تر، زمان‌بر و کم‌تر در دسترس است (Partik et al, 2002; Molazem et al, 2006; Vajhi et al, 2010).

اولتراسونوگرافی از جمله تکنیک‌های تصویربرداری تشخیصی است که برای بررسی دستگاه ادراری کاربرد فراوانی دارد. انجام این تکنیک به دلیل ارائه اطلاعات آناتومیکی مهمی از قبیل اندازه، شکل و ساختار داخلی، از جمله نخستین انتخاب‌ها برای معاینه کلیه‌ها است و می‌تواند در مواقعی که بیماری‌های دستگاه ادراری مورد ظن و تردید است، به عنوان یک راهکار تشخیصی مهم مورد استفاده قرار گیرد. یکی از شاخص‌های سالم بودن کلیه، طبیعی بودن ابعاد و حجم آن است. در منابع متعدد چگونگی اندازه‌گیری ابعاد کلیه‌ها با رادیولوژی و اولتراسونوگرافی در سگ توصیف شده است (Wood et al, 1990; d'Anjou, 2015; Kealy et al, 2011). Kantrowitz (۱۹۸۹) روی ۱۰ قلاده سگ به کمک اولتراسونوگرافی، طول، عرض و ارتفاع کلیه‌ها را تعیین کردند. نام بردگان به کمک فرمول حجم بیضوی کشیده، حجم را تخمین، آن را با واقعیت مقایسه کرده و گزارش دادند که حجم محاسبه شده کلیه‌ها به کمک اولتراسونوگرافی نسبت به حجم واقعی کم‌تر است. Barr (۱۹۹۰) مشاهده کرد که حجم کلیه‌ها پس از محاسبه از طریق فرمول حجم بیضوی نسبت به واقعیت کوچک‌تر است. دستگاه‌های اولتراسونوگرافی قدیمی امکان تعیین حجم به صورت خودکار را نداشتند. در حالی که در

استفاده از فرمول حجم بیضوی کشیده (طول×عرض×ارتفاع× $\frac{\pi}{6}$) حجم کلیه محاسبه گردید.

صورت بیضوی، حجم کلیه به صورت خودکار ارایه شد (Figure 1c). در روش دوم ابعاد کلیه با دستگاه تعیین و با

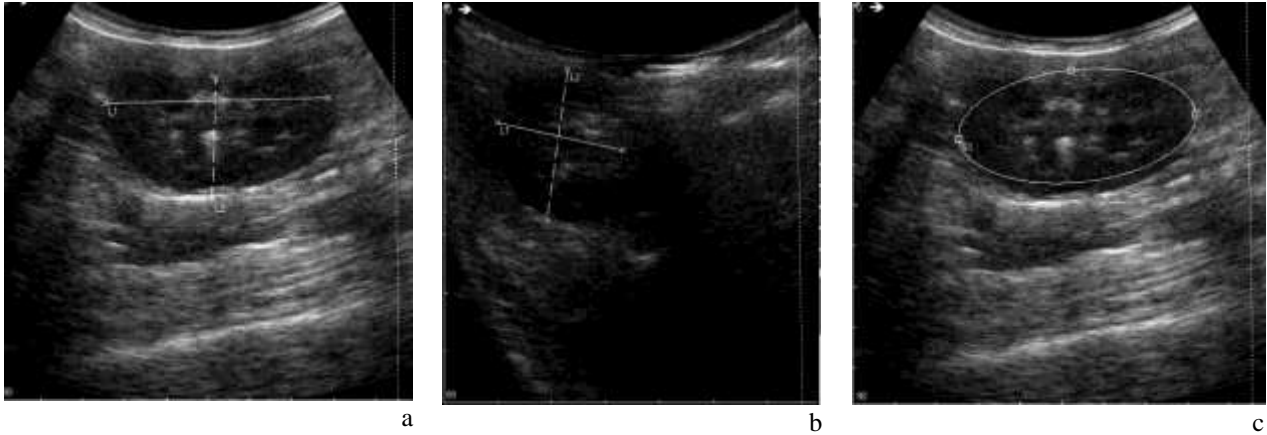


Figure 1: a: An ultrasound image of a healthy dog's kidney's longitudinal section, measuring the length (L1) and width (L2) with the ultrasound machine's clipper. b: A transverse ultrasound image of a healthy dog kidney is shown, along with measurements of width (L2) and height (L1) taken with the ultrasound device's clipper. c: An ultrasound image of the kidney's longitudinal section is shown, as is the volume measurement by determining the kidney area of a healthy dog, and the volume of the kidney was measured automatically in the ultrasound machine.

مشخصی از آب پر شده بود، قرار داده شد. میزان حجم جدید حاصل از قرار دادن کلیه در استوانه مدرج یادداشت و حجم اولیه از آن کم شد تا میزان حجم واقعی هر کلیه مشخص گردد.

برای محاسبات آماری از نرم افزار SPSS استفاده گردید. به این ترتیب که از آزمون رگرسیون خطی و آنالیز همبستگی برای بررسی میزان همبستگی بین طول، عرض، ارتفاع و حجم کلیه‌ها در اولتراسونوگرافی با مقادیر واقعی آنها استفاده گردید. مقادیر $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد. همچنین برای مقایسه بین طول، عرض و ارتفاع کلیه در دو روش اندازه‌گیری در لاپاراتومی و کالبدگشایی، از آزمون تی زوج‌ها استفاده شد.

برای اندازه‌گیری مستقیم و تعیین ابعاد واقعی کلیه‌ها (روش استاندارد طلایی) از دو شیوه اندازه‌گیری هنگام لاپاراتومی و بعد از کالبدگشایی استفاده شد. لاپاراتومی طبق اصول مربوطه انجام گرفت و با کنار زدن ارگان‌های موجود در محوطه شکمی و رسیدن به کلیه‌ها، طول، عرض و ارتفاع به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد. در این مرحله سایر دستگاه‌های موجود در محوطه شکمی برای مشاهده سلامت ظاهری از نظر حجم و عدم وجود توده و سایر جراحات معاینه گردیدند. بلافاصله سگ‌ها به وسیله تزریق وریدی میزان بالای تیوپتال سدیم ۲/۵ درصد (ساخت شرکت Sandoz وین، اتریش)، آسان‌کشی و به سرعت کلیه‌ها از بدن خارج و تمام بافت‌های اضافی اطراف کلیه‌ها برداشته شد. طول، عرض و ارتفاع واقعی کلیه‌ها با کولیس اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری حجم به روش غوطه-ورسازی، هر کلیه درون یک استوانه مدرج که تا میزان

نتایج

و معنی‌داری با ابعاد واقعی داشت. بر اساس میزان ضریب همبستگی در Table 2، می‌توان مشاهده کرد که هر کدام از پارامترهای اندازه‌گیری شده در اولتراسونوگرافی به چه میزانی با واقعیت مطابقت دارند. همچنین با قرار دادن هر کدام از شاخص‌های اندازه‌گیری شده در فرمول می‌توان به مقدار واقعی آن با ضریب رگرسیون مربوطه رسید. بر اساس Table 1، حجم کلیه‌ها در هر دو روش تعیین حجم در اولتراسونوگرافی، نسبت به حجم واقعی کم‌تر بود. ولی در روش دوم، حجم محاسبه شده (فرمول حجم بیضوی کشیده)، به مقدار حجم واقعی نزدیک‌تر و ارتباط آن با واقعیت بیش‌تر بود. همچنین ابعاد کلیه‌ها در اولتراسونوگرافی نسبت به مقادیر واقعی آن‌ها کم‌تر بود. در ضمن، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین ابعاد واقعی کلیه‌ها در دو روش اندازه‌گیری لاپاراتومی و کالبدگشایی مشاهده نشد ($P > 0.05$).

با توجه به معاینه بالینی، رادیوگرافی و اولتراسونوگرافی همگی سگ‌ها به جز موارد بالای شکستگی در استخوان-های اندام‌های حرکتی، لگن و تا حدودی سر و دنده‌ها، سالم بودند. در Table 1 میانگین و انحراف معیار ابعاد و حجم کلیه‌های راست و چپ، در اولتراسونوگرافی و مقادیر واقعی آن‌ها (حین لاپاراتومی و بعد از کالبدگشایی) آورده شده است. همچنین معادلات رگرسیون و ضریب همبستگی (r) بین ابعاد و حجم کلیه نسبت به مقادیر واقعی در Table 2 مشاهده می‌شود. بر اساس آزمون رگرسیون خطی و آنالیز همبستگی حجم اندازه‌گیری شده به دوروش در اولتراسونوگرافی، همبستگی مستقیم و معنی‌داری با حجم واقعی داشت. میزان این ارتباط در روش حجم محاسبه شده با فرمول بیش‌تر و به اندازه واقعی نزدیک‌تر بود. ابعاد کلیه در اولتراسونوگرافی نیز همبستگی مستقیم

Table 1: Average and standard deviation of dimensions (mm) and volume (cm³) of kidneys with ultrasonography and their actual values (direct measurement during laparotomy and after necropsy) in ten native dogs

| Method of measurement | Renal parameters | Left kidney | | Right kidney | |
|-----------------------|-------------------------------|-------------|--------------------|--------------|--------------------|
| | | Mean | Standard deviation | Mean | Standard deviation |
| Ultrasonography | Volume (ellipsoid formula) | 28.7 | 7.1 | 29.1 | 8.2 |
| | Volume (ultrasound equipment) | 23.9 | 6.7 | 24.0 | 7.2 |
| | Length | 29.5 | 9.7 | 30.4 | 8.8 |
| | Width | 33.0 | 10.19 | 34.4 | 10.8 |
| | Height | 53.2 | 7.0 | 57.9 | 6.1 |
| Laparotomy | Volume (ellipsoid formula) | 60.3 | 6.03 | 59.0 | 5.9 |
| | Length | 60.6 | 6.65 | 58.9 | 6.6 |
| | Width | 29.9 | 3.1 | 29.6 | 3.1 |
| | Height | 28.1 | 4.28 | 29.5 | 3.5 |
| Necropsy | Volume (submersion) | 27.8 | 4.56 | 29.4 | 4.2 |
| | Length | 31.0 | 3.4 | 31.8 | 3.1 |
| | Width | 33.0 | 6.42 | 24.2 | 6.3 |
| | Height | 33.0 | 6.41 | 34.0 | 6.2 |

Table 2: Correlation formulas (regression equations) and correlation coefficient of kidney dimensions and volume measured in ultrasonography in ten native dogs

| | Right kidney | | Left kidney | |
|--|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| | Regression equation | Correlation coefficient (r) | Regression equation | Correlation coefficient (r) |
| The real volume (V) through ultrasonography (v) (ellipsoid formula) | $V=1.1 \times v + 1.91$ | 0.861 | $V= 1.2 \times v + 1.0$ | 0.871 |
| The real volume (V) through ultrasonography (v) (ultrasound equipment) | $V=1.30 \times v + 1.49$ | 0.853 | $V= 1.38 \times v + 2.15$ | 0.773 |
| The real length (L) through ultrasonography (l) | $L=0.959 \times l + 5.1$ | 0.795 | $L=0.88 \times l + 12.54$ | 0.853 |
| The real width (W) through ultrasonography (w) | $W=1.27 \times w - 9.77$ | 0.759 | $W=1.13 \times w - 4.15$ | 0.831 |
| The real height (H) through ultrasonography (h) | $H=1.69 \times h - 20.8$ | 0.709 | $H=1.51 \times h - 13.57$ | 0.781 |

بحث

موجود است ولی تحقیقات در این خصوص، هیچ‌گاه متوقف نشده است و مقالاتی که از سوی پژوهشگران مختلف داخلی (Molazem et al, 2006; Vajhi et al, 2010; Ghadiri et al, 2015) و خارجی (Barella et al, 2012; Beige et al, 2015) در دامپزشکی و پزشکی در سال‌های اخیر منتشر شده است، تنها نمونه‌هایی برای این ادعا است.

هدف اصلی مطالعه حاضر بررسی میزان صحت و درستی محاسبه حجم کلیه‌ها در سگ توسط استفاده از دستگاه اولتراسونوگرافی با حجم واقعی در ده قلاده سگ بومی سالم بود. یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که ارتباط مثبت و کاملی بین حجم کلیه، محاسبه شده به وسیله دستگاه اولتراسونوگرافی در هر دو روش خودکار و با استفاده از فرمول بیضوی نسبت به حجم واقعی بعد از کالبد گشایی، به روش غوطه‌ورسازی، وجود دارد. با این وجود، بر اساس آزمون رگرسیون خطی و آنالیز همبستگی میزان این ارتباط در روش حجم محاسبه شده با فرمول بیش‌تر و به اندازه واقعی نزدیک‌تر بود. از طرفی حجم کلیه‌ها در هر دو روش تعیین حجم در اولتراسونوگرافی، نسبت به حجم واقعی کم‌تر بود. در هر صورت روش حجم محاسبه شده با فرمول بیضوی به مقدار حجم واقعی نزدیک‌تر بود. Nyland و Kantrowitz (۱۹۸۹) گزارش دادند که حجم

این تحقیق به منظور تعیین میزان ارتباط و همبستگی بین اندازه‌گیری کلیه‌ها (طول، عرض، ارتفاع و حجم) در اولتراسونوگرافی، با مقادیر واقعی و مقایسه آن‌ها با یکدیگر در سگ‌های سالم به طور موفقیت‌آمیزی انجام گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که دستگاه اولتراسونوگرافی یافته‌های حاصل را کم‌تر از مقادیر واقعی تخمین می‌زند ولی به کمک فرمول‌های حاصل از رگرسیون خطی (Table 2) می‌توان آن‌ها را اصلاح کرد.

اولتراسونوگرافی تکنیکی انتخابی برای ارزیابی دستگاه ادراری در پزشکی و دامپزشکی است که به کمک آن می‌توان تغییرات نسبی و ابعادی کلیه‌ها را بررسی نمود. در علوم پزشکی عقیده بر این است که تخمین حجم کلیه با اولتراسونوگرافی یک پارامتر مهم در ارزیابی درمانگاهی بیماری‌های کلیوی و پیوند کلیه است. تخمین حجم کلیه نسبت به اندازه‌گیری طول، عرض و ضخامت پارانشیم آن ارجحیت دارد. در انسان همچنین گفته شده که دستگاه اولتراسونوگرافی ابعاد و حجم کلیه‌ها را کم‌تر از میزان واقعی آن‌ها اندازه‌گیری می‌کند. به هر حال بهترین پارامتر اندازه‌گیری مورفومتریک (طول یا حجم) مرتبط با کارایی کلیه، هنوز به عنوان یک سؤال علمی مطرح است. اگر چه کتاب‌های مرجع فراوانی در خصوص اولتراسونوگرافی کلیه و نحوه اندازه‌گیری ابعاد آن، در طب انسانی و دامپزشکی

۱۴ درصد دیگر، مربوط به عوامل و فاکتورهای دیگر دخیل در تعیین اندازه کلیه‌ها است.

مشکل برآورد کوچک‌تر ابعاد و حجم کلیه‌ها به وسیله اولتراسونوگرافی، در طب انسانی نیز مطرح است، به عنوان نمونه، Beige و همکاران (۲۰۱۵) ابعاد و حجم کلیه ۱۵ جسد را با اولتراسونوگرافی اندازه‌گیری و آن را با مقادیر واقعی مقایسه کرده و اظهار داشتند که ابعاد و در نتیجه حجم کلیه راست و چپ، نسبت به مقادیر واقعی کوچک‌تر است. در تحقیق یاد شده، روش اندازه‌گیری ابعاد و حجم واقعی و اولتراسونوگرافی، مشابه مطالعه حاضر بوده است. با این تفاوت که اختلاف بین ابعاد و حجم اولتراسونوگرافی با واقعی نسبت به مطالعه حاضر، زیاد است. به طوری که حجم واقعی در تحقیق آن‌ها بیش از دو برابر حجم اولتراسونوگرافی است. چنین یافته‌ای از جانب Patrik و همکاران (۲۰۰۲) نیز مشاهده شده است. در این دو مقاله نیز، برای تصحیح اندازه‌های حاصل از اولتراسونوگرافی، فرمول‌های به دست آمده از رگرسیون خطی پیشنهاد شده است.

در مطالعه حاضر اندازه‌های طول، عرض و ارتفاع کلیه-های راست و چپ با اولتراسونوگرافی و بعد از کالبدگشایی اندازه‌گیری و مقایسه شدند تا مشخص شود میزان ارتباط و همبستگی اندازه‌های ذکر شده با واقعیت به چه میزان است. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که در این مورد نیز ارتباط معنی‌دار و مثبتی با واقعیت وجود دارد. علاوه بر این، در این حالت نیز مانند حجم، ابعاد حاصل از اولتراسونوگرافی کوچک‌تر از واقعیت به دست آمد. تغییرات طول، عرض، ارتفاع و حجم در تعیین حالات پاتولوژیک کلیه‌ها به کمک اولتراسونوگرافی اهمیت دارد. Barr و همکاران (۱۹۹۰) پیشنهاد نمودند که اندازه‌گیری حجم کلیه‌ها اهمیت بیش-تری نسبت به اندازه‌گیری هر کدام از ابعاد کلیه‌ها به تنهایی دارد. آن‌ها معتقدند هرگونه تغییرات فیزیولوژیک و پاتولوژیک در کلیه منجر به تغییر در هر سه بعد آن می‌شود. در این تحقیق ابعاد واقعی کلیه‌ها به دو روش پس از لاپاراتومی و کالبدگشایی اندازه‌گیری و مشاهده شد که

محاسبه شده کلیه‌ها در سگ به کمک اولتراسونوگرافی نسبت به حجم واقعی آن کم‌تر است. در آن زمان امکان تعیین حجم با استفاده از دستگاه وجود نداشته و میزان حجم از طریق حجم بیضوی محاسبه شده بود. همچنین، Barr (۱۹۹۰) مشاهده کرد که حجم کلیه‌ها پس از محاسبه از طریق فرمول حجم بیضوی نسبت به واقعیت کوچک‌تر است. در آن تحقیق نیز حجم کلیه‌ها از طریق تعیین طول، عرض و ارتفاع به دست آمده بود. Felkai و همکاران (۱۹۹۲) علی‌رغم آن که در تحقیق آن‌ها حجم کلیه‌ها کوچک‌تر محاسبه شده بود، گزارش دادند که بین حجم محاسبه شده کلیه‌ها با واقعیت، ارتباط و همبستگی مناسبی وجود دارد. با جستجو در منابع و اینترنت به نظر می‌رسد که تحقیقی در خصوص مقایسه بین دو روش تعیین حجم کلیه به کمک دستگاه اولتراسونوگرافی با واقعیت در سگ انجام نگرفته باشد. بر اساس یافته‌های حاصل از این مطالعه روش خودکار تعیین حجم اگر چه در دستگاه‌های اولتراسونوگرافی به عنوان یک امکان اضافی معرفی شده است ولی با توجه به دقیق‌تر بودن روش تعیین حجم با فرمول، در عمل مزیت چندانی نسبت به آن ندارد و بر اساس مطالعه حاضر نمی‌توان از آن به عنوان یک روش قابل اعتماد استفاده کرد.

در مطالعه حاضر میزان حجم محاسبه شده با دستگاه اولتراسونوگرافی کم‌تر از واقعی به دست آمد ولی به کمک فرمول‌های رگرسیون خطی امکان اصلاح عدد محاسبه شده وجود دارد. به بیان دیگر، پس از اندازه‌گیری ابعاد و حجم هر کدام از کلیه‌ها به روش اولتراسونوگرافی می‌توان مقادیر واقعی آن‌ها را به کمک فرمول حاصل از رگرسیون به دست آورد. به عنوان نمونه، میزان ضریب همبستگی برای کلیه راست با دو روش تعیین حجم با دستگاه و با فرمول بیضوی به ترتیب $0/853$ و $0/861$ محاسبه شده است. به عبارت دیگر تعیین حجم به کمک دستگاه اولتراسونوگرافی برای کلیه راست در حدود $85/3$ درصد و در روش حجم بیضوی در $86/1$ درصد می‌تواند اندازه واقعی را نشان دهد و حدود

محدوده کلیه و در نتیجه برآورد کم‌تر در ابعاد آن است (Gilja et al, 1999; Beige et al, 2015).

به طور کلی یافته‌های این تحقیق نشان داد که دستگاه اولتراسونوگرافی ابعاد و حجم کلیه‌ها را کم‌تر محاسبه می‌کند و روش استفاده از تعیین حجم با فرمول، مناسب‌تر از روش خودکار است. پس از اندازه‌گیری ابعاد و حجم هرکدام از کلیه‌ها به روش اولتراسونوگرافی می‌توان مقادیر واقعی آن‌ها را به کمک فرمول حاصل از رگرسیون به دست آورد.

اختلاف معنی‌داری بین ابعاد کلیه‌ها وجود ندارد. علاوه بر این، حجم محاسبه شده به روش حجم بیضوی نیز در دو روش نزدیک به هم بوده و اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند. این یافته نشان می‌دهد که با خارج کردن کلیه‌ها از بدن و اندازه‌گیری بلافاصله آن‌ها، کاهش یا افزایش معنی‌داری در ابعاد آن حاصل نمی‌شود و اختلاف ابعاد و حجم کلیه در روش اولتراسونوگرافی به عاملی دیگر وابسته است. بعضی پژوهشگران معتقدند اختلاف بین اندازه‌گیری‌ها احتمالاً مربوط به عدم توانایی در تعیین دقیق

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله، مراتب تقدیر و تشکر خود را از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز، به منظور تأمین هزینه‌های لازم برای تحقیق حاضر ابراز می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافی ندارند.

منابع مالی

هزینه پایان‌نامه مزبور، در قالب پژوهانه، از دانشگاه شهید چمران اهواز، تأمین شده است.

منابع

- Barella, G., Lodi, M., Sabbadin, L. A. & Faverzani, S. (2012). A new method for ultrasonographic measurement of kidney size in healthy dogs. *Journal of Ultrasound*, 15(3), 186-191.
- Barr, F. J. (1990). Evaluation of ultrasound as a method of assessing renal size in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, 31(4), 174-179.
- Barr, F. J., Holt, P. E. & Gibbs, C. (1990). Ultrasonographic measurement of normal renal parameters. *Journal of Small Animal Practice*, 31(4), 180-184.
- Beige, J., Lothar, P., Treutler, T., Loffler, S., Feja, C. & Hamza, A. (2015). Kidney ultrasound in human cadavers: usefulness for clinical biopsy training and accuracy of volume estimation. *International Journal of Scientific Research*, 4(1), 346-350.
- d'Anjou M. A. (2015). Kidney and Ureters, In: Penninck, D. P., & d'Anjou, M. A, *Atlas of Small Animal Ultrasonography* (2nd Edition), Wiley Blackwell Science. Iowa, USA, Pp. 331-362.
- Felkai, C. S., Voros, K., Vrabely, T. & Karsai, F. (1992). Ultrasonographic determination of renal volume in the dog. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 33(5), 292-296.
- Ghadiri, A., Mosallanejad, B., Pourmahdi Borujeni, M. & Bashiri, S. (2015). Ultrasonographic evaluation of correlation between renal, prostatic gland and testicular dimensions in healthy dogs. *Iranian Veterinary Journal*, 11(3), 80-86.
- Gilja, O. H., Hausken. T., Berstad. A. & Odegaard, S. (1999). Measurements of organ volume by ultrasonography. *Proceeding of the Institution of Mechanical Engineers, Part H, Journal of Engineering in Medicine*, 213(3), 247-259.
- Kealy, J. K. (2011). The Urinary System. In: J. K, Kealy, & Mc Allister, H. *Diagnostic Radiology and Ultrasonography of the Dog and Cat* (4th Edition), St. Louis: Mosby. USA, Pp. 112-117.

- Molazem, M., Vajhi, A. R. & Masoudi Fard, M. (2006). Possibility and reproducibility of renal assessing and size measurement by three-dimensional vs two-dimensional ultrasonography in dogs. *Iranian Journal of Veterinary Surgery*, 1(1), 82-87.
- Nyland, T. G. & Kantrowitz, B. M. (1989). Ultrasonic determination of kidney volume in the dog. *Veterinary Radiology*, 30(4), 174-180.
- Partik, B. L., Stadler, A., Schamp, S., Koller, A., Voracek, M., Heinz, G. & Helbich T. H. (2002). 3D versus 2D ultrasound: accuracy of volume measurement in human cadaver kidneys. *Investigative Radiology*, 37(9), 489-495.
- Vajhi, A., Rajabioun, M., Molazem, M. & Sharifi, H. (2010). Ultrasonographic volumetry of the canine thyroid gland: a comparison of 2D, 3D ultrasonography and real gland volume. *Iranian Journal of Veterinary Surgery*, 05(1-2), 45-50.
- Wood, A. K. & McCarthy, P. H. (1990). Ultrasonographic- anatomic correlation and imaging protocol of the normal canine kidney. *American Journal of Veterinary Research*, 51(1), 103-108.

Received: 08.09.2022

Accepted: 31.08.2023

مطالعه اثرات فراکسیون‌های سم عقرب همی/اسکورپیوس/پتوروس بر مقادیر گلوکز و هورمون‌های انسولین، گلوکاگون و کورتیزول در رت

نوید کوشکی^۱، محمد راضی جلالی^{۲*}، سیدرضا فاطمی طباطبایی^۳ و هدیه جعفری^۴

^۱ دانشجوی دکتری تخصصی کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۳ استاد گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۴ استادیار انگل شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۷/۱۸

چکیده

عقرب همی/اسکورپیوس/پتوروس به عنوان خطرناک‌ترین عقرب در مناطق جنوب و جنوب غربی ایران شناخته شده است. این عقرب می‌تواند موجب بیماری و حتی مرگ در انسان و حیوانات شود. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات متابولیک و اندوکراین فراکسیون‌های مختلف سم عقرب همی/اسکورپیوس/پتوروس بود. برای این منظور سم عقرب به روش شوک الکتریکی استحصال و پس از جداسازی فاز محلول به کمک کروماتوگرافی ستونی توسط ژل سفادکس G-50، تعداد ۶ فراکسیون بر اساس جذب نوری در طول موج ۲۸۰ nm جداسازی شد. سپس ۷۲ سر رت نر نژاد ویستار در ۸ گروه مساوی شامل کنترل (NS)، سم خام (۱۰۰۰ µg/kg)، فراکسیون‌های I (۱۲۰ µg/kg)، II (۴۳۰ µg/kg)، III (۸۰ µg/kg)، IV (۱۸۰ µg/kg)، V (۶۰ µg/kg) و VI (۱۳۰ µg/kg) تقسیم و طبق مقادیر فوق به ترتیب با سرم فیزیولوژی، سم خام و فراکسیون‌های مختلف از طریق داخل صفاقی مورد تزریق قرار گرفتند. آنگاه در زمان ۱، ۳، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تزریق، غلظت گلوکز به روش آنزیمی و مقادیر هورمون‌های انسولین، گلوکاگون و کورتیزول به روش الیزا با استفاده از کیت‌های اختصاصی رت مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد تزریق سم خام و تمامی فراکسیون‌ها موجب افزایش معنی‌دار گلوکز نسبت به گروه کنترل گردید. همچنین افزایش معنی‌دار کورتیزول و گلوکاگون متعاقب تزریق در سم خام و فراکسیون‌های II و VI مشاهده گردید. همچنین میانگین انسولین در گروه‌های دریافت‌کننده سم خام و فراکسیون‌های II و VI کاهش معنی‌داری را نشان داد. این یافته‌ها نشان داد که تزریق فراکسیون‌های مختلف سم عقرب همی/اسکورپیوس/پتوروس می‌تواند با اثر بر هورمون‌های تنظیم‌کننده گلوکز روند متابولیسم را تحت تأثیر قرار داده و موجب تغییراتی در فرآیندهای متابولیسمی شود. شناسایی این اثرات با توجه به اثرات وسیع این هورمون‌ها در متابولیسم و همچنین تغییرات ناشی از فراکسیون‌های سم می‌تواند به درشناسایی هر چه دقیق‌تر مکانیسم‌های سمیت و نیز اتخاذ روش‌های درمانی اختصاصی در موارد عقرب‌گزیدگی کمک‌کننده و مفید باشد.

کلمات کلیدی: همی/اسکورپیوس/پتوروس، فراکسیون، انسولین، گلوکاگون، کورتیزول، گلوکز

مقدمه

تشکیل می‌دهد. این پدیده نیز بیش‌تر در جنوب غرب کشور رخ می‌دهد (Pipelzadeh et al, 2007). عقرب‌ها از شاخه بندپایان (Phylum Arthropoda)، رده عنکبوتیان

سالانه حدود ۵۰ هزار مورد عقرب‌گزیدگی در ایران ثبت می‌شود. مطالعات اپیدمیولوژیک نیز نشان داده است که عقرب‌گزیدگی بیش‌ترین نوع مسمومیت را در کشور

* نویسنده مسئول: محمد راضی جلالی، استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

E-mail: jalali_m@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

مواجهه با سم این عقرب می‌تواند منجر به آسیب‌های متعدد به دستگاه قلبی-عروقی، عصبی و ریوی (Amaral et al, 1992; Ismail et al, 1993) و ایجاد علائم بالینی متنوع نظیر درد، تعریق، تب و افزایش فشار خون و اختلالات عصبی و حتی ایجاد اختلال در پوست گردد (Radmanesh et al, 1998). همچنین در موارد شدیدتر هماچوری ناشی از اثر همولیتیک سم نیز به چشم می‌خورد (Radmanesh, 1990).

در بسیاری موارد عقرب گزیدگی منجر به آزادسازی مقادیر زیادی کتکول‌آمین‌ها و نیز هورمون‌های تنظیم‌کننده متابولیسم (گلوکاگون و کورتیزول) و کاهش ترشح انسولین و مقاومت انسولینی می‌گردد (Devarbhavi and Murthy, 2013). در این شرایط متابولیسم کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و چربی‌ها به سمت کاتابولیسم می‌رود و متعاقباً هایپرگلیسمی ایجاد می‌گردد که با پیش‌آگهی ضعیف در موارد عقرب‌گزیدگی همراه است (Bahloul et al, 2018). با توجه به اهمیت هورمون‌های مورد مطالعه در تنظیم محیط داخلی بدن و احتمال اثر سم این عقرب بر فرآیند تولید هورمون‌ها از یک سو و تغییرات حیاتی ناشی از آن‌ها از سوی دیگر، در این مطالعه تغییرات این هورمون‌ها پس از تزریق سم خام و بدن‌بال آن فراکسیون‌های جدا شده از آن در رت مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه پیامدهای بیماری‌زا، و روندهای ناشی از گزش با این عقرب، مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های حاصل از این مطالعه می‌تواند به اتخاذ تدابیر درمانی مناسب یاری رساند.

مواد و روش کار

این مطالعه روی ۷۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار سالم با میانگین وزنی 20 ± 200 گرم انجام شد. موش‌ها به صورت تصادفی به ۸ گروه مساوی تقسیم شدند. میزان LD₅₀ سم خام $6/2 \text{ mg/kg}$ در نظر گرفته شد و تزریق هر فراکسیون بر اساس درصد حضور آن در سم خام بر حسب 1000 میکروگرم سم خام محاسبه و انجام شد. میزان دوز هر یک از فراکسیون‌ها بر اساس مطالعات قبلی و Table 1

(Class Archnida) و راسته اسکورپیونیدا (Order Scorpionida) هستند. دستگاه سمی آن‌ها در انتهای دم قرار گرفته و شامل دو غده سمی است که در پوشش ضخیم کیتینی جای گرفته است (Di Nicola et al, 2024).

عقرب‌ها نقش مهم و جدی در سلامت جامعه، به ویژه در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری، ایفا می‌کنند (Elmourid et al, 2023; Gueron et al, 2000). بیش از ۱۵۰۰ گونه عقرب در سراسر دنیا شناخته شده است. همی/اسکورپیوس لپتوروس یکی از انواع خطرناک است که در جنوب و جنوب غرب ایران پراکنده و یکی فراوان‌ترین عقرب‌های موجود در خوزستان است (Radmanesh, 1990). این عقرب، همچون سایر عقرب‌ها، می‌تواند سلامت انسان‌ها را به خطر اندازد. سم این عقرب مخلوطی از توکسین‌های مختلف، پپتیدها، آنزیم‌ها، آمین‌ها، لیپیدها و سایر ترکیبات فعال زیستی ناشناخته است (Hmed et al, 2015; Ortiz et al, 2015; Shahbazzade et al, 2007; Srairi et al, 2008). این سموم عمدتاً کانال‌های یونی (Ca, K, Na) را مسدود یا دچار تغییر می‌کنند. توکسین‌هایی که دارای زنجیره بلند (۶۰ تا ۷۰ اسیدآمین) با چهار پیوند دی‌سولفیدی درون زنجیره‌ای هستند بر روی کانال‌های سدیمی عمل می‌کنند و توکسین‌های با زنجیره کوتاه (۳۰ تا ۴۰ توالی اسیدآمین) با سه پیوند دی‌سولفیدی، عمدتاً روی کانال‌های کلر و پتاسیم اثر می‌گذارند (Biggen et al, 2002; Catterall et al, 2007; Goudet et al, 2002). این عمل منجر به طولانی شدن پتانسیل عمل و یا تحریک پی‌درپی سلول‌های عصبی و تجمع یون‌های کلسیم یا سدیم در سلول می‌شود و در نهایت منجر به آزاد شدن غیرفعال نروترانسمیترها از بافت‌های تحت تأثیر می‌گردد (Hill et al, 1981) و ممکن است منجر به عوارض گوناگون همولیتیک، نورو توکسیک و سایتوتوکسیک گردد. همچنین سم این عقرب با ایجاد آسیب‌های بافتی و عروقی، و به واسطه آزادسازی مقادیر زیادی از کتکول‌آمین‌ها اختلالات اندوکرینی و متابولیکی را ایجاد می‌کنند (Petricevich et al, 2010).

گروه چهارم (FII): دریافت FII به میزان $430 \mu\text{g/kg}$
 گروه پنجم (FIII): دریافت FIII به میزان $80 \mu\text{g/kg}$
 گروه ششم (FIV): دریافت FIV به میزان $180 \mu\text{g/kg}$
 گروه هفتم (FV): دریافت FV به میزان $60 \mu\text{g/kg}$
 گروه هشتم (FVI): دریافت FVI به میزان $130 \mu\text{g/kg}$

تعیین گردید (Khataminia, 2020; Yazdkhasti, 2021).
 گروه‌های مورد مطالعه و میزان دریافت سم به صورت تزریق داخل صفاقی عبارتند از:
 گروه اول (C): دریافت 0.5 ml سرم فیزیولوژی
 گروه دوم (FO): دریافت $1000 \mu\text{g}$ سم خام
 گروه سوم (FI): دریافت FI به میزان $120 \mu\text{g/kg}$

Table 1: Protein contents and yields of *Hemiscorpius lepturus* venom fractions

| Parameter | FI | FII | FIII | FIV | FV | FVI |
|----------------|------|-------|------|-------|------|------|
| Protein (mg) | 8.04 | 28.81 | 5.36 | 12.06 | 4.02 | 8.71 |
| Efficiency (%) | 12 | 43 | 8 | 18 | 6 | 13 |

به مدت ۲۴ ساعت لیوفیلیزه شده و با روش برادفورد تعیین غلظت شدند.

برای تعیین غلظت پروتئین فراکسیون‌های به دست آمده، از روش برادفورد استفاده شد. در این روش معرف رنگی کوماسی بلو با اسیدهای آمینه بازی و آروماتیک موجود در پروتئین واکنش داده و بر اساس تغییر بیش‌ترین جذب نوری کوماسی برلیانت بلو G-250 از 450 nm به 595 nm در هنگام اتصال به پروتئین عمل می‌نماید (Bradford, 1976).

جهت بررسی کیفیت فراکسیون‌های جمع‌آوری شده از روش SDS-PAGE استفاده شد. بعد از آماده‌سازی ژل پلی‌آکریل‌امید ۱۸ درصد در مدت زمان ۱۰ ساعت با جریان 30 mA امپر الکتروفورز شده و سپس رنگ‌آمیزی کوماسی برلیانت بلو R250 به مدت ۲۴ ساعت صورت گرفت. بعد از آن رنگ‌بری با 30% درصد استیک اسید و 10% درصد متانول انجام شد و در پایان نتایج با سیستم مستند سازی ژل (Gel Documentation system) ثبت گردید.

در زمان‌های ۱، ۳، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از اتمام تزریق سم و فراکسیون‌ها، از کلیه گروه‌ها (هر بار از ۳ سر رت) پس از بیهوش نمودن با 60 mg/kg پنتوباریتال سدیم به صورت تزریق داخل صفاقی، از طریق داخل قلبی خون-گیری شد. نمونه‌های خون در کنار هپارین جمع‌آوری شده و پس از سانتیفریژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت 4000 دور پلاسما جداسازی شد.

پس از خرید و جمع‌آوری حدود ۱۰ هزار عقرب، با استفاده از دستگاه شوک الکتریکی با ولتاژ ۱۲۷-۶ سم‌گیری انجام شد (موسسه رازی اهواز). بعد از هر بار سم‌گیری، سموم استحصال شده در دمای 20°C - نگهداری شدند. سپس با استفاده از دستگاه خشک‌کننده در خلأ در دمای 56°C و فشار 0.03 اتمسفر به مدت ۴۸ ساعت لیوفیلیزه شدند. آنگاه به کمک دستگاه سانتیفریوژ (به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۳ هزار در دقیقه) هموژنیزه گردید. پس از آن محلول رویی که حاوی پروتئین‌های سم است از رسوب سم جدا شده و مایع شفاف به دست آمده جهت آزمایشات بعدی در فریزر 20°C - درجه سلسیوس نگهداری شدند.

جهت آماده‌سازی ستون، 10 g رزین سفادکس G50 (فارماسیا، سوئد)، در بافر آمونیوم 20 mM میلی‌مولار با $\text{pH}=8.5$ مخلوط شده و ستون طبق پروتکل‌های استاندارد آماده شدند. پس از آن ستون با سه برابر حجم آمونیوم استات 20 mM میلی‌مولار شستشو داده شده و متعادل گردید. مقدار 50 g میلی‌گرم سم آماده شده به ستون تزریق گردیده و اجزاء با سرعت جریان 0.3 میلی‌لیتر در دقیقه توسط دستگاه خشک‌کننده در خلأ در مدت زمان ۱۸ ساعت جمع‌آوری شدند. طول موج شناسایی به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر ماوراء بنفش در طول موج 280 nm جمع‌آوری شدند و کروماتوگرام نهایی منحنی جذب لوله‌ها با نرم افزار Unicorn به دست می‌آید. اجزاء تهیه شده در دستگاه خشک‌کن انجام‌دای در دمای 56°C - و فشار 0.04 اتمسفر

نتایج
نتایج حاصل از تزریق فراکسیون‌های سم و سم خام در مقایسه با گروه شاهد به تفکیک به شرح زیر می‌باشد:

گلوکز
همان طور که از Table 2 قابل مشاهده است، تزریق سم خام و تمامی فراکسیون‌ها منجر به افزایش معنی‌دار میزان گلوکز نسبت به گروه کنترل شد ($P \leq 0.05$).

به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های هورمونی شامل مقادیر انسولین، گلوکاگون، کورتیزول به روش الیزا با استفاده از کیت‌های اختصاصی رت (ساندیاگو، آمریکا) و همچنین مقادیر گلوکز به روش گلوکز اکسیداز با استفاده از اتوانالایزر (BT-1500, Biotecnica, ایتالیا) اندازه‌گیری شدند.

داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۴ و آزمون آنالیز واریانس و آزمون تکمیلی Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌داری نیز کوچک‌تر و مساوی ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

Table 2: Mean \pm Standard Deviation of Glucose (mg/dl) after injection of *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom fractions in Different Groups and Times

| Group | Sampling time | | | |
|-------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| | 1 h | 3 h | 24 h | 72 h |
| C | 101.66 \pm 3.51 | 94.00 \pm 7.00 | 92.00 \pm 7.81 | 91.00 \pm 4.52 |
| F0 | 154.75 \pm 6.44** | 130.75 \pm 2.21** | 120.5 \pm 5.91* | 118 \pm 4.32* |
| FI | 125.33 \pm 10.14* | 128 \pm 10.14** | 124.33 \pm 4.72* | 125.33 \pm 2.51* |
| FII | 131.33 \pm 4.50** | 127.00 \pm 3.60* | 123.33 \pm 2.08* | 123.00 \pm 4.24* |
| FIII | 118.00 \pm 2.64* | 125.33 \pm 1.52* | 118.66 \pm 5.50* | 119.66 \pm 5.68* |
| FIV | 117.00 \pm 3.60* | 118.00 \pm 5.56* | 113.00 \pm 6.08* | 116.66 \pm 8.02* |
| FV | 122.00 \pm 5.29* | 118.66 \pm 7.23* | 122.66 \pm 5.50* | 123.00 \pm 6.55* |
| FVI | 138.33 \pm 4.16** | 138.33 \pm 3.05** | 133.66 \pm 6.11** | 135.00 \pm 7.09* |

* $P \leq 0.05$ compare with control group ** $P \leq 0.001$ compare with control group

انسولین

تزریق منجر به کاهش سطح انسولین گردید که این کاهش نیز از نظر آماری معنی‌دار بود.

Table 3 نشان داد که تزریق سم خام در تمامی زمان‌ها و تزریق فراکسیون‌های II و VI در ساعت ۱ و ۳ پس از

Table 3: Mean \pm standard deviation of insulin (pg/ml) after injection of *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom fractions in different groups and times

| Group | Sampling time | | | |
|-------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | 1 h | 3 h | 24 h | 72 h |
| C | 11.48 \pm 0.70 | 11.62 \pm 0.63 | 12.70 \pm 1.07 | 12.94 \pm 1.23 |
| F0 | 8.83 \pm 0.66* | 4.28 \pm 0.78** | 7.92 \pm 0.47* | 8.12 \pm 0.23* |
| F1 | 11.02 \pm 0.50 | 12.02 \pm 0.50 | 12.62 \pm 0.43 | 12.96 \pm 0.50 |
| FII | 9.91 \pm 0.19* | 8.99 \pm 0.23* | 10.21 \pm 0.47 | 11.08 \pm 0.48 |
| FIII | 10.06 \pm 56.95 | 10.34 \pm 0.45 | 10.12 \pm 0.18 | 11.27 \pm 0.46 |
| FIV | 12.84 \pm 0.21 | 12.16 \pm 0.23 | 11.42 \pm 0.64 | 12.80 \pm 0.25 |
| FV | 11.12 \pm 0.66 | 11.40 \pm 0.48 | 12.09 \pm 0.43 | 11.77 \pm 0.17 |
| FVI | 9.05 \pm 0.71* | 8.00 \pm 0.66* | 12.53 \pm 0.51 | 11.53 \pm 0.41 |

* $P \leq 0.05$ compare with control group ** $P \leq 0.001$ compare with control group

کورتیزول

زمان‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود. همچنین میانگین مقادیر این هورمون در فراکسیون II و VI در تمامی ساعت‌های مورد مطالعه به صورت معنی‌داری افزایش یافته است.

نتایج مندرج در Table 4 نشان داد که میانگین کورتیزول پس از تزریق سم خام در تمامی ساعت‌های مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل افزایش یافته که این افزایش در تمامی

Table 4: Mean \pm standard deviation of cortisol (pg/ml) after injection of *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom fractions in different groups and times

| Group | Sampling time | | | |
|-------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| | 1 h | 3 h | 24 h | 72 h |
| C | 3.10 \pm 0.12 | 3.25 \pm 0.34 | 2.78 \pm 0.30 | 2.66 \pm 0.24 |
| F0 | 12.95 \pm 1.72** | 11.48 \pm 0.61** | 9.49 \pm 0.56** | 9.51 \pm 0.23** |
| F1 | 3.56 \pm 0.21 | 3.00 \pm 0.21 | 3.43 \pm 0.43 | 3.70 \pm 0.51 |
| FII | 6.87 \pm 2.71** | 5.87 \pm 0.98** | 5.05 \pm 0.78** | 4.06 \pm 0.14* |
| FIII | 3.67 \pm 0.43 | 3.14 \pm 0.28 | 3.15 \pm 0.17 | 2.90 \pm 0.18 |
| FIV | 3.89 \pm 0.53 | 3.47 \pm 0.63 | 3.12 \pm 0.14 | 3.23 \pm 0.36 |
| FV | 3.97 \pm 0.18 | 3.57 \pm 0.63 | 3.22 \pm 0.45 | 3.14 \pm 0.23 |
| FVI | 5.72 \pm 0.51** | 4.12 \pm 0.83* | 3.48 \pm 0.39 | 2.77 \pm 0.60 |

P \leq 0.05 compare with control group **P \leq 0.001 compare with control group*

گلوکاگون

زمان‌های ۱ و ۳ ساعت بعد از تزریق به طور معنی‌داری افزایش یافته است.

همان طور که در Table 5 قابل مشاهده است، میانگین گلوکاگون پس از تزریق سم خام در تمامی ساعت‌های مورد مطالعه و پس از تزریق فراکسیون‌های II و VI در

Table 5: Mean \pm standard deviation of glucagon (pg/ml) after injection of *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom fractions in different groups and times

| Group | Sampling time | | | |
|-------|---------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| | 1 h | 3 h | 24 h | 72 h |
| C | 113.5 \pm 7.77 | 106.00 \pm 7.54 | 103.00 \pm 7.70 | 101.12 \pm 4.54 |
| F0 | 160.50 \pm 6.24** | 171.75 \pm 11.23** | 132.00 \pm 6.05* | 131.01 \pm 4.52* |
| F1 | 121 \pm 4.50 | 113.66 \pm 4.50 | 107.00 \pm 4.58 | 104.33 \pm 3.78 |
| FII | 142.00 \pm 3.60* | 137.00 \pm 7.60* | 116.00 \pm 6.24 | 116.50 \pm 14.84 |
| FIII | 110.5 \pm 8.88 | 107.66 \pm 5.50* | 107.00 \pm 4.58 | 107.00 \pm 5.00 |
| FIV | 114.33 \pm 4.72 | 104.66 \pm 2.51 | 98.33 \pm 2.51 | 107.33 \pm 5.03 |
| FV | 111.33 \pm 4.61 | 103.00 \pm 9.16 | 97.33 \pm 5.03 | 104.66 \pm 3.05 |
| FVI | 136.33 \pm 5.50* | 126.66 \pm 3.05* | 115.66 \pm 7.57 | 107.00 \pm 4.58 |

*P \leq 0.05 compare with control group **P \leq 0.001 compare with control group

بحث

Bagheri-) و خواص درمانی دیگر (Mehr et al, 2023) شناسایی اثرات هر یک از اجزای سم علاوه بر اهمیت آن در مباحث درمانی در شناخت هر چه بهتر عوارض سم نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مطالعات انجام شده بر اثرات انواع سم عقرب‌ها در

امروزه از سم عقرب و خالص سازی توکسین‌های آن برای تهیه آنتی‌ونوم و درمان عوارض مختلف عقرب‌گزیدگی استفاده می‌شود (Abroug et al, 2020; Godoy et al, 2021; Lergos et al, 2001). در کنار فواید پرشمار آن نظیر درمان برخی از اختلالات بدخیم، (Setayesh-

حیوانات آزمایشگاهی نشان داده است که کلیه اثرات ناشی از زهر این عقرب‌ها مربوط به پلی‌پپتیدهای با وزن ملکولی پایین بوده که به عنوان توکسین‌های اصلی زهر عقرب قلمداد می‌شوند (Legros et al, 2001).

نتایج این مطالعه نشان داد که سم خام و برخی فراکسیون‌های عقرب همی/اسکورپیوس/پتوروس موجب افزایش آزادسازی هورمون‌های گلوکاگون و کورتیزول و همچنین کاهش ترشح انسولین می‌گردد که به دنبال آن میزان ترشح گلوکز افزایش می‌یابد. بیش‌تر تغییرات ناشی از سم و فراکسیون‌های II و VI در زمان‌های ۱ و ۳ ساعت پس از تزریق بوده و حکایت از اثرات سریع سم بر پارامترهای مورد نظر و به تبع آن سایر متابولیت‌ها بوده است.

این نتایج با یافته‌های حاصل از بررسی سایر عقرب‌ها در خصوص افزایش گلوگاگون (Johanson et al, 1976)، افزایش کورتیزول (Gureon et al, 1987; Freire et al, 1987) و کاهش سطح انسولین (Murthy et al, 1986) هم‌خوانی دارد. بنابراین در این شرایط این انتظار وجود دارد که متابولیسم کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و چربی‌ها به سمت کاتابولیسم هدایت شود. این رخداد نیز موجب تحریک گلوکوئوتوز و افزایش گلوکز سرم می‌گردد. در این حالت اسیدهای چرب آزاد و به عنوان سوخت برای متابولیسم رقابت می‌کنند. عوارض هایپرگلیسمی نیز با کاهش سطح سیتوکاین‌های پیش التهابی، افزایش ترشح انسولین و افزایش فعالیت گلوکوتائون پراکسیداز همراه است. بنابراین، مسمومیت منجر به افزایش گلوکز سرم و هایپرگلیسمی می‌شود (Murthy et al, 1988). Omran و همکاران (۱۹۹۲) و Zare و همکاران (۱۹۹۴) نیز بر این باور بودند که سم خام این عقرب منجر به هایپرگلیسمی در مدل حیوانی می‌شود. در مطالعات مشابه دیگر نیز افزایش سطح گلوکز خون ۱، ۲ و ۴ ساعت پس از تزریق سم این عقرب گزارش شده است (Salman et al, 2017). Arjmand و همکاران (۲۰۱۵) نشان داده‌اند که بیش‌ترین اثرات سم عقرب همی/اسکورپیوس/پتوروس در

قربانیان این عقرب بر پانکراس، سلول‌های عصبی و طحال بوده است. از طرفی با ایجاد طوفان اتونومیک در اثر عقرب گزیدگی، تولید کتکول آمین‌ها اتفاق می‌افتد و این خود منجر به ترشح کورتیزول و گلوکاگون و افزایش سطح هورمون‌های تیروئیدی خواهد شد و در نتیجه منجر به کاهش سطح انسولین و افزایش قند خون می‌گردد. Bahloul و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهشی به بررسی مکانیسم‌ها و پیامدهای هایپرگلیسمی ناشی از عقرب گزیدگی پرداختند نشان دادند که سم عقرب پس از تأثیر بر بافت‌های مختلف و متعاقب افزایش استرس و مقاومت انسولینی، منجر به هایپرگلیسمی می‌گردد. در مطالعات مشابه دیگر نیز مشخص شده است که سم این عقرب می‌تواند منجر به ایجاد پانکراتیت گردد (Fletcher et al, 2010). همچنین مشخص شده است که القا مستقیم سم این عقرب در پانکراس موش صحرایی نیز منجر به مهار ترشح انسولین و تحریک ترشح گلوکاگون می‌شود (Johnson et al, 1976). از این روی می‌توان بیان نمود که آزاد شدن گلوکاگون به دنبال سم عقرب به دلیل آزاد شدن نوراپی نفرین از پایانه‌های عصبی آدرنژیک پانکراس است، همچنین احتمالاً سم این عقرب محرک مؤثرتری نسبت به نوراپی نفرین در ترشح گلوکاگون از سلول‌های پانکراس است (Salman et al, 2017). در مطالعه Razi Jalali و همکاران (۲۰۲۰) بر اثرات سم عقرب مزوبوتوس/پتوس نشان داده شد که سم این عقرب موجب سرکوب ترشح هورمون‌های T₃، T₄ و انسولین و همچنین تحریک ترشح گلوکاگون و کورتیزول گردیده و منجر به هایپرگلیسمی می‌شود. Moghadam و همکاران (۲۰۰۹) نیز به بررسی اثرات این عقرب روی پارامترهای بیوشیمیایی پرداختند. نتایج مطالعه آنان نشان از آن داشت که در اغلب موارد، گلوکز خون در یک ساعت اول پس از مسمومیت به میزان کم‌تر از ۶۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر کاهش می‌یابد و سطح کلسترول، تری‌گلیسیرید و پروتئین کل به طور معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند. اما، سایر پارامترها مانند اوره، کراتینین و اسید اوریک بدون تغییر باقی می‌مانند. آنان بر اساس

خفیف پرز را نشان دهند و فعالیت آنزیمی کراتین کیناز و لاکتات دهیدروژناز نیز به صورت معنی داری در سرم در ۹ ساعت افزایش یابد. اما آنان هیچ ضایعه نکروزی در ریه‌ها و کبد مشاهده نکردند.

همچنین بر اساس نتایج این مطالعات مشخص شده است که تأثیر سم این عقرب بر ارگان‌ها مختلف وابسته به دوز می‌باشد. مطالعات مشابه نظیر Salman و همکاران (۲۰۱۷) نیز اثرات مختلفی با دوزهای مختلف تجویز سم عقرب مشاهده کردند.

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده شد که ترکیبات متفاوت با اثرات متنوعی در اجزای پروتئینی سم عقرب وجود داشته که تفکیک هر چه بیش تر آن‌ها با بهره‌گیری از تکنولوژی‌های جدید می‌تواند اطلاعات بیش تری را در ارتباط با فرآیندای بیماری‌زایی و عوارض جدی ناشی از گزش با این گونه خطرناک را در اختیار قرار دهد. اثرات فراکسیون‌های سم عقرب همی/سکورپیوس/لیتوروس بر افزایش سطح هورمون‌های گلوکاکگون و کورتیزول و کاهش سطح انسولین نشان دهنده امکان بروز بسیاری از تغییرات متابولیسمی به دنبال گزش این عقرب بوده و به نوعی تأیید کننده مخاطرات جدی ناشی از این عقرب خواهد بود. طبیعتاً انجام این مطالعه به عنوان دستاورد اولیه‌ای برای انجام مطالعات دقیق‌تر و جزئی‌تر به شمار می‌رود.

مشاهدات خود اذعان داشتند که علت تغییرات بیوشیمیایی، به دلیل افزایش ترشح کاتکول آمین‌ها و افزایش شدید انسولین در ۳۰ دقیقه اول پس از مسموم شدن است و پس از آن به دلیل کاهش سطح انسولین، میزان گلوکز افزایش می‌یابد.

مطالعات دیگر انجام شده بر سایر اثرات سمی این عقرب نشان دهنده اثرات منفی بر سایر ارگان‌های بدن بوده است (Brady et al, 2023). به طور مثال Dehghani و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که سم این عقرب می‌تواند هم به صورت موضعی و به صورت سیستمی به ارگان‌های مختلف با درجات مختلف کبد (۷۶ درصد)، کلیه (۶۸ درصد) و ریه (۶۶ درصد) آسیب رساند. در مطالعات مشابه درصدهای مشابه دیگری نظیر کبد (۷۶ درصد)، کلیه (۳۵ درصد) و طحال (۲۷ درصد) گزارش کرده‌اند (Dehghani et al, 2004). برخی نیز بر این باورند که آسیب وارده می‌تواند منجر به نارسایی کلیوی و مرگ بیمار گردد (Rahmani et al, 2012; Shahi et al, 2015). Heidarpour و همکاران (۲۰۱۲) نیز در مشاهدات بافت-شناسی خود دریافتند که سم همی/سکورپیوس/لیتوروس منجر به تغییرات دژنراتیو کلیه به همراه تغییر در گلوبولین‌ها می‌شود و این تغییرات در ۶ ساعت پس از مواجهه به حداکثر میزان خود می‌رسد. آنان همچنین دریافتند که سم این عقرب موجب می‌شود تا روده‌ها ادم لامینا پروپریا و نکروز

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات کارشناسان محترم موسسه واکسن و سرم سازی رازی اهواز و همچنین آقای تونی، کارشناس محترم بخش کلینیکال پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز و سایر همکاران بخش تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافی ندارند.

منابع مالی

منابع مالی این پژوهش از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین گردیده است.

- Abroug, F., Ouanes-Besbes, L., Tilouche, N., & Elatrous, S. (2020). Scorpion envenomation: state of the art. *Intensive care medicine*, 46(3): 401-410.
- Amaral, C. F. S., de Rezende, N. A., & Freire-Maia, L. (1993). Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. *The American journal of cardiology*, 71(2): 242-245.
- Arjmand, M., Akbari, Z., Taghizadeh, N., Shahbazzadeh, D., Zamani, Z. (2015). NMR-based metabonomics survey in rats envenomed by *Hemiscorpius lepturus* venom. *Toxicon*, 94: 16-22.
- Bahloul, M., Souissi, B., Turki, O., Dlela, M., Ben Mahfoudh, K., & Bouaziz, M. (2018). Evidence of direct toxicological effects of scorpion venom on central nervous system in tunisian children. *Hindawi, Case Reports in Critical Care*, <https://doi.org/10.1155/2018/8304375>.
- Bagheri-Ziari, S., Shahbazzadeh, D., Sardari, S., Sabatier, J. M., & Pooshang Bagheri, K. (2021). Discovery of a new analgesic peptide, leptucin, from the iranian scorpion, *Hemiscorpius lepturus*. *Molecules*, 26(9): 2580.
- Biggin, P. C., Roosild, T., & Choe, S. (2000). Potassium channel structure: domain by domain. *Current opinion in structural biology*, 10(4): 456-461.
- Brady, M. F., Kumar, P., Currier, C., & Ruha, A. M. (2023). Treatment of Scorpion Envenomations in the Middle East: Understanding the Stinging Controversy. *Wilderness & Environmental Medicine*, 34(2), doi.org/10.1016/j.wem.2023.01.001.
- Catterall, W. A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Frank, H. Y., Konoki, K., & Scheuer, T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49(2): 124-141.
- Dehghani R, Rastegar Pouyani N, Dadpour B, Keyler D, Panjehshahi M, Jazayeri M, et al. (2016). A survey on non-venomous snakes in Kashan (Central Iran). *Journal of Biology and Today's World*, 5(4):65-75.
- Dehghani, R., Khamechian, T., Vazirianzadeh, B., Vatandoost, H., & Moravvej, S. A. (2012). Toxic effects of scorpion, *Hemiscorpius lepturus* (Hemiscorpiidae) venom on mice. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 22(3): 593-596.
- Dehghani, R., Khamechian, T., Vatandoost, H., Asadi, M. A., & Mosavi, G. A. (2004). The effect of *Hemiscorpius lepturus* venom on pathologic changes of rat oranges. *Quarterly Research Journal of Lorestan University of Medical Sciences and Health Services*, 6(22): 37-41.
- Devarbhavi, P.K., & Vasudeva Murthy, C.R. (2013). Scorpion sting envenomation - an overview. *Journal of Clinical Biomedicine and Science*, 3:159-166.
- Di Nicola, M. R., Colombo, M., Kass, G. E. N., Paolino, G., Strong, P. N., & Dorne, J. L. C. M. (2024). Scorpions: Taxonomy, anatomy, medical relevance, venom composition, pharmacology, toxicology and clinical management. *Encyclopedia of Toxicology*, 8: 445-456.
- Elmourid, A., Boussaa, S., El Hidan, M. A., Amahmid, O., & Touloun, O. (2023). Epidemiological, toxicological and physiopathological characteristics of scorpion stings and their management in Morocco: A literature review. *Acta tropica*, 239, 106812.
- Fletcher, M. D., Weninger, K., Anderson, T. E., & Martin, B. M. (2010). Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10): 7405-7416.
- Freire-Maia, L., & Campos, J. A. (1987). On the treatment of the cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon*, 25(2):125-130.
- Godoy, D. A., Badenes, R., Seifi, S., Salehi, S., & Seifi, A. (2021). Neurological and systemic manifestations of severe scorpion envenomation. *Cureus*, 13(4), [doi: 10.7759/14715](https://doi.org/10.7759/14715)
- Goudet, C., Chi, C. W., & Tytgat, J. (2002). An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi Karsch*. *Toxicon*, 40(9): 1239-1258.
- Gueron, M., & Ovsyshcher, I. (1987). What is the treatment for the cardiovascular manifestations of scorpion envenomation?. *Toxicon: Official journal of the International Society on Toxinology*, 25(2): 121-130.
- Gueron, M., Iliia, R., & Margulia, G. (2000). Arthropod poisons and the cardiovascular system. *The American journal of emergency medicine*, 18(6), 708-714.
- Heidarpour, M., Ennaifer, E., Ahari, H., Srairi-Abid, N., Borchani, L., Khalili, G., ... & Shahbazzadeh, D. (2012). Histopathological changes induced by *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom in mice. *Toxicon*, 59(3), 373-378.

- Hill, R. G. (1981). The status of naloxone in the identification of pain control mechanisms operated by endogenous opioids. *Neuroscience Letters*, 21(2), 217-222.
- Hmed, B., Serria, H. T., & Mounir, Z. K. (2013). Scorpion peptides: potential use for new drug development. *Journal of toxicology*, 2013.
- Ismail, M., Fatani, A. J., & Dabees, T. T. (1992). Experimental treatment protocols for scorpion envenomation: a review of common therapies and an effect of kallikrein-kinin inhibitors. *Toxicon*, 30(10): 1257-1279.
- Johnson, D. G., & Ensinnck, J. W. (1976). Stimulation of glucagon secretion by scorpion toxin in the perfused rat pancreas. *Diabetes*, 25(8), 645-649.
- Johnson, D. G., Henry, D. P., Moss, J., & Williams, R. H. (1976). Inhibition of insulin release by scorpion toxin in rat pancreatic islets. *Diabetes*, 25(3), 198-201.
- Khataminia, A., Razi Jalali, M., Jalali, S. M., & Jafari, H. (2020). The Effect of Various Fractions of *Hemiscorpius lepturus* Scorpion (Scorpionida: Hemiscorpiidae) Venom on Hemostatic System in Peripheral Blood of Rats in Comparison to Whole Venom. *Jundishapur Journal of Health Sciences*, 12(3), e102586.
- Legros, C., Kaabi, H., El Ayeb, M., Céard, B., Vacher, H., Bougis, P. E., & Martin-Eauclaire, M. F. (2001). Use of fusion protein constructs to generate potent immunotherapy and protection against scorpion toxins. *Vaccine*, 20(5-6): 934-942.
- Moghadam, A. T., Masihpour, B., Bakhshandeh, N., & Navidpour, S. (2009). Biochemical manifestation of *Mesobuthus eupeus* envenomation in human. *Biochemical and Cellular Archives*, 9(1), 83-85.
- Murthy, K. R., & Ag, J. (1986). Reduced insulin secretions in acute myocarditis produced by scorpion (*Buthus tamulus*) venom injection in rabbits. *Indian Heart J.*
- Murthy, K. R., Zolfagharian, H., Medh, J. D., Kudalkar, J. A., Yeolekar, M. E., Pandit, S. P., ... & Billimoria, F. R. (1988). Disseminated intravascular coagulation & disturbances in carbohydrate & fat metabolism in acute myocarditis produced by scorpion (*Buthus tamulus*) venom. *Indian Journal of Medical Research*, 87: 318.
- Omran, M. A., & Abdel-Rahman, M. S. (1992). Effect of scorpion *Leiurus quinquestriatus* (H&E) venom on the clinical chemistry parameters of the rat. *Toxicology letters*, 61(1): 99-109.
- Ortiz, E., Gurrola, G. B., Schwartz, E. F., & Possani, L. D. (2015). Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*, 93: 125-135.
- Petricevich, V. L. (2006). Balance Between Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Mice Treated With *Centruroides noxius* Scorpion Venom. *Mediators of Inflammation*, 6(6):54273, doi: 10.1155/MI/2006/54273.
- Pipelzadeh, M. H., Jalali, A., Taraz, M., Pourabbas, R., & Zaremirakabadi, A. (2007). An epidemiological and a clinical study on scorpionism by the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus*. *Toxicon*, 50(7): 984-992.
- Radmanesh, M., 1990. Clinical study of *Hemiscorpius lepturus* in Iran. *Journal of tropical medicine and hygiene*. 93: 327-332.
- Radmanesh, M., 1998. Cutaneous manifestations of the *Hemiscorpius lepturus* sting: a clinical study. *International Journal of Dermatology*. 37, 500-507.
- Rahmani, A. H., & Jalali, A. (2012). Symptom patterns in adult patients stung by scorpions with emphasis on coagulopathy and hemoglobinuria. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 18: 427-431.
- Razi Jalali, M., Jalali, S. M., Jafari, H., & Babakhan, M. (2020). An Experimental Study of the Effects of *Mesobuthus eupeus* Scorpion Venom on Plasma Concentrations of Metabolic Hormones and Glucose in Rats. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 14(1).
- Salman, M. M., & Hammad, S. (2017). Oxidative stress and some biochemical alterations due to scorpion (*Leiurus quinquestriatus*) crude venom in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91: 1017-1021.
- Setayesh-Mehr, Z., Asoodeh, A., & Ghasemi, L. V. (2023). The Anti-cancer Effect of Two Extract Fractions from the *Hemiscorpius lepturus* Scorpion Venom. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 59(6): 850-857.
- Shahbazzadeh, D., Srairi-Abid, N., Feng, W., Ram, N., Borchani, L., Ronjat, L., et al. (2007). Hemicalcin, a new toxin from the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus* which is active on ryanodine-sensitive Ca²⁺ channels. *The Biochemical journal*, 404(1): 89-96.
- Shahi, M., Rafinejad, J., Az-Khosravi, L., & Moosavy, S. H. (2015). First report of death due to *Hemiscorpius acanthocercus* envenomation in Iran: Case report. *Electronic physician*, 7(5): 1234.

Srairi-Abid, N., Shahbazzadeh, D., Chatti, I., Mlayah-Bellalouna, S., Mejdoub, H., Borchani, L., Benkhalifa, R., Akbari, A. and El-Ayeb, M. (2008). Hemitoxin, the first potassium channel toxin from the venom of the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus*. *FEBS Journal*, 275(18): 4641-4650.

Yazdkhasti, M., Razi Jalali, M., Khadjeh, G. H., Jafari, H., & Rezaie, A. (2021). Cardiotoxic effects of *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom

fractions in rats. *Iranian Journal of Toxicology*, 15(1): 27-36.

Zare, M. A., Murthy, K. R. K., & Haghazari, L. (1994). Scorpion venom poisoning in experimental animals. *Archives of Razi Institute journal*, 44(45): 67-72.

Received: 08.01.2024

Accepted: 29.01.2024

بررسی اثر ژل رویال بر تغییرات هیستوپاتولوژیک و بیوشیمیایی ریه موش‌های صحرائی متعاقب مسمومیت با آرسنیک تری اکساید

حسین محمدی^۱، بابک محمدیان^{۲*}، حسین نجف‌زاده‌ورزی^۳ و علی شهریار^۴

^۱ دانش‌آموخته دکتری تخصصی پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۳ استاد گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۴ دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۴

چکیده

گونه‌های فعال اکسیژن و آسیب اکسیداتیو اصلی‌ترین عوامل دخیل در آسیب‌های بافتی ناشی از آرسنیک تری اکساید است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات محافظتی ژل رویال بر پارامترهای استرس اکسیداتیو و آسیب‌های هیستوپاتولوژیک وارده بر بافت ریه ناشی از مسمومیت با آرسنیک تری اکساید بوده است. ۴۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار آلبینو به مدت ۳۰ روز به صورت خوراکی آرسنیک تری اکساید و ژل رویال دریافت کردند و به صورت تصادفی در ۸ گروه پنج تایی تقسیم شدند؛ گروه اول نرمال سالین را با دوز ۱ mg/kg، گروه دوم ژل رویال را با دوز ۱۵۰ mg/kg، گروه سوم آرسنیک تری اکساید را با دوز ۱ mg/kg، گروه چهارم آرسنیک تری اکساید (۱ mg/kg) را به همراه ژل رویال با دوز ۱۵۰ mg/kg، گروه پنجم آرسنیک تری اکساید (۱ mg/kg) را به همراه ژل رویال با دوز ۱۰۰ mg/kg، گروه ششم آرسنیک تری اکساید (۱ mg/kg) را به همراه ژل رویال با دوز ۱۰۰ mg/kg، گروه هفتم آرسنیک تری اکساید (۱ mg/kg) را به همراه ویتامین E با دوز ۱۰۰ mg/kg، گروه هشتم آرسنیک تری اکساید (۱ mg/kg) را به همراه ویتامین E و ژل رویال (هر دو) با دوز ۱۰۰ mg/kg دریافت کردند. سپس فراسنجه‌های استرس اکسیداتیو شامل: مالون دی آلدئید (MDA)، گلووتاتیون پراکسیداز (GPx)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین آسیب‌های وارده به بافت ریه از طریق رنگ‌آمیزی بافتی همتوکسیلین-ئوزین مورد سنجش قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آرسنیک تری اکساید سبب افزایش MDA و کاهش GPx، SOD و CAT گردید. درمان با ژل رویال باعث کاهش سطح MDA و افزایش غلظت GPx، SOD و CAT در بافت ریه گردید. همچنین شدت آسیب‌های بافتی ریه کاهش یافت. به طور کلی ژل رویال سبب کاهش استرس اکسیداتیو و آسیب‌های بافتی ریه گردید.

کلمات کلیدی: آرسنیک تری اکساید، ژل رویال، ریه، استرس اکسیداتیو

مقدمه

آن به سه شکل گازی، آلی و معدنی موجود است. این ماده معمولاً از انحلال مواد معدنی ناشی از پساب‌های صنعتی و

آرسنیک یک عنصر فلزی سمی قوی محیطی است که به طور گسترده در خاک، آب و غذا یافت می‌شود. ترکیبات

* نویسنده مسئول: بابک محمدیان، دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

E-mail: mohammadb@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

ژنوتوکسیسیتی بر روی سلول‌های انسانی، تغییرات بافتی دژنراتیو و بی‌ثباتی ساختار اسکلت سلولی نیز از آسیب‌های مسمومیت با آرسنیک می‌باشند (Abdollahzade et al, 2021).

مکانیسم‌های مختلفی در مطالعات قبلی به عنوان واسطه‌های سلولی و مولکولی پیشنهاد شده بود، که بیش‌تر آن‌ها نشان می‌دهد که نقش استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد در این مسمومیت قابل توجه است که منجر به افزایش استفاده درمانی از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی و عوامل شل‌کننده شده است (Flora et al, 2007). مطالعات قبلی نشان می‌داد که استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی در برابر پاتوفیزیولوژی اندام‌هایی که در معرض مواد شیمیایی قرار می‌گیرند، مفید است (Yun et al, 2016). به تازگی، ژل رویال به دلیل مطالعاتی که نشان داده است یک آنتی-اکسیدان بسیار کارآمد است و دارای قابلیت حذف رادیکال‌های آزاد است، مورد توجه خاصی قرار گرفته است (Cemek et al, 2010; Silici et al, 2011). ژل رویال توسط غدد زیر حلق و فک پایین زنبورهای عسل کارگر (*Apis mellifera*) ترشح می‌شود. ژل رویال حاوی بسیاری از ترکیبات مهم با فعالیت بیولوژیکی مانند اسیدهای آمینه آزاد، پروتئین‌ها، قندها، اسیدهای چرب، مواد معدنی و ویتامین‌ها است (Nakajima et al, 2009). تا کنون مشخص شده است که ژل رویال دارای چندین فعالیت فیزیولوژیکی در حیوانات آزمایشگاهی از جمله فعالیت‌های گشاد کننده عروق و کاهش فشار خون، القای کاهش سطح کلسترول سرم، ضد میکروبی، ضد حساسیت، ضد التهابی، تنظیم کننده سیستم ایمنی و خواص آنتی‌اکسیدانی است (Abdollahzade et al, 2021).

در مطالعات پیشین اثرات آنتی‌اکسیدانی‌های فراوانی از جمله ملاتونین، رزوراترول، آسکوربیک اسید و آلفا توکوفرول در پیش‌گیری از اثرات زیان‌بار مسمومیت با آرسنیک تری اکساید بررسی شده است (Abdollahzade et al, 2021; Mukhopadhyay et al, 2013; Zhang et al, 2013). تا کنون مطالعه‌ای بر روی اثرات ژل رویال در

معدنی و رسوبات جوی وارد آب می‌شود. در سال‌های اخیر، به دلیل توسعه صنعتی و افزایش آلودگی، میزان آرسنیک نیز افزایش یافته است (Jomova et al, 2011). میلیون‌ها نفر در سراسر جهان، عمدتاً در کشورهای در حال توسعه، به دلیل انتشار گازهای گلخانه‌ای ناشی از فعالیت‌های معدنی، استفاده از صنایع یا آفت‌کش‌ها، یا آب چاه‌های آلوده از قرار گرفتن در معرض آرسنیک مزمن رنج می‌برند (Burchiel et al, 2009; States et al, 2011). متداول‌ترین راه برای افزایش در معرض قرار گرفتن محیط زیست به آرسنیک معدنی در سراسر جهان از طریق آب آشامیدنی است. قرار گرفتن مزمن در معرض آرسنیک باعث ایجاد طیف گسترده‌ای از اثرات سمی می‌شود و بنابراین، این فلز در گروه یک سرطان‌زا در انسان طبقه‌بندی می‌شود (آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان) (Mukhopadhyay et al, 2013). قرار گرفتن در معرض آرسنیک با افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های ریوی همراه است، که ممکن است آن را به سمی منحصر به فرد که منجر به سرکوب ایمنی ذاتی و ضایعات ریوی می‌شود، تبدیل کند (Kozul et al, 2009; Zhao et al, 2012). جدا از این اثرات مضر، آرسنیک تری اکسید (As_2O_3) دارای اثرات قابل ملاحظه‌ای در درمان افراد مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتیک حاد عود کننده و مقاوم است (Zhang et al, 2010). آرسنیک و ترکیبات آن در داروهای سرطان، شیشه، سرامیک، مواد رنگی، آلیاژهای فلزی و صنایع دامداری و کشاورزی نیز استفاده می‌شود (Xu et al, 2019). مسمومیت با آرسنیک یک موضوع بهداشتی است که اهمیت زیادی برای سلامت انسان دارد و اغلب باعث انواع بیماری‌ها از جمله دژنراسیون کبدی، التهاب، نکروز و آپوپتوز می‌شود (Abdollahzade et al, 2021). از جمله مشکلاتی که ایجاد می‌کند شامل اختلالات عصبی، سرطان‌ها، کم خونی، بیماری‌های قلبی عروقی، ریوی، کبدی، دیابت، ضایعات پوستی و اختلالات غدد درون‌ریز در بدن انسان می‌باشد. آرسنیک با ایجاد آسیب اکسیداتیو سمیت سلولی را آغاز و گسترش می‌دهد (Abdollahzade et al, 2021). علاوه بر این،

۳- گروه سوم (کنترل منفی، دریافت کننده آرسنیک تری اکساید)، که آرسنیک تری اکساید را به صورت خوراکی (گاواژ) به مدت ۳۰ روز با دوز ۱ mg/kg دریافت نمودند (Reagan-Shaw et al, 2008).

۴- گروه چهارم (تیمار اول)، که آرسنیک تری اکساید (۱mg/kg) را به همراه ژل رویال به صورت خوراکی (گاواژ) با دوز ۱۵۰ mg/kg به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند.

۵- گروه پنجم (تیمار دوم)، که آرسنیک تری اکساید (۱mg/kg) را به همراه ژل رویال به صورت خوراکی (گاواژ) با دوز ۱۰۰ mg/kg به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند.

۶- گروه ششم (تیمار سوم)، که آرسنیک تری اکساید (۱mg/kg) را به همراه ژل رویال به صورت خوراکی (گاواژ) با دوز ۵۰ mg/kg به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند.

۷- گروه هفتم (تیمار چهارم)، که آرسنیک تری اکساید (۱mg/kg) را به همراه ویتامین E با دوز ۱۰۰ mg/kg به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند.

۸- گروه هشتم (تیمار پنجم) که آرسنیک تری اکساید (۱mg/kg) را به همراه ویتامین E و ژل رویال (هر دو) با دوز ۱۰۰ mg/kg به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند.

یک روز بعد از آخرین روز مداخلات و با رعایت اخلاق کار با حیوانات، موش‌ها با تزریق دوز بیش از حد مجاز ترکیب کتامین - زایلازین (۲۵۰ mg/kg، ۳۰ mg/kg) آسان‌کشی شدند و نمونه‌های بافت ریه اخذ گردید. مقدار تقریبی ۴۰ میلی‌گرم از هر کدام از بافت‌های ریه گروه‌های مختلف در بافر فسفات (PH برابر ۷/۴) به طور کامل هموژن شده و بعد از سانترفیوژ (به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm) و جداسازی مایع رویی جهت اندازه‌گیری شاخص‌های استرس اکسیداتیو (گلوکاتاتیون پراکسیداز، مالون دی‌آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز) مورد استفاده قرار گرفت. پارامترهای گلوکاتاتیون پراکسیداز با کیت تجاری (شرکت Randox انگلستان، Cat No: SC692) با دقت اندازه‌گیری ۷۵-۹۲۵ IU/L و سوپراکسید

مسمومیت القا شده توسط آرسنیک تری اکساید انجام نشده است. در مطالعه حاضر، اثر ژل رویال بر تغییرات هیستوپاتولوژیک و بیوشیمیایی ریه موش‌های صحرایی متعاقب مسمومیت با آرسنیک تری اکساید مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

در مطالعه حاضر از ۴۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار آلبینو با وزن حدود ۱۸۰-۲۲۰ گرم استفاده گردید. حیوانات در شرایط استاندارد و در دمای 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد، رطوبت تقریبی ۵۵ درصد و سیکل نوردهی ۱۲/۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی نگهداری شدند. غذای پلیت مخصوص جوندگان و آب به مقدار کافی در اختیار موش‌های صحرایی قرار داده شد. پیش از انجام آزمایشات حیوانات به محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی در دانشکده دامپزشکی منتقل و به مدت یک هفته در آن‌جا نگهداری شدند تا به این شرایط عادت کنند. برای القا مسمومیت ریوی در پژوهش حاضر از آرسنیک تری اکساید به صورت خوراکی (گاواژ) روزانه به مدت ۳۰ روز استفاده گردید. برای درمان هم از دوزهای مختلف (۵۰ mg/kg، ۱۰۰، ۱۵۰) ژل رویال (سیگما-آلدريج) استفاده گردید. همچنین از ویتامین E به عنوان یک آنتی‌اکسیدان برای قیاس با گروه‌های درمانی استفاده شد.

موش‌های صحرایی به صورت تصادفی در ۸ گروه ۵ تایی به ترتیب زیر تقسیم‌بندی شدند:

۱- گروه اول (شاهد، دریافت کننده نرمال سالین)، که نرمال سالین را با دوز ۱ mg/kg به صورت خوراکی (گاواژ) به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند.

۲- گروه دوم (کنترل مثبت، دریافت کننده ژل رویال)، که ژل رویال (سیگما-آلدريج) را به صورت خوراکی (گاواژ) با دوز ۱۵۰ mg/kg به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند (Karaca et al, 2010).

برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics نسخه ۲۰ استفاده گردید به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها از آزمون آماری کولموگرو-سمیرنوف استفاده گردید. سپس داده‌هایی که توزیع نرمال داشتند با آزمون واریانس یک طرفه ANOVA و داده‌هایی که فاقد توزیع نرمال بودند با آزمون کروسکال والیس مورد ارزیابی قرار گرفتند. سطح معنی‌داری داده‌ها $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج مربوط به پارامترهای استرس اکسیداتیو در Figure 1 درج گردیده است. Figure 1.A یافته‌های مربوط به غلظت MDA را نشان می‌دهد. همان گونه که از نمودار مشخص است، در گروه کنترل منفی پس از القا مسمومیت با آرسنیک تری اکساید غلظت مالون دی آلدئید افزایش یافته که اختلاف آن با گروه‌های شاهد و کنترل مثبت از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$). تمامی گروه‌های تیمار سطح مالون دی آلدئید را در قیاس با گروه‌های شاهد و کنترل مثبت به طرز معنی‌داری کاهش دادند ($P < 0/05$). تمام گروه‌های تیمار با گروه تیمار آرسنیک تری اکساید + ژل رویال با دوز ۱۵۰ mg/kg معنی‌دار داشتند ($P < 0/05$). Figure 1.B مقادیر بیان آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز را نشان می‌دهد. تمامی گروه‌های تیمار و گروه کنترل منفی با گروه‌های شاهد و کنترل مثبت اختلاف معنی‌دار داشتند ($P < 0/05$). درمان با دوزهای مختلف ژل رویال سطح گلوکوتاتیون پراکسیداز را افزایش داد و به جز گروه تیمار اول در بقیه گروه‌ها اختلاف با گروه کنترل منفی معنی‌دار بود ($P < 0/05$). مقادیر SOD در Figure 1.C نشان داده شده است. مسمومیت با آرسنیک تری اکساید سطح SOD را به طرز معنی‌داری در قیاس با گروه‌های شاهد و کنترل مثبت کاهش داد ($P < 0/05$). به جز گروه تیمار اول بقیه گروه‌های درمانی به طور معنی‌داری سطح سوپراکسید دیسموتاز را در قیاس با گروه کنترل منفی افزایش دادند. همچنین اختلاف بین گروه تیمار آرسنیک تری اکساید + ژل رویال با دوز ۱۵۰ mg/kg با سایر گروه‌های تیمار از

دیسموتاز با کیت تجاری (شرکت Randox انگلستان، Cat No: SD125) با محدوده اندازه‌گیری ۴/۵۲-۰/۰۶ U/ml و طبق دستورات موجود در راهنمای کیت مورد سنجش قرار گرفت. برای سنجش غلظت مالون دی آلدئید از روش Ohkawa و همکاران (۱۹۷۹) استفاده شد. مطابق این روش، ده درصد هموزن بافت با سدیم دودسیل سولفات، بافر استات (pH 3.5) و محلول آبی تیوباربیتریک اسید مخلوط شد. پس از حرارت دادن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه، رنگدانه قرمز تولید شده با مخلوط n-بوتانول-پیریدین استخراج شد و جذب آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر برآورد شد. سطح آنزیم کاتالاز طبق روش Aebi و همکاران (۱۹۸۴) مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور خلاصه، واکنش با افزودن ۵۰ میکرولیتر نمونه بافت هموزن شده به ۱۰۰۰ میکرولیتر سالیان بافر فسفات (pH = 7) آغاز شد. پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن، محلول نهایی با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. نمونه‌های بافت ریه در فرمالین بافر ۱۰ درصد فیکس و تثبیت گردید، پس از آن وارد سبدهای دستگاه اتوتکنیکون شدند، مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها شامل: آب‌گیری، شفاف‌سازی و آغشته‌سازی به صورت خودکار توسط دستگاه مذکور انجام شد، سپس در پارافین قالب‌گیری شدند. از بلوک‌های پارافینی تهیه شده برش‌هایی به ضخامت تقریبی ۵ میکرومتر با استفاده از میکروتوم چرخشی تهیه گردید. پس از آن برش‌های تهیه شده پارافین‌زدایی شده و بر روی لام‌های میکروسکوپی گذاشته شده و تثبیت گردید. در نهایت لام‌ها با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. آسیب‌های بافت ریه توسط یک پاتولوژیست و بدون اطلاع از گروه‌بندی‌ها و آزمایشات صورت گرفته بر اساس شدت آسیب به طور نیمه‌کمی و به صورت نرمال (-)، خفیف (+)، متوسط (++) و شدید (+++) دسته‌بندی شدند.

و شاهد به طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0.05$). تمامی گروه‌های تیمار به طور معنی داری سطح آنزیم کاتالاز را در قیاس با گروه کنترل منفی افزایش دادند ($P < 0.05$).

نظر آماری معنی دار گزارش گردید ($P < 0.05$). سطح کاتالاز در بافت ریه در Figure 1.D نشان داده شده است. کاتالاز در گروه کنترل منفی در قیاس با گروه کنترل مثبت

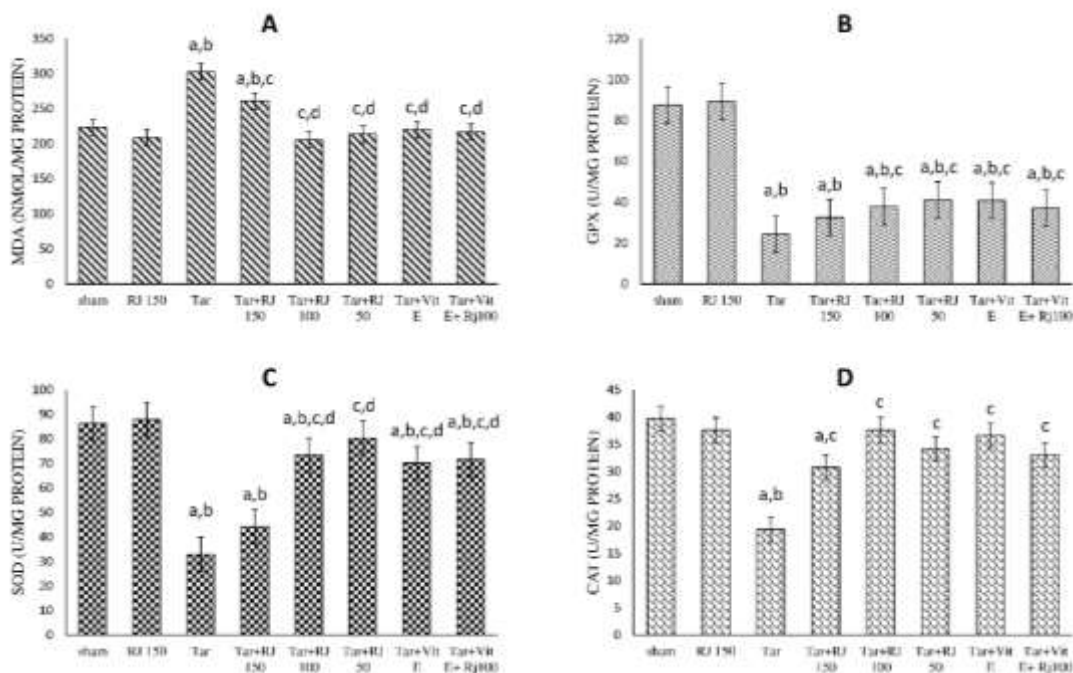


Figure 1: A; The comparison of Malondialdehyde (MDA), B; The comparison of Glutathione peroxidase (GPx), C; the comparison of Superoxide dismutase (SOD), and D; the comparison of catalase (CAT) in different experimental groups of study. a means the significant difference with sham group ($p < 0.05$). b means the significant difference with positive control group ($p < 0.05$). c means the significant difference with negative control group ($p < 0.05$). d means the significant difference with trioxide arsenic + royal jelly 150 mg/kg group ($p < 0.05$).

۴۰ درصد نمونه‌های نرمال و ۶۰ درصد دیگر دارای آسیب خفیف بافتی بودند. در گروه تیمار اول که ژل رویال با دوز ۱۵۰ mg/kg دریافت نموده بود نیز نتایج مشابه با گروه کنترل منفی مشاهده گردید. در سایر گروه‌های تیمار هیچ گونه آسیب بافتی در بافت ریه مشاهده نشد و همه نرمال بودند.

مقایسه اثرات هیستوپاتولوژیک آرسنیک تری اکساید ۱ mg/kg و تیمارهای انجام شده بر بافت ریه موش‌های نژاد ویستار در گروه‌های ۸ گانه مورد مطالعه در Table 1 درج شده است. همان طور که از جدول مشخص است، در گروه‌های شاهد و کنترل مثبت هیچ گونه آسیب بافتی در بافت ریه مشاهده نشد. در گروه دریافت کننده آرسنیک تری اکساید که هیچ درمانی دریافت نکردند (کنترل منفی)

Table 1: Comparison of histopathological effects of arsenic trioxide 1 mg / kg on lung tissue of male Wistar rats in the 8 groups studied

| Groups | Normal | Low damage | Moderate damage | Severe damage |
|--|----------|------------|-----------------|---------------|
| Normal saline (Sham group) | 5 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Royal jelly 150 mg / kg | 5 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Arsenic trioxide 1 mg/kg | 2 (40%) | 3 (60%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Arsenic trioxide 1 mg/kg + Royal jelly 150 mg/kg | 2 (40%) | 3 (60%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Arsenic trioxide 1 mg/kg + Royal jelly 100 mg/kg | 5 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Arsenic trioxide 1 mg/kg + Royal jelly 50 mg/kg | 5 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Arsenic trioxide 1 mg / kg + Vitamin E | 5 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Arsenic trioxide 1 mg / kg + Vitamin E + Royal jelly 100 mg / kg | 4 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Chi-square test results (P-value) | 0.004 | | | |

گروه‌های درمانی به جز گروه تیمار اول (آرسنیک تری اکساید 1 mg/kg + ژل رویال با دوز 150 mg/kg) درمان‌های انجام شده به صورت معنی‌داری باعث کاهش آسیب‌های وارد شده به ریه‌ها در اثر القای مسمومیت گردید.

ارزیابی‌های پاتولوژیک بافت ریه در Figure 2 نشان داده شده است. در گروه‌های شاهد و گروه کنترل مثبت هیچ آسیب پاتولوژیکی در بافت ریه مشاهده نشد و ریه‌ها کاملاً سالم بودند. در گروه کنترل منفی Figure 2. C بینابینی و پرخونی شدید در بافت ریه مشاهده شد. در تمام

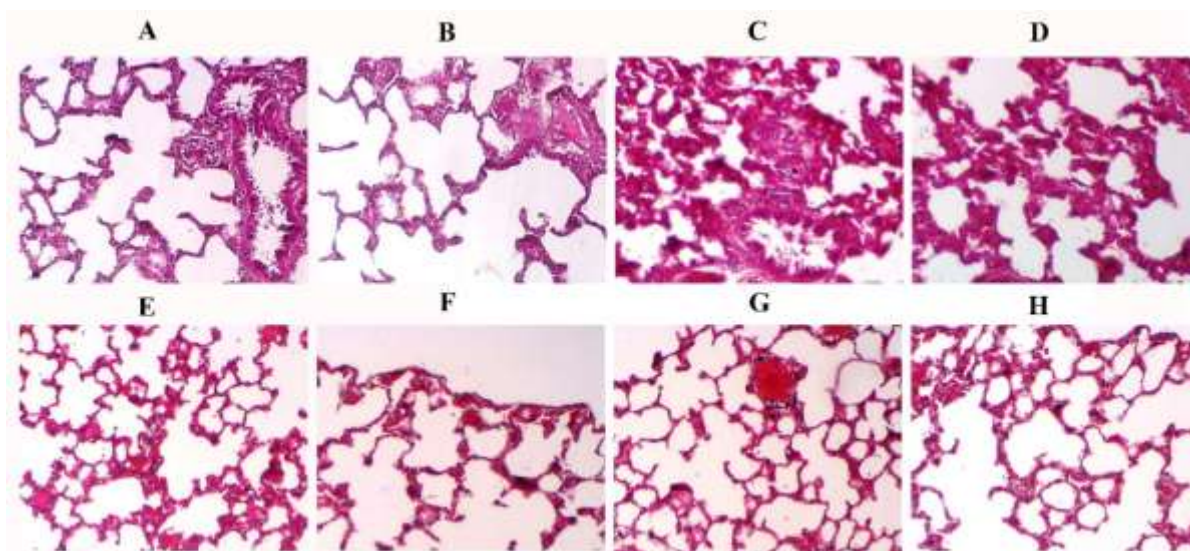


Figure 2: Hematoxylin and Eosin (H&E) stained slides of the lung tissue in different study groups with 100X magnification. A: Normal saline (Sham group), B: Royal jelly 150 mg / kg, C: Arsenic trioxide 1 mg / kg, D: Arsenic trioxide 1 mg / kg + Royal jelly 150 mg / kg, E: Arsenic trioxide 1 mg / kg + royal jelly 100 mg / kg, F: Arsenic trioxide 1 mg / kg + royal jelly 50 mg / kg, G: Arsenic trioxide 1 mg / kg + vitamin E & H: Arsenic trioxide 1 mg / kg + vitamin E + royal jelly 100 mg / kg. In all study groups the lung tissue was normal without any pathological lesions. Only in the control group and Arsenic trioxide 1 mg / kg + Royal jelly 150 mg / kg interstitial pneumonia and hyperemia were observed.

بحث

طور معنی داری در قیاس با گروه کنترل کاهش یافته و سطح مالون دی آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها به طرز معنی داری افزایش یافت (Mohanta et al, 2014). Lin و همکاران (۲۰۰۴) به بررسی توزیع بافتی گونه‌های آرسنیک پس از مصرف خوراکی تک دوزه و چند دوزه آرسنیک تری اکساید پرداختند و یافته‌های مطالعه آن‌ها حاکی از این بود که در بافت‌ها دی متیل آرسینیک اصلی-ترین متابولیت ناشی از آرسنیک تری اکساید بوده و با افزایش دوز مصرفی آرسنیک تری اکساید غلظت این متابولیت در بافت‌ها نیز افزایش می‌یابد. دی متیل آرسنیک به صورت غالب در بافت‌های ریه، کبد، کلیه و قلب یافت گردید (Lin et al, 2005).

Pourmoradian و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای اثرات مصرف ژل رویال را بر پارامترهای استرس اکسیداتیو در دیابت نوع دو در بیماران بررسی کردند و نتیجه گرفتند که پس از مصرف ژل رویال مقادیر SOD و GSH به شکل معنی داری افزایش و سطح مالون دی آلدئید به طور معنی-داری کاهش یافت. Karadeniz و همکارانش (۲۰۱۱) در پژوهشی اثرات ژل رویال را بر استرس اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از درمان با سیسیپلاتین در موش‌های صحرایی بررسی کردند. نتایج مطالعه آن‌ها حاکی از آن بود که در گروهی که ژل رویال دریافت کرده بودند غلظت گلوکوتایون احیا، گلوکوتایون اس ترانسفراز و سوپراکسید دیسموتاز به صورت معنی داری در قیاس با گروهی که ژل رویال دریافت نکرده بودند افزایش یافته و سطح مالون دی آلدئید به صورت معنی دار کاهش یافت. Silici و همکاران (۲۰۱۱) اثرات محافظتی ژل رویال را در آسیب کلیوی القا شده توسط سیسیپلاتین در موش‌های صحرایی مطالعه کردند. نتایج بررسی پارامترهای استرس اکسیداتیو در مطالعه آن‌ها که در گروه درمان شده با ژل رویال SOD، CAT و GSH-PX به صورت معنی داری در قیاس با گروه کنترل افزایش و سطح MDA کاهش یافت. در مطالعه‌ای دیگر، تضعیف ماندگاری آرسنیک توسط رزوراترول در ریه موش‌های در معرض تری اکسید آرسنیک مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های

ریه یکی از ارگان‌های اصلی است که تحت تأثیر آرسنیک قرار دارد. ریه انسان به دلیل دفع گاز دی متیل آرسین و همچنین فشار جزئی بالای اکسیژن می‌تواند یک اندام مستعد ابتلا به سرطان توسط آرسنیک باشد (Abdollahzade et al, 2021). با مکانیسم ناشناخته، حتی قرار گرفتن در معرض دوزهای پایین آرسنیک باعث بروز سرطان‌های مختلف از جمله سرطان ریه شده است و از آن جا که انسان می‌تواند هم از طریق تماس شغلی و هم از طریق آلودگی محیط زیست در معرض این ماده قرار گیرد، اجتناب و اقدامات پیش‌گیرانه ضروری است (Abdollahzade et al, 2021). استرس اکسیداتیو یکی از مکانیسم‌های احتمالی است که زمینه‌ساز مسمومیت ناشی از آرسنیک و آسیب بافتی است (Wang et al, 2013). در بافت‌های زنده، تشکیل ROS به دلیل قرار گرفتن در معرض آرسنیک باعث آسیب جدی اکسیداتیو به بافت‌ها و سلول‌ها می‌شود (Noman et al, 2015). آرسنیک منجر به تولید ROS و رادیکال‌های آزاد مانند پراکسید هیدروژن (H₂O₂)، نیتریک اکسید (NO-)، گونه‌های هیدروکسیل (HO-)، آنیون سوپراکسید (O₂-)، رادیکال دی متیل آرسنیک و رادیکال پراکسیل دی متیل آرسنیک می‌گردد (Abdollahzade et al, 2021). سمیت آرسنیک می‌تواند به صورت غیر مستقیم با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) یا مستقیماً با حمله به گروه‌های SH رخ دهد (Zaaza, 2014). پس از قرار گرفتن سلول‌ها در معرض آرسنیک، تولید بیش از حد ROS باعث تغییر در دفاع آنتی اکسیدانی ذاتی سلول و در نتیجه استرس اکسیداتیو می‌شود (Greani et al, 2017).

Mohanta و همکاران در مطالعه‌ای به بررسی وضعیت بیوشیمی خون، هورمون‌های تیروئید و وضعیت اکسیدان/آنتی‌اکسیدان خوکچه‌های هندی به چالش کشیده شده با آرسنیت سدیم یا تری اکسید آرسنیک پرداختند و نتیجه گرفتند که در گروهی که آرسنیک تری اکساید به جیره موش‌ها اضافه گردید مقادیر کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوکوتایون ردوکتاز و گلوکوتایون اس ترانسفراز به

بلئومایسین تغییرات هیستوپاتولوژیک شدید مانند ضخیم شدن فضاهای آلوئولی و نفوذ سلول‌های التهابی مشاهده شد. همچنین در رنگ آمیزی ماسون تریکروم الیاف کلاژن آبی در بافت بینابینی افزایش یافت. تغییرات هیستوپاتولوژیک ذکر شده در گروه‌های تحت درمان با ژل رویال بهبود یافت و ضایعات به طور قابل توجهی توسط ژل رویال با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش یافت. در پژوهشی که به تضعیف ماندگاری آرسنیک توسط رزوراترول در ریه موش‌های در معرض تری اکسید آرسنیک پرداخته شد هیستوپاتولوژی بافت ریه نیز مورد بررسی قرار گرفت. میزان آسیب ناشی از آرسنیک تری اکساید، شامل نفوذ سلول‌های التهابی، احتقان عروقی و تخریب ساختارهای آلوئولی بود که موش‌های تحت درمان با رزوراترول سلول‌های التهابی کم‌تری در بافت‌های ریوی و گلبول‌های قرمز نسبت به موش‌هایی که آرسنیک تری اکساید به تنهایی دریافت کرده بودند، داشتند (Zhang et al, 2013). مطابق با یافته‌های مطالعات پیشین، در پژوهش حاضر نیز در گروه کنترل منفی که فقط آرسنیک تری اکساید دریافت کرده بود، پرخونی، پنومونی بینابینی و نفوذ سلول‌های التهابی رخ داد. استفاده از ژل رویال به عنوان درمان سبب کاهش شدت آسیب‌های ناشی از مسمومیت با آرسنیک تری اکساید در گروه‌های تیمار شده گردید.

در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد که استفاده از آرسنیک تری اکساید باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب‌های بافت ریه در موش‌های صحرائی گردید. استفاده از ژل رویال در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg در کاهش استرس اکسیداتیو و آسیب‌های بافت ریه مؤثرتر از دوز ۱۵۰ mg/kg بود. همچنین ویتامین E نیز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان سبب کاهش آسیب اکسیداتیو و آسیب‌های بافتی گردید. بنابراین می‌توان ژل رویال و ویتامین E را به عنوان درمان‌های مؤثر برای کاهش اثرات زیان‌بار مسمومیت با آرسنیک تری اکساید پیشنهاد نمود. در مطالعات آتی پیشنهاد می‌گردد مکانیسم‌های دقیق تر عملکرد ژل رویال به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مورد بررسی قرار گیرد.

این مطالعه نشان داد مقادیر ROS در بافت ریه در گروه آسیب دیده توسط آرسنیک تری اکساید به طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه کنترل بود و رزوراترول به صورت مؤثری توانست مقادیر گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش داده و از استرس اکسیداتیو ایجاد شده بکاهد. همچنین سطح GSH در اثر مسمومیت با آرسنیک تری اکساید به صورت معنی‌داری کاهش یافت که درمان با رزوراترول این سطح را افزایش داد (Zhang et al, 2013). مطابق با مطالعات پیشین، در مطالعه حاضر نیز درمان با ژل رویال باعث کاهش معنی‌دار غلظت MDA در تمامی گروه‌های درمانی در قیاس با گروه کنترل منفی گردید. سطح GPx در همه گروه‌های تیمار به جز گروه تیمار اول در مقایسه با گروه کنترل منفی به صورت معنی‌دار از نظر آماری افزایش یافت. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز در همه گروه‌های تیمار به جز گروه درمان شده با ژل رویال با دوز ۱۵۰ در قیاس با گروه کنترل منفی به صورت معنی‌دار افزایش یافت. غلظت کاتالاز در تمام گروه‌ها تیمار به صورت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل منفی به صورت معنی‌دار افزایش یافت.

در یک مطالعه Mingxing و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی مسمومیت حاد تزریق تری اکسید آرسنیک با دوزهای مختلف داخل نایی در ریه‌های موش صحرائی پرداختند. نمونه‌ها در ساعات ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ پس از مواجهه جمع‌آوری شد و تغییرات دینامیکی نشان‌دهنده سمیت حاد ریوی مورد بررسی قرار گرفت. در مقایسه با گروه کنترل، گروه‌های مواجهه تغییرات معنی‌داری از جمله افزایش محتوای آب ریه و غلظت پروتئین در مایع لاواژ شده برونکوآلوئولار، ادم بینابینی ریوی، ادم غشای سلولی، افزایش غلظت فاکتورهای التهابی، JNK و P38 به طور معنی‌داری فعال شدند و درجه فسفوریلاسیون افزایش یافت. Zargar و همکاران (۲۰۱۷) در پژوهشی به بررسی اثرات درمان طولانی مدت با ژل رویال در فیروز ریوی القا شده توسط بلئومایسین در موش‌ها پرداختند. یافته‌های این پژوهش نشان داد که در گروه شم بافت ریه نرمال و بدون تغییرات پاتولوژیک بود. در گروه فیروز ریوی القا شده با

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز بابت پشتیبانی‌های مالی و نیز مساعدت و همراهی کارشناسان بخش پاتولوژی دانشکده دامپزشکی، آقای حسین بهداروند و خانم فاطمه بهداروند کمال تشکر و قدردانی را دارند.

کد اخلاق

تاییدیه‌های اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی از کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه شهید چمران اهواز اخذ گردید (کد اخلاق: EE/1400.2.24.13667/scu.ac.ir)

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله هیچ گونه تعارضی با یکدیگر ندارند.

منابع مالی

تمامی منابع مالی این تحقیق توسط معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین گردید.

منابع

- Abdollahzade, N., Majidinia, M., & Babri, S. (2021). Melatonin: A pleiotropic hormone as a novel potent therapeutic candidate in arsenic toxicity. *Molecular biology reports*, 1-16 .
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- Burchiel, S. W., Mitchell, L. A., Lauer, F. T., Sun, X., McDonald, J. D., Hudson, L. G., & Liu, K. J. (2009). Immunotoxicity and biodistribution analysis of arsenic trioxide in C57Bl/6 mice following a 2-week inhalation exposure. *Toxicology and applied pharmacology*, 241(3), 253-259 .
- Cemek, M., Aymelek, F., Büyükkuroğlu, M. E., Karaca, T., Büyükben, A., & Yilmaz, F. (2010). Protective potential of Royal Jelly against carbon tetrachloride induced-toxicity and changes in the serum sialic acid levels. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2827-2832 .
- Flora, S., Bhadauria, S., Kannan, G., & Singh, N. (2007). Arsenic induced oxidative stress and the role of antioxidant supplementation during chelation: a review. *Journal of Environmental Biology*, 28(2), 333.
- Greani, S., Lourkisti, R., Berti, L., Marchand, B., Giannettini, J., Santini, J., & Quilichini, Y. (2017). Effect of chronic arsenic exposure under environmental conditions on bioaccumulation, oxidative stress, and antioxidant enzymatic defenses in wild trout *Salmo trutta* (Pisces, Teleostei). *Ecotoxicology*, 26(7), 930-941 .
- Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudecova, D., . . . Valko, M. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of Applied Toxicology*, 31(2), 95-107 .
- Karaca, T., Bayiroglu, F., Yoruk, M., Kaya, M., Uslu, S., Comba, B., & Mis, L. (2010). Effect of royal jelly on experimental colitis induced by acetic acid and alteration of mast cell distribution in the colon of rats. *European journal of histochemistry: EJH*, 54(4).
- Karadeniz, A., Simsek, N., Karakus, E., Yildirim, S., Kara, A., Can, I., . . . Turkeli, M. (2011). Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011 .
- Kozul, C. D., Hampton, T. H., Davey, J. C., Gosse, J. A., Nomikos, A. P., Eisenhauer, P. L., . . . Hamilton, J. W. (2009). Chronic exposure to arsenic in the drinking water alters the expression of immune response genes in mouse lung. *Environmental health perspectives*, 117(7), 1108-1115 .

- Lin, C.-J., Wu, M.-H., Hsueh, Y.-M., Sun, S. S.-M., & Cheng, A.-L. (2005). Tissue distribution of arsenic species in rabbits after single and multiple parenteral administration of arsenic trioxide: tissue accumulation and the reversibility after washout are tissue-selective. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 55(2), 170-178 .
- Mingxing, S., Haiying, W., Congsong, S., Chunyu, Y., Liu, C., & Wang, Q. (2019). Acute toxicity of intratracheal arsenic trioxide instillation in rat lungs. *Journal of Applied Toxicology*, 39(11), 1578-1585 .
- Mohanta, R. K., Garg, A. K., Dass, R. S., & Behera, S. K. (2014). Blood biochemistry, thyroid hormones, and oxidant/antioxidant status of guinea pigs challenged with sodium arsenite or arsenic trioxide. *Biological trace element research*, 160(2), 238-244 .
- Mukhopadhyay, P. K., Dey, A., Mukherjee, S., & Pradhan, N. K. (2013). The effect of coadministration of α -tocopherol and ascorbic acid on arsenic trioxide-induced testicular toxicity in adult rats. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 24(4), 245-253 .
- Nakajima, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Mishima, S., & Hara, H. (2009). Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC complementary and alternative medicine*, 9(1), 1-9 .
- Noman, A. S. M., Dilruba, S., Mohanto, N. C., Rahman, L., Khatun, Z., Riad, W., . . . Chowdhury, S. (2015). Arsenic-induced histological alterations in various organs of mice. *Journal of cytology & histology*, 6(3).
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358 .
- Pourmoradian, S., Mahdavi, R., Mobasseri, M., Faramarzi, E., & Mobasseri, M. (2014). Effects of royal jelly supplementation on glycemic control and oxidative stress factors in type 2 diabetic female: a randomized clinical trial. *Chinese journal of integrative medicine*, 20(5), 347-352 .
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB journal*, 22(3), 659-661 .
- Silici, S., Ekmekcioglu, O., Kanbur, M., & Deniz, K. (2011). The protective effect of royal jelly against cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *World journal of urology*, 29(1), 127-132 .
- States, J. C., Barchowsky, A., Cartwright, I. L., Reichard, J. F., Futscher, B. W., & Lantz, R. C. (2011). Arsenic toxicology: translating between experimental models and human pathology. *Environmental health perspectives*, 119(10), 1356-1363 .
- Wang, H., Xi, S., Xu, Y., Wang, F., Zheng, Y., Li, B., . . . Sun, G. (2013). Sodium arsenite induces cyclooxygenase-2 expression in human uroepithelial cells through MAPK pathway activation and reactive oxygen species induction. *Toxicology in Vitro*, 27(3), 1043-1048 .
- Xu, M., Niu, Q., Hu, Y., Feng, G., Wang, H., & Li, S. (2019). Proanthocyanidins antagonize arsenic-induced oxidative damage and promote arsenic methylation through activation of the Nrf2 signaling pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019 .
- Yun, S.-M., Woo, S. H., Oh, S. T., Hong, S.-E., Choe, T.-B., Ye, S.-K., . . . Noh, W. C. (2016). Melatonin enhances arsenic trioxide-induced cell death via sustained upregulation of Redd1 expression in breast cancer cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 422, 64-73 .
- Zaazaa, A. M. (2014). Protective role of the nigella sativa oil against arsenic-induced neurotoxicity in male rats. *World J Pharm Res*, 3(2), 1624-1636 .
- Zargar, H. R., Hemmati, A. A., Ghafourian, M., Arzi, A., Rezaie, A., & Javad-Moosavi, S. A. (2017). Long-term treatment with royal jelly improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 95(1), 23-31 .
- Zhang, W., Yao, C., Ge, M., Xue, J., Ma, D., Liu, Y., . . . Zhang, Z. (2013). Attenuation of arsenic retention by resveratrol in lung of arsenic trioxide-exposed rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(1), 35-39 .
- Zhang, X.-W., Yan, X.-J., Zhou, Z.-R., Yang, F.-F., Wu, Z.-Y., Sun, H.-B., . . . Jeanne, M. (2010). Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RAR α oncoprotein by directly binding PML. *Science*, 328(5975), 240-243 .
- Zhao, Y., Toselli, P., & Li, W. (2012). Microtubules as a critical target for arsenic toxicity in lung cells in vitro and in vivo. *International journal of environmental research and public health*, 9(2), 474-495 .

Received: 14.01.2022

Accepted: 18.04.2022

ارزیابی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در سرم متعاقب دریافت مکمل‌های نانوذرات سلنیم، سلنیت سدیم و ویتامین E در بره‌های شیرخوار

سامان محمدی‌راد^۱، احسان عناصری^{۲*}، علیقلی رامین^۳ و سیامک عصری‌رضایی^۲

^۱ دانش آموخته دکترای حرفه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۲ دانشیار گروه بیماری‌های داخلی و کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۳ استاد گروه بیماری‌های داخلی و کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۸

چکیده

به مجموعه فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان‌های غیراختصاصی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) گویند. هدف تعیین مقادیر سرمی TAC متعاقب تجویز مکمل‌های سلنیم و ویتامین E در بره‌هاست. تعداد ۳۲ بره نر ماکوئی با میانگین سنی زیر ۲ ماه و میانگین وزن ۱۰ کیلوگرم در ۸ گروه کنترل، ویتامین E، نانو ذره سلنیم، سلنیت سدیم خوراکی، سلنیت سدیم تزریقی، نانو ذره سلنیم/ویتامین E، سلنیت سدیم خوراکی/ویتامین E و سلنیت سدیم تزریقی/ویتامین E به مدت ۹۰ روز انتخاب و مطالعه شدند. از بره‌ها در طی روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ خون‌گیری انجام شد و سرم‌ها برای ارزیابی TAC استفاده شدند. برای مجموع بره‌ها پایین‌ترین غلظت TAC در گروه نانوسلنیم ($1/17 \mu\text{mol/l}$) و بیش‌ترین آن در گروه سلنیم/ویتامین E تزریقی ($1/32 \mu\text{mol/l}$) در روز ۶۰ مشاهده شد اما این تفاوت در بین گروه‌های ۸ گانه در طی ۹۰ روز معنی‌دار نبود. در طی ۹۰ روز منظم‌ترین و کم‌ترین تغییرات در گروه ویتامین E، بیش‌ترین و نامنظم‌ترین تغییرات در گروه‌های نانوسلنیم خوراکی و نانوسلنیم/ویتامین E مشاهده شد. غلظت TAC در روز ۱۴ و ۶۰ در بین گروه‌ها معنی‌دار بود که عمدتاً به ترتیب در گروه سلنیت سدیم تزریقی و سلنیم/ویتامین E تزریقی بود. مقایسه غلظت TAC در بین دفعات نمونه‌برداری وجود اختلاف معنی‌دار در نانوسلنیم و نانوسلنیم/ویتامین E بود که کم‌ترین غلظت در نانوسلنیم بود. نتایج تأثیر زمان نمونه‌گیری و گروه‌ها در غلظت TAC نشان داد که بین دفعات نمونه‌برداری (زمان) تفاوت معنی‌دار مخصوصاً در روزهای ۱۴ و ۶۰ بود ولی بین گروه‌ها معنی‌دار نبود. مقادیر TAC روز اول با روز ۶۰ در گروه کنترل، روز ۷ و ۱۴ در گروه نانوسلنیم/ویتامین E و روز ۶۰ در گروه سلنیم/ویتامین E تزریقی در ارتباط بودند. نتیجه این که مکمل‌های سلنیم و ویتامین E در میزان TAC تأثیر نداشتند در صورتی که میزان TAC وابسته به زمان بود. بنابراین فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های غیراختصاصی (TAC) متأثر از آنتی‌اکسیدان‌های اختصاصی نظیر سلنیم و ویتامین E نمی‌باشد و تحت تأثیر زمان تغییر می‌کند.

کلمات کلیدی: نانوسلنیم، سلنیت سدیم، ویتامین E، بره، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی

مقدمه

هموستاز در سطح سلولی و خصوصاً اندام‌ها عبارت از تعادل بین واکنش‌های فعال اکسیژن (ROS)، نیتروژن (RNS) و پاسخ آنتی‌اکسیدان‌ها در حفظ مطلوب اثرات سوء ROS یا تقلیل واکنش‌های غیراختصاصی آن‌ها از طریق

* نویسنده مسئول: احسان عناصری، دانشیار گروه بیماری‌های داخلی و کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

E-mail: e.anassori@urmia.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی اختصاصی مشکل و گران بوده (Meng et al, 2017) در صورتی که محاسن TAC نسبت به روش‌های آنزیمی فراوان بوده و از امتیاز یک آزمایش ساده، جذاب، بدون مشکلات آزمایش و وسایل آزمایشی و سرانجام ارزان برخوردار است (Belal et al, 2021). مضاف بر این که تعیین TAC ارزش بیولوژیکی داشته که می‌تواند اکسیدان‌های غیر پیش‌بینی شده در نمونه‌های مورد آزمایش را نیز مشخص نماید (Fragaab et al, 2015). همچنین TAC ممکن است یک سینترسیم احتمالی را بین آنتی‌اکسیدان‌های شناخته و یا ندرتاً ناشناخته شده را نشان دهد (Mattioli et al, 2020). بهره‌مندی از چنین ارزیابی‌هایی به طور فزاینده‌ای در بین علوم زیستی و پژوهشگران جامعیت پیدا کرده، تجاری شده و ممکن است شناس یک روش آزمایشگاهی بالینی استاندارد را پیدا کند. بنابراین برای نشان دادن و ارزیابی معایب و محاسن به همراه نتایج با ارزش این روش و یا محدودیت‌های TAC، مطالعه و بررسی آن امری اجتناب‌ناپذیر بوده و می‌تواند مهم تلقی شود.

سلنیم به صورت گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPX) از آنتی-اکسیدان‌های آنزیمی (Ighodaro and Akinloye, 2018; Spears, 2011) و آلفاتوکوفرول غیر آنزیمی (Awawdeh et al, 2019) به منزله سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مسئول حذف گونه‌های فعال اکسیژن هستند. اگر فعالیت GPX و مقدار آلفاتوکوفرول کاهش یابد افزایش پراکسید هیدروژن منجر به آسیب مستقیم بافتی و فعال شدن فاکتورهای هسته‌ای با مسیر التهابی می‌شود (Ding et al, 2017). به همین منظور مکمل‌های معدنی مانند سلنیت سدیم (Shi et al, 2009) و نانو سلنیم به صورت خوراکی و یا تزریقی (Shi et al, 2012; Kojouri et al, 2011) به تنهایی و یا همراه با آلفاتوکوفرول (Soliman et al, 2012) به کار رفته تا با تعیین شاخص استرس اکسیداتیو مانند GPX به اثرات آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی واقف گردد. در صورتی که در خصوص تعیین آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی و شاخص آن یعنی TAC در بره‌های نر نوزاد در حال رشد مطالعه نشده

بیومولکول‌های حیاتی است (Mittal et al, 2014). تعریف فوق بیان‌گر اهمیت ارتباط هموستاز با میزان آنتی‌اکسیدان‌ها در بدن و همچنین محتوای آنتی‌اکسیدان‌ها در غذا و مایعات را نشان می‌دهد (Zhang et al, 2021). آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که در مقادیر بسیار اندک به طور معنی‌داری موجب تأخیر و یا ممانعت از بروز گونه‌های اکسیژن فعال و اثرات مخرب آن‌ها می‌شوند (Mikulková et al, 2020). به عبارت بهتر استرس اکسیداتیو به عارضه منتج از عدم تعادل سیستم اکسیدانی، آنتی‌اکسیدانی و پیشرفت سیستم اکسیدانی در بدن اطلاق می‌گردد (Mavangira and Sordillo, 2018). بر این اساس آنتی‌اکسیدان‌ها به ۳ گروه عمده تقسیم می‌شوند. گروه اول آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که مستقیماً اکسیژن‌های فعال را حذف می‌کنند. مانند سوپراکسید دیسموتاز که سوپراکسیدها را حذف می‌کند کاتالاز و گلوکوتاتیون پراکسیداز که هیدروژن پراکسیداز را غیرفعال می‌کنند (Konvicná et al, 2015). گروه دوم فلزات متصل شونده به مواد بیولوژیکی هستند که از شرکت یون‌های فلزی در تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل و دیگر واکنش‌های آنتی‌اکسیدانی ممانعت می‌کنند (Bordignon et al, 2019) و سرانجام گروه سوم که به صورت سیستم آنتی‌اکسیدانی غیر اختصاصی عمل می‌کنند مانند ویتامین C، E، کارتنوئیدها، اسید اوریک، بیلی‌روبین، کو آنزیم Q و اسیدهای آمینه سیستین، متیونین و تیروزین هستند (Mutalip et al, 2018). لذا مهم‌ترین اعمال آنتی‌اکسیدان‌ها حذف رادیکال‌های آزاد تأثیرگذار بر سلول‌ها و بافت‌های بدن است (Nimse and Pal, 2015). در یک تعریف کلی به مجموعه فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان‌های غیر اختصاصی اصطلاحاً ظرفیت تام آنتی-اکسیدانی (TAC) اطلاق می‌گردد (Fragaab et al, 2014). اگر چه پژوهشگران توصیه می‌کنند که لزوماً از آزمایش‌های آنتی‌اکسیدانی اختصاصی علیه نوع رادیکال آزاد تولید شده و ترجیحاً آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی اختصاصی مانند گلوکوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز برای تعیین استرس اکسیداتیو استفاده نمود اما روش‌های ارزیابی

خوراکی/ویتامین E مقدار 0.1 mg/kg سلنیت سدیم خورنده شد و 8 mg/kg ویتامین E به شکل عضلانی تزریق شد. در گروه ویتامین E تزریقی فقط 8 mg/kg ویتامین E به صورت عضلانی تزریق شد. در گروه سلنیت سدیم تزریقی مقدار 0.1 mg/kg سلنیت سدیم به شکل تزریق زیر جلدی استفاده شد و سرانجام در گروه سلنیت سدیم تزریقی/ویتامین E مقدار 0.1 mg/kg سلنیت سدیم و 8 mg/kg ویتامین E به شکل یک داروی ترکیبی به صورت زیر جلدی تجویز شد. دز نانو سلنیم 0.1 mg/kg بوده که پس از محاسبه بر اساس وزن در هفت روز خورنده می‌شود.

نانو سلنیم در آزمایشگاه توسط روش Gao و همکاران (۲۰۱۳) و با استفاده از سلنیت سدیم (مرک آلمان)، اسید آسکوربیک (مرک آلمان)، پیتون و آب مقطر دو بار یونیزه شده تهیه گردید. مقدار $2/63$ گرم سلنیت سدیم (مرک آلمان) در 100 ml آب دیونیزه موجود در بالن افزوده و مخلوط شد. سپس مقدار 5 گرم پیتون به محتویات بالن اضافه و توسط دستگاه لرزاننده به مدت 15 دقیقه یکنواخت شد. سپس مقدار $7/03$ گرم اسید آسکوربیک (مرک آلمان) به تدریج در 30 دقیقه در بالن حاوی لرزاننده افزوده شده تا سلنیت سدیم مجزا و سلنیم شکسته شده و آزاد گردد. سلنیم شکسته شده توسط پیتون احاطه شده تا از الحاق مجدد سلنیم ممانعت شود و ذرات نانو سلنیم در محیط ثابت پیتون به رنگ قرمز و خالص سلنیم تولید شود (Hunter and Manter, 2008). پس از تهیه نانو سلنیم برای تعیین اندازه ذرات از دستگاه آنالیزور و روش XRD اندازه ذرات تا 30 نانومتر تعیین گردید (Figure 1). تفسیر طیف XRD که از آن به عنوان "اثر انگشت" استفاده می‌شود دقیقاً مشابه طیف XRD نانو سلنیم در منابع است که طبق روش مذکور در آن منبع نانو سلنیم تهیه شد. اندازه نانوذرات با استفاده از طیف XRD از معادله دبای-شرر (Debye Scherrer Equation) استنتاج می‌شود و معمولاً پس از محاسبه جزیی کم‌تر از 30 نانومتر نیز به دست می‌آید (Figure 2).

است که لزوماً استخراج چنین اطلاعاتی می‌تواند راه‌گشای تأثیر مکمل‌های سلنیم در میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در دام را نشان دهد. اهداف این مطالعه عبارتند از: ۱- تعیین مقادیر ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی پس از تجویز مکمل‌های سلنیم و ویتامین E در سرم خون بره‌های نر، ۲- مقایسه میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی پس از تجویز مکمل‌های سلنیم و ویتامین E و ۳- تعیین بالاترین مقادیر ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در گروه‌های تجویز شده با مکمل‌های سلنیم و ویتامین E.

مواد و روش کار

تعداد ۳۲ رأس بره نر شیرخوار بین یک تا زیر دو ماه، از نژاد ماکویی و سالم انتخاب شدند. بره‌ها روزی ۲ وعده صبح و عصر از میش‌ها شیر دریافت می‌کردند. بره‌ها به صورت تصادفی به هشت گروه ۴ رأسی شامل ۱- کنترل، ۲- ویتامین E، ۳- نانو ذره سلنیم، ۴- سلنیت سدیم خوراکی، ۵- سلنیت سدیم تزریقی، ۶- نانو ذره سلنیم/ویتامین E، ۷- سلنیت سدیم خوراکی/ویتامین E، ۸- سلنیت سدیم تزریقی/ویتامین E تقسیم شدند. ابتدا قبل از تجویز تمامی بره‌ها خون‌گیری و وزن‌کشی شدند تا بر اساس وزن بدن داروی مورد نیاز تجویز شوند. میانگین وزن بره‌ها در گروه‌های ۸ گانه به ترتیب ۱۲، ۱۰/۷، ۱۰، ۱۱، ۱۰/۳، ۱۱/۳، ۱۰/۷ و ۹/۷ کیلوگرم بود. در گروه کنترل هیچ دارویی مصرف یا تجویز نشد. در گروه نانو سلنیم خوراکی مقدار 0.1 mg/kg نانو سلنیم خورنده شد. ترکیبات سلنیم شامل نانو سلنیم و سلنیت سدیم خوراکی پس از توزین به شکل سوسپانسیون معلق در آب معمولی حل شده و توسط سرنگ 20 میلی‌لیتر خورنده شدند. در گروه نانو سلنیم خوراکی/ویتامین E مقدار 0.1 mg/kg نانو سلنیم خوراکی و 8 mg/kg ویتامین E به شکل عضلانی تزریق شد. در گروه سلنیت سدیم خوراکی مقدار 0.1 mg/kg سلنیت سدیم خورنده شد. در گروه سلنیت سدیم

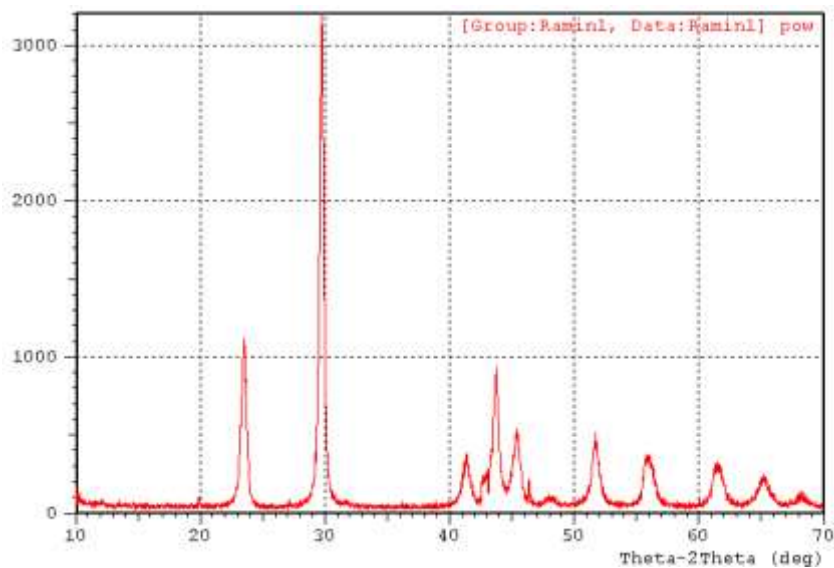


Figure 1: XRD to show the Nano Se particle sizes

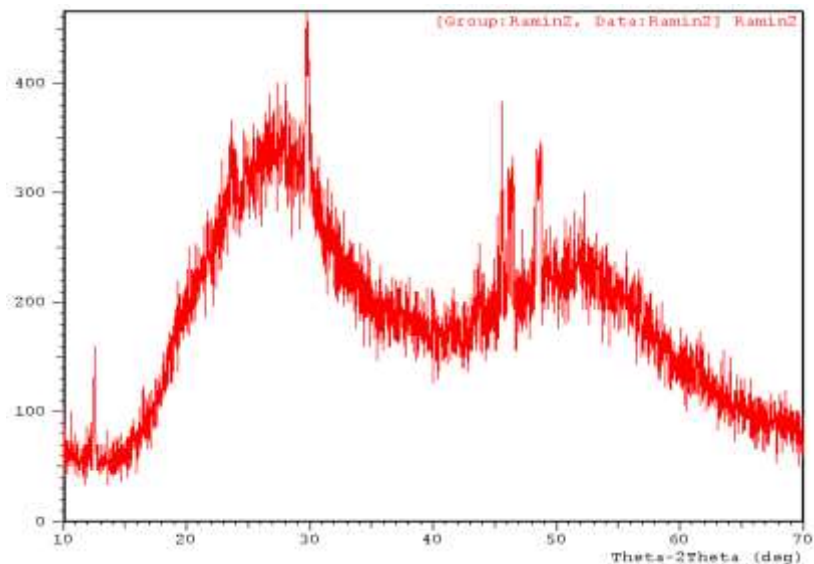


Figure 2: XRD to show the Nano Se particle sizes

مقادیر ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) با استفاده از دستگاه کالری‌متری یا رنگ‌سنجی (Spectrophotometer) (Jenway 6300, USA) توسط روش Koracevic و Koracevic (۲۰۰۱) اندازه‌گیری شد. از نرم افزار SPSS¹⁷ ابتدا با روش آماری Case Summaries میانگین، انحراف معیار، خطای استاندارد و دامنه ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) سرم تعیین شد. از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و Repeated measue ANOVA جهت مقایسه میانگین TAC بر اساس

بره‌ها در روز ۱، ۷، ۱۴، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ (۶ بار) خون‌گیری شدند. مقدار ۵ ml خون از ورید وداچ به وسیله سرنگ ۵ ml تهیه شد. خون‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ و سرم‌ها جدا گردید. نمونه‌های خون در وعده صبح اخذ گردیدند. در این مطالعه از مجموع ۳۲ رأس بره تعداد ۱۹۲ نمونه خون تهیه شد و به آزمایشگاه منتقل و پس از جداسازی سرم‌ها در فریزر -20°C منجمد شدند. پس از اتمام نمونه‌گیری‌ها در روز ۹۰ سرم‌ها از انجماد خارج و مقادیر سرمی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی ارزیابی شدند.

سلنیم، سلنیت سدیم خوراکی، سلنیت سدیم تزریقی، نانو ذره سلنیم/ویتامین E، سلنیت سدیم خوراکی/ویتامین E و سلنیت سدیم تزریقی/ویتامین E نشان می‌دهد. میانگین TAC بره‌ها در مجموع مطالعه در نانوسلنیم کمترین (1) $\mu\text{mol/l}$ (1/7) و سلنیم/ویتامین E تزریقی بیشترین ($\mu\text{mol/l}$ 1/32) بود. تفاوت بین گروه‌ها در طی 90 روز معنی‌دار نبود ($P>0.05$). بالاترین و پایین‌ترین غلظت TAC در روز 60 به ترتیب در سلنیم/ویتامین E تزریقی و نانوسلنیم خوراکی مشاهده شد.

زمان نمونه‌برداری در گروه‌های 8 گانه استفاده شد. از آزمون ضریب همبستگی Pearson Correlation برای ارزیابی احتمالی وجود ارتباط TAC در دفعات نمونه‌برداری (روز اول با سایر روزهای نمونه‌گیری) استفاده شد. مقدار P کمتر از 0/05 به عنوان تفاوت معنی‌دار تلقی گردید. نتایج به صورت جداول و نمودار به صورت روزانه و هفتگی برای هرکدام از گروه‌های 8 گانه ترسیم و تفسیر گردید.

نتایج

Table میانگین و انحراف معیار تغییرات غلظت TAC

خون را در بین گروه‌های کنترل، ویتامین E، نانو ذره

Table 1: Mean serum TAC concentration ($\mu\text{mol/l}$) in 8 groups during 90 days (n=4)

| Groups | Day 1 | Day 7 | Day 14 | Day 30 | Day60 | Day 90 | Day 1-90 | F-Value |
|---------------|-------|-------|--------|--------|-------|--------|----------|---------|
| Control | 1.37 | 1.23 | 1.36 | 1.43 | 1.11 | 1.27 | 1.37 | 0.85 |
| Oral NanoSe | 1.41 | 1.2 | 0.96 | 1.14 | 1.06 | 1.26 | 1.41 | 7.44** |
| Oral NanoSe/E | 1.23 | 1.07 | 1.05 | 1.26 | 1.18 | 1.65 | 1.23 | 2.76* |
| Oral NaSe | 1.32 | 1.31 | 1.06 | 1.09 | 1.22 | 1.28 | 1.32 | 1.20 |
| Injected E/Se | 1.36 | 1.19 | 1.23 | 1.15 | 1.16 | 1.17 | 1.36 | 0.74 |
| VitE | 1.33 | 1.26 | 1.3 | 1.32 | 1.25 | 1.3 | 1.33 | 0.08 |
| Injected NaSe | 1.17 | 1.23 | 1.35 | 1.34 | 1.42 | 1.41 | 1.17 | 0.35 |
| Oral NaSe/E | 1.44 | 1.24 | 1.76 | 1.3 | 1.24 | 1.14 | 1.44 | 2.49† |
| F-Value | 1.10 | 1.15 | 0.80 | 1.49 | 2.39* | 0.69 | 1.21 | ----- |

†=P<0.1>0.05 **= P<0.01 *= P<0.05 ، 2 =g/l μ ، 1 = SE=0.1

ویتامین E، بیش‌ترین و نامنظم‌ترین تغییرات در نانوسلنیم خوراکی و نانوسلنیم/ویتامین E مشاهده شد.

Figure 3 تغییرات TAC خون را در بره‌های نر شیری در 90 روز نشان می‌دهد. منظم‌ترین و کم‌ترین تغییرات در

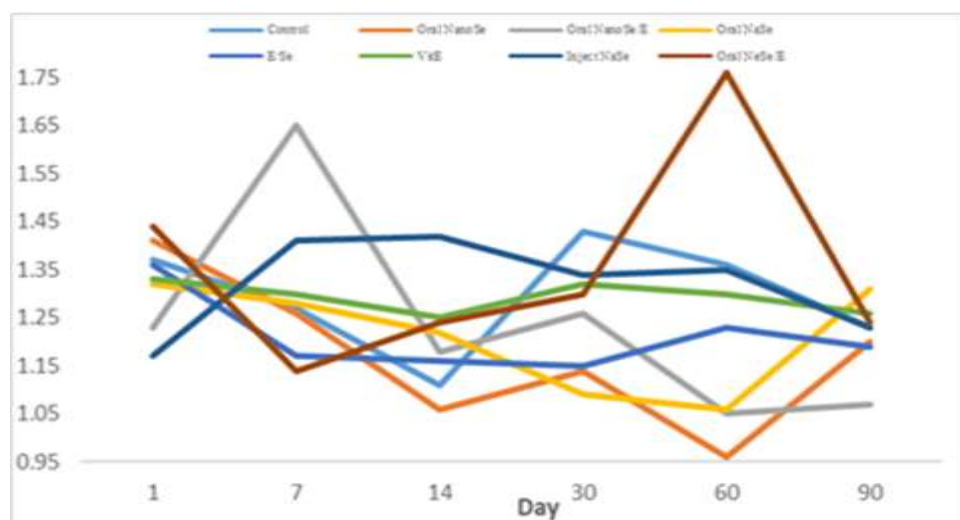


Figure 3: Comparison of total antioxidant capacity changes in lambs serum in 8 groups during 90 days

TAC در بین دفعات نمونه‌برداری وجود اختلاف معنی‌دار در نانوسلنیم و نانوسلنیم/ویتامین E بود ($P < 0.01$) که کم‌ترین غلظت TAC در نانوسلنیم بود (Table 2).

مقایسه میانگین غلظت TAC در بین گروه‌ها نشان داد که TAC در روز ۱۴ و ۶۰ در بین گروه‌ها معنی‌دار بود ($P < 0.01$) که عمدتاً به ترتیب در سلنیت سدیم تزریقی و سلنیم/ویتامین E تزریقی بود (Table 2). مقایسه غلظت

Table 2: Mean comparison (ANOVA) of serum total antioxidant capacity concentration ($\mu\text{mol/l}$) in 8 groups during 90 days (n=4)

| Sampling times | Mean Square | df | Sum Square | F-value |
|-----------------------|-------------|-----|------------|---------|
| Groups | | | | |
| Day 1 | 0.23 | 7 | 0.03 | 1.10 |
| “ “ 7 | 0.74 | “ “ | 0.11 | 1.15 |
| “ “ 14 | 0.33 | “ “ | 0.05 | 3.02* |
| “ “ 30 | 0.40 | “ “ | 0.05 | 1.49 |
| “ “ 60 | 1.76 | “ “ | 5.20 | 3.17* |
| “ “ 90 | 0.14 | “ “ | 0.02 | 0.69 |
| Groups | | | | |
| Sampling times | | | | |
| Control | 0.27 | 5 | 0.05 | 0.85 |
| Oral NanoSe | 0.50 | “ “ | 0.10 | 7.44** |
| Oral NanoSe/E | 0.96 | “ “ | 0.19 | 2.76* |
| Oral NaSe | 0.25 | “ “ | 0.05 | 1.30 |
| Injected E/Se | 1.10 | “ “ | 0.02 | 0.74 |
| VitE | 0.02 | “ “ | 0.01 | 0.08 |
| Injected NaSe | 0.20 | “ “ | 0.04 | 0.35 |
| Oral NaSe/E | 0.98 | “ “ | 0.20 | 2.49† |

*= $P < 0.05$ **= $P < 0.01$ †= $P < 0.1 > 0.05$

($P < 0.01$) و عمدتاً برای روز ۱۴ و ۶۰ بود ولی برای گروه‌ها معنی‌دار نبود. همچنین تأثیر زمان در میزان TAC در بین گروه معنی‌دار نبود.

Table 3 مقایسه میانگین غلظت TAC در بین گروه‌ها، دفعات نمونه‌برداری و تأثیر زمان در غلظت TAC را نشان می‌دهد. اختلاف بین دفعات نمونه‌برداری (زمان) معنی‌دار

Table 3: Mean comparison¹ of serum total antioxidant capacity concentration ($\mu\text{mol/l}$) among sampling times, treatment groups and time by group interactions.

| Parameters | Mean Square | df | Sum Square | F-value |
|---------------------------|-------------|----|------------|---------|
| Sampling times | 0.21 | 5 | 0.20 | 5.28* |
| Groups | 0.65 | 7 | 0.09 | 1.01 |
| Time by group interaction | 0.48 | 6 | 0.07 | 1.74 |

¹= Repeated Measure ANOVA * = $P < 0.05$

در گروه نانو سلنیم/ویتامین E و روز ۶۰ در گروه سلنیم/ویتامین E تزریقی در ارتباط بودند.

نتایج آنالیز همبستگی پیرسون غلظت TAC در روز اول با ایام دیگر نمونه‌گیری در گروه‌ها (Table 4) نشان می‌دهد که TAC روز اول با روز ۶۰ در گروه کنترل، روز ۷ و ۱۴

Table 4: Correlations of serum total antioxidant capacity concentration ($\mu\text{mol/l}$) between day 1 and other sampling times in 8 lambs' group

| Sampling times | Day 7 | Day 14 | Day 30 | Day60 | Day 90 |
|----------------|---------|--------|--------|--------|--------|
| Control | -0.93 | 0.86 | 0.14 | 0.99** | -0.68 |
| Oral NanoSe | 0.89 | 0.20 | 0.88 | -0.01 | -0.08 |
| Oral NanoSe/E | -0.99** | -0.98* | 0.28 | -0.79 | -0.11 |
| Oral NaSe | -0.40 | -0.83 | -0.89 | 0.75 | 0.28 |
| Injected E/Se | -0.19 | 0.47 | -0.09 | -0.21 | -0.57 |
| VitE | -0.33 | -0.01 | 0.89 | 0.03 | 0.59 |
| Injected NaSe | -0.07 | -0.26 | 0.01 | 0.30 | -0.38 |
| Oral NaSe/E | -0.18 | 0.32 | 0.55 | 0.98* | -0.40 |

*=P<0.05 **=P<0.01

بحث

لذا افزایش در مقادیر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی ظرفیت و توانایی مقاومت سلول‌های بدن دام را در برابر استرس اکسیداتیو نشان می‌دهد (Bordignon et al, 2019). مکانیسم عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی متفاوت است. به عنوان مثال آنزیم سوپراکسید دیسموتاز رادیکال‌های سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند و این در حالی است که آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز هیدروپراکسیدهای آلی و پراکسید هیدروژن را خنثی و حذف می‌کند (Mittal et al, 2014). آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی همانند آلبومین، گلوکاتایون، ویتامین C، آلفاتوکوفرول، بتاکاروتن، اسید اوریک، بیلیروبین و فلاونوئیدها از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدانت‌ها محسوب شده که به همراه طیف وسیعی از سایر مواد دیگر تحت عنوان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در دام ذکر می‌گردند (Boldižárová et al, 2005). از آن جایی که ارزیابی هر یک از مولکول‌های آنتی‌اکسیدانت‌های گوناگون ممکن و عملی نیست لذا عملاً ارزیابی وضعیت آنتی‌اکسیدانی را بر مبنای اندازه‌گیری ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (Fragaab et al, 2015) در سرم همان طوری که در این مطالعه انجام شد

فعالیت و ماندگاری اندام‌ها و بافت‌های بدن موجودات زنده همانند انسان در اثر توسعه واکنش‌های سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی متعدد و گوناگون اعم از آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز (Ighodaro and Akinloye, 2018) و یا غیراختصاصی مانند ویتامین E و C در قالب ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی بوقوع می‌پیوندد (Belal et al, 2021). فرجام این فرآیند حذف و یا خنثی شدن رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که متعاقب فرایندهای متابولیکی در بدن نشخوارکنندگان ایجاد می‌گردند (Celi, 2011). آزاد شدن رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب اکسیداسیون مضر در سلول‌ها شده که این واکنش‌ها توسط واکنش‌های متنوع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی خنثی می‌شوند (Boldižárová et al, 2005). افزودن مکمل‌های سلنیم به عنوان یک ریزمغذی ضروری از عوامل مهم تأثیرگذار در تشکیل متالوآنزیم گلوکاتایون پراکسیداز در تمامی بافت‌های بدن است (Huang et al, 2009; Wang, 2011). تغییرات در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی در سطح سلول‌ها به عنوان معیاری برای ارزیابی استرس اکسیداتیو در نظر گرفته می‌شود (Konvicná et al, 2015).

آن ضرورتاً بیانگر یک شرایط ناخواسته نمی‌باشد. Boldižárová و همکاران (۲۰۰۵) بالاترین میزان کاهش TAC را پس از خوراندن مخمر سلنیم در مقابل سلنیم آلی و معدنی نشان داده است. صرف نظر از کلیه عواملی که قبلاً در خصوص احتمال کاهش TAC به دنبال مصرف ترکیبات حاوی سلنیم ذکر شد می‌توان به اطلاعات موجود در زمینه میزان جذب سلنیم و اشکال شیمیایی آن از دستگاه گوارش نیز مرتبط دانست. ترکیبات متفاوت سلنیم آلی و معدنی که در منابع غذایی برای دام‌ها افزوده می‌شوند قبل از این که به سلنوپروتئین‌ها تبدیل شوند به سلنید تبدیل می‌شوند (Esaki et al, 1981). لذا این مقدار از سلنیم احیا شده با واسطه اتصالات سولفیدی به آلبومین پلاسما باند می‌شود (Suzuki and Ogra, 2002). گزارش شده است که نسبت آلبومین به ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در حدود ۴۳ درصد است. بنابراین کاهش TAC در بره‌های تجویز شده با سلنوپروتئین نتیجه متصل شدن مقادیر زیادی از سلنید به آلبومین است (Fragaab et al, 2015). این تفسیر در این مطالعه می‌تواند مباحثه‌ای باشد. زیرا کم‌ترین میزان TAC در نانوسلنیم مشاهده شد که شکل نوظهور سلنیم معدنی بوده و لاجرم اثرات آن در زمینه‌های گوناگون منجمله TAC بهتر و مناسب‌تر از نوع معدنی آن یعنی سلنیت سدیم باشد. این بخش با نظرات قبلی که سلنیم به سلنید تبدیل و به آلبومین باند شده و سبب کاهش TAC می‌گردد مطابقت می‌کند (Belal et al, 2021). در صورتی که سایر گروه‌های سلنیم به همراه ویتامین E حتی با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را در میزان TAC نشان ندادند یعنی با تعبیر فوق هماهنگ نمی‌باشند.

یکی از مواردی که در بره‌های تغذیه شده از سلنیم معدنی مانند سلنیت سدیم در ارتباط با عدم تأثیر و یا کاهش آن در TAC همانند سلنیم آلی اتفاق نمی‌افتد می‌توان این گونه بیان کرد که سلنیت مولکول کوچکی است که به سرعت جذب و توسط گلوکوتایون در عرض چند دقیقه سریعاً احیا و به سلنید تبدیل می‌شود. سلنید قبل از این که به کبد برای سنتز به سلنوپروتئین و یا متیله شدن برای دفع

در نظر می‌گیرند. در مطالعه حاضر اثرات تجویز سلنیم (به عنوان بخشی از ساختار آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز و محرک تولید این آنزیم) و آلفا توکوفرول به تنهایی و به صورت ترکیبی در بره‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی به عنوان شاخص سیستم آنتی‌اکسیدانی در تمامی بره‌های تحت مطالعه بررسی گردید.

میانگین TAC بره‌ها قبل از شروع تجویز مکمل‌ها در این مطالعه $1/32 \mu\text{mol/l}$ بوده که از نتایج $0/80 \mu\text{mol/l}$ گزارش شده توسط Boldižárová و همکاران (۲۰۰۵) اندکی بیش‌تر بوده و دلالت بر وضعیت تغذیه‌ای بهتر بره‌ها در این مطالعه دارد. اگر چه بره‌ها در مقایسه با مطالعه فوق TAC بیش‌تری دارند اما بالفعل ممکن است همچنان حساس به استرس اکسیداتیو و بروز بیماری‌های ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد باشند (Celi, 2011). ارزیابی نتایج این مطالعه نشان داد که در بره‌های دریافت‌کننده نانوذرات سلنیم همراه با ویتامین E یا بدون آن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در سرم خون کاهش یافت.

در این بررسی اگر چه در مجموع ۹۰ روز تفاوتی در بین گروه‌ها از نظر مقدار TAC مشاهده نشد اما در بررسی انفرادی، نمونه‌برداری روز ۶۰ در بره‌های نانوسلنیم کم‌ترین و بره‌های با E/Se بیش‌ترین میزان TAC را نشان دادند. Belal و همکاران (۲۰۲۱)، Kassab و همکاران (۲۰۲۰) و Sherief و همکاران (۲۰۱۹) با تجویز E/Se افزایش معنی‌دار TAC را نشان دادند که با نتایج این مطالعه مغایرت داشته در صورتی که در مطالعات Hassan and AbdAllah (۲۰۲۱) و El-Sayed و همکاران (۲۰۲۰) و Mousavi و همکاران (۲۰۱۹) افزایش مذکور مختصر و جزئی بوده که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد. تغییرات در مقادیر TAC بر اساس تجویز نوع مکمل سلنیم و روش تجویز می‌تواند متغیر باشد.

Prior و Cao (۱۹۹۹) گزارش نمودند اگر چه ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی انعکاسی از شرایط تغذیه‌ای و نیز میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد ولی تغییر در مقادیر

از بدن آماده شود به صورت موقتی به آلبومین متصل می‌گردد (Suzuki and Itoh, 1997). بنابراین بهره‌مندی مداوم از ترکیبات سلنیم آلی سبب افزایش سلنید و کاهش آلبومین آزاد و نهایتاً کاهش TAC خواهد شد. به همین منظور تلاش محققان در استفاده از سلنیت معدنی (Gupta et al, 2010; Shirkhande et al, 1997; Suttle, 2010) و نوع نانوذره آن (Humann-Ziehanka et al, 2013; Karren et al, 2014) است تا از طرفی سبب افزایش آنتی‌اکسیدان‌های اختصاصی و آنزیمی مانند گلوکوتایون پراکسیداز شده و ثانیاً سبب تضعیف آلبومین که از آنتی‌اکسیدان‌های کثیر، مهم و غیراختصاصی است نشود و مقدمات کاهش TAC را فراهم نکند. در راستای تأیید موارد ذکر شده بایستی به بره‌های گروه ویتامین E این مطالعه اشاره نمود که منظم‌ترین و کم‌ترین تغییرات TAC را در بین گروه‌های ۸ گانه حتی بهتر از گروه کنترل نشان داد که یکی از برجسته‌ترین علل آن قرار گرفتن توکوفرول در گروه آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی و یا TAC است (Yildiz et al, 2015) و نهایتاً بیش‌ترین و نامنظم‌ترین تغییرات در گروه‌های نانوسلنیم به همراه ویتامین E است که می‌تواند از محدودیت‌های مصرف این گونه از مکمل‌های سلنیم در بره‌ها باشد.

مشاهده تغییرات میزان TAC در روز ۶۰ در غالب گروه‌ها حکایت از تأثیرگذار بودن مکمل‌های سلنیم در میزان TAC در بره را دارد. وجود رابطه مثبت TAC روز اول با روز ۶۰ در گروه کنترل نشانگر افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی در بدن و محافظت مناسب در برخورد با عوامل بیماری‌زا است. رابطه منفی TAC روز اول با روز ۷ و ۱۴ در گروه نانوسلنیم/ویتامین E و روز ۶۰ در گروه سلنیم/ویتامین E تزریقی بیانگر مصرف شدن و کاهش TAC می‌باشد. نتایج مشابه توسط Boldizárová و همکاران (۲۰۰۵) گزارش شده است. این محققین نتیجه می‌گیرند پس از افزودن مکمل‌های آلی و معدنی میزان TAC کاهش می‌یابد. از آن جایی که نقش آنتی‌اکسیدان‌ها در سلامت دام‌ها و جلوگیری از بروز بیماری‌ها مهم تلقی شده است، لذا محققان تلاش نموده‌اند که ارتباط TAC را در گیاهان (Gladine et al, 2007; Lou et al, 2007)، مواد غذایی (Luciano et al, 2011; López-Andre et al, 2013) دام‌ها (Kanatt et al, 2005) و انسان (Dizdar et al, 2011) با سایر عوامل تأثیرگذار در میزان TAC را بررسی و ارزیابی کنند. پس از افزودن مکمل‌های آلی و معدنی سلنیم میزان TAC کاهش و در مقابل فعالیت و غلظت آنزیم‌های گلوکوتایون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز افزایش داشت (Belal et al, 2021). مقادیر TAC در دام سالم $1/14 \mu\text{mol/l}$ بوده که به میزان $0/75$ تقلیل یافت. لذا می‌توان ارتباط منفی را منظور نمود.

نتایج این مطالعه نشان داد که TAC روزهای ۱۴ و ۶۰ برای گروه‌هایی مانند سلنیت سدیم تزریقی و E/Se تزریقی مهم تلقی می‌شوند. افزایش TAC در گروه‌های سلنیت معدنی احتمالاً با تفاسیر ذکر شده در فوق مطابقت می‌کند (Boldizárová et al, 2005) اما در جزئیات نقش زمان نیز در مقدار TAC احتمالاً تعیین کننده باشد. در همین راستا موقعی که سلنیم معدنی استفاده می‌شود (Mlambo, 2003) افزایش TAC در حداقل زمان یعنی دو هفته و سریع است در صورتی که سلنیم معدنی با آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند توکوفرول توأم استفاده شود (Soliman et al, 2012) میزان TAC در دو ماه به حداکثر خود می‌رسد که شاید شرایط بهتر از سلنیم معدنی خالص باشد زیرا ماندگاری آنتی‌اکسیدان تا دو ماه دوام یافته و بره را در مقابل بسیاری از بیماری‌های تنفسی، عضلانی و گوارشی (Shirkhande

و سرانجام در گاوهای مبتلا به جفت ماندگی نسبت اکسیدان‌ها به TAC افزایش داشت که تصور می‌شود عدم بالانس این عوامل سبب بروز جفت ماندگی در دام شود (Kankofe et al, 2010). مجموعه نتایج و یافته‌های محققان فوق بیان‌گر مرتبط بودن و متأثر شدن TAC از عوامل متعدد و گوناگون فیزیولوژیک و پاتولوژیک است. در خاتمه می‌توان نتیجه گرفت که تجویز مکمل‌های سلنیم خصوصاً نانوسلنیم و ویتامین E موجب کاهش TAC سرم خون بره‌ها شده در صورتی‌که مکمل‌های ساده سلنیم در وضعیت TAC تأثیری نمی‌گذارند. مقدار TAC وابسته به زمان بوده و سلنیم معدنی در کوتاه مدت و سلنیم معدنی توأم با ویتامین E در دراز مدت TAC را افزایش می‌دهد. سرانجام جهت افزایش سریع TAC و درمان بیماری‌های منتج از کاهش سلنیم، تزریق سلنیم معدنی مؤثر بوده در حالی‌که برای افزایش TAC در بلند مدت و پیش‌گیری از کمبودهای احتمالی سلنیم تزریق E/Se در بره‌های نوزاد مناسب خواهد بود.

در بسیاری از بیماری‌ها ارتباط بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها مطالعه شده است. در مطالعه Eghbali و همکاران (۲۰۱۰) در گاو میش ارتباط عکس بین مقدار TAC را با حجم، حرکت و پلاسمای منی نشان دادند در گاوهای با تولید شیر بالا نسبت اکسیدان‌ها با TAC بالا بود که نقش آنتی‌اکسیدان‌ها را در ممانعت از هر گونه استرس ناشی از بیماری‌های متابولیک در گاو شیری را نشان می‌دهد (Castillo et al, 2003; Xiao et al, 2021). در آلودگی‌های انگلی دستگاه گوارش گوسفند و بز میزان آنتی‌اکسیدان‌ها در بین این دو گونه دامی متفاوت بود و میزان TAC در بزغاله‌های سالم بیش‌تر از بره‌های سالم بود (Lightbody et al, 2001). در بیماری‌های با بزبوز گوسفند میزان مالون دی‌آلدئید با TAC رابطه منفی داشت (Esmailnejad et al, 2012). در گاوهای مبتلا به تب برفکی میزان اکسیدان‌ها افزایش یافته اما TAC تغییر و یا کاهش نیافت (Bozukluhan et al, 2012). در سندرم آشفته‌گی تنفس نوزادان نسبت اکسیدان‌ها با TAC بالا بود اما پس از درمان نسبت فوق به نفع TAC تغییر یافت (Dizdar et al, 2011).

تشکر و قدردانی

مؤلفین این مقاله صمیمانه از کارکنان دانشگاه و سایر کسانی که در این پروژه یاری و مشارکت نموده‌اند کمال تشکر و امتنان را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافع وجود ندارد.

منابع مالی

منابع مالی این مطالعه توسط معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه، تأمین شده است.

منابع

Awawdeh, M.S., Eljarah, A.H. and Ababneh, M.M. (2019). Multiple injections of vitamin E and selenium improved the reproductive performance of estrus-synchronized Awassi ewes. *Tropical Animal Health and Production*, 3: 11–6.

Belal, H., Elmetwaly, H. and Amer, A. (2021). Role of Selenium and/ or Vitamin E in Preventing Some Pre-and Post-Partum Problems in Dromedary She Camels. *Suez Canal Veterinary Medical Journal. SCVMJ*, 26(1): 131-141.

- Boldižárová, K., Grešáková, L., Faix, S., Mellen, M. and Leng, L. (2005). Antioxidant status of lambs fed on diets supplemented with selenite or Se-yeast. *Journal. Animal Feed Science*, 14::245–253.
- Bordignon, R., Volpato, A., Glombowsky, P., Souza, C.F., Baldissera, M.D., Secco, R., Pereira, W.A.B., Leal, M.L.R., Vedovatto, M. and Silva, A.S. (2019). Nutraceutical effect of vitamins and minerals on performance and immune and antioxidant systems in dairy calves during the nutritional transition period in summer. *Journal Thermal Biology*, 84: 451–459.
- Bozukluhan, K., Atakisi, E., Atakisi, O. and Kodu, M. (2012). Nitric Oxide Levels, Total Antioxidant and Oxidant Capacity in Cattle with Foot-and-Mouth-Disease. *Kafkas Univiversity Veterinary Fakultesi Dergesi*, 19: 179-181.
- Castillo, C., Hernandez, J., Alonso, M.L., Miranda, M. and Benedito, J.L. (2003). Values of plasma lipid hydroperoxides and total antioxidant status in healthy dairy cows. *Archive Tierz Dummerstorf*, 3: 227-233.
- Celi, P. (2011). Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33: 233-240.
- Dizdar, E.A., Uras, N. and Oguz, S. (2011). Total antioxidant capacity and total oxidant status after surfactant treatment in preterm infants with respiratory distress syndrome. *Annale Clininical Biochemistry*, 48: 462–467.
- Eghbali, M., Alavi-Shoushtari, S.M., Asri-Rezaei, S. and Ansari, M.K., (2010). Calcium, Magnesium and Total Antioxidant Capacity (TAC) in Seminal Plasma of Water Buffalo (*Bubalus Bubalis*) Bulls and their Relationships with Semen Characteristics. *Veterinary Reasearch Furum*, 1: 12-20.
- El-Sayed, A., El-Ashker, M., Ebissy, E. and Ateya, A. (2020). Effect of prepartum vitamin E and selenium administration on postpartum gene expression and metabolic profile of immune and oxidative markers in Barki ewes. *Genetika*, 52 (2): 673 – 688.
- Esaki, N., Nakamura, T. Tanaka, H., Suzuki, T., Morino, Y. and SodaEnzymic, K. (1981). synthesis of selenocysteine in rat liver. *Biochemistry*, 20: 15-24.
- Esmaeilnejad, B., Tavassoli, M., Asri-Rezaei, S. and Dalir-Naghadeh, B. (2012). Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in sheep naturally infected with *Babesia ovis*. *Veterinary Parasitology*, 185: 124-130.
- Fragaab, C.G., Oteizabc, P.I. and Galleanoa, M. (2014). In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 840(2): 931-934.
- Gladine, C., Rock, E., Morand, C. and Bauchart, D. (2007). Antioxidant capacity of plant extracts rich in polyphenols, given as a single acute dose, in sheep made highly susceptible to lipoperoxidation. *British Journal of Nutrition*, 98: 691–701.
- Gupta, S. and DeLemos, J.A., (2007). Use and misuse of cardiac troponins in clinical practice. *Progress in cardiovascular diseases Journal*, 50: 151-165.
- Hassan, M.S. and Abd-Allah, E.A. (2021). Impact the effect of vitamin E and Selenium supplementation on oxidative parameters and reproductive efficiency of Egyptian buffaloes. *Journal Multidiscipline. Science*, 3(1): 16-20.
- Huang, Y., Sun, Y., Zhou, J. and Guo, L. (2009). Effects of Organic Selenium Sources on Lamb's Growth Performance and Its Antioxidative Activities. *Animal Husbandry Feed Science*, 6: 35-44.
- Humann-Ziehanka, E., Renkob, K., Muellerc, A.S., Roehriga, P., Wolfsena, J. and Gantera, M. (2013). Comparing functional metabolic effects of marginal and sufficient selenium supply in sheep. *Journal Trace Element Medical Biology*, 27: 380–390.
- Ighodaro, O.M. and Akinloye, O.A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase(CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54: 287–293.
- Kanatt, S.R., Chander, R., Radhakrishna, P., and Sharma, R. (2005). Potato Peel Extract a Natural Antioxidant for Retarding Lipid Peroxidation in Radiation Processed Lamb Meat. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 53: 1499–1504.
- Kankofe, M., Albera, E., Feldman, M., Gundling, N. and Hoedemaker, M. (2010). Comparison of antioxidative/oxidative profiles in blood plasma of cows with and without retained fetal placental membranes. *Theriogenology* :1385-1395.
- Karren, B.J., Thorson, J.F., Cavinder, C.A., Hammer, C.J. and Coverdale, J.A. (2014). Effect of selenium supplementation and plane of nutrition on mares and their foals. Selenium concentrations and glutathione peroxidase. *Journal Animal Science*, 88: 3 991-997.

- Kassab, A.Y., Hamdon H., Senosy, W., Daghash, H. and Soliman, A. (2020). Impact of antioxidants supplementation on metabolic status and reproductive performance of Aberdeen cows during seasonal thermal stress in arid subtropical regions. *Egyptian Journal of Animal Production*, 57 (1): 1- 11.
- Kojouri, G.A., Sadeghian, S. and Mohebbi, A. (2012). Effects of Oral Consumption of Selenium Nanoparticles on Chemotactic and Respiratory Burst Activities of Neutrophils in Comparison with Sodium Selenite in Sheep. *Biology trace element Research*, 146: 160-166.
- Konvicná, J., Vargová, M., Paulíková, I., Ková, C.G. and Kostecká, Z. (2015). Oxidative stress and antioxidant status in dairy cows during prepartal and postpartal periods. *Acta Veterinaria. Brno*, 84: 133-140.
- Koracevic, D. and Koracevic, G. (2001). Total antioxidant capacity (Colorimetric method). *Journal Clinical Pathology*, 54: 356-361.
- Lightbody, U.H., Stevenson, L.M., Jackson, F., Donaldson, K. and Jones, D.J. (2001). Comparative Aspects of Plasma Antioxidant Status in Sheep and Goats, and the Influence of Experimental Abomasal Nematode Infection. *Journal of Comparative Pathology*, 124: 192-199.
- Lo'pez-Andre's, P., Luciano, G., Vasta, V., Gibson, T.M., Biondi, L., Priolo, A. and Mueller-Harvey, I. (2013). Dietary quebracho tannins are not absorbed, but increase the antioxidant capacity of liver and plasma in sheep. *British Journal of Nutrition*, 110: 632-639.
- Lou, H., Lin, S., Ren, F., Wu, L, Chen, L. and Sun, Y. (2007). Antioxidant and Antimicrobial Capacity of Chinese Medicinal Herb Extracts in Raw Sheep Meat. *Journal of Food Protection*, 70: 1440-1445.
- Luciano, I.J., Vasta, V., Monahan, F.J., López-Andrés, P., Biondi, L., Lanza, M. and Priolo, A. (2011). Antioxidant status, colour stability and myoglobin resistance to oxidation of longissimus dorsi muscle from lambs fed a tannin-containing diet. *Food Chemistry*, 124: 1036-1042.
- Mattioli, A.G., Diana, E.R., Esteban, T., Sebastián, J.P., Santiago, J.R., Antonio, H.H.M. and Luis, E.F. (2020). Effects of Parenteral Supplementation with Minerals and Vitamins on Oxidative Stress and Humoral Immune Response of Weaning Calves. *Animals*, 10: 1298-1305.
- Mavangira, V. and Sordillo, L.M. (2018). Role of lipid mediators in the regulation of oxidative stress and inflammatory responses in dairy cattle. *Research Veterinary Science*, 116: 4-14.
- Meng, D., Zhang, P., Zhang, L., Wang, H., Ho, C.T., Li, S., Shahidi, F. and Zhao, H., (2017). Detection of cellular redox reactions and antioxidant activity assays, *Journal of Functional Foods*, 37: 467-479.
- Mikulková, K., Kadek, R. and Filípek, J. (2020). Evaluation of oxidant/antioxidant status, metabolic profile and milk production in cows with metritis. *Irish Veterinary Journal*, 73, 1-11.
- Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P. and Malik, A.B. (2014). Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxid. Redox Signal*, 20: 1126-1127.
- Mlambo, S.S. (2003). Active biomonitoring (ABM) of the Rietvlei Wetland System using antioxidant enzymes, non-enzymatic antioxidants and histopathology as biomarkers, URI: <http://hdl.handle.net/10210/1192>.
- Mousavi, S., Fatahnia, F., Taasoli, G. and Mohammadi, Y. (2019). Effect of some injectable vitamins and trace minerals on blood antioxidant capacity and incidence of metabolic disorders in transition dairy cows. *Animal Science Journal*, 31(121): 173-192.
- Mutalip, M., Ab-Rahim, S., Rajikin, M., (2018). Vitamin E as an antioxidant in female reproductive health. *Antioxidants*, 7(2): 22-29.
- Nimse, S.B. and Pal, D.F. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Royal Society of Chemistry*, 5: 27986-28006.
- Prior, R.L, Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*, 27 (11-12): 1173-1181.
- Sherief, M., Abdel-Raheem, G., Mahmoud, B., Walled, S. and Taymour, M. (2019). Influence of vitamin E and selenium supplementation on the performance, reproductive indices and metabolic status of Ossini ewes. *Slovenian Veterinary Research*, 56: 353- 363.
- Shi, L., Yang, R., Yue, W., Wu, J., Zhao, P., and Lei, X. (2009). Comparison of Nano-Selenium and Methionine-Selenium on Growth and Selenium Content in Blood and Tissue of Boer Goats Lamb. *Acta Ecology Animal Domast*, 19: 33-39.
- Shi, L., Xun, W., Yue, W., Zhang, C., Ren, Y., Shi, L., Wang, Q., Yang, R. and Lei, F. (2011). Effect of sodium selenite, Se-yeast and nano-elemental selenium on growth performance, Se concentration and antioxidant status in growing male goats. *Small Ruminant Research*, 96: 49-52.

- Shirkhande, G.B., Sapre, V.A. and Sarode, D.B. (1997). Metabolic profile of dairy cows. *Indian Veterinary Journal*, 74(5): 407-408.
- Shokrollahi, B. et, al., (2013). The Effect of Enriched Milk with Selenium and Vitamin E on Growth Rate, Hematology, Some Blood Biochemical Factors, and Immunoglobulins of Newborn Goat Kids. *Biological Trace Element Research*, 153: 184-190.
- Soliman, E. et, al., (2012). Combined effect of vitamin E and selenium on some productive and physiological characteristics of ewes and their lambs during suckling period. *Egyptian Journal of Sheep & Goat Sciences*, 7: 31- 42.
- Spears, J.W. (2011). Trace Mineral Bioavailability in Ruminants. *Journal Nutrition*; 133: 1506-1509.
- Suttle, N.F. (2010). Mineral Nutrition of Livestock. 4th Edition, FSC, Mixed Sources, MPG Books Group 2010; 4, 355–377.
- Suzuki, K.T. and Itoh, M. (1997). Metabolism of selenite labelled with enriched stable isotope in the bloodstream. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 692:15-22.
- Suzuki, K.T. and Ogra, Y. (2002). Metabolic pathway for selenium in the body: speciation by HPLC-ICP MS with enriched Se. *Food Additives & Contaminants*, 19(10): 1232-1239.
- Tufarelli, V. and Laudadio, V., (2011). Dietary supplementation with selenium and vitamin E improves milk yield composition and rheological properties of dairy Jonica goats. *Journal of Dairy Research*, 78: 144-148.
- Wang, L.S.A. (2011). Recent Advances of Nano-selenium in Animal Nutrition. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 11(4): 14-21.
- Xiao, J., Zahoor, T., Khan, M., Ma, Y., Alugongo, J.M., Ma, J., Chen, T., Khan, A. and Cao, Z., 2021. The Antioxidant Properties of Selenium and Vitamin E; Their Role in Periparturient Dairy Cattle Health Regulation *Antioxidants*, 10: 1555.
- Yildiz, A., Balikci, E. and Gurdogan, F., (2015). Effect of injection of vitamin E and selenium administered immediately before the Ovsynch synchronization on conception rate, antioxidant activity and progesterone levels in dairy cows. *Firat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 29: 183–186.
- Zhang, J., Liu, C.L., Liu, J.J., Bai, X.H., Cao, Z.K., Yang, J. and Yu, M. (2021). Ramakrishnad S, Long YZ, 2021. Eluting mode of photodynamic nanofibers without photosensitizer leakage for one-stop treatment of outdoor hemostasis and sterilizing super bacteria. *Nanoscale*, 13: 6105–6116.
- Ding, Z., Li, W., Huang, J., Yi, B. and Xu, Y. (2017). Dietary alanyl-glutamine and vitamin E supplements could considerably promote the expression of GPx and PPAR α genes, antioxidation, feed utilization, growth, and improve composition of juvenile cobia. *Aquaculture* 470: 95–102.

Received: 29.12.2021

Accepted: 03.09.2022

ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژی بافت بیضه و اپیدیدیم در سگ‌های تحت درمان با هورمون‌های استانوزولول و ناندرولون دکانوات

بهمن مصلی‌نژاد^{۱*}، سعد گورانی‌نژاد^۱، آناهیتا رضایی^۲، سیدرضا فاطمی طباطبایی^۳، هادی ایمانی‌راستابی^۴ و سامان سلمانی^۵

^۱ استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۳ استاد گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۴ دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۵ دانش‌آموخته دکترای تخصصی بیماری‌های داخلی دام‌های کوچک، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۳/۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۴

چکیده

هورمون‌های استانوزولول و ناندرولون دکانوات، عمدتاً جهت تقویت رشد عضلانی، افزایش وزن بدن، درمان کم‌خونی و تحریک اشتها، در سگ و اسب کاربرد دارند؛ در عین حال، برخی عوارض جانبی از جمله آتروفی بیضه و کاهش تعداد اسپرماتوزوئید در سگ‌ها گزارش شده است. هدف از انجام تحقیق حاضر، ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژی بافت بیضه و اپیدیدیم، در سگ‌های تحت درمان با استانوزولول و ناندرولون دکانوات می‌باشد. مطالعه حاضر بر روی ۱۶ قلاده سگ نر صورت گرفت. حیوانات مورد مطالعه، به دو گروه مساوی ۸ تایی تقسیم‌بندی شدند. سگ‌های گروه A، به مدت ۶ هفته متوالی تحت تجویز داروی استانوزولول با دوز ۵۰ میلی‌گرم/به‌ازاء هر قلاده سگ و به شکل داخل عضلانی قرار گرفتند. گروه B مشابه گروه A بود، با این تفاوت که به جای استانوزولول، ناندرولون دکانوات و با دوز ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم تزریق گردید. جهت بررسی عوارض احتمالی بر بیضه‌ها، یکی از آن‌ها قبل از تحقیق، از طریق جراحی برداشت شده و بیضه دوم در روزهای ۲۸ (۴ قلاده از هر گروه) و ۴۲ (۴ قلاده باقی‌مانده در هر گروه) برداشت شدند. قبل از قرار گرفتن بیضه‌ها در فرمالین بافر ۱۰ درصد، کیفیت اسپرم در اپیدیدیم از لحاظ شاخص‌هایی نظیر تحرک، مورفولوژی و تعداد آن‌ها در زمان‌های صفر، ۲۸ و ۴۲ روزگی بررسی شدند. نتایج نشان داد که اثرات مخربی نظیر هیپرپلازی سلول‌های لایدیگ بینابینی، واکوئل‌دار شدن، حضور سلول‌های چند هسته‌ای و مراحل مختلف اسپرماتوگونی در بافت بیضه و نیز تخریب سلول‌های پوشاننده مجرا و کنده شدن مژه‌های پوشاننده در مخاط اپیدیدیم، به وجود آمد. این تغییرات، در گروه دریافت‌کننده استانوزولول، به شکل معنی‌داری بیش‌تر از ناندرولون دکانوات بود. در گروه استانوزولول، بیشتر تغییرات کمی و در گروه ناندرولون دکانوات، تغییرات کیفی مشهودتر بود. اگر چه هر دو دارو، دارای عوارض جانبی بر بافت بیضه و اپیدیدیم بودند؛ اما عوارض جانبی استانوزولول، بیش‌تر از ناندرولون دکانوات بود؛ لذا پیشنهاد می‌گردد جهت اهداف درمانی، از ناندرولون دکانوات و با دوز حداقل دارو استفاده شود.

کلمات کلیدی: استانوزولول، ناندرولون دکانوات، هیستوپاتولوژی، بیضه، اپیدیدیم، سگ

مقدمه

استروئیدهای آنابولیک، شامل تستوسترون و مشتقات سنتتیک آن‌ها می‌باشند. این هورمون‌ها، موجب افزایش استئوپروستین، رشد ماهیچه‌ها، تحریک اشتها و افزایش روند خون‌سازی می‌شوند. تستوسترون توسط بیضه و به مقدار

* نویسنده مسئول: بهمن مصلی‌نژاد، استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

E-mail: bmosallanejad@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

کم توسط غده فوق کلیوی ترشح می‌شود. کاهش کیفیت اسپرم و افزایش شیوع تومورهای بیضه ممکن است در ارتباط با در معرض قرار گرفتن با عوامل شیمیایی مختلف، به ویژه در زمان رشد و تکامل جنین، رخ دهد. استانوزولول و ناندرولون دکانونات دو هورمون معمول، مورد استفاده در دامپزشکی هستند. کاربرد استروئیدهای آنابولیک بیش‌تر در سگ، اسب و انسان گزارش شده است (Ettinger and Feldman, 2010; Sumner et al, 2021).

استانوزولول، معروف به وینسترو- V ، بیش‌تر جهت کمک به درمان بیماری‌های مزمن مرتبط با کم خونی استفاده می‌شود. دوز معمول دارو، ۲ تا ۴ میلی‌گرم برای هر حیوان دو بار در روز، و یا ۵۰ میلی‌گرم از فرم تزریقی به صورت عضلانی یک بار در هفته و برای مدت ۶ هفته تجویز می‌شود. استروئیدهای آنابولیک ایده‌آل، باید دارای حاشیه ایمنی وسیع، فعالیت قابل توجه، سهولت در تجویز و سازگاری با سایر ترکیبات باشند. برخی از استروئیدهای آنابولیک ۱۷-آلفا-آلکیل، مانند استانوزولول، با آسیب‌های بافت بیضه (لیومیوسارکوما) و اپیدیدیم همراه بوده‌اند. با این حال، استانوزولول ممکن است باعث عوارض جانبی نظیر آسیب کبدی و یا تغییرات رفتاری، در برخی از گونه‌های حیوانی شود (به ویژه در تجویزهای طولانی مدت) (Maddison et al, 2002; Faghihi and Gandomi Sani, 2013; Bond et al, 2016; Ozcagli et al, 2018).

بررسی‌های هیستوپاتولوژیک بیضه‌ها، جزء ضروری جهت درک فیزیولوژی طبیعی، اندوکرینولوژی، هیستوپاتولوژی و آناتومی بافت بیضه می‌باشد که کارایی ازدیاد نسل را در سگ‌ها مشخص می‌نماید. استفاده از هورمون‌های آنابولیک برای اهداف مختلف، در حیوانات خانگی رشد چشم‌گیری داشته است، اما با نتایج متفاوتی همراه بوده است. در استفاده از هورمون‌های آنابولیک می‌بایست دقت لازم صورت گیرد، چرا که برخی عوارض، نظیر آرواسپرمی، ناباروری، تومور پروستات، بزرگی آلت تناسلی، افزایش نعوظ، جلوگیری از عملکرد طبیعی بیضه، ناتوانی جنسی، آتروفی بیضه پس از بلوغ، بزرگ شدن غیر عادی سینه‌ها و کاهش حجم مایع منی، گزارش شده است. متأسفانه این دارو، به شکل غیر قانونی در باشگاه‌های بدنسازی کشورهای مختلف، استفاده شده است (Etienne, 2007; Faghihi and Gandomi Sani, 2013).

ناندرولون دکانونات (دورابولین) نیز از تستوسترون مشتق می‌شود. بسیاری از تحقیقات نشان داده‌اند که تزریق داخل عضلانی این دارو، موجب افزایش توده عضلانی می‌شود. اثرات مثبت ناندرولون دکانونات شامل رشد عضلانی، تحریک اشتها، افزایش تولید اریتروپویتین و در نتیجه افزایش گلبول‌های قرمز خون، درمان آنمی و پوکی استخوان می‌باشد. گزارش‌های متعددی، در ارتباط با اثرات نامطلوب استروئیدهای آنابولیک بر اندام‌های مختلف از جمله عملکرد بیضه‌ها، گزارش شده است. لازم به ذکر است که اثرات این داروها، تا حدود زیادی وابسته به دوز می‌باشد (Etienne, 2007; Polzin, 2010; Carrero et al, 2010).

با توجه به تحقیقات نسبتاً محدود در این زمینه، به نظر می‌رسد که بررسی‌های بیش‌تر لازم است تا عوارض هورمون‌های مختلف آنابولیک، بر اندام‌های مختلف در سگ‌ها مشخص گردد. این نتایج، از نظر بالینی در روند تولید مثل حیوانات خانگی از جمله سگ‌ها و گربه‌ها، جایگاه خاص خود را دارد (Harkin et al, 2000; Mohd Mutalip et al, 2013). از آن‌جا که در زمینه آسیب‌های بافتی ناشی از تجویز هورمون‌های فوق، نتایج مشخص و قطعی با دوزاژ درمانی وجود ندارد، لذا هدف از انجام

ناندرولون دکانونات (دورابولین) نیز از تستوسترون مشتق می‌شود. بسیاری از تحقیقات نشان داده‌اند که تزریق داخل عضلانی این دارو، موجب افزایش توده عضلانی می‌شود. اثرات مثبت ناندرولون دکانونات شامل رشد عضلانی، تحریک اشتها، افزایش تولید اریتروپویتین و در نتیجه افزایش گلبول‌های قرمز خون، درمان آنمی و پوکی استخوان می‌باشد. گزارش‌های متعددی، در ارتباط با اثرات نامطلوب استروئیدهای آنابولیک بر اندام‌های مختلف از جمله عملکرد بیضه‌ها، گزارش شده است. لازم به ذکر است که اثرات این داروها، تا حدود زیادی وابسته به دوز می‌باشد (Etienne, 2007; Polzin, 2010; Carrero et al, 2010).

شده، به روش هماتوکسیلین و ائوزین، رنگ آمیزی شده و مورد ارزیابی میکروسکوپی قرار گرفتند.

سگ‌های گروه A، به مدت ۶ هفته متوالی (هفته‌ای یک-بار) تحت تجویز داروی استانوزولول با دوز ۵۰ میلی‌گرم/به ازای هر قلاده سگ و به شکل داخل عضلانی قرار گرفتند و گروه B، تحت تجویز هورمون ناندرولون دکانوات، با دوز ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم و به مدت ۶ هفته (هفته‌ای یک‌بار) قرار گرفتند. لازم به ذکر است که هورمون‌ها در تمام طول انجام مطالعه، در دمای پائین‌تر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد، دمای اتاق و دور از نور آفتاب نگهداری شدند. جهت برداشت بیضه سگ‌ها، ابتدا عمل پیش بیهوشی صورت گرفت. بدین منظور از داروهای اسپرومازین (۰/۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) و کتامین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) استفاده شد. همچنین جهت نگهداری بیهوشی از دو داروی کتامین (با همان دوز قبلی) و دیازپام (۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) استفاده گردید. در حین عمل جراحی نیز تمام رفلکس‌های حیاتی با دستگاه مانیتورینگ بررسی شدند. بیضه‌ها پس از برداشت از طریق جراحی، در شرایط کاملاً آسپتیک و در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شده و پس از برداشت نمونه اسپرما توژنید از دم اپیدیدیم، کیفیت و کمیت نمونه‌ها بررسی گردید. لازم به ذکر است که در آزمایشگاه، تلاش گردید تا رگ‌های روی اپیدیدیم برداشته شوند تا نمونه‌های اسپرم با خون مخلوط نشوند، ضمناً، نمونه‌های بافتی چندین بار با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد شستشو داده شدند. انتقال نمونه‌ها به بخش پاتولوژی دانشکده، نیز در کنار کیسه یخ انجام شد. سپس جهت ارزیابی هیستوپاتولوژی از بافت بیضه و اپیدیدیم، نمونه‌های بافتی برش داده شده و در فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار گرفتند. یادآوری می‌شود که فرمالین‌های بافتی، پس از انتقال به بخش پاتولوژی دانشکده، ۲۴ ساعت بعد تعویض شدند و تا زمان اتمام مطالعات در آن باقی ماندند.

تحقیق حاضر، ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژی بافت بیضه و اپیدیدیم در سگ‌های تحت درمان با هورمون‌های استانوزولول و ناندرولون دکانوات می‌باشد. مطالعه حاضر در ادامه تحقیقات قبلی، انجام شده است. نتایج این بررسی، از نظر بالینی کاربردی بوده و می‌تواند برای سگ‌های مبتلا به کریپتورکیدیسم نیز مفید باشد.

مواد و روش کار

در این تحقیق، ۱۶ قلاده سگ نر سالم از نظر بالینی، نژاد مخلوط، در مجدوده سنی ۱/۵ تا ۲ سال و میانگین وزنی ۲۰/۱۵ کیلوگرم، مورد بررسی قرار گرفتند. قبل از انجام آزمایش و به منظور از بین بردن استرس، تمامی حیوانات، در قفس‌های مجزا و برای مدت ۷۲ ساعت در بیمارستان دامپزشکی اهواز نگهداری شدند. آن‌ها از جیره غذایی ثابت و مشابهی، عمدتاً اسکلنت مرغ، تغذیه شدند. سپس واکسن ۷ گانه و هاری به آن‌ها تزریق شد و نیز داروهای ضدانگل (کنیورم) به آن‌ها خورانده شد.

سگ‌های مورد مطالعه، به شکل تصادفی، به دو گروه مساوی ۸ تایی تقسیم‌بندی شدند. گروه A جهت بررسی هورمون استانوزولول و گروه B به منظور بررسی هورمون ناندرولون دکانوات انتخاب شدند. سگ‌های گروه A به صورت تصادفی، به دو زیر گروه A₁ و A₂ تقسیم شدند. گروه B نیز، به دو زیر گروه B₁ و B₂ تقسیم شد. در هر زیر گروه، ۴ قلاده سگ قرار داشتند. جهت بررسی عوارض احتمالی بر بیضه‌ها، یکی از آن‌ها قبل از انجام تحقیق (زمان صفر)، در تمام گروه‌ها و بیضه دوم در روزهای ۲۸ (۴ قلاده از هر گروه ۸ تایی یا زیر گروه‌های اول A₁ و B₁) و ۴۲ (۴ قلاده باقی‌مانده در هر گروه یا زیر گروه‌های دوم A₂ و B₂)، از طریق جراحی برداشته شدند و در فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار گرفتند. قبل از قرار گرفتن بیضه‌ها در فرمالین، کیفیت اسپرم در اپیدیدیم از لحاظ شاخص‌هایی نظیر (تحرک، مورفولوژی و تعداد) در کنار ارزیابی هیستوپاتولوژی و در زمان‌های صفر، ۴ و ۶ هفته بررسی شدند. اسلایدهای تهیه

جهت ارزیابی هیستوپاتولوژی، ابتدا از نمونه‌ها، برش‌های کوچک‌تر تهیه و پس از چند ساعت که در زیر آب جاری قرار گرفتند به دستگاه اتوتکنیکون، جهت پاساژ بافتی، انتقال داده شدند. این دستگاه به مدت ۱۸ ساعت به طور اتوماتیک کار می‌کند. مراحل کار این دستگاه شامل آبیگری، شفاف‌سازی و آغشته‌گری می‌باشد. بعد از طی این مراحل، مرحله قالب‌گیری انجام شد. بدین منظور ابتدا قالب‌های مخصوص را روی یک میز آماده نموده و به وسیله یک پنس، نمونه بافت به آهستگی، داخل قالب قرار داده شد و روی آن پارافین مذاب ریخته شد. سرانجام بافت، روی یخ قرار داده شد تا سرد شود و برای برش آماده شود. جهت برش از دستگاه میکروتوم استفاده گردید و مقاطعی به ضخامت ۳-۴ میکرون برای رنگ‌آمیزی تهیه گردید. اسلایدهای تهیه شده، به روش معمول، با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. در این رنگ-آمیزی، لام‌ها به مدت یک دقیقه در رنگ هماتوکسیلین قرار داده شدند. سپس به مدت ۱۰ ثانیه در آب جاری قرار گرفتند. برای آب‌گیری، لام‌ها طی سه مرحله و هر مرحله به مدت ده ثانیه در الکل ۸۰ درصد و دو بار در الکل ۹۶ درصد قرار داده شدند. در گام بعدی به منظور شفاف‌سازی بافت‌ها، لام‌ها در دو ظرف متفاوت و هر یک به مدت ۳ دقیقه، در گزلیول قرار داده شدند. سرانجام، در مرحله آخر لام‌ها با استفاده از چسب مونتانلان، مونت‌گذاری شدند و با میکروسکوپ نوری مورد بررسی دقیق قرار گرفتند. لازم به ذکر است که در تمامی موارد، حداقل ۵ میدان میکروسکوپی با عدسی‌های مختلف، مورد بررسی قرار گرفتند.

جهت ارزیابی اسپرمتوزوئیدها، از تمامی سگ‌ها قبل از برداشت بیضه، مایع منی گرفته شد. جهت بررسی اسپرم، از اسپرم موجود در دم‌پی دیدیم و جهت اندازه‌گیری حجم انزال از تمام بخش سوم انزال مایع منی، استفاده گردید. اسپرم‌ها در هر یک از سگ‌ها، از نظر تحرک، تعداد کل

اسپرم‌ها و شکل مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت بررسی تحرک اسپرم‌ها، یک قطره از مایع منی بر روی لام قرار داده شد. سپس درصد تحرک اسپرم‌ها نسبت به هم سنجیده شد. جهت بررسی تعداد اسپرم‌ها در میلی‌لیتر، ابتدا رقیق-سازی بخش سوم انزال صورت گرفت. بدین منظور، ۱ قسمت از مایع منی (۰/۱ میلی‌لیتر) با ۹ قسمت از سالیین فرمالینه بافر شده (۰/۹ میلی‌لیتر) رقیق شد که رقت ۱ به ۱۰ اولیه را ایجاد کرده و سپس با مخلوط کردن ۱ قسمت از این رقت اولیه با ۹ قسمت سالیین فرمالینه بافر شده، رقت ۱ به ۱۰۰ از مایع منی تهیه گردید. سپس مایع منی رقیق شده روی ناحیه مرکزی هموسایتومتر قرار داده شد که در ادامه، محلول رقیق شده توسط خاصیت موئینگی در سرتاسر ناحیه مرکزی هموسایتومتر پخش گردید. هموسایتومتر پر شده، به مدت ۵ دقیقه در محل سکون قرار داده شد تا اسپرم‌ها در جای خود آرام بگیرند و در اثر جریان مایع حرکت نکنند. سپس یکی از مربع‌ها توسط میکروسکوپ نوری شمارش شد. در نهایت، تعداد اسپرم‌ها به صورت میلیون در میلی‌لیتر محاسبه گردید. در نهایت برای بررسی تعداد کل اسپرم در مایع منی، حجم بخش سوم منی (میلی‌لیتر به ازاء هر انزال) ضرب در غلظت (تعداد اسپرم در میلی‌لیتر) شد. جهت بررسی شکل اسپرم‌ها، مایع منی با ائوزین-نگروزین رنگ‌آمیزی شد. در این روش یک قطره منی در یک انتهای لام و یک قطره رنگ ائوزین-نگروزین در کنار آن قرار داده شد. سپس با کمک یک لام دیگر، دو قطره به سمت همدیگر حرکت داده شد و با هم مخلوط گردید، سپس با همان لام، گسترشی از مخلوط این دو، تهیه شد و در مجاورت هوا خشک گردید. در نهایت لام با استفاده از روغن ایمرسیون زیر میکروسکوپ ارزیابی و نواقص اولیه اسپرم بررسی شدند. ناهنجاری‌های بررسی شده شامل سر شکسته، سر سنجاقی، سر دوتایی و دم دوتایی بودند.

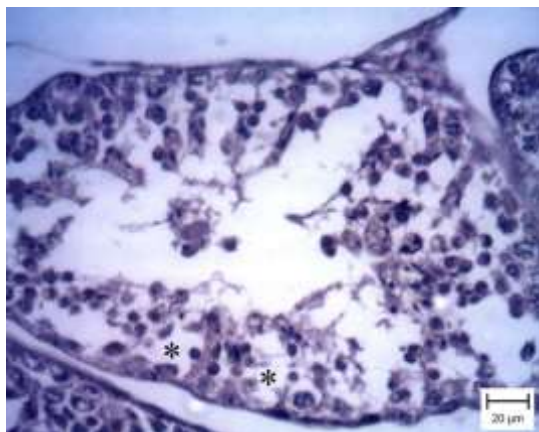


Figure 2: Dog testicle. Group A₁ (Stanozolol) on days 28. Note the presence of multiple vacuoles (stars) among the germ cells (staining with Hematoxylin and Eosin).

پس از سپری شدن ۴۲ روز از تجویز استانوزولول، بافت بیضه، آسیب بسیار شدیدتری دیده بود. تعداد زیادی از لوله‌های سمی‌نیفر، دچار تغییرات دژنراتیو شده بودند. این لوله‌ها چروکیده شده بودند و مخاط پوشاننده آن‌ها بسیار نازک شده بود. همچنین در برخی از لوله‌ها، فقط سلول‌های سرتولی مشاهده گردید و در مجرای مرکزی برخی، نیز سلول‌های چند هسته‌ای مشاهده شدند. سلول‌های لایدیگ در بین لوله‌های سمی‌نیفر افزایش یافته بودند (Figure 3 and 4). در گروه دریافت‌کننده ناندرولون دکانوات، ۲۸ روز پس از تجویز دارو، برخی از لوله‌ها چروکیده شده بودند. همچنین تعداد سلول‌های لایدیگ، در بین لوله‌های سمی‌نیفر نیز افزایش یافته بودند (Figure 5 and 6). لازم به ذکر است که تعداد لوله‌های آسیب دیده از گروه دریافت‌کننده استانوزولول کم‌تر بود.

جهت ارزیابی داده‌ها، از آزمون مربع‌کای و بر اساس شاخص‌های توصیفی (میانگین، انحراف معیار، فراوانی و درصد) استفاده گردید. همچنین به منظور ارزیابی رابطه بین متغیرها، از آزمون فریدمن، t-test، آزمون t وابسته و ANOVA یک طرفه استفاده شد. تمام آنالیزها به کمک نرم‌افزار SPSS-16 انجام گرفت و از نظر آماری $P < 0.05$ ، معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

در بررسی میکروسکوپی از بافت بیضه، ۲۸ روز پس از تزریق استانوزولول، در مقایسه با بیضه‌هایی که در روز صفر برداشته شده بودند، در تعدادی از لوله‌های سمی‌نیفر تغییرات مختلفی دیده شدند. برخی از لوله‌ها چروکیده و فضای خالی زیادی در اطراف آن‌ها مشاهده گردید. در این لوله‌ها، غشای پایه چروکیده شده بودند. روند اسپرماتوژنز نیز در آن‌ها آسیب دیده، ضخامت لایه سلولی کم و در لابلای سلول‌های جنسی، واکوئل‌های متعددی دیده شدند. همچنین در بین لوله‌های سمی‌نیفر سلول‌های لایدیگ متعدد مشاهده گردید (Figure 1 and 2).

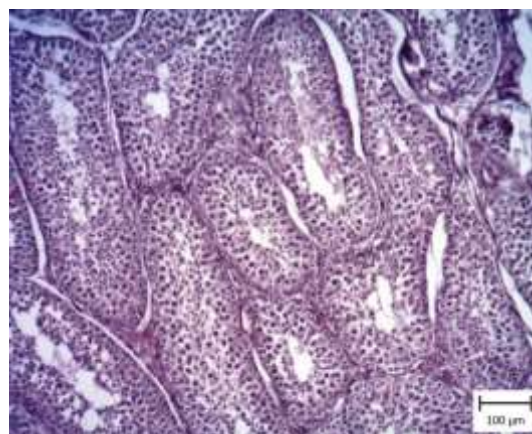


Figure 1: Dog testicle. Group A (Stanozolol) on day zero. Note the natural structure of seminiferous tubules (staining with Hematoxylin and Eosin).

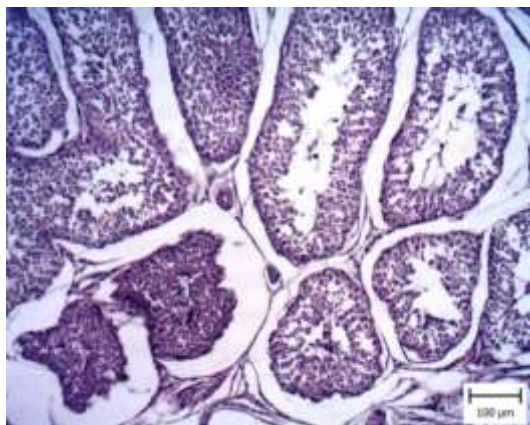


Figure 6: Dog testicle. Group B₁ (Nandrolone decanoate) on days 28. Note the wrinkling of some toxic-nipple tubules (staining with Hematoxylin and Eosin).

پس از گذشت ۴۲ روز از تجویز ناندروлон دکانوات، تعداد زیادی از لوله‌های سمی نیفر آسیب دیده و سلول‌های جنسی متعددی از بین رفته بودند. در مقایسه با گروه دریافت‌کننده استانوزولول، لوله‌های سالم بیشتری دیده شدند و روند اسپرماتوژنز کاملاً متوقف نشده بود. در این گروه نیز افزایش تعداد سلول‌های لایدیگ دیده شد (Figure 7 and 8).

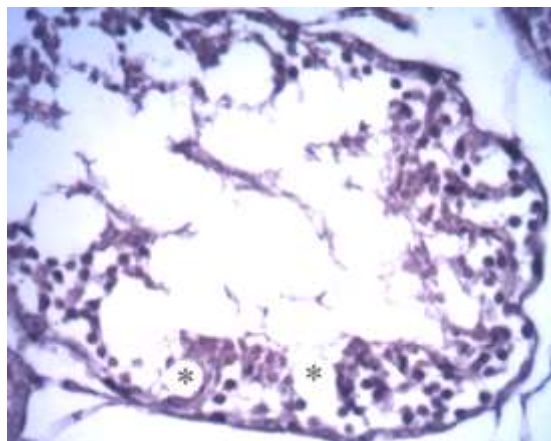


Figure 7: Dog testicle. Group B₂ (Nandrolone decanoate) is seen on days 42. Note the degeneration and vacuolation of sex cells (star) (staining with Hematoxylin and Eosin).

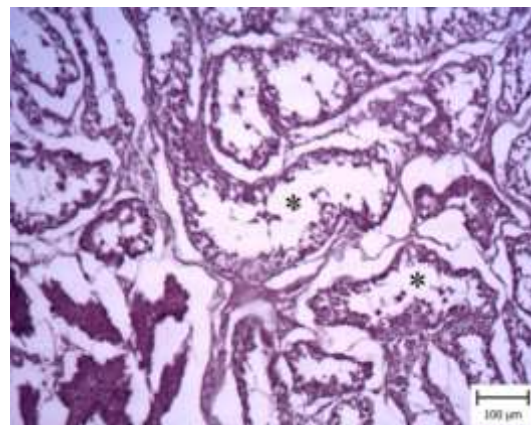


Figure 3: Dog testicle. Group A₂ (Stanozolol) on days 42. Note the shrinkage of the seminiferous tubules and the destruction of the mucosa covering them (star) (staining with Hematoxylin and Eosin).

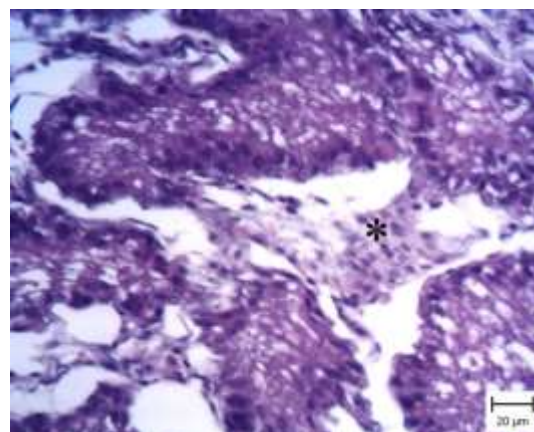


Figure 4: Dog testicle. Group A₂ (Stanozolol) on days 42. Note the increase of the number of Leydig (star) cells among the damaged seminiferous tubules (staining with Hematoxylin and Eosin).

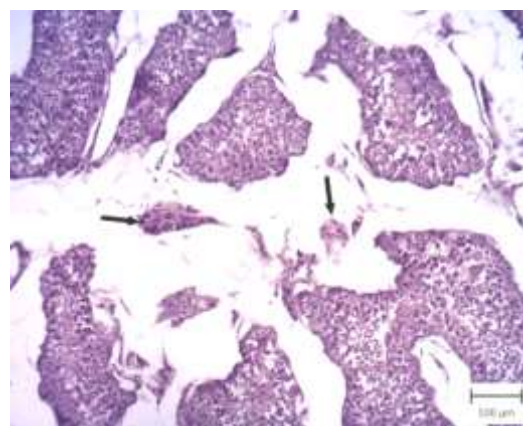


Figure 5: Dog testicle. Group B₁ (Nandrolone decanoate) on days 28. Note the increase of Leydig (arrow) cells between damaged and wrinkled seminiferous tubules (staining with Hematoxylin and Eosin).

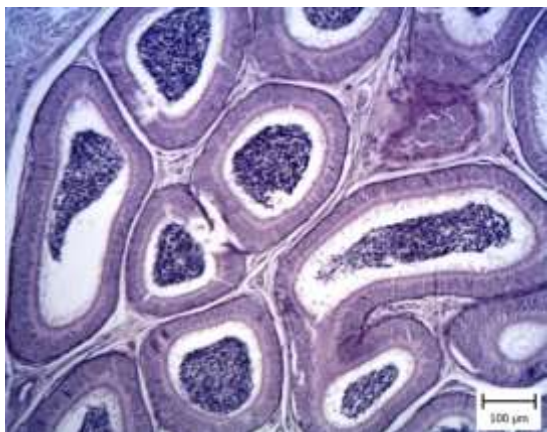


Figure 9: Epididymis tissue. Group A on day zero. Note the normal structure of the epididymal tubes and the presence of spermatozoa in them (staining with Hematoxylin and Eosin).

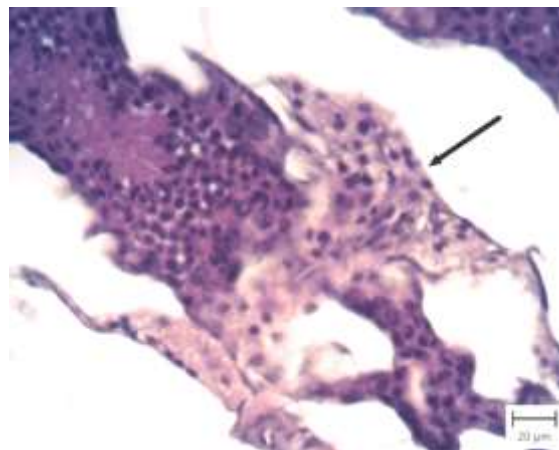


Figure 8: Dog testicle. Group B₂ (Nandrolone decanoate) on days 42. Note the increase of Leydig (arrow) cells (staining with Hematoxylin and Eosin).



Figure 10: Epididymis tissue. Group A₁ (Stanozolol) on days 28. Note the presence of spermatid cells in the epididymal duct (black arrow) and focal removal of cilia (red arrow) (staining with Hematoxylin and Eosin).

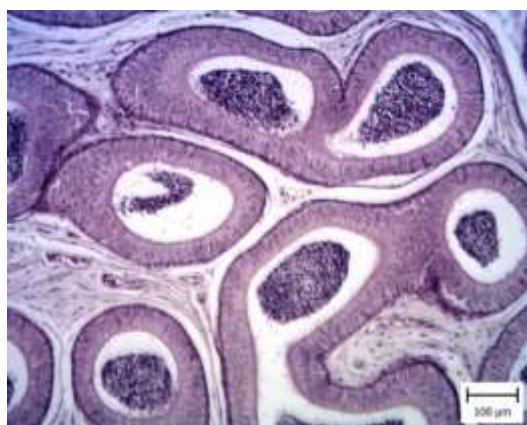


Figure 11: Epididymis tissue. Group A₂ (Stanozolol) on days 42. Different stages of spermatogonia. Note the absence of spermatozoa in the epididymis (star) (staining with Hematoxylin and Eosin).

اپیدیدیم

در بررسی میکروسکوپی اپیدیدیم در روز صفر، در مجرای مرکزی مقاطع لوله‌ها، سلول‌های اسپرماتوزوئید فراوان دیده شدند. همچنین مخاط پوشاننده این لوله‌ها، استوانه‌ای شبه مطبق همراه با مژه بودند. ۲۸ روز پس از تجویز استانوزولول، در مجرای لوله‌ها، سلول‌های اسپرماتوزوئید کم‌تری دیده شد و در مقابل، تعداد زیادی سلول‌های گرد که شبیه اسپرماتوزوئید بودند، دیده شدند. همچنین مژه‌ها به صورت کانونی کنده شده بودند (Figure 9 and 10). پس از گذشت ۴۲ روز در همین گروه، سلول‌های پوشاننده مخاط لوله‌های اپیدیدیم دچار دژنراسانس شدیدی شدند که با وجود واکوئل‌های خالی در داخل سیتوپلاسم سلول‌های مخاطی، مشخص گردید. در مجرای مرکزی آن‌ها سلول‌های جنسی مشاهده نشد. گروه ناندرولون دکانوات، آسیب خفیف‌تری را در مقایسه با گروه استانوزولول نشان دادند. ۲۸ روز پس از تجویز ناندرولون دکانوات، تعداد کمی از لوله‌ها فقط کنده شدن کانونی مژه‌ها را نشان دادند و در مجرای مرکزی آن‌ها، سلول‌های اسپرماتوزوئید فراوان دیده شد. پس از طی ۴۲ روز از تجویز هورمون، برخی از سلول‌ها دچار دژنراسانس سلولی شدند (Figure 9-12).

اسپرم‌ها در شاخص‌های سر سنجاقی، دو عدد دم، حرکت سریع و متوسط در روز ۴۲ بیشتر از روز صفر بود، اما این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).

گروه B

اگر چه تعداد کل اسپرماتوزوئیدها و اسپرم‌های مرده، در گروه دریافت کننده ناندرولون دکانوات، کاهش یافته بود، اما این تغییر از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). همچنین میانگین شاخص‌های داشتن دو عدد سر، سر سنجاقی، دو عدد دم، حرکت متوسط و حرکت چرخشی، در روز ۲۸ نسبت به روز صفر افزایش پیدا کرده بود، اما این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). در ادامه، اگر چه میانگین‌ها در شاخص‌های سر شکسته، دو عدد دم، سر سنجاقی، دو عدد سر، حرکت‌های سریع، متوسط و چرخشی در روز ۴۲ نسبت به روز صفر افزایش پیدا کرده بود، اما این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). با توجه به نتایج فوق، استانوزولول بیش‌تر منجر به تغییرات کمی، و ناندرولون دکانوات بیش‌تر منجر به تغییرات کیفی در اسپرم‌ها گردید.

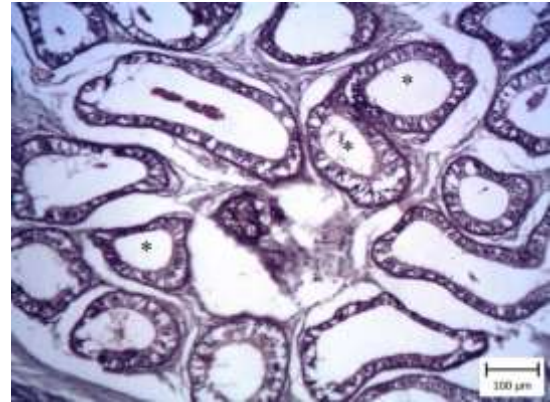


Figure 12: Epididymis tissue. Group B1 (Nandrolone decanoate) on days 28. Different stages of spermatogonia. Note the moderate presence of spermatozoa in the duct (staining with Hematoxylin and Eosin).

گروه A

نتایج به دست آمده نشان داد که تعداد کل اسپرم در روزهای ۲۸ و ۴۲ نسبت به روز صفر، در گروه دریافت کننده استانوزولول کاهش یافته بودند و این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$). اگر چه در گروه دریافت کننده استانوزولول، میانگین در شاخص‌های سر شکسته، داشتن دو عدد سر، سر سنجاقی، حرکت سریع و حرکت متوسط، در روز ۲۸ بیش از روز صفر بود و نیز میانگین

Table 1: Mean±standard deviation of total sperm count and dead sperm (per ml) in groups A and B

| Data \ Time (days) | Zero | 28 | 42 |
|------------------------------|--------------------|------------------|-------------------|
| Total number of spermatozoid | 132.27 ± 60.26 (A) | 105 ± 18.02 (A) | 52.5 ± 3.53 (A) |
| | 132.27 ± 60.26 (B) | 180 ± 18.02 (B) | 118.75 ± 53.2 (B) |
| Dead spermatozoid | 26.44 ± 18.90 (A) | 23.33 ± 5.77 (A) | 20.0 ± 0 (A) |
| | 26.44 ± 18.90 (B) | 10 ± 0 (B) | 21.83 ± 14.54 (B) |

Table 2: Mean±standard deviation of sperm shape and movement (per ml) in groups A and B

| Data (spermatozoid) \ Time (days) | Zero | 28 | 42 |
|-----------------------------------|---------------|-------------------|-------------------|
| Broken head | 2.44 ± 1.58 | 3.33 ± 2.3 (A) | 2.0 ± 0 (A) |
| | | 2.0 ± 0 (B) | 2.38 ± 1.46 (B) |
| Two head | 1.66 ± 0.7 | 3.33 ± 1.52 (A) | 1.5 ± 0.7 (A) |
| | | 5.0 ± 0 (B) | 2.05 ± 1.1 (B) |
| Ancillary head | 1.22 ± 0.44 | 1.66 ± 1.57 (A) | 1.5 ± 0.7 (A) |
| | | 2.0 ± 0 (B) | 1.38 ± 0.5 (B) |
| Two tail | 1.44 ± 0.72 | 1.33 ± 1.57 (A) | 2.0 ± 1.41 (A) |
| | | 3.0 ± 0 (B) | 1.77 ± 0.87 (B) |
| Fast moving | 45.88 ± 23.36 | 46.66 ± 15.27 (A) | 52.5 ± 10.60 (A) |
| | | 40.0 ± 0 (B) | 49 ± 18.55 (B) |
| Moderate moving | 9.44 ± 0.3 | 13.33 ± 5.77 (A) | 20.0 ± 14.14 (A) |
| | | 20.0 ± 0 (B) | 12.77 ± 6.23 (B) |
| Rotational motion | 16.66 ± 12.24 | 16.66 ± 11.54 (A) | 7.5 ± 3.53 (A) |
| | | 30.0 ± 0 (B) | 15.55 ± 10.83 (B) |

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تغییرات در بافت بیضه و اپیدیدیم، در گروه دریافت‌کننده استانوزولول بیش‌تر از گروه ناندروولون دکانوات بود؛ به نحوی که اگرچه هر دو هورمون استانوزولول و ناندروولون دکانوات، منجر به تغییراتی نظیر حضور واکوئل‌های متعدد، تخریب اپی‌تلیوم لوله منی‌ساز، هیپرپلازی سلول‌های لایدیگ بینابینی و نیز حضور سلول‌های چند هسته‌ای در بافت بیضه شدند، اما شدت آن در گروه A بیش‌تر بود. همچنین هورمون‌های فوق منجر به تغییراتی از قبیل حضور مراحل مختلف اسپرماتوگونی، واکوئل‌های خالی، دژنرسانس سلولی و کنده شدن مژه‌ها، در اپیدیدیم شدند (با شدت بیش‌تر در گروه A). بیست و هشت روز پس از تجویز ناندروولون دکانوات، تعداد کمی از لوله‌ها، فقط کنده‌شدن کانونی مژه‌ها را نشان دادند و در مجرای مرکزی آن‌ها، سلول‌های اسپرماتوزوئید فراوان دیده شد و ۴۲ روز بعد از تجویز هورمون فوق، برخی از سلول‌ها دچار دژنرسانس سلولی شدند؛ در حالی که روند تغییرات در گروه استانوزولول، به مراتب شدیدتر از گروه ناندروولون دکانوات بود. به عبارت دیگر، استانوزولول بیش‌تر منجر به تغییرات کمی و ناندروولون دکانوات بیش‌تر منجر به تغییرات کیفی در اسپرم‌ها گردید.

Farrell و همکاران (۲۰۰۴) با تزریق هورمون‌های استانوزولول و ناندروولون دکانوات، هر دو با دوز ۵ میلی-گرم/کیلوگرم و بررسی بافت بیضه در رت، حضور مراحل مختلف اسپرماتوگونی را مشاهده کردند. Pope و همکاران (۲۰۰۰) نیز با تزریق هورمون‌های مذکور، تغییرات مشابهی را در بافت بیضه انسان مشاهده نمودند. Delgado و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که درمان با استانوزولول، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در ماهیچه‌های منقطع موش صحرائی را افزایش می‌دهد. Tousson و همکاران (۲۰۱۶) بافت بیضه خرگوش سفید نیوزیلند را بعد از تزریق هورمون بولدنون آندسیلنات (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم و به مدت ۳ تا ۹ هفته) بررسی نمودند. مشاهدات میکروسکوپی آن‌ها نشان داد که خون‌ریزی، حضور لایه‌های فیبروزی،

مراحل مختلف اسپرماتوسیت در لوله‌های منی‌ساز و تغییرات واکوئل‌شدن در سیتوپلاسم اپی‌تلیوم لایه ژرمینال و سلول‌های سرتولی بافت بیضه ایجاد شده بود. با افزایش مدت زمان تجویز هورمون، اثرات جانبی در بافت بیضه تشدید گردید.

Jannatifar و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که تزریق ناندروولون دکانوات، بر تعداد سلول‌های لایدیگ، سلول‌های اسپرماتوزوئید و غلظت سرمی تستوسترون در رت‌های نابالغ، اثرات سویی (کاهش تعداد اسپرماتوزوئیدها) بر جا گذاشت. Mohd Mutalip و همکاران (۲۰۱۳) تغییرات بافت بیضه موش‌های تحت درمان با ناندروولون دکانوات، تستوسترون و استانوزولول را بررسی نمودند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که تمامی این هورمون‌ها، اثرات زیان‌باری بر عملکرد طبیعی بیضه، در زمان بلوغ رت‌ها داشتند. Siti و همکاران (۲۰۱۳) نیز با تزریق ناندروولون دکانوات و استانوزولول در رت و بررسی بافت بیضه نشان دادند که تزریق هورمون‌های مذکور، اثرات منفی بر بافت بیضه بر جا گذاشت؛ به نحوی که با تزریق ناندروولون دکانوات در بیضه، شکل لوله‌های منی‌ساز تغییر نموده و به صورت جزئی، جمعیت اسپرماتوگونی‌ها کاهش یافت؛ همچنین در گروه دریافت‌کننده استانوزولول، از بین رفتن کامل شکل لوله‌های منی‌ساز و افزایش سلول‌های بافت بینابینی را مشاهده کردند. نتایج محققین فوق نشان داد که استانوزولول، تغییرات شدیدتری را نسبت به گروه ناندروولون دکانوات در بافت بیضه ایجاد کرد و همچنین با بالا رفتن دوزاژ هورمون، میزان اثربخشی هورمون افزایش یافت. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که متعاقب تزریق هورمون‌های استانوزولول و ناندروولون دکانوات، اثرات مخربی نظیر هیپرپلازی سلول‌های لایدیگ بینابینی، واکوئل‌دار شدن، حضور سلول‌های چند هسته‌ای و مراحل مختلف اسپرماتوگونی در بافت بیضه و نیز تخریب سلول‌های پوشاننده مجرا و کنده شدن مژه‌های پوشاننده در مخاط

اپیدیدیم، بوجود آمد. این تغییرات، در گروه دریافت‌کننده استانوزولول، بیش‌تر از ناندرولون دکانونات بود.

Tahtamouni و همکاران (۲۰۱۰) نیز ناندرولون دکانونات را به رت‌های نر تزریق کردند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که تزریق دارو با دوز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم توانست اثرات جانبی بر روند اسپرماتوژنز ایجاد نماید. همچنین تجویز دارو با دوز بالا، توانست باعث بروز اختلالاتی در سیستم تولید مثلی رت‌ها گردد. Mesbah و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که بیضه رت‌ها متعاقب تزریق ناندرولون دکانونات (۱۰-۳ میلی‌گرم/کیلوگرم و به مدت ۱۴ هفته) دچار آتروفی شده و اندازه لوله‌های منی‌ساز تغییر کرد. در مطالعه حاضر، در گروه دریافت‌کننده ناندرولون، ۲۸ روز پس از تجویز هورمون، برخی از لوله‌ها چروکیده شده بودند. همچنین تعداد سلول‌های لایدیگ، در بین لوله‌های سمی‌نیفر نیز افزایش یافته بودند. در مجموع، تعداد لوله‌های آسیب دیده در گروه ناندرولون دکانونات، نسبت به گروه استانوزولول کم‌تر بود. از جنبه فارماکوکینتیک، بر استفاده از دارو، با فاصله زمانی ۱ هفته و در یک دوره زمانی ۶ هفته، تاکید شده است تا عوارض جانبی احتمالی دارو کاهش یابد.

Samah و همکاران (۲۰۱۲) خرگوش‌های نر بالغ سفید نیوزیلند را به دو گروه تقسیم‌بندی نموده و به ترتیب ۴/۴ و ۸/۸ میلی‌گرم/کیلوگرم از هورمون بولدنون آندوسیلنات را به مدت ۲ ماه (هفته‌ای دوبار) تزریق کردند. در بررسی میکروسکوپی از بافت بیضه در گروه اول دژنره شدن لوله‌های منی‌ساز و پرخونی و در بیضه گروه دوم کوچک شدن اندازه لوله‌های منی‌ساز و افزایش ضخامت بافت بینابینی را مشاهده کردند. آن‌ها همچنین در بررسی بافت اپی‌دیدیم، در گروه اول کاهش میزان اسپرماتوژنز و در گروه دوم عدم حضور اسپرماتوزوئید بالغ را مشاهده کردند. این محققین اذعان داشتند که اثرات مخرب در گروه دریافت‌کننده دوز بیش‌تر، به صورت مشهودی از گروه اول بیش‌تر بود. Thabet و همکاران (۲۰۱۰) نیز با مطالعه بر روی بافت بیضه خرگوش‌های دریافت‌کننده استروئیدهای

آنابولیک، ناهنجاری‌های مختلفی را مشاهده کردند. برخی از ناهنجاری‌ها شامل دور شدن لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر، افزایش سلول‌های لایدیگ، حضور سلول‌های غول‌پیکر در لومن، تفاوت در مراحل اسپرماتوگونی، درجات خفیف خون‌ریزی، کاهش رشد اپی‌تلیوم، واکوئل-دار شدن و حضور موارد ائوزینوفیلیک بودند. همچنین با افزایش سن خرگوش‌ها، اثرات منفی ایجاد شده به مراتب بیش‌تر بود.

Cannizzo و همکاران (۲۰۰۷) نیز با بررسی هستیوپاتولوژی بافت بیضه انسان به یافته‌های مشابهی از جمله هیپرپلازی سلول‌های لایدیگ و مراحل مختلف اسپرماتوگونی رسیدند. در تبیین نتایج به دست آمده می‌توان نکاتی را یادآور شد: نخست آن که میزان تأثیر استروئیدهای آنابولیک بر بافت بیضه به عوامل مختلفی بستگی دارد، از جمله با افزایش دوز داروی مصرفی، میزان اثرات منفی بر بافت بیضه افزایش می‌یابد. دوم آن که سن عاملی مهم در میزان تغییرات در بافت بیضه است، به گونه‌ای که با افزایش سن، میزان تأثیرات این هورمون‌ها بر بافت بیضه بیش‌تر می‌شود. در واقع، متعاقب تزریق استروئیدهای آنابولیک، با ایجاد فیدبک منفی، اثرات مخربی بر بیضه برجا می‌گذارد (Faghihi and Gandomi Sani, 2013).

Olson و همکاران (۲۰۰۰) اعلام کردند که تجویز استانوزولول در سگ‌ها، موجب افزایش احتباس ازت اسیدهای آمینه در بدن گردید. نتایج آن‌ها نشان داد که تزریق استانوزولول، به شکل داخل عضلانی، مؤثرتر از تجویز خوراکی است. Perry و همکاران (۲۰۰۵) گزارش نمودند که دوره کاربرد هورمون‌های آنابولیک در انسان معمولاً بین ۱۰-۵ هفته است.

Pomara و همکاران (۲۰۱۶) اثر تحریکی ناندرولون دکانونات را در بیوسنتز تستوسترون، در سلول‌های لایدیگ موش صحرائی بررسی کردند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که این هورمون قادر است از طریق تداخل در بیان ژن StAR و CYP17AI در سلول‌های لایدیگ، تولید

به دلیل تخریب سلول‌های بافت بیضه، خصوصاً سرتولی، مانع از عملکرد صحیح این بافت در تشکیل اسپرم می‌شوند. در مطالعه‌ای که Tatem و همکاران (۲۰۲۰) در انسان انجام دادند، مشاهده کردند که بعد از قطع مصرف استروئیدهای آنابولیک طی ۲۴ ماه، اسپرماتوزوئیدها به غلظت و شکل طبیعی خود بازگشتند. از این یافته و یافته‌های مشابه می‌توان نتیجه گرفت که این هورمون‌ها احتمالاً اثرات برگشت‌ناپذیر بر روی باروری ایجاد نمی‌کنند و بعد از قطع مصرف دارو با گذشت زمان، اثرات منفی آن از بین می‌رود، که البته نیاز به مطالعات بیش‌تر در این زمینه است. از این رو توصیه می‌شود، این هورمون‌ها تنها در حیواناتی که برای نسل‌گیری استفاده می‌شوند، به کار برده شود. اثرات منفی استروئیدهای آنابولیک، به میزان فیزیولوژیک تستوسترون موجود در خون نیز بستگی دارد (Hall, 2005). اثرات جانبی، با ساختار شیمیایی (ترکیبات آلکیل و غیر آلکیل) استروئیدهای آنابولیک مصرفی، ارتباط مستقیم دارد (Thabet et al, 2010). با توجه به دلایل فوق، می‌توان این چنین استدلال نمود که احتمالاً، علت عدم ایجاد عوارض جانبی در گروه ناندرولون دکانوات در مقابل گروه استانوزولول، به ساختار شیمیایی متفاوت هورمون‌ها بر می‌گردد. دلیل احتمالی دیگر، این که دوزاژ دارو و زمان‌های انتخاب شده در تجویز هورمون، در گروه ناندرولون دکانوات، قدرت لازم برای ایجاد عوارض جانبی در کبد را نداشته است.

اگر چه هر دو هورمون استانوزولول و ناندرولون دکانوات دارای عوارض جانبی بر بافت بیضه و اپیدیدیم بودند؛ اما عوارض جانبی استانوزولول بیش‌تر از ناندرولون دکانوات بود؛ همچنین هر دو هورمون، اثرات جانبی پرشماری بر بافت بیضه و اسپرم ایجاد کرده بودند، لذا پیشنهاد می‌گردد جهت اهداف درمانی، بیش‌تر از ناندرولون دکانوات و با دوز حداقل دارو، استفاده شود.

تستوسترون را افزایش دهد. در مطالعه حاضر، تغییرات در شکل و حرکت اسپرماتوزوئید و نیز کاهش در تعداد کل، در هر دو گروه ایجاد شده بود، به نحوی که در هر دو گروه A و B، تعداد کل اسپرماتوزوئیدها در روزهای ۲۸ و ۴۲ نسبت به روز صفر کاهش یافته بود؛ اما این روند کاهشی در گروه A معنی‌دار و در گروه B غیر معنی‌دار بود.

Goedken و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که جهت ارزیابی میکروسکوپی از بافت بیضه و اپیدیدیم، حداقل سن حیوان می‌بایست ۱۰ ماهه باشد؛ اما اگر ارزیابی اسپرماتوزنر مد نظر است، سن سگ می‌بایست حداقل ۱۲ ماه باشد. مطالعه آن‌ها بر روی ۸۰ قلابه سگ، از نژاد بیگل صورت گرفته بود. یافته‌های میکروسکوپی از هیپواسپرماتوزنر در ۷۵ درصد از سگ‌های ۶ تا ۷ ماهه و آتروفی یا هیپوپلازی توبول‌های سمینی‌فر، در ۴۰-۲۵ درصد از سگ‌های زیر ۱۲ ماهه دیده شدند. در مطالعه حاضر، در گروه دریافت‌کننده استانوزولول، کاهش تعداد کل اسپرم و در گروه دریافت‌کننده ناندرولون دکانوات، تغییرات منفی در مورفولوژی اسپرم مشاهده شده است، که این تغییرات در برخی از مولفه‌ها، همچون تغییر شکل سر اسپرم، حرکت متوسط و حرکت چرخشی معنی‌دار بود. از این رو می‌توان این چنین استنباط کرد که در صورت استفاده از استانوزولول و ناندرولون دکانوات به صورت هفتگی در ۶ هفته، باروری سگ‌ها تحت تأثیر قرار می‌گیرد. طی بررسی‌های به عمل آمده، مقاله‌ای برخلاف نتایج این عنوان از پژوهش یافت نشد. مطالعه حاضر با نتایج برخی پژوهش‌های مشابه با تزریق دیگر استروئیدهای آنابولیک از جمله Thabet و همکاران (۲۰۱۰) و Torres-callega و همکاران (۲۰۰۱) هم‌خوانی دارد. این محققان با تزریق هورمون‌های استروئیدی آنابولیک، اذعان داشتند که در صورت تجویز این هورمون‌ها، تعداد کل اسپرم کاسته می‌شود و همچنین شکل طبیعی اسپرم‌ها تغییر می‌کند. این هورمون‌ها، احتمالاً

تشکر و قدردانى

نویسندگان مقاله، مراتب تشکر و قدردانى خود را از حوزه معاونت محترم پژوهشى دانشگاه شهید چمران اهواز، ابراز مى‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام مى‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعى ندارند.

منابع مالی

هزینه پایان‌نامه مزبور، در قالب پژوهانه، از دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین شده است.

منابع

- Bachman, E., Travison, T. G., Basaria, S., Davda, M. N., Guo, W., Li, M., Westfall, J. C., Bae, H., & Gordeuk, V. (2014). Testosterone induces erythrocytosis via increased erythropoietin and suppressed hepcidin: evidence for a new erythropoietin/hemoglobin set point. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 69(6), 725-735.
- Bond, P., Llewellyn, W., & Mol, P. V. (2016). Anabolic androgenic steroid-induced hepatotoxicity. *Medical Hypotheses*, 93, 150-153.
- Cannizzo, F. T., Zancanaro, G., Spada, F., Mulasso, C., & Biolatti, B. (2007). Pathology of the testicle and sex accessory glands following the administration of boldenone and boldione as growth promoters in Veal Calves. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 69(11), 1109-1116.
- Carrero, J. J., Barany, P., Yilmaz, M. I., Qureshi, A. R., Sonmez, A., Heimburger, O., Ozgurtas, T., Yenicesu, M., Lindholm, B., & Stenvinkel, P. (2012). Testosterone deficiency is a cause of anemia and reduced responsiveness to erythropoiesis-stimulating agents in men with chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 27(2), 709-715.
- Delgado, J., Saborido, A., & Megias, A. (2010). Prolonged treatment with the anabolic-androgenic steroid stanozolol increases antioxidant defences in rat skeletal muscle. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 66(1): 63-71.
- Etienne, C. (2007). *Clinical Veterinary Advisor: Dogs and cats*. St. Louis, Missouri, Elsevier, pp: 1495-1496.
- Ettinger, S. J., & Feldman, E. C. (2010). *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Diseases of the dog and cat. Vol. 2. Sixth edition. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp: 1646-1690.
- Faghihi, S. M., & Gandomi Sani, H. R. (2013). *Veterinary Pharmacy*. 3rd ed., Tehran University Press, pp: 484-485.
- Farrell, S. F., & McGinnis, M. Y. (2004). Long-term effect of pubertal anabolic androgenic steroid exposure on reproductive and aggressive behaviors in male rats, *Hormonology Behavior*, 46(2), 193-203.
- Goedken, M. J., Kerlin, R. L., & Morton, D. (2008). Spontaneous and age-related testicular findings in Beagle dogs. *Toxicologic Pathology*, 36, 465-471.
- Hall, R. C. (2005). Abuse of supraphysiologic doses of anabolic steroids. *Southern Medicine Journal*, 98(5), 550-555.
- Harkin, K. R., Cowan, L. A., Andrews, G. A., Basaraba, R. J., Fischer, J. R., DeBowes, L. J., Roush, J. K., Guglielmino, M. L., & Kirk, C. A. (2000). Hepatotoxicity of stanozolol in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217(5), 681-684.
- Jannatifar, R., Shokri, S., Farrokhi, A., & Nejatbakhsh, R. (2015). Effect of supraphysiological dose of Nandrolone Decanoate on the testis and testosterone concentration in mature and immature male rats: A time course study. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 13(12), 779-786.
- Maddison, J., Page, S., & Church, D. (2002). *Small animal clinical pharmacology*. (2nd ed.) W.B. Saunders Company. Harcourt Publishers, London, UK.

- Mesbah, S. F., Shokri, S., Karbalay-Doust, S., & Mirkhani, H. (2007). The effect of Nandrolone Decanoate on the body, testis and epididymis weight and semen parameters in adult male rats. *Iranian Journal of Medicine Science*, 32(2), 93-99.
- Mohd Mutalip, S. S., Surindar Singh, G. K., Mohd Shah, A., Mohamad, M., Mani, V., & Hussin, S.N. (2013). Histological changes in testes of rats treated with testosterone, nandrolone, and stanozolol. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 11(8), 653-658.
- Olson, M. E., Morck, D. W., & Quinn, K. B. (2000). The effect of stanozolol on 15 nitrogen retention in the dog. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 64(4), 246-248.
- Ozcagli, E., Kara, M., Kotil, T., Fragkiadaki, P., Tzatzarakis, M. N., Tsitsimpikou, Ch., Stivaktakis, P. D., Tsoukalas, D., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., & Alpertunga, B. (2018). Stanozolol administration combined with exercise leads to decreased telomerase activity possibly associated with liver aging. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(1), 405-413.
- Perry, P. J., Lund, B. C., Deninger, M. J., Kutscher, E. C., & Schneider, J. (2005). Anabolic steroid use in weightlifters and bodybuilders. An internet survey of drug utilization. *Clinical Journal of Sports Medicine*, 15(5), 326-330.
- Polzin, D. J. (2010). Chronic kidney disease. In: Ettinger S.J. and Feldman E. C. editors. 7th ed., Vol. 2, *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. St. Louis, Missouri, W. B. Saunders Co., pp: 1990-2021.
- Pomara, C., Barone, R., Gammazza, A. A. M., Sangiorgi, C., Barone, F., Pitruzzella, A., Locorotondo, N., Di Gaudio, F., Salerno, M., Maglietta, F., Sarni, A. L., Di Felice, V., Cappello, F., & Turillazzi, E. (2016). Effects of Nandrolone Stimulation on Testosterone Biosynthesis in Leydig Cells. *Journal of Cellular Physiology*, 231(6), 1385-1391.
- Pope, H. G., Kouri, E. M., & Hudson, J. I. (2000). Effects of supraphysiologic doses of testosterone on mood and aggression in normal men: A randomized controlled trial. *Archives of General Psychiatry*, 57, 133-140.
- Samah, S., Ibrahim, O., & El-Ashmawy, M. (2012). Adverse effects of the anabolic steroid, boldenone undecylenate, on reproductive functions of male rabbits. *International journal of experimental pathology*, 93, 172-178.
- Siti, M., Gurmeet, K., Aishah, M. S., Mashani, M., Vasudevan, M., & Siti, N. (2013). Histological changes in testes of rats treated with testosterone, Nandrolone, and Stanozolol. *Journal of Reproduction Medicine*, 11(8), 653-658.
- Sumner, R. N., Byers, A., Zhang, Z., Agerholm, J. S., Lindh, L., England, G. C. W., & Lea, R. G. (2021). Environmental chemicals in dog testes reflect their geographical source and may be associated with altered pathology. *Scientific Reports*, 11(73), 1-11.
- Tahtamouni, L. H., Mustafa, N. H., Hassan, I. M., Ahmad, I. M., Yasin, S. R. & Abdalla, M. Y. (2010). Nandrolone Decanoate Administration to Male Rats Induces Oxidative Stress, Seminiferous Tubules Abnormalities, and Sperm DNA Fragmentation. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 3(4), 165-174.
- Tatem, A. J., Beilan, J., Kovac, J. R., & Lipshultz, L. I. (2020). Management of Anabolic Steroid-Induced Infertility: Novel Strategies for Fertility Maintenance and Recovery. *World Journal of Mens Health*, 38(2), 141-150.
- Thabet, N. S., Abdelrazek, E. M., Ghazy, E. W., & Elballah, S. S. (2010). Effect of the Anabolic Steroid, Boldenone Undecylenate on Reproductive Performance of Male Rabbits. *Journal of Reproduction and Infertility*, 1(1), 8-17.
- Torres-Calleja, J., Gonzalez-Unzaga, M., Celis-Carrillo, R., Calzada- Sanchez, L., & Pedron, N. (2001). Effect of androgenic anabolic steroids on sperm quality and serum hormone levels in adult male bodybuilders. *Life Science*, 68, 1769-1774.
- Tousson, E. (2016). Histopathological alterations after a growth promoter boldenone injection in rabbits. *Toxicology Indian Health*, 32(2), 299-305.

Received: 27.05.2022

Accepted: 25.06.2022

ردیابی میزان آنتی‌بادی و بررسی شیوع سرمی علیه اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال در سرم بوقلمون‌های کشتار شده در استان خوزستان با استفاده از الایزای خانگی

صدیقه یوسفی‌نژاد^۱، محمد خسروی^{۲*}، داریوش غریبی^۳، منصور میاحی^۴
و مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری^۵

^۱ دانش آموخته دکتری تخصصی باکتری‌شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۳ دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۴ استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۵ استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۷/۱۷

چکیده

اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال (*Ornithobacterium rhinotracheal: ORT*) یک پاتوژن میله‌ای گرم منفی است که جزء عوامل ایجاد کننده بیماری‌های تنفسی در پرندگان محسوب می‌شود. عفونت همزمان با سایر پاتوژن‌ها، می‌تواند سبب اختلال در سلامت گونه‌های پرندگان شده و همچنین منجر به زیان‌های مالی در صنعت طیور گردد. روش‌های سرولوژی از جمله روش‌های بسیار مهم در تشخیص سریع عفونت، پایش گله و همچنین کنترل و پیشگیری از عفونت می‌باشند. نظر به عدم وجود اطلاعات در خصوص میزان آنتی‌بادی و اختلاف عیار آنتی‌بادی در پرندگان سالم و بیمار، هدف این مطالعه طراحی یک آزمون الایزای کمی جهت ارزیابی شیوع اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال، ردیابی میزان آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه آن در سرم جمع‌آوری شده از بوقلمون است. جهت انجام این مطالعه، پس از ایمن‌سازی سه قطعه بوقلمون و به دست آوردن سرم‌های پرایمین، خالص‌سازی آنتی‌بادی با روش‌های کروماتوگرافی تعویض یونی و افینیتی کروماتوگرافی انجام شد. آنتی‌بادی‌های اختصاصی جداسازی شده در الایزای خانگی به عنوان نمونه استاندارد، جهت تعیین میزان آنتی‌بادی اختصاصی علیه اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال به کار گرفته شد. در این بررسی، تعداد ۲۴۴ نمونه سرم از بوقلمون‌های کشتار شده در کشتارگاه طیور استان خوزستان جمع‌آوری گردید که وجود معنی‌دار آنتی‌بادی علیه اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال در ۱۴۱ نمونه مثبت (۵۷/۷۸ درصد) توسط الایزا تشخیص داده شد. میانگین غلظت آنتی‌بادی در نمونه‌های مثبت $124/128 \pm 467/72$ و در نمونه‌های منفی $262/97 \pm 37/264$ میکروگرم در هر میلی‌لیتر از سرم بود. نتایج این مطالعه شیوع عفونت‌های اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال در استان خوزستان را نشان داد. بنابراین به دلیل عدم وجود واکسن مطمئن علیه اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال، مدیریت بهداشتی مناسب برای کنترل بیماری مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال، بوقلمون، آنتی‌بادی، الایزا

مقدمه

چندین پاتوژن باکتریایی به عنوان عوامل احتمالی عفونت‌های دستگاه تنفسی به تنهایی یا در ترکیب

بیماری‌های تنفسی جدی‌ترین مشکلات پیش‌روی تولید طیور در سراسر جهان در نظر گرفته می‌شوند (Awad et al, 2022).

* نویسنده مسئول: محمد خسروی، دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

E-mail: m.khosravi@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

با سایر میکروارگانیس‌ها قلمداد می‌شوند. اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال (*Ornithobacterium rhinotracheal: ORT*) یک باکتری گرم منفی، چند شکلی، غیرمتحرک و غیرهاگ‌زا است که برای اولین بار در طیور اهلی شده که به وسیله پرندگان وحشی مبتلا شده بودند، شناسایی شد. اولین گزارش از این بیماری یک سندرم بیماری جدید در بوقلمون‌ها در اوایل دهه ۱۹۹۰ در آلمان بود (Hinze et al, 1994) و باکتری عامل این بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۹۴ نام‌گذاری شد (Vandamme et al, 1994).

علاوه بر علائم تنفسی، یافته‌های بالینی عمدتاً با افزایش مرگ و میر، توقف رشد، هزینه‌های بالاتر دارو، کاهش تولید تخم مرغ، کاهش کیفیت پوسته تخم مرغ و کاهش قابلیت جوجه‌ریزی همراه است. شدت علائم بالینی، طول مدت بیماری و مرگ و میر با شیوع تأیید شده اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال بسیار متغیر است و تحت تأثیر عوامل محیطی بسیاری مانند مدیریت ضعیف، تهویه ناکافی، ازدحام بیش از حد، شرایط بستر نامناسب، بهداشت نامناسب، نوع عفونت ثانویه، سطح بالای آمونیاک، بیماری‌های مرتبط قرار دارد (Van Empel and Hafez, 1999). علائم بالینی و ضایعات پس از مرگ مرتبط با عفونت اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال شامل تراکتیت، پریکاردیت، سینوزیت، پنومونی آگزوداتیو و ترشحات کف‌آلود ماست مانند در کیسه‌های هوایی می‌باشد (Banani et al, 2001). تصاویر بالینی اورنیتوباکتریوز در بوقلمون‌ها و جوجه‌ها پاتوگنومیک نیست و اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال مشابه بسیاری از بیماری‌های تنفسی دیگر ناشی از پاتوژن‌های باکتریایی یا ویروسی است. بنابراین تکیه بر علائم بالینی و ضایعات پس از مرگ ارزش تشخیصی کمی دارد و برای تشخیص قطعی نیاز به آزمایش‌های تأییدی است (Alispahic et al, 2021; Ellakany et al, 2019).

روش‌های سرولوژیکی برای پایش گله از جمله مهم‌ترین ابزار در تشخیص عفونت‌های باکتریایی هستند. تا به حال ۱۸ سروتیپ مختلف (A-R) در اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال به وسیله روش‌های سرولوژیکی به خصوص الیزا شناسایی شده است. برخی از تفاوت‌های جغرافیایی در سروتیپ‌های موجود در سراسر جهان وجود دارد. بیش‌تر ایزوله‌ها در ایالات متحده و اروپا متعلق به سروتیپ A هستند، در حالی که سروتیپ C فقط در جوجه‌ها و بوقلمون‌های آفریقای جنوبی و ایالات متحده یافت شده است و سروتیپ‌های B, D و E بعد از سروتیپ A در اروپا

با سایر میکروارگانیس‌ها قلمداد می‌شوند. اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال (*Ornithobacterium rhinotracheal: ORT*) یک باکتری گرم منفی، چند شکلی، غیرمتحرک و غیرهاگ‌زا است که برای اولین بار در طیور اهلی شده که به وسیله پرندگان وحشی مبتلا شده بودند، شناسایی شد. اولین گزارش از این بیماری یک سندرم بیماری جدید در بوقلمون‌ها در اوایل دهه ۱۹۹۰ در آلمان بود (Hinze et al, 1994) و باکتری عامل این بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۹۴ نام‌گذاری شد (Vandamme et al, 1994).

جنس *Ornithobacterium* عضوی از خانواده *Weeksellaceae* است که در این خانواده علاوه بر جنس اورنیتوباکتریوم، دو جنس *Riemerella (R. anatipestifer)* و *Coenonia (C. anatine)* نیز وجود دارند که از مهم‌ترین پاتوژن‌های پرندگان به خصوص در غاز و اردک اهلی می‌باشند (Hafez and Chin, 2020).

اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های تنفسی باکتریایی است که عمدتاً صنعت بوقلمون با آن مواجه است. در سال ۲۰۲۰، اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال در فهرست مهم‌ترین مسائل بهداشتی در صنعت بوقلمون آمریکا در رتبه چهارم قرار گرفت و در چندین سال گذشته به طور مداوم بین شماره ۳ و شماره ۴ در نوسان بوده است (Clark and Ahlmeyer, 2018). به غیر از طیور تجاری، عفونت با اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال در گونه‌های مختلف پرندگان نیز گزارش شده است. در این زمینه، پرندگان وحشی به عنوان منبع بالقوه عفونت برای گله‌های طیور تجاری در نظر گرفته می‌شوند (Hashish et al, 2022). عفونت اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال می‌تواند به صورت افقی و عمودی منتقل شود. انتقال افقی عفونت از طریق آب آشامیدنی و آئروسول‌ها و از طریق تماس مستقیم و غیرمستقیم صورت می‌گیرد. اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال در دماهای پایین بقای زیادی دارد و ممکن است عفونت حاصل از این باکتری در زمستان شیوع بیش‌تری داشته باشد. انتقال عمودی از مادر به جنین نیز به اثبات رسیده است، زیرا برخی از محققان

نگهداری شدند. همزمان با نمونه‌گیری از خون بوقلمون، نمونه‌برداری جهت جداسازی جدایه‌های اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال نیز انجام شد.

برای استخراج آنتی‌ژن، جدایه‌های اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال ذخیره شده در بخش آزمایشگاه میکروب-شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز که قبلاً طبق روش‌های باکتریولوژیکی و بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفته بودند، استفاده شد. جدایه‌ها را از دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد خارج نموده و سپس بر روی محیط کشت آگار خون‌دار حاوی ۵ درصد خون اسب به مدت ۲۴-۴۸ ساعت و شرایط میکروانروفیل کشت و گرم‌خانه‌گذاری شدند و پس از اطمینان از خالص بودن، با استفاده از PBS استریل سوسپانسیون‌هایی از آن‌ها تهیه شد. با استفاده از روش استاندارد مک‌فارلند، تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر بر روی $10^8 \times 12$ (McFarland) تنظیم گردید.

با استفاده از روش‌های توصیه شده قبلی آنتی‌ژن اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال تهیه شد. جهت غیرفعال‌سازی باکتری‌ها تیمار باکتری‌ها با فرمالدئید ۱ درصد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. سوسپانسیون باکتری‌ها در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد چندین بار فریز و دفریز شدند که با مشاهده عدم رشد باکتری‌ها پس از ۲۴-۴۸ ساعت از غیر فعال‌سازی آن‌ها اطمینان حاصل شد. سپس سوسپانسیون‌های تهیه شده با ادجوانت کامل فروند و یا در تزریق‌های یادآور با ناقص فروند مخلوط شده و برای تزریق آماده شدند.

از جدایه‌های اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال در غلظتی برابر با $10^8 \times 12$ ، و در حجم ۰/۵ میلی‌لیتر با ۰/۵ میلی‌لیتر ادجوانت کامل فروند مخلوط شد. ایمن‌سازی سه قطعه بوقلمون با تزریق آنتی‌ژن، در عضلات سینه و ران انجام شد. تزریق‌های یادآور در حجم ۰/۵ میلی‌لیتر و با چهار تکرار انجام شد. بدین منظور، تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر از باکتری‌های غیرفعال شده با مقدار مساوی از ادجوانت ناقص فروند با فاصله ۱۰ روز انجام شد. پس از کسب اطمینان از ایجاد عیار مناسب آنتی‌بادی با روش الیزا

غالب هستند. همچنین سروتیپ A شایع‌ترین سروتیپ در بین سویه‌های جدا شده از مرغ‌ها و سروتیپ‌های A، B، D و E در بوقلمون‌ها است (Xue et al, 2022; Churria et al, 2012). گزارش‌هایی از عفونت ORT در کشورهای مختلف مانند ایالات متحده، آلمان، آفریقای جنوبی، ژاپن، ترکیه و ایران وجود دارد (Van Empel and Hafez, 1999). گسترش سریع بیماری‌های مرتبط با اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال و افزایش گزارش آن در مطالعات اپیدمیولوژیک، تفاوت‌های درون گونه‌ای و ویژگی‌های خاص جدایه‌ها را بر اساس منطقه جغرافیایی و منبع نشان داد (Alispahic et al, 2021; Barbosa et al, 2019).

علی‌رغم اهمیت اقتصادی این پاتوژن در صنعت بوقلمون، تا کنون مطالعات همه‌گیری‌شناسی در مورد اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال در بوقلمون‌های استان خوزستان گزارش نشده است. با توجه به افزایش عیار آنتی‌بادی متعاقب عفونت با ORT، به کارگیری آزمون الیزا می‌تواند سبب بهبود نظارت بر وضعیت سیستم ایمنی و شناسایی سرولوژیک اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال در پرندگان بیمار شود. هدف از این مطالعه، طراحی یک آزمون الیزا جهت بررسی کمی میزان آنتی‌بادی در پرندگان سالم و دارای علائم بیماری تنفسی و همچنین ارزیابی شیوع سرمی این بیماری در بوقلمون‌های کشتار شده در کشتارگاه طیور خوزستان (جنوب غربی ایران) می‌باشد.

مواد و روش کار

در زمستان و بهار ۱۴۰۰ تا ۱۴۰۲ تعداد ۲۴۴ نمونه خون بدون ماده ضد انعقاد از بوقلمون‌های کشتار شده با و بدون علائم تنفسی از کشتارگاه‌های استان خوزستان (جنوب غربی ایران) جمع‌آوری گردید. نمونه‌های خون در لوله‌های آزمایشگاهی به صورت استریل و در کنار یخ به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شدند. جداسازی سرم از نمونه‌های خون در کم‌تر از ۲۴ ساعت انجام شد و جهت بررسی‌های سرولوژیکی در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد

منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Khosravi et al, 2021).

افینیتی کروماتوگرافی

خالص‌سازی آنتی‌بادی‌های اختصاصی اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی انجام شد. به طور خلاصه، باکتری‌های اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال با استفاده از فریز و دفریز شدن متوالی تخریب شدند، چهار میلی‌گرم از آنتی‌ژن‌های آماده شده به ازای هر میلی‌لیتر از سفارز 4B (Sigma-product number 4B200, Aldrich) فعال شده با سیانوژن بروماید مخلوط شد و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد، سپس سانتریفوژ در دور ۳۰۰۰ به مدت پنج دقیقه انجام شد و مایع رویی خارج و جهت مسدود نمودن گروه‌های فعال به رسوب بافر گلیسین یک مولار (pH = ۷/۲) اضافه گردید و شش ساعت شیکر شده و مجدداً سانتریفوژ انجام شد و پس از شست و شو با بافر PBS مایع رویی را دور ریخته و به رسوب، حدود ۱۰ میلی‌گرم از IgY حاصل از دیالیز اضافه گردید و پس از ۲ ساعت در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی به عنوان آنتی‌بادی‌های غیراختصاصی حذف شد و مراحل شست و شو تا حذف کلیه آنتی‌بادی‌های آزاد ادامه یافت. استخراج IgY اختصاصی ORT متصل به سفارز ۴B با قرار دادن سفارز در ستون و آزاد نمودن آنتی‌بادی‌های متصل شده به وسیله بافر گلیسین (pH = ۲/۵) و خنثی‌سازی سریع با استفاده از بافر تریس (pH = ۹/۵) انجام شد (Khosravi et al, 2021).

بررسی میزان آنتی‌بادی با استفاده از پروتئین سنجی به روش برادفورد انجام شد. برای انجام پروتئین سنجی از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر از نمونه ۱۰ میکرولیتر از محلول برادفورد و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر در هر یک از گوده‌ها اضافه شد. نمونه‌های استاندارد به وسیله آلبومین سرم گاوی تهیه شدند. به منظور شناسایی دقیق سطح آنتی‌بادی هر نمونه، جذب نوری نمونه‌ها با

غیرمستقیم، خون‌گیری از ورید بال بوقلمون انجام شد و سرم هایپرایمن ایجاد شده جداسازی گردید. سرم‌های هیپر ایمن از بوقلمون‌های تیمار شده برداشت و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Hurn and Chanter, 1980).

مراحل تخلیص آنتی‌بادی با استفاده از سولفات آمونیوم

در این روش به ازای ۱۰ میلی‌لیتر سرم به دست آمده، به صورت قطره قطره پنج میلی‌لیتر محلول آمونیوم سولفات اشباع اضافه شد، این کار به صورتی انجام شد که بشر حاوی سرم بر روی یخ و شیکر ۹۰ دور در ۳۰ دقیقه در حال مخلوط شدن بود. پس از مخلوط شدن کامل سرم و سولفات آمونیوم اشباع، محلول در دور ۴۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی جداسازی شد و به رسوب حاصل، پنج میلی‌لیتر سولفات آمونیوم ۴۰ درصد اضافه شد و مجدداً سانتریفوژ گردید. سپس رسوب ایجاد شده، در بافر فسفات (PB) Phosphate Buffer ۰/۰۲ مولار با pH ۷/۲ مخلوط شد. جهت جداسازی نمک، رسوب حاصل از سولفات آمونیوم در برابر بافر فسفات دیالیز شد (Burns, 2005).

کروماتوگرافی تعویض یونی

در این روش پس از خیساندن پودر DEAE-Cellulose در محلول PB ۰/۰۲ مولار به مدت ۲۴ ساعت، پودر حاصل را در ستون قرار داده و سپس به ترتیب با استفاده از بافر فسفات حاوی KCL یک مولار و بافر فسفات ۰/۰۲ مولار با pH = ۷/۲ شست و شو گردید. محلول جمع‌آوری شده از کیسه دیالیز به ستون منتقل شد و ستون به مدت ۲ ساعت بسته شد. ستون با استفاده از بافر فسفات ۰/۰۲ مولار با pH = ۷/۲ شست و شو داده شد. آنتی‌بادی‌های IgY به ستون متصل نمی‌شوند و فراکسیون‌های آن در میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری جمع‌آوری شد. IgY‌های جمع‌آوری شده از ستون پس از بررسی میزان و درصد خلوص و عملکرد جهت انجام سایر مراحل کار در دمای

استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد.

الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات

جهت اطمینان از تخلیص آنتی‌بادی‌های IgY نمونه سرم هایپر ایمن بوقلمون از آزمون Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) استفاده شد. SDS-PAGE با ژل جداکننده ۹ درصد و ژل انباشته ۴ درصد انجام شد. نمونه‌ها در چاهک‌ها اضافه شدند، جریان روی ولتاژ ۸۵ جهت ژل بالا و ولتاژ ۱۰۰ جهت حرکت نمونه‌ها در ژل پایین تنظیم شد. ژل در ظرف حاوی محلول رنگی کوماسی آبی بر روی شیکر به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد و سپس محلول را خالی کرده و محلول رنگ بر حاوی ۵۰ درصد متانول و ۱۰ درصد اسید استیک به آن اضافه گردید و تا هنگامی که ژل کاملاً بی رنگ شد رنگ بری ادامه داشت (Hurn and Chanter, 1980).

الایزا غیرمستقیم با استفاده از اصلاح روشی که قبلاً توسط Hafez و Sting (۱۹۹۹) شرح داده شد، انجام شد. آنتی‌ژن‌های ORT که پس از فریز و دفریز شدن متوالی به دست آمده بودند به عنوان آنتی‌ژن کامل با غلظت ۱۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر با بافر کربنات-بی کربنات (pH = ۹/۵) رقیق و ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک پلیت اضافه شد. در ادامه پلیت‌ها جهت پوشیده شدن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پلیت سه بار با PBS حاوی توین ۰/۰۵ درصد شسته شد و به هر چاهک ۲۵۰ میکرولیتر شیر فاقد چربی (Skim Milk) چهار درصد اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس پلیت مجدداً سه بار به صورت فوق شسته شد. به هر چاهک نمونه سرم رقیق شده با بافر PBS با رقت ۱/۴۰ اضافه گردید و پلیت به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. پس از شست و شوی مجدد پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱/۴۰۰۰ آنتی‌بادی

نشان‌دار شده با پراکسیداز ضد مرغ به هر چاهک اضافه شد و به مدت یک ساعت انکوبه گردید و دوباره شسته شد. ۵۰ میکرولیتر سوبسترای کروموژن به هر چاهک اضافه شد و پس از انکوبه شدن پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر محلول توقف کننده واکنش متوقف گردید. مقادیر جذب به روش فتومتری ELISA (Medispec ESR 200) reader در طول موج ۴۵۰ نانومتر ارزیابی شد. آزمون الایزا غیرمستقیم به صورت فوق برای نمونه آنتی‌بادی‌های خالص‌سازی شده با روش کروماتوگرافی میل ترکیبی به عنوان نمونه استاندارد در بوقلمون‌های ایمن شده نیز انجام شد.

نتایج

آنتی‌بادی اختصاصی علیه اورنیوباکتریوم راینوتراکتال از حیوانات واکسینه شده پس از چهار دوره ایمن‌سازی به دست آمد. تجزیه و تحلیل SDS-PAGE و برادفورد خالص‌سازی آنتی‌بادی‌های حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی و افینیتی کروماتوگرافی را نشان دادند (Figure 1). چگالی نوری حاصل از الایزا غیرمستقیم در سرم بوقلمون‌های هایپر ایمن قبل از ایمن‌سازی و بعد از ایمن‌سازی به ترتیب $0/257 \pm 0/064$ و $0/833 \pm 0/215$ بود (Figure 2).

میزان غلظت آنتی‌بادی موجود در هر نمونه نیز در آزمون الایزا غیرمستقیم بر اساس منحنی استاندارد محاسبه شده برای آنتی‌بادی‌های خالص‌سازی شده از افینیتی کروماتوگرافی به دست آمد. حد تشخیص نمونه‌های مثبت از منفی بر اساس میزان میانگین و انحراف معیار غلظت آنتی‌بادی در ۱۰ نمونه سرم مستخرج از بوقلمون‌های منفی در کشت باکتری بر اساس نمودار استاندارد محاسبه شد (Figure 3) (Ozbej et al, 2004). بر اساس نتایج به دست آمده از ۲۴۴ نمونه سرم جمع‌آوری شده از بوقلمون‌های کشتار شده، تعداد نمونه مثبت و منفی در آزمون الایزا به ترتیب ۵۷/۷۸ درصد و ۴۲/۲۱ درصد محاسبه شد. نتایج آزمون الایزا در Figure 4 نشان داده شده است.

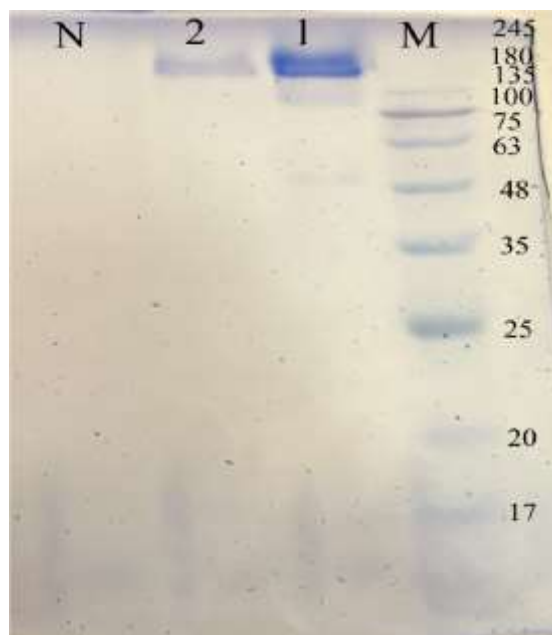


Figure 1: Electrophoresis on SDS polyacrylamide gel to determine the purity of antibodies against ORT isolated from hyperimmune turkey serum. N: negative control, M: size marker protein, 1,2: turkey antibodies purified using ion exchange chromatography and affinity chromatography, respectively.

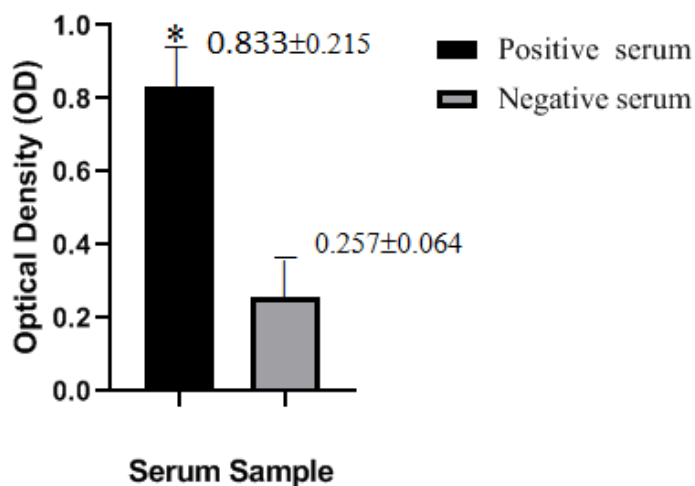


Figure 2: The optical density obtained by ELISA for detection of reactive antibodies in turkey serum samples (n=3) before (Negative) and after (Positive) immunization by ORT bacteria. The significant difference between of the groups showed by star symbol.

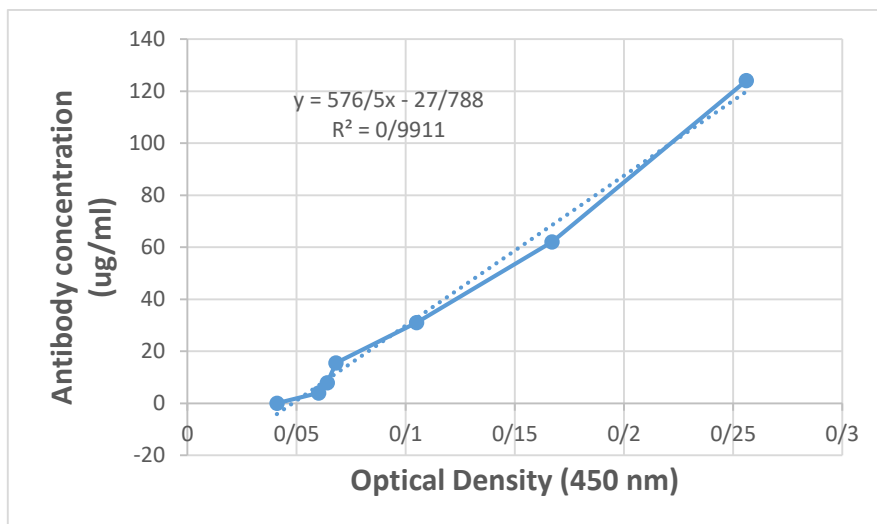


Figure 3: The obtained standard curve based on affinity purified antibodies for detection of the antibody concentration in turkey serum samples.

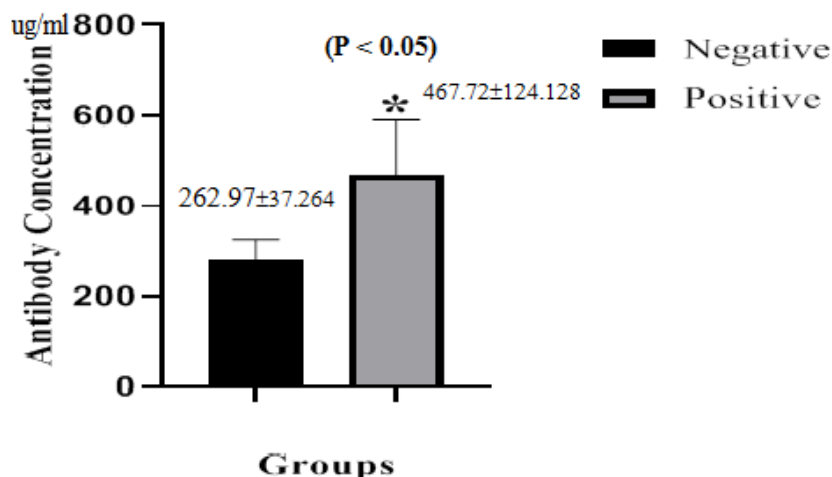


Figure 4: The average concentration of specific antibody (ug/ml) against *Ornithobacterium rhinotracheal* in positive (n=182) and negative (n=62) serum samples. The significant difference between of the groups showed by star symbol.

بحث

به اندازه کافی برای تشخیص اختصاصی نیست، بنابراین، مطالعات سرولوژی از عمده ترین روش های مورد استفاده در تحقیقات بوده است.

در مطالعه حاضر ۵۷/۷۸ درصد از نمونه ها از نظر وجود آنتی بادی بر علیه اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال مثبت بودند و ۴۲/۲۱ درصد از نمونه ها نیز از نظر وجود آنتی بادی بر علیه این باکتری منفی تشخیص داده شدند. یافته های حاصل از مطالعه Nik Piran و همکاران (۱۳۹۰) در استان اردبیل نشان داد که ۷۲/۲ درصد از نمونه ها به

با توجه به افزایش بیماری های تنفسی و خسارات اقتصادی ناشی از کاهش رشد و تولید و تلفات بالا در صنعت طیور به خصوص در مرغ و بوقلمون به نظر می رسد که جهت تعیین عوامل ایجاد کننده این بیماری ها و عوامل مستعد کننده همراه بایستی مطالعات بیشتری در این زمینه صورت گیرد. در کشورهای مختلف تحقیقات زیادی جهت بررسی شیوع آلودگی به اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال در مرغ و بوقلمون انجام شده است و به دلیل این که علائم بالینی و یافته های کالبدگشایی اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال

یک روش مناسب جهت پایش آنتی‌بادی‌های اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال می‌باشد (Eid et al, 2021).

Van Empel و همکاران (۱۹۹۷) در مطالعه خود گزارش دادند که تیتراژ آنتی‌بادی در ۱ تا ۴ هفته پس از آلودگی به حداکثر میزان خود می‌رسد اما بعد از این مدت به سرعت کاهش می‌یابد بنابراین نتایج آن‌ها نشان داد که اخذ نمونه‌های سرم جهت غربالگری گله باید در سنین مختلف انجام شود تا بتوان به طور دقیق میزان بروز عفونت را تشخیص داد.

در مطالعه Xue و همکاران (۲۰۲۰) میزان شیوع آلودگی سرمی به ORT در میان گله‌های مرغ ۱۵ استان چین ۴۴/۰۶ درصد بود، آن‌ها نشان دادند که در جوجه‌های جوان، میزان مثبت سرمی کم‌تر از جوجه‌های مسن‌تر بود و با افزایش سن، میزان مثبت سرمی افزایش یافت. جوجه‌های مسن نه تنها نرخ مثبت بالاتری داشتند بلکه سطح آنتی‌بادی آن‌ها نیز بالا بود، بنابراین این داده‌ها نشان داد که عفونت‌های اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال در چین نیز رایج است.

مطالعات انجام شده در کره جنوبی نشان داد که شیوع سرمی آنتی‌بادی‌های اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال در جوجه‌های تخم‌گذار ۹۸/۹۱ درصد است که این بررسی نیز شیوع بالای اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال در جوجه‌های تخم‌گذار در استان گیونگی، کره جنوبی را نشان داد (Jung, 2020).

در مطالعه سرمی Baksi و Chauhan (۲۰۱۷) در کشور هند به وسیله آزمون الیزا نشان داده شد که ۷۴/۳۷ درصد از نمونه‌ها برای آنتی‌بادی‌های اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال مثبت و ۲۵/۶۳ درصد نیز منفی بودند، آن‌ها نشان دادند که میزان شیوع سرمی این بیماری در شهرهای مختلف هند و در فصول مختلف سال متفاوت است و در فصل باران‌های موسمی میزان عفونت بیش‌تر از زمستان است، آن‌ها همچنین نمونه‌ها را بر اساس گروه‌های مختلف سنی پرندگان تقسیم‌بندی کردند و نشان دادند که با افزایش سن میزان آنتی‌بادی علیه اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال نیز افزایش می‌یابد.

اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال آلوده بودند و ۲۷/۸ درصد از نمونه‌ها مشکوک گزارش شدند، در این مطالعه هیچ مورد منفی قطعی مشاهده نشد. همچنین Haghigi Khoshkho و همکاران (۲۰۰۸) گزارش دادند که با توجه به نتایج آزمون الیزا میزان آلودگی به اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال در استان تهران ۴۴/۵ درصد است.

Ghanbarpour و Salehi (۲۰۰۹) در مطالعه خود در جنوب شرق ایران نشان دادند که از ۴۲۰ نمونه سرمی که توسط الیزا مورد بررسی قرار گرفته بود، ۱۳۴ (۳۱/۰۹ درصد) سرم از ۱۷ گله (۸۱ درصد) از نظر آنتی‌بادی ORT مثبت گزارش دادند.

در سایر کشورها، تحقیقات متعددی در مورد میزان مثبت آنتی‌بادی اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال در مرغ و بوقلمون گزارش شده است اما میزان غلظت آنتی‌بادی اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال در این مطالعات مورد بررسی قرار نگرفته است.

در مطالعه حاضر میزان چگالی نوری نمونه‌های سرم بوقلمون‌های هایپرایمن بعد از ایمن‌سازی ۳/۲ برابر بیش‌تر از نمونه زمان صفر (قبل از ایمن‌سازی) بود: همچنین میزان آنتی‌بادی موجود در نمونه‌های سرم مثبت ۶/۸ برابر نمونه‌های سرم منفی بوقلمون‌های کشتار شده بود. در مطالعه‌ی در شرق ترکیه از ۳۲۴ نمونه سرم گله‌های جوجه گوشتی ۳۳ نمونه (۱۰/۲ درصد) از نظر میزان آلودگی به اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال به وسیله آزمون الیزای خانگی مثبت گزارش شد (Ozbey et al, 2004). در مطالعه دیگری با استفاده از یک الیزای خانگی طراحی شده در مطالعه خود در استان شارقیا مصر گزارش دادند که ۸۰ درصد از نمونه‌های سرمی از نظر اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال مثبت بودند، گزارشات آن‌ها نشان داد که میزان میانگین چگالی نوری نمونه‌های سرم مثبت و منفی به ترتیب ۰/۸۳۷ و ۰/۱۴۷ می‌باشد که با مطالعه حاضر مطابقت داشت. نتایج این تحقیقات نشان داد که میزان شیوع اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال در این کشورها بسیار بالاست و آزمایش الیزا

الایزا طراحی شده در مطالعه حاضر مطابقت داشتند (De Boeck et al, 2015).

نتایج مطالعه حاضر وجود آنتی‌بادی بر علیه اورنیئوباکتریوم راینوتراکتال در سرم بوقلمون‌های استان خوزستان را نشان داد. که این نتایج با مطالعات صورت گرفته در سایر استان‌های ایران و کشورهای دیگر هم‌خوانی داشت. برخی اختلاف‌های مشاهده شده موجود نیز به دلیل تفاوت در زمان نمونه‌گیری، سنین مختلف پرندگان در انجام آزمایش و نمونه‌گیری در فصول مختلف سال و در نتیجه تغییر در میزان آنتی‌بادی‌های ایجاد شده بود. بنابراین درصد بالای غلظت آنتی‌بادی بر علیه این باکتری در سرم بوقلمون‌های مورد بررسی، نشان دهنده شیوع بالای اورنیئوباکتریوم راینوتراکتال در استان خوزستان است. این مسئله به دلیل خسارات اقتصادی فراوان ناشی از تلفات بالا، ایجاد عفونت‌های تنفسی همراه و کاهش رشد و تولید در صنعت طیور بسیار مهم است. پیشنهاد می‌گردد که جهت مدیریت و پیش‌گیری از خسارات اقتصادی در صنعت طیور ردیابی آنتی‌بادی واکنش دهنده با اورنیئوباکتریوم راینوتراکتال در گونه‌های مختلف پرندگان استان به خصوص طیور تخم‌گذار و گله‌های مادر با سنین مختلف انجام شود.

با توجه به میزان آنتی‌بادی واکنش دهنده با اورنیئوباکتریوم راینوتراکتال در سرم بوقلمون‌های مورد آزمون، آزمون الایزا کنونی طراحی شده است؛ لذا کم‌ترین و بیش‌ترین میزان آنتی‌بادی اختصاصی قابل ردیابی متناسب با این میزان در سرم بوقلمون‌ها می‌باشد. قابل ذکر است کم‌ترین میزان آنتی‌بادی قابل ردیابی با استفاده از الایزا طراحی شده کم‌تر از یک میکروگرم در هر میلی‌لیتر از سرم می‌باشد، در صورتی که کم‌ترین میزان آنتی‌بادی موجود در سرم بوقلمون‌ها $262/97 \pm 37/264$ میکروگرم در هر میلی‌لیتر می‌باشد. در اغلب مطالعات سرولوژی، جهت تعیین آنتی‌بادی علیه اورنیئوباکتریوم راینوتراکتال از کیت‌های تجاری الایزا استفاده شده است. در مطالعات انجام شده در کشور ترکیه، نمونه سرم‌های جمع‌آوری شده با استفاده از کیت تجاری الایزا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آن‌ها نشان داد که $66/3$ درصد از نمونه‌های سرم مرغ و $11/1$ درصد از نمونه‌های سرم بوقلمون برای اورنیئوباکتریوم راینوتراکتال مثبت بودند (Türkyilmaz and Kaya, 2005). در مطالعه دیگری نیز وجود آنتی‌بادی علیه اورنیئوباکتریوم راینوتراکتال را در جوجه‌های گوشتی در سنین مختلف را با استفاده از کیت‌های تجاری الایزا گزارش دادند که با نتایج

تشکر و قدردانی

از همکاری کارکنان محترم کشتارگاه دزفول جهت همکاری مؤثر در اخذ نمونه‌های مورد بررسی تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی ندارند.

منابع مالی

منابع مالی این پژوهش در قالب بودجه پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین شده است.

منابع

- Alispahic, M., Endler, L., Hess, M., Hess, C., 2021. *Ornithobacterium rhinotracheale*: MALDI-TOF MS and whole genome sequencing confirm that serotypes K, L and M deviate from well-known reference strains and numerous field isolates. *Microorganisms* 9, 1006.
- Awad, N. F., Hashem, Y. M., Elshater, N. S., Khalifa, E., Hamed, R. I., Nossieur, H. H., ... & Abd El-Hamid, M. I. (2022). Therapeutic potentials of aivlosin and/or zinc oxide nanoparticles against *Mycoplasma gallisepticum* and/or *Ornithobacterium rhinotracheale* with a special reference to the effect of zinc oxide nanoparticles on aivlosin tissue residues: An in vivo approach. *Poultry Science*, 101(6), 101884.
- Baksi, S., Rao, N., & Chauhan, P. (2017). Seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler breeders in India. *PSM Veterinary Research*, 2(2), 29-32.
- Banani, M., Pourbakhsh, S. A., & Khaki, P. (2001). Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from commercial chickens.
- Barbosa, E. V., Cardoso, C. V., Silva, R. D. C. F., Cerqueira, A. D. M. F., Liberal, M. H. T., & Castro, H. C. (2019). *Ornithobacterium rhinotracheale*: An update review about an emerging poultry pathogen. *Veterinary sciences*, 7(1), 3.
- Burns, R. (Ed.). (2005). *Immunochemical protocols* (Vol. 295). Totowa, NJ: Humana Press.
- Churria, C. D. G., Machuca, M. A., & Petruccelli, M. A. (2012). *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in poultry: an updated review. *International Journal of Molecular Zoology*, 2.
- Clark, S., & Ahlmeyer, V. (2018). Current health & industry issues facing the turkey industry: 2018. *United States Animal Health Association, Kansas City, MO*.
- De Boeck, C., Kalmar, I., Dumont, A., & Vanrompay, D. (2015). Longitudinal monitoring for respiratory pathogens in broiler chickens reveals co-infection of *Chlamydia psittaci* and *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal of Medical Microbiology*, 64(5), 565-574.
- Eid, A. A., Morsy, A. M., Adael, S. A., & Ismail, A. S. N. (2021). Comparative ELISA and SAT assays for the detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* antibodies in broiler chickens at Sharkia Governorate. *Zagazig Veterinary Journal*, 49(2), 171-180.
- Ellakany, H. F., Elbestawy, A. R., Abd-Elhamid, H. S., Gado, A. R., Nassar, A. A., Abdel-Latif, M. A., ... & Alowaimer, A. N. (2019). Effect of experimental *Ornithobacterium rhinotracheale* infection along with live infectious bronchitis vaccination in broiler chickens. *Poultry science*, 98(1), 105-111.
- Hafez, H. M., & Sting, R. (1999). Investigations on different *Ornithobacterium rhinotracheale* "ORT" isolates. *Avian diseases*, 1-7.
- Hafez, H. M., & Chin, P. R. (2020). *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. *Diseases of Poultry, 14th ed.; Swayne, ED, Boulianne, M., Logue, CM, McDougald, LR, Nair, V., Suarez, DL, de Wit, S., Grimes, T., Johnson, D., Kromm, M., et al., Eds*, 853-889.
- Haghigi Khoshkho, P., Akbari Azad, G. and Amiri, Sh. (2008). Investigation of the seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheal* infection in broiler chickens of Tehran province. Proceedings of the 4th National Symposium on Poultry Health and Diseases, Shahrekord. Page 10(In Farsi)
- Hashish, A., Sinha, A., Sato, Y., Macedo, N. R., & El-Gazzar, M. (2022). Development and validation of a new TaqMan real-time PCR for the detection of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Microorganisms*, 10(2), 341.
- Hinz, K. H., Blome, C., & Ryll, M. (1994). Acute exudative pneumonia and airsacculitis associated with *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys. *Veterinary record*, 135(10), 233-234.
- Hurn, B. A., & Chanter, S. M. (1980). [5] Production of reagent antibodies. In *Methods in enzymology* (Vol. 70, pp. 104-142). Academic Press.
- Ghanbarpour, R., & Salehi, M. (2009). Seroprevalence and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler flocks in south-eastern Iran. *Tropical animal health and production*, 41, 1679-1683.
- Khosravi, M., Nouri, M., Mohammadi, A., Mosavari, N., & Constable, P. D. (2021). Preparation of immunomagnetic beads coupled with a rhodamine hydrazine immunosensor for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bovine feces, milk, and colostrum. *Journal of Dairy Science*, 104(6), 6944-6960.
- Kwang Jung (2020) High seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* in layer chickens in Gyeonggi province, South Korea *Journal of Livestock Hygiene Society (KOJVS)*, 43(4), 257-259.

- Nik Piran, Abbasi Bahner, Bijanzad, Peyman and Taqvi Melai. (2012). Serological investigation of *Ornithobacterium rhinotracheale* in beef herds of Ardabil province. *Veterinary Clinical Pathology*, 5(4 (20) Winter), 1363-1368. (In Farsi)
- Ozbey, G., Ongor, H., Turgut-Balik, D., Celik, V., Kilic, A., & Muz, A. (2004). Investigations on *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler flocks in Elazig province located in the East of Turkey. *Veterinari medicina*, 49(8).
- Türkyilmaz, S., & Kaya, O. (2005). Detection of antibodies produced against *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Bordetella avium* by enzyme-linked immunosorbent assay in hens and turkeys in Aydın province, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 29(3), 897-902.
- Vandamme, P., Segers, P., Vancanneyt, M., Van Hove, K., Muters, R., Hommez, J., ... & Mannheim, W. (1994). *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov., isolated from the avian respiratory tract. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(1), 24-37.
- van Empel, P., van den Bosch, H., Loeffen, P., & Storm, P. (1997). Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal of clinical microbiology*, 35(2), 418-421.
- Van Empel, P. C. M., & Hafez, H. M. (1999). *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. *Avian pathology*, 28(3), 217-227.
- Xue, J., Lv, C., He, P., Xu, M., & Zhang, G. (2020). Research Note: Serological investigation of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in China. *Poultry science*, 99(10), 4814-4817.

Received: 09.10.2023

Accepted: 23.01.2024

Evaluation of specific immunogenicity of *Aeromonas hydrophila* biofilm oral vaccine in common carp

Amir Aramoon^{1*}, Mojtaba Alishahi², Masoudreza Seifi Abad Shapoori³
and Masoud Ghorbanpoor⁴

¹ PhD Graduate in Aquatic Animal Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³ Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

⁴ Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, and Department Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received: 13.09.2023

Accepted: 26.11.2023

Abstract

One of the methods of protection and slow release of vaccine antigens is the use of biodegradable natural polymers such as chitin in the bacterial biofilm substrate. The bacterium is complex and protected by the polymer substrate in the conditions of the digestive system, and finally, healthier vaccine antigens with better immunogenicity are provided to the intestine mucosal immune system of the fish. In this method, biofilm vaccine of *Aeromonas hydrophila* bacteria was done by culturing the bacteria in TSB medium (0.225% W/V) along with chitin (0.3% W/V) for 4 days in a shaker incubator. Afterward bacteria were washed with sterile PBS and were inactivated by heat. A number of common carp of 32 ± 11 g were divided into 5 equal treatments and each treatment was repeated three times as follows: the first to fourth treatment with biofilm vaccine, bacterin, media chitin and chitin + TSB respectively, by oral method during 10 days were immunized; the fifth treatment without vaccine administration was considered as the control group. Sampling of fish serum was done on days 0, 20, 40 and 60. Antibacterial antibody level in the samples was evaluated by ELISA test and by monoclonal antibody. The results showed that the antibody level of *Aeromonas hydrophila* in oral biofilm treatment on day 20 was significant compared to the other treatments, but it was not significant on days of 40 and 60.

Key word: Oral vaccine, Biofilm, *Aeromonas hydrophila*, Common carp

* **Corresponding Author:** Amir Aramoon, PhD Graduate in Aquatic Animal Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: aramoon.haser@gmail.com



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Study on the effect of *Spirulina platensis* on the histomorphometric and histological structure of rat testicular tissue exposed to iron oxide nanoparticles

Abbas Pirzadeh¹, Hassan Morovvati^{2*} and Mohsen Abbasi³

¹ PhD Student of Histology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

² Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Associated Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Received: 06.12.2022

Accepted: 08.02.2023

Abstract

Repeated exposure to iron oxide nanoparticles can lead to structural disorders in the testicles and have negative effects on the individual's reproductive function. On the other hand, spirulina algae can reduce these effects by having antioxidant properties and abundant vitamin source. The purpose of this study was to investigate the effects of spirulina algae on tissue changes in the testes of rats induced using iron oxide nanoparticles. After acclimatization, 36 Wistar male rats were randomly divided into the following 6 groups. The first group: control, the second group: 15 mg/kg body weight of iron oxide nanoparticles, the third group: 300 mg/kg body weight of spirulina algae, the fourth group: 15 mg/kg body weight of iron oxide nanoparticles and 300 mg/kg algae body weight. spirulina at the same time, fifth group: 15 mg/kg of body weight of iron oxide nanoparticles for 14 days, then 300 mg/kg of spirulina algae, sixth group: 300 mg/kg of body weight of spirulina algae for 14 days, then 15 mg/kg of body weight of iron oxide nanoparticles. Sampling was done after 60 days and testicular bud sections were stained by hematoxylin-eosin (H & E) after preparation for histological and histometric studies. The study of tissue sections of the testis in rats exposed to iron oxide nanoparticles showed a decrease in the diameter of the spermatogenic tubules and the thickness of the epithelium of the spermatogenic tubules, a decrease in the number of Sertoli cells and the number of Leydig cells in comparison with the control group, while exposure to spirulina algae increased the diameter of the spermatogenic tubules and the thickness of the epithelium of the spermatogenic tubules. Algae treatment in the groups exposed to iron oxide nanoparticles improved the tissue changes in the testis and prevented the decrease in the diameter of the spermatogenic tubes, the thickness of the germinal epithelium, and the number of Leydig and Sertoli cells. The results showed that the oral administration of spirulina in male rats improves the structural disorders in the testis and tissue changes caused by induction by iron oxide nanoparticles.

Key words: Spirulina, Iron oxide nanoparticles, Testis, Rat

* **Corresponding Author:** Hassan Morovvati, Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
E-mail: hmorovvati@ut.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Comparison of diluents containing pigeon plasma egg yolk, chicken plasma egg yolk and their combinations to preservation of ram semen at 4° C

Alireza Hamisi¹, Mohsen Eslami^{2*}, Hamed Esmaili³, Farhad Farrokhi-Ardabili⁴
and Sina Bahmani³

¹ DVSc Student of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

² Associate Professor, Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

³ Graduated from Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 29.03.2023

Accepted: 05.10.2023

Abstract

The current study was conducted to evaluate the effect of pigeon plasma egg yolk (PPEY) and chicken plasma egg yolk (CPEY) compared to combination of PPEY+CPEY in tris-citric acid-fructose diluent to preserve the ram semen quality during liquid-cold storage. Semen samples were collected using the artificial vagina from four Qezel rams twice a week. Then, in case if the samples met the criteria, they were pooled and used for the experiment. Tris-citric acid-fructose based extenders were prepared using PPEY (28%, v/v), CPEY (28%), and the combinations of PPEY (7, 14 and 21%) + CPEY (21, 14 and 7 %), and used for the experiment. Following dilution of samples with extenders, total and forward progressive motility of spermatozoa (evaluated by computer assisted sperm analysis), viability and plasma membrane integrity was assessed at 0, 24, 48 and 72 of after cooling. Furthermore, amounts of malondialdehyde (MDA), as an oxidative indicator, were measured at mentioned time points. Results revealed that forward progressive motility (at 24, 48 and 72 h) and viability (at 72 h) were higher in PPEY (28%) group compared to all combination groups. Moreover, membrane integrity (at 24, 48 and 72 h) was greater in PPEY (28%) relative to combination groups containing 14 and 21% CPEY. Amounts of MDA did not differ among treated groups. In conclusion, combinations of PPEY+CPEY was not effective as PPEY (28%) and CPEY (28%) alone to preservation of ram semen during liquid-cold storage.

Key words: Plasma pigeon egg yolk, Ram, Spermatozoa, Malondialdehyde

* **Corresponding Author:** Mohsen Eslami, Associate Professor, Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
E-mail: m.eslami@urmia.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Study and identification of primordial germ cells in the gonad of female pheasant embryo (*Phasianus colchicus*) using various histological techniques

Zahra Khodaparast¹ and Abolghasem Nabipour^{2*}

¹ PhD Student of Histology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

² Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 17.07.2023

Accepted: 01.10.2023

Abstract

The goal of this study was to detect and evaluate the presence of primordial germ cells in pheasant ovarian tissue at various embryonic ages. These are the only growing cells in the embryo capable of transmitting genetic information to the following generation via gametogenesis. Birds are quite useful for research in this area because of their growth features. On the other hand, the pheasant is one of the birds with very beneficial features, but this rare species is at risk of extinction. In this study, 28 fertilized pheasant eggs were used, and the gonads of female embryos were differentiated based on their asymmetry and retrieved between embryonic days 9 and 24. Tissue sections were prepared as serial sections and the identification of primordial germ cells was examined using hematoxylin-eosin and PAS staining, as well as semithin slice preparation and toluidine blue staining. The number of primordial germ cells, cell volume, and nucleus volume of primordial germ cells were then estimated using stereological techniques. Early germ cells were recognized in paraffin and resin sections from embryonic days 9 to 14 because of their unique properties, which comprised a big nucleus and little cytoplasm. Furthermore, the response of these cells to PAS staining was negative at all ages. According to the stereological results, the number of primordial germ cells was decreased at more advanced ages of development, so that it was not seen at 18 day embryo. Whereas, the volume of the primordial germ cells and nucleus of these cells have been increased with the increasing of the age. The findings of this study revealed that primordial germ cells in the ovarian tissue of pheasant embryos at all examined ages responded negatively to the PAS staining, whereas routine hematoxylin and eosin staining and the use of semithin sections are suitable for microscopic detection of these cells. Morphologically, this cell in pheasant was similar to other birds, whereas in terms of histochemistry, the reaction of these cells was negative to PAS staining which differs from some species of birds.

Key words: Primordial germ cells, Pheasant embryo, Female gonad, Semithin section, Streology

* **Corresponding Author:** Abolghasem Nabipour, Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
E-mail: nabipour@um.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

The Effect of *Varroa destructor* (Acari.: Varroidae) on morphological and nutritional characteristics of the worker honeybee, *Apis mellifera meda* (Hymenoptera.: Apidae)

Mehdi Toosi¹, Arash Rasekh^{2*}, Masumeh Ziaee³, Parviz Shishehbor²
and Gholamhosein Tahmasbi⁴

¹ Ph.D Student of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³ Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

⁴ Professor, Department of Animal Science Research Institute of Iran, Head of Iranian Apicultural Society, Karaj, Iran

Received: 08.07.2023

Accepted: 26.11.2023

Abstract

Honey bees play an important role in the survival and pollination of many plants. One of the most important of pests that attack honey bees is *Varroa destructor* mite. This mite is an ectoparasite of honeybees and feeds mainly on larvae and pupae. In this research, *Apis mellifera meda* workers were infected at the pupal stage to different mite densities and then the biological and morphological characteristics of the emerged adult bees were investigated. For this purpose, female mites were collected from infected hives and placed in each prepupal cell according to the desired mite density (0, 1, 2 or 3 mites). After adult bees emerged, nutritional traits were checked every 3 days for 12 days. Then these adult bees were dissected to measure the area of the hypopharyngeal acinus. The biological and morphological results showed that the increase mite density had no effect on the duration of the pupation period of bees, but it significantly decreased the weight, body length, area of the forewings, hind wings and hind tibia of bees. Adult bees that had three mites during their pupation had the highest mortality rate and for this reason, it was not possible to examine their nutritional characteristics. The nutritional characteristics results showed that increasing the mite density caused a decrease in the consumption of syrup and water by the adult bees, but the consumption of pollen did not change. The food consumption index of bees without mite and bees with two mites during the pupation period was higher than bees with one mite, but the growth rate and the area of the acini of the treatments did not show any difference. The results of this study are expected to provide a basis for biological control of this mite by providing further information on how it affects honeybees.

Key words: *Varroa* mite density, Consumption index, Growth rate, Morphological characteristics

* **Corresponding Author:** Arash Rasekh, Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: a.rasekh@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Effect of Formulation (particle size) of inactivated AI+ND vaccine on Stability and Immunogenicity in SPF and Broiler Chickens

Mohammad Abbasnia^{1*}, Ali Shirazi Nezhad², Nader Ghaleh golab behbahan³,
Mansour Mayahi⁴ and Seyed Sobhan Emadi Jamali¹

¹ PhD Graduated of Avian Disease, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

² PhD Graduated of microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

³ Assistant Professor, Department of Poultry Disease, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran

⁴ Professor, Department of Livestock, Poultry and Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 28.08.2023

Accepted: 31.01.2024

Abstract

Mineral oils are the most common adjuvants that are used in the production of poultry killed vaccine based on water-in-oil emulsion (W/O) to create high and long term antibody responses to vaccine antigens. The vaccine structural specifications, including particle size and formulation on stability and immunogenicity, have needed more clarification for vaccine producers so that they can produce their products based on highly efficient methods. This study assessed the effect of particle size on the stability and immunogenicity of a W/O vaccine. Different W/O emulsions were formulated by three different homogenization times by means of inactivated Avian Influenza Virus subtype H9N2 (AI H9N2) and Newcastle Disease Virus (V4) antigens and Montanide™ ISA 70 adjuvant. The three killed AI+ND vaccines were formulated and 2 commercial vaccines were evaluated for magnitude and duration of specific antibody response in SPF and broiler chickens. The vaccine dose for each bird was considered 0/2 ml. On days 7, 14 and 21 post vaccination, antibody titers of serum were evaluated by Hemagglutination Inhibition (HI) test. The serum antibody titers (ND) of group B and C on days 7 and 21 were higher than the other groups ($P < 0.05$), but the difference between the other groups was not significant on the same day. The serum antibody titers (ND) of broiler chickens in group B and C on day 7, 21 and also group E on day 21 were significantly higher than other groups. The serum antibody titers (AI) of SPF chickens on day 21, in group C, had significant difference with other groups. The antibody titers (AI) on days 7 and 14 showed no significant difference in all groups except group D. The immunogenicity of emulsions was higher in more homogenization time. In all, these results indicate that increases in homogenization time create a smaller size of droplets and are effective for the rapid onset of antibody production. The small size of droplets not only creates a fast and good response, but also promotes immunogenicity both in broilers and SPF chickens.

Key words: Particle size, Adjuvant, Water in oil, Immunogenicity, Inactivated vaccine

* **Corresponding Author:** Mohammad Abbasnia, Ph.D. of Avian Disease, Department of Poultry Disease, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran
E-mail: Abasnia2011@gmail.com



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Evaluation of the correlation between renal dimensions and volume in ultrasonography and real measurement in dogs

Alireza Ghadiri^{1*}, Reza Avizeh¹, Ali Baniadam² and Shahrzad Samimi³

¹ Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Associated Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³ DVM Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 08.09.2022

Accepted: 31.08.2023

Abstract

The main objective of this study was to compare the accuracy of renal volume measured with ultrasonography to real volume in ten native dogs that were candidates for euthanasia due to severe injuries sustained in traffic accidents. Furthermore, correlations of renal dimensions in ultrasonography, such as length, width, and height, were determined with real ones. Initially, the dimensions of the right and left kidneys were determined using ultrasonography. Renal volume was measured using two different methods. The first method consisted of choosing automatic volume measurement in an ultrasonography unit. The volume formula of a prolonged ellipsoid (length \times width \times height \times 0.523) was used in the second method. The real renal dimensions (golden standard) were measured during celiotomy and after necropsy, and the true volume of kidneys was calculated using water displacement. Linear regression analysis was used to determine correlations between renal dimensions and volume in ultrasonography with real ones. Results showed that renal dimensions and volume measured in ultrasonography were lower than actual measurements. There were positive and statistically significant correlations between renal volume in ultrasonography and actual renal volume. However, the correlation coefficient (r) of volume determined by the formula was greater than that of the automatic volume method, and its mean was closer to that of the real volume mean. There were also positive and significant correlations between renal dimensions measured with ultrasonography and those measured in real measurement. No significant difference was found between renal dimensions measured during celiotomy and after necropsy. These findings indicate that ultrasonographic measurements underestimated renal dimensions and volume, and the formula method provided more accurate results than the automatic volume method.

Keywords: Ultrasonography, Renal Dimension, Renal volume, Dog

* **Corresponding Author:** Alireza Ghadiri, Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: alighadiri@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Study the effects of *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom fractions on the levels of Glucose and Insulin, Glucagon and Cortisol Hormones in rats

Navid Koshki¹, Mohammad Razi Jalali^{2*}, Seyed Reza Fatemi Tabatabaee³ and Hedieh Jafari⁴

¹ DVSc Student of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³ Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

⁴ Assistant Professor of Parasitology, Razi Vaccines and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ahvaz, Iran

Received: 08.10.2023

Accepted: 29.01.2024

Abstract

The *Hemiscorpius lepturus scorpion* is known as the most dangerous *scorpion* in the south and southwest regions of Iran. This *scorpion* can cause illness and even death in humans and animals. The purpose of this study was to investigate the metabolic and endocrine effects of different fractions of *Hemiscorpius lepturus* venom. For this purpose, scorpion venom was extracted by electric shock method and after separating the solution phase and activation of the venom by freeze drying method and with the help of column chromatography by Sephadex G-250 gel, 6 fractions were separated based on optical absorption at 280 nm. Then 72 male Wistar rats were divided into 8 equal groups including control (NS), crude venom (1000 µg/kg), fractions I (120 µg/kg), II (430 µg/kg), III (80µg/kg), IV (180 µg/kg), V (60 µg/kg) and VI (130 µg/kg) divided and according to the above amounts, respectively, with normal saline, crude venom and different fractions through intraperitoneal injection. After 1, 3, 24 and 72 hours, the concentration of glucose and the insulin, glucagon and cortisol were measured by elisa with specific rat kits. The results showed that the injection of crude venom and all fractions caused a significant increase in glucose compared to the control group. Also, a significant increase of cortisol and glucagon was observed after injection in crude venom and fractions II and VI. Also, the average insulin in the groups receiving crude venom and fractions II and VI showed a significant decrease. These findings showed that the injection of different fractions of *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom can affect the metabolic process and cause changes in the metabolic processes by affecting the glucose regulating hormones. Identifying these effects, considering the wide effects of these hormones in metabolism, as well as the changes caused by the venom fractions, can help to identify the toxicity mechanisms as accurately as possible and also to adopt specific treatment methods in cases of scorpion stings. be helpful and useful.

Key words: *Hemiscorpius lepturus scorpion*, Fractions, Insulin, Glucagon, Cortisol, Glucose

* **Corresponding Author:** Mohammad Razijalali, Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: jalali_m@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Evaluation of the effect of royal jelly on histopathological and biochemical changes in the lungs of rats following arsenic trioxide toxicity

Hossien Mohammadi¹, Babak Mohammadian^{2*}, Hossen Najafzadeh Varzi³ and Ali Shahriari⁴

¹ PhD Graduated in Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Associated Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³ Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

⁴ Associated Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 14.01.2022

Accepted: 18.04.2022

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) and the oxidative damage are the main factors involved in tissue damage caused by arsenic trioxide. In the present study, we investigated the protective effects of royal jelly on the parameters of oxidative stress and histopathological damage to lung tissue due to arsenic trioxide toxicity. Forty male Wistar albino rats received arsenic trioxide and royal jelly orally for 30 days and were randomly divided into eight groups of five; The first group received normal saline at a dose of 1 mg /kg, the second group received royal jelly at a dose of 150 mg /kg, the third group received arsenic trioxide at a dose of 1 mg / kg, the fourth group received arsenic trioxide (1 mg /kg) with Royal jelly at a dose of 150 mg /kg, the fifth group received arsenic trioxide (1 mg /kg) with royal jelly at a dose of 100 mg /kg, the sixth group received arsenic trioxide (1 mg /kg) with royal jelly at a dose of 50 mg /kg, the seventh group received arsenic trioxide (1 mg /kg) with vitamin E at a dose of 100 mg /kg, and the eighth group received arsenic trioxide (1 mg /kg) with vitamin E and royal jelly (both) at a dose of mg/ kg 100. Oxidative stress parameters including malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were evaluated. Damage to lung tissue was also assessed by hematoxylin-eosin (H&E) tissue staining. The results of the present study revealed that arsenic trioxide increased the level of MDA and decreased the levels of GPx, SOD and CAT. Royal jelly treatment decreased MDA levels and increased GPx, SOD and CAT concentrations in lung tissue. The severity of lung tissue damage was also reduced. In general, Royal Jelly reduced oxidative stress and lung tissue damage.

Key word: Arsenic trioxide, Royal jelly, Lung, Oxidative stress

* **Corresponding Author:** Babak Mohammadian, Associated Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: mohammadb@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Evaluation of the serum total antioxidant capacity following administration of selenium nanoparticles, sodium selenite and vitamin E injection in suckling lambs

Saman Mohammadi Rad¹, Ehsan Anassori^{2*}, Aligholi Ramin³ and Siamak Asri-Rezaei³

¹ DVM Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

² Associate Professor, Department of Internal Medicine and Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

³ Professor, Department of Internal Medicine and Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 29.12.2021

Accepted: 03.09.2022

Abstract

The set of non-specific antioxidant activities is called Total Antioxidant Capacity (TAC). The aim was to determine the serum TAC level following selenium and Vit.E supplementation in lambs. Thirty two male Macuei lambs under 2 months of age and average weight of 10 kg were selected. Lambs were classified into 8 groups including control, Vit.E, Se nanoparticles (NanoSe), Oral sodium selenite (NaSe), NaSe Injection, NanoSe/Vit.E, Oral NaSe/Vit.E and Se/Vit.E (E/Se) injection and studied for 90 days. Lambs were bled 6 times around 5 ml at days 1, 7, 14, 30, 60 and 90 and sera were used to assess TAC concentration. In all, the lowest TACs in lambs was observed in the NanoSe group (1.17 $\mu\text{mol/l}$) and the highest was in the injected E/Se group (1.32 $\mu\text{mol/l}$) on day 60, but the differences among 8 groups during the 90 days were not significant. During the 90 days of investigation the most stable and lowest changes in TAC concentration was observed in the Vit.E group and the most unstable changes were revealed in the NanoSe and injected NanoSe/Vit.E groups. The mean TAC concentrations on days 14 and 60 were significant among groups, which was mainly predominant in the injected sodium selenite and injected selenium/vitamin E groups, respectively. Comparison of TAC concentration among sampling times revealed the difference in NanoSe and NanoSe/vitamin E in which the lowest concentration belonged to NanoSe. The results of the interaction effect of sampling time and groups on TAC concentration showed a significant time difference, especially on days 14 and 60, with no significant difference between groups. TAC concentration in the first day was correlated with day 60 in the control group, day 7 and 14 in NanoSe/Vit.E, group and day 60 in injected E/Se. In conclusion, selenium and Vit.E supplements had no effect on TAC levels, whereas TAC levels were time-dependent. Therefore, the activity of nonspecific antioxidants (TACs) is not affected by specific antioxidants such as selenium and Vit.E and changes over time.

Key words: Nanoselenium, Sodium selenite, Vit.E, Lamb, TAC

* **Corresponding Author:** Ehsan Anassori, Associate Professor, Department of Internal Medicine and Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
E-mail: e.anassori@urmia.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Evaluation of histopathological changes of testicular and epididymal tissues in dogs treated with Stanozolol and Nandrolone decanoate

Bahman Mosallanejad^{1*}, Saad Gooraninejad¹, Annahita Rezaie²,
Seyed Reza Fatemi Tabatabaei³, Hadi Imani Rastabi⁴ and Saman Salmani⁵

1 Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2 Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3 Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

4 Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

5 DVSc Graduate in Small Animal Internal Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 27.05.2022

Accepted: 25.06.2022

Abstract

Stanozolol and nandrolone decanoate hormones are mainly used in dogs and horses to strengthen muscle growth, increase of body weight, treatment of anemia and stimulation of appetite; nevertheless, some side effects have been reported, including testicular atrophy, and decrease of spermatozoid count in dogs. The aim of the present study is to evaluate the histopathological changes of testicular and epididymal tissues in dogs treated with stanozolol and nandrolone decanoate. The present survey was performed on sixteen male dogs. The studied animals were divided into two equal groups of eight. Stanozolol was administered to dogs in group A with dosage of 50 mg per dog intramuscularly for 6 continuous weeks. Group B was similar to group A, but instead of stanozolol, nandrolone decanoate was injected with dosage of 1 mg/kg. To evaluate the possible side effects on the testicles, one of them was surgically removed before the investigation and the second testicle was removed on days 28 (four dogs in each group) and 42 (the remaining four of each group). Before the testes were placed in 10% formalin buffer, sperm quality in the epididymis was evaluated for indicators such as motility, morphology and number in times zero, 28 and 42 days. The results showed that destructive effects were obtained such as hyperplasia of interstitial Leydig cells, vacuolation, the presence of multinucleated cells and different stages of spermatogonia in testicular tissue; also, the destruction of duct covering cells and the detachment of cilia in the epididymal epithelium was observed. These changes were significantly greater in the stanozolol group than nandrolone decanoate. The quantitative changes were more pronounced in the stanozolol group and the qualitative changes in the nandrolone decanoate group. Although both drugs had side effects on testicular and epididymal tissues; the side effects of stanozolol were greater than nandrolone decanoate; therefore, it is recommended minimum dose of nandrolone decanoate for therapeutic purposes.

Key words: Stanozolol, Nandrolone decanoate, Histopathology, Testes, Epididymis, Dog

* **Corresponding Author:** Bahman Mosallanejad, Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: bmosallanejad@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Tracking the antibody level against *Ornithobacterium rhinotracheal* in the serum of slaughtered turkeys in Khuzestan province using In-house ELISA

Sedigheh Yousefinejad¹, Mohammad Khosravi^{2*}, Darioush Gharibi³, Mansoor Mayahi⁴ and Masoud Reza Seyfi Abad Shapouri⁵

¹ PhD Graduated in Veterinary Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³ Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

⁴ Professor, Department of Livestock, Poultry and Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

⁵ Professor of the Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 09.10.2023

Accepted: 23.01.2024

Abstract

Ornithobacterium rhinotracheal (ORT) is a Gram-negative pathogen that is one of the causes of respiratory diseases in birds. Co-infection of *Ornithobacterium rhinotracheal* with other pathogens can cause serious health problems in bird species and also lead to financial losses in the poultry industry. Serological methods are among the most important techniques for rapid infection diagnosis, farm monitoring, infection control and prevention. The purpose of this study was to design an ELISA test to assess the prevalence of ORT and track the amount of ORT-specific antibody in serum collected from turkeys. After immunizing three pieces of turkey and obtaining the immunization serum, antibody purification was performed using ion exchange chromatography and affinity chromatography methods. The purified antibodies were then used in a homemade ELISA reaction as a standard sample to determine the quantity of specific antibodies against ORT. A total of 244 serum samples were collected from turkeys slaughtered in the poultry slaughterhouse of Khuzestan province. ELISA testing revealed the significant presence of antibodies against ORT in 141 (57.78%) of the samples. The average concentration of antibodies in positive samples was 467.72 ± 124.128 micrograms per milliliter of serum, while in negative samples it was 262.97 ± 37.263 micrograms per milliliter. This study revealed the prevalence of ORT infections in Khuzestan province. Therefore, due to the lack of a reliable vaccine against *O. rhinotracheal*, it is necessary to implement good disease management and biosecurity measures in order to effectively control the disease.

Key words: *Ornithobacterium rhinotracheal*, Turkey, Antibody, ELISA

* **Corresponding Author:** Mohammad Khosravi, Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: m.khosravi@scu.ac.ir



تشکر و قدردانی

از کلیه داوران محترم که در بررسی و ارزیابی مقالات این شماره از مجله دامپزشکی ایران همکاری ارزنده و عالمانه‌ای داشته‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

اسامی داوران به ترتیب حروف الفبا:

دکتر معصومه احمدی‌زاده، دکتر فرید براتی، دکتر زهرا بصیر، دکتر زهرا برومند، دکتر رحیم پیغان، دکتر سیده میثاق جلالی، دکتر محمود جمشیدیان، دکتر محمدحسن حبل‌الورید، دکتر سیدمهدی حسینی‌فرد، دکتر محمد خسروی، دکتر احمدرضا راجی، دکتر محمد مهدی رنجبر، دکتر بهادر شجاعی، دکتر مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری، دکتر مسعود طالب‌خان‌گروسی، دکتر احمد عرفان‌منش، دکتر سیامک عصری‌رضایی، دکتر حمید قاسم‌زاده‌نوا، دکتر فرخ‌رضا کییر، دکتر مجید محمدصادق، دکتر مجید مسعودی‌فرد، دکتر محمدسعید مصدق، دکتر عبدالواحد معربی، دکتر میثم مکی، دکتر جلیل مهرزادسلاکجال، دکتر سعید نظیفی، دکتر غلامرضا نیکبخت‌بروجنی، دکتر سیدعلی همتی و دکتر سیده پرستو یاسینی.

بسم الله الرحمن الرحيم

مجله دامپزشکی ایران

فهرست مطالب

عنوان

صفحه

- راهنمای تدوین مقاله ۱
- ارزیابی ایمنی‌زایی اختصاصی واکسن خوراکی بایوفیلیم آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی
امیر آرامون، مجتبی علیشاهی، مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری و مسعود قربانپور ۵
- مطالعه تأثیر جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس بر ساختار هیستومورفومتريک و هیستولوژیک بافت بیضه رت مواجهه شده
با نانوذرات اکسید آهن
عباس پیرزاده، حسن مروتی و محسن عباسی ۱۶
- مقایسه رقیق‌کننده حاوی پلاسماي زرده تخم کبوتر، مرغ و ترکیب آن‌ها جهت نگهداری منی قوچ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ۲۷
علیرضا حمیصی، محسن اسلامی، حامد اسماعیلی، فرهاد فرخی‌اردبیلی و سینا بهمنی
- مطالعه و شناسایی سلول‌های زایای اولیه در گناد جنین قرقاول ماده (*Phasianus colchicus*) با استفاده از تکنیک‌های
مختلف بافت‌شناسی
زهرا خداپرست و ابوالقاسم نبی‌پور ۳۹
- اثر کنه وارواآ، (*Varroa destructor*)، روی ویژگی‌های ریخت‌شناختی و تغذیه‌ای زنبور عسل نژاد ایرانی
(*Apis mellifera meda*)
مهدی طوسی، آرش راسخ، معصومه ضیایی، پرویز شیشه‌بر و غلامحسین طهماسبی ۵۰
- تأثیر فرمولاسیون (قطر ذرات) واکسن غیرفعال دوگانه (AI+ND) بر پایداری و ایمنی‌زایی آن در جوجه‌های SPF و گوشتی ۶۴
محمد عباس‌نیا، علی شیرازی‌نژاد، نادر قلعه‌گلاب‌بهبهان، منصور میاچی و سیدسبحان عمادی‌جمالی
- بررسی میزان همبستگی بین ابعاد و حجم کلیه‌ها در اولتراسونوگرافی با مقادیر واقعی آن‌ها در سگ
علیرضا غدیری، رضا آویزه، علی بنی‌آدم و شهرزاد صمیمی ۷۵
- مطالعه اثرات فراکسیون‌های سم عقرب همی‌اسکورپیوس لپتوروس بر مقادیر گلوکز و هورمون‌های انسولین، گلوکاکون
و کورتیزول در رت
نوید کوشکی، محمد راضی‌جلالی، سیدرضا فاطمی‌طباطبایی و هدیه جعفری ۸۲
- بررسی اثر ژل رویال بر تغییرات هیستوپاتولوژیک و بیوشیمیایی ریه موش‌های صحرایی متعاقب مسمومیت با
آرسنیک تری‌اکساید
حسین محمدی، بابک محمدیان، حسین نجف‌زاده‌ورزی و علی شهریاری ۹۲
- ارزیابی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در سرم متعاقب دریافت مکمل‌های نانوذرات سلنیم، سلنیت سدیم و ویتامین E
در بره‌های شیرخوار
سامان محمدی‌راد، احسان عناصری، علیقلی رامین و سیامک عصری‌رضایی ۱۰۲
- ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژی بافت بیضه و اپیدیدیم در سگ‌های تحت درمان با هورمون‌های استانوزولول و
ناندرولون دکانوات
بهمن مصلی‌نژاد، سعد گورانی‌نژاد، آناهیتا رضایی، سیدرضا فاطمی‌طباطبایی، هادی ایمانی‌راستابی و سامان سلمانی ۱۱۵
- ردیابی میزان آنتی‌بادی و بررسی شیوع سرمی علیه اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال در سرم بوقلمون‌های کشتار شده
در استان خوزستان با استفاده از الایزای خانگی
صدیقه یوسفی‌نژاد، محمد خسروی، داریوش غریبی، منصور میاچی و مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری ۱۲۸
- خلاصه انگلیسی مقاله‌ها ۱۳۹

Iranian Veterinary Journal

Founder

SHAHID CHAMRAN UNIVERSITY OF AHVAZ

Director in Chief

Dr. Mansoor Mayahi

Editor in Chief

Dr. Mohammad Rahim Haji Hajikolaie

Expert

Mona Abbasi

Editorial Board

Abbas Ali Pourkabireh, M., Professor of Clinical Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran.
Ahmadizadeh, M., Professor of Toxicology, Faculty of Health, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Iran.
Akhtardanesh, B., Professor of Small Animal Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.
Baniadam, A., Associate Professor of Veterinary Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
Ghafourian Boroujerdnia, M., Professor of Immunology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Iran.
Gharib Naseri, M.K., Professor of Physiology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Iran.
Ghorbanpoor, M., Professor of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
Haji Hajikolaie, M.R., Professor of Large Animals Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
Hamidinejat, H., Professor of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
Hemmatzadeh, F., Associate Professor of Virology, Faculty of Animal and Veterinary Sciences, University of Adelaide, Australia.
Jolodar, A., Professor of Molecular Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
Karim, G., Professor of Health and Food Safety, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran.
Kohli, R.N., Professor of Veterinary Surgery, and Editor of National Academy of Veterinary Sciences, India.
Morovvati, H., Professor of Histology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran.
Naem, S., Professor of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Iran.
Najafzadeh Varzi, H., Professor of Medical Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
Pourmahdi Borojeni, M., Associate Professor of Epidemiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
Ranjbar, R., Associate Professor of Anatomical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
Razi Jalali, M., Professor of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
Seyfi Abad Shapouri, Professor of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
Shahinduran, Sh., Professor of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Burdur, Turkiye

Advisory Editorial Board

Academic staffs of all veterinary medicine faculties and other relevant faculties and research centers

Mailing Address of the Editor

Dr. Mohammad Razi Jalali, DVM, PhD
Editor in chief of Iranian Veterinary Journal
Ahvaz, Postal Code: 61355 P.O. Box : 145, Iran
Tel / Fax : +98 61 33336312
<http://ivj.ir>
E-mail: ivj@scu.ac.ir

This Journal has been granted the rating of **Scientific – Research** by the Commission for Evaluation of Iranian Scientific Journals, the Ministry of Science, Research and Technology, through the letter numbered 3.2910.545 dated 30.7.2006

This journal is indexed by Iran and Islamic World Scientific Citation Center (**ISC**)

Published by

Regional Information Center for Science and Technology and Islamic World Science Citation Center