

بررسی ارتباط میان ضایعات هیستوپاتولوژیک و میزان تغییرات بیومارکرهای قلبی در بره‌های مبتلا به بیماری تب برفکی

زهرا جعفرنیا^۱، محمد هاشم نیا^{۲*}، زهرا نیکو صفت^۳

۱- دانش‌آموخته دکترای عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

۲- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

۳- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: m.hashemnia@razi.ac.ir

چکیده

بیماری تب برفکی در بره‌ها باعث مرگ و میر بالا می‌شود که علت آن غالباً آسیب شدید میوکارد است. آزمایش‌های الایزا و روش‌های مولکولی از جمله اعمال متداول برای تشخیص حیوانات مبتلا هستند که علی‌رغم کارآمد بودن، معمولاً پرهزینه هستند، بنابراین استفاده از روش‌های تشخیصی سریع و کم‌هزینه حائز اهمیت می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی میزان تغییرات بیومارکرهای قلبی و ارتباط آن‌ها با شدت ضایعات پاتولوژیک در قلب بره‌های مبتلا به بیماری تب برفکی، انجام شد. ۲۵ رأس گوسفند که بر اساس آزمایش الایزا مبتلا به تب برفکی تشخیص داده شدند به عنوان گروه بیمار و ۲۵ رأس گوسفند سالم به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. برای سنجش بیومارکرهای قلبی، از حیوانات مبتلا و سالم خونگیری بعمل آمد. پس از کالبدگشایی حیوانات مبتلا، نمونه‌های بافت قلب جهت تهیه مقاطع میکروسکوپی برداشته شد. در حیوانات بیمار، مهم‌ترین ضایعات قلبی عبارت بودند از دژنراسیون هیالینی، نکروز بافتی، تجمع بینابینی سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای، آتروفی عضلانی، التهاب عروق و پرخونی. همچنین در سرم حیوانات مبتلا، میانگین غلظت تروپونین I، میوگلوبین و رادیکال‌های فعال اکسیژن و فعالیت آنزیم‌های کراتین کیناز و لاکتات دهیدروژناز در مقایسه با گروه کنترل سالم بیشتر بود ($p < 0.05$). میزان افزایش بیومارکرهای قلبی هم با شدت ضایعات پاتولوژیک ارتباط مستقیم داشت. نتایج نشان داد که سنجش بیومارکرهای قلبی می‌تواند شواهدی جامع در مورد آسیب‌های قلبی در حیوانات مبتلا به تب برفکی ارائه دهد. به نظر می‌رسد، اندازه‌گیری تروپونین سرم دارای اختصاصیت و حساسیت بالایی برای تشخیص آسیب قلبی است و همراه با اخذ تاریخچه و انجام معاینات بالینی، می‌تواند به تشخیص بیماری تب برفکی کمک کند.

کلیدواژه‌ها: بیماری تب برفکی، بره، ضایعات پاتولوژیک، بیومارکرهای قلبی.

بیماری تب برفکی (Foot and Mouth Disease; FMD) یک بیماری ویروسی ویزیکولار و شدت واگیردار در حیوانات زوج سم می‌باشد که به لحاظ شدت خسارات اقتصادی یکی از موانع اصلی در تامین بهداشت و تولید دام و فرآورده‌های دامی محسوب می‌گردد. تب برفکی تقریباً تمامی دام‌های زوج سم از جمله گونه‌های نشخوارکنندگان اهلی مانند گاو، گاو میش، گوسفند، بز و خوک را درگیر می‌کند، هرچند حساسیت گاو نسبت به سایر دام‌ها بیشتر است. شدت واگیری در دام‌های حساس، بسیار بالا (۱۰۰ درصد) بوده ولی میزان مرگ و میر معمولاً پایین (۲ تا ۲۰ درصد) است (Paton *et al.*, 2018). عامل بیماری مذکور، RNA ویروسی از خانواده پیکورناویریده و جنس آفتوویروس است که شامل هفت سروتیپ با آنتی‌ژنی متفاوت A, C, O, SAT₁, SAT₂, SAT₃ و Asia-1 و همچنین بیش از ۶۰ زیرگروه است که به وسیله آزمایش‌های سرولوژیکی از یکدیگر متمایز می‌شوند. این سروتیپ‌ها از نظر ایمنی‌زایی، با یکدیگر متفاوت هستند و عفونت با یک سروتیپ، سبب مقاومت به دیگر سروتیپ‌ها نمی‌شود. همچنین، وجود زیرگونه‌های آنتی‌ژنیک زیادی با درجات بیماری‌زایی گوناگون، می‌تواند سبب شکست واکسیناسیون و پیدایش بیماری در گله‌ها شود. سویه‌های گوناگون ویروس، دارای حدت متفاوت بوده و یک سویه، قادر به تغییر حدت است. بیماری‌زایی، به عوامل بسیاری مانند تیپ و تحت تیپ ویروس، مقدار ویروس، گونه حیوان، سن، وضعیت ایمنی و سلامتی دام‌ها با توجه ویژه به عفونت‌های مخفی، بستگی دارد (Ding *et al.*, 2013; Tolouei *et al.*, 2021). بیماری تب برفکی به دلیل سرعت انتشار و زیان‌های اقتصادی فراوانی که به صنعت دامداری وارد می‌سازد به عنوان مهمترین بیماری واگیردار دام‌ها شناخته شده‌است که با جراحات تاولی اروزیونی و زخم در دهان و روی پوزه، سرپستانک‌ها، فضای بین‌انگشتی و تاج سم مشخص می‌شود. ضایعات ممکن است به پیش‌مده‌ها، مانند شکمبه و نگاری نیز گسترش یابند. در دام‌های جوان، شکل بدخیم بیماری رخ می‌دهد به طوری که در دام‌های مذکور ویزیکول‌ها تشکیل نشده و مرگ ناگهانی شایع است که به دلیل ابتلای ماهیچه‌های قلب است. همچنین کانون‌های بی‌رنگ تا سفیدرنگ با اندازه‌های گوناگون در دیواره بطن‌ها و ماهیچه‌های پاپیلری قلب دیده می‌شود که تحت عنوان نمای قلب ببری (Tiger heart) معروف است. از نظر میکروسکوپی، ضایعهٔ میوکاردیت حاد به صورت دژنراسانس هیالن و نکروز انعقادی رشته‌های ماهیچه‌ای قلب همراه با نفوذ خفیف تا متوسط سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای مشاهده می‌شود (Jamal and Belsham, 2013).

با توجه به اهمیت بیماری تب برفکی در صنعت دامپروری، کنترل آن یک چالش همیشگی برای مدیران صنعت مذکور می‌باشد. کنترل بیماری تب برفکی در مناطق آندمیک با تشخیص، نظارت و واکسیناسیون منظم و بصورت انبوه انجام می‌شود. اما در کشورهای عاری از بیماری تب برفکی، سیاست‌های کنترلی بر اساس کاهش جمعیت حیوانات آلوده و در معرض تماس، همراه با ایجاد محدودیت در انتقال حیوانات و محصولات آن‌ها می‌باشد. در حال حاضر، واکسن‌های موثر بر علیه ویروس تب برفکی، محافظت قابل قبولی در برابر شکل بالینی بیماری ایجاد می‌کنند، اما از عفونت اولیه مخاط نازوفارنکس جلوگیری نمی‌کنند، بنابراین روندهای کنترل معمولاً شامل برنامه ریشه‌کنی و یا واکسیناسیون و یا ترکیبی از آن‌ها می‌باشد (Lu *et al.*, 2022). با توجه به این‌که اساس برنامه‌های کنترلی و ریشه‌کنی، تشخیص سریع و به موقع بیماری است، لذا تشخیص ویروس در بافت و مایعات و استفاده از روش الایزا، آزمایش تثبیت کمپلمان، تشخیص مولکولی اسید نوکلئیک‌ها و روش‌های سرولوژیکی، از مهم‌ترین روش‌های تشخیصی این بیماری هستند.

مسلم، برخی از این روش‌ها زمان‌بر هستند یا از لحاظ اقتصادی به صرفه نیستند. بنابراین، جستجو برای یافتن روش‌های دیگر بطور مداوم در حال پیگیری است (Wong *et al.*, 2020).

نظر بر این‌که یکی از ضایعات مشخص بیماری تب برفکی به‌ویژه در دام‌های جوان و مرگ ناگهانی، به دلیل ابتلای ماهیچه‌های قلب می‌باشد و معمولاً تشخیص میوکاردیت ناشی از بیماری از طریق معاینات بالینی به دلیل کاهش صداهای قلبی معمولاً دشوار است و در موارد متعددی کالبدگشایی دام و تهیه نمونه بافتی جهت انجام آزمایش‌های هیستوپاتولوژی امکان‌پذیر نیست (Reef and McGuirk, 2002)، لذا اخیراً استفاده از بیومارکرها در تشخیص ضایعات قلب مورد بررسی قرار گرفته است و به‌نظر می‌رسد که استفاده از بیومارکرهای مذکور، تشخیص بیماری‌های قلبی را سریع‌تر و آسان‌تر سازد. بیومارکرهای معمول برای تشخیص بیماری قلبی شامل تروپونین (Cardiac Troponin I; CTnI)، میوگلوبین، آسپاراتات آمینوترانسفراز (Aspartate aminotransferase; AST)، لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase; LDH) و کراتین کیناز (Creatine kinase MB; CK-MB) هستند. بیومارکرهای قلبی در واقع شامل آنزیم‌ها و پروتئین‌هایی هستند که در هنگام آسیب دیدن قلب به درون آن آزاد می‌شوند و با اندازه‌گیری مقدار آن‌ها می‌توان ضایعات قلبی از جمله سندروم کرونر حاد، اندوکاردیت و اینفارکت میوکارد را تشخیص داد (Undhad *et al.*, 2012; Jafari Dehkordi *et al.*, 2014).

تروپونین کمپلکسی از ۳ پروتئین تنظیمی است که در جریان انقباض عضلات اسکلتی و قلبی دخالت داشته، اما در عضلات صاف وجود ندارند. تروپونین‌ها در حالت عادی در سرم وجود نداشته و تنها زمانی که نکروز عضلانی رخ دهد، آزاد می‌شوند. این مولکول‌ها در واقع استاندارد طلایی برای تشخیص آسیب میوکارد در انسان و حیوانات هستند و همچنین به عنوان جایگزین برای سایر بیومارکرهای قلبی از جمله میوگلوبین، لاکتات دهیدروژناز و کراتین کیناز متصل به میوگلوبین در نظر گرفته می‌شوند، زیرا هم اختصاصیت و هم حساسیت آن در تشخیص آسیب قلبی بیشتر از سایر بیومارکرها است. تغییر غلظت تروپونین در خون ۱ تا ۲ هفته باقی می‌ماند و به همین دلیل یک گستره وسیع برای سنجش و تشخیص آسیب قلبی ایجاد می‌کند (Undhad *et al.*, 2012).

هرچند آزمایش‌هایی مانند آزمون الایزا، ختنی‌سازی و ویروس و روش‌های مولکولی از جمله اعمال متداول و بسیار کارآمد برای تشخیص بیماری تب برفکی بوده و حساسیت و ویژگی بالایی دارند ولی معمولاً پرهزینه هستند. بنابراین استفاده از روش‌های تشخیصی جدید، سریع و کم‌هزینه مانند اندازه‌گیری بیومارکرهای قلبی در کنار توجه به تاریخچه و علائم بیماری می‌تواند در تشخیص سریع بیماری حائز اهمیت باشد (Aslani *et al.*, 2013).

لذا مطالعه حاضر به منظور بررسی ارتباط میان شدت ضایعات هیستوپاتولوژیک و میزان تغییرات بیومارکرهای قلبی شامل تروپونین I، لاکتات دهیدروژناز، میوگلوبین، کراتین کیناز و رادیکال‌های فعال اکسیژن در بره‌های مبتلا به بیماری تب برفکی و همچنین تعیین کاربردی‌ترین بیومارکر در این خصوص، انجام شد.

مواد و روش‌ها

در طی مطالعه حاضر، گوسفندان مربوط به کانون‌های مشکوک به تب برفکی در شهرستان کرمانشاه در یک دوره ۳ ماهه (اسفند ۱۳۹۶ و فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۷) مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور، از گوسفندان زیر یک سال سن مشکوک به فرم حاد بیماری که واجد علائمی مانند تب شدید، بی‌حالی، بی‌اشتهایی و آریتمی قلبی بودند، خونگیری توسط سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری از ورید وداج انجام و حیوانات علامت‌گذاری شدند. سپس نمونه‌های خون به آزمایشگاه پاتولوژی شفا (واقع در اسلام آباد غرب) منتقل و پس از جداسازی سرم، ۲۵ رأس گوسفند که بر اساس آزمایش ساندریج الایزا غیرمستقیم (با استفاده از کیت آزمایشگاه مرجع جهانی تب برفکی، WRL for FMD-Pirbright) مبتلا به تب برفکی تشخیص داده شدند، انتخاب شدند. با مراجعه مجدد به محل نگهداری دام‌ها و بعد از کسب اجازه از دامداران، مجدداً نمونه خون به میزان ۱۰ میلی‌لیتر از هر حیوان اخذ و به‌صورت سیستمیک، عمل کالبدگشایی دام‌های مبتلا انجام شد. بعد از ارزیابی ضایعات ماکروسکوپی قلب، نمونه‌های مناسب از بافت قلب برداشته شده و جهت تهیه مقاطع میکروسکوپی، در ظروف حاوی فرمالین بافر ۱۰ درصد به آزمایشگاه فرستاده شدند. همچنین تعداد ۲۵ رأس گوسفند سالم هم از مناطق عاری از تب برفکی به عنوان حیوانات گروه کنترل انتخاب شدند و تنها نمونه خون به روش فوق جهت انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی از آنها اخذ گردید. پس از انتقال نمونه‌های خون به آزمایشگاه و انجام سانتریفیوژ و سپس جداسازی سرم، نمونه‌ها در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. لازم به ذکر است که انتخاب حیوانات بیمار در نهایت از ۳ گله مجزا انجام شد که براساس تاریخچه اخذ شده، واکسن تب برفکی را دریافت نکرده بودند و سابقه ورود حیوانات جدید به گله بدون در نظر گرفتن موارد بهداشتی و گذراندن دوره قرنطینه وجود داشت.

قابل ذکر است که طراحی، روش شناسی و اهداف مطالعه حاضر هم به تایید شورای پژوهشی دانشکده دامپزشکی و کمیته اخلاق دانشگاه رازی رسیده است (کد اخلاق: ۰۱۰-۲-۳۹۶).

- روش تهیه مقاطع آسیب‌شناسی بافت قلب بره‌ها:

جهت آماده‌سازی بافتی، نمونه‌های قلب توسط درجات صعودی الکل (مجللی، ایران) آگیری شده و پس از شفاف‌سازی با گزلیل (مجللی، ایران)، برای مدت ۵ ساعت درون پارافین مذاب (Merck، آلمان) با حرارت ۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. البته مراحل مذکور به طریقه اتوماتیک و با استفاده از دستگاه پاساژ بافتی (مدل DS2080، دید سبز، ایران) انجام گرفت. سپس نمونه‌های بافتی در بلوک‌های پارافینی قالب‌گیری شدند و با استفاده از دستگاه میکروتوم (Rotary Microtomes RAZOR, Germany) برش‌هایی به قطر ۵ میکرون از آنها تهیه شد. به منظور مطالعه برش‌های نازک تهیه شده، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (شیمی پژوه، ایران) طبق روش متداول انجام و ضایعات بافتی مشاهده شده، بوسیله میکروسکوپ نوری (Leica Galen III, USA) مورد بررسی قرار گرفتند.

- اندازه‌گیری بیومارکرهای قلبی در سرم بره‌ها:

اندازه‌گیری مقدار کمی تروپونین I توسط روش سنجش‌های ایمنی آنزیمی با استفاده از کیت شرکت DiaSorin ایتالیا و با رعایت کلیه شرایط استاندارد انجام شد. در این روش از آنتی‌بادی مونوکلونال موش (متصل‌شونده به اسیدهای آمینه ۸۰-۱۱۰ مولکول تروپونین قلبی I) برای پوشش فاز جامد (ذرات مغناطیسی) و آنتی‌بادی پلی‌کلونال بز (متصل‌شونده به

اسیدهای آمینه ۳۹-۲۷ مولکول تروپونین قلبی (I) برای کانژوگه کردن استفاده می‌شود. در طی مرحله گرمخانه‌گذاری، تروپونین موجود در کالیراسیون، نمونه سرمی یا کنترل، به آنتی‌بادی مونوکلونال فاز جامد متصل می‌شود و سپس آنتی‌بادی پلی‌کلونال کانژوگه با تروپونین متصل به فاز جامد، واکنش نشان می‌دهد. بعد از گرمخانه‌گذاری، مواد متصل نشده بوسیله شستشو با آب جدا می‌شوند. در مرحله بعد، معرف‌های آغازگر اضافه می‌شوند و یک واکنش شیمیایی کمی‌لومینسانس ایجاد می‌شود. در نهایت، سیگنال نوری (مقدار آنتی‌بادی ایزولومینول کانژوگه) با استفاده از فوتومولتی پلایر اندازه‌گیری می‌شود که نشان‌دهنده غلظت تروپونین موجود در کالیراسیون، نمونه یا کنترل است. اندازه‌گیری میوگلوبین به کمک روش الایزا و کیت اندازه‌گیری DRG (EIA-3955) و دستگاه الایزا ریدر استات فکس (USA, Awareness) انجام شد. در این روش از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد میوگلوبین موش برای غیرفعال کردن فاز جامد و از آنتی‌بادی ضد میوگلوبین بز به عنوان محلول کانژوگه‌کننده آنتی‌بادی-آنزیم (Horseradish Peroxidase) استفاده می‌شود. بدین منظور به نمونه آزمایشی اجازه داده شد تا به طور همزمان با ۲ آنتی‌بادی مذکور واکنش دهد و پس از ۴۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق، چاهک‌ها برای جدا شدن آنتی‌بادی‌های متصل نشده توسط آب شسته شدند. در مرحله بعد، تتراماتیل - بنزیدین (Tetramethylbenzidine; TMB) اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه دیگر، عمل گرمخانه‌گذاری انجام گرفت که منجر به ایجاد یک رنگ آبی شد. توسعه رنگ با افزودن محلول متوقف‌کننده (Stop Solution) متوقف شده و تغییر رنگ به زرد اتفاق افتاد. غلظت میوگلوبین به طور مستقیم با شدت رنگ نمونه متناسب است. جذب نوری مربوطه، به وسیله روش اسپکتروفتومتری (اسپکتروفتومتر مدل ۶۳۰۵، جنوی انگلستان) در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری رادیکال‌های فعال اکسیژن بر پایه واکنش بین مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehyde) (محصول بدست آمده از اثر ترکیبات رادیکال‌های فعال اکسیژن با دزوکسی‌ریبوز) و معرفی به نام تیوباربیتوریک‌اسید (Thiobarbituric Acid) استوار است. برای انجام این آزمایش به هریک از نمونه‌های سرم ۰/۵ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۲/۸ درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید ۱ درصد اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری در حال جوش قرار داده شد. بعد از سرد شدن لوله‌ها، میزان جذب نوری هریک از آن‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۶۳۰۵، جنوی انگلستان)، اندازه‌گیری و قرائت شد.

اندازه‌گیری لاکتات دهیدروژناز به وسیله دستگاه اتوآنالیزور (مدل ۹۱۲، هیتاچی ژاپن) با استفاده از کیت‌های تشخیص آنزیمی شرکت پارس آزمون صورت گرفت. در این روش، اندازه‌گیری لاکتات دهیدروژناز با استفاده از لاکتات به عنوان سوبسترا و نیکوتین‌آمید آدنین دی‌نوکلئوتید (NAD) به عنوان کوآنزیم انجام می‌گردد که در این فرآیند NADH به NAD اکسید می‌شود. مقدار کاهش NADH با فعالیت لاکتات دهیدروژناز نسبت مستقیم دارد که به روش اسپکتروفتومتری (اسپکتروفتومتر مدل ۶۳۰۵، جنوی انگلستان) در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری کراتین کیناز به وسیله دستگاه اتوآنالیزور (مدل ۹۱۲، هیتاچی ژاپن) با استفاده از کیت‌های تشخیص آنزیمی شرکت پارس آزمون صورت گرفت. در این روش، فعالیت CK-MM (Creatine kinase-MM) که قسمت اعظم فعالیت CPK (Creatine phosphokinase) را تشکیل می‌دهد و CK-M (Creatine kinase-M) که زیر مجموعه CK-

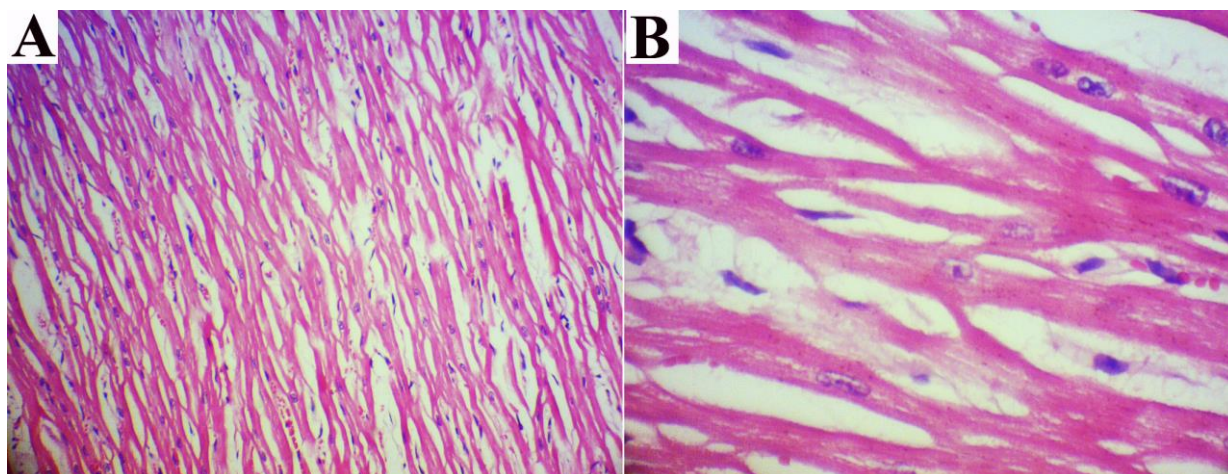
MB (Creatine kinase-MB) است توسط یک آنتی بادی اختصاصی بر علیه CK-M مهار شده و تنها فعالیت CK-B که نیمی از فعالیت CK-MB را دارا است، اندازه گیری می شود. در نهایت، میزان تشکیل نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات (NADPH) که متناسب با میزان فعالیت کراتین کیناز است، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۶۳۰۵، جنوی انگلستان) در طول موج ۳۶۵ نانومتر اندازه گیری شد.

- تحلیل آماری داده ها: آنالیز نتایج به دست آمده به کمک نرم افزار آماری SPSS ورژن ۲۱ انجام شد. بعد از جمع آوری داده ها و وارد کردن آن ها به نرم افزار، برای تعیین توزیع نرمال داده ها آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف (-Kolmogorov-Smirnov test) مورد استفاده قرار گرفت. داده های نرمال توسط آزمون تی مستقل (Independent sample t test) و داده های غیر نرمال توسط آزمون مان ویتنی (Mann-Whitney U) آنالیز شدند. سطح آماری معنی دار هم، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

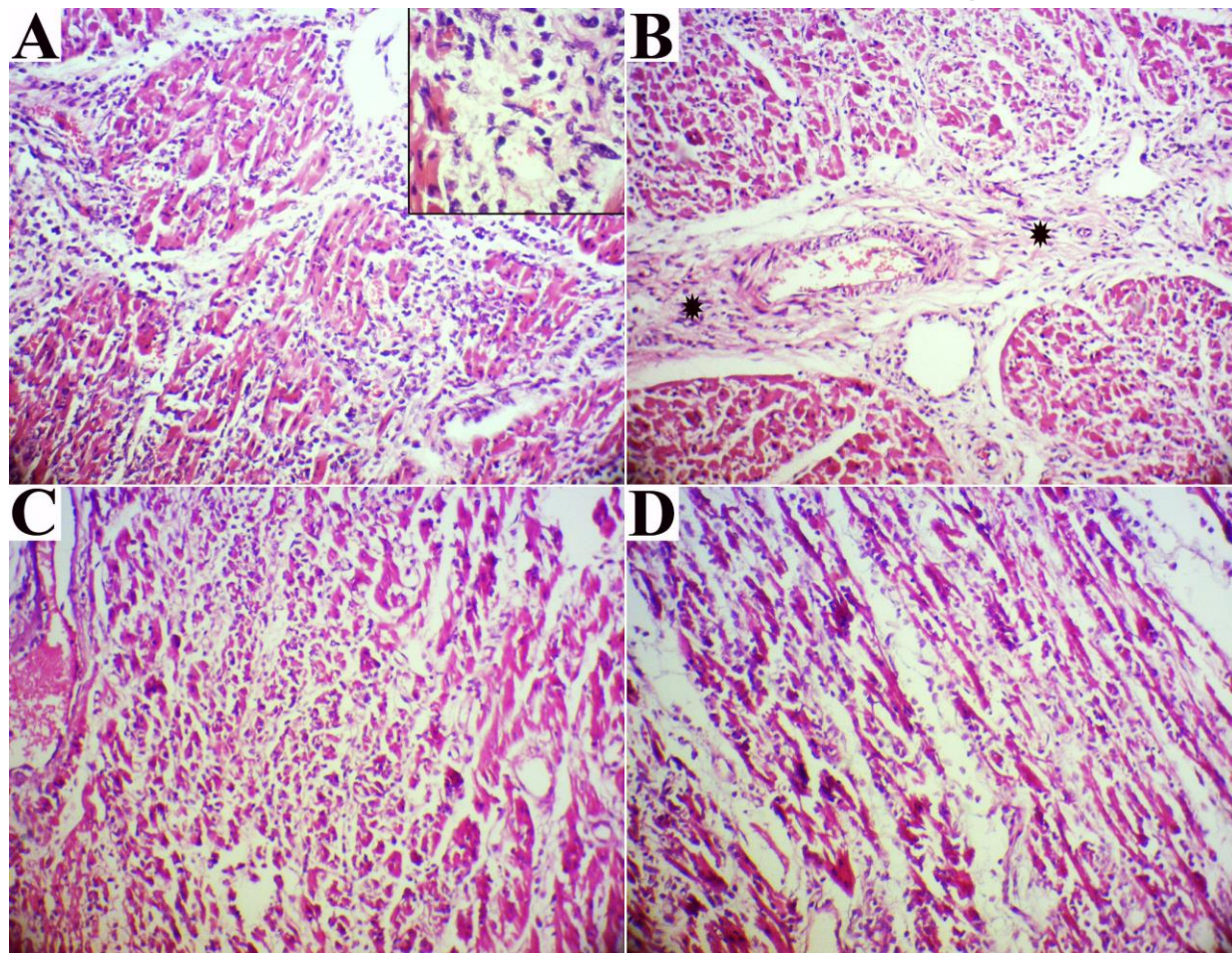
- یافته های ماکروسکوپی و میکروسکوپی قلب:

در بررسی ماکروسکوپی، ظاهر قلب در گروه کنترل کاملاً طبیعی بود. در حیوانات مبتلا به بیماری تب برفکی، کیسه پریکارد حاوی ۳۰ تا ۴۰ میلی لیتر مایع و فیبرین بود. عروق خونی و عروق کرونر پر خون بودند. در برخی موارد سطح پریکارد خشن بود. میوکارد از لحاظ قوام، شل و وارفته بود و دارای خطوط یا نقاط پراکنده سفید رنگ بود. در بررسی میکروسکوپی، مقاطع بافتی قلب در گروه کنترل ساختار طبیعی داشتند به طوری که کاردیومیوسیت ها یکنواخت و هم اندازه و غشاء پلازما و دیسک های بینابینی در محل اتصال بین سلول ها، سالم و دست نخورده بودند (شکل ۱).



شکل ۱- نمای میکروسکوپی ساختار طبیعی قلب بره* مربوط به گروه کنترل سالم (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین، بزرگنمایی های ۷۲۰x، شکل A و ۲۸۰۰x شکل B).

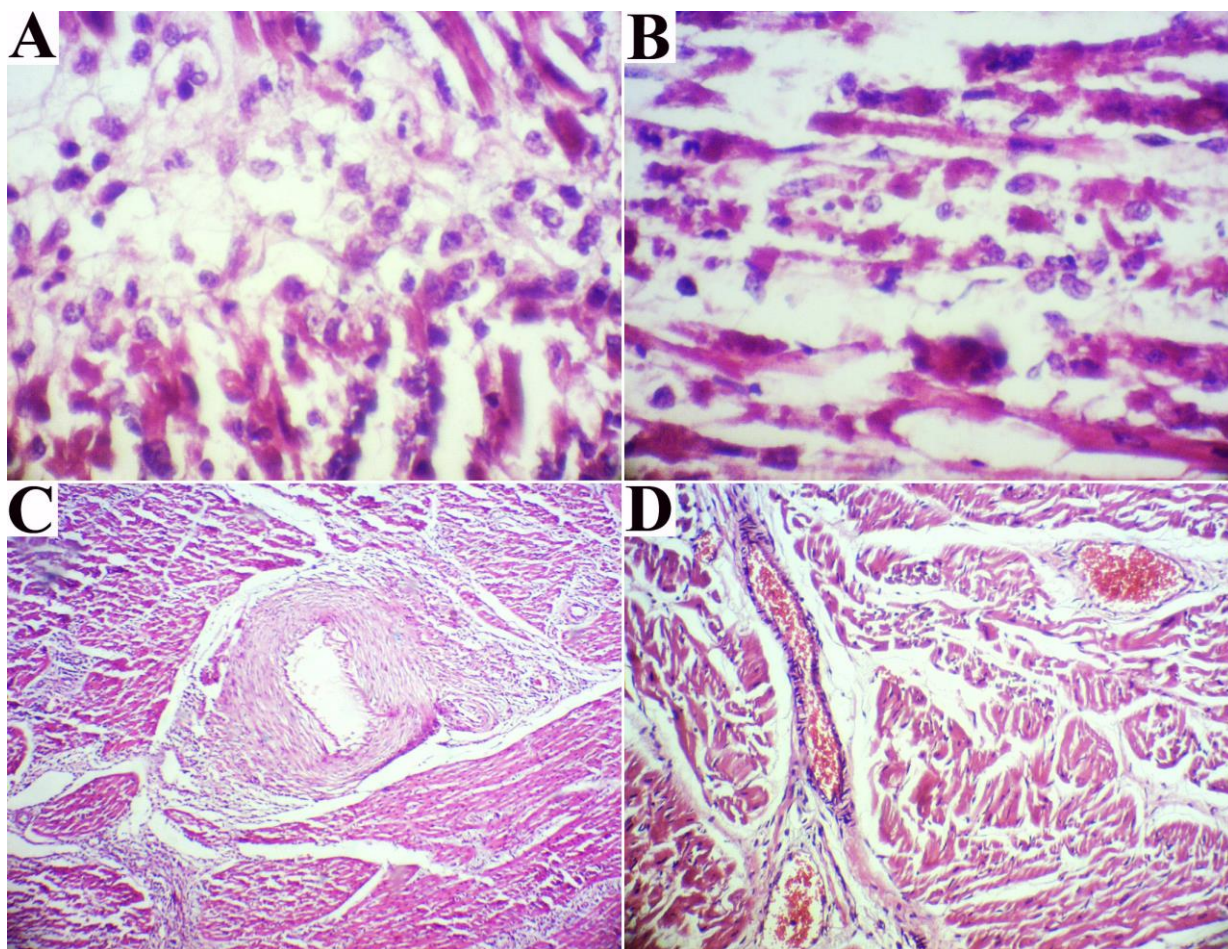
در حیوانات مبتلا به تب برفکی، ضایعات قلبی از خفیف تا شدید متغیر بودند. دژنراسیون هیالینی، نکروز بافتی، مینرالیزه شدن فیبرهای میوکارد و تجمع بینابینی سلول‌های التهابی (عمدتاً لنفوسیت و تعداد کمتری ماکروفاژ) و در مواردی نفوذ بافت فیبروبلاستیک در بین رشته‌های ماهیچه‌ای مشهود بود. دژنراسیون و نکروز میوکارد بصورت کانونی و منتشر هم در محل تجمع سلول‌های التهابی و هم در نواحی نزدیک به این تجمعات مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲- نمای میکروسکوپی از ساختار بافت قلب بره* مربوط به گروه بیمار: A- تراوش شدید سلول‌های تک هسته‌ای (عمدتاً لنفوسیت و تعداد کمتری ماکروفاژ)، B- نفوذ بافت فیبروبلاستیک در بین رشته‌های ماهیچه‌ای (ستاره‌ها)، C- دژنراسیون و نکروز متوسط میوکارد بصورت کانونی، D- دژنراسیون و نکروز شدید میوکارد بصورت منتشر در بافت قلب (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، بزرگ‌نمایی: $\times 720$ ؛ بزرگ‌نمایی تصویر کوچک در شکل A: $\times 2800$).

اما در موارد شدید ابتلا بره‌ها به بیماری تب برفکی، بافت عضلانی قلب کاملاً آتروفیک بود و یا توسط کانون‌های سلول‌های التهابی جایگزین شده بود. هسته میوسیت‌ها درون کانون‌های میوکاردیت بصورت هایپرکروماتیک، پیکنوزه یا تکه‌تکه شده مشاهده شدند. در مراحل نکروز شدید، اثری از هسته‌ها مشاهده نشد و فیبرهای عضلانی بصورت توده‌های نامنظم ائوزینوفیل و بی‌شکل و بقایای گرانوله مشخص بودند. گرانول‌های معدنی شده بصورت جداگانه در میان برخی از فیبرهای نکروز شده پراکنده بودند. علاوه بر این، در برخی مناطق، سارکوپلاسما، حاوی دانه‌های

بازوفیلیک متراکم بود که نشان‌دهنده رسوب کلسیم است. در مواردی، واسکولیت حاد کانونی و نکروز فیبرینوئید همراه با هایپرتروفی عضلات عروق کوچک و پرخونی متوسط تا شدید عروق مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳- نمای میکروسکوپی از ساختار بافت قلب بره* مربوط به گروه بیمار: A- آتروفی شدید بافت عضلانی و حضور سلول‌های التهابی بین سلول‌های ماهیچه‌ای قلب، B- هسته‌های پیکنوزه یا تکه‌تکه شده همراه با فیبرهای عضلانی بصورت توده‌های نامنظم اتوزینوفیل و بی‌شکل، C- واسکولیت حاد و نکروز فیبرینوئید همراه با هایپرتروفی عضلات عروق و D- پرخونی متوسط تا شدید عروق در بافت قلب (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- اتوزین: تصاویر A و B بزرگ‌نمایی ۲۸۰۰× و تصاویر C و D بزرگ‌نمایی ۷۲۰×).

- یافته‌های بیوشیمیایی در سرم بره‌ها و تقسیم‌بندی ضایعات آسیب‌شناختی در بافت قلب آن‌ها:

برای انجام بررسی دقیق‌تر و یافتن ارتباط بین شدت ضایعات پاتولوژیک و میزان تغییر مارکرهای قلبی، ابتدا ضایعات پاتولوژیک مشاهده‌شده در بافت قلب بره‌ها، به ۳ گروه خفیف (الف)، متوسط (ب) و شدید (د) تقسیم‌بندی شد (Aslani et al., 2013) و سپس هر حیوان مورد مطالعه، با توجه به شدت ضایعات مذکور، در گروه مربوط به خود قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱- تقسیم‌بندی ضایعات پاتولوژیک بافت قلب بره‌های مبتلا به بیماری تب‌برفکی، بر اساس شدت ضایعات

شدت ضایعات	ضایعات خفیف (گروه الف)	ضایعات متوسط (گروه ب)	ضایعات شدید (گروه ج)
------------	------------------------	-----------------------	----------------------

توصیف ضایعات	دژنراسیون و نکروز خفیف	دژنراسیون هیالینی متوسط، نکروز	دژنراسیون هیالینی شدید، نکروز عضلانی
	بافتی، آتروفی خفیف فیبرهای	متوسط بافتی، نفوذ سلول‌های	گسترده، نفوذ شدید سلول‌های التهابی بصورت
	عضلانی، نفوذ سلول‌های	التهابی بصورت چندکانونی، آتروفی	چندکانونی و جایگزین شدن با فیبرهای
	التهابی بصورت خفیف تا	متوسط فیبرهای عضلانی و نفوذ	عضلانی، آتروفی شدید فیبرهای عضلانی و
	متوسط، پرخونی خفیف	سلول‌های التهابی بین فیبرهای	نفوذ سلول‌های التهابی و بافت فیبروزه بین
	عروق.	عضلانی، پرخونی شدید عروق.	فیبرهای عضلانی، واسکولیت.
تعداد حیوانات گروه	۸	۷	۱۰

از طرف دیگر، مجموعه یافته‌های بیوشیمیایی در سرم بره‌های مورد تحقیق که به شرح زیر می‌باشد و نیز ارتباط آن‌ها با میزان ضایعات بافتی مشاهده شده در قلب آن‌ها هم در جدول ۲ ارائه گردیده است:

در بررسی میزان تروپونین I بین دو گروه سالم و بیمار، میزان آنزیم مذکور در سرم بره‌های گروه سالم $0/02 \pm 0/04$ نانوگرم/میلی‌لیتر و در سرم حیوانات گروه بیمار $9/5 \pm 0/4$ نانوگرم/میلی‌لیتر بود و تفاوت مشاهده شده بین دو گروه، از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0/001$).

میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سرم بره‌های دو گروه سالم و بیمار هم به ترتیب $148/72 \pm 7/53$ واحد/لیتر و $531/84 \pm 24/29$ واحد/لیتر ثبت شد که تفاوت موجود هم بین دو گروه، از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0/001$).

در اندازه‌گیری میزان میوگلوبین بین دو گروه سالم و بیمار، میزان سرمی میوگلوبین در گروه سالم $11/51 \pm 0/66$ نانوگرم/میلی‌لیتر و در گروه بیمار $122/40 \pm 6/21$ نانوگرم/میلی‌لیتر بود که از نظر آماری، تفاوت ملاحظه شده از این نظر نیز، بین دو گروه معنی‌دار بود ($p < 0/001$).

همچنین میزان سرمی کراتین کیناز در بره‌های دو گروه سالم و بیمار، به ترتیب $60/32 \pm 3/15$ واحد/لیتر و $896/84 \pm 21/28$ واحد/لیتر ثبت شد که تفاوت مشاهده شده بین دو گروه، از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0/001$).

در بررسی میزان سرمی رادیکال‌های فعال اکسیژن بین دو گروه حیوانات سالم و بیمار، میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن در گروه سالم $557/41 \pm 23/23$ میکرومول/لیتر و در گروه بیمار $1898/91 \pm 199/95$ میکرومول/لیتر بود که در این خصوص نیز تفاوت موجود بین دو گروه، از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0/001$).

از طرف دیگر در مقایسه پارامترهای ذکر شده، بین ۳ گروه حیوان مبتلا به تب برفکی، براساس جدول شماره ۱، بیشترین و کمترین مقدار آنزیم تروپونین I بترتیب در سرم بره‌های گروه‌های (ج) و (الف) مشاهده شد و تفاوت بین گروه‌ها هم از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0/001$). همچنین در بررسی سطح آنزیم لاکتات دهیدروژناز، بیشترین مقدار

آنزیم در سرم حیوانات گروه (ج) مشاهده شد و به دنبال آن گروه‌های (الف) و (ب) قرار گرفتند، اما در این مورد، تفاوت مشاهده شده بین ۳ گروه، از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p = 0/81$). بیشترین مقدار میوگلوبین سرمی نیز در گروه

(ج) و کمترین مقدار آن در گروه (الف) مشاهده شد که این تفاوت هم از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p = 0/13$). در بررسی میزان آنزیم کراتین کیناز، بیشترین مقدار آن در سرم بره‌های گروه (ج) مشاهده شد که اختلاف مقدار مذکور، در

مقایسه با میزان مربوط به دو گروه دیگر، معنی‌دار بود ($p < 0/001$). بیشترین مقدار رادیکال‌های فعال اکسیژن هم به

ترتیب در گروه‌های (ج)، (ب) و (الف) مشاهده شد، هرچند تفاوت بین گروه‌ها در مورد مقادیر فاکتور مذکور، از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p=0/39$).

جدول ۲. میزان بیومارکرهای قلبی و ارتباط آن‌ها با شدت ضایعات هیستوپاتولوژیک بافت قلب بره‌های گروه‌های مختلف مبتلا به بیماری تب‌برفکی

گروه‌ها	تروپونین I (نانوگرم/میلی‌لیتر)	لاکتات دهیدروژناز (واحد/لیتر)	میوگلوبین (نانوگرم/میلی‌لیتر)	کراتین کیناز (واحد/لیتر)	رادیکال‌های فعال اکسیژن (میکرومول/لیتر)
گروه (الف)	$7/4 \pm 0/1^e$	$459/86 \pm 27/28^{\pi}$	$108/18 \pm 7/06^{\pi}$	$819/12 \pm 27/35^{*e}$	$1566/71 \pm 276/64^{\pi}$
گروه (ب)	$8/8 \pm 0/1^f$	$534/57 \pm 36/65^{\pi}$	$118/08 \pm 11/61^{\pi}$	$857/71 \pm 38/19^f$	$1821/66 \pm 418/62^{\pi}$
گروه (ج)	$11/6 \pm 0/4^{\pi}$	$587/50 \pm 45/15^{\pi}$	$136/81 \pm 11/01^{\pi}$	$986/40 \pm 18/11^{\pi}$	$2218/73 \pm 339/85^{\pi}$
Sig	0/00	0/81	0/13	0/00	0/39

π, e, f : علامت‌های غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد.

* نتایج با لحاظ $p < 0/05$ ارائه شده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میانگین غلظت سرمی تروپونین I، میوگلوبین و رادیکال‌های فعال اکسیژن و فعالیت آنزیم‌های کراتین کیناز و لاکتات دهیدروژناز در حیوانات مبتلا به تب‌برفکی در مقایسه با حیوانات سالم به‌طور معنی‌داری بیشتر است و همچنین میزان افزایش بیومارکرهای قلبی با شدت ضایعات پاتولوژیک ارتباط مستقیم دارد. مهمترین ضایعات ماکروسکوپی و میکروسکوپی در قلب شامل شل و وارفته بودن قوام میوکارد و وجود خطوط یا نقاط پراکنده سفیدرنگ بویژه در نزدیکی قاعده قلب و دژنراسیون هیالینی، نکروز بافتی، تجمع سلول‌های التهابی در بافت بینابینی و آتروفی سلول‌های عضلانی بود (شکل‌های ۲ و ۳) که با نتایج گزارش شده در مطالعات پیشین هم‌خوانی داشت. اکتاس و همکاران در سال ۲۰۱۵، ضایعاتی مانند دژنراسیون هیالین و نکروز میوکاردوسیت‌ها همراه با نفوذ سلول‌های تک‌هسته‌ای در بافت بینابینی متشکل از لنفوسیت‌ها، ماکروفاژها و تعداد کمی نوتروفیل را در بافت قلب گوساله‌های شیرخوار مبتلا به تب‌برفکی گزارش کردند (Aktas et al., 2015). در مطالعه انجام‌شده توسط تونکا و همکاران در سال ۲۰۰۹، نکروز گسترده میوکاردوسیت‌ها، آتروفی فیبرهای عضلانی همراه با نفوذ گسترده سلول‌های التهابی شامل لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها از مهمترین تظاهرات پاتولوژیک گزارش شده در بافت قلب گوساله‌های مبتلا به تب‌برفکی بود (Tunca et al., 2008). همچنین الکساندرسن و موات در سال ۲۰۰۵، میوکاردیت لنفوسیتوسیتی همراه با دژنراسیون هیالین، نکروز میوسیت‌ها و نفوذ سلول‌های تک‌هسته‌ای در بافت بینابینی از مهمترین علائم پاتولوژیک در حیوانات مبتلا به تب‌برفکی برشمردند (Alexandersen and Mowat, 2005).

در بررسی تغییرات سرمی تروپونین I، افزایش معنی دار تروپونین در گروه مبتلا به تب برفکی در مقایسه با گروه کنترل سالم مشاهده شد که افزایش مقدار این آنزیم با شدت ضایعات پاتولوژیک ارتباط مستقیم داشت (جدول ۲). افزایش سرمی تروپونین قلبی، به دنبال نشت آن از میوکاردوسیت‌های آسیب‌دیده اتفاق می‌افتد. حساسیت ۱۰۰ درصد این آنزیم برای بافت قلب، تروپونین را به عنوان یک ابزار بیوشیمیایی و ایمونوهیستوشیمیایی برای تشخیص آسیب قلبی معرفی می‌کند (Ford, 2016; Alaour et al., 2018). در سال‌های اخیر استفاده از تروپونین در دامپزشکی توسعه یافته‌است و کارایی و اهمیت اندازه‌گیری آن در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است و بسیاری از محققین اندازه‌گیری این آنزیم را در موارد مشکوک به میوکاردیت پیشنهاد داده‌اند. باسبوگان و همکاران در سال ۲۰۱۰، غلظت سرمی تروپونین را در نشخوارکنندگان سالم تعیین کردند. در این مطالعه، غلظت تروپونین I در گاو ۰/۲۳-۰ نانوگرم/میلی‌لیتر (میانگین ۰/۱۸ نانوگرم/میلی‌لیتر)، در گوسفند ۰/۲۱-۰ نانوگرم/میلی‌لیتر (میانگین ۰/۱۵ نانوگرم/میلی‌لیتر) و در بز ۰/۲۴-۰ نانوگرم/میلی‌لیتر (میانگین ۰/۲۰ نانوگرم/میلی‌لیتر) به دست آمد (Basbugan et al., 2010). در گزارش دیگری غلظت تروپونین در نشخوارکنندگان سالم حدود ۰/۰۴-۰ نانوگرم/میلی‌لیتر گزارش شده‌است که این مقدار در حیوانات مبتلا به پریکاردیت با دلیل نامشخص، تا ۰/۸۹ نانوگرم/میلی‌لیتر افزایش می‌یابد (Gunes et al., 2008). در مطالعه حاضر، میزان متوسط تروپونین در حیوانات سالم ۰/۰۲ نانوگرم/میلی‌لیتر بود که تاییدی بر سالم بودن حیوانات مورد استفاده می‌باشد (جدول ۲). تونکا و همکاران در سال ۲۰۰۸، در مطالعه‌ای تغییرات تروپونین I در خون و بافت قلب گوساله‌های مبتلا به تب برفکی را ارزیابی کردند. در این مطالعه افزایش سطح تروپونین I از ۱۱/۷ تا ۱۶/۴ نانوگرم/میلی‌لیتر در نمونه‌های مبتلا به تب برفکی متغیر بود، در حالی که میانگین غلظت تروپونین در گوساله‌های سالم ۰/۲۴ نانوگرم/میلی‌لیتر گزارش شده است. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده ارتباط مستقیم بین شدت ضایعات پاتولوژیک و افزایش غلظت سرمی تروپونین در حیوانات مبتلا بود (Tunca et al., 2008). در مطالعه دیگری، گونس و همکاران در سال ۲۰۱۰، میزان دژنراسیون میوکارد را با استفاده از سنجش تروپونین و یافته‌های هیستوپاتولوژی در بره‌های مبتلا به بیماری عضله سفید مورد ارزیابی قرار دادند. این محققین نشان دادند که کیت‌های انسانی سنجش تروپونین می‌توانند به طور موثری آسیب میوکارد را در حیوانات تشخیص دهند و بنابراین توسط دامپزشکان برای تأیید وجود ضایعات قلبی مورد استفاده قرار گیرند (Gunes et al., 2010). همچنین، کاراپینار و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعه‌ای تغییرات غلظت پلاسمایی تروپونین I را در بره‌های مبتلا به میوکاردیت مورد ارزیابی قرار دادند. در این مطالعه، میانگین غلظت پلاسمایی تروپونین قلبی I در بره‌های مبتلا و سالم به ترتیب ۱۴۶/۷۸ و ۰/۰۱۳ میکروگرم/لیتر به دست آمد. این محققین افزایش تروپونین را ناشی از نشت و پارگی سلول‌های قلبی دانستند (Karapinar et al., 2010). وارگا و همکاران در سال ۲۰۰۹، همبستگی غلظت تروپونین I و آسیب قلبی ناشی از مسمومیت با مونسنین در گاو را گزارش کردند. در این مطالعه، افزایش قابل توجه تروپونین متناسب با شدت ضایعات هیستوپاتولوژیک به خصوص شدت نکروز در میوکارد بود (Varga et al., 2009). علاوه بر مطالعات ذکر شده، افزایش غلظت سرمی تروپونین به دنبال آسیب قلبی در گاوهای

مبتلا به ورم پستان حاد و گاوهای شیری مبتلا به متریت سپتیک نیز گزارش شده است (Shaw et al., 2004; Diniz et al., 2008). همچنین افزایش غلظت سرمی تروپونین با طیف بین ۴/۳ تا ۵/۹ میکروگرم/لیتر در اسب‌های مبتلا به نکروز چندکانونی میوکارد مشاهده شده است (Cornelisse et al., 2000; Schwarzwald et al., 2003). از بررسی مطالعات انجام شده و نتایج مطالعه حاضر چنین می‌توان برآورد کرد که اندازه‌گیری تروپونین علاوه بر داشتن ارزش تشخیصی، از دیدگاه فنی نیز بسیار آسان و ارزان است. همچنین، افزایش غلظت سرمی این آنزیم در بافت مستقیماً مربوط به شدت ضایعات است که خود انعکاسی از شدت دژنراسیون و نکروز سلولی می‌باشد (Lim et al., 2005). نکته حائز اهمیت دیگر تفاوت در سطح نرمال و همچنین تفاوت در غلظت این آنزیم در بیماری‌های مختلف و مطالعات متفاوت است. این تفاوت‌ها ممکن است به دلیل تفاوت در روش‌های سنجش آنزیم و معیارهای اعمال شده، استفاده از دستگاه‌های آنالیزور شیمیایی مختلف یا استفاده از آنتی‌بادی‌های متفاوت باشد (Apple, 2001).

در بررسی میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز بین دو گروه سالم و بیمار، میزان سرمی آنزیم لاکتات دهیدروژناز در گروه بیمار بصورت معنی‌داری بیشتر از گروه سالم بود. اما در بررسی بین گروه‌های مختلف براساس شدت ضایعات پاتولوژیک، هرچند میزان این آنزیم در گروه دارای ضایعات شدید بیشتر از دو گروه دیگر بود ولی اختلاف بین گروه‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۲). لاکتات دهیدروژناز در شرایط ایجاد آسیب در عضلات اسکلتی و قلبی و همچنین آسیب سلول‌های کبدی افزایش می‌یابد. مقادیر مرجع برای لاکتات دهیدروژناز در گاو ۶۹۲-۱۴۴۵ واحد/لیتر، در گوسفند ۶۰-۴۴۰ واحد/لیتر و در بز ۱۲۳-۳۹۳ واحد/لیتر ذکر شده است. هرچند عنوان شده که در گروه‌های سنی بالاتر بعلاوه تغییرات فیزیولوژیک، این مقادیر ممکن است متفاوت باشند (Turgut, 2000). باسبوگان و همکاران در سال ۲۰۱۰، مقدار نرمال این آنزیم را در گاو، گوسفند و بز بترتیب ۹۳۳/۴، ۴۵۰/۱ و ۳۲۷/۸ واحد/لیتر گزارش کرده‌اند. در این گزارش نیز تغییرات سنی باعث تغییر گسترده‌ای در میزان لاکتات دهیدروژناز شده است (Basbugan et al., 2010). در مطالعه انجام شده توسط تونکا و همکاران در سال ۲۰۰۹، مقدار سرمی آنزیم لاکتات دهیدروژناز در بره‌های مبتلا به بیماری عضله سفید، ۲۲۸/۷۷ واحد/لیتر و در حیوانات سالم ۱۲۵/۴۷ واحد/لیتر گزارش شده است (Tunca et al., 2009). تونکا و همکاران در سال ۲۰۰۸ در مطالعه‌ای روی گوساله‌های مبتلا به تب برفکی مقدار لاکتات دهیدروژناز را در گروه سالم 109 ± 23 واحد/لیتر و در حیوانات بیمار 298 ± 29 واحد/لیتر گزارش کردند (Tunca et al., 2008). همانطور که مشخص است دامنه تغییرات این آنزیم در مطالعات مختلف بسیار متغیر است. همچنین به دلیل کمبود اختصاصیت لاکتات دهیدروژناز و افزایش غلظت این آنزیم در موارد متعددی مانند ضایعات وارد شده به عضلات اسکلتی و قلب و آسیب سلول‌های کبدی، تفسیر آن مشکل است.

در بررسی میزان کراتین کیناز بین دو گروه سالم و بیمار، میزان سرمی کراتین کیناز در گروه بیمار بصورت معنی‌داری بیشتر از گروه سالم بود. همچنین افزایش میزان این آنزیم با شدت ضایعات نسبت مستقیم داشت، به طوری که میزان آن در گروه ضایعات شدید از دو گروه دیگر بصورت معنی‌داری بیشتر بود (جدول ۲). کراتین کیناز آنزیمی است که به مقدار زیاد در عضلات منقطع یافت می‌شود و افزایش سطح آن در خون نشان دهنده آسیب به عضلات اسکلتی و یا

قلبی است. مقدار طبیعی کراتین کیناز در گاو ۲۲۸-۴۴ واحد/لیتر، در گوسفند ۹۷/۵-۳۹ واحد/لیتر و در بز کمتر از ۲۰۰ واحد/لیتر می‌باشد (Humann-Ziebank *et al.*, 2007). هرچند در مطالعه باسبوگان و همکاران در سال ۲۰۱۰، مقدار نرمال این آنزیم در گاو، گوسفند و بز بترتیب ۵۶/۷۱، ۶۱/۵۷ و ۴۵/۹۶ واحد/لیتر گزارش شده است. در مطالعه انجام شده توسط تونکا و همکاران در سال ۲۰۰۹، مقدار سرمی آنزیم کراتین کیناز در بره‌های مبتلا به بیماری عضله سفید، ۲۶۱/۱۶ واحد/لیتر گزارش شد (Tunca *et al.*, 2009). همچنین در مطالعه انجام شده توسط وارگا و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر پارامترهای بیوشیمیایی در گاوهای مسموم شده با مونسنین، مقدار این آنزیم در ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت پس از مسمومیت بترتیب ۳۶۷، ۵۶۵ و ۲۱۱۴ واحد/لیتر گزارش شده است. هر چند در مطالعه ذکر شده، افزایش قابل توجهی در غلظت سرمی کراتین کیناز مشاهده شده، ولی این محققین ارزیابی تروپونین I را ارجح تر دانسته و عنوان کرده‌اند که کراتین کیناز اختصاصیت کمی برای تشخیص آسیب قلبی و شدت ضایعات پاتولوژیک دارد (Varga *et al.*, 2009). مقایسه با کراتین کیناز، CK-MB، یک ایزوآنزیم کراتین کیناز است که دارای اختصاصیت بالاتری برای آسیب‌های میوکارد است (Costa *et al.*, 2008). در مطالعه حاضر، CK-MB اندازه‌گیری نشد، بنابراین اظهار نظر در مورد ارزش تشخیصی این آنزیم در بیماری تب برفکی، امکان‌پذیر نیست.

هرچند اندازه‌گیری لاکتات دهیدروژناز و کراتین کیناز و ایزوآنزیم‌های آن‌ها به عنوان بیومارکرهای کلاسیک در ضایعات قلبی مورد استفاده قرار می‌گیرند، ولی باید در نظر داشت که این بیومارکرها اختصاصی نیستند و در آسیب‌های مربوط به عضلات اسکلتی نیز افزایش می‌یابند و استفاده مؤثر از این آنزیم‌ها به دلیل عدم اختصاصیت بافتی و حساسیت پایین، محدود است (O'Brien, 2008).

در بررسی میزان میوگلوبین بین دو گروه سالم و بیمار در مطالعه حاضر، میزان میوگلوبین در گروه بیمار بصورت معنی‌داری بیشتر از گروه سالم بود. در بررسی بین گروه‌های مختلف براساس شدت ضایعات پاتولوژیک، هرچند افزایش میزان میوگلوبین با شدت ضایعات ارتباط مستقیم داشت ولی اختلاف بین گروه‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۲). میوگلوبین به میزان قابل توجهی از آنزیم تروپونین کوچکتر است و از این رو قبل از آن در خون آزاد شده و افزایش می‌یابد. با این حال، میوگلوبین دارای نقص اختصاصیت بافتی است و در آسیب‌های عضلانی نیز افزایش می‌یابد. بنابراین استفاده از آن به عنوان بیومارکر قلبی، مستلزم حذف ضایعات عضلات اسکلتی است. قابل ذکر است که میوگلوبین در مقایسه با کراتین کیناز و لاکتات دهیدروژناز اختصاصیت و حساسیت بیشتری دارد و بررسی آن نسبت به آنزیم‌های ذکر شده ارجح‌تر است (O'Brien, 2008).

رادیکال‌های آزاد و در رأس آن‌ها ترکیبات رادیکال‌های فعال اکسیژن، جزء مهمترین عوامل شکل‌گیری استرس اکسیداتیو هستند. تولید بیش از حد رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌تواند به ماکرومولکول‌هایی مانند اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و لیپیدها آسیب برساند و سبب تغییرات ساختمانی و کاهش فعالیتشان گردد، که در نهایت منجر به آسیب بافتی در بیماری‌های مختلف مزمن و دژنراتیو می‌شود (Phaniendra *et al.*, 2015). در مطالعه حاضر، در بررسی میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن بین دو گروه سالم و بیمار، میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن در گروه بیمار بصورت معنی‌داری بیشتر از گروه سالم بود. در بررسی بین گروه‌های مختلف براساس شدت ضایعات پاتولوژیک، هرچند افزایش میزان

رادیکال‌های فعال اکسیژن با شدت ضایعات ارتباط مستقیم داشت ولی اختلاف بین گروه‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۲). همسو با این نتایج، تاثیر افزایش سطح رادیکال‌های فعال اکسیژن در پاتوژنز بیماری تب برفکی در گاو قبلا به اثبات رسیده‌است (Bozukluhan *et al.*, 2013).

به‌طور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزایش سطح سرمی تروپونین I، کراتین کیناز، لاکتات دهیدروژناز، رادیکال‌های فعال اکسیژن و میوگلوبین می‌تواند به طور بالقوه شواهدی جامع در مورد آسیب‌های قلبی در طی تب برفکی در بره‌ها ارائه دهد. افزایش بیومارکرهای قلبی در این مطالعه با شدت و وسعت پاتولوژیک ایجاد شده در قلب حیوانات مبتلا نسبت مستقیم داشت و در موارد ضایعات شدید افزایش این پارامترها بویژه تروپونین I، قابل ملاحظه بود. به نظر می‌رسد، اندازه‌گیری تروپونین I سرم دارای اختصاصیت و حساسیت بالایی برای تشخیص آسیب قلبی در بره‌های مبتلا به تب برفکی است و ممکن است اولین گام مهم در جهت طراحی روش‌های جدید برای تشخیص میوکاردیت ناشی از تب برفکی باشد. در حیواناتی که از نظر بالینی مشکوک به میوکاردیت هستند، گرفتن تاریخچه گله، معاینات بالینی دقیق، علائم کالبدگشایی و اندازه‌گیری تروپونین I، می‌تواند در تشخیص بیماری کمک کننده باشد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه خانم زهرا جعفرنیا (کد پایان‌نامه: ۲۱۹۱۹) در دوره دکتری عمومی دامپزشکی می‌باشد. نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از مسئولان محترم آزمایشگاه پاتولوژی دامپزشکی دانشگاه رازی اعلام می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچگونه تعارض منافع ندارند.

منابع

- Aktas, M.S., Ozkanlar, Y., Oruc, E., Sozdutmaz, I. and Kirbas A. (2015) Myocarditis associated with foot-and-mouth disease in suckling calves. *Veterinarski Arhiv*, 85(3): 273-282.
- Alaour, B., Liew, F. and Kaier, T.E. (2018). Cardiac Troponin - diagnostic problems and impact on cardiovascular disease. *Annals of medicine*, 50(8): 655-665.
- Alexandersen, S. and Mowat, N. (2005). Foot-and-mouth disease: host range and pathogenesis. *Current topics in microbiology and immunology*, 288: 9-42.
- Apple F.S. (2001). Cardiac troponin assays: analytical issues and clinical reference range cutpoints. *Cardiovascular Toxicology*, 1(2): 93-98.
- Aslani, M.R., Mohri, M. and Movassaghi A.R. (2013). Serum troponin I as an indicator of myocarditis in lambs affected with foot and mouth disease. *Veterinary Research Forum*, 4(1): 59-62.
- Basbugan, Y., Agaouglu, Z. and Yuksek, N. (2010). An Investigation on Serum Troponin Concentration in Healthy Ruminants. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 16(4): 641-645.
- Bozukluhan, K., Atakisi, E. and Atakisi, O. (2013). Nitric Oxide Levels, Total Antioxidant and Oxidant Capacity in Cattle with Foot-and-Mouth-Disease. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 19 (1): 179-181.

- Cornelisse, C.J., Schott, H.C., Olivier, N.B., Mullaney, T.P., Koller, A., Wilson, D.V., *et al.* (2000). Concentration of cardiac troponin I in a horse with a ruptured aortic regurgitation jet lesion and ventricular tachycardia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217(2): 231-235.
- Costa, T.N., Cassaro Strunz, C.M., Nicolau, J.C. and Gutierrez, P.S. (2008). Comparison of MB fraction of creatine kinase mass and troponin I serum levels with necropsy findings in acute myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology*, 101(3): 311-314.
- Ding, Y.Z., Chen, H.T., Zhang, J., Zhou, J.H., Ma, L.N., Zhang, L., *et al.* (2013). An overview of control strategy and diagnostic technology for foot-and-mouth disease in China. *Virology Journal*, 10(1): 78-84.
- Fartashvand, M., Derangian, A. and Kaveh, A. (2013). Evaluation of cardiac troponin I alterations in dairy cattle with septicemias. *Veterinary Clinical Pathology*, 7(27): 239-248. [In Persian]
- Fllah, M., Fartashvand, M., Kouchakzadehomran, H. and Kaveh, A. (2016). Evaluation of cardiac injury biomarkers in cattle with acute clinical mastitis. *Veterinary Clinical Pathology*, 10(1): 53-59. [In Persian]
- Ford, I., Shah, A.S., Zhang, R., McAllister, D.A., Strachan, F.E., Caslake, M., *et al.* (2016). High-Sensitivity Cardiac Troponin, Statin Therapy, and Risk of Coronary Heart Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 68(25): 2719-2728
- Gunes, V., Atalan, G., Cital, M. and Erdogan, H.M. (2008). Use of cardiac troponin kits for the qualitative determination of myocardial cell damage due to traumatic reticuloperitonitis in cattle. *The Veterinary Record*, 162(16): 514-517.
- Gunes, V., Ozcan, K., Cital, M., Onmaz, A.C. and Erdogan, H.M. (2010). Detection of myocardial degeneration with point-of-care cardiac troponin assays and histopathology in lambs with white muscle disease. *Veterinary Journal*, 184(3): 376-378.
- Humann-Ziehan, E., Ganter M., Hennig-Pauka, I. and Binder, A. (2007). Trace mineral status and liver and blood parameters in sheep without mineral supply compared to local roe deer (*Copreolus capreolus*) populations. *Small Ruminant Research*, 75(2-3): 185-191
- Jafari Dehkordi, A., Mohebbi, A.N. and Balali Dehkordi, Sh. (2014). Evaluation of dysrhythmias and myocardial biomarkers in high and low-yielding dairy cows. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 8(2): 101-109.
- Jamal, S.M., and Belsham, G.J. (2013). Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Veterinary Research*, 44(1): 116-130.
- Karapinar, T., Dabak, D.O., Kuloglu, T. and Bulut, H. (2010). High cardiac troponin I plasma concentration in a calf with myocarditis. *Canadian Veterinary Journal*, 51(4): 397-399.
- Lim, B.K., Shin, J.O., Choe, S.C., Choi, S. W., Jeong, J.O., Seong, I.W., *et al.* (2005). Myocardial injury occurs earlier than myocardial inflammation in acute experimental viral myocarditis. *Experimental & Molecular Medicine*, 37(1): 51-57.
- Lu, Z., Yu, S., Wang, W., Chen, W., Wang, X., Wu, K., *et al.* (2022). Development of Foot-and-Mouth Disease Vaccines in Recent Years. *Vaccines*, 10(11): 1817-1834.
- O'Brien, P.J. (2008). Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicology*, 245(3): 206-218.
- Reef, V.B. and McGuirk, S.M. (2002). Diseases of the cardiovascular system. In: *Large Animal Internal Medicine*. Smith, B.P. editor. 3rd ed., St. Louis: Mosby Co, pp: 443-478.
- Schwarzwald, C.C., Hardy, J. and Buccellato, M. (2003). High cardiac troponin I serum concentration in a horse with multifocal ventricular tachycardia and myocardial necrosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(3): 364-368.
- Paton, D.J., Gubbins, S. and King, D.P. (2018). Understanding the transmission of foot-and-mouth disease virus at different scales. *Current Opinion in Virology*, 28(6): 85-91.
- Phaniendra, A., Jestadi, D.B. and Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1):11-26.

- Tolouei, M., Daneshvar, A., Tayefi-nasrabadi, H. and Madadgar, O. (2021). Clinical evaluation of the effect of hydroalcoholic extract of *Hypericum perforatum* on the healing of oral lesions of Foot and mouth disease in cattle. *Veterinary Clinical Pathology*, 15(1): 61-73. [In Persian]
 - Tunca, R., Erdogan, M.H., Sozmen, M., Cital M., Devrim, A.K., Erginsoy, S., *et al.* (2009). Evaluation of Cardiac Troponin I and Inducible Nitric Oxide Synthase Expressions in Lambs with White Muscle Disease. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 33(1): 53-59.
 - Tunca, R., Sozmen, M., Erdogan, H., Cital, M., Uzlu, E., Ozen, H., *et al.* (2008). Determination of cardiac troponin I in the blood and heart of calves with foot-and-mouth disease. *Journal of Veterinary Diagnostic*, 20(5): 598-605.
- Turgut, K. (2000). *Veterinary clinic laboratory diagnosis*. Ankara Bahçivanlar Basım Evi. pp, 1143-1153.
- Undhad, V.V., Fefar, D.T., Jivani, B.M., Gupta, H., Ghodasara, D.J., Joshi, B.P., *et al.* (2012). Cardiac troponin: an emerging cardiac biomarker in animal health. *Veterinary World*, 5(8): 508-511.
 - Varga, A., Schober, K. E., Holloman, C.H., Stromberg, P.C., Lakritz, J. and Rings, D.M. (2009). Correlation of serum cardiac troponin I and myocardial damage in cattle with monensin toxicosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(5): 1108-1116.
 - Wong, C.L., Yong, C.Y., Ong, H. K., Ho, K.L. and Tan, W.S. (2020). Advances in the Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 7: 477-501.

Evaluation of relationship between histopathological lesions and cardiac biomarkers changes in lambs with foot and mouth disease

Jafarnia, Z.¹, Hashemnia, M.^{2*}, Nikoosafat, Z.³

1- D.V.M. Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran.

2- Associate Professor, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran.

*Corresponding author's email: m.hashemnia@razi.ac.ir

Abstract

Foot-and-mouth disease produces high mortality in lambs, and the cause of their death is often myocardial injury. ELISA test and molecular methods are among the routine methods for diagnosis of infected animals. Although these methods are very efficient, they are usually expensive and time-consuming, therefore, it is important to use fast and low-cost diagnostic methods. This study was designed to evaluate cardiac biomarkers and their relationship with the severity of histopathologic lesions in the heart of lambs suffering from FMD. 25 diseased lambs that were diagnosed based on ELISA test were selected as the disease group and 25 healthy lambs were used as the control. To determine cardiac biomarkers, blood was collected from infected and healthy animals. After necropsy of the affected lambs, samples of the heart tissue were taken to histopathological studies. The main histopathologic findings were hyaline degeneration, necrosis and infiltration of inflammatory cells, muscular atrophy, vasculitis and congestion in the affected lambs. Mean troponin I, myoglobin and ROS concentrations and CK and LDH activities were significantly higher in FMD cases compared with controls ($p<0.05$). The rate of increase in cardiac biomarkers was directly related to the extent and severity of pathologic lesions. These results showed that the increase in the serum level of these biomarkers can potentially provide comprehensive evidence about cardiac lesions in animals with FMD. The increase in cardiac biomarkers, particularly troponin I, was directly related to the severity pathological lesions. It seems that the assay of serum troponin has high specificity and sensitivity for the diagnosis of cardiac lesions, and together with taking the history of the flock, clinical examinations and necropsy symptoms can help in diagnosing the disease.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Cardiac biomarkers, Foot-and-mouth disease, Histopathological lesions, Lamb.