



فصلنامه زیست‌شناسی جانوری

ISSN:1735-9724

سال نهم، تابستان ۱۴۰۴، دارای نسخه الکترونیک



sanad.iau.ir/journal/ascij



فصلنامه زیست شناسی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

علمی - پژوهشی، سال هفدهم، تابستان ۱۴۰۴

صاحب امتیاز: معاونت پژوهش و فن آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

مدیرمسئول: دکتر هومن شجعی

سر دبیر: دکتر غلامحسین واعظی

مدیر داخلی: دکتر ویدا حجتی

هیأت تحریریه:

دکتر مریم شمس لاهیجانی (استاد)، دکتر نصرالله رستگارپویانی (استاد)، دکتر محمدجعفر گلعلی پور (استاد)، دکتر غلامحسین واعظی (استاد)، دکتر مختار مختاری (استاد)، دکتر شاهرخ پاشایی راد (دانشیار)، دکتر اسکندر رستگارپویانی (استاد)، دکتر مهدی رهنما (دانشیار)، دکتر فرشید کفیل زاده (استاد)، دکتر مهرداد مدرسی (دانشیار)، دکتر عبدالحسین شیروی (دانشیار) و دکتر ویدا حجتی (دانشیار)

ویزاستار: دکتر ویدا حجتی

تنظیم و صفحه آرایی: سمانه مروی زاده

طبق نامه شماره ۸۷/۲۸۶۰۴۴ مورخ ۸۴/۱۲/۲۰ سازمان مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی، فصلنامه زیست شناسی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی

واحد دامغان دارای مجوز انتشار می باشد.

طبق مجوز شماره ۳/۱۸/۱۲۵۳۹۵ مورخ ۹۳/۰۷/۱۴ وزارت علوم، تحقیقات و فناوری حوزه تخصصی مقالات این نشریه **تکوین و فیزیولوژی** می باشد.

طبق مجوز شماره ۳/۱۸/۸۶۵ مورخ ۹۸/۰۱/۱۱ وزارت علوم، تحقیقات و فناوری این مجله دارای رتبه علمی-پژوهشی می باشد.

ISSN : ۱۷۳۵ - ۹۷۲۴

فصلنامه علمی پژوهشی زیست شناسی جانوری در ISC، Magiran، SID و Academia نمایه می گردد.

نشانی: دامغان، یک جاده چشمه علی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، حوزه معاونت پژوهش و فن آوری، دفتر فصلنامه زیست شناسی جانوری

تلفکس: ۰۲۳ - ۳۵۲۲۵۰۵۸

پست الکترونیک: Faslnameh.zist@gmail.com

آدرس الکترونیک: <https://sanad.iau.ir/journal/ascij/>

- ۱ پروار بره‌های با ابعاد دنبه کوچک و مقایسه آنها با دنبه بزرگتر بر عملکرد رشد صفات لاشه بره‌های نژاد گوسفند لری ستودا شمشاد، بهروز یاراحمدی، محسن محمدی ساعی، میرحسن بیرانوند، امین کاظمی‌زاده

- ۱۳ توصیف ویژگی‌های ریخت‌شناسی، کالبدشناسی و کلید شناسایی ماهی سیکلید زندانی (*Amatitlania nigrofasciata*) بابک مقدسی، مهفام سزاوار اردبیلی^۲ درسا حیدری‌فر

- ۲۷ تأثیر سطوح مختلف پپتیدهای زیست‌فعال دانه کینوا بر قابلیت هضم ایلنومی، فعالیت آنزیم‌های کبدی، ریخت‌شناسی و جمعیت میکروبی روده جوجه‌های گوشتی جلیل رضایی، محمدعلی جعفری، کاوه جعفری خورشیدی

- ۴۱ بررسی اثر محصول تجاری **NPN** (نیتروژن غیرپروتئینی) روی گاوهای شیری در شرایط برون‌تنی امین دیندار صفا، مهدی دهقان بنادکی، حامد خلیل‌وندی بهروزیار، مهدی گنج‌خانلو

- ۵۵ اثرات استفاده از اسیدهای چرب امگا-۳، امگا-۶ و مخلوط آن‌ها بر عملکرد، شاخص‌های اسکلتی و سلامت در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین اسماعیل سنگین، علی نیکخواه، محمد چمنی، علی اصغر صادقی، مهدی امین افشار

- ۶۷ اثر بربرین بر پارامترهای اسپرم در ناباروری القا شده توسط واریکوسل در موش‌های صحرایی نر سوگل فمی تفرشی، اکرم عیدی، پژمان مرتضوی، احمد اصغری

- ۷۹ وضعیت مرغداری‌های گوشتی از نظر الگوی پراکندگی باکتری‌های مقاوم/اثرشیا کولی و ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) داریوش بهزادپور، کاوه مدهوش، بهزاد کاویانی، سید محمدرضا طباطبائی‌مهر

- ۹۳ بررسی اثرات سلولی و ملکولی و ضدآپوپتوتیک نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس گیاه درمنه کوهی (*Artemisia aucheri*) بر سلول‌های سرطان تخمدان فرناز ابوطالبی، مریم تیموری

- ۱۰۵ بررسی تأثیر مصرف همزمان منیزیم و ویتامین D به مدت چهار هفته بر کیفیت خواب و ریتم شبانه‌روزی در دانشجویان دانشگاه افسری امام علی (ع) حکمت احسان‌بخش، حمید یوسفی، احسان یوسفعلی‌زاده

اثر بخشی باکتری *Micrococcus luteus* بر روی برخی شاخص های خونی و ایمنی بچه ماهی کپور معمولی

۱۱۵

مهران آوخ کیسمی، علیرضا اکبری، حمید عبدالله پور بی ریا، مریم آوخ کیسمی

القای آپیتوز در دودمان سلولی سرطان تخمدان توسط عصاره گیاه شیرپنیر (*Galium verum*)

۱۲۹

فاطمه کشوری، سمیه عرب زاده، معصومه حسن بارانی، فاطمه اکبریان، شادی حاج رسولیها

اثرات ترکیبی pH و دما بر روی رشد صدف حلزون بین جزرومدی (*Nerita textilis*)

۱۴۳

موسی کشاورز، عبدالعلی حمزه ئی، عماد کوچک نژاد

Research Article

Fattening Lambs with Small Fat Tail Dimensions and Comparing them with Larger Fat Tail on the Growth Performance and Carcass Traits of lambs of Lori Sheep Breeds

Behrouz Yarahmadi*, Mohsen Mohamadi Saei, Mir Hassan Beiranvand, Amin Khazmizadeh

Department of Animal Sciences, Lorestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Iran

*Corresponding author: Behrouzy@gmail.com

Received: 14 September 2024

Accepted: 13 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1183899

Abstract

This study was conducted with the aim of fattening lambs with small fat-tail compared to lambs with large fat-tail on growth performance and carcass traits of lambs of the Lori breed. 30 male lambs were selected based on the size of the tail. The lambs weighing about 30 kg and three months old of weaning were selected and divided into two groups of 15. The experimental group lambs included lambs whose fat-tail width was between 15.5-19.5 cm and fat-tail length 17-22 cm, and the control group included all lambs whose fat-tail width was more than 19.5 cm and fat-tail length was 22 cm. At the period end daily weight gain (ADG), feed intake (FI), and feed conversion ratio (FCR) were measured. At the end of the fattening stage of 90 days, 8 heads from each group of small tail and large fat-tail were weighed and slaughtered and carcass traits were measured. The results showed that the highest ADG in lambs with small fat-tail and 90 days of fattening was 210 grams per day and the lowest ADG was related to lambs with larger fat-tail of 182 g/d. The FCR was better in lambs with small fat-tail compared to lambs with larger fat-tail (7.21 vs. 8.35). The highest carcass efficiency percentage, hot and cold carcass weight, carcass cuts and lean meat percentage were belonging to small fat-tail lambs. In terms of total carcass fat, there was a significant difference between the two groups and small tail lambs had the lowest total carcass fat with 17.29% and large tail lambs had the highest total carcass fat with 23.63%. There was no significant difference between small tail lambs and control lambs in terms of lean meat percentage ($p < 0.05$) and carcass length, bone percentage and eye muscle area ($p > 0.05$). The price of each kilogram of weight gain per feed consumed for lambs with small tails was 13.65% cheaper than lambs with larger tails, and in this sense, they had a higher economic value. Lambs with small fat-tail size are recommended for fattening due to the suitable feed conversion ratio, higher daily weight gain and more suitable carcass traits along with the production cost per kilogram of weight gain and lower carcass.

Keywords: Fattening characteristics, Carcass traits, Feed conversion ratio, Lori lambs, Small fat-tail.



پروار بره‌های با ابعاد دنبه کوچک و مقایسه آنها با دنبه بزرگتر بر عملکرد رشد صفات لاشه بره‌های نژاد گوسفند لری

بهروز یاراحمدی^{*}، محسن محمدی ساعی، میرحسن بیرانوند، امین کاظمی‌زاده

بخش تحقیقات علوم دامی مرکز آموزش و تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج
کشاورزی، خرم‌آباد، ایران

^{*}مسئول مکاتبات: Behrouzy@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۲۴

DOI: 10.60833/ascij.2025.1183899

چکیده

این مطالعه با هدف پروار بره‌های با دنبه کوچک در مقایسه با بره‌های با دنبه بزرگ بر عملکرد رشد و صفات لاشه بره‌های نژاد گوسفند لری انجام شد. تعداد ۳۰ رأس بره نر بر اساس اندازه دنبه انتخاب شدند. بره‌ها با وزن حدود ۳۰ کیلوگرمی و سن سه ماه از شیرگیری، انتخاب و به دو گروه ۱۵ رأسی تقسیم شدند. بره‌های گروه آزمایشی شامل بره‌هایی که عرض دنبه آنها بین ۱۹/۵-۱۵/۵ سانتی‌متر و طول دنبه ۲۲-۱۷ سانتی‌متر بوده و گروه شاهد تمام بره‌هایی که دنبه آنها دارای عرض بیش از ۱۹/۵ سانتی‌متر و طول دنبه ۲۲ سانتی‌متر بودند. در پایان میزان افزایش وزن روزانه، خوراک مصرفی و ضریب تبدیل خوراک اندازه‌گیری شد. در انتهای مرحله پروار ۹۰ روز تعداد ۸ رأس از هر گروه دنبه کوچک و دنبه بزرگ توزین و ذبح شدند و صفات لاشه اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد بالاترین افزایش وزن روزانه در بره‌های با دنبه کوچک با میزان ۲۱۰ گرم در روز و کمترین افزایش وزن روزانه مربوط به بره‌های با اندازه دنبه بزرگتر با میزان ۱۸۲ گرم در روز بود. ضریب تبدیل خوراک در بره‌های با دنبه کوچک در مقابل بره‌های با اندازه دنبه بزرگتر (۷/۲۱ در مقابل ۸/۳۵) وضعیت بهتری داشت. بالاترین راندمان لاشه، وزن لاشه سرد و گرم، درصد قطعات لاشه و درصد گوشت لخم مربوط به بره‌های دنبه کوچک بود. از نظر چربی کل لاشه، بین دو گروه تفاوت معنی‌دار وجود داشت و بره‌های دنبه کوچک با ۱۷/۲۹ درصد کمترین و دنبه بزرگ‌ها با ۲۳/۶۳ درصد بیشترین چربی کل لاشه را داشتند. بین بره‌های دنبه کوچک و بره‌های شاهد از نظر درصد گوشت لخم معنی‌دار ($p < 0/05$) و طول لاشه، درصد استخوان و سطح مقطع عضله راسته معنی‌دار نشد ($p > 0/05$). قیمت هر کیلوگرم افزایش وزن به‌ازای خوراک مصرفی برای بره‌های با دنبه کوچک ۱۳/۶۵ درصد ارزان‌تر از بره‌های با دنبه بزرگتر بوده و ارزش اقتصادی بالاتری داشتند. بره‌هایی با اندازه دنبه کوچک به علت ضریب تبدیل خوراک مناسب، افزایش وزن روزانه بالاتر و صفات لاشه مناسب‌تر به همراه هزینه تولید هر کیلوگرم افزایش وزن و لاشه پائین‌تر جهت پروار قابل توصیه است.

کلمات کلیدی: بره‌های نژاد لری، دنبه کوچک، خصوصیات پرواری، ضریب تبدیل خوراک، صفات لاشه.

مقدمه

داشتن دنبه از ویژگی‌های اکثر گوسفندان از جمله نژادهای بومی ایران است که نقش بیولوژیکی و اصلی آن ذخیره انرژی و استفاده از آن در شرایط محدودیت غذایی است. یکی از مهمترین ذخایر چربی در گوسفند به لحاظ کمیت دنبه است. صرف‌نظر از نژاد زل سایر نژادهای گوسفند در ایران جزو گوسفندان دنبه‌دار

محسوب می‌شوند و رشد دنبه در این نژادها معمولاً نسبت به وزن حیوان قابل توجه می‌باشد. داشتن دنبه از ویژگی‌های اکثر گوسفندان از جمله نژادهای بومی ایران است که نقش بیولوژیکی و اصلی آن ذخیره انرژی و استفاده از آن در شرایط محدودیت غذایی است (۱، ۲، ۳). شرایط اقلیمی، سیستم‌های پرورشی باز و خرید دام بر اساس وزن زنده در سال‌های اخیر تولیدکنندگان گوسفند را در بسیاری از مناطق ناخواسته به دلیل همبستگی بالای وزن دنبه و وزن بدن به سمت انتخاب برای دنبه بزرگتر سوق داده است به طور متوسط ۱۶/۵ درصد لاشه بره‌های پرواری را چربی قابل تفکیک تشکیل می‌دهد که این رقم در گوسفندان بالغ ممکن است تا ۳۵ درصد نیز برسد که از معایب عمده گوشت گوسفند از حیث اقتصاد تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان است (۴، ۵). تولید گوشت با کمیت و کیفیت بالا بدون نیاز به افزایش تعداد دام و دستیابی به سود مناسب در کوتاه‌ترین زمان ممکن، از اهداف اصلی پرواربندی محسوب می‌شود که یکی از عوامل مؤثر جهت رسیدن بدین منظور، مدت پرواربندی است. با مدت پروار ناکافی، وزن دام به حداکثر نرسیده و راندمان پروار کاهش می‌یابد و با طولانی‌شدن دوره پروار، علاوه بر افزایش هزینه پرواربندی به دلیل افزایش ضریب تبدیل غذایی، تجمع چربی در قسمت‌هایی از بدن مثل قلب، زیرپوست، اطراف کلیه‌ها و دستگاه گوارش موجب کاهش کیفیت و بازارپسندی لاشه می‌گردد. مصرف‌کنندگان لاشه با چربی کمتر را می‌پسندند (۶، ۷)؛ بنابراین پرورش نیز باید به سمتی حرکت کند که بتواند لاشه‌هایی با گوشت بیشتر و چربی کمتر تولید و تحویل مصرف‌کننده نماید. بدین ترتیب زیاد بودن درصد دنبه و به‌طور کلی چربی کل لاشه گوسفند سبب کاهش ارزش کیفی آن می‌شود. تنوع وزن و درصد دنبه نسبت به لاشه باعث شده گوسفندانی با

اندازه‌های بدنی یکسان حتی در داخل یک نژاد، درصد دنبه متفاوتی در لاشه‌های مورد بررسی داشته باشند (۸، ۹). افزایش تجمع چربی را سبب نمی‌شود، لذا می‌توان گفت اعمال محدودیت خوراک و رشد جبرانی موجب تولید لاشه‌هایی با درصد فیزیکی چربی کمتر و گوشت لخم یکسان می‌گردد. در بره‌های نر با مصرف جیره‌های با مقدار انرژی و مواد مغذی متفاوت و با دامنه وسیع وزن لاشه گرم، لاشه سرد و بازده لاشه به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۹). دامداران به پرورش بره‌های دنبه بزرگ علاقه‌مند هستند و نمایانگر این واقعیت است که درواقع گوسفندانی را چاق کرده‌اند که بجای تولید گوشت، دنبه را با هزینه بالا تولید نموده‌اند. لذا اگرچه وزن کشتار در این بره‌ها بالا است؛ اما راندمان لاشه به طور محسوسی پائین بوده و علاوه بر آن درصد گوشت لخم نیز پائین است (۱۰، ۱۱). دنبه بره‌های لری دارای سه شکل کاملاً سنگین و افتاده با فراوانی ۴۸ درصد دنبه متوسط با فراوانی ۳۴ درصد و دنبه کوچک و فشرده با فراوانی ۸ درصد در گوسفندان لری شناسایی شد. براین اساس گسترش دنبه به سه صورت، دنبه بالاتر از مفصل خرگوشی ۸۵ درصد، دنبه پایین از مفصل خرگوشی ۴ درصد و دنبه به‌موازات مفصل خرگوشی ۱۱ درصد گزارش شد (۱۲، ۱۳). رشد بافت‌های چربی در دام‌ها یکی از بخش‌های بسیار مهم از مراحل رشد کلیدی بدن محسوب می‌شود. یکی از مهم‌ترین ذخایر چربی در گوسفند به لحاظ کمیت دنبه است (۱۴). در ایران تحقیقات کمی در انتخاب اندازه دنبه به‌عنوان یک صفت برای تأثیر بر عملکرد در نژادهای دنبه‌دار در نظر گرفته شده است. طی پژوهشی، اثر اندازه دنبه روی اضافه وزن روزانه، خوراک مصرفی، ضریب تبدیل خوراک معنی‌دار نشد. بیشترین اضافه وزن روزانه در بره‌های دنبه کوچک با ۱۸۸ گرم و کمترین مربوط به تیمارهای دنبه بزرگ با

۱۷۸ گرم بود. با افزایش طول مدت پروار ضریب تبدیل غذایی افزایش یافت و بره‌های دنبه بزرگ بالاترین ضریب تبدیل غذایی را داشتند (۱۱). خاللداری و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مطالعه‌ای عملکرد رشد و ویژگی‌های لاشه بره‌های لری - بختیاری با سه نوع دنبه بزرگ، متوسط و کوچک را مقایسه کردند. اثر اندازه دنبه روی اضافه‌وزن روزانه، خوراک مصرفی، ضریب تبدیل خوراک معنی‌دار نشد (۶). در مطالعه‌ای روی خصوصیات لاشه سه نژاد دنبه‌دار مصری دریافت، سنگینی دنبه باعث کاهش کیفیت لاشه و افزایش چربی کل بدن می‌شود. براین‌اساس بره‌های دنبه سنگین دارای وزن لاشه گرم بالاتری نسبت به بره‌های دنبه کوچک بوده است (۱۵). تحقیقی نشان داده میزان چربی کل لاشه با افزایش وزن لاشه، بیشتر شده است. بره‌های با وزن کشتار کمتر دارای خصوصیات لاشه بهتری نسبت به بره‌های با وزن بالاتری هستند (۷). رابطه بسیار بالایی بین اندازه‌های دنبه و کل چربی بدن وجود دارد (۱۶). با افزایش طول مدت پروار، ضریب تبدیل غذایی افزایش‌یافته است (۱۱). نگویسی و همکاران در سال ۲۰۰۳ در بررسی روی گوسفندان دنبه‌دار نژاد منز در مراحل مختلف پرواری نتیجه گرفتند، اندازه دنبه اثر معنی‌داری بر روی مراحل مختلف پروار داشته و باعث ذخیره مقدار بیشتری چربی در لاشه بره‌ها می‌شود (۱۷). از طرفی پرورش گوسفند به شکل کنونی باتوجه به افزایش سریع تعداد دام در کشور و همچنین تخریب مراتع آینده نامطمئن دارد. بنابراین لازم است با اعلام سیاست مشخص، برنامه‌ریزی جهت افزایش تولید گوشت قرمز اعلام و به مرحله اجرا درآید. استان لرستان با بیش از ۶/۴ میلیون واحد دامی یکی از مراکز مهم پرورش دام در کشور است و گوسفند نژاد لری تقریباً نیمی از گوسفندان استان را تشکیل می‌دهد. گوسفند لری یکی از نژادهای دنبه‌دار

و سنگین کشور است. وزن دنبه در گوسفند لری برای نرها ۱۰-۸ کیلوگرم و در ماده‌ها ۸-۷ کیلوگرم است. سالیانه در استان لرستان بیش از ۳۲۰ هزار رأس بره نر از نژاد لری و لری بختیاری آماده پرواربندی می‌شوند. این بره‌ها از نظر اندازه دنبه در سه گروه دنبه کوچک، دنبه متوسط و دنبه بزرگ قرار می‌گیرند. این بره‌ها به شیوه‌های سنتی و صنعتی پروار شده و روانه کشتارگاه می‌شوند (۱۸). با توجه به ویژگی‌های مذکور، این نژاد می‌تواند جایگاه ویژه‌ای در برنامه‌های تولید گوشت قرمز کشور داشته باشد و پرورش آن از نظر اقتصادی درآمد خوبی حاصل نماید؛ اما ایراد وارده بر این نژاد، بزرگ‌بودن دنبه آن است؛ لذا چنانچه در مدیریت سعی شود از بره‌هایی با خصوصیات مناسب پروار، جثه بزرگ و درعین‌حال دنبه کوچک استفاده شود، ممکن است این ایراد رفع گردد. با توجه به تنوع گسترده در صفت اندازه دنبه در این نژاد، تدبیر فوق احتمالاً میسر است (۱۱). براین اساس برای کاهش چربی کمتر در لاشه، بایستی دام‌هایی با ابعاد دنبه کوچک‌تر انتخاب شود (۸). اهداف این پروژه شامل پروار کردن بره‌های با دنبه کوچک در مدت پروار ۹۰ روز در مقایسه با بره‌های با دنبه بزرگ بر عملکرد رشد و صفات لاشه بره‌های نژاد گوسفند لری است.

مواد و روش‌ها

برای انجام آزمایش تعداد ۳۰ رأس بره‌ی نر سه‌ماهه با میانگین وزن زنده ۳۰ کیلوگرم از نژاد لری از گله تحت پوشش طرح محوری قوچ لری انتخاب شده و مورد استفاده قرارگرفت. انتخاب بره‌ها بر اساس طول و عرض دنبه به‌صورت گزینش بر اساس فرد انجام شد. این بره‌ها پس از توزین و نصب پلاک گوش وارد برنامه پرواربندی شدند. بره‌ها مدت ۹۰ روز پروار شدند. بره‌های گروه آزمایشی شامل بره‌هایی که عرض دنبه آنها بین ۱۹/۵-۱۵/۵ سانتی‌متر و طول دنبه

۱۷-۲۲ سانتی‌متر بود و گروه شاهد تمام بره‌هایی که دنبه آنها دارای عرض بیش از ۱۹/۵ سانتی‌متر و طول دنبه ۲۲ سانتی‌متر بود. دو هفته اول دوره پرواربندی به عنوان زمان عادت‌پذیری دام‌ها به شرایط محیطی و جیره‌ها در نظر گرفته شد. طی این مدت جیره‌ها کم-کم در اختیار دام‌ها قرار داده شد به طوری‌که از روز پانزدهم به بعد خوراک به اندازه مصرف روزانه (به اضافه ۱۰ درصد بیش‌تر) در آخور بره‌ها ریخته شد. در همین زمان عادت‌پذیری، داروی ضد انگل داخلی به شکل سوسپانسیون توسط مایع خوران به بره‌ها داده شد و دو هفته بعد از آن تکرار گردید. باتوجه به سرعت رشد و وزن شروع پروار بره‌ها، جیره بر اساس جداول احتیاجات غذایی نشخوارکنندگان کوچک (NRC, 2007) تهیه شد (۱۹). نسبت کنسانتره به علوفه در سه مرحله از پروار متغیر در نظر گرفته شد و به این ترتیب سه جیره از نظر ترکیب فیزیکی و شیمیایی در طول دوره برای هر یک از گروه‌ها ساخته شد و در طول ماه‌های یک، دو و سه، بره‌ها با جیره‌ها تغذیه شدند (جدول ۱). جیره دام‌ها به صورت هفتگی تهیه و روزانه در دو وعده صبح و عصر در ساعت‌های ۸ صبح و ۱۶ بعدازظهر با مقدار مشخص برای هرکدام از تیمارها در اختیار دام‌ها قرار می‌گرفت. دام‌ها به صورت مداوم به آب تمیز و سنگ نمک دسترسی داشتند. باقیمانده هر خوراک روزانه قبل از عرضه وعده خوراک جمع‌آوری و توزین شد. در طی آزمایش در دو وعده غذا به نحوی در اختیار دام‌ها قرار می‌گرفت که هر روز حدود ۱۵-۱۰ درصد از خوراک روز قبل در آخورها باقی بماند. در هنگام تهیه خوراک علوفه و کنسانتره توزین شده به صورت کاملاً مخلوط در اختیار دام‌ها قرار می‌گرفت. بره‌ها قبل از شروع آزمایش با ترازوی دیجیتال توزین شده و این وزن به عنوان وزن شروع پروار در نظر گرفته شد. پس از آن توزین دام‌ها هر ماه یکبار انجام شد

به طوری‌که آخرین وزن‌کشی در پایان روز ۹۰ آزمایش صورت گرفت. خوراک مصرفی به صورت روزانه توزین شده و سپس در اختیار دام‌ها قرار می‌گرفت. باقیمانده خوراک پس از جمع‌آوری و توزین از خوراک داده شده کسر گردیده و از تقسیم خوراک مصرف شده به اضافه وزن زنده در پایان هر بار توزین دام‌ها، ضریب تبدیل خوراک محاسبه گردید. هزینه تولید هر کیلوگرم افزایش وزن به ازای خوراک مصرفی از ضرب قیمت هر کیلوگرم خوراک (ریال) در ضریب تبدیل خوراک محاسبه شد. همچنین وزن کشتار، راندامان لاشه، وزن دنبه، وزن لاشه گرم، وزن لاشه سرد، وزن گوشت لخم، وزن چربی کل لاشه، درصد گوشت لاشه، درصد چربی داخلی و درصد استخوان، هزینه تولید هر کیلوگرم لاشه و هزینه تولید هر کیلوگرم گوشت لخم اندازه‌گیری شد. در انتهای مرحله پروار ۹۰ روز تعداد ۸ رأس از هر گروه دنبه کوچک و دنبه بزرگ توزین و ذبح شدند. نیم لاشه چپ بر اساس روش ایرانی به قسمت‌های مختلف گردن، سردست، راسته، سینه و قلوه‌گاه، ران و دنبه برش داده شد. پس از تقسیم نیمه لاشه چپ به شش قسمت مذکور، بافت گوشت، چربی زیرجلدی و استخوان آنها جدا و پس از توزین با ترازوی دیجیتالی ثبت گردید. سطح مقطع عضله راسته بین دنده ۱۲ و ۱۳ با استفاده از کاغذ شفاف رسم و سپس به وسیله دستگاه، پلانی متر اندازه‌گیری شد، طول لاشه به وسیله متر پارچه‌ای اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون t برای مقایسه میانگین دو گروه (T-test مستقل) توسط نرم‌افزار SAS 2003 آنالیز شدند. در تمام آزمون‌ها سطح حداکثر احتمال قابل قبول برای خطای نوع اول ۵ درصد در نظر گرفته شد. برای آزمون یکنواختی واریانس گروه‌ها از آزمون لوون استفاده شد. F تست لوون برای کلیه صفات مورد آنالیز معنی‌دار نشد.

جدول ۱- اقلام مواد خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره (درصد ماده خشک)

Table 1. Food items and chemical compounds of the experimental diet (percentage of dry matter)	
Food items	Amount in ration (percentage)
Alfalfa	30.6
Wheat straw	9.4
Barley	24.8
Corn grain	12.6
Wheat bran	11.9
Soybean meal	7.7
Mineral-vitamin supplement ¹	0.5
Salt	0.3
Sodium Bicarbonate	1.1
Carbonate Calcium	1.6
Chemical composition	
Metabolizable energy (megacal/kg MD)	2.58
Crude protein (percent)	14.6
Calcium (percent)	0.74
Phosphorus (percent)	0.42
NDF (percent)	43.56

¹هر کیلوگرم از این مکمل حاوی: ۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D و ۰/۱ گرم ویتامین E است. هر کیلوگرم از این مکمل حاوی: ۱۸۰ گرم کلسیم، ۹۰ گرم فسفر، ۲۰ گرم منیزیم، ۶۰ گرم سدیم، ۲ گرم منگنز، ۳ گرم آهن، ۰/۳ گرم مس، ۳ گرم روی، ۰/۱ گرم کبالت، ۰/۱ گرم سلنیوم، ۰/۱ گرم ید و ۳ گرم آنتی‌اکسیدان است.

¹Each kilogram of the supplement contains: 500,000 international units of vitamin A, 100,000 international units of vitamin D and 0.1 gram of vitamin E. Each kilogram of the supplement contains: 180 grams of calcium, 90 grams of phosphorus, 20 grams of magnesium, 60 grams of sodium, 2 grams of iron, 0.3 grams of copper, 3 grams of zinc, 0.1 grams of cobalt, 0.1 grams of selenium, 0.1 grams of iodine, 3 grams of antioxidants.

نتایج

عملکرد رشد: نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش فوق در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس اطلاعات موجود در جدول دو بین بره‌های دنبه کوچک و بره‌های شاهد از نظر افزایش وزن روزانه (۱۹۶/۹۳ و ۱۸۹/۴۹ گرم در روز)، افزایش وزن به‌دست‌آمده در کل دوره پرورش (۱۸/۹۲ و ۱۶/۳۸ کیلوگرم) و وزن نهایی بره‌ها (۴۹/۰۲ و ۴۵/۸۳ کیلوگرم) در کل دوره پرورش اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.05$). نتایج نشان داد بین میزان خوراک مصرفی روزانه بره‌های دنبه کوچک و بره‌های شاهد (۱۵۱۴ و ۱۵۱۹ گرم در روز) در کل دوره پرورش اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$). میانگین ضریب تبدیل خوراک بین بره‌های دنبه کوچک و بره‌های شاهد (۷/۲۱ و ۸/۳۵) نشان داد که در کل دوره پرورش اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.05$). از لحاظ

هزینه تولید هر کیلوگرم وزن زنده به‌ازای خوراک مصرفی بین بره‌های دنبه کوچک و بره‌های شاهد تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($p < 0.05$) (جدول ۲). **صفات لاشه:** جدول شماره سه میانگین صفات لاشه در بره‌ها لری را نشان می‌دهد. بر اساس اطلاعات موجود در جدول سه، بین بره‌های دنبه کوچک و بره‌های شاهد بر وزن خالی بدن، لاشه گرم و سرد معنی‌دار بود ($p < 0.05$). بیشترین وزن خالی بدن، لاشه گرم و سرد به ترتیب با ۴۵/۱۶، ۲۴/۵۲ و ۲۳/۱۸ کیلوگرم در بره‌های دنبه کوچک بود (جدول ۳). بین بره‌های دنبه کوچک و بره‌های شاهد از نظر راندمان لاشه معنی‌دار شد ($p < 0.05$). به‌طوری‌که بره‌های با دنبه کوچک با ۴۷/۲۸ درصد بیشترین راندمان و بره‌های دنبه بزرگ، کمترین راندمان لاشه را داشتند. میانگین وزن دنبه، درصد دنبه نسبت به لاشه

سرد در بین دو گروه معنی‌دار شد ($p < 0.05$). کمترین وزن دنبه مربوط به بره‌های دنبه کوچک با ۳/۷۸ کیلوگرم و بیشترین وزن دنبه به بره‌های دنبه بزرگ با ۴/۷۵ کیلوگرم بود (جدول ۲). کمترین درصد دنبه نسبت به لاشه سرد مربوط به گروه دنبه کوچک با ۱۶/۳۱ درصد و بیشترین آن مربوط به گروه دنبه بزرگ با ۲۲/۲۵ درصد بود. از نظر چربی کل لاشه، بین دو گروه تفاوت معنی‌دار وجود داشت و بره‌های دنبه کوچک با ۱۷/۲۹ درصد کمترین و دنبه بزرگ‌ها با ۲۳/۶۳ درصد بیشترین چربی کل لاشه را داشتند (جدول ۲). بین بره‌های دنبه کوچک و بره‌های شاهد از نظر درصد گوشت لخم معنی‌دار ($p < 0.05$) و طول لاشه، درصد استخوان و سطح مقطع عضله راسته معنی‌دار نشد ($p > 0.05$). از لحاظ هزینه تولید لاشه و گوشت لخم بین بره‌های دنبه کوچک و بره‌های شاهد تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($p < 0.05$). (جدول ۳).

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار فراسنجه‌های دو گروه بره‌های شاهد و دنبه کوچک بر عملکرد رشد بره‌های نژاد لری

Table 2. The mean and standard deviation of parameters of two groups of control lambs and small tail lambs on growth performance and lambs of Lori breed

Characteristics	Control lambs standard deviation	Small tail lambs standard deviation	t- test	P-Value
Initial weight (kg)	29.45 (1.03)	30.11 (1.05)	1.12	0.086
Final weight (kg)	45.83 (1.84)	49.02 (1.71)	1.92*	0.036
Average food consumption during the whole period (g/day)	1519 (16.32)	1514 (15.25)	1.39	0.093
The average Feed conversion ratio (FCR) in the whole period	8.35 (0.37)	7.21 (0.32)	2.02*	0.019
Average daily gain (g)	182 (6.52)	210 (5.05)	2.25*	0.013
Weight gain in the whole period(kg)	16.38 (1.62)	18.92 (1.58)	1.96*	0.043
The price of each kilogram of weight gain per feed intake (Rial)	694586 (13956)	599757 (13872)	2.61*	0.012

* significant difference ($p < 0.05$).

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار فراسنجه‌های دو گروه بره‌های شاهد و دنبه کوچک بر خصوصیات لاشه بره‌های نژاد لری

Table 3. The mean and standard deviation of parameters of two groups of control lambs and small tail lambs on carcass characteristics lambs of Lori breed

Characteristics	Control lambs (standard deviation)	Small tail lambs (standard deviation)	t- test	P-Value
Final weight (kg)	45.83 (1.04)	49.02 (1.01)	1.92*	0.036
Empty body (kg)	40.25 (1.11)	45.16 (1.09)	1.98*	0.032
Hot carcass (kg)	22.15 (0.75)	24.52 (0.77)	2.01*	0.034
Cold carcass (kg)	21.11 (0.71)	23.18 (0.67)	2.03*	0.022
Carcass total fat without tail fat (kg)	1.38 (0.13)	0.985 (0.11)	1.83*	0.042
Carcass efficiency percentage	46.06 (0.35)	47.28 (0.38)	1.93*	0.039
Tail fat (kg)	4.75 (0.31)	3.78 (0.33)	1.83*	0.042
Tail fat percentage to cold carcass	22.25 (1.21)	16.31 (1.16)	2.13*	0.012
Total fat percentage	23.63 (1.14)	17.29 (1.17)	2.09*	0.017
Lean percentage	53.12 (1.32)	58.77 (1.41)	2.13*	0.011
Bone percentage	23.25 (1.01)	23.94 (1.03)	1.03	0.092
Eye muscle area (cm ²)	14.53 (1.08)	14.87 (1.13)	1.06	0.097
Carcass lenght (cm)	47.61 (1.05)	48.05 (1.03)	0.93	0.122
Cost per kg of carcass	1508002 (754600)	1268521 (859000)	2.15*	0.012
Cost per kg of lean meat	2838859 (198754)	2158450 (182456)	2.13*	0.011

بحث

در میزان اضافه‌وزن روزانه و وزن نهایی بین تیمارهای آزمایشی در کل دوره پرورش از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود داشت. یاراحمدی و همکاران گزارش کردند بیشترین افزایش وزن روزانه مربوط به بره‌های با دنبه کوچک با میزان ۲۰۷ گرم و کمترین آن مربوط به تیمارهای دنبه بزرگ با ۱۶۸ گرم در روز بوده و بین تیمارها بر اساس اندازه دنبه از نظر افزایش وزن روزانه تفاوت معنی‌دار وجود داشت. یافته‌های به‌دست‌آمده توسط یاراحمدی و همکاران در سال ۲۰۱۷ با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشته ولی با گزارش خاللداری در بره‌های نژاد شال مطابقت ندارد (۲۰). براین‌اساس تا زمان پروار ۹۰ روز برای بره‌های دنبه کوچک، افزایش وزن روزانه مناسب در سرعت رشد مشاهده گردید. در مورد گروه دنبه بزرگ این کاهش رشد به علت افزایش میزان ذخیره چربی و کاهش نسبی پروتئین و آب بدن است، زیرا بافت عضلانی بدن زودتر از بافت چربی تکمیل می‌شود؛ لذا با طولانی‌شدن مدت پروار، مقدار انرژی بیشتری به شکل ذخیره چربی در بدن ابقا می‌شود (۱۷). تغییر جهت مواد مغذی به سمت ذخیره چربی در بدن سبب نامطلوب شدن ضریب تبدیل غذایی و کاهش سرعت رشد می‌گردد زیرا برای تولید چربی نسبت به عضله در بدن مواد مغذی بیشتری مصرف می‌گردد بخصوص بافت عضلانی دارای میزان آب بالایی است که در سرعت رشد و کاهش هزینه تأثیرگذار است (۸). معمولاً با افزایش سن دام‌ها، مقدار خوراک مصرفی افزایش می‌یابد که دلیل آن افزایش وزن زنده و در نتیجه افزایش احتیاجات غذایی دام است. نتایج حاصله از خوراک مصرفی برای بره‌های شاهد و بره‌های با دنبه کوچک با نتایج یاراحمدی و همکاران در سال ۲۰۱۷ برای بره‌های نر لری با سه گروه دنبه کوچک، متوسط و بزرگ که بین گروه‌های فوق

تفاوت معنی‌دار وجود نداشته، همخوانی داشت (۱۱). همچنین چگنی و همکاران در سال ۲۰۰۶ برای بره‌های نر لری به نتایج مشابهی دست یافت (۱۲). معنی‌دار نشدن میزان مصرف خوراک بین تیمار شاهد و تیمار آزمایشی می‌تواند بیانگر این مسئله باشد که جیره برای دو گروه شاهد و آزمایشی، مواد مغذی را از نظر انرژی و پروتئین به طور مشابه و در برای رشد و افزایش وزن زنده بره‌های دو گروه فراهم کرده است. نتایج جدول ۲ نشان داد بین بره‌های با دنبه کوچک و شاهد به لحاظ ضریب تبدیل خوراک اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. ضریب تبدیل غذایی تابعی از میزان خوراک مصرفی به افزایش وزن بدن است. ضریب تبدیل خوراک از جمله صفاتی است که تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای در بازده اقتصادی پرواربندی دام به‌ویژه بره‌های پرواری دارد. علاوه بر سن دام، میزان ضریب تبدیل خوراک به کیفیت جیره و اجزای تشکیل‌دهنده‌ی آن نیز بستگی دارد (۹، ۱۰). یافته‌های این تحقیق با نتایج یک گزارش برای بره‌های نر لری که کمترین ضریب تبدیل خوراک را برای بره‌های با اندازه دنبه کوچک گزارش نمودند (۱۱)، همخوانی داشت. نگووسی و همکاران در سال نتیجه گرفتند اندازه دنبه اثر معنی‌داری بر روی مراحل مختلف پروار داشته و باعث ذخیره مقدار بیشتری چربی در لاشه بره‌ها می‌شود (۱۷). از جمله دلایل مهم زیاد شدن ضریب تبدیل خوراک، متوقف شدن رشد عضلانی و افزایش ذخیره چربی در بدن است به طوری که ذخیره هر واحد چربی در بدن، چندین برابر پروتئین نیاز به انرژی دارد. لذا افزایش ذخیره چربی تابعی از میزان خوراک مصرفی بوده و این موضوع باعث می‌شود در طول مدت پروار بیشتر، اندازه دنبه بزرگ‌تر موجب افزایش چربی شود. با توجه به اینکه بیشترین راندمان لاشه، لاشه گرم و سرد به ترتیب با ۴۷/۲۸ درصد،

۲۴/۵۲ و ۲۳/۱۸ کیلوگرم در بره‌های دنبه کوچک بدست آمد (جدول ۳). در مجموع یافته‌های به‌دست‌آمده در مورد وزن لاشه گرم و سرد در این تحقیق با برخی نتایج دیگر محققین شامل طالبی در سال ۲۰۰۲ و ۲۰۱۳، فرزاد در سال ۱۹۹۶، یاراحمدی و همکاران در سال ۲۰۱۷ و طالبی و ادریس در سال ۲۰۰۲ مطابقت دارد (۵، ۱۰، ۱۱، ۲۱، ۲۲). همچنین یاردیمشی و همکاران در سال ۲۰۰۸ برای تعیین خصوصیات لاشه در بره‌های اکرامان بر اساس اندازه دنبه، میانگین وزن لاشه سرد را ۱۹/۸ کیلوگرم و درصد راندمان لاشه را ۴۸/۴ درصد گزارش کرد (۷). راندمان لاشه از معیارهایی است که بین نژادها و مراحل مختلف پروراندی دارای تغییرات زیاد بوده و بهبود این نسبت به‌عنوان یک هدف مطلوب به شمار می‌رود. بازده لاشه بره‌های نر نژاد لری بختیاری و آمیخته (سنجابی × لری بختیاری) در دوره پروار ۸۰ روزه به ترتیب ۴۷/۵ و ۴۸ درصد گزارش شده است (۲۲). در مطالعه‌ای روی بره لری بختیاری پروار شده، میزان بازده لاشه ۴۷ درصد گزارش شده است (۵). همچنین طی مطالعه‌ای راندمان لاشه گوسفند لری ۴۷/۱۹ درصد گزارش شده است (۱۲). نتایج مطالعه حاضر با نتایج چگنی و همکاران برای گوسفند لری، طالبی و ادریس، عبدالمنعم، وطن‌خواه و طالبی برای گوسفند لری بختیاری، موسوی و همکاران در بره‌های افشاری و نوراللهی در بره‌های ترکی - قشقایی مطابقت دارد (۵، ۸، ۹، ۱۵، ۱۲، ۲۳)، اما با نتایج خالدار و همکاران در بره‌های شال متناقض می‌باشد (۲۰). راندمان لاشه حاصل در این بررسی در مقایسه با راندمان لاشه گزارش‌شده برای سایر نژادهای ایرانی نشان می‌دهد که راندمان لاشه در بره‌های نر ترکی - قشقایی، بلوچی بیشتر از گوسفند لری می‌باشد. اختلاف جزئی در خصوص راندمان لاشه در مطالعه حاضر و مقادیر گزارش‌شده برای نژاد لری را می‌توان

به اختلاف در ترکیب دام‌های کشتار شده، نحوه پرورش، مرحله رشد و اختلافات انفرادی در داخل این نژاد نسبت داد. کمترین وزن دنبه مربوط به بره‌های دنبه کوچک با ۳/۷۸ کیلوگرم و بیشترین وزن دنبه به بره‌های دنبه بزرگ با ۴/۷۵ کیلوگرم بود (جدول ۲). کمترین درصد دنبه نسبت به لاشه سرد مربوط به گروه دنبه کوچک با ۱۶/۳۱ درصد و بیشترین آن مربوط به گروه دنبه بزرگ با ۲۲/۲۵ درصد بود. از نظر چربی کل لاشه، بین دو گروه تفاوت معنی‌دار وجود داشت و بره‌های دنبه کوچک با ۱۷/۲۹ درصد کمترین و دنبه بزرگ‌ها با ۲۳/۶۳ درصد بیشترین چربی کل لاشه را داشتند (جدول ۲). مطالعات انجام‌شده بر روی وزن و درصد دنبه نسب به لاشه در سایر نژادهای ایرانی نشان می‌دهد که درصد دنبه نسب به لاشه در بره‌های بختیاری، مهربانی و قزل، مغانی و ورامینی تقریباً مشابه یا کمی بیشتر از درصد دنبه نسب به لاشه گوسفند لری می‌باشد (۲۰). مطالعات منافی آذر و همکاران در سال ۲۰۰۵ در نژادهای شال و زندی و همچنین کیانزاد در سال ۲۰۰۵ در نژادهای شال و کلکوهی، درصد دنبه کمتری نسبت به نژاد لری را نشان می‌دهند (۲۴). در این میان مطالعه دانیالی در سال ۱۹۹۶ در مورد گوسفند سنجابی درصد بالاتری نسبت به نژاد لری گزارش‌شده است (۲۵). عطایی و بن حمود در سال ۲۰۰۴ در تحقیقی بین اندازه دنبه و ترکیبات لاشه در گوسفندان دنبه‌دار بربرین نتیجه گرفتند رابطه بسیار بالایی بین اندازه دنبه و کل چربی بدن وجود دارد (۱۶). تنوع وزن و درصد دنبه نسبت به لاشه در نژادهای مختلف را می‌توان به تنوع بسیار بالا در دام‌های مورد آزمایش از نظر شرایط پروار و درجه چاقی نسبت داد. این موضوع باعث شده گوسفندانی با اندازه‌های بدنی یکسان حتی در داخل یک نژاد، درصد دنبه متفاوتی در لاشه‌های مورد بررسی داشته باشند. در مجموع با

توجه به میانگین درصد کل چربی لاشه با ۳۵/۶ درصد در گوسفندان ایرانی دنبه‌دار که توسط خالداری در سال ۲۰۰۹ گزارش شده، گوسفند لری دارای یکی از نژادهای با چربی کل لاشه متوسط در بین نژادهای ایرانی می‌باشد (۲۰). برخی از نتایج حاصل از تحقیقات در مورد چربی کل لاشه در بره‌های لری بختیاری و بره‌های بلوچی، با نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه تا حدودی مشابهت دارد (۵، ۲۱، ۲۲). بر این اساس چنین می‌توان نتیجه گرفت که گوسفند نژاد لری با دنبه کوچک درصد چربی کل لاشه و درنهایت چربی کل کمتری نسبت به گروه دنبه بزرگ داشته و افزایش درصد چربی کل لاشه موجب افزایش چربی کل دام می‌شود. مقدار زیادی از این افزایش مربوط به افزایش میزان چربی قابل تفکیک (چربی عضلانی و احشایی) به همراه افزایش حجم و ابعاد دنبه می‌باشد (۸، ۱۷). میزان درصد گوشت لخم در بره‌های دنبه کوچک و بره‌های شاهد به ترتیب ۵۸/۷۷ و ۵۳/۷۲ درصد بود (جدول ۳). نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر در مورد درصد گوشت لخم و استخوان نشان داد که نسبت به نتایج چگنی و همکاران در سال ۲۰۰۶ و دالوند و همکاران در سال ۲۰۱۹ در گوسفند نژاد لری (برای درصد گوشت لخم و استخوان) و کیانزاد در سال ۲۰۰۵ در گوسفندان مغانی و ماکویی (برای درصد گوشت لخم) مطابقت داشته (۱۲، ۱۳، ۲۶) اما با نتایج خالداری در سال ۲۰۰۹ برای میانگین درصد گوشت لخم و استخوان برخی نژادهای ایرانی و دانیالی در سال ۱۹۹۶ در نژاد سنجابی بیشتر می‌باشد (۲۰، ۲۵). تحقیق دیگری نشان داده که آمیخته‌گری بره‌های رومانف × لری بختیاری (F1RL)، وزن شیرگیری و شش ماهگی و ترکیب لاشه را بهبود بخشیده است (۲۷). دلیل تفاوت مذکور احتمالاً مربوط به اختلاف در دوره مدت پرورار و وزن کشتار بره‌ها می‌باشد. میانگین قیمت خوراک در زمان

آزمایش ۸۳۱۸۴ ریال بود. هزینه هر کیلوگرم افزایش وزن برای بره‌های با اندازه دنبه بزرگتر، بیشترین قیمت (۶۹۴۵۸۶ ریال) را داشته درحالی‌که بره‌های با دنبه کوچک (۵۹۹۷۵۷ ریال) بوده و قیمت هر کیلوگرم افزایش وزن بره‌های آزمایشی ۹۴۸۲۹ ریال ارزان‌تر از بره‌های پرورش متعارف دامدار بود. براین‌اساس بره‌های با دنبه کوچک ۱۳/۶۵ درصد، قیمت هر کیلوگرم افزایش وزن کمتری نسبت به شاهد داشت و ارزش اقتصادی بالاتری داشت. هزینه تولید هر کیلوگرم لاشه و گوشت لخم بره‌های با دنبه کوچک به ترتیب ۲۳۹۴۸۱ ریال (۱۵/۸۸ درصد) و ۶۸۰۴۰۹ ریال (۲۳/۹۷) نسبت به بره‌های با اندازه دنبه بزرگتر کمتر بود.

نتیجه‌گیری

با توجه به قیمت‌های فعلی برای مواد خوراکی و لاشه، دامداران تمایل به پرورار بره‌ها با دنبه بزرگتر داشته که دلیل این امر افزایش وزن زنده در دام‌های پروراری بوده که سبب افزایش ذخیره چربی و وزن لاشه، کاهش درصد گوشت لخم، زیاده‌شدن ضریب تبدیل غذایی و درنهایت عدم رضایت مصرف‌کننده به دلیل کاهش کیفیت لاشه و افزایش وزن دنبه در لاشه می‌شود. این موضوع باعث شده پرورار بره‌های با اندازه دنبه بزرگتر برای پرورار در شرایط کمبود خوراک قابل توصیه نباشد، زیرا هزینه تولید یک کیلوگرم افزایش وزن زنده به‌ازای هزینه تولید هر کیلوگرم لاشه و گوشت لخم، نسبت به بره‌های با دنبه کوچک دارای اختلاف قیمتی بسیار بالایی است. علاوه بر این بره‌های دنبه بزرگ، ضریب تبدیل غذایی در حدود ۷/۵ تا ۸ کیلوگرم داشته باشند؛ لذا باتوجه‌به اینکه حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد هزینه‌های تولید در پرورابندی بستگی به تغذیه دارد، این امر می‌تواند از نظر توجیه اقتصادی برای تولیدکننده دارای اهمیت

7. Yardimci M. Estimation of carcass composition and fat depots by means of subcutaneous adipocyte area and body and tail measurements in fat-tailed Akkaraman lambs. *S Afr J Anim Sci.* 2008; 38:282-289.

8. Mohapatra A, Shinde AK. Fat-tailed sheep-an important sheep genetic resource for meat production in tropical countries: an overview. *Indian J Small Rumin.* 2018; 24(1):1-17.

9. Vatankhah M, Talebi MA. Genetic parameters of body weight and fat-tail measurements in lambs. *Small Rumin Res.* 2008;75:1-6.

10. Talebi MA. Phenotypic changes of fat in Lori-Bakhtiari fat-tailed sheep. *Macedonian J Anim Sci.* 2013;3(2):153-158.

11. Yarahmadi B, Mohammadi Saie M, Chegeni A. Effect of fattening period and fat-tail size fattening performance and carcass characteristics of male Lori lamb. *Appl Anim Sci J.* 2017;26:47-58.

12. Chegni AR, Yarahamdi B, Mansouri H. Comparison of the efficiency and characteristics of Lori lamb carcass in the conditions before entering the pasture, after leaving the pasture and fattening. *Proceedings of the Second Congress of Animal and Aquatic Sciences of the Country.* 2006; pp:66-68.

13. Dalvand M, Banabazi M, Sadeghi Panah A, Chegni AR, Vatankhah M, Yarahamdi B. Registration and monitoring of Lori sheep population. Final report of research project, No. Frost 57927, Agricultural Research, Education and Promotion Organization. 2019.

14. Papi N. Effect of ram on growth performance and biometrics indicators of Shall male lambs in Qazvin province. *J Anim Environ.* 2019;11(3):29-34.

15. Abdel-Moneim AY. Use of live body measurements for prediction of body and carcass cuts weights in three Egyptian

باشد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، بره‌هایی با اندازه دنبه کوچک، به علت ضریب تبدیل خوراک مناسب و افزایش وزن روزانه بالاتر به همراه هزینه تولید هر کیلوگرم افزایش وزن و لاشه پائین‌تر جهت پرور قابل توصیه می‌باشد.

منابع

1. Hosseini Vardanjani SM, Miraei-Ashtiani SR, Pakdel A, Moradi Shahrehabak H. Selection and validation of parameters in multiple linear and principal component regression for prediction fat-tail weight. *J Anim Sci.* 2014;27(104):91-100.

2. Papi N, Azizi A, Pasandideh R, Rashedi Dehsahraei A, Sharifi A. Comparison of growth performance of Shall male lambs from inbreeding and outbreeding in Qazvin region flocks. *J Breed Improv Livestock.* 2021;1(2):19-29 .

3. Vatankhah M, Moradi Shahrababak M, Nejati Javaremi A, Miraei-Ashtiani SR, Vaez-Torshizi R. A Study of external fat-tail dimensions and their relationships with fat-tail weight in Lori-Bakhtiari breed of sheep. *J Crop Prod Process.* 2006; 10(3):445-456.

4. Kazemian H, Hasni S, Samadi F, Mohammadi A. Examining the appearance dimensions of tail and the effect of environmental factors on fat tail traits in Khorasan Kurdi sheep. *The 6th National Innovation Conference in Agriculture, Animal Sciences and Veterinary Medicine, Tehran,* 2022.

5. Talebi MA, Edriss MA. Effect of fattening period on growth and carcass characteristics in Lori-Bakhtiari male lambs. *J Agric Nat Resour Sci.* 2002; 2:153-167.

6. Khaldari M, Azarfar A, Pahlavan R. The size of fat tail does not have an effect on growth performance and carcass characteristics in Lori-Bakhtiari lambs. *Small Rumin Res.* 2020;187:106088.

22. Talebi MA. Selection for a Reduction in Fat-Tail Size in Lori-Bakhtiari Sheep. *Iran J Anim Sci.* 2002;43(3):401-411.
23. Nourullahi J. The effect of fattening period on the growth and carcass characteristics of Turkish Qashqai male lambs. *J Res Construct.* 2007;75:132-137.
24. Manafi Azar Q, Emamjomeh Kashan N, Salehi A, Afzalzadeh A. Investigating the growth and carcass characteristics of lambs resulting from the crossbreeding of the Zandi breed with Zel. *Res Construct.* 2005;38:56-60.
25. Daniyali A. Investigating the effects of different levels of energy and protein on the growth characteristics and quality and quantity of Sanjabi male lamb carcasses. Master's Thesis, University of Tehran. 1996.
26. Kianzad MR. Comparison of carcass composition of Iranian fat-tailed sheep. *Asian-Australian J Anim Sci.* 2005;18(9): 1348-1352.
27. Talebi MA, Miraei Ashtiani SR, Moradi Shahrababak M, Nejati Javaremi A. Relationship between growth and carcass traits in Lori-Bakhtiari. *J Anim Sci.* 2008; 39(1):29-37.
- breeds of sheep. *Egypt J Sheep Goat Sci.* 2009;4:17-32.
16. Attai N, Ben-Hamoud M. Relationships among carcass composition and tail measurements in fat-tailed Barbarine sheep. *Small Rumin Res.* 2004; 53:151-155.
17. Negussie E, Rottmann OJ, Pirchner F, Rege JEO. Patterns of growth and partitioning of fat depots in tropical fat-tailed Menz and Horro sheep breeds. *Meat Sci.* 2003;64(4):491-498.
18. Deputy for the Improvement of Livestock Products in Lorestan Province. Report on the performance of the Deputy of Livestock Affairs of Lorestan province in 2022. Agricultural Jihad Organization of Lorestan Province. 2022.
19. NRC. Nutrient Requirements of Lamb. 7th ed, National Academy Press. Washington, DC. 2007.
20. Khaldari M. Challenges and strategies of sheep carcass quality in Iran. The first seminar on improving the quality and quantity of livestock and poultry carcasses, University of Tehran. 2009.
21. Farzad A. Investigating the effect of live weight on carcass quality of Balochi fattening male lambs. Proceedings of the First Sheep and Goat Research Seminar, Iran's Animal Science Research Institute. 1996; pp:44-53.

Research Article

Description of the Morphologic, Anatomic and Key Characteristics of the Convict Cichlid (*Amatitlania nigrofasciata*)

Babak Moghaddasi^{1*}, Mahfam Cezawar Ardebily², Dorsa Heidarifar²

1- Department of Natural Resources, Savadkooh Branch, Islamic Azad University, Savadkooh, Iran

2- Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author: babak_moghaddasi@yahoo.com

Received: 2 March 2025

Accepted: 13 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1200918

Abstract

The morphological characteristics and anatomical features of the convict cichlid fish (*Amatitlania nigrofasciata*) were examined to describe the species and provide its identification Key. Based on standard ichthyological methods 50 adult specimens were analyzed. External traits (body shape and color, fin types, scales, lateral line, mouth and teeth), meristic features (fin rays, scales above, below, and on the lateral line, gill rakers, and vertebrae), and morphometric characteristics (total length, standard length, head length, and body proportion ratios) were observed, counted, and measured. The results revealed that this species has a fusiform, laterally compressed body with a broad and muscular caudal peduncle. Of young adult individuals, the total length was 7.67 ± 0.75 cm. Males were larger than females with sharper and longer dorsal and anal fin tips, thicker lips, narrower flanks, and a more pointed urogenital papilla. The body color was bluish-gray with black vertical stripes, while the ventral region of mature females exhibited an orange to reddish-copper hue. Mouth was terminal with horizontal gape, thick lips, without barbules. Ctenoid scales covered the entire total body, operculum, and cheeks. Lateral line was divided into two parts, 16–21 scales on the first and 7–12 on the second part. Dorsal fin had 13–18 spines and 8–10 soft rays, pectoral fins 1 spine and 10–12 soft rays, pelvic fins 1 or 2 spines and 4 or 5 soft rays, anal fin 8–10 spines and 6–10 soft rays, and the caudal fin was homocercal, large, rounded. Jaws had multiple sharp, conical teeth, but no teeth were found on the tongue or palate. Short, numerous conical pharyngeal teeth were present on the bony pharyngeal plates, no distinct pattern observed in their arrangement on the pharyngeal plates. Gill rakers 6–8 and vertebrae 26 across all the specimens.

Keywords: Convict cichlid, Morphology, Anatomy, Identification key, *Amatitlania nigrofasciata*.



توصیف ویژگی‌های ریخت‌شناسی، کالبدشناسی و کلید شناسایی ماهی سیکلید زندانی (*Amatitlania nigrofasciata*)

بابک مقدسی^{۱*}، مهفام سزاوار اردبیلی^۲، درسا حیدری‌فر^۲

۱- گروه کشاورزی و منابع طبیعی، واحد سوادکوه، دانشگاه آزاد اسلامی، سوادکوه، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: babak_moghaddasi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۱۲

DOI: 10.60833/ascij.2025.1200918

چکیده

ویژگی‌های ریخت‌شناسی و برخی مشخصات کالبدشناختی ماهی سیکلید زندانی (*Amatitlania nigrofasciata*) به منظور توصیف و ارائه کلید شناسایی گونه بررسی شدند. در این راستا ۵۰ ماهی بالغ بر اساس شیوه‌های متداول ماهی‌شناسی بررسی و صفات ظاهری (شکل و رنگ بدن، موقعیت باله‌ها، پولک‌ها، خط جانبی و موقعیت دهان و دندان‌ها)، ویژگی‌های قابل شمارش (تعداد شعاع‌های باله، پولک‌های خط جانبی، خارهای آبششی و مهره‌ها) و ویژگی‌های قابل اندازه‌گیری (طول‌ها و نسبت ابعاد بدن) بررسی شدند. نتایج نشان داد که این گونه بدنی دوکی شکل مرتفع و از دو پهلو فشرده با ساقه دم پهن عضلانی داشته و میانگین طول کل در افراد بالغ $7/67 \pm 0/75$ سانتی‌متر بود. نرها نسبت به ماده‌ها درشت‌تر، انتهای باله‌های پشتی و مخرجی تیزتر و بلندتر، لب‌ها کلفت‌تر و لوله تناسلی باریک‌تر از ماده‌ها بود. رنگ بدن خاکستری مایل به آبی با نوارهای عمودی سیاه و ناحیه شکمی ماهیان ماده بالغ مایل به نارنجی یا سرخ مسی بود. دهان جلویی با شکاف افقی، لب‌ها کلفت و بدون سیبک و تمام سطح بدن، درپوش آبششی و گونه‌ها پوشیده از پولک‌های شانه‌ای بود. خط جانبی دوقسمتی، تعداد پولک‌های روی خط جانبی اول ۱۶ تا ۲۱ و روی خط دوم ۷ تا ۱۲ عدد بود. باله پشتی دارای ۱۳ تا ۱۸ شعاع سخت و ۸ تا ۱۰ شعاع نرم، باله سینه‌ای یک شعاع سخت و ۱۰ تا ۱۲ شعاع نرم، باله شکمی یک یا دو شعاع سخت و ۴ یا ۵ شعاع نرم، باله مخرجی ۸ تا ۱۰ شعاع سخت و ۶ تا ۱۰ شعاع نرم و باله‌ی دم‌ی متجانس، بزرگ و مدور بود. دهان دارای دندان‌های مخروطی تیز متعدد در جلوی فک‌ها بود. دندان‌های حلقی متعدد مخروطی کوتاه روی استخوان‌های حلقی قرار داشته و تعداد خارهای آبششی ۶ تا ۸ و تعداد مهره‌های ستون مهره‌ها ۲۶ عدد بود.

کلمات کلیدی: سیکلید زندانی، ریخت‌شناسی، کالبدشناسی، کلید شناسایی، *Amatitlania nigrofasciata*.

مقدمه

سیکلیدماهیان (Cichlidae) یکی از خانواده‌های بسیار متنوع راسته سوف‌ماهی‌شکلان (Perciformes) از رده پرتوبالگان در فوق‌رده‌ی ماهیان استخوانی است (۱) که جنس‌ها و گونه‌های متنوعی را هم در آب‌های شور و

در حال حاضر بسیاری از ماهیان زینتی به عنوان جانوران مدل آزمایشگاهی معرفی شده و در گستره وسیعی از پژوهش‌های زیست‌شناسی، آبی‌پروری و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. خانواده

و سیکلید گورخری (*Zebra Cichlid*) هم نامیده می‌شود (۷)، به گروه سیکلیدماهیان آمریکایی تعلق دارد (۵). این گونه به طور طبیعی در آب‌های شیرین آمریکای مرکزی، از گواتمالا تا پانامای غربی پراکنش دارد (۸). سیکلید زندانی اولین بار توسط آلبرت گونتر (*Heros nigrofasciatus*) با نام علمی (*Albert Günther*) معرفی شده (۹) و پس از آن به نام‌های *Archocentrus nigrofasciatus* و *Cichlasoma nigrofasciatum* نیز خوانده شده است (۱۰). نام این جنس از نام دریاچه آمازیگانی در شرق گواتمالا گرفته شده و *nigrofasciata* به معنی نوار سیاه است. سیکلید زندانی یکی گونه‌های زینتی است که به عنوان جانور مدل در پژوهش‌های زیستی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۱، ۱۲). بهترین شرایط محیطی مناسب برای نگهداری ماهی سیکلید زندانی در مخازن پرورش ماهی درجه حرارت ۲۲ تا ۲۹ درجه سانتیگراد، سختی 10 ± 170 میلی‌گرم/لیتر و pH بین ۷/۵ تا ۸/۵ است (۱۳). این ماهی در طول یک سال چندین بار تخم ریزی نموده گونه مناسبی برای مطالعه رفتارهای تولید مثل است (۱۱). در سال‌های اخیر حضور ماهی سیکلید زندانی (مانند بسیاری از ماهیان زینتی دیگر) به عنوان یک گونه مهاجم غیر بومی در اکوسیستم‌های آب‌های داخلی ایران گزارش شده است (۱۴، ۱۵ و ۱۶). مشیدی و ایگدري (۱۳۹۵) الگوهای رشد آلومتریک و خصوصیات ریختی سیکلید زندانی (*A. nigrofasciata*) را (البته با نام غیردقیق ماهی سیچلاید گورخری) طی مراحل اولیه تکوین بررسی نموده و مراحل اولیه رشد این گونه را به سه مرحله (دوره لاروی تا جذب کیسه زرده، دوره پست لاروی همراه با توسعه باله‌ها و ظهور رنگدانه‌های بخش‌های میانی، پستی و ساقه دمی و دوره ابتدای جوانی همراه با ظهور بیشتر رنگدانه‌ها به ویژه در بخش باله‌های پستی و مخرجی و تکوین کامل باله‌ها) تفکیک نمودند. همچنین بیان داشتند که در این گونه نقاط

هم در آب شیرین شامل می‌شود (۲). تاکنون درجنس *Amatitlania* تعداد ۹ گونه شناسایی شده که عبارتند از *A. kanna*، *A. coatepeque*، *A. altoflava*، *A. nigrofasciata*، *A. nanolutea*، *A. myrnae*، *A. sajiica*، *A. septemfasciata* و *A. siquia* (۳). در میان گونه‌های این جنس، دو گونه *A. kanna* و *A. siquia* شباهت ظاهری زیادی با *A. nigrofasciata* دارند. در آب‌های داخلی کشور ایران تنها یک گونه سیکلید بومی با نام علمی *Iranocichla hormuzensis* در حوزه هرمز گزارش شده است که از نظر ذخیره ژنتیکی فون جانوری آبریان کشور اهمیت ویژه‌ای دارد (۴). در صنعت ماهیان زینتی، خانواده سیکلیدماهیان آب شیرین به دو گروه بزرگ سیکلیدهای آفریقایی و سیکلیدهای آمریکایی تقسیم می‌شوند. از سیکلیدهای آمریکایی می‌توان به سیکلیدهای سوروم، تگزاس، رد دوپل، میداس، جگوار، گلد تریماکو، دهان آتشی، گرین ترور، رد ترور، جک دمپسی، مرواریدی، زمین‌خوار، پیکاک، پروت، پروت کوتوله، پوزه میمونی، فلاورهورن، افرا، رامپریزی، اسکار، دیسکس، انجل، کوتوله مک مستر، گرگی و سیکلید زندانی اشاره کرد (۵). گونه‌های متعدد دیگری از سیکلید ماهیان نیز در پی فعالیت‌های آبی-پروری و یا در اثر رهاسازی ماهیان زینتی در اکوسیستم‌های آبی ایران وارد شده‌اند. از مهم‌ترین سیکلیدماهیان غیربومی که در بسیاری از اکوسیستم‌های آبی ایران گسترش یافته‌اند می‌توان گونه‌های تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) و تیلاپیای شکم قرمز (*Tilapia zillii*) را نام برد (۶). تنوع رژیم غذایی و رفتار قلمروطلبی این ماهیان سبب شده است تا در صورت ورود به منابع آبی کشور به صورت غیربومی و مهاجم تهدیدی جدی برای اکوسیستم‌های آبی کشور و گونه‌های بومی آن به شمار آیند. ماهی سیکلید زندانی (*Convict Cichlid*) با نام علمی *Amatitlania nigrofasciata* که در بازار ماهیان زینتی با نام بارش

عطف رشد بیشتر ویژگی‌های ریختی همزمان با تغییر از تغذیه داخلی به خارجی بوده و شکل بدن ماهی همگام با اولویت‌های زیستی توسعه می‌یابد (۱۷). اثرات مخمر ساکارومایسس سرویسیه بر میزان بقاء و عملکرد رشد سیکلید زبرا نشان داد که عملکرد رشد در تیمارهای تغذیه شده با مخمر ساکارومایسس سرویسیه خصوصاً در سطح ۲ درصد به‌طور معنی‌داری افزایش داشت (۱۸). همچنین جیره حاوی تاموکسیفن سبب بهبود شاخص‌های رشد و هماوری سیکلید زندانی می‌گردد (۱۹). بررسی‌ها حاکی از آن بوده که تغذیه با جیره حاوی کلومیفن نیز شاخص‌های رشد این ماهی را افزایش می‌دهد (۲۰). جیره حاوی باکتری *Pediococcus acidilactici* نیز به عنوان پروبیوتیک شاخص‌های رشد، تغذیه، بازماندگی و هماوری را در این ماهی افزایش می‌دهند (۷). با مقایسه تأثیرات خوراکی باکتری‌های پروبیوتیک *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) و *پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی* (*Pediococcus acidilactici*) در بچه‌ماهیان سیکلید زندانی، نشان داده شد که این پروبیوتیک‌ها شاخص‌های رشد و تغذیه را در ماهیان مورد بررسی بهبود بخشیده ولی شاخص‌های هماوری را کاهش دادند (۲۱). استفاده از سین‌بیوتیک تجاری لاکتوفید در جیره غذایی، شاخص‌های رشد را بهبود بخشیده و شاخص‌های هماوری را در هر دو جنس نر و ماده ماهی سیکلید زندانی ارتقا می‌دهد (۲۲). استفاده از هورمون ۱۷ آلفا-متیل تستوسترون در جیره غذایی این ماهی بر بهبود شاخص‌های رشد، بازماندگی، تغذیه و هماوری این ماهی تأثیرات مثبتی داشته و دوز پیشنهادی آن برای این گونه منظور به میزان ۲ میلی‌گرم/کیلوگرم جیره خشک پیشنهاد شده است (۲۳). همچنین نشان داده شده که ساپونین در مقادیر بالا می‌تواند سبب بهبود عملکرد رشد ماهیان شده و این افزایش برای ماهیان جنس نر و ماده متفاوت بود به طوری که در ماهیان

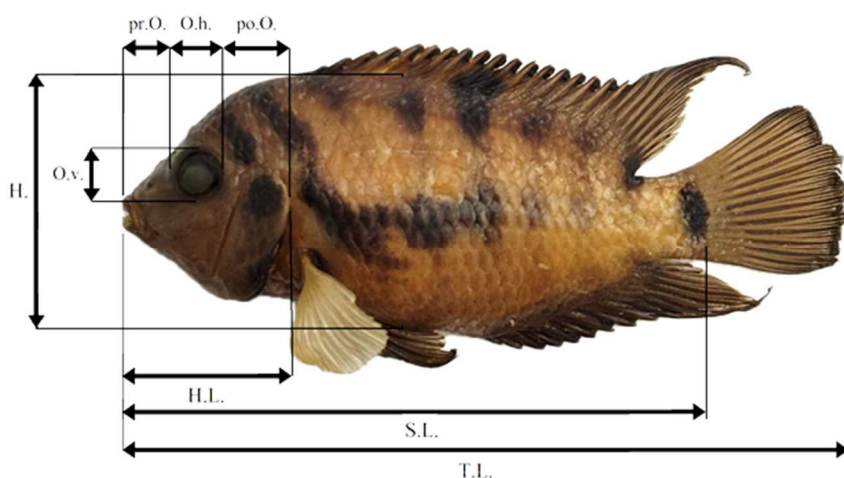
جنس نر سطوح بالاتر این ماده (۷۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم غذا) نسبت به جنس ماده (۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم غذا) مشاهده شد (۲۴). طی پژوهشی، درصد تخم‌گذاری در ماهیان سیکلید زندانی مولدی که با عصاره پروآنتوسیانیدین دانه انگور تغذیه شده بودند صفر بوده و هیچ یک از تخم‌ها تفریخ نشدند (۲۵). میزان ضریب تبدیل غذایی و نسبت کارایی پروتئین در بچه‌ماهیان سیکلید زندانی تغذیه شده با سطح ۰/۵ گرم/کیلوگرم سین‌بیوتیک بایومین ایمبو، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشته و میزان افزایش وزن بدن، درصد افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه و میزان بیومس در تیمار تغذیه شده با ۱ گرم/کیلوگرم سین‌بیوتیک، افزایش معنی‌داری مشاهده شد (۲۶). با توجه به متداول بودن ماهی سیکلید زندانی در صنعت تکثیر و پرورش ماهیان زینتی و همچنین ورود آن به اکوسیستم‌های آبی طبیعی کشور ایران، هدف از انجام این پژوهش، توصیف ویژگی‌های کلیدی این ماهی به منظور ارائه کلید شناسایی آن بوده تا امکان شناسایی و تشخیص افتراقی این گونه را از سایر گونه‌های مشابه سیکلیدماهیان فراهم نموده و تشخیص زیرگونه‌ها و واریته‌های احتمالی آن را در آینده با دقت بیشتری امکان‌پذیر سازد.

مواد و روش‌ها

در این بررسی تعداد ۵۰ عدد ماهی سیکلید زندانی (*Amatitlania nigrofasciata*) بالغ جوان با میانگین طول کل 7.67 ± 0.75 سانتی‌متر پرورش یافته در کارگاه خصوصی ماهیان زینتی تهیه شده و پس از آسان‌کشی (غوطه‌وری در محلول غلیظ اوژنول)، ویژگی‌های ریخت‌شناسی و برخی از مشخصات کالبدشناختی کلیدی آنان بر اساس شیوه‌های و قواعد علمی مورد استفاده در منابع معتبر ماهی‌شناسی و سیستماتیک ماهیان (۶، ۲۴، ۲۷، ۲۸، ۲۹) بررسی، ارزیابی و ارائه شدند. ویژگی‌های ظاهری (مانند شکل و رنگ بدن،

بیومتری مدرج (با دقت ۱ میلی‌متر) و برای مشاهده اجزای ریز بدن و ثبت تصاویر از میکروسکوپ دیجیتال (CELESTRON Hand Held Digital Microscope Pro 44308) استفاده شد. مقادیر عددی ویژگی‌های قابل شمارش و قابل اندازه‌گیری، بر اساس میانگین $\pm$ انحراف معیار و با ذکر مقادیر حداقل و حداکثر ارائه شدند.

نوع و موقعیت باله‌ها، نوع پولک‌ها، خط جانبی و نوع و موقعیت دهان و دندان‌ها)، ویژگی‌های قابل شمارش (شامل تعداد شعاع‌های سخت و نرم باله‌ها، پولک‌های رو، بالا و پایین خط جانبی، خارهای آبششی و تعداد مهره‌های ستون مهره) و ویژگی‌های قابل اندازه‌گیری (شامل طول کل بدن، طول استاندارد، طول سر و نسبت‌های ابعاد بدن) مشاهده، شمارش و اندازه‌گیری شدند (شکل ۱). برای اندازه‌گیری طول‌ها از تخته



شکل ۱- نمایش مهم‌ترین ویژگی‌های قابل اندازه‌گیری بررسی شده در ماهی سیکلید زندانی. طول کل (T.L.)، طول استاندارد (S.L.)، طول سر (H.L.)، ارتفاع بدن (H.)، قطر عمودی چشم (O.v.)، قطر افقی چشم (O.h.)، فاصله پیش از حدقه (Pro.O.) و فاصله پس از حدقه (Po.O.)

Fig 1. Most important Morphometric features of the Convict Cichlid fish. Total Length (T.L.), Standard Length (S.L.), Head Length (H.L.), Body High (H.), Vertical Diameter of Eye (O.v.), Horizontal Diameter of Eye (O.h., Pre-Orbit Length (Pro.O.), Post-Orbit Length (Po.O.)

نتایج

ویژگی‌های ریخت‌شناختی: نتایج نشان داد که شکل بدن ماهی سیکلید زندانی دوکی شکل مرتفع و از دو پهلو فشرده بوده و ساقه‌ی دمی پهن، عضلانی و مشخص بود. باله‌های پستی و مخرجی عریض و انتهای آن‌ها در ماهیان جنس نر در مقایسه با جنس ماده تیزتر و بلندتر بود. باله‌ی دمی متجانس، بزرگ و مدور بود. رنگ بدن (در افراد غیر آلبینو) خاکستری مایل به آبی با ۶ تا ۹ نوار عمودی سیاه رنگ بود که اولین نوار سیاه در انتهای سر و روی درپوش آبششی قرار داشت

(شکل ۲). پهلوهای ناحیه شکمی در ماهیان ماده بالغ در مقایسه با جنس نر متورم بوده و رنگ آن مایل به نارنجی و یا سرخ مسی بود. میانگین طول کل بدن در افراد بالغ $7/67 \pm 0/75$ سانتی‌متر و نرها درشت‌تر از ماده‌ها بودند. بیشترین طول کل بدن در برخی از نرها پرورشی مسن‌تر، تا ۱۴ سانتی‌متر هم اندازه‌گیری شد (جدول ۲). خط جانبی دو قسمتی بود (شکل ۳). همه سطح بدن و درپوش آبششی و گونه‌ها (به جز پیشانی و پوزه بدون) تمام سطح بدن (به جز پیشانی و پوزه)

پوشیده از پولک‌های شانه‌ای بود (شکل ۴). موقعیت دهان جلویی، شکاف دهانی افقی، لب‌ها کلفت و بدون سبیلک و طول فک بالا و پایین برابر بود (شکل ۵). علاوه بر نوستریل‌ها، تعداد زیادی سوراخ‌های حسی روی سر وجود داشت که یک سوراخ منفرد در وسط بالای پیشانی، دو جفت سوراخ دیگر جلوتر از آن به طرف پوزه و سه جفت سوراخ حسی دیگر زیر پیش-درپوش آبششی قرار داشت.

ویژگی‌های کالبدشناختی: دهان دارای دندان‌های آرواره‌ای تیز متعدد در جلوی فک بالا و پایین بوده (شکل ۶) ولی سطح زبان و کام دهان فاقد دندان بود. دندان‌های حلقی متعدد مخروطی و کوتاه بر روی سه صفحه استخوانی حلقی (دو صفحه پهن بیضی‌شکل جانبی و یک صفحه مثلثی‌شکل پایینی) قرار داشته و ترتیب قرارگیری این دندان‌ها روی صفحات استخوانی حلقی از الگوی مشخصی پیروی نمی‌کند (شکل ۶). خارهای آبششی مخروطی تیز و کوتاه در دو ردیف طولی و با فاصله مشخصی از هم در بخش جلویی هر کمان آبششی قرار داشتند (شکل ۷). تعداد خارهای آبششی در هر ردیف طولی ۶ تا ۸ عدد (میانگین $6/88 \pm 0/72$) بود. تعداد مهره‌های ستون مهره‌ها در همه نمونه‌های مورد بررسی ۲۶ عدد بود (شکل ۸). نتایج شمارش، اندازه‌گیری و محاسبه ویژگی‌های مهم قابل شمارش (شامل تعداد شعاع‌های سخت و نرم باله‌ها، پولک‌های رو، بالا و پایین خطوط جانبی اول و دوم، خارهای کمان آبششی و تعداد مهره‌های ستون فقرات) و همچنین نتایج سنجش ویژگی‌های قابل اندازه‌گیری (طول‌ها و نسبت‌های مهم ابعاد بدن) سیکلید ماهیان مورد بررسی، در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده‌اند.

ویژگی‌های قابل شمارش: نتایج نشان داد که تعداد پولک‌های روی خط جانبی اول ۱۶ تا ۲۱ (میانگین $1/24 \pm 1/8/8$) و خط جانبی دوم ۷ تا ۱۲ عدد (میانگین $1/14 \pm 8/85$) عدد بود. پولک‌های بالای خط جانبی

اول ۳ تا ۷ عدد (میانگین $0/82 \pm 4/4$) و زیر آن ۹ تا ۱۳ عدد (میانگین $0/97 \pm 1/0$) بود. خط جانبی دوم از زیر پولک ۱۷ تا ۱۹ خط جانبی اول آغاز و تعداد پولک‌های بالا و پایین آن ۳ تا ۴ عدد بود. باله پشتی دارای ۱۳ تا ۱۸ شعاع سخت (میانگین $1/39 \pm 16/65$) و ۸ تا ۱۰ شعاع نرم (میانگین $0/64 \pm 9/1$)، باله سینه‌ای یک شعاع سخت و ۱۰ تا ۱۲ شعاع نرم (میانگین $0/59 \pm 11/35$)، باله شکمی یک یا دو شعاع سخت (میانگین $0/31 \pm 1/1$) و ۴ یا ۵ شعاع نرم (میانگین $0/41 \pm 4/8$)، باله مخرجی ۸ تا ۱۰ شعاع سخت (میانگین $0/66 \pm 8/7$) و ۶ تا ۱۰ شعاع نرم (میانگین $0/86 \pm 7/7$) و باله‌ی دمی متجانس، بزرگ و مدور این ماهیان دارای ۱۳ تا ۱۸ شعاع نرم (میانگین $0/83 \pm 15/95$) بود. خارهای آبششی در هر ردیف طولی ۶ تا ۸ عدد (میانگین $0/72 \pm 6/88$) بود. تعداد مهره‌های ستون مهره‌ها در همه نمونه‌ها ۲۶ عدد شمارش شد.

ویژگی‌های قابل اندازه‌گیری: نتایج بررسی ویژگی‌های قابل اندازه‌گیری ماهیان بالغ مورد بررسی (شامل طول کل بدن، طول استاندارد، طول سر و نسبت‌های ابعاد بدن) بیانگر آن بود که طول کل ماهیان (T.L.) بین ۶/۲ تا ۹/۲۵ سانتی‌متر (میانگین $0/75 \pm 7/67$)، طول استاندارد (S.L.) ۳/۶ تا ۶/۷ سانتی‌متر (میانگین $0/81 \pm 5/86$) و طول سر (H.L.) ۱/۲ تا ۲/۵ سانتی‌متر (میانگین $0/28 \pm 1/99$) بود. همچنین نسبت ارتفاع بدن به طول کل ۳۱/۹۱ تا ۳۶/۶۷ درصد (میانگین ۱/۷۹ $\pm 31/99$)، نسبت طول سر به طول کل ۱۲/۹۷ تا ۳۰/۵۶ درصد (میانگین $4/32 \pm 21/21$)، نسبت قطر چشم به طول سر ۲۲/۷۳ تا ۳۰ درصد (میانگین $49/85 \pm 38/26$) و نسبت طول آرواره به طول سر ۱۳/۶۴ تا ۳۱/۵۸ درصد (میانگین $6/36 \pm 23/57$) محاسبه شد. ماهیان نر در مقایسه با جنس ماده دارای بدن درشت‌تر و مرتفع‌تر و پهلوهایی باریک‌تری بوده و انتهای باله‌های پشتی و مخرجی تیزتر و بلندتر، لب‌ها کلفت‌تر، قوز

پیشانی مشخص و برجسته تر از ماده‌ها بود. رنگ بدن در پهلوه‌ای بدن ماهیان ماده بالغ مایل به نارنجی یا سرخ مسی بوده. لوله تناسلی نرها تیزتر و باریک‌تر از ماده‌ها و لوله تناسلی (لوله تخمگذاری) در ماده‌ها پهن‌تر از نرها بود.



شکل ۲- ریخت‌شناسی ماهی سیکلید زندانی جنس نر (بالا) و ماده (پایین)

Fig. 2. Morphology of the male (above) and female (below) Convict Cichlid fish



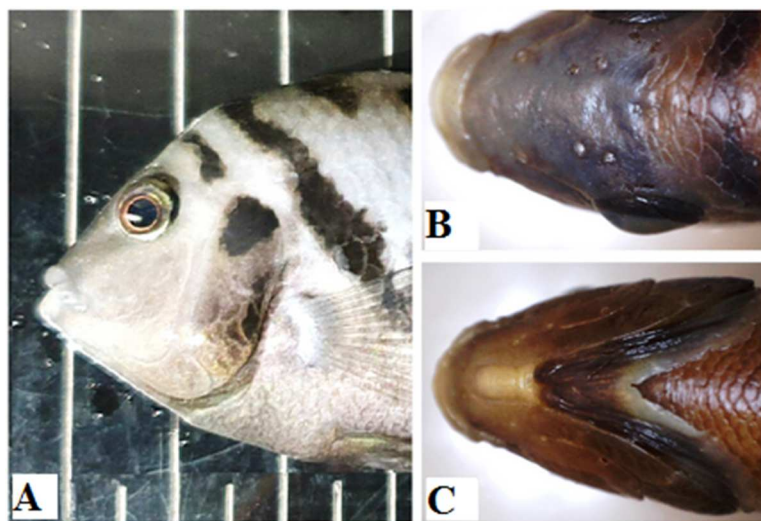
شکل ۳- نمایش موقعیت خط جانبی دو قسمتی در ماهی سیکلید زندانی

Fig. 3. Bipartite Lateral line in the Convict Cichlid fish



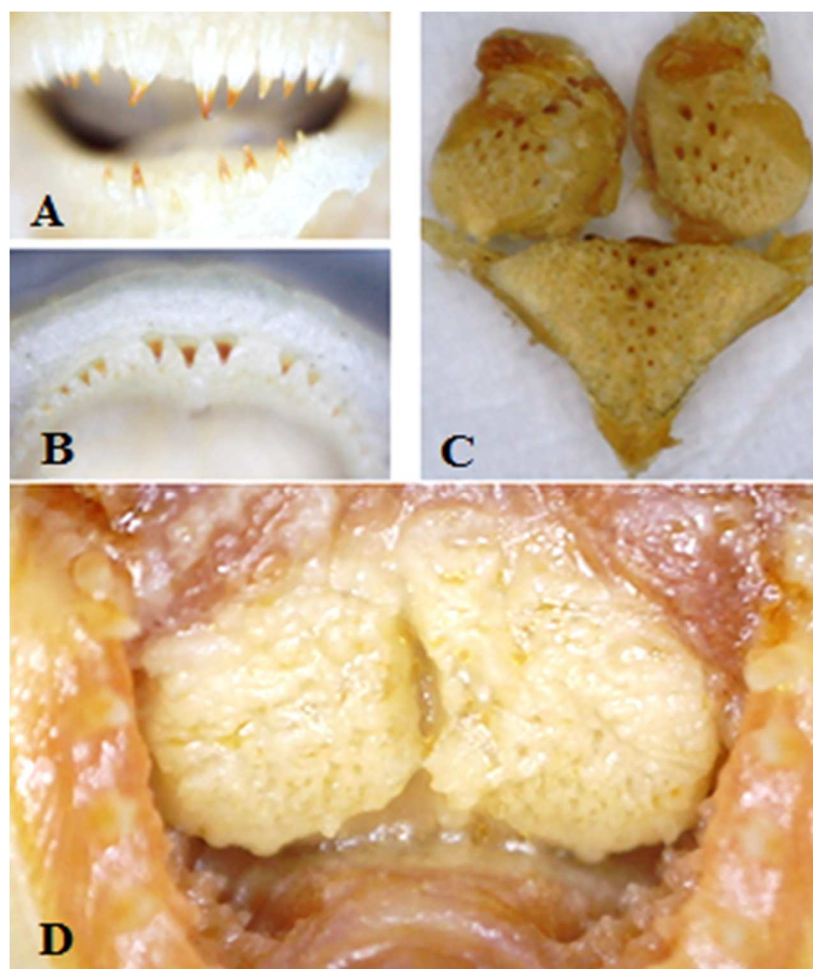
شکل ۴- پولک شانه‌ای روی خط جانبی در ماهی سیکلید زندانی

Fig. 4. Ctenoid scale in the convict cichlid



شکل ۵- ریخت‌شناسی سر در ماهی سیکلید زندانی. A: نمای جانبی، B: نمای پشتی، C: نمای شکمی

Fig. 5. Morphology of the head region in the Convict Cichlid. Lateral View (A), Dorsal View (B), Ventral View (C)



شکل ۶- وضعیت دندان‌های آرواره‌ای و دندان‌های حلقی ماهی سیکلید زندانی. A: نمای روبرو B: نمای زیرین، C: صفحات استخوانی حلقی جدا شده از بدن ماهی D: موقعیت صفحات حلقی جانبی در انتهای دهان.

Fig. 6. Position of the maxillary and pharyngeal teeth of a convict cichlid.
A: Front view (Jaw teeth), B: Bottom view (Jaw teeth), C: Pharyngeal bony plates separated from the body of the fish D: Position of the lateral pharyngeal plates at the end of the mouth.



شکل ۷- وضعیت آبشش‌ها و خارهای آبششی ماهی سیکلید زندانی

Fig 7. Gills and Gill Rakers of the Convict Cichlid fish



شکل ۸- نمایش استخوان‌های ستون مهره‌ها در ماهی سیکلید زندانی

Fig 8. Vertebral Column of the Convict Cichlid fish

جدول ۱- نتایج بررسی ویژگی‌های قابل شمارش ماهی سیکلید زندانی

Table 1. Meristic features of the convict cichlid

Table 1. Meristic features of the convict cichlid					
Meristic features			Min	Max	Average
Fin Rays	Dorsal Fin	Spines	13	18	16.65 ± 1.39
		Soft Rays	8	10	9.1 ± 0.64
	Pectoral Fin	Spines	1	1	1 ± 0
		Soft Rays	10	12	11.35 ± 0.59
	Pelvic Fin	Spines	1	2	1.1 ± 0.31
		Soft Rays	4	5	4.8 ± 0.41
	Anal Fin	Spines	8	10	8.7 ± 0.66
		Soft Rays	6	10	7.7 ± 0.86
	Caudal Fin	Spines	0	0	0 ± 0
		Soft Rays	13	18	15.95 ± 0.83
Scales	Lateral Line 1 st	Above	3	7	4.40 ± 0.82
		On	16	21	18.8 ± 1.24
		Below	9	13	10 ± 0.97
	Lateral Line 2 nd	Above	3	4	3.71 ± 0.47
		on	7	12	8.85 ± 1.14
		Below	3	4	3.68 ± 0.49
Gill Rakers			6	8	6.88 ± 0.72
Vertebrae			26	26	26 ± 00

جدول ۲- نتایج بررسی ویژگی‌های قابل اندازه‌گیری ماهی سیکلید زندانی

Table 2. Morphometric features of the convict cichlid

Morphometric features		Min	Max	Average
Lengths (cm)	Total Length (T.L.)	6.2	9.25	7.67 ± 0.75
	Standard Length (S.L.)	3.6	6.7	5.86 ± 0.81
	Head Length (H.L.)	1.2	2.5	2.03 ± 0.21
	Body High (H.)	1.9	2.9	2.40 ± 0.40
	Length of Maxilla (L.mx.)	0.3	0.7	0.46 ± 0.10
	Length of mandible (L.md.)	0.3	0.7	0.46 ± 0.10
	Horizontal Eye Diameter (O.h.)	0.4	0.6	0.54 ± 0.05
	Vertical Eye Diameter (O.h.)	0.4	0.6	0.54 ± 0.05
	Pro-Orbital length (pr.O.)	0.4	0.9	0.71 ± 0.14
	Post-Orbital length (po.O.)	0.5	1.0	0.82 ± 0.14
Ratios	Body High / Total Length	31.91	36.67	% 31.99 ± 1.8
	Head Length / Total Length	20.00	30.56	% 26.59 ± 3.3
	Eye Diameter / Head Length	22.73	30.00	% 27.31 ± 2.8
	Length of Maxilla / Head Length	18.00	31.58	% 22.80 ± 4.8

بحث

شکل ظاهری سیکلید زندانی در میان سایر گونه‌های جنس *Amatitlania* شباهت زیادی با دو گونه *A. siquia* و *kanna* داشت ولی در مقایسه با سایر گونه‌های متعلق به این جنس، با توجه به فرم بدن و نوع رنگبندی آن بهتر قابل تشخیص است. بدن ماهی سیکلید زندانی (مانند سایر سیکلیدماهیان) دوکی شکل پهن و از دو پهلو فشرده بوده و این ویژگی امکان انجام حرکات سریع پر پیچ و تاب و تغییر جهت‌های ناگهانی را برای ماهی فراهم نموده و با رفتار قلمروطلبی و تهاجمی این ماهی (۱) و تعقیب و گریزهای سریع و ناگهانی کاملاً سازگار است. همچنین فرم دهان و دندان‌های این ماهی نیز با رژیم غذایی همه چیزخواری با ترجیح گوشتخواری (۳۰) سازگار شده است. سیکلید ماهیان اغلب گوشتخوارند و در این ماهیان رفتار هم‌نوع‌خواری هم دیده می‌شود به طوری که در صورت گرسنگی، افراد بزرگتر به کوچکترها حمله‌ور می‌شوند و آنها را می‌خورند. بنابر این بهتر است تا ماهیان رقم‌بندی شده و سائیزهای مختلف در مخازن جداگانه قرار گیرند. انواع رنگین نسبت به هم‌نوعان خود و ماهی‌های دیگر رفتار تهاجمی دارند (۱). ماهی نر به شدت از قلمرو خود دفاع می‌کند و در این مرحله برای جلوگیری از درگیری و خشونت بهتر است جفت انتخاب شده را به آرامی به یک آکواریوم دیگر منتقل نمود. ماهی سیکلید زندانی یکی از گونه‌های غیر بومی آب‌های داخلی کشور ایران است که با توجه به توان تولید مثلی زیاد، رژیم همه چیزخواری، رفتار قلمروطلبی و سازگاری زیاد با شرایط محیطی و طیف وسیعی از منابع غذایی مختلف، در صورت ورود به منابع آبی می‌تواند به عنوان یک گونه مهاجم غیر بومی مشکلات متعددی را برای زیستگاه‌های آبی و گونه‌های بومی کشور ایران ایجاد نماید. متأسفانه در سال‌های اخیر گونه‌های متعددی از آبزیان غیر بومی به زیستگاه‌های

ایران وارد شده و گسترش یافته‌اند. در حال حاضر گزارشات غیررسمی متعددی مبنی بر حضور ماهی سیکلید زندانی (همچون بسیاری از گونه‌های زیتتی غیر بومی دیگر) در زیستگاه‌های آب‌های داخلی ایران وجود دارد. اولین گزارش حضور ماهی سیکلید زندانی در آب‌های ایران از رودخانه‌های کل حوزه ی آبریز هرمز توسط اسماعیلی و همکاران (۱۴) و سپس در حوزه ی دریاچه نمک چشمه ی سلیمانیه (۱۵) گزارش شده است که احتمالاً از مراکز تکثیر و پرورش و یا آکواریوم‌های خانگی به آب‌های داخلی کشور راه یافته است. با توجه به ماهیت تهاجمی این گونه و پراکنش آن در آب‌های داخلی ایران، لازم است تا مطالعه جامعی پیرامون ویژگی‌های زیست‌شناختی و چالش‌های اکولوژیکی ناشی از حضور آن در ایران انجام گیرد. بررسی مطالعات انجام شده نشان داد که سیکلید زندانی به دلیل برخورداری از ویژگی‌های زیست‌شناختی خاص مانند تحمل دامنه وسیعی از شرایط محیطی، فرصت طلبی، پرخاشگری، توانایی تصرف زیستگاه‌های آشفته و رشد سریع به یک گونه مهاجم در اکوسیستم‌های آبی تبدیل شده است. این گونه قادر است از طریق شیوه‌های مختلف مانند رقابت، انتشار عوامل بیماری‌زا و هیبریداسیون روی جمعیت‌های ماهیان به ویژه گونه‌های بومی مانند سیاه ماهیان (*Capoeta*) تأثیرات منفی داشته باشد (۱۶). این گونه‌های مهاجم غیر بومی، یا به‌طور مستقیم با حمله و آسیب زدن به گونه‌های بومی و یا تغذیه از تخم، لارو و نوزادان سایر آبزیان به آنها آسیب می‌زنند و یا آن‌که به طور غیر مستقیم با اعمال رقابت غذایی و قلمروطلبی، عرصه را برای گونه‌های بومی تنگ می‌کنند. در این میان ماهی سیکلید زندانی نیز توان بالایی برای تهدید و آسیب رساندن به تعادل اکولوژیک زیستگاه‌های آبی را داشته و می‌تواند گونه‌های بومی را به شدت تحت تأثیر حضور خود قرار دهد.

نتیجه‌گیری

منابع

1. Sandford G. Aquarium owner's manual. Dorling Kindersley, UK, 2003; 288 p.
2. Kapur K, Toor HS. The effect of clomiphene citrate on ovulation and spawning in indomethacin treated carp, *Cyprinus carpio*. J Fish Biol. 1979;14(1):59-66.
3. Fishbase (<https://fishbase.se/identification/SpeciesList.php?genus=Amatitlania>).
4. Abdoli A. The inland water fishes of Iran. Naghsh-E Mana Publication, 1999; 377p. [In Persian]
5. Montajemi S, Zolfaghari Sharak A, Montajemi S, Taheri A. Aquariums and freshwater aquarium fish. Agricultural Education Publication (TAK), 2016; pp:63-148. [In Persian]
6. Sattari M, Shahsavani D, Shafi S. Ichthyology (2) (Systematics). Haghshenas Publication, 2007; pp:408-409. [In Persian]
7. Ramezani F, Moghaddasi B. Dietary effects of the probiotic "Pediococcus acidilactici" on growth and feeding indices in the Convict Cichlid fish (*Amatitlania nigrofasciata*). J Anim Biol. 2016;9(2):45-57. [In Persian]
8. Mitwally H, Mitwally K, Boyd B, Mitwally M. 2016. Clomiphene Citrate versus Aromatase Inhibitors: Mechanism of Action. Manual of Ovulation Induction and Ovarian Stimulation Protocols, Chapter 34, 2016;293p.
9. Günther A. On the fishes of the states of Central America, founded upon specimens collected in fresh and marine waters of various parts of that country by Messrs. Salvin and Godman and Capt. J.M. Dow. Proc Zool Soc Lond. 1866;3:600-604.
10. Centre for Agriculture and Bioscience International (CABI). 2019. Invasive Species Compendium *Amatitlania nigrofasciata* (convict cichlid). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/112202>. Accessed August 11, 2019.

نتایج این پژوهش در مورد ماهی سیکلید زندانی نشان داد که این گونه دارای بدن دوکی شکل مرتفع و از دو پهلو فشرده با ساقه‌ی دمی پهن و عضلانی و باله‌ی دمی متجانس، بزرگ و مدور بود. رنگ بدن (در نمونه‌های غیر آلبینو) خاکستری مایل به آبی با نوارهای عمودی سیاه رنگ و پهلوهای شکم در ماهیان بالغ جنس ماده به رنگ نارنجی یا سرخ مسی مایل بود. میانگین طول کل $7/67 \pm 0/75$ سانتی‌متر و ماهیان نرها درشت‌تر از جنس ماده بودند (طول کل بدن در برخی نرهای بالغ مسن تا ۱۴ سانتی‌متر یا بیشتر اندازه‌گیری شد). میانگین طول استاندارد $5/86 \pm 0/8$ سانتی‌متر، نسبت ارتفاع بدن به طول کل $31/99 \pm 1/79$ درصد و نسبت طول سر به طول کل $3/31 \pm 26/59$ درصد بود. دهان جلویی، با شکاف افقی، لب‌ها کلفت و بدون سیبلیک و طول فک بالا و پایین برابر بود. پولک‌های شانهای بر روی تمام سطح بدن، درپوش آبششی و گونه‌ها (به جز پیشانی و پوزه) و خط جانبی دوقسمتی بود. دندان‌های آرواره‌ای مخروطی شکل تیز متعدد بر روی هر دو فک بالا و پایین، سطح زبان و کام دهان فاقد دندان قرار داشته و دندان‌های حلقی متعدد مخروطی شکل کوتاه (بدون الگوی مشخص) بر روی صفحات استخوانی حلقی قرار داشتند. استخوان‌های حلقی: سه عدد (دو صفحه پهن بیضی شکل جانبی و یک صفحه مثلثی شکل پایینی)، خارهای آبششی مخروطی شکل (۶ تا ۸ عدد) و تعداد مهره‌های ستون مهره‌ها در همه نمونه‌ها ۲۶ عدد بود. تعداد شعاع‌های باله‌ها به شرح ۸-۱۰ A. ۱۰-۶، V. I-II ۵-۴، P. I ۱۲-۱۰، D. XIII-IXX VIII-X و تعداد فلس‌های خط جانبی به شرح زیر ارائه شد:

$$L.L.1. \frac{6-7}{9-13} 21 \quad L.L.2. \frac{7-8}{3-4} 12$$

- Iran J Vet Res. 2015;16(1):59-62. [In Persian]
19. Zohrei N, Moghaddasi B, Hayati Roodbari N. Dietetic effects of tamoxifen on survival, growth performance and gonadal indices in convict cichlid fish (*Amatitlania nigrofasciata*). M.Sc. Thesis. Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, 2016; 95p. [In Persian]
 20. Javadinejad A, Moghaddasi B, Hayati Roodbari N. Dietetic effects of Clomiphene on survival, growth performance and Fecundity indices in Convict Cichlid fish (*Amatitlania nigrofasciata*). J Mar Biol. 2022;13(4):1-16. [In Persian]
 21. Ramezani F, Moghaddasi B. Comparison of the bacteria *Bacillus subtilis* and *Pediococcus acidilactici* as probiotics on growth, nutrition, survival and fecundity indices in Convict Cichlid fish (*Amatitlania nigrofasciata*). M.Sc. Thesis in Aquaculture, Islamic Azad University, Savadkooh Branch, 2016; 150p. [In Persian]
 22. Rostamian F, Soltani M, Moghaddasi B. Effect of lactofeed as a probiotic on growth and fecundity of convict cichlid fish (*Amatitlania nigrofasciata*). M.Sc. Thesis in Aquaculture, Islamic Azad University, Science and Research Branch, 2017; 62p. [In Persian]
 23. Nosrati Kenareh N, Moghaddasi B, Hayati Roodbari N. Dietetic effects of the hormone 17 α -Methyltestosterone on survival, growth performance and gonadal indices in the convict cichlid fish (*Amatitlania nigrofasciata*). M.Sc. Thesis. Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, 2018; 85p. [In Persian]
 24. Mohammad Rezaei D. Effect of different levels of saponin on growth performance and food efficiency in convict cichlid (*Amatitlania nigrofasciata*). J Fish Aquat Sci. 2020;15(1):22-26. [In Persian]
 11. Ishikawa T, Tachihara K. Life history of the nonnative convict cichlid *Amatitlania nigrofasciata* in the Haeburu Reservoir on Okinawa-jima Island, Japan. Environ Biol Fish. 2010;88(3): 283-292.
 12. Kocher TD. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. Nat Rev Genet. 2004;5:288-298.
 13. Mousavi-Sabet H, Eagderi S. First record of the convict cichlid, *Amatitlania nigrofasciata* (Günther, 1867) (Teleostei: Cichlidae) from the Namak Lake basin, Iran. Iran J Ichthyol. 2016;3(1):25-30. [In Persian]
 14. Esmaeili H, Gholamifard A, Sayyadzadeh G, Parsi B, Mirghiyasi S, Ghasemian S. New record of the convict cichlid *Amatitlania nigrofasciata* (Günther 1867) from the Middle East (Actinopterygii Cichlidae). Aqua Int J Ichthyol. 2013; 2013: 225-229.
 15. Moshidi F, Eagderi S. Early development and allometric growth patterns in Zebra Cichlid *Amatitlania nigrofasciata* (Günther, 1866). J Ornament Aquat Iran Ornament Fish Soc (IOFS). 2016.3(1):1-6. [In Persian]
 16. Radkhah A, Eagderi S. Study on the biological characteristics and ecological challenges of convict cichlid (*Amatitlania nigrofasciata* Günther, 1867) in inland waters of Iran. J Utiliz Cultiv Aquat. 2022;9(1):69-80. [In Persian]
 17. Mosavi Sabet SH, Zamini A, Vahabzadeh Rodsari H, Morad Khani Z. Masculinization of zebra cichlid (*Cichlasoma nigrofasciata*) with oral treatment of 17alpha-methyl testosterone and the effects on mortality rate, sterilization and mixed sexual fish. J Mar Sci Technol Res. 2010;5(3):25-29. [In Persian]
 18. Mohammadi F, Mousavi SM, Ahmadmoradi E, Zakeri M, Jahedi A. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on survival rate and growth performance of Convict Cichlid (*Amatitlania nigrofasciata*).

Organization, 2004; 80p. [In Persian]

28. Sadeghit SN. Morphological and biological characteristics of southern Iranian fishes (The Persian Gulf and Oman Sea). Naghsh-e Mehr Publication, 2001; 438p. [In Persian]

29. Vossoughi G, Mostajeer B. Freshwater Fishes. Tehran University Publication, 1988; 317p. [In Persian]

30. Hopperdietzel C, Hirschberg RM, Hünigen H, Wolter J, Richardson K, Plendl J. Gross morphology and histology of the alimentary tract of the convict cichlid *Amatitlania nigrofasciata*. J Fish Biol. 2014; 85(5):1707-1725.

25. Mohammadi S, Moulodi F, Bahrami Kamangar B. The effect of grape seed proanthocyanidin extract on the growth and reproduction of convict cichlid (*Amatitlania nigrofasciata*). International Conference on Society and Environment. 2 September 2018. University of Tehran. 2018; 9p. [In Persian]

26. Changizi R, Manouchehri H, Hosseinifard SM, Ghobadi S. Effect of Different levels of biomin Imbo synbiotic on growth indices, feeding factors and survival rate of convict cichlid (*Amatitlania nigrofasciata*). J Appl Biol. 2020;33(3):25-36. [In Persian]

27. Naderi Jolodar M, Abdoli A. Fish species atlas of south Caspian Sea basin (Iranian waters). Iranian Fisheries Research

Research Article

Effects of Quinea Seed Bioactive Peptides Different Levels on Ileum Digestibility, Liver Enzymes Activity, Microbial Population and Intestinal Morphology of Broiler Chickens

Jalil Rezaei, Mohammad Ali Jafari*, Kaveh Jafari Khorshidi

Department of Animal Sciences, Ghaemshahr Branch, Islamic Azad University, Ghaemshahr, Iran

*Corresponding Email: drjafari1349@gmail.com

Received: 27 May 2024

Accepted: 27 January 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1120936

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effects of Quinea Seed bioactive peptides on Ileum digestibility of amino acids, Liver enzymes activity, intestinal morphology and microbial population in broiler chickens. This experiment was used in a completely randomized design with 240 one-day old male commercial Ross 308 broilers in 4 treatments, 4 replications (15 chickens per replication). Birds were fed on basal diets (Control) or basal diets supplemented with 50, 100 and 150 mg Quinea Seed bioactive peptides for 42 d of age. The results showed that the addition of 100 mg of quinoa seed peptide per kg of feed increased the ileal digestibility of crude protein, ether extract, calcium and phosphorus ($p < 0.05$). Also, the ileal digestibility of amino acids histidine, lysine, and methionine in broilers fed with 100 mg of quinoa seed peptide per kg of feed increased ($p < 0.05$), but the digestibility of other amino acids was not affected by the experimental diets. Also, the chickens fed with the diet containing 100 mg peptide had the lowest *Escherichia coli* population, the highest number of lactobacilli in the ileum, the highest villi length and width, and the crypt depth compared to other experimental treatments ($p < 0.05$). Experimental treatments did not have a significant effect on the concentration of liver enzymes ($p > 0.05$). In general, the results of this research showed that the use of 100 mg of quinoa seed peptide per kilogram of feed can improve the digestibility of nutrients and maintain the balance of the intestinal microbial population and improve growth in broiler diets.

Keywords: Quinea Seed peptides, Ileum digestibility, Liver enzymes, Microbial population, Intestinal morphology, Broiler chickens.

تأثیر سطوح مختلف پپتیدهای زیست‌فعال دانه کینوا بر قابلیت هضم ایلئومی، فعالیت آنزیم‌های کبدی، ریخت‌شناسی و جمعیت میکروبی روده جوجه‌های گوشتی

جلیل رضایی، محمدعلی جعفری^{*}، کاوه جعفری خورشیدی

گروه علوم دامی، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم‌شهر، ایران

^{*}مسئول مکاتبات: drjafari1349@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۷

DOI: 10.60833/ascij.2025.1120936

چکیده

پژوهش حاضر به منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف پپتیدهای زیست‌فعال دانه کینوا بر قابلیت هضم ایلئومی اسیدهای آمینه، فعالیت آنزیم‌های کبدی، ریخت‌شناسی و جمعیت میکروبی روده جوجه‌های گوشتی در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. بدین منظور تعداد ۲۴۰ قطعه جوجه گوشتی نر آمیخته راس ۳۰۸ با ۴ تیمار و ۴ تکرار و ۱۵ پرنده در هر تکرار به طور تصادفی در واحدهای آزمایشی قرار داده شدند. جوجه‌های گوشتی با جیره شاهد (فاقد پپتید) و جیره شاهد به همراه مقادیر ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم پپتید زیست‌فعال دانه کینوا در کیلوگرم خوراک برای مدت ۴۲ روز تغذیه شدند. نتایج نشان داد که افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم پپتید دانه کینوا در کیلوگرم خوراک، قابلیت هضم ایلئومی پروتئین خام، عصاره اتری، کلسیم و فسفر را افزایش داد ($p < 0/05$). همچنین قابلیت هضم ایلئومی اسیدهای آمینه هیستیدین، لیزین و متیونین در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با ۱۰۰ میلی‌گرم پپتید دانه کینوا در کیلوگرم خوراک، افزایش یافت ($p < 0/05$) ولی قابلیت هضم سایر اسیدهای آمینه تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت. همچنین جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم پپتید کمترین جمعیت/شیرشیاکلی، بیشترین تعداد لاکتوباسیلوس‌های ایلئوم، بیشترین طول و عرض ویلی و عمق کریپت را نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی دارا بودند ($p < 0/05$). تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری را غلظت آنزیم‌های کبدی نداشتند. بطور کلی نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم پپتید دانه کینوا در کیلوگرم خوراک می‌تواند باعث بهبود قابلیت هضم مواد مغذی و حفظ تعادل جمعیت میکروبی روده و بهبود رشد در جیره جوجه‌های گوشتی گردد.

کلمات کلیدی: پپتیدهای دانه کینوا، قابلیت هضم ایلئومی، آنزیم‌های کبدی، جمعیت میکروبی، ریخت‌شناسی روده، جوجه‌های گوشتی.

مقدمه

آنتی‌بیوتیک که بتواند سیستم دفاعی طبیعی بدن و سلامت دستگاه گوارش حیوان و همچنین تولید یک ماده غذایی سالم جهت تغذیه انسان را فراهم کند، ضروری است. به این منظور، استفاده از مواد افزودنی به خوراک نه فقط با هدف تحریک رشد و بهبود راندمان خوراک بلکه برای بهبود سلامت پرندگان

امروزه به دلیل نگرانی‌های جهانی در زمینه توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی و انتقال ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک از حیوان به انسان، استفاده از آنتی‌بیوتیک به عنوان محرک رشد در امریکا از سال ۱۹۹۶ و در اروپا از اوایل ژانویه ۲۰۰۶ در جیره غذایی حیوانی حذف شده است (۱). بنابراین استفاده از یک جایگزین مناسب

مورد توجه قرار گرفته است. یکی از این فرآورده‌های طبیعی، پتیدها هستند. پتیدها فرآورده‌هایی هستند که پس از هیدرولیز پروتئین‌ها با آنزیم، اسید، قلیا و یا میکروبی (فرآیند تخمیر) حاصل می‌شوند. این تعریف، تمام فرآورده‌های حاصل از هیدرولیز پروتئین‌ها مانند پتیدها، اسیدهای آمینه، مواد معدنی، کربوهیدرات‌ها و چربی‌های همراه با پروتئین را هم دربرمی‌گیرد. با توجه به افزایش سطح اطلاعات و دانش در زمینه تولید پتیدها، امروزه آن‌ها در بخش‌های مختلف مانند صنایع تخمیر، زیست‌فناوری، کشاورزی، زیست محیطی، کنترل علف‌های هرز و جیره غذایی حیوانات کاربرد زیادی دارند (۲). امروزه تولید پتیدها بسیار دقیق‌تر از گذشته انجام می‌شود؛ بدین‌صورت که با به‌کارگیری آنزیم‌ها و تجهیزات و امکانات بیشتر، پتیدهای با اهداف ویژه تولید می‌شود (۳). پتیدها می‌توانند هم از منابع پروتئین‌های حیوانی و پروتئین‌های گیاهی استخراج شوند اما هزینه بالای استخراج پتید از پروتئین‌ها حیوانی سبب محدودیت مصرف آنها شده است، و توجه محققان را به استفاده از پروتئین‌های گیاهی از جمله پروتئین دانه کینوا جهت تهیه پتید معطوف داشته است. گیاه کینوا با نام علمی *Chenopodium quinoa* Willd بومی کوه‌های آند در بولیوی، شیلی و پرو است. کینوا منبع خوبی از اسیدهای آمینه لیزین، متیونین و گوگرددار، ویتامین‌های C، تیامین، ریبوفلاوین، اسید فولیک و ویتامین A و E دارد (۴). ترکیبات پلی‌فنولی زیست‌فعال کینوا شامل فلاونول‌های کورستین و کامفرول گلیکوزیدها به‌عنوان فراوان‌ترین پلی-فنول‌های دانه‌های کینوا به ترتیب با غلظت ۳۶/۷ و ۴۰/۲ میکرومول در ۱۰۰ گرم وزن خشک هستند. فلاونول‌های دانه کینوا دارای خاصیت پاداکسندگی بوده و می‌توانند رادیکال‌های آزاد را مهار کنند. با این وجود دانه خام کینوا به دلیل داشتن ترکیبات ضد مغذی

از قبیل بازدارنده تریپسین، ساپونین، تانن، اگزالات و اسید فیتیک سبب کاهش بهره‌وری از پروتئین، کاهش اشتها، تخریب پرزهای روده و رشد و سرکوب سامانه ایمنی در طیور بویژه طیور جوان می‌گردد. بنابراین جهت استفاده بهینه از ارزش غذایی دانه کینوا استفاده از روش‌های نوین فرآوری همچون روش زیست-فناوری هیدرولیز پروتئینی به منظور استخراج پتیدی ضروری است (۵). پژوهش‌های مختلف نشان داده است که در فرآیند‌های هیدرولیز پروتئین‌ها با روش‌های شیمیایی (محلول‌های اسید و باز)، آنزیمی و تخمیری (میکروبی)، پتیدهای با ویژگی‌های غذاهای فراسودمند: شامل خاصیت آنتی‌اکسیدانی، محرک سیستم ایمنی، ضد میکروبی، تعدیل فشار خون، ضد سرطان و ضد چاقی تولید می‌شود (۶). البته روش استفاده از هیدرولیز آنزیمی پروتئین (آنزیم‌های تجاری) به‌جای روش‌های هیدرولیز شیمیایی و تخمیری به دلیل ارزان و تحت کنترل بودن، دارای مزایای بسیار زیادی است. به همین خاطر در پژوهش حاضر تأثیر هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه کینوا بر قابلیت هضم ایلئومی اسیدهای آمینه، فعالیت آنزیم‌های کبدی، ریخت‌شناسی و جمعیت میکروبی روده و فعالیت آنزیم‌های کبدی جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

زمان و مکان آزمایش: این آزمایش در فروردین و اردیبهشت ماه سال ۱۴۰۰ در یک مزرعه پرورش مرغ گوشتی واقع در استان مازندران، شهرستان ساری انجام شد.

تهیه دانه کینوا و استخراج پتیدهای زیست‌فعال: دانه کینوا مورد نیاز از مزرعه‌ای در استان مازندران، شهرستان آمل تهیه گردید و جهت هیدرولیز پروتئین دانه کینوا به منظور استخراج پتیدهای زیست‌فعال از

خشک می‌شود تا پودر پپتیدهای دانه کینوا به دست آید (۷).

پرنده‌گان و گروه‌های آزمایشی: برای انجام این آزمایش از ۲۴۰ قطعه جوجه خروس گوشتی سویه تجاری راس ۳۰۸ در قالب ۴ تیمار و ۴ تکرار و ۱۵ قطعه در هر تکرار استفاده شد. توزیع تیمارها بین واحدهای آزمایشی به صورت کاملاً تصادفی انجام شد. جوجه‌ها به مدت ۴۲ روز و در قالب سه برنامه تغذیه‌ای آغازین (۱۰-۱ روزگی)، رشد (۲۴-۱۱ روزگی) و پایانی (۴۲-۲۵ روزگی) تغذیه شدند. پرنده‌گان در طول آزمایش دسترسی آزاد به خوراک و آب داشتند. جیره‌های آزمایشی با استفاده از برنامه جیره نویسی WUFFDA تنظیم و همه جیره‌ها با سطوح پروتئین و انرژی قابل متابولیسم یکسان تنظیم شدند. تیمارهای آزمایشی شامل جیره شاهد (فاقد پپتید) و جیره شاهد به همراه مقادیر ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم پپتید زیست‌فعال دانه کینوا در کیلوگرم خوراک بود. برای تنظیم جیره‌ها از مواد مغذی ارائه شده در جداول احتیاجات غذایی جوجه‌های گوشتی راس ۳۰۸ استفاده شد (جدول ۱).

قابلیت هضم مواد مغذی: برای اندازه‌گیری قابلیت هضم مواد مغذی به هر یک از جیره‌های آزمایشی ۰/۳ درصد اکسید کروم اضافه شد. در روز ۳۸ پرورش، ۵ قطعه جوجه از هر واحد آزمایشی انتخاب و در قفس با کف سیمی و دارای سینی‌های جمع آوری فضولات، قرار داده شد. هر قفس مجهز به دانخوری و آبخوری شد. در سن ۴۲ روزگی این جوجه‌ها کشتار شدند. سپس نمونه‌های گوارشی از انتهای ایلئوم جمع‌آوری شده و این نمونه‌ها برای اندازه‌گیری قابلیت هضم مواد مغذی و اسیدهای آمینه استفاده شدند. برای اندازه‌گیری ماده خشک، نمونه‌های مورد نظر در آون ۵۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. پروتئین خام نمونه‌ها توسط دستگاه کلدال و با

روش هیدرولیز آنزیمی (آنزیم پروتئاز تجاری آلکالاز) استفاده شد. بدین منظور ابتدا پودر دانه کینوا در آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۵ مخلوط شده و pH مخلوط حاصل در سطح ۱۰ تنظیم شد. پس از حرارت دادن در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. pH سوپرناتانت حاصل توسط محلول ۱ مول اسید کلریدریک در حد ۴/۵ تنظیم و سپس سانتریفیوژ شد. پروتئین ته نشین شده در آب مقطر حل و pH آن در سطح ۷ تنظیم شد. مایع حاصل ابتدا در دمای ۳۰- درجه سانتی‌گراد منجمد و سپس توسط دستگاه فریز درایر خشک گردید تا پودر پروتئین ایزوله دانه کینوا به دست آید. جهت تهیه پروتئین هیدرولیز دانه کینوا، پروتئین ایزوله دانه کینوا در غلظت ۵ درصد در راکتور ۲۵۰ میلی‌لیتری حل شد. درجه حرارت و pH محلول قبل از شروع فرآیند هیدرولیز در حد اپتیمم فعالیت آنزیم تنظیم گردید. ظرف مخصوص هیدرولیز به روی صفحه مگنتیک داغ قرار داده شده و طی فرآیند هیدرولیز مخلوط به طور دائم بهم زده شد. هیدرولیز پروتئین ایزوله کنجاله کانولا توسط آنزیم پروتئاز تجاری آلکالاز در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۸ pH طی مدت ۴ ساعت با غلظت آنزیم به پروتئین ۱ به ۲۰ انجام شد. طی فرآیند هیدرولیز، pH مخلوط توسط هیدروکسیدسدیم ۱ مول در سطح ۸ ثابت نگهداشته شد. بعد از اتمام هیدرولیز، pH توسط محلول ۱ مول اسید کلریدریک در حد ۴ تنظیم و سپس جهت غیر فعال سازی آنزیم، مخلوط در آب جوش به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد. جهت زدودن ناخالصی‌ها، مخلوط فوق به مدت ۳۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور سانتریفیوژ و مایع حاصل ابتدا در ظروف پتری دیش بزرگ با قطر حدود ۱۵ سانتی‌متر ریخته و در دمای ۳۰- درجه سانتی‌گراد منجمد گردید و محلول منجمد توسط دستگاه فریز درایر طی ۳ روز

روش AOAC اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری میزان چربی نمونه‌ها از روش سوکسله استفاده شد. میزان اسیدهای آمینه موجود در نمونه‌های ایلئومی نیز از طریق کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) انجام شد. تعیین غلظت اکسید کروم نمونه‌های فضولات براساس روش Fenton و همکاران (۱۹۷۹) انجام شد (۸). در پایان برای اندازه‌گیری قابلیت هضم هر یک از مواد مغذی از رابطه زیر استفاده شد:

$$D \text{ (درصد)} = 100 - 100 \times [(A/B) \times (C/E)]$$

D: قابلیت هضم (درصد)، A: غلظت اکسیدکروم نمونه خوراک (درصد)، B: غلظت اکسید کروم نمونه فضولات (درصد)، C: غلظت ماده مغذی نمونه فضولات (درصد)، E: غلظت ماده مغذی نمونه خوراک (درصد)

فعالیت آنزیم‌های کبدی: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کبدی، در سن ۴۲ روزگی از هر واحد آزمایشی دو قطعه جوجه به صورت تصادفی انتخاب و خون‌گیری از سیاهرگ بال آن انجام شد. جوجه‌ها قبل از خون‌گیری به مدت ۴ ساعت ناشتا نگهداری شدند. سپس با استفاده از سرنگ‌های ۳ سی‌سی، مقدار ۳ میلی‌لیتر خون از هر جوجه گرفته شد و بلافاصله به داخل لوله‌های آزمایشی حاوی ماده ضدانعقاد اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید منتقل شد. لوله‌های آزمایشی به آزمایشگاه انتقال داده شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ (VISION مدل VS CFN - ۱۵۰۰۰II، ساخت کره) با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت، تا سرم آنها جدا شود. بعد از جداسازی سرم خون، غلظت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) موجود در نمونه‌های سرم با استفاده از روش آنزیمی PAP-CHOD و با کیت تجاری شرکت پارس آزمون و شرکت زیست‌شیمی تعیین گردید (۹).

ریخت‌شناسی روده: به این منظور بخش (ژژنوم) جوجه‌های مورد آزمایش، در سن ۴۲ روزگی از هر تکرار یک قطعه جوجه با شرایط نزدیک به میانگین وزنی واحد آزمایشی، انتخاب و کشتار شدند. سپس یک قطعه ۲ سانتی‌متری از بخش میانی ژژنوم انتخاب و جداسازی شد و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی، در محلول فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شد. و پاساژ بافت نمونه‌ها شامل سه مرحله آب‌گیری، شفاف‌سازی و آغشته‌گری به ترتیب به وسیله الکل، گزیلول و پارافین مذاب انجام شد. پس از قالب‌گیری و برش‌گیری از بافت‌های مورد نظر از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین استفاده شد. در نهایت طول پرز، عرض ویلی و عمق کریپت با میکروسکوپ نوری اندازه‌گیری شد. ارتفاع پرزها از نوک پرزها به محل اتصال پرز-کریپت اندازه‌گیری و عمق کریپت به عنوان عمق پیچ خوردگی بین پرزهای مجاور تعریف شد.

جمعیت میکروبی روده: به منظور بررسی جمعیت میکروبی روده جوجه‌های مورد آزمایش، در سن ۴۲ روزگی از هر تکرار یک قطعه جوجه با شرایط نزدیک به میانگین وزنی واحد آزمایشی، انتخاب و کشتار شدند. برای ارزیابی جمعیت میکروبی از محتویات بخش انتهایی ایلئوم همراه با روده‌های کور استفاده شد. این نمونه‌ها در داخل لوله‌های استریل قرار داده شد و جهت اندازه‌گیری تعداد کلونی‌های باکتری‌های لاکتوباسیلوس،/شریشیا کولی و جمعیت کل باکتری-های بی‌هوازی به آزمایشگاه ارسال شدند.

شمارش کل باکتری‌ها: برای شمارش کل باکتری‌ها از محیط کشت تریپتیک سوی آگار (Tryptic Soy Agar) استفاده شد. بعد از تهیه محیط کشت، با میکروسمپلر، ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های تهیه شده، بر روی محیط کشت به طور سطحی پخش شد. پلیت-های کشت داده شده مربوط به کل باکتری‌ها بعد از

۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد شمارش شدند (۱۰).

شمارش باکتری‌ها: برای شمارش لاکتوباسیلوس‌ها از محیط کشت MRS استفاده شد. ۰/۱ میلی لیتر از رقت تهیه شده از محتویات روده، بر روی محیط کشت به طور سطحی پخش شد. نمونه‌ها در جای بی‌هوازی و در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند (۱۱). برای شمارش/شریشیا کلی از محیط کشت آگار استفاده شد. ۰/۱ میلی لیتر از رقت تهیه شده از محتویات روده، بر روی محیط کشت به طور سطحی پخش شد. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه قرار گرفت. ظاهر شدن کلنی‌های متمایل به سبز نشان‌دهنده وجود/شریشیا

کلی است (۱۱). در همه موارد پس از اتمام زمان انکوباسیون، کلنی‌ها بعد از شمارش، در عکس رقت مورد استفاده ضرب و سپس لگاریتم کلنی در گرم (Log CFU/g) به دست آمد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: بر پایه طرح کاملاً تصادفی (با ۴ تیمار و ۴ تکرار و ۱۵ پرنده در هر تکرار) با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS 2003 مورد ارزیابی قرار گرفت و برای مقایسه میانگین تیمارهای آزمایشی از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد استفاده شد. مدل آماری مورد استفاده در این آزمایش به صورت زیر بود: $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$ که Y_{ij} : مقدار هر مشاهده، μ : میانگین جامعه، T_i : اثر تیمارها، e_{ij} : خطای آزمایش می‌باشند.

جدول ۱- اجزاء و ترکیبات شیمیایی جیره‌های آزمایشی

Table 1. The ingredients and chemical composition of the experimental diets

Feed ingredients (%)	1-10d	11-24d	25-42d
Corn grain	53.88	57.33	62.2
Soybean meal	40.78	36.98	31.82
Soybean Oil	1.1	1.84	2.41
Dicalcium phosphate	1.84	1.64	1.47
Calcium carbonate	0.87	0.81	0.75
Vitamin supplements	0.05	0.25	0.25
Mineral supplements	0.25	0.25	0.25
DL-Methionine	0.35	0.31	0.28
L-Lysine	0.22	0.16	0.16
L-Threonine	0.08	0.05	0.03
Common salt	0.38	0.38	0.38
Chemical composition (calculated)			
Metabolizable energy (kcal/kg)	2800	2900	3000
Crude protein (%)	21.47	20.11	18.28
Calcium (%)	0.89	0.82	0.75
Available phosphorus (%)	0.40	0.36	0.33
Methionine (%)	0.66	0.60	0.55
Lysine (%)	1.36	1.22	1.10
Na(%)	0.16	0.15	0.15
Cl(%)	0.29	0.29	0.29

*ویتامین‌ها و مواد معدنی در هر کیلوگرم جیره دارای: ۱۵۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A؛ ۲۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D₃، ۲۰ میلی‌گرم ویتامین E، ۵ میلی‌گرم ویتامین K₃، ۲ میلی‌گرم ویتامین B₁، ۵ میلی‌گرم ویتامین B₂، ۲ میلی‌گرم B₆، ۰/۰۵ میلی‌گرم B₁₂، ۱ میلی‌گرم اسید فولیک، ۲۵ میلی‌گرم نیاسین، ۱۲ میلی‌گرم پنتوتونیک اسید، ۰/۱ میلی‌گرم بیوتین، ۷۰ میلی‌گرم منگنز، ۵۰ میلی‌گرم روی، ۵۰ میلی‌گرم آهن، ۵ میلی‌گرم مس، ۱ میلی‌گرم ید، ۰/۱ میلی‌گرم سلنیوم.

Vitamin-mineral mixture supplied per kilogram of diet: Vit A: 15000 IU, Vit D₃: 2000 IU, Vit E: 20mg, Vit K₃: 5 mg, Vit B₂: 5 mg, Vit B₁: 2 mg, VitB₁₂: 0.02 mg, VitB₆: 2 mg, Pantothenic acid: 12 mg, Biotin: 0.1 mg, Niacin: 25 mg, Folic acid: 1 mg, Copper: 5 mg, Iodine: 1 mg, Manganese: 70 mg, Iron: 50mg, Zinc: 50 mg and Selenium: 0.1 mg.

نتایج

قابلیت هضم مواد مغذی: جدول ۲، اثر تیمارهای حاوی سطوح مختلف پپتیدهای دانه کینوا را بر قابلیت هضم ماده خشک، پروتئین خام، عصاره اتری، کلسیم و فسفر نشان می‌دهد. قابلیت هضم ماده خشک در بین تیمارهای آزمایشی اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نمی‌دهد اما تفاوت قابلیت هضم پروتئین خام، عصاره اتری، کلسیم و فسفر در بین تیمارهای آزمایشی معنی‌دار بود ($p < 0/05$) و جوجه‌های دریافت‌کننده جیره حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم دانه کینوا بیشترین و جوجه‌های دریافت‌کننده جیره شاهد کمترین قابلیت هضم پروتئین خام و عصاره اتری را دارا بودند و از نظر قابلیت هضم کلسیم و فسفر بین تیمارهای ۳ و ۴ و همچنین بین تیمارهای ۱ و ۲ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

قابلیت هضم ایلئومی اسیدهای آمینه: با توجه به نتایج جدول ۳، افزودن سطوح مختلف پپتیدهای دانه کینوا به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی تأثیر معنی‌داری بر قابلیت هضم ایلئومی اسیدهای آمینه هیستیدین، لیزین و متیونین در سن ۴۲ روزگی داشت ($p < 0/05$). به طوری که قابلیت هضم ایلئومی اسیدهای آمینه هیستیدین، لیزین و متیونین، در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم پپتید دانه کینوا در کیلوگرم خوراک بیشترین و در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره فاقد پپتید دانه کینوا کمترین مقدار را دارا بودند و قابلیت هضم این اسیدهای آمینه در بین جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح ۵۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم پپتید دانه کینوا در کیلوگرم خوراک تفاوت آماری را نشان نداد ($p > 0/05$). قابلیت هضم سایر اسیدهای آمینه نیز تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ($p > 0/05$).

فعالیت آنزیم‌های کبدی: بررسی داده‌های مربوط به تأثیر سطوح مختلف پپتیدهای زیست‌فعال دانه کینوا بر غلظت آنزیم‌های کبدی در جدول ۴ نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در فعالیت آنزیم‌های کبدی آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینوترانسفراز، آسپارات-آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز در بین جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های مختلف آزمایشی می‌باشد ($p > 0/05$).

جمعیت میکروبی روده: جدول ۵ جمعیت ایلئومی لاکتوباسیلوس، اشریشیا کلی و نیز باکتری کل را در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح مختلف پپتیدهای دانه کینوا در سن ۴۲ روز نشان می‌دهد. نتایج بیانگر اختلاف آماری معنی‌دار در تعداد جمعیت ایلئومی لاکتوباسیلوس و اشریشیا کلی در بین تیمارهای آزمایشی می‌باشد ($p < 0/05$) و بیشترین و کمترین جمعیت ایلئومی لاکتوباسیلوس و اشریشیا کلی به ترتیب در جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با جیره‌های ۱۰۰ و ۰ میلی‌گرم پپتید دانه کینوا در کیلوگرم خوراک مشاهده گردید و بیشترین جمعیت ایلئومی اشریشیا کلی در جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با جیره شاهد مشاهده گردید. مقایسه جمعیت باکتری کل بیانگر عدم تفاوت آماری معنی‌دار در بین تیمارهای آزمایشی می‌باشد ($p > 0/05$).

ریخت‌شناسی روده: با توجه به نتایج جدول ۶، در سن ۴۲ روزگی تفاوت معنی‌داری از نظر طول ویلی، عرض ویلی و عمق کریپت در ناحیه ژرَنوم روده باریک، در بین جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح مختلف پپتیدهای دانه کینوا، مشاهده گردید ($p < 0/05$) و جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با جیره حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم پپتید دانه کینوا در کیلوگرم خوراک در مقایسه با سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری بالاترین مقدار طول ویلی، عرض ویلی و عمق کریپت را دارا بودند. بود و نسبت طول ویلی به عرض ویلی

و طول ویلی به عمق کریپت تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ($p > 0.05$).

جدول ۲- تأثیر سطوح مختلف پپتیدهای زیست‌فعال دانه کینوا بر بر قابلیت هضم ایلئومی جوجه‌های گوشتی (%).

Table 2. The effects of Quinoa Seed bioactive peptides different levels on Ileum digestibility in broiler chickens (%)

	T1	T2	T3	T4	SEM	p-value
Dry Matter	69.25	70.02	70.61	70.65	0.63	0.35
Crude Protein	69.09 ^c	71.64 ^b	73.95 ^a	71.18 ^b	0.65	0.01
Ether Extract	63.28 ^c	64.92 ^b	66.19 ^a	64.57 ^b	0.76	0.03
Calcium	52.70 ^b	51.96 ^b	54.63 ^a	54.25 ^a	0.43	0.04
Phosphorus	43.37 ^b	43.75 ^b	46.85 ^a	46.59 ^a	0.52	0.04

تیمار ۱ (جیره شاهد)، تیمار ۲ (جیره حاوی ۵۰ میلی گرم پپتید زیست‌فعال دانه کینوا در کیلوگرم)، تیمار ۳ (جیره حاوی ۱۰۰ میلی گرم پپتید زیست‌فعال دانه کینوا در کیلوگرم)، تیمار ۴ (جیره حاوی ۱۵۰ میلی گرم پپتید زیست‌فعال دانه کینوا در کیلوگرم). a, b و c: حروف غیرمشابه در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار در بین گروه‌های آزمایشی می‌باشد ($p < 0.05$).

Treatment1, control diet; Treatment2, supplemented with 50mg/kg Quinoa Seed bioactive peptides; Treatment3, supplemented with 100mg/kg Quinoa Seed bioactive peptides; Treatment4, supplemented with 150 mg/kg Quinoa Seed bioactive peptides. ^{a,b,c} Means followed by different letters in the same row are different ($p < 0.05$).

جدول ۳- تأثیر سطوح مختلف پپتیدهای زیست‌فعال دانه کینوا بر قابلیت هضم اسیدهای آمینه در جوجه‌های گوشتی (%).

Table 3. The effects of Quinoa Seed bioactive peptides different levels on Amino Acid Ileum digestibility in broiler chickens (%)

	T1	T2	T3	T4	SEM	p-value
Argenine	82.15	82.05	83.79	82.92	1.05	0.21
Histidine	65.43 ^c	68.87 ^b	70.39 ^a	68.79 ^b	1.11	0.03
Isoleucine	76.70	77.23	75.83	76.66	1.53	0.61
leucine	81.32	82.87	81.15	81.53	1.42	0.34
Lysine	75.80 ^c	76.63 ^b	79.92 ^a	78.79 ^{ab}	1.19	0.03
Methionine	84.73 ^c	85.89 ^b	87.63 ^a	86.23 ^{ab}	1.61	0.02
Phenylalanine	78.65	78.73	77.24	78.66	1.15	0.43
Threonine	69.14	69.26	70.01	70.43	0.71	0.32
valine	76.48	77.62	77.25	77.06	1.13	0.79
Alanine	82.97	82.83	81.60	82.35	0.64	0.43
Aspartic acid	76.57	76.70	75.35	76.45	0.81	0.46
Cysteine	72.36	72.21	72.87	73.01	1.24	0.36
Glutamic acid	83.51	82.90	81.16	83.31	1.52	0.37
Glycine	74.39	76.62	75.94	76.91	1.28	0.39
Tyrosine	77.65	78.07	78.11	77.91	1.28	0.42

a, b و c: حروف غیرمشابه در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار در بین گروه‌های آزمایشی می‌باشد ($p < 0.05$).

^{a,b,c} Means followed by different letters in the same row are different ($p < 0.05$).

جدول ۴- تأثیر سطوح مختلف پپتیدهای زیست‌فعال دانه کینوا بر فعالیت آنزیم‌های کبدی جوجه‌های گوشتی (U/L)

Table 4. The effects of Quinoa Seed bioactive peptides different levels on liver enzymes activity in broiler chickens(U/L)

	T1	T2	T3	T4	SEM	p-value
ALP	1830	1843	1836	1831	164.9	0.271
ALT	14.31	14.11	14.08	14.19	0.83	0.192
AST	96.25	96.37	96.38	96.29	2.73	0.491
LDH	284.93	286.72	286.18	285.24	5.49	0.216

جدول ۵- تأثیر سطوح مختلف پپتیدهای زیست‌فعال دانه کینوا بر جمعیت میکروبی روده جوجه‌های گوشتی (log cfu/g)

Table 5. The effects of Quinoa Seed bioactive peptides different levels on Microbial Population of Intestine in broiler chickens(log cfu/g)

	T1	T2	T3	T4	SEM	p-value
<i>Lactobacillus</i>	6.12 ^c	6.31 ^{bc}	6.97 ^a	6.58 ^{ab}	0.06	0.021
<i>E. coli</i>	6.84 ^a	6.82 ^a	6.03 ^b	6.13 ^b	0.08	0.04
Total bacteria	7.93	8.34	8.52	8.49	0.21	0.27

جدول ۶- تأثیر پپتیدهای زیست‌فعال دانه کینوا بر ریخت‌شناسی روده جوجه‌های گوشتی (میکرومتر)

Table 6. The effects of Quinoa Seed bioactive peptides different levels on the intestinal morphology in broiler chickens (μm)

	T1	T2	T3	T4	SEM	P-value
Villi height	997 ^c	984 ^c	1088 ^a	1054 ^b	3.18	0.01
Vili width	138 ^b	134 ^b	151 ^a	146 ^a	1.06	0.04
Crypt depth	244 ^c	243 ^c	264 ^a	252 ^b	1.86	0.02
villi height / Vili width	7.22	7.34	7.20	7.22	0.16	0.04
villi height /crypt depth	4.09	4.05	4.12	4.18	0.12	0.35

بحث

تقویت و بهبود عطر، طعم و مزه مواد خوراکی می‌شود (۲). بالا بودن نرخ جذب پپتیدهای با وزن مولکولی پایین (دی و تری‌پپتید) در مقایسه با نرخ جذب معادل اسیدهای آمینه آزاد نیز می‌تواند عاملی بر بهبود قابلیت هضم ایلئومی برخی از اسیدهای آمینه در مطالعه حاضر باشد. Demain و Pasupuleti (۲۰۱۰) گزارش کردند که مکانیسم انتقال پپتیدهای کوچک، متفاوت و مجزا از سیستم‌های انتقال اسیدهای آمینه آزاد در حیوانات است و حدود ۷۰ تا ۸۵ درصد از مجموع جذب اسیدهای آمینه موجود در روده باریک در حیوانات سالم، به شکل پپتید صورت می‌گیرد (۲). همچنین پپتیدها می‌توانند با ایجاد تعادل میکروبی دستگاه گوارش، بهبود جمعیت میکروبی مفید روده، افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی، بهبود ریخت

در مطالعه حاضر استفاده از پپتیدهای دانه کینوا در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی، باعث بهبود قابلیت هضم مواد مغذی گردید. پپتیدها با افزایش فعالیت و ترشح آنزیم‌های گوارشی تریپسین، کیموتریپسین و لیپاز می‌توانند قابلیت هضم مواد خوراکی را افزایش دهند (۱۰). پپتیدها با افزایش تعداد و ارتفاع ویلی در دئودنوم، ژژنوم و ایلئوم و عمق کریپت‌های دئودنوم، ژژنوم و ایلئوم و افزایش فعالیت اندوسیتی، سطح جذب مواد غذایی را بالا می‌برند (۱۲). همچنین پپتیدهای با وزن مولکولی پایین به‌ویژه با منشاء گیاهی به عنوان عامل کمک‌کننده در بروز عطر، طعم و مزه در مواد غذایی به‌کار می‌روند و سبب افزایش مصرف خوراک می‌شوند. غلظت بالای اسید آمینه گلوتامیک در مواد خوراکی محتوی پروتئین‌های هیدرولیز سبب

شناسی روده باریک و تحریک سیستم ایمنی موکوسی روده سبب افزایش قابلیت هضم مواد مغذی در جوجه‌های گوشتی شوند (۱۳، ۱۴). Kruse و همکاران (۱۹۹۹) نیز در شرایط آزمایشگاهی گزارش کردند که هیدرولیز تخمیری کنجاله سویا سبب افزایش حلالیت و قابلیت هضم مواد مغذی سویا شد (۱۵). Hang و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که افزودن مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم اولیگو ساکارید در کیلوگرم جیره جوجه‌های گوشتی باعث افزایش جذب روده‌ای کلسیم، منیزیم، فسفر، آهن و پروتئین خام در سن ۲۱ روزگی شد (۳). Karimzadeh و همکاران (۲۰۱۶) جوجه‌های گوشتی را با تیمارهای صفر، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم پپتید کانولا تغذیه کردند و گزارش نمودند که افزودن ۲۵۰ میلی‌گرم پپتید کانولا در جیره جوجه‌های گوشتی سبب افزایش قابلیت هضم ماده آلی، پروتئین خام، عصاره اتری و اسیدهای آمینه ضروری شد (۷). Chen و همکاران (۲۰۰۹) نیز در مطالعه‌ای تاثیر تیمارهای حاوی اسیدآمینه مصنوعی، اولیگوپپتید و مخلوط اسیدآمینه و کازئین را در تغذیه جوجه‌های گوشتی بررسی کردند و افزایش قابلیت هضم اسیدهای آمینه لیزین و آرژنین روده‌ای را در تیمار حاوی اولیگوپپتید مشاهده نمودند و دلیل آن را افزایش ترشح آنزیم‌های پروتئاز به ویژه کیموترپسین و تریپسین گزارش کردند (۱۶). Feng و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که استفاده از کنجاله سویا تخمیری در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی سبب افزایش قابلیت هضم اسید آمینه متیونین و آرژنین روده‌ای در دوره آغازین و رشد شد (۱۷). دلیل افزایش قابلیت هضم اسیدهای آمینه را به تبدیل شدن پپتیدهای بزرگ کنجاله سویا مانند پروتئین‌های آنتی‌ژنیک به پپتیدهای کوچک و کاهش حضور مواد ضد مغذی در اثر فرآیند هیدرولیز تخمیری نسبت دادند. همچنین پپتیدها به ویژه

اولیگوپپتیدها و پلی‌پپتیدها دارای ویژگی پری‌بیوتیکی هستند و به دلیل ماهیت شیمیایی آنها، در بخش‌های بالایی دستگاه گوارش جذب نمی‌شوند و هنگامی که وارد ایلئوم و سکوم می‌شوند به عنوان سوبسترای باکتری‌های مفید این ناحیه از دستگاه گوارش عمل می‌کنند و در نهایت سبب افزایش تولید و ترشح آنزیم‌های گوارشی توسط باکتری‌های مفید روده می‌شوند (۱۸). بررسی جمعیت میکروبی روده در مطالعه حاضر نشان‌دهنده تاثیر مثبت تغذیه پپتید در جیره بر رشد جمعیت لاکتوباسیل‌ها و کاهش جمعیت اشریشیاکلی دارد و مشابه این یافته‌ها، نتایج پژوهش‌های مختلف نشان داد که تغذیه با پپتیدها و پری بیوتیک‌ها، جمعیت باکتریایی مفید موجود در دستگاه گوارش جوجه‌ها را حفظ و ویژگی باکتری‌های مولد اسید لاکتیک تا حد زیادی به فرآورده‌های حاصل از متابولیسم آنها نسبت داده می‌شود. پروبیوتیک‌ها تحت تاثیر پدیده حذف رقابتی با کاهش جمعیت باکتریایی گرم منفی بیماری‌زا مانند /اشریشیاکلی و از راه کاهش pH سبب افزایش جمعیت باکتری‌های گرم مثبت مفید مانند لاکتوباسیل‌های ایلئوم و سکوم روده می‌شوند (۱۹). Choi و همکاران (۲۰۱۳) تاثیر افزودن آنتی‌بیوتیک و سطوح صفر، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم پپتید ضد میکروبی در کیلوگرم خوراک را به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی بررسی و مشاهده نمودند که جمعیت کل باکتری‌های بی‌هوازی، کلی‌فرم‌های فضولات و کلی‌فرم‌های محتوای ایلئوم و سکوم پرندگان تغذیه شده با آنتی‌بیوتیک و ۶۰ میلی‌گرم پپتید ضد میکروبی در کیلوگرم خوراک در مقایسه با تیمار شاهد پایین‌تر بود (۲۰). این پژوهشگران در آزمایشی دیگر جوجه‌های گوشتی را با تیمارهای آنتی‌بیوتیک و سطوح صفر، ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم پپتید ضد میکروبی در کیلوگرم خوراک تغذیه کردند و کاهش معنی‌دار جمعیت کلی فرمی، جمعیت کل

باکتری‌های بی‌هوازی و کلسترییدیوم فضولات و جمعیت کلی‌فرم‌های ایلئوم و سکوم را در مقایسه با گروه شاهد گزارش کردند (۲۱). میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا روده از طریق رها سازی متابولیت‌های مانند لیپو پلی ساکاریدها توسط باکتری‌های گرم‌منفی و اسید لیپوتیکوئیک توسط باکتری‌های گرم‌مثبت سبب التهاب روده میزبان می‌شوند (۲۲، ۲۳) همچنین باکتری‌های گرم‌منفی می‌توانند سبب تغییر ساختاری نمک‌های صفراوی می‌شوند (تبدیل شکل اولیه به شکل ثانویه نمک‌های صفراوی) بنابراین قابلیت هضم و جذب مواد مغذی و انرژی کاهش یافته و در نهایت سبب کاهش بازده انرژی، چربی و پروتئین در میزبان می‌شوند و در مقابل پپتیدها با ویژگی ضد میکروبی خود باعث کاهش جمعیت کل باکتری‌های گرم‌منفی ایلئوم و سبب افزایش قابلیت هضم و جذب مواد مغذی می‌شوند (۲۰). مطابق نتایج پژوهش حاضر، Bao و همکاران (۲۰۰۸) نیز افزایش ارتفاع پرزها و عمق کریپت در دئودنوم و ژژنوم جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با پپتیدهای ضد میکروبی را گزارش کردند (۲۴). در آزمایش دیگری افزایش ارتفاع پرزها و عمق کریپت در دئودنوم و ژژنوم جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با ۱۰ درصد کنجاله کلزا تخمیری مشاهده شد. همچنین نسبت ارتفاع پرزها به عمق کریپت در ژژنوم جوجه اردک‌های تغذیه شده با ۱۰ درصد کنجاله کلزا تخمیری به طور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارها بود (۲۵). Karimzadeh و همکاران (۲۰۱۶) نیز گزارش کردند که ارتفاع پرز و عمق کریپت و نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت دئودنوم، ایلئوم و ژژنوم جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با ۲۵۰ میلی‌گرم پپتیدهای تهیه شده از کنجاله کانولا و پری بیوتیک در کیلوگرم خوراک در مقایسه با سایر گروه‌ها بالاتر بود (۲۶).

Choi و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که استفاده از آنتی‌بیوتیک و ۶۰ میلی‌گرم پپتید ضد میکروبی در کیلوگرم خوراک، ارتفاع پرزهای دئودنوم و ژژنوم و نسبت ارتفاع پرزها به عمق کریپت دئودنوم، ژژنوم و ایلئوم جوجه‌های گوشتی را به طور معنی‌داری افزایش داد. اما تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر عمق کریپت دئودنوم، ژژنوم و ایلئوم نداشت (۱۲). Xu و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که استفاده از کنجاله سویا تخمیری به جای کنجاله سویا در جیره مرغان تخمگذار سبب افزایش ارتفاع پرز و نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت در دئودنوم و ژژنوم می‌شود (۲۷). Jiang و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمارهای حاوی ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم پپتیدهای تهیه شده از کنجاله سویا در کیلوگرم خوراک به طوری معنی‌داری تعداد سلول‌های گابلت و عمق کریپت دئودنوم و ژژنوم افزایش یافت (۲۸). همچنین در آزمایش دیگری Chen و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که افزودن اولیگوپپتید به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی سبب افزایش ارتفاع پرزها و کاهش عمق کریپت شد (۱۶). همچنین He و Wen (۲۰۱۲) گزارش کردند که پپتیدهای ضد میکروبی اثر مثبتی بر ارتفاع پرزها و نسبت ارتفاع پرزها به عمق کریپت دارند در حالی که افزودن آنها به جیره عمق کریپت در دئودنوم و ژژنوم را کاهش داد (۲۹). پپتیدها و پری‌بیوتیک‌ها سبب کاهش باکتری‌های بیماری‌زا در روده (۳۰، ۳۱، ۳۲) و توسعه موکوس بخش‌های مختلف روده باریک می‌شوند و به دنبال آن از طریق افزایش تعداد و ارتفاع پرز دئودنوم، ژژنوم و ایلئوم و عمق کریپت‌های دئودنوم، ژژنوم و ایلئوم و افزایش فعالیت اندوسیتی، سطح جذب مواد مغذی را افزایش می‌دهند (۲۱، ۲۶).

traits, intestinal morphology and microbial population of broiler chickens fed quinoa seed-based diets with phytase or protease supplements and their combination. *Trop Anim Health Prod.* 2021;53:1-8.

5. Heidemann R, Zhang C, Rule QJ, Rozales C, Park S, Chuppa S, et al. The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnology.* 2000; 32:157-167.

6. Brij, PS, Shilpa V, Subrota H. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *J Peptides.* 2014;20:16-22.

7. Karimzadeh S, Rezaei M, Teimouri Yansari A. Effects of Canola bioactive peptides on performance, digestive enzyme activities, nutrient digestibility, intestinal morphology and gut microflora in broiler chickens. *Poult Sci.* 2016;4:27-36.

8. Fenton TW, Fenton M. An improved procedure for the determination of chromic oxide in feed and feces. *Can J Anim Sci.* 1979;59:631-634.

9. Richmond W. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin Chem.* 1973;19:1350-1356.

10. Faddin M, Cand FJ. *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria*, Publisher: Lippincott Williams and Wilkins, 2000; pp: 912.

11. Sallam KI. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control.* 2007;18:566-575.

12. Choi SC, Ingale SL, Kim J, Park YK, Kwon IK, Chae BJ. An antimicrobial peptide-A3: effects on growth performance, nutrient retention, intestinal and faecal microflora and intestinal morphology of broilers. *J Br Poult Sci.* 2013;54:738-746.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم پپتید دانه کینوا در کیلوگرم خوراک، باعث افزایش قابلیت هضم ایلئومی پروتئین خام، عصاره اتری، کلسیم، فسفر، اسیدهای آمینه هیستیدین، لیزین و متیونین در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده گردد ولی قابلیت هضم سایر اسیدهای آمینه تحت تاثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت. همچنین جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم پپتید دانه کینوا در کیلوگرم خوراک، کمترین جمعیت/شیرشیا کلی، بیشترین تعداد لاکتوباسیلوس‌های ایلئوم، بیشترین طول و عرض پرز و عمق کریپت را نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی دارا بودند و تیمارهای آزمایشی تاثیر معنی‌داری را بر تعداد باکتری کل و غلظت آنزیم‌های کبدی نداشتند و بدین ترتیب، استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم پپتید دانه کینوا در کیلوگرم خوراک جهت بهبود قابلیت هضم مواد مغذی، حفظ تعادل جمعیت میکروبی روده و بهبود رشد در جیره جوجه‌های پیشنهاد می‌گردد.

منابع

1. Oveissipour M, Safari R, Motamedzadegan A, Shabanpour B. Chemical and biochemical hydrolysis of persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food Bioproc Technol.* 2012;5:460-465.
2. Pasupuleti VK, Demain A. Protein hydrolysates in biotechnology. ISBN 978-1-4020-6673-3. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 2010.
3. Hang, RL, Yin GY, Wu YG, Zhang, TJ, Li LL, Li MX, et al. Effect of dietary oligochitosan supplementation on ileal digestibility of nutrients and performance in broilers. *Poult Sci.* 2005;84:1383-1388.
4. Asnaashari Amiri MY, Jafari MA, Irani M. Growth performance, internal organ

21. Chen T, She R, Wang K, Bao H, Zang Y, Luo D, et al. Effect of rabbit sacculus rotundus antimicrobial peptides on the intestinal mucosal immunity in chicken. *Poult Sci.* 2008;87:250-254.
22. Niewold TA. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poult Sci.* 2007;86:605-609.
23. Sukhotnik I, Yakirevich E, Coran AG, Siplovich L, Krausz M, Sabo E. et al. Lipopolysaccharide endotoxemia reduces cell proliferation and decreases enterocyte apoptosis during intestinal adaptation in a rat model of short-bowel syndrome. *Pediatr Surg Int.* 2002;18: 615-619.
24. Bao H, She R, Liu T, Zhang Y, Peng KS, Luo D. et al. Effects of pig antibacterial peptides on growth performance and intestine mucosal immune of broiler chickens. *Poult Sci.* 2008;88:291-297.
25. Xu FZ, Li LM, Liu HJ, Zhan K, Qian K, Wu D, Ding XL. Effects of fermented soybean meal on performance, serum biochemical parameters and intestinal morphology of laying hens. *J. Anim. Veterinary Advances.* 2012;5:649-654.
26. Karimzadeh S, Seyfi M, Rezaei M. Effects of native probiotic (Dipro®) on performance growth, digestive enzyme activities and intestinal morphology in broiler chickens. 5th International Veterinary Poultry Congress, Thran, Iran. 2016.
27. Xu FZ, Zeng XG, Ding XL. Effects of replacing soybean meal with fermented rapeseed meal on performance, serum biochemical variables and intestinal morphology of broilers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2012;25:1734-1741.
28. Jiang YB, Yin QQ, Yang YR. Effect of soybean peptides on growth performance, intestinal structure and mucosal immunity of broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 2008;93:754-760.
29. Wen LF, He JG. Dose-response effects of an antimicrobial peptide, a
13. Jin Z, Yang YX, Choi JY, Shinde PL, Yoon SY, Hahn TW, et al. Potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Golden valley) protein as a novel antimicrobial agent in weanling pigs. *J Anim Sci.* 2008;86:1562-1572.
14. Tang JW, Sun H, Yao XH, Wu YF, Wang X, Feng J. Effects of replacement of soybean meal by fermented cottonseed meal on growth performance, serum biochemical parameters and immune function of yellow-feathered broilers. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2012;25(3): 393-400.
15. Kruse H, Johansen BK, Pørivk LM, Schaller G. The use of avoparcin as a growth promoter and the occurrence of vancomycin-resistant enterococcus species in norwegian poultry and swine production. *Microb. Drug Resist.* 1999;5:135-139.
16. Chen B, Cai H, Jing C, Yu H, Tian Y, Li J. Absorptivity of amino acid and oligopeptide mixture in gastrointestinal tract of broiler. *J Chin Poult.* 2009;20:9-14.
17. Feng J, Liu X, Xu ZR, Wang YZ, Liu JX. Effects of fermented soybean meal on digestive enzyme activities and intestinal morphology in broilers. *Poult Sci.* 2007;86: 1149-1154.
18. Jin Z, Shinde PL, Yang YX, Choi JY, Yoon SY, Hahn TW, et al. Use of refined potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) protein as an alternative to antibiotics in weanling pigs. *Livest. Sci.* 2009;124(1-3):26-32.
19. Karimzadeh S, Seyfi M, Rezaei M. Effects of probiotic and prebiotic on growth performance, intestinal bacteria population and carcass chemical composition in broiler chickens. 5th International Veterinary Poultry Congress, Thran, Iran. 2016.
20. Choi SC, Ingale SL, Kim JS, Park YK, Kwon IK, Chae BJ. Effects of dietary supplementation with an antimicrobial peptide-P5 on growth performance, nutrient retention, excreta and intestinal microflora and intestinal morphology of broilers. *Anim Feed Sci Technol.* 2013;185:78-84.

31. Jafari MA, Rezaei J. Effects of Quinoa Seed bioactive peptides on performance, carcass characteristics and immune system of broiler chickens. *J Anim Environ*. 2023; 14(4):325-332. [In Persian]
32. Li F, Cai H. The effect of peptide on growth performance of broilers and its mechanism. *J Acta Zoonutr Sin*. 2005; 12:23-29.
- cecropin hybrid, on growth performance, nutrient utilisation, bacterial counts in the digesta and intestinal morphology in broilers. *Br J Nutr*. 2012;108:1756-1763.
30. Dibner JJ, Richards JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poul Sci*. 2005;84:634-643.

*Research Article***The Effect of Commercial NPN Product on Dairy Cows in Vitro**

**Amin Dindar Safa¹, Mehdi Dehghan Banadaky^{1*}, Hamed Khalilvandi
Behrouzyar², Mehdi Ganjkhanelou¹**

1- Department of Animal Sciences, Faculties of Agriculture and Natural Resources, Tehran University, Karaj, Iran

2- Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

*Corresponding author: dehghanb@ut.ac.ir

Received: 2 February 2025

Accepted: 30 May 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1198439

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of replacing soybean meal (SBM) with slow-release urea (SRU) on in vitro fermentation, gas production parameters, and nutrient disappearance. Five dietary treatments were set up in a completely randomized design including: 1- control diet (without urea); 2- diet containing 0.5% urea (CU) replacing SBM; 3- diet containing 0.5% SRU replacing SBM; 4- diet containing 0.1% CU replacing SBM; and 5- diet containing 0.1% SRU replacing SBM. The gas production of the experimental diets was measured using the standard water displacement method at time series of 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 72, and 96 hours of incubation. After 8 hours of incubation, the highest gas production volume and potential were significantly higher for the diet containing 0.5% SRU instead of SBM ($p < 0.05$). The lowest gas production rate constant was obtained for the fourth diet, which had the highest concentration of conventional urea (0.038 ml/h). The dissociation index value was significant among the experimental diets and the highest value was for the control diet. The highest metabolizable energy value was 23.6 MJ/kg dry matter for the diet containing 0.5% SRU instead of SBM. Significantly, the highest and lowest levels of short-chain fatty acids were obtained for the third diet containing 0.5% SRU instead of SBM and the diet containing 0.1% CU instead of SBM, respectively (0.641 vs. 0.513 mmol). The percentage disappearance of dry matter and crude protein at 12, 24, and 48 hours of incubation was significantly different among the experimental diets. The use of a protected source of urea without having a detrimental effect on the fermentation process and nutrient disappearance would be a suitable alternative to soybean meal.

Keyword: Gas production, Non-protein nitrogen, Nutrient disappearance, Polymer, Slow-release urea.

مقاله پژوهشی

بررسی اثر محصول تجاری NPN (نیتروژن غیرپروتئینی) روی گاوهای شیری در شرایط برون‌تنی

امین دیندار صفا^۱، مهدی دهقان بنادکی^{۱*}، حامد خلیل‌وندی بهروزیار^۲، مهدی گنج‌خانلو^۱

۱- گروه علوم دامی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

*مسئول مکاتبات: dehghanb@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۰۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۱۴

DOI: 10.60833/ascij.2025.1198439

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی تأثیر جایگزینی کنجاله سویا (SBM) با اوره آهسته‌رهش (SRU) بر تخمیر آزمایشگاهی، فراسنجه‌های تولید گاز و ناپدید شدن ماده مغذی روی گاوهای شیری اجرا شد. پنج تیمار غذایی در قالب یک طرح کاملاً تصادفی شامل: ۱- جیره شاهد (بدون اوره)؛ ۲- جیره حاوی ۰/۵ درصد اوره (CU) جایگزین SBM؛ ۳- جیره حاوی ۰/۵ درصد SRU جایگزین SBM؛ ۴- جیره حاوی ۱/۰ درصد CU جایگزین SBM؛ و ۵- جیره حاوی ۱/۰ درصد SRU جایگزین SBM تنظیم شدند. میزان تولید گاز جیره‌های آزمایشی با استفاده از روش استاندارد جابجایی آب در سری‌های زمانی ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوباسیون اندازه‌گیری شد. بعد از ۸ ساعت انکوباسیون به‌طور معنی‌دار بیش‌ترین حجم و پتانسیل گاز تولیدی مربوط به جیره حاوی ۰/۵ درصد SRU جایگزین SBM بود ($p < ۰/۰۵$). کم‌ترین ثابت نرخ تولید گاز برای جیره چهارم که بیش‌ترین غلظت اوره معمولی را دارا بود بدست آمد (۰/۳۸ میلی‌لیتر/ساعت). مقدار شاخص تفکیک در بین جیره‌های آزمایشی معنی‌دار و بیش‌ترین مقدار برای جیره شاهد بود. بیش‌ترین مقدار انرژی قابل متابولیسم مربوط به جیره حاوی ۰/۵ درصد SRU جایگزین SBM برابر ۶/۲۳ مگاژول/کیلوگرم ماده خشک بود. به‌طور معنی‌داری بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار اسیدهای چرب زنجیر کوتاه به ترتیب برای جیره سوم حاوی ۰/۵ درصد SRU جایگزین SBM و جیره حاوی ۱/۰ درصد CU جایگزین SBM بدست آمد (۰/۶۴۱ در مقابل ۰/۵۱۳ درصد میلی‌مول). درصد ناپدید شدن ماده‌ی خشک و پروتئین خام در ساعات ۱۲، ۲۴ و ۴۸ انکوباسیون در بین جیره‌های آزمایشی اختلاف معنی‌دار داشت. استفاده از منبع محافظت شده اوره بدون آن‌که اثر مخربی بر روند تخمیر و ناپدید شدن ماده مغذی داشته باشد، یک جایگزین مناسب برای کنجاله سویا خواهد بود.

کلمات کلیدی: اوره آهسته‌رهش، پلیمر، تولید گاز، ناپدید شدن ماده‌ی مغذی، نیتروژن غیر پروتئینی.

مقدمه

منابع نیتروژنی را برای تولید پروتئین میکروبی شکمبه فراهم می‌کند و معمولاً از خوراک گران‌قیمت، مانند کنجاله سویا (SBM) به دست می‌آید (۱). در ایران، کمبود منابع پروتئینی به یک مشکل عمده در صنعت دامپروری تبدیل شده است، که به‌طور جدی پیشرفت

با توسعه صنعت پرورش نشخوارکنندگان در ایران، چالش‌های مهمی از جمله محدودیت منابع، مخاطرات زیست‌محیطی برای توسعه پایدار و تقاضای پروتئین حیوانی وجود دارد. پروتئین جیره نقش مهمی در تغذیه نشخوارکنندگان ایفا می‌کند و اسیدهای آمینه و

پرورش نشخوارکنندگان در ایران را محدود کرده است. بنابراین، توسعه و استفاده از جایگزین‌های خوراک پروتئینی، از جمله نیتروژن غیرپروتئینی (NPN)، برای کاهش استفاده از SBM یکی از موضوعات مهم و دشوار در حال حاضر ما است (۲). برای نشخوارکنندگان، استفاده از منابع NPN در جیره یک جایگزین عملی برای جایگزین SBM است، زیرا میکروارگانیسم‌های شکمبه می‌توانند NPN را به پروتئین میکروبی تبدیل کنند که ۵۰ تا ۸۰ درصد پروتئین وارد شده به روده کوچک گاو را تشکیل می‌دهد (۳). اوره یک منبع رایج از NPN است که معمولاً برای جایگزینی نسبی SBM استفاده می‌شود، اما هیدرولیز سریع آن در شکمبه و تبدیل به آمونیاک (NH_3) می‌تواند منجر به تجمع بیش از حد NH_3 در شکمبه و افزایش سطح NH_3 خون شود (۴). اوره و چرخه آن در نشخوارکنندگان مجموعه‌ای از فرایندهای شیمیایی متوالی است که نتیجه نهایی آن سنتز اوره در اثر ایجاد تغییرات شیمیایی در آمونیاک است. اوره به دلیل هزینه کم و در دسترس بودن، یک مکمل پروتئینی مهم برای نشخوارکنندگان است (۵). اوره پس از ورود به شکمبه توسط اوره‌آز تولید شده توسط باکتری‌ها به سرعت به آمونیاک تجزیه می‌شود سپس به پروتئین میکروبی سنتز می‌شود. اما سرعت تجزیه اوره در شکمبه بسیار سریع‌تر از سرعت استفاده از آمونیاک توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه است، بنابراین باعث تجمع آمونیاک در شکمبه شده، که در نتیجه آن دفع نیتروژن از طریق ادرار افزایش یافته و آلودگی محیط‌زیست افزایش می‌یابد (۶). همزمان‌سازی احتیاجات میکروبی با تامین نیتروژن در شکمبه یک استراتژی تغذیه‌ای مهم برای بهبود بازده انرژی شکمبه و استفاده از نیتروژن است (۴).

اوره آهسته‌رهش (SRU) یک منبع کارآمد از NPN است (۷). امروزه استفاده از ترکیبات NPN پوشش‌دار در اشکال مختلف از جمله بیورت، فسفات اوره، اوره محافظت‌شده با روغن، فرمالدهید و یا پلیمر وجود دارد (۸). پوشش‌دار کردن اوره به روش‌های مختلف این امکان را می‌دهد که نیتروژن اوره به تدریج در شکمبه آزاد شود و استفاده از مواد مغذی توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه را بهبود بخشد. تحقیقات بسیاری بر روی اثرات این محصولات صورت گرفته است به‌طوری که نشان داده شده است اگر چه SRU نسبت به SBM نیتروژن بیش‌تری آزاد می‌کند، اما سبب غلظت بالای آمونیاک در محیط شکمبه نیز می‌شود، با این حال می‌توان تا ۱ درصد از مقدار SBM را با SRU جایگزین کرد بدون این‌که عملکرد تولیدی در گاوهای شیرده تحت تاثیر قرار گیرد (۲، ۳، ۴، ۷، ۸). در این خصوص، نتایج ارائه شده به‌طور قابل ملاحظه‌ای متفاوت است که احتمالاً به نرخ آزادسازی اوره، مقدار گنجانیدن در جیره روزانه، نوع جیره، جمعیت میکروبی شکمبه و صفات میزبان مانند جذب NH_3 شکمبه و سرعت عبور مواد مایع و جامد بستگی دارد. اصلی‌ترین محصولات SRU مورد استفاده در نشخوارکنندگان اوره پوشش داده شده با پلیمر است اما با سایر روش‌های محافظت شده قیمت زیادی دارد ولی در گاوهای پرواری نشان داده‌اند که SRU عملکرد حیوانات را بدون تأثیر بر تخمیر شکمبه بهبود می‌بخشد (۹)، اما اثرات آنها برای قابلیت هضم و تخمیر در شرایط آزمایشگاهی به‌ندرت گزارش شده است. بنابراین، هدف از اجرای این آزمایش، بررسی جایگزینی کنجاله سویا با منبع نیتروژن غیرپروتئینی آهسته‌رهش محافظت شده بر تخمیر آزمایشگاهی، فراسنجه‌های تولید گاز و میزان ناپدید شدن ماده مغذی با روش اصلاح یافته بود.

مواد و روش‌ها

برای این آزمایش ابتدا یک جیره کاملاً مخلوط (TMR) توسط نرم‌افزار CPMDairy (نسخه 3.0.8.01) برای گاوهای شیرده (15 ± 680 کیلوگرم وزن بدن) با تعداد روزهای شیردهی 13 ± 100 روز و مقدار ۴۵ کیلوگرم تولید شیر فرموله شد (جدول ۱). جیره‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند، سپس با الک ۱ میلی‌متری آسیاب شدند (۱۰). پنج جیره آزمایشی حاوی نیتروژن و انرژی برابر فرموله شدند که عبارتند از: ۱) جیره شاهد (بدون اوره؛ ۲) جیره حاوی ۰/۵ درصد CU جایگزین SBM (۰/۵CU؛ ۳) جیره حاوی ۰/۵ درصد SRU جایگزین SBM (۰/۵SRU؛ ۴) جیره حاوی ۱/۰ درصد CU جایگزین SBM (۱/۰CU؛ ۵) جیره حاوی ۱/۰ درصد SRU جایگزین SBM (۱/۰SRU) بود. تجزیه شیمیایی جیره‌های غذایی با استفاده از روش‌های استاندارد AOAC (۱۱) اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری میزان تولید گاز با استفاده از روش فدوراک و هرودی (۱۲) در آزمایشگاه تغذیه گروه علوم دامی دانشگاه تهران انجام شد. از جیره‌های کاملاً مخلوط آسیاب شده با الک ۱ میلی‌متری مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم توزین و داخل ویال‌های مخصوص ۶۰ میلی‌لیتری استریل ریخته شد (۱۳). تعداد ۶ تکرار به ازای هر تیمار، برای سری زمان‌های انکوباسیون در نظر گرفته شد. نمونه مایع شکمبه از ۲ رأس گاو شیری هلشتاین مزرعه دانشگاه تهران با وزن بدن 15 ± 580 کیلوگرم و شکم زایش ۲ که با نسبت علوفه به کنساتره ۵۰ به ۵۰ به مدت ۱۰ روز تغذیه شده بودند، جمع‌آوری و با پارچه تمیز ۲ لایه‌ای صاف و در ظرف درپوش‌دار محتوی گاز CO₂ در مدت زمان کوتاه به آزمایشگاه منتقل گردید. طبق روش مکدوگال (۱۴) مایع شکمبه و بافر به نسبت ۱ به ۲ تهیه شد. سپس مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از مخلوط مایع شکمبه و بافر

در هر ویال حاوی نمونه، ریخته شد و با استفاده از درپوش لاستیکی پس از بی‌هوازی نمودن محیط داخل ویال‌ها (ویال) درب آن محکم بسته شد و در دستگاه انکوباتور شیکردار در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد با ۶۰ دور در دقیقه برای زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت قرار داده شد. به‌منظور تصحیح مواد خوراکی، تخمیر و تولید گاز با منشاء مایع شکمبه در هر دوره انکوباسیون نمونه بلانک نیز در نظر گرفته شد. مقدار گاز تولیدی ناشی از تخمیر ماده غذایی مورد آزمایش به روش فدوراک (جایجایی آب مایع) قرائت و ثبت گردید (۱۲). تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به فراسنجه‌های کینتیک تولید گاز توسط معادله پیشنهادی ارسکوف و مک‌دونالد (۱۵) و با استفاده از رویه NLIN و نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ و Fitcurve برآورد شد. فرمول (۱): $GP = A [1 - e^{-k(t-Lag)}]$ که GP: گاز تولیدی تجمعی در زمان t؛ A: پتانسیل تولید گاز بر حسب میلی‌لیتر بر گرم ماده‌ی خشک؛ C: ثابت نرخ تولید گاز در واحد زمان؛ Lag: زمان تاخیر؛ و t مدت زمان انکوباسیون (ساعت) و e عدد ثابت نپرین (۲/۷۱۸) می‌باشد. شاخص بخش-پذیری جیره‌های آزمایشی بر اساس روش بلومل و همکاران، (۱۶) اندازه‌گیری شد. و برای محاسبه شاخص بخش‌پذیری از فرمول‌های (۲) و (۳) استفاده گردید:

فرمول (۲):

= ماده آلی هضم شده حقیقی (میلی‌گرم)

[خاکستر - باقیمانده - مقدار اولیه]

فرمول (۳):
$$\frac{\text{میلی‌گرم ماده آلی حقیقی هضم شده}}{\text{میلی‌لیتر گاز تولیدشده}} = \frac{\text{شاخص بخش‌پذیری}}{\text{شاخص بخش‌پذیری}}$$

تولید توده میکروبی و بازده تولید توده میکروبی بر اساس روش بلومل و بولردیک (۱۷) و با استفاده از

فرمول‌های (۴) و (۵) محاسبه گردید. فرمول (۴):
 $MBP = [TDOM - (gas \text{ at } t_{1/2} \times SF)]$
 MBP: تولید توده میکروبی، TDOM: ماده آلی هضم شده حقیقی، $gas \text{ at } t_{1/2}$: مقدار گاز تولید شده در زمان ۱/۲، SF: که فاکتور ثابت که برای مواد خشبی ۲/۲ و برای مواد کنسانتره‌ای ۲/۳۴ در نظر گرفته می‌شود. فرمول (۵):
 $EMBS = (MBP/TDOM) \times 100$
 EMPS: بازده تولید توده میکروبی، MBP: تولید توده میکروبی بر حسب میلی‌گرم، TDOM: ماده آلی واقعاً هضم شده بر حسب میلی‌گرم در گرم ماده خشک می‌باشند. به منظور بررسی اثرات محصول تجاری اوره آهسته‌رهش [پرشیا مین@] بر قابلیت هضم ماده‌ی مغذی با استفاده از یک روش برون‌تنی اصلاح یافته توسط پرینان و همکاران (۱۸) مشابه تکنیک تولید گاز انجام شد. جیره کاملاً مخلوط تهیه‌شده برای هر پنج تیمار به مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم توزین و در کیسه‌های پلی‌استر (با اندازه منافذ ۴۵ میکرومتر) با ابعاد ۳×۵×۲ سانتی‌متر ریخته و درب کیسه‌ها توسط پرس حرارتی مهر و موم گردید. کیسه‌های حاوی ماده خوراکی مورد آزمایش در داخل شیشه‌های ۱۲۰ میلی‌لیتری قرار داده شد. سپس ویال‌ها در داخل انکوباتور شیکردار و در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. برای اندازه‌گیری قابلیت‌هضم ماده‌ی مغذی هر تیمار در هر دوره زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸ ساعت تعداد ۶ تکرار در نظر گرفته شد. در پایان هر دوره انکوباسیون، شیشه‌های مربوطه به همراه شیشه‌های

بلانک آن دوره برداشته‌شده و کیسه‌های داخل شیشه‌ها تخلیه شدند، برای اطمینان از حذف هرگونه آلودگی میکروبی توسط میکروارگانیزم‌های شکمبه، کیسه‌های تخلیه‌شده با بافر فسفات مطابق با روش پرینان و همکاران، (۱۹) شستشو گردید. داده‌های نمونه خوراک باقیمانده برای اندازه‌گیری میزان ناپدید شدن پروتئین خام (۱۱) و فیبر شوینده خنثی (۲۰) تجزیه و قابلیت‌هضم ماده‌ی مغذی CP و NDF در شرایط آزمایشگاهی (IVBCD) به صورت فرمول (۶) محاسبه گردید:

$$IVBCD = \frac{\{[(درصد ماده مغذی خوراک باقیمانده) \times (گرم خوراک باقیمانده)] - [(درصد ماده مغذی جیره کاملاً مخلوط) \times (گرم جیره کاملاً مخلوط)]\}}{[(درصد ماده مغذی جیره کاملاً مخلوط) \times (گرم جیره کاملاً مخلوط)]}$$

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های مربوط به فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری و تولید گاز با استفاده از طرح کاملاً تصادفی و رویه‌ی GLM نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (فرمول ۷) و مقایسه میانگین‌ها در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد و با آزمون دانکن انجام شد. فرمول (۷): $Y_i = \mu + T_i + e_i$ که در این مدل مشاهدات (Y_i)؛ میانگین کل (μ)؛ اثر تیمار (T_i)؛ اثر خطای آزمایشی (e_i) بود.

جدول ۱- اجزا و ترکیبات شیمیایی جیره‌های آزمایشی

Table 1. Components and chemical compositions of experimental diets

Food	Experimental diets*				
	Control	0.5CU	0.5SRU	1.0CU	1.0SRU
Diet components based on dry matter (%)					
Corn silage	23.84	23.54	23.59	23.75	23.67
Alfalfa	14.09	13.91	13.94	14.03	13.99
Wheat straw	2.21	2.18	2.18	2.20	2.19
Crushed corn kernels	23.45	23.16	23.21	23.37	23.28
Crushed barley grain	9.87	9.74	9.77	9.83	9.80
Wheat bran	0.58	4.20	5.97	2.62	4.30
Cottonseed meal	4.37	4.32	4.33	4.36	4.34
Soybean meal	10.06	7.26	4.56	8.02	5.96
Corn gluten meal (60% CP)	2.90	2.87	3.29	2.89	3.27
Fat powder	1.78	1.76	1.76	1.77	1.77
Dicalcium phosphate	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Calcium carbonate	0.37	0.36	0.36	0.39	0.38
Sodium bicarbonate	0.97	0.96	0.96	0.96	0.96
Vitamins and minerals**	0.62	0.61	0.61	0.62	0.61
Magnesium oxide	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
Zeolite	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
Salt	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Regular urea (281% CP)	0	0.30	0	0.61	0
Slow-release urea (220% CP)	0	0	0.30	0	0.61
Chemical analysis (DM%)					
DM	52.11	52.41	52.38	52.19	52.29
(Mcal/kg) NEI	1.55	1.54	1.53	1.54	1.53
CP	14.69	14.68	14.88	14.71	14.89
NDF	35.3	35.43	35.37	35.34	35.27
ADF	20.35	20.00	19.71	20.12	19.86
EE	4.36	4.32	4.30	4.34	4.31
Ash	8.25	8.19	8.13	8.22	8.15

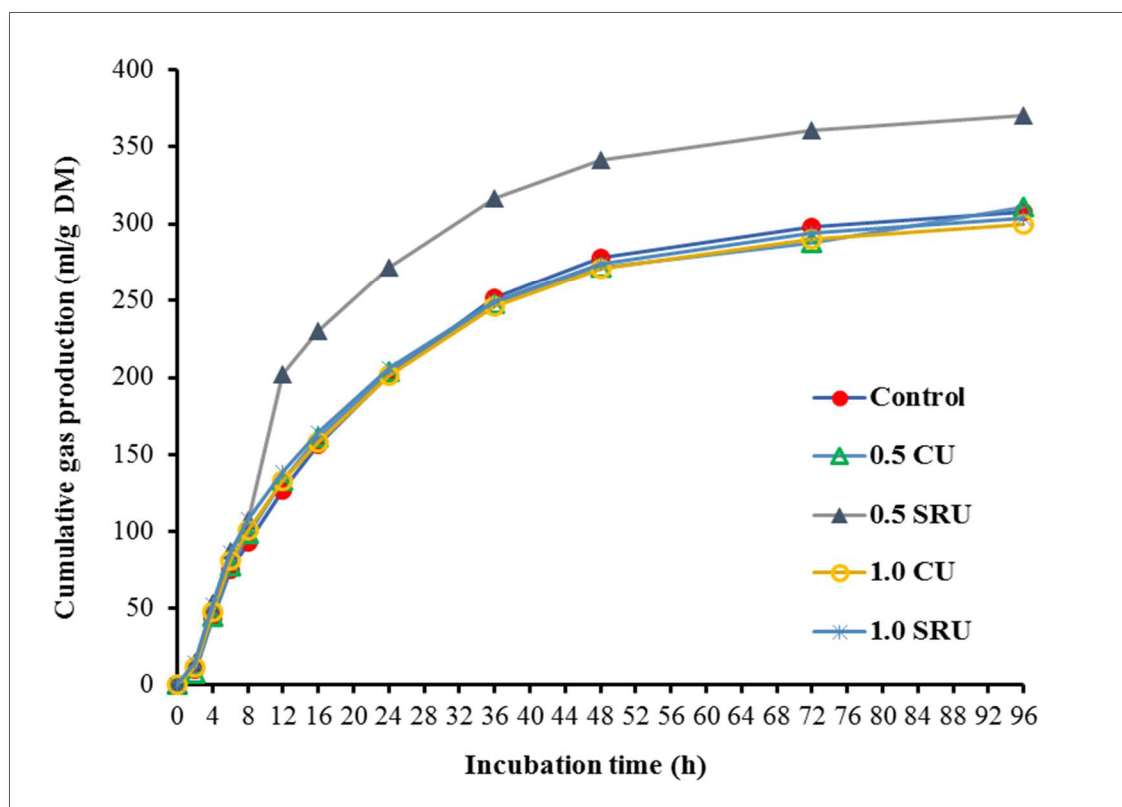
* جیره آزمایشی Control: جیره شاهد (بدون اوره)؛ 0.5CU: جیره حاوی ۰/۵ درصد CU جایگزین SBM؛ 0.5SRU: جیره حاوی ۰/۵ درصد اوره آهسته‌رهش (SRU) جایگزین SBM؛ 1.0CU: جیره حاوی ۱/۰ درصد CU جایگزین SBM؛ و 1.0SRU: جیره حاوی ۱/۰ درصد SRU جایگزین. ** مکمل معدنی و ویتامینی: کلسیم: ۱۷۰ گرم، فسفر ۶۰ گرم، منیزیم: ۱۰۰ گرم، منگنز: ۱۳۰۰۰ میلی‌گرم، مس: ۵۰۰۰ میلی‌گرم، آهن: ۴۰۰۰ میلی‌گرم، کبالت: ۸۰ میلی‌گرم، سلنیوم: ۱۱۰ میلی‌گرم، ید: ۲۰۰ میلی‌گرم، ویتامین A: ۱,۲۵۰,۰۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین D₃: ۳۰۰,۰۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین E: ۶۰۰۰ واحد بین‌المللی. DM: ماده خشک؛ NEI: انرژی خالص برای شیردهی؛ CP: پروتئین خام؛ EE: عصاره اتری؛ NDF: الیاف شوینده خنثی؛ ADF: الیاف شوینده اسیدی؛ Ash: خاکستر.

* Control diet: control diet (without urea); 0.5CU: diet containing 0.5% CU replacing Soybean meal (SBM); 0.5SRU: diet containing 0.5% Slow-release urea (SRU) replacing SBM; 1.0CU: diet containing 0.1% CU replacing SBM; and 1.0SRU: diet containing 0.1% SRU replacing SBM. ** Mineral and vitamin supplement: Calcium: 170 g, Phosphorus 60 g, Magnesium: 100 g, Manganese: 13,000 mg, Copper: 5,000 mg, Iron: 4,000 mg, Cobalt: 80 mg, Selenium: 110 mg, Iodine: 200 mg, Vitamin A: 1,250,000 IU, Vitamin D₃: 300,000 IU, Vitamin E: 6,000 IU. DM: dry matter; NEI: net energy for lactation; CP: crude protein; EE: ether extract; NDF: neutral detergent fiber; ADF: acid detergent fiber; Ash: ash.

نتایج

بیش‌ترین و کم‌ترین پتانسیل تولید گاز به ترتیب مربوط به جیره حاوی ۰/۵ درصد SRU جایگزین SBM و جیره حاوی ۱/۰ درصد CU جایگزین SBM (۳۱۲/۷۵ در مقابل ۲۶۵/۰۱ میلی‌لیتر در ساعت) بود ($p < ۰/۰۰۱$). بیش‌ترین ثابت نرخ تولید گاز برای جیره شاهد (۰/۰۵۶ میلی‌لیتر در ساعت) و کم‌ترین آن برای جیره حاوی ۱/۰ درصد CU جایگزین SBM بدون منبع اوره (۰/۰۳۸ میلی‌لیتر در ساعت) مشاهده شد.

داده‌های مربوط به روند تخمیر تولید گاز در ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوباسیون در شکل (۱) نشان می‌دهد که در ساعات اولیه انکوباسیون (تا ۸ ساعت) روند تخمیر تحت تاثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت و یکسان بود (۰/۰۵) ($p < ۰/۰۰۱$). که می‌تواند ناشی از تأخیر در اتصال میکروارگانیسم‌ها به سوبسترا و رقابت بین جمعیت میکروبی در این اتصال باشد. داده‌های فراسنجه‌های تولید گاز ارائه شده در جدول (۲) نشان داد که



شکل ۱- منحنی روند تولید گاز در ساعات انکوباسیون ($p < ۰/۰۰۵$)

Fig. 1. Gas production trend curve during incubation hours ($p < 0.05$)

جدول ۲- نتایج تولید گاز و فراسنجه‌های تغذیه‌ای گاز تولیدی جیره‌های آزمایشی حاوی منابع مختلف نیتروژن غیرپروتئینی

Table 2. Results of gas production and nutritional parameters of gas produced by experimental diets containing different NPN sources

	Experimental groups					SEM	p-value
	Control	0.5CU	0.5SRU	1.0CU	1.0SRU		
A	295.62a	284.99b	312.75a	265.01c	280.41b	7.355	< 0.001
C	0.056a	0.042bc	0.052a	0.038c	0.045b	0.002	< 0.001
IVOMD	73.05a	70.88ab	74.32a	62.45c	69.11bc	4.249	0.002
PF	4.78a	3.26c	4.48b	3.03c	4.13b	0.211	< 0.001
MBP	101.42a	82.84b	105.36a	75.45c	83.11b	4.955	< 0.001
EMBP	0.49a	0.48ab	0.52a	0.43c	0.48ab	0.011	< 0.001
ME	6.15a	5.88bc	6.23a	5.54c	6.01ab	0.428	0.01
SCFA	0.611b	0.525c	0.641a	0.513d	0.617a	0.118	< 0.001

* کنترل: جیره شاهد (بدون اوره)؛ 0.5CU: جیره حاوی ۰/۵ درصد CU جایگزین SBM؛ 0.5SRU: جیره حاوی ۰/۵ درصد SRU؛ 1.0CU: جیره حاوی ۱/۰ درصد CU جایگزین SBM؛ 1.0SRU: جیره حاوی ۱/۰ درصد SRU جایگزین؛ A: حداکثر پتانسیل تولید گاز (تولید گاز بخش محلول و غیرمحلول) برحسب میلی‌لیتر/ساعت؛ C: ثابت نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر/ساعت)؛ PF: شاخص تفکیک براساس میلی‌گرم ماده آلی قابل هضم به حجم گاز تولیدی؛ EMPS: راندمان تولید توده میکروبی، MBP: تولید توده میکروبی بر حسب میلی‌گرم، IVOMD: ماده آلی قابل تجزیه در شرایط آزمایشگاهی براساس درصد؛ ME: انرژی قابل متابولیسم برحسب مگاژول در کیلوگرم ماده خشک؛ SCFA: اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (میلی‌مول)؛ SEM: میانگین خطای استاندارد؛ حروف غیر مشترک در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار است ($p < 0.05$).

* Control: control diet (without urea); 0.5CU: diet containing 0.5% CU as a substitute for SBM; 0.5SRU: diet containing 0.5% SRU as a substitute for SBM; 1.0CU: diet containing 0.1% CU as a substitute for SBM; and 1.0SRU: diet containing 0.1% SRU as a substitute for SBM; A: maximum gas production potential (gas production of soluble and insoluble fractions) in ml/h; C: gas production rate constant (ml/h); PF: separation index based on mg of digestible organic matter per volume of gas produced; EMPS: microbial mass production efficiency; MBP: microbial mass production in mg; IVOMD: in vitro degradable organic matter in percent; ME: metabolizable energy in megajoules per kilogram of dry matter; SCFA: short-chain fatty acids (mmol); SEM: standard error of the mean; Non-common letters in each row indicate significant differences ($p < 0.05$).

جدول ۳- نتایج ناپدید شدن ماده‌ی مغذی جیره‌های آزمایشی حاوی منابع مختلف NPN

Table 3. Nutrient disappearance results of experimental diets containing different NPN sources

Incubation time	Experimental diets*					SEM	<i>p</i> -value
	Control	0.5CU	0.5SRU	1.0CU	1.0SRU		
Dry matter (%)							
12h	65.38a	62.12a	64.48a	59.36b	63.08a	4.56	0.039
24h	76.74a	67.51bc	75.24a	62.08c	69.35b	5.62	0.043
48h	84.29a	70.22bc	81.55a	68.14c	75.71b	5.77	0.001
Crude protein (%)							
12h	55.18a	50.19b	52.02b	48.77b	50.35b	5.32	0.031
24h	69.09a	53.11c	64.85b	51.33c	60.74b	6.12	0.002
48h	82.41a	65.55c	78.43ab	63.97c	73.87bc	6.85	0.015

* کنترل: جیره شاهد (بدون اوره)؛ 0.5CU: جیره حاوی ۰/۵ درصد CU جایگزین کنجاله سویا (SBM)؛ 0.5SRU: جیره حاوی ۰/۵ درصد SRU جایگزین؛ 1.0CU: جیره حاوی ۱/۰ درصد CU جایگزین SBM؛ 1.0SRU: جیره حاوی ۱/۰ درصد SRU جایگزین؛ SEM: میانگین خطای استاندارد، حروف غیرمشترک در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار است ($p < 0.05$).

* Control: control diet (without urea); 0.5CU: diet containing 0.5% CU as a substitute for SBM; 0.5SRU: diet containing 0.5% SRU as a substitute for SBM; 1.0CU: diet containing 0.1% CU as a substitute for SBM; and 1.0SRU: diet containing 0.1% SRU as a substitute for SBM; SEM: standard error of the mean; different letters in each row indicate significant differences ($p < 0.05$).

بحث

در راستای نتایج بدست آمده عنوان شده است در زمان‌های اولیه انکوباسیون بعلت تجزیه سریع اوره به آمونیاک و در دسترس بودن نیتروژن آزاد برای میکروارگانیسم‌های موجود در محیط کشت، سرعت تخمیر مواد مغذی بالا بوده و حجم گاز تولیدی تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۱۳، ۲۱). در مطالعه‌ی که اخیراً گزارش گردید عنوان شده است گازی که طی ساعات اولیه انکوباسیون تولید می‌شود گاز تولیدی مرتبط با بخش سریع‌الهضم (محلول) می‌باشد (۱۳). با گذشت زمان یعنی در ۸ ساعت بعد از انکوباسیون حجم گاز تولیدی برای جیره حاوی ۰/۵ درصد SRU جایگزین SBM به‌طور معنی‌دار نسبت به جیره شاهد و سایر جیره‌های حاوی نیتروژن غیرپروتئینی افزایش یافت. راب و همکاران (۲۲) تکنیک تولید گاز را به‌عنوان روشی برای تخمین تجزیه‌پذیری پروتئین خوراک‌های رایج پیشنهاد کرد. با این‌حال، مشخص شده است که همزمانی بین انرژی سهل‌الهضم و نیتروژن تجزیه‌پذیر در شکمبه تأثیر مهمی در سنتز پروتئین میکروبی و مانع از هدرروی نیتروژن به شکل آمونیاک می‌شود (۲۳). با توجه به منحنی تولید گاز تیمار حاوی ۰/۵ درصد SRU جایگزین SBM تا زمان ۹۶ ساعت حجم گاز تولیدی بیش‌تری نسبت به سایر تیمارها نشان داد. منحنی تولید گاز با توجه به ماهیت ماده تخمیر شونده شامل دو مرحله است بخش محلول در آب و بخش دیگر ماده نامحلول در آب می‌باشد (۱۳). که منحنی سیگموئیدی (S) را تشکیل می‌دهد و سه مرحله‌ای می‌باشد شامل نفوذ آب به ذرات خوراک و چسبیدن باکتری، مرحله دوم به‌صورت نمایی و بیانگر هضم آنزیمی بوده و نهایتاً تولید گاز متوقف شده و به مرحله صفر می‌رسد (۲۲). در مطالعه‌ی حاضر کلیه منحنی‌های تولید گاز از الگوی فوق تبعیت کرد. اندک گاز تولیدی در ساعات پایانی ناشی از لاشه

باکتری‌های تولید شده ناشی از تخمیر می‌باشد که خود سوبسترای دیگر اجرام میکروبی داخل ویال‌ها بوده که طبق گزارش لوپز و همکاران (۲۴) مقدار گاز تولید شده جزئی در ساعات پایانی انکوباسیون را توجیه می‌کند. مطالعات قبلی گزارش دادند غلظت بالای آمونیاک به‌واسطه اشباع شدن محیط و سمیت برای باکتری‌های شکمبه باعث کاهش هضم‌پذیری ذرات خوراک می‌گردد (۲۵، ۲۶). در مطالعه حاضر مقدار ماده آلی تجزیه‌شده برای سوبسترهای مورد بررسی در زمان $T_{1/2}$ برای جیره حاوی ۰/۵ درصد SRU جایگزین SBM همانند جیره شاهد نسبت به جیره‌های حاوی ۰/۵ و ۱/۰ درصد CU جایگزین SBM بیش‌تر بود. بیش‌ترین مقدار شاخص تفکیک (PF) برای جیره شاهد و کم‌ترین مقدار برای جیره حاوی ۱/۰ درصد CU جایگزین SBM بود. در مطالعه حاضر مقادیر شاخص تفکیک (PF) از ۳/۰۳ تا ۴/۷۸ متغیر بود و در محدوده نظریه‌ی بلومل و همکاران (۱۷) بود که دامنه شاخص تفکیک را ۲/۷۵ تا ۴/۴۱ گزارش کردند؛ همسو با نتایج حاضر، صادقی و همکاران نیز در مطالعه‌ی خود شاخص تفکیک را در این محدوده‌ی عنوان نمودند و بیش‌ترین مقدار PF را برای تیماری که حاوی ۰/۳۸ درصد ماده خشک از SRULab در جیره لحاظ شده بود، گزارش کردند (۱۳). حداکثر نمودن تولید پروتئین میکروبی از خوراک تخمیر شده در شکمبه به‌عنوان یک اصل در تغذیه نشخوارکنندگان پذیرفته شده است به‌طوری که افزایش بازدهی پروتئین میکروبی منجر به افزایش پروتئین عبوری از شکمبه به روده باریک می‌گردد و در عوض باعث کاهش اتلاف کربن خوراک در قالب گازهای تخمیری می‌گردد (۱، ۲۷). تولید توده میکروبی (MBP) و راندمان تولید توده میکروبی (EMBP) برای جیره حاوی ۰/۵ درصد SRU جایگزین SBM و جیره شاهد بیش‌ترین مقدار

مشاهده شد (جدول ۲). همسو با نتایج ما، صادقی و همکاران گزارش کردند با افزایش غلظت اوره راندامان تولید پروتئین میکروبی کاهش یافت (۱۳). عنوان شده است که بیشتر از ۶۰ درصد نیتروژن اوره‌ای که از شکمبه گاوهای شیرده خارج می‌شود را پروتئین میکروبی تشکیل می‌دهد (۲۸، ۲۹) و حدود ۸۰ درصد این پروتئین در روده باریک گوارش‌پذیری دارد و نسبت اسید آمینه‌های لیزین و متیونین در پروتئین میکروبی با نسبت این اسیدهای آمینه در شیر مشابه می‌باشد (۳۰). بنابراین اتخاذ هر استراتژی که بتواند منجر به تولید حداکثر پروتئین میکروبی شود نه تنها بازدهی نیتروژن مصرفی را افزایش می‌دهد بلکه باعث کاهش هزینه‌های تمام شده خوراک و نیز کاهش آلودگی‌های محیط زیستی می‌گردد (۱). گزارش شده است بعلت آزادسازی تدریجی اوره در فرم محافظت شده آن بخش محلول‌پذیری کاهش یافته و از اشباع تولید آمونیاک در ویال انکوباسیون جلوگیری می‌کند که منجر به افزایش بازده تولید پروتئین میکروبی می‌شود (۱۳، ۳۱). بیش‌ترین مقدار انرژی قابل متابولیسم مربوط به جیره حاوی ۰/۵ درصد SRU جایگزین SBM برابر ۶/۲۳ مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک بود. جیره‌های حاوی نیتروژن غیر پروتئینی محافظت شده با پلیمر (جیره سوم و پنجم) از نظر ME نسبت به جیره شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت ($p > 0/05$)، اما جیره‌های حاوی اوره معمولی ME کم‌تری نسبت به جیره شاهد و جیره حاوی ۰/۵ و ۱/۰ درصد SRU جایگزین SBM برابر بودند ($0/05 < p$). همچنین به طور معنی‌دار بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار اسیدهای چرب زنجیر کوتاه (SCFA) به ترتیب برای جیره سوم حاوی ۰/۵ درصد SRU جایگزین SBM و جیره حاوی ۱/۰ درصد CU جایگزین SBM بدست آمد (۶۴۱/۰ در مقابل ۵۱۳/۰ درصد میلی‌مول $0/05 < p$). تجزیه کربوهیدرات‌ها در شرایط تخمیر

آزمایشگاهی به قندهای ساده (هگزوزها) تبدیل می‌گردد، که جهت نگهداری و یا رشد میکروارگانیسم‌های دخیل در تخمیر مورد نیاز است (۲۲). از باقیمانده این فرآیند تجزیه کربوهیدرات‌ها تولید اسیدهای چرب فرار که به‌عنوان منبع انرژی برای حیوان میزبان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۷). انرژی قابل متابولیسم یک خوراک نمایانگر آن قسمتی از خوراک که توسط حیوان مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مطالعه‌ی حاضر اثر منفی اوره محافظت نشده روی پارامترهای تغذیه‌ای تولید گاز از جمله ME و SCFA مشهود بود. همسو با نتایج ما اسپانگرو و همکاران (۲۰۱۸) عنوان کردند که با افزایش غلظت NPN جیره مقدار انرژی قابل متابولیسم و اسیدهای چرب زنجیر کوتاه کاهش معنی‌داری داشت (۳۲). برخلاف نتایج بدست آمده، در مطالعه دیگر مقدار SCFA تحت تاثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت (۳۱). که احتمالاً به غلظت NPN استفاده شده در جیره، مایع شکمبه، نوع دام، جیره پایه و غیره بستگی داشته باشد. محققین عنوان نمودند که بین میزان ME، حجم گاز تولیدی زمان ۲۴ انکوباسیون و ترکیبات موجود در نمونه خوراک ارتباط قوی وجود دارد (۱۶)، (۱۷). بنابراین ماده‌ی مغذی موجود در خوراک سرعت تخمیر را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱۲). به‌عنوان مثال هر چه غلظت اوره و NPN در ترکیب جیره افزایش یابد، احتمال کاهش انرژی قابل متابولیسم و اسیدهای چرب فرار نیز کاهش خواهد یافت (۱۶). در این شرایط در اثر تجزیه‌پذیری ذرات خوراک به جای تولید اسیدهای چرب فرار (منبع اصلی انرژی برای میزبان) به سمت تولید آمونیاک پیش خواهد رفت (۱۹). میزان ناپدید شدن ماده‌ی خشک و پروتئین خام در شرایط آزمایشگاهی جیره حاوی منابع مختلف نیتروژن غیر پروتئینی جایگزین کنجاله سویا در جدول (۳) نشان داده شده است. درصد ناپدید شدن

ماده‌ی خشک و پروتئین خام در ساعات ۱۲، ۲۴ و ۴۸ انکوباسیون در بین جیره‌های آزمایشی اختلاف معنی‌دار داشت ($p < 0/05$). نتایج این‌گونه بود که کم‌ترین درصد ناپدید شدن ماده‌ی خشک و پروتئین خام برای جیره چهارم که حاوی ۱/۰ درصد CU جایگزین SBM بود، بدست آمد. جیره‌های حاوی اوره معمولی روی تجزیه‌پذیری ماده خشک و پروتئین خام اثر کاهشی معنی‌دار نشان داد ($p < 0/05$). و لازم به ذکر است در تمام ساعات انکوباسیون سطح ۰/۵ درصد جایگزین کنجاله سویا با SRU اثر مشابه با جیره شاهد داشت. نتایج مطالعه‌ی حاضر، با برخی گزارشات همخوانی داشت (۳۳ و ۳۴). در مقابل، برخی مطالعات حاکی از آن است که غلظت بالای منابع اوره محافظت شده، درصد گوارش‌پذیری ماده‌ی خشک و فیبر شویده خنثی را افزایش داد (۲ و ۳۵). شین و همکاران، (۲۰۱۰) هیچ تفاوتی معنی‌دار در گوارش‌پذیری ماده مغذی جیره گاوهای شیری حاوی CU و یا SRU با پلی‌اورتان گزارش نکردند (۳۴). همچنین گاردینال و همکاران، (۲۰۱۷) عنوان کردند که تجزیه‌پذیری ماده‌ی مغذی در کل دستگاه گوارش با گنجاندن ۲ درصد SRU در جیره غذایی بوفالوها هیچ تفاوت معنی‌دار نشان نداد (۳۳). در مقابل گو و همکاران، (۲۰۱۸) گزارش دادند که تجزیه‌پذیری ماده‌ی خشک جیره غذایی حاوی کنسانتره بالا با افزایش غلظت SRU افزایش یافت (۲). مطالعه دیگری نشان داد است که افزایش تجزیه‌پذیری پروتئین خام کل دستگاه گوارش هنگام تغذیه گاوهای شیرده با جیره حاوی SRU مشاهده شد (۳۶). اساس بکارگیری SRU به‌عنوان منبع نیتروژن جهت افزایش فعالیت میکروبی فیبرولایติก و تولید پروتئین میکروبی و کاهش انتشار ازت آمونیاکی است (۱۳). منبع پایدار ازت غیر پروتئینی (محافظت شده از دسترس میکروارگانیسم‌ها) می‌تواند بر

گوارش‌پذیری بهینه ماده‌ی مغذی در محیط شکمبه تأثیر بگذارد (۳۲). اما مقالات مختلف در مورد غلظت بهینه نیتروژن آمونیاک برای گوارش‌پذیری الیاف خوراک متفاوت می‌باشد (۳۷، ۳۸). ران و همکاران، (۲۰۲۱) گزارش کردند که سطح نیتروژن آمونیاکی بیش‌تر از ۵ mg/dl برای افزایش جمعیت باکتری‌های سلولولایطیک ضروری است (۳۷). در حالی‌که علیپور و همکاران، (۲۰۱۸) اظهار داشتند که هر جیره غذایی دارای غلظت آمونیاک بهینه است زیرا تولید پروتئین میکروبی و مصرف آمونیاک به سرعت و نرخ تخمیر کربوهیدرات مربوط می‌شود (۲). در مطالعه حاضر، علت این‌که در جیره حاوی ۰/۵ و ۱/۰ درصد SRU جایگزین SBM قابلیت هضم مواد مغذی نسبت به جیره پایه تغییر نکرد آزادسازی تدریجی ماده‌ی نیتروژنی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که استفاده از منابع مختلف نیتروژن غیر پروتئینی به‌جای کنجاله سویا مخصوصاً نوع محافظت شده آن بدون آن‌که اثر مخربی بر روند تخمیر و ناپدید شدن ماده مغذی داشته باشد، یک جایگزین مناسب برای منابع پروتئینی گیاهی گران‌قیمت که بخش قابل توجه آن در شکمبه تجزیه‌پذیر است می‌باشد در کنار این مطلب از انتشار نیتروژن آمونیاکی نیز جلوگیری می‌کند و از اتلاف ماده مغذی مخصوصاً انرژی مورد نیاز حیوان میزبان ممانعت می‌کند. نیتروژن غیر پروتئینی محافظت شده که آزادسازی تدریجی را برای ازت در شکمبه فراهم می‌کند یک استراتژی تغذیه‌ای کارآمد برای افزایش قابلیت هضم ماده‌ی مغذی موجود در جیره می‌باشد. محصول مورد استفاده در این آزمایش از یک پوشش پلیمری برای محافظت کردن اوره بهره برده است که نتایج این مطالعه در موارد مورد بررسی در شرایط

sustainability of feeding slow-release urea in dairy production. Plos One. 2021; 16(2):e0246922.

9. Salami SA, Moran CA, Warren HE, Taylor-Pickard J. A meta-analysis of the effects of slow-release urea supplementation on the performance of beef cattle. Animals. 2020;10(4):657.

10. Trei J, Hale WH, Theurer B. Effect of grain processing on in vitro gas production. J Animal Sci. 1970;30(5):825-831.

11. AOAC. Official methods of analysis. 18th ed. Association of Official Analytical Chemist. Arlington, V.A. 2005; pp:806-842.

12. Fedorah PM, Hrudey SE. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. Environ Technol. 1983;4(10):425-432.

13. Sadeghi K, Ganjkhanelou M, Dehghan Banadaky M, sadeghi M, Zali A, Tagizadeh A. Evaluating the effects of dietary supplementation with different sources of urea on nitrogen release rate, fermentation kinetics, gas production parameters and nutrient disappearance rate in Vitro. Iran J Anim Sci. 2024;52(4):38-51. In Persian

14. McDougall EI. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochem J. 1948;43(1):99.

15. Ørskov ER, McDonald I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J Agric Sci. 1979;92(2):499-503.

16. Blümmel M, Makkar HPS, Becker K. In vitro gas production: a technique revisited. Journal of animal physiology and animal nutrition, 1997;77(1-5):24-34.

17. Blümmel M, Bullerdieck P. The need to complement in vitro gas production measurements with residue determinations from in Sacco degradabilities to improve the prediction of voluntary intake of hays. Animal Sci. 1997;64(1):71-75.

آزمایشگاهی حاکی از آن است که روند پوشش‌دار کردن به درستی انجام شده است.

منابع

1. Azizi A, Sharifi A, Fazaeli H. Effect of one produced slow-release urea component on gas production, fermentation, nutrient disappearance and activity of microbial enzymes using rumen liquor of sheep. J Anim Sci. 2019;32(122):279-290

2. Alipour D, Saleem AM, Sanderson H, Brand T, Santos LV, Mahmoudi-Abyane M, Marami MR, McAllister TA. Effect of combinations of feed-grade urea and slow-release urea in a finishing beef diet on fermentation in an artificial rumen system. Translation Anim Sci. 2020; 4(2):839-847.

3. Guo Y, Xiao L, Jin L, Yan S, Niu D, Yang W. Effect of commercial slow-release urea product on in vitro rumen fermentation and ruminal microbial community using RUSITEC technique. J Anim Sci Biotechnol. 2022;13(1):56.

4. Amani-Yengejeh M, Taghizadeh A, Mohammadzadeh H, Hosseinkhani A, Shirmohammadi S, Abachi S, et al. Utilisation of slow-release non-protein nitrogen produced from agro-industrial by-products: feed digestibility and ruminal parameters. J Anim Feed Sci. 2023; 32(1):76-84.

5. Getahun D, Alemneh T, Akeberegn D, Getabalew M, Zewdie D. Urea metabolism and recycling in ruminants. Biomed J Sci Tech Res, 2019;20(1):14790-14796.

6. Marini JC, Sands JM, Van Amburgh ME. Urea transporters and urea recycling in ruminants. In Ruminant physiology (pp. 155-171). Wageningen Academic, 2006; pp. 155-17.

7. Ma SW, Faciola AP. Impacts of slow-release urea in ruminant diets: A review. Fermentation. 2024;10(10):527.

8. Salami SA, Moran CA, Warren HE, Taylor-Pickard J. Meta-analysis and

26. Ceconi I, Ruiz-Moreno MJ, DiLorenzo N, DiCostanzo A, Crawford GI. Effect of urea inclusion in diets containing corn dried distillers grains on feedlot cattle performance, carcass characteristics, ruminal fermentation, total tract digestibility, and purine derivatives-to-creatinine index. *J Anim Sci*. 2015; 93(1):357-369.
27. Anele UY, Südekum KH, Hummel J, Arigbede OM, Oni AO, Olanite JA, Böttger C, Ojo VO, Jolaosho AO. Chemical characterization, in vitro dry matter and ruminal crude protein degradability and microbial protein synthesis of some cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) haulm varieties. *Anim Feed Sci Technol*. 2011; 163(2-4):161-169.
28. Reynal SM, Broderick GA. Effects of feeding dairy cows protein supplements of varying ruminal degradability. *J Dairy Sci*. 2003;86(3):835-843.
29. Korhonen M. Amino acid supply and metabolism in relation to lactational performance of dairy cows fed grass silage based diets (Doctoral dissertation, Helsingin yliopisto). 2003; P:355.
30. National Research Council, Committee on Animal Nutrition and Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition, Nutrient requirements of dairy cattle: 2001. National Academies Press. 2001; p:178.
31. Guo Y, Xiao L, Jin L, Yan S, Niu D, Yang W. Effect of commercial slow-release urea product on in vitro rumen fermentation and ruminal microbial community using RUSITEC technique. *J Anim Sci Biotechnol*. 2022;13(1):56.
32. Spanghero M, Nikulina A, Mason F. Use of an in vitro gas production procedure to evaluate rumen slow-release urea products. *Anim Feed Sci Technol*. 2018; 237:19-26.
33. Gardinal R, Calomeni GD, Cônsolo NRB, Takiya CS, Freitas JE, Gandra JR, et al. Influence of polymer-coated slow-
18. Parnian-Khajezdizaj F, Taghizadeh A, Hosseinkhani A, Mesgaran MD. Evaluation of dietary supplementation of B vitamins and HMBI on fermentation kinetics, ruminal or post-ruminal diet digestibility using modified in vitro techniques. *J BioSci Biotechnol*. 2018;7(2-3):125-133.
19. Parnian-Khajezdizaj FP, Taghizadeh A, Nobari BB. Effect of feeding microwave irradiated sorghum grain on nutrient utilization, rumen fermentation and serum metabolites in sheep. *Livestock Sci*. 2014;167:161-170.
20. VanSoest PV, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*. 1991;74(10):3583-3597.
21. Wanapat M, Phesatcha K, Kang S. Rumen adaptation of swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*) by high level of urea supplementation when fed on rice straw-based diet. *Tropic Anim Health Prod*. 2016; 48:1135-1140.
22. Raab L, Cafantaris B, Jilg T, Menke KH. Rumen protein degradation and biosynthesis: 1. A new method for determination of protein degradation in rumen fluid in vitro. *Br J Nutr*. 1983;50(3): 569-582.
23. Cherdthong A, Wanapa M. In vitro gas production in rumen fluid of buffalo as affected by urea-calcium mixture in high quality feed block. *J Anim Sci*. 2014; 85(4):420-426.
24. López S, Dhanoa MS, Dijkstra JA, Bannink A, Kebreab E, France J. Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Anim Feed Sci Technol*. 2007;135(1-2):139-156.
25. Highstreet A, Robinson PH, Robison J, Garrett JG. Response of Holstein cows to replacing urea with a slowly rumen released urea in a diet high in soluble crude protein. *Livestock Sci*. 2010;129(1-3):179-185.

36. Galo E, Emanuele SM, Sniffen CJ, White JH, Knapp JR. Effects of a polymer-coated urea product on nitrogen metabolism in lactating Holstein dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2003;86(6):2154-2162.
37. Ran T, Jin L, Abeynayake R, Saleem AM, Zhang X, Niu D, et al. Effects of brewers' spent grain protein hydrolysates on gas production, ruminal fermentation characteristics, microbial protein synthesis and microbial community in an artificial rumen fed a high grain diet. *J Anim Sci Biotechnol.* 2021;12(1):1-14.
38. Mehrez AZ, Ørskov ER, McDonald I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *Br J Nutr.* 1977; 38(3):437-443.
- release urea on total tract apparent digestibility, ruminal fermentation and performance of Nellore steers. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 2017;30(1):34.
34. Xin HS, Schaefer DM, Liu QP, Axe DE, Meng QX. Effects of polyurethane coated urea supplement on in vitro ruminal fermentation, ammonia release dynamics and lactating performance of Holstein dairy cows fed a steam-flaked corn-based diet. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 2010;23(4): 491-500.
35. Calomeni GD, Gardinal R, Venturelli BC, Freitas Júnior JED, Vendramini THA, Takiya CS, et al. Effects of polymer-coated slow-release urea on performance, ruminal fermentation, and blood metabolites in dairy cows. *R. Bras. Zootec.* 2015;44:327-334.

Research Article

The Effects of Using Omega-3, Omega-6 Fatty Acids and Their Mixture on Performance, Skeletal and Health Indicators in Nursing Holstein Calves

Esmacil Sangin¹, Ali Nikkhah², Mohammad Chamani^{3*}, Ali Asghar Sadeghi³, Mehdi Amin Afshar³

1- Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tehran University, Karaj, Iran

3- Department of of Agriculture, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author: m.chamani@srbiau.ac.ir

Received: 27 November 2023

Accepted: 2 January 2024

DOI: 10.60833/ascij.2025.1196566

Abstract

This study aimed to investigate the effects of using omega-3, omega-6 fatty acids and their mixtures on performance, skeletal indices and health in Holstein calves. 56 suckling calves (male and female) with an average body weight of 38 ± 1.5 kg were selected and divided into four experimental groups in a completely randomized design: 1- control (oil-free); 2- soybean oil + milk; 3- fish oil + milk; and 4- combination of soybean oil and fish oil + milk. The experiment began at 3 days of age, weaning was at 75 days of age, and the end of the period was at 80 days of age. Feed intake (starter + milk) and body weight gain were recorded daily for each calf separately. Growth factors were measured using a standard meter on days 3, 75, and 85 of rearing, and stool scores and vitality scores were assessed and recorded based on appearance (1 to 5). The results showed that feed intake and milk solids intake did not change significantly among the experimental groups with the addition of omega-3 and omega-6 fatty acids ($p > 0.05$). No significant difference was observed in the average daily weight gain and body weight of calves compared to the control treatment, but daily weight gain was greater for soybean oil than for fish oil. Feed Intake efficiency for the experimental groups was not affected by the experimental treatments ($p > 0.05$). Skeletal indices measured in this experiment were not significantly affected by the experimental treatments ($p > 0.05$). Health indicators, including stool score and vitality score, were not affected by experimental treatments ($p > 0.05$). The use of polyunsaturated fatty acids from soybean oil and fish oil not only had no adverse effects on calf performance, but also led to improvements in some growth factors and body weight.

Keyword: Health, Omega-6/Omega-3 Fatty Acids, Performance, Skeletal growth, Weanling calves.

اثرات استفاده از اسیدهای چرب امگا-۳، امگا-۶ و مخلوط آن‌ها بر عملکرد، شاخص‌های اسکلتی و سلامت در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین

اسماعیل سنگین^۱، علی نیکخواه^۲، محمد چمنی^{۳*}، علی اصغر صادقی^۱، مهدی امین افشار^۳

۱- گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه علوم دامی دانشگدان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳- گروه کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: m.chamani@srbiau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۶

DOI: 10.60833/ascij.2025.1196566

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثرات استفاده از اسیدهای چرب امگا-۳، امگا-۶ و مخلوط آن‌ها بر عملکرد، شاخص‌های اسکلتی و سلامت در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین بود. تعداد ۵۶ رأس گوساله شیرخوار (نر و ماده) با میانگین وزن بدن $38 \pm 1/5$ کیلوگرم انتخاب و به صورت طرح کاملاً تصادفی به چهار گروه آزمایشی شامل: ۱- شاهد (فاقد روغن)؛ ۲- روغن سویا + شیر؛ ۳- روغن ماهی + شیر و ۴- ترکیب روغن سویا و روغن ماهی + شیر تقسیم شدند. شروع آزمایش ۳ روزگی، از شیرگیری ۷۵ روزگی و پایان دوره ۸۰ روزگی بود. مصرف خوراک (استارتر + شیر) و افزایش وزن بدن به صورت روزانه برای هر گوساله به صورت مجزا انجام گردید. سنجش فاکتورهای رشد به وسیله مترسنج استاندارد در روزهای ۳، ۷۵ و ۸۵ پرورش انجام شد و اسکور مدفوع و اسکور شادابی براساس شکل ظاهری (۱ تا ۵) بررسی و ثبت گردید. نتایج نشان داد مصرف خوراک و مصرف ماده خشک شیر با افزودن اسیدچرب امگا-۳ و امگا-۶ در بین گروه‌های آزمایشی تغییر معنی‌داری نداشت ($p > 0/05$). تفاوت معنی‌دار از نظر میانگین افزایش وزن روزانه و وزن بدن گوساله‌ها نسبت به تیمار شاهد مشاهده نشد، اما افزایش وزن روزانه برای روغن سویا بیش‌تر از روغن ماهی بود. بازده استفاده از خوراک برای گروه‌های آزمایشی تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی نبود ($p > 0/05$). شاخص‌های اسکلتی اندازه‌گیری شده در این آزمایش به‌طور معنی‌دار تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند ($p > 0/05$). شاخص‌های سلامت اعم از اسکور مدفوع و اسکور شادابی تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی نبودند ($p > 0/05$). استفاده از اسیدهای چرب اشباع نشده چندانکه روغن سویا و روغن ماهی نه تنها هیچ تأثیر سوئی بر عملکرد گوساله‌ها نداشت، بلکه منجر به بهبود برخی از فاکتورهای رشد و وزن بدن نیز شد.

کلمات کلیدی: امگا-۶، امگا-۳، رشد اسکلتی، سلامت، عملکرد، گوساله‌های شیرخوار.

مقدمه

ترکیبات منحصراً به فردی هستند، به‌منظور بهبود عملکرد و تحریک سیستم ایمنی استفاده شود. در بین مواد خوراکی متفاوت اثرات مفید اسیدهای چرب

رابطه تغذیه، رشد و ایمنی در مطالعات بسیار و در گونه‌های مختلف به اثبات رسیده است و امروزه سعی می‌شود از پتانسیل مواد خوراکی خاص که حاوی

ضروری (امگا-۳، امگا-۶)، ویتامین‌ها و مواد معدنی کم‌نیاز مورد توجه محققین قرار گرفته است و طی سالیان اخیر آزمایش‌های زیادی برای تعیین اثرات این مواد مغذی در حیوانات مزرعه‌ای و آزمایشگاهی طراحی شده و به نتیجه رسیده‌اند (۱، ۲، ۳). در این بین، پاسخ‌های دام و طیور به منابع اسیدهای چرب ضروری به دلیل نیاز کمی بیش‌تر نسبت به سایر گروه-های مواد غذایی ذکر شده (ویتامین‌ها و عناصر کم-نیاز) و همچنین مقدار محدود آن‌ها در مواد خوراکی رایج، چشمگیرتر بوده است. به رغم آزمایش‌های متعدد در این زمینه روی دام‌های دیگر به دلیل تنوع در جیره پایه و همچنین تفاوت بین منابع تأمین‌کننده اسیدهای چرب ضروری هنوز محققین نظر قطعی در مورد مقدار احتیاجات اسیدهای چرب ضروری و چگونگی مصرف این منابع در گوساله‌های شیرخوار ارائه نکرده‌اند. به همین دلیل سعی می‌شود در آزمایش‌های جدید لزوم وجود این مواد و مقدار مناسب و شکل مصرف آن‌ها در جیره گونه‌های مختلف دام و طیور مورد بررسی قرار گیرد (۴). حیوانات می‌توانند اسید اولئیک (C18:1) را بسازند اما قادر به ساختن اسید لینولئیک (C18:2) و اسید آلفا لینولئیک (C18:3) نیستند چرا که آنزیم غیراشباع‌ساز موردنیاز برای این کار را ندارند؛ بنابراین چنین اسیدهای چرب بایستی در جیره غذایی وجود داشته باشند (۵). نوزاد نشخوارکنندگان در اوائل زندگی به دلیل عدم توسعه شکمبه از سیستم ناودان مری استفاده می‌نمایند و مواد غذایی به‌ویژه اسیدهای چرب غیراشباع بدون اینکه پروسه بیوهیدروژناسیون بر روی آنها صورت پذیرد بدون هیچ‌گونه تغییری می‌توانند مستقیماً وارد روده باریک شده و اثرات مثبت خود را ایفا نمایند. لذا تصور می‌گردد با وجود پروفایل اسیدهای چرب ضروری موجود در روغن‌های گیاهی و حیوانی، استفاده از روغن سویا و ماهی می‌تواند در

بهبود بازده خوراک، افزایش وزن روزانه، انرژی متابولیسمی و همچنین رشد طبیعی غضلات و استخوان‌ها مؤثر باشد (۶). کارچر و همکاران (۷) گزارش نمودند شاخص‌های رشدی و عملکردی در گوساله‌های شیرخوار، با افزودن روغن ماهی در جایگزین‌کننده شیر تغییر می‌یابد، به‌طوری که افزودن روغن ماهی سبب بهبود ضریب تبدیل غذایی و نرخ رشد بیش‌تر در گوساله‌ها شد. در مطالعه‌ی دیگری که توسط مک‌نیون و همکاران، (۸) انجام شد افزایش وزن بیش‌تری موقع استفاده از روغن سویا نسبت به دانه‌ی کتان و کانولا گزارش کردند. روغن سویا به دلیل دارا بودن پروفایل اسیدهای چرب متعادل، منبع خوبی برای انرژی در گوساله‌های جوان می‌باشد (۹). بررسی سوابق قبلی در راستای موضوع حاضر نشان داد که استفاده منابع مختلف روغن برای گوساله‌های شیرخوار مخصوصاً همراه شیر مصرفی روزانه محدود بوده و اثرات هم‌افزایی و مثبت مصرف روغن‌های خوراکی (با منابع مختلف گیاهی و حیوانی) در کنار شیر دریافتی گوساله‌ها هنوز در پرده ابهام می‌باشد. بنابراین با توجه به اطلاعات اندک در خصوص استفاده از روغن سویا و ماهی و یا استفاده توأم آنها در گوساله شیرخوار، آزمایش حاضر با هدف بررسی اثرات استفاده از اسیدهای چرب امگا-۳، امگا-۶ و مخلوط آن‌ها بر عملکرد، فاکتورهای رشد و سلامت در گوساله‌های شیرخوار هلستاین طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در اواسط فصل پاییز تا اواسط فصل زمستان سال ۱۴۰۰ در مزرعه پرورش گاو شیری شرکت ماهشام با ظرفیت ۲۰۰۰ رأس گاو مولد، واقع در بخش جنوبی شهرستان پاکدشت (استان تهران) به مدت ۸۵ روز انجام شد. روغن‌های مورد استفاده از

شرکت نگین پودر خزر خریداری شد. قبل از شروع آزمایش، جایگاه‌ها کاملاً تمیز و ضدعفونی شدند. تعداد ۵۶ رأس گوساله شیرخوار و به‌طور تصادفی گوساله‌های هر تیمار در جایگاه‌ها قرار گرفتند. چهار گروه آزمایشی شامل (۱) شاهد (بدون منبع روغن)؛ (۲) تغذیه ۳۰ گرم روغن سویا+ شیر مصرفی؛ (۳) تغذیه ۳۰ گرم روغن ماهی+ شیر مصرفی؛ و (۴) تغذیه ۱۵ گرم روغن ماهی + ۱۵ گرم روغن سویا به همراه شیر مصرفی بود. همه گوساله‌ها بلافاصله پس از تولد از مادرها جدا و پس از وزن‌کشی و تغذیه با آغوز (۵ لیتر در ۱۲ ساعت اول) به جایگاه‌های انفرادی منتقل داده شدند. تغذیه آغوز برای ۲ روز اول پس از تولد ادامه داشت. در این آزمایش از ۵۶ رأس گوساله هلشتاین شامل نر (۲۸ رأس) و ماده (۲۸ رأس) استفاده شد که بر اساس جنس و وزن بدن به ۴ گروه یکسان (۷ رأس گوساله نر و ۷ رأس گوساله ماده به ازاء هر جیره آزمایشی) تقسیم و به صورت تصادفی به جیره‌های آزمایشی اختصاص داده شدند. میانگین وزن گوساله‌های ماده و نر در زمان تولد به ترتیب حدود $1/5 \pm 38$ کیلوگرم بود. گوساله‌ها از روز سوم پس از تولد وارد آزمایش شدند. برای ورود به طرح نخست با انجام آزمایش‌های لازم سطح ایمنی گوساله‌ها تعیین شد و دام‌هایی که واجد حداقل شرایط ایمنی نبودند، وارد طرح نشدند. همچنین در این طرح از گوساله گاوهای شکم زایش < 3 و گوساله‌هایی که دوقلو نبودند و وزن تولد زیر ۳۷ کیلوگرم نداشتند، استفاده شد. گوساله‌هایی که از آغوز گاوهای دارای ورم‌پستان مصرف کرده بودند و یا با سخت‌زایی متولد شده بودند در طرح مورد استفاده قرار نگرفتند. گوساله‌ها در طول زمان شیرخوارگی روزانه با دو وعده شیر به میزان ۵ درصد وزن بدن در هر وعده تغذیه شدند. این عمل ساعات ۷ صبح و ۴ بعدازظهر انجام شد. شیر مصرفی توسط سطل‌های

فلزی در اختیار گوساله‌ها قرار گرفت. با توجه به اینکه تغذیه روغن‌های خوراکی (سویا و ماهی) توسط گوساله‌ها همراه با شیر مصرفی روزانه آن‌ها بود جهت جلوگیری از دو فازی شدن روغن در شیر، بعد از اضافه کردن روغن به شیر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد گرم و توسط یک هم‌زن برقی کاملاً همگن شدند. مصرف روغن توسط گوساله‌ها در دو نوبت صبح و عصر صورت گرفت و گوساله‌ها به روغن خوراکی بمدت ۷ روز عادت‌دهی شدند تا بوی بد ماهی مصرف شیر را کاهش ندهد. پروفایل اسیدهای چرب روغن ماهی (دارای اسیدهای چرب امگا-۳) و روغن سویا (دارای اسیدهای چرب امگا-۶) مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی شرکت Agilent آمریکا مدل ۸۸۹۰ مجهز به شناساگر Mass در آزمایشگاه تغذیه پردیس ابوریحان دانشگاه تهران تعیین گردید (جدول ۱). جیره‌ی آغازین با استفاده از جدول احتیاجات غذایی (انجمن ملی تحقیقات، ۲۰۰۱)، بخش مربوط به گوساله‌های شیری هلشتاین (۱۰) و با استفاده از نرم‌افزار CNCPS (Cornel Net Carbohydrate and Protein System) تنظیم گردید (جدول ۲). گوساله‌ها از هنگام ورود به طرح تا پایان طرح دسترسی آزاد به جیره آغازین و آب داشتند. در این آزمایش مصرف روزانه ماده خشک خوراک آغازین در دوره پیش از شیرگیری (۳ تا ۷۵ روزگی) پس از شیرگیری (۷۵ الی ۸۰ روزگی) و کل دوره (۳ تا ۸۵ روزگی) ثبت شد. همچنین مقدار مصرف ماده خشک شیر در دوره پیش از شیرگیری با توجه به مقدار شیر مصرفی و ماده خشک آن محاسبه شد. مصرف کل ماده خشک از مجموع مصرف ماده خشک شیر و خوراک آغازین محاسبه شد. در این آزمایش وزن‌کشی گوساله‌ها هر ۱۰ روز یک‌بار در روزهای سوم (شروع تغذیه جیره‌های آزمایشی)، ۱۳، ۲۳، ۳۳، ۴۳، ۵۳، ۶۳، ۷۳ و

۸۳ آزمایش به صورت انفرادی و قبل از خوراک نوبت صبح با استفاده از باسکول دیجیتال با دقت ۰/۱ کیلوگرم انجام شد. سپس افزایش وزن روزانه و بازده استفاده از خوراک (افزایش وزن تقسیم بر خوراک مصرفی) محاسبه شد. اندازه‌گیری شاخص‌های رشد اسکلتی گوساله‌ها شامل ارتفاع جدوگاه، ارتفاع هیپ، عرض هیپ (اندازه عرض استخوان لگن)، طول بدن (فاصله بین آخرین مهره گردن تا اولین مهره دمی)، دور سینه و حجم بدن گوساله‌ها در هنگام ورود به آزمایش (روز ۳ پس از تولد)، روز شیرگیری (روز ۷۵) و پایان آزمایش (روز ۸۵) اندازه‌گیری و یادداشت شد (۱۱). نمرات مدفوع و وضعیت سلامتی در هنگام تغذیه صبح طبق مدل پیشنهادی لارسون و همکاران (۱۲) در یک مقیاس چهار درجه‌ای مدفوع ۱- مدفوع طبیعی تا ۴- مدفوع آبکی ثبت شد. نمره مدفوع گوساله مساوی و بالای ۳ به عنوان ابتلا به اسهال تشخیص داده شد. در صورت ادامه یافتن اسکور مدفوع شماره ۴ به مدت دو روز متوالی گوساله به بیمارستان انتقال یافته و پس از بهبودی در صورت امکان به طرح بازگردانده شدند. همچنین گوساله‌های با اسکور شادابی ۳ برای ساعاتی به استال‌های جمعی انتقال یافته و مورد درمان قرار می‌گرفتند. میزان بروز اسهال به صورت زیر محاسبه شد (۱۲): درصد بروز اسهال = تعداد گوساله‌های اسهال × روز اسهال / (تعداد

کل گوساله × روزهای آزمایش) × ۱۰۰. اسکور شادابی طبق مدل پیشنهادی فصیحی و خوروش (۱۳) در یک مقیاس پنج درجه‌ای شامل درجه ۱- هوشیار و نرمال (پاسخ به محرک‌های صدا مخصوصاً موقع شیرخورانی)، درجه ۲- گوش‌های گوساله آویزان و هوشیار پایین، درجه ۳- سر و گوش پایین و چشم‌ها افتاده، درجه ۴- خوابیده و تمایلی به بلندشدن ندارد و درجه ۵- خوابیده به یک سمت و رو به مرگ ثبت گردید. پردازش تمام داده‌های مربوط به این آزمایش با استفاده از نرم‌افزار تحلیل‌گر آماری SAS انجام شد. پردازش داده‌های مربوط به صفات عملکردی (روز از شیرگیری، ماده خشک مصرفی و افزایش وزن روزانه) در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۱۴ تکرار در هر تیمار، از رویه مدل‌های آمیخته خطی و تکرار شده در زمان MIXED استفاده شد. مدل مورد استفاده برای این صفات به صورت زیر می‌باشد. برای تمام صفات ذکر شده در بالا وزن اولیه گوساله‌ها و جنس گوساله به عنوان کوواریت (متغیر کمکی) در نظر گرفته شد. $Y_{ijk} = \mu + T_i + W_j + \beta(X_i - X) + e_{ijk}$ Y_{ijk} : مشاهده مربوط به گوساله i امین در تیمار j امین در هفته k امین؛ μ : میانگین کل جامعه آماری مورد مطالعه؛ T_i : اثر ثابت تیمار i امین؛ W_j : اثر k امین هفته $\beta(X_i - X)$: وزن اولیه به عنوان متغیر کمکی e_{ijk} : اثر خطای آزمایش.

جدول ۱- پروفایل اسیدهای چرب روغن‌های مورد استفاده در طرح بر اساس ماده خشک (DM، گرم/کیلوگرم)

Table 1. Fatty acid profile of oils used in the project based on dry matter (DM, g/kg)

Fatty acids	Fish oil*	Soybean oil**	Mixture of both
Palmitic acid	21.65	13.00	0
Stearic acid	4.95	4.03	0
Oleic acid	32.75	24.38	0
Linoleic acid	2.87	49.69	0
Linolenic acid	1.70	5.93	0
EPA	4.74	-	0
DHA	8.2	-	0
Saturated fatty acids	34	17.5	0
Unsaturated fatty acids	66	82.5	0

* نمایانگر اسیدهای چرب امگا-۳ شناسه ۵۳۵، ** نمایانگر اسیدهای چرب امگا-۶ شناسه ۵۳۶.

* Represents omega-3 fatty acids ID 535; ** Represents omega-6 fatty acids ID 536.

جدول ۲- مواد خوراکی تشکیل دهنده و ترکیب شیمیایی جیره آغازین

Table 2. Feed ingredients and chemical composition of starter diet

Feedstuff (based on %DM)	Amount (%)	Chemical composition**	Based on DM
Dry hay	10	Net energy of weight gain (Mcal/kg)	1.36
Barley	13.5	Metabolizable energy (Mcal/kg)	2.94
Corn	36	Dry matter	87.15
Soybean meal	26	Crude protein	19.98
Corn gluten meal	5	Ethereal extract	3.81
Wheat bran	5	Neutral detergent fiber	18.49
Mineral and vitamin supplement*	2	Non-fibrous carbohydrates	48.83
Sodium bicarbonate	0.7	Calcium	0.68
Calcium carbonate	0.8	Phosphorus	0.46
Dicalcium phosphate	0.5	Lysine	0.41
Salt	0.5	Methionine	0.45

* هر کیلوگرم مکمل دارای ۲۵۰,۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A؛ ۵۰,۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D₃؛ ۱۵۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E؛ ۱۲۰ گرم کلسیم؛ ۲۰ گرم فسفر؛ ۲۰/۵ گرم منیزیم؛ ۱۸۶ گرم سدیم؛ ۳ گرم سولفور؛ ۲۲۵۰ میلی‌گرم منگنز؛ ۷۷۰۰ میلی‌گرم روی؛ ۱۲۵۰ میلی‌گرم آهن؛ ۱۴ میلی‌گرم کبالت؛ ۱۲۵۰ میلی‌گرم مس؛ ۵۶ میلی‌گرم ید و ۱۰ میلی‌گرم سلنیوم. ** محاسبه شده با NRC (۲۰۰۱).

*: Each kilogram of supplement contains 250,000 IU of vitamin A; 50,000 IU of vitamin D₃; 1,500 IU of vitamin E; 120 g of calcium; 20 g of phosphorus; 20.5 g of magnesium; 186 g of sodium, 3 g of sulfur; 2,250 mg of manganese; 7,700 mg of zinc; 1,250 mg of iron; 14 mg of cobalt; 1,250 mg of copper; 56 mg of iodine and 10 mg of selenium.

** : Calculated with NRC (2001).

نتایج

بر بازده خوراک در سه دوره متوالی قبل از شیرگیری، بعد از شیرگیری و کل دوره پرورش اثری نداشتند ($p > 0.05$) (جدول ۳). اثر تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های رشد اسکلتی شامل دور سینه، طول بدن، ارتفاع جدوگاه و ارتفاع هیپ گوساله‌ها در روز شیرگیری و پایان آزمایش در جدول ۴ مشاهده می‌شود. اندازه‌گیری پارامترهای رشدی و اسکلتی در زمان ورود به طرح (۳ روزگی)، ۶۵ روزگی و ۸۰ روزگی صورت گرفته است. این فراسنجه‌ها شامل: ارتفاع جدوگاه، ارتفاع هیپ، پهنای هیپ، طول بدن، دور سینه و دور شکم (عمق بدن) می‌باشند. جهت مقایسه میانگین تیمارها از نظر صفات فیزیکی و به منظور بالا بردن دقت و صحت آنالیز، صفات فیزیکی فوق در ۳ روزگی (ورود به طرح) به عنوان یک عامل کواریت (متغیر کمکی) در نظر گرفته شد. همه شاخص‌های اندازه‌گیری شده به‌طور معنی‌دار تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی نیستند ($p > 0.05$). جدول ۴ نشان می‌دهد بیشتر شاخص‌های رشد اسکلتی

نتایج داده‌های مربوط به مصرف خوراک، افزایش وزن روزانه، وزن بدن و بازده خوراک در جدول ۳ ارائه شده است. مصرف خوراک در دوره قبل و بعد از شیرگیری و نیز مصرف ماده خشک شیر در آزمایش حاضر تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ($p > 0.05$). در آزمایش حاضر، انتظار بر این است که کاهش اثر منفی مکمل اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶ بر فرایندهای تخمیری شکمبه (مخصوصاً ماده خشک جیره آغازین) به دلیل مصرف آن‌ها با شیر باشد. بنابراین تفاوت معنی‌دار بین مصرف کل ماده خشک در گوساله‌های دریافت‌کننده شیر حاوی اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶ مشاهده نشد ($p > 0.05$). میانگین افزایش وزن روزانه در سه دوره متوالی قبل و بعد از شیرگیری و کل دوره پرورش تحت تأثیر مصرف اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶ قرار نگرفت ($p > 0.05$) (جدول ۳). وزن بدن گوساله‌ها در روز شیرگیری و پایان آزمایش تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ($p > 0.05$). تیمارهای آزمایشی

گوساله‌های دریافت‌کننده مکمل اسیدهای چرب امگا-۳ در مقایسه با سایر گروه‌ها بیشتر است. طبق جدول ۵، نمره مدفوع در همه دوره‌های آزمایشی تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ($p > 0.05$). در دوره‌های قبل و بعد از شیرگیری، از نظر اسکور شادابی بین تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود که نشان می‌دهد گوساله‌ها با شرایط یکسان و به دور از بیماری مورد آزمایش قرار گرفتند.

جدول ۳- اثر مصرف اسیدهای چرب امگا-۳، امگا-۶ و ترکیب هر دو بر عملکرد رشد گوساله‌های شیرخوار

Table 3. Effect of omega-3, omega-6 fatty acids and a combination of both on growth performance of suckling calves

Measured traits	Experimental groups*				SEM	<i>p</i> -Value
	1	2	3	4		
Starter feed intake (g/day)						
Before weaning	650	647	615	623	47.24	0.842
After weaning	2028	1986	1965	1973	79/11	0.447
The whole period	1017	1005	986	990	88.27	0.923
DM milk intake (g/day)	642	640	635	638	16.74	0.970
Total DM intake (g/day)	1324	1314	1266	1285	90.55	0.741
Daily weight gain (g/day)						
Before weaning	577	581	569	573	18.92	695
After weaning	987	1020	897	995	84.36	0.138
The whole period	673	682	655	673	27.33	0.642
Body weight (kg)						
Weight at the beginning of period	42.8	42.6	42.7	42.1	0.68	0.753
Weaning weight	64.5	67.2	60.9	65.1	2.39	0.329
End of period weight	86.3	88.2	79.7	83.5	3.11	0.081
Feed efficiency (percentage)						
Before weaning	0.49	0.52	0.50	0.51	0.01	0.092
After weaning	0.41	0.42	0.40	0.41	0.03	0.418
The whole period	0.46	0.48	0.46	0.47	0.01	0.367

* گروه‌های آزمایشی شامل: ۱- شاهد (عدم مصرف روغن)؛ ۲- دریافت ۳۰ گرم روغن سویا همراه با شیر مصرفی روزانه؛ ۳- دریافت ۳۰ گرم روغن ماهی همراه با شیر مصرفی روزانه؛ و ۴- دریافت ۱۵ گرم روغن سویا و ۱۵ گرم روغن ماهی همراه با شیر مصرفی روزانه. a، b و c: میانگین‌های با حروف متفاوت در یک ردیف دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($p < 0.05$).

* Experimental groups included: 1- Control (no oil consumption); 2- Receiving 30 grams of soybean oil along with daily milk consumption; 3- Receiving 30 grams of fish oil along with daily milk consumption; and 4- Receiving 15 grams of soybean oil and 15 grams of fish oil along with daily milk consumption. a, b and c: Means with different letters in the same row are significantly different ($p < 0.05$)

جدول ۴- اثر مصرف اسیدهای چرب امگا-۳، امگا-۶ و ترکیب هر دو بر فراسنجه‌های اسکلتی گوساله‌های شیرخوار

Table 4. Effect of omega-3, omega-6 fatty acids and a combination of both on skeletal parameters of suckling calves

Measured traits	Experimental groups*				SEM	<i>p</i> -Value
	1	2	3	4		
Abdominal circumference (cm)						
Weaning	121	121	115	118	2.62	0.070
End of the period	126	124	121	123	3.62	0.251
Chest circumference (cm)						
Weaning	104	103	102	103	2.55	0.418
End of the period	106	105	104	106	2.36	0.501
Hip height (cm)						
Weaning	93.3	92.7	90.9	91.6	1.58	0.624
End of the period	95.7	95.2	93.6	94.4	2.26	0.824
withers height (cm)						

Weaning	87.7	87.3	85.4	86.7	1.63	0.238
End of the period	89.5	88.3	86.6	88.1	2.55	0.092
Body length (cm)						
Weaning	51.6	50.5	49.2	49.9	1.02	0.457
End of the period	56.3	55.8	54.4	54.9	1.19	0.329
Hip width (cm)						
Weaning	18.7	18.5	17.3	17.8	1.09	0.125
End of the period	19.5	19.2	18.4	18.6	1.32	0.245

جدول ۵- اثر مصرف اسیدهای چرب امگا-۳، امگا-۶ و ترکیب هر دو بر اسکور مدفوع و شادابی گوساله‌های شیرخوار
Table 5. Effect of omega-3, omega-6 fatty acids and a combination of both on stool score and liveliness of suckling calves

Measured traits	Experimental groups*				SEM	<i>p</i> -Value
	1	2	3	4		
Stool score						
Before weaning	2.45	1.98	1.62	1.55	0.07	0.625
After weaning	1.16	0.92	0.71	0.68	0.03	0.117
Freshness score						
Before weaning	1.47	1.40	1.19	1.26	0.12	0.449
After weaning	1.24	1.18	1.15	1.15	0.05	0.302

بحث

ماهی) در مقایسه با اسیدهای چرب امگا-۶ (روغن سویا) مصرف ماده خشک خوراک آغازین و کل مصرف ماده خشک (آغازین + شیر) کاهش یافت. در آزمایش حاضر نیز این روند (روغن ماهی ۱۲۶۶ در مقابل روغن سویا ۱۳۱۴ گرم در روز) صادق بود. در گروه چهارم دریافت کننده هر دو منبع روغن نسبت به گروه روغن ماهی نیز مقدار کل مصرف ماده خشک بیشتر بود. اثر مکمل‌های چربی بر مصرف ماده خشک در نشخوارکنندگان به عوامل مختلفی از جمله مقدار مکمل چربی، الگوی اسیدهای چرب مکمل چربی، نوع مکمل چربی و ترکیب شیمیایی جیره پایه وابسته می‌باشد (۱۸). مشابه با نتایج آزمایش حاضر در تحقیقات گذشته از جمله رجبی و همکاران، (۱۴)؛ کاظمی بونچناری و همکاران، (۹، ۱۵)؛ یوسف‌نژاد و همکاران، (۱۶) و کلوپ و همکاران، (۲۱) در دوره‌های قبل از شیرگیری، بعد از شیرگیری و کل دوره پرورش بر افزایش وزن روزانه گوساله‌های شیرخوار اثری نداشت. بر خلاف نتایج آزمایش

نتایج آزمایش حاضر با نتایج دیگر محققین از جمله فصیحی و خوروش، (۱۳)؛ رجبی و همکاران، (۱۴)؛ کاظمی بونچناری و همکاران، (۱۵)؛ یوسف‌نژاد و همکاران، (۱۶) در یک راستا بود. در تضاد نتایج مطالعه‌ی حاضر مک‌دائل و همکاران، (۱۷) و کوگلی و همکاران، (۱۸) گزارش کردند که صرف‌نظر از نوع منبع اسید چرب، مصرف ماده خشک روزانه گوساله‌ها تحت تأثیر مصرف اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶ بود. نتایج هیل و همکاران، (۱۹) نشان داد افزودن اسید چرب با منبع امگا-۳ (روغن کتان) و امگا-۶ (روغن کانولا) به جایگزین شیر باعث افزایش مصرف خوراک شد. همچنین این محققین در آزمایش دیگر بیان کردند با افزایش روغن نمک کلسیمی روغن کتان در خوراک در دوره‌ی قبل از شیرگیری، گوساله‌ها تمایل بیشتری به مصرف خوراک و در دوره‌ی بعد از شیرگیری تفاوتی مشاهده نشد (۵). محتشمی و همکاران (۲۰) مشاهده کردند در گوساله‌های تغذیه شده با گروه حاوی اسیدهای چرب امگا-۳ (روغن

حاضر، افزودن منبع اسید چرب امگا-۳ به جیره آغازین در مقایسه با جیره شاهد باعث افزایش وزن روزانه گوساله‌های شیرخوار در کل دوره آزمایش شد (۱۵). در صورتی که گوساله‌های دریافت‌کننده اسیدهای چرب امگا-۳ (روغن ماهی) در مقایسه با اسیدهای چرب امگا-۶ (روغن سویا) در دوره قبل از شیرگیری و کل دوره آزمایش دارای افزایش وزن روزانه پایین بودند (۲۰). عدم تاثیر جیره‌های آزمایشی بر افزایش وزن روزانه گوساله‌های شیرخوار در آزمایش حاضر را می‌توان به مصرف ماده خشک یکسان (۲) در این گوساله‌ها ارتباط داد. برخلاف نتایج حاضر، رجبی و همکاران، (۱۴) و کاظمی-بونچناری و همکاران، (۱۵) عنوان کردند گوساله‌های دریافت‌کننده اسید چرب امگا-۳ در مقایسه با گروه اسید چرب امگا-۶ در روز شیرگیری وزن بدن بیشتری داشتند. اما در تحقیق دیگری که همسو با نتایج ما بود، مکمل اسیدهای چرب امگا-۳ (روغن ماهی) در مقایسه با اسیدهای چرب امگا-۶ (روغن سویا) باعث کاهش وزن بدن گوساله‌های شیرخوار در زمان شیرگیری شد (۲۰). همچنین این نتایج همسو با مطالعات ویستوبا و همکاران، (۲۲) می‌باشد که گزارش کردند افزودن امگا-۳ در جیره گوساله‌های در حال چرا بدلیل کاهش قابلیت هضم فیبر اثر منفی بر افزایش وزن دارد. مطالعه برروی نشخوارکنندگان کوچک نشان داد روغن سویا باعث افزایش وزن و مصرف خوراک شد در حالی‌که در استفاده از روغن ماهی و آفتابگردان اثر مثبتی دیده نشد (۲۳). هریستوف و همکاران، (۲۴) گزارش کردند با کاهش درجه اشباعیت و افزایش تعداد باند دوگانه در اسیدهای چرب از میزان قابلیت هضم فیبر و انرژی دریافتی برای میکروارگانیسم‌های شکمبه کاسته شده و کاهش مصرف خوراک و کمتر شدن افزایش وزن را به دنبال دارد. مک‌نیون و همکاران،

(۸) افزایش وزن بیشتر را در استفاده از سویا به دلیل میزان چربی کمتر و در نتیجه اثر کمتر بر میکروب‌های شکمبه و پروتئین آزاد بیشتر نسبت به دانه‌ی کتان و کانولا گزارش کردند. همچنین سویا بدلیل دارا بودن پروفایل اسیدهای آمینه بهتر و مقدار مناسب چربی، منبع خوبی برای تامین پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه و انرژی برای گوساله‌های جوان نیازمند انرژی زیاد و پروتئین با کیفیت می‌باشد (۹). در تضاد با نتایج آزمایش حاضر، افزودن مکمل اسیدهای چرب امگا-۳ به جیره آغازین در مقایسه با جیره شاهد باعث افزایش بازده استفاده از خوراک در دوره پیش از شیرگیری و کل دوره آزمایش شد (۱۵). همسو با نتایج ما، در صورتی که جیره آغازین حاوی مکمل اسیدهای چرب امگا-۳ (روغن ماهی) در مقایسه با اسیدهای چرب امگا-۶ (روغن سویا) بر بازده استفاده از خوراک در گوساله‌های شیرخوار اثری نداشت (۲۰). مک‌نیون و همکاران، (۸) بررسی منبع دانه روغنی بر گوساله‌های نر پروراری، هیل و همکاران، (۵، ۱۹) افزودن اسیدهای چرب امگا-۳ به خوراک آغازین و جایگزین شیر، بالو و همکاران، (۲) افزودن روغن ماهی و کانولا به جایگزین شیر اعلام کردند افزودن اسیدهای چرب امگا-۳ در مقایسه با امگا-۶ اثری بر بازده خوراک ندارد. در حالی که در مطالعه‌ی دیگر اعلام کردند تغییر منبع چربی و ترکیب اسیدهای چرب با روغن کانولا و نارگیل باعث افزایش بازده خوراک خواهد شد (۱۹). متناقض بودن گزارش‌های ارائه شده در خصوص مصرف اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶ توسط گوساله‌های شیرخوار به دلایلی از قبیل نژاد، دیگر اجزای خوراک آغازین، جایگزین شیر، مقدار مکمل چربی، نوع مکمل چربی و الگوی اسیدهای چرب می‌توان ارتباط داد. نتایج حاصله در این آزمایش حاکی از این است که گوساله‌های دریافت‌کننده روغن سویا دارای عمق بدن و جثه

علاوه بر این مکمل روغن کتان دارای روزهای درگیری با اسهال کمتری در مقایسه با تیمار شاهد و چربی پالم بود (۲۸).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که استفاده از روغن سویا دارای اسیدهای چرب امگا-۶ و روغن ماهی دارای اسیدهای چرب امگا-۳ در گوساله‌های شیرخوار تأثیر معنی‌داری بر روی صفات افزایش وزن بدن، خوراک مصرفی، ضریب تبدیل غذایی، فاکتورهای رشد و اسکلتی، نمره مدفوع و سلامت نداشته است. حال آن‌که مصرف روغن سویا در مقایسه با روغن ماهی از نظر صفات عملکردی منجر به بهبود وزن بدن، خوراک مصرفی و فاکتور رشد گوساله‌ها شده است. در به‌طور کلی روغن‌های مورد استفاده در گروه‌های آزمایشی هیچ اثرات منفی بر روی عملکرد رشد و سلامت گوساله‌ها نداشت. بازده خوراک مصرفی پایین در گروه‌هایی که از روغن سویا استفاده کردند بدست آمد بدین معنی که حیوان به ازای هر واحد وزن، غذای کمتری مصرف نموده است و بازده خوراک تقریباً ۱۳ درصد بهبود یافته است. بنابراین، چنانچه هزینه تولید در نظر گرفته شود، این تیمار از لحاظ اقتصادی مقرون به‌صرفه خواهد بود. از طرفی، همه دام‌ها از لحاظ شاخص سلامتی (اسکور شادابی و اسکور مدفوع) در حد مطلوبی قرار داشته‌اند.

منابع

1. Calder PC. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids. 2008;79(3-5):101-108.
2. Ballou MA, Cruz GD, Pittroff W, Keisler DH, DePeters EJ. Modifying the acute phase response of Jersey calves by supplementing milk replacer with omega-3

بالاتری نسبت به گوساله‌هایی دریافت‌کننده روغن ماهی هستند. چنین استنباط می‌گردد که گوساله‌های دریافت‌کننده روغن سویا به دلیل مصرف خوراک بالاتر افزایش عمق بدن بیشتری را داشتند که این افزایش حجم شکمبه‌ای نشان‌دهنده توسعه فیزیکی شکمبه در گوساله‌های دریافت‌کننده روغن سویا می‌باشد. برخلاف نتایج ما، گروه‌های حاوی مکمل اسیدهای چرب امگا-۳ در مقایسه با گروه شاهد باعث افزایش ارتفاع جدوگاه گوساله‌های شیرخوار در زمان شیرگیری شد اما بر طول بدن، دور شکم و پهنای هیپ اثری نداشت (۱۵). اگرچه در آزمایش دیگر افزودن مکمل اسیدهای چرب امگا-۳ (روغن ماهی) در مقایسه با امگا-۶ (روغن سویا) بر ارتفاع جدوگاه، دور شکم و پهنای هیپ گوساله‌های شیرخوار اثر نداشت اما طول بدن آنها را کاهش داد (۲۰). بهبود بیشتر شاخص‌های رشد اسکلتی را می‌توان به اثر مثبت اسیدهای چرب امگا-۶ بر متابولیسم و رشد استئوکلاستهای بافت استخوان و نقش تنظیم‌کنندگی اسیدهای چرب امگا-۶ بر رشد و سلامت استخوان (۲۵) و بالاتر بودن غلظت انسولین پلاسما (جدول ۴) در این گوساله‌ها ارتباط داد. انسولین به عنوان یک هورمون آنابولیک بر رشد بافت استخوان اثر مثبت دارد (۲۶). از جنبه دیگر، عوامل اصلی مداخله‌کننده در جذب کلسیم حضور اسیدهای چرب فرار در شکمبه است زیرا این اسیدها از آنیون‌های اصلی موجود در شکمبه هستند که با کاهش pH سبب یونیزه‌شدن کلسیم و جذب فعال این عنصر، از طریق ناقلین یا تعویض‌کننده‌های کلسیم/پروتون مشابه منیزیم می‌شوند (۱۱). تغذیه اسید چرب امگا-۳ اثرات مثبتی روی سلامت و سیستم ایمنی گوساله‌ها داشت (۲۷). گوساله‌های دریافت‌کننده روغن ماهی دارای نمره مدفوع بهتری نسبت به سایر تیمارها در کل دوره آزمایشی بودند.

10. National Research Council, Committee on Animal Nutrition and Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition, 2001. Nutrient requirements of dairy cattle: 2001. National Academies Press.
11. Khan MA, Lee HJ, Lee WS, Kim HS, Ki KS, Hur TY, Suh GH, Kang SJ, Choi YJ. Structural growth, rumen development, and metabolic and immune responses of Holstein male calves fed milk through step-down and conventional methods. *J Dairy Sci.* 2007;90(7):3376-3387.
12. Larson LL, Owen FG, Albright JL, Appleman RD, Lamb RC, Muller LD. Guidelines toward more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. *J Dairy Sci.* 1977; 60(6):989-991.
13. Fasihi H, Khorosh M. Investigating the interaction effect of the ratio of omega-6 to omega-3 fatty acids with different levels of vitamin E in starter feed on the performance and immunological responses of Holstein calves. Master's Thesis in Animal Sciences, Isfahan University, 2012; pp:36-40.
14. Rajabi A, Fatahnia F, Kazemi-Bonchenari M, Shams-Elahi M, Jahani Azizabadi H. The interaction effect of type of fatty acid (omega-6 or omega-3) and crude protein level of starter diet on growth performance, blood parameters in Holstein weanling calves, Master's Thesis in Animal Science, Ilam University, 2021; pp:29-34.
15. Kazemi-Bonchenari M, Dehghan-Banadaky M, Fattahnia F, Saleh-Bahmanpour A, Jahani-Moghadam M, Mirzaei M. Effects of linseed oil and rumen undegradable protein: rumen degradable protein ratio on performance of Holstein dairy calves. *Br J Nutr.* 2020;123(11):1247-1257.
16. Yousefinejad S, Fattahnia F, Kazemi-Bonchenari M, Khanaki H, Drackley JK, Ghaffari MH. Soybean oil supplementation and starter protein content: Effects on growth performance, digestibility, ruminal fermentation, and urinary purine derivatives fatty acids from fish oil. *J Dairy Sci.* 2008; 91(9):3478-3487.
3. Garcia M, Greco LF, Lock AL, Block E, Santos JEP, Thatcher WW, Staples CR. Supplementation of essential fatty acids to Holstein calves during late uterine life and first month of life alters hepatic fatty acid profile and gene expression. *J Dairy Sci.* 2016;99(9):7085-7101.
4. Ghorbani H, Kazemi-Bonchenari M, HosseinYazdi M, Mahjoubi E. Effects of various fat delivery methods in starter diet on growth performance, nutrients digestibility and blood metabolites of Holstein dairy calves. *Anim Feed Sci Technol.* 2020;262:114429.
5. Hill TM, Bateman HG, Aldrich JM, Schlotterbeck RL. Effect of various fatty acids on dairy calf performance. *The Professional Animal Scientist (PAS).* 2011; 27(3):167-175.
6. Masmeijer C. A Fat chance for calves: influence of dietary supplemented fatty acids on immune, health and production variables in stressed calves (Doctoral dissertation, Ghent University). 2019; pp:55-58.
7. Karcher EL, Hill TM, Bateman HG, Schlotterbeck RL, Vito N, Sordillo LM, VandeHaar MJ. Comparison of supplementation of n-3 fatty acids from fish and flax oil on cytokine gene expression and growth of milk-fed Holstein calves. *J Dairy Sci.* 2014;97(4):2329-2337.
8. McNiven MA, Duynisveld JL, Turner T, Mitchell AW. Ratio of n-6/n-3 in the diets of beef cattle: Effect on growth, fatty acid composition, and taste of beef. *Anim Feed Sci Technology.* 2011;170(3-4):171-181.
9. Kazemi-Bonchenari M, Mirzaei M, Jahani-Moghadam M, Soltani A, Mahjoubi E, Patton RA. Interactions between levels of heat-treated soybean meal and prilled fat on growth, rumen fermentation, and blood metabolites of Holstein calves. *J Anim Sci.* 2016;94(10):4267-4275.

- supplementation on growth and immune system characteristics of cattle. *J Anim Sci.* 2005;83(5):1097-1101.
23. Lewis, G.S., Wulster-Radcliffe, M.C. and Herbein, J.H., Fatty acid profiles, growth, and immune responses of neonatal lambs fed milk replacer and supplemented with fish oil or safflower oil. *Small Rumin Res.* 2008;79(2-3):167-173.
24. Hristov AN, Kennington LR, McGuire MA, Hunt CW. Effect of diets containing linoleic acid-or oleic acid-rich oils on ruminal fermentation and nutrient digestibility, and performance and fatty acid composition of adipose and muscle tissues of finishing cattle. *J Anim Sci.* 2005;83(6):1312-1321.
25. Kapoor B, Kapoor D, Gautam S, Singh R, Bhardwaj S. Dietary polyunsaturated fatty acids (PUFAs): Uses and potential health benefits. *Curr Nutr Rep.* 2021;10:232-242.
26. Dimitrova R, December. Bone and insulin resistance-a literature review. In *Varna Med Forum.* 2020;9(2):78-88.
27. Garcia M, Greco LF, Lock AL, Block E, Santos JEP, Thatcher WW, Staples CR. Supplementation of essential fatty acids to Holstein calves during late uterine life and first month of life alters hepatic fatty acid profile and gene expression. *J Dairy Sci.* 2016;99(9):7085-7101.
28. Kadkhoday A, Riasi A, Alikhani M, Dehghan-Banadaky M, Kowsar R. Effects of fat sources and dietary C18: 2 to C18: 3 fatty acids ratio on growth performance, ruminal fermentation and some blood components of Holstein calves. *Livestock Sci.* 2017;204:71-77.
- of Holstein dairy calves. *J Dairy Sci.* 2021; 104(2):1630-1644.
17. McDonnell RP, O'Doherty JV, Earley B, Clarke AM, Kenny DA. Effect of supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and/or β -glucans on performance, feeding behaviour and immune status of Holstein Friesian bull calves during the pre-and post-weaning periods. *J Anim Sci Biotechnol.* 2019;10:1-17.
18. Quigley JD, Hill TM, Hulbert LE, Dennis TS, Suarez-Mena XF, Bortoluzzi EM. Effects of fatty acids and calf starter form on intake, growth, digestion, and selected blood metabolites in male calves from 0 to 4 months of age. *J Dairy Sci.* 2019; 102(9):8074-8091.
19. Hill TM, Quigley JD, Suarez-Mena FX, Bateman HG, Schlotterbeck RL. Effect of milk replacer feeding rate and functional fatty acids on dairy calf performance and digestion of nutrients. *J Dairy Sci.* 2016; 99(8):6352-6361.
20. Mohtashami B, Khalilvandi-Behroozyar H, Pirmohammadi R, Dehghan-Banadaky M, Kazemi-Bonchenari M, Dirandeh E, Ghaffari MH. The effect of supplemental bioactive fatty acids on growth performance and immune function of milk-fed Holstein dairy calves during heat stress. *Br J Nutr.* 2022;127(2):188-201.
21. Klopp RN, Franco JFH, Hogenesch H, Dennis TS, Cowles KE, Boerman JP. Effect of medium-chain fatty acids on growth, health, and immune response of dairy calves. *J Dairy Sci.* 2022;105(9):7738-7749.
22. Wistuba TJ, Kegley EB, Apple JK, Davis ME. Influence of fish oil

Research Article**Effect of Berberine on Sperm Profile in Varicocele-Induced Rats****Sogol Fami Tafreshi¹, Akram Eidi^{1*}, Pejman Mortazavi², Ahmad Asghari³**

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Veterinary Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- Department of Veterinary Clinical Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Corresponding author: akeidi@iau.ac.ir

Received: 23 November 2024

Accepted: 31 May 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1191336

Abstract

Berberine (C₂₀H₁₉NO) is a quaternary isoquinoline extracted from a variety of medicinal plants including *Berberis aquifolium*, *Berberis aristata*, *Phellodendron amurense*, *Berberis vulgaris* and *Hydrastis canadensis*. This substance has many medicinal properties including antihypertensive, antianxiety, antihyperglycemic, antidepressant, analgesic, anticancer, antioxidant, neuroprotective, anti-inflammatory, antiarrhythmic and cholesterol-lowering. In the present study, the protective effects of berberine on sperm profile in varicocele-induced mice were evaluated. The animals were randomly divided into 9 groups: healthy control, sham, healthy experimental receiving berberine at doses of 25, 50 and 100 mg/kg body weight, varicocele control and experimental varicocele varicocele mice treated with berberine at doses of 25, 50 and 100 mg/kg body weight. After 30 days of treatment, the animals were anesthetized and sperm parameters were examined. The results showed that varicocele induction significantly reduced sperm motility, viability, and count compared to the healthy control group. In addition, sperm abnormalities were significantly increased in varicocele-induced mice. Berberine treatment at doses of 50 and 100 mg/kg body weight significantly increased all sperm quality parameters and reduced the adverse effects of varicocele induction. Berberine treatment did not significantly change sperm characteristics in healthy mice. Therefore, the findings indicate that berberine may have therapeutic potential on the male reproductive system as an antioxidant and has potential clinical application for the treatment of varicocele disorders.

Keywords: Berberine, Varicocele, Sperm, Infertility, Rat.



مقاله پژوهشی

اثر بربرین بر پارامترهای اسپرم در ناباروری القا شده توسط واریکوسل در موش‌های صحرایی نر

سوگل فمی تفرشی^۱، اکرم عیدی^{۲*}، پژمان مرتضوی^۲، احمد اصغری^۳

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه پاتوبیولوژی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- گروه علوم درمانگاهی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مستول مکاتبات: akeidi@iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۳

DOI: 10.60833/ascij.2025.1191336

چکیده

بربرین ($C_{20}H_{19}NO$) یک ایزوکینولین چهارتایی است که از انواع گیاهان دارویی از جمله *Berberis aquifolium*، *Berberis aristata*، *Phellodendron amurense*، *Berberis vulgaris* و *Hydrastis canadensis* استخراج می‌شود. این ماده از خواص دارویی فراوانی از جمله ضد فشار خون بالا، ضد اضطراب، ضد افزایش قند خون، ضد افسردگی، ضد درد، ضد سرطان، آنتی اکسیدان، محافظت از مغز و اعصاب، ضد التهاب، ضد اریتمی و کاهش کلسترول برخوردار است. در تحقیق حاضر، اثرات حفاظتی بربرین بر پروفایل اسپرم در موش‌های با القا واریکوسل ارزیابی گردید. حیوانات به صورت تصادفی به ۹ گروه تقسیم گردیدند: کنترل سالم، شم، تجربی سالم با دریافت بربرین در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، کنترل واریکوسل و تجربی واریکوسل موش‌های واریکوسلی با تیمار بربرین در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن. پس از ۳۰ روز تیمار، حیوانات بیهوش گردیده و پارامترهای اسپرم بررسی شد. نتایج نشان داد که القای واریکوسل به صورت معنی‌داری باعث کاهش تحرک، زنده‌مانی و تعداد اسپرم در مقایسه با گروه کنترل سالم شد. علاوه بر این، ناهنجاری‌های اسپرم به صورت معنی‌داری در موش‌های القا شده با واریکوسل افزایش یافته است. تیمار بربرین در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن به صورت معنی‌داری در تمام پارامترهای کیفیت اسپرم موجب افزایش گردید و اثرات نامطلوب القای واریکوسل را کاهش داد. تیمار بربرین تغییر معنی‌داری در ویژگی‌های اسپرم در موش‌های سالم ایجاد نکرد. بنابراین، یافته‌ها نشان می‌دهد که بربرین احتمالاً دارای پتانسیل درمانی بر سیستم تولیدمثلی مردان به عنوان یک آنتی‌اکسیدان می‌باشد و کاربرد بالینی بالقوه‌ای برای درمان اختلالات واریکوسل دارد.

کلمات کلیدی: بربرین، واریکوسل، اسپرم، ناباروری، موش صحرایی.

مقدمه

می‌شود. واریکوسل در ۱۵ درصد جمعیت عمومی اتفاق می‌افتد و اولین بار در بزرگسالی پدیدار می‌شود (۱). واریکوسل اغلب در مردان نابارور شناسایی می‌شود و در ۴۴ درصد از مردان مبتلا به ناباروری

واریکوسل مجموعه‌ای از سیاهرگ‌های پریپچ و خم شبکه پامپینی‌فرم است که به طور غیرطبیعی بزرگ شده‌اند. این شبکه از وریدها تخلیه بیضه‌ها را فراهم می‌کند و با یک سیاهرگ اسپرماتیک داخلی ادغام

مضری بر بافت‌های مختلف انسان و همچنین بر روی مدل‌های حیوانی ندارد (۶). در مطالعه حاضر اثرات بربرین بر پارامترهای اسپرم در موش‌های صحرایی مدل واریکوسل مورد بررسی قرار داده شد.

مواد و روش‌ها

موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم در یک محیط کنترل شده، در دمای ۲۰±۲۳ درجه سانتیگراد و رطوبت ۵±۵ درصد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفته و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. مطالعه حاضر با کد اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1402.210 به ثبت رسیده است. حیوانات در این مطالعه ابتدا با تزریق کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بصورت تزریق داخل صفاقی بیهوش شدند. القاء مدل واریکوسل به روش Turner انجام گردید که بر گرفته از پدیده فندق‌شکن (Nutcracker Phenomenon) است. حیوانات در حالت سوپاین قرار گرفتند و یک برش در خط وسط بصورت عمودی در شکم در حدود ۳-۴ سانتی‌متر ایجاد شد. پس از باز کردن شکم، احشای شکمی با کمک یک گاز خیس به آرامی به طرف راست بدن انتقال یافتند. یافتن ورید کلیوی چپ و محل ورود ورید اسپرماتیک داخلی به آن صورت گرفت و سپس اطراف ورید کلیوی چپ باز گردید. به موازات ورید کلیوی یک سرسوزن به قطر ۰/۸۵ میلی‌متر قرار داده شد و بوسیله نخ سیلک ۴ صفر روی ورید کلیوی چپ گره زده شد به طوریکه محل گره بعد از محل ورود اسپرماتیک داخلی به ورید کلیوی باشد. بعد از ایجاد گره، سر سوزن خارج گردیده تا ورید به حالت اولیه خود برگردد. با این کار، قطر ورید کلیوی تا ۵۰ درصد کاهش یافته و باعث می‌شود که فشار داخل وریدی افزایش یابد و به ورید اسپرماتیک چپ انتقال

اولیه وجود دارد. همچنین معمولاً در ۸۱-۴۵ درصد از مردان مبتلا به ناباروری ثانویه یافت می‌شود، زیرا تصور می‌شود که واریکوسل در طول زمان اثرات سویی بر عملکرد بیضه دارد (۲). در حالی که رابطه دقیق بین واریکوسل و ناباروری هنوز به طور کامل مشخص نشده است، واریکوسل می‌تواند بر غلظت، تحرک و مورفولوژی اسپرم و همچنین یکپارچگی DNA اسپرم تأثیر منفی بگذارد. مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژی این بیماری بطور دقیق شناخته نشده است اما می‌توان به استرس اکسیداتیو، هیپوترمی اسکروتال، رفلکس متابولیت‌ها، آپوپتوزیس اشاره کرد (۳). استرس اکسیداتیو عامل اختلال در تعادل بین گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و ظرفیت بافری آنتی‌اکسیدان‌ها است (۴). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که استرس اکسیداتیو می‌تواند باعث آسیب به غشای اسپرم و DNA شود، اسپرم‌زایی را مختل کرده و تحرک اسپرم را کاهش دهد (۴). روش‌های درمانی متفاوتی مانند واریکوسلکتومی بطور معمول برای مردان واریکوسلی انجام می‌گردد که اگرچه پارامترهای اسپرمی و هورمونی را بهبود می‌بخشد به همین دلیل وجود عوارض بسیار در اثر واریکوسلکتومی استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های معمولاً می‌تواند پارامترهای اسپرمی را بهبود بخشد (۵). بربرین آلکالوئیدی است که در گیاهانی از جمله زرشک (*Berberis vulgaris*)، عصاره ریشه قبلی چینی (*Coptis chinensis*) و خوک طلائی (*Hydrastis canadensis*) یافت می‌شود. بربرین دارای ویژگی‌های دارویی متعددی از جمله خواص ضد اضطراب، ضد التهاب، ضد افسردگی، ضد درد و ضد فراموشی است. اثرات درمانی بربرین بر ایسکمی مغزی و سکنه نشان داده شده است. علاوه بر این، اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی بربرین نیز قبلاً گزارش شده است و نشان داده شده است که بربرین هیچ اثر

یابد و واریکوسل ایجاد گردد. احشای شکمی به آرامی به محل خود باز گردانده شدند و محل برش شکمی بوسیله نخ ۴ صفر سیلک بخیه زده شد و آنتی-بیوتیک تتراسایکلین به محل بخیه زده شد (۷). حیوانات در ۹ گروه به صورت تصادفی تقسیم بندی شدند، هر گروه شامل ۶ سر موش بودند. ۱- گروه کنترل سالم که حیوانات هیچ گونه درمان و مداخله ای دریافت نکردند. ۲- گروه شم، حیوانات در این گروه تحت عمل جراحی قرار گرفتند ولی القای واریکوسل در آنها صورت نگرفت. ۳ تا ۵- گروه‌های تجربی سالم که بربرین در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند. ۶- گروه کنترل نابارور که القای واریکوسل در این گروه حیوانات صورت گرفت. ۷ تا ۹- گروه‌های تجربی نابارور حیوانات با القای واریکوسل نابارور شده و بربرین در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند. مدت تیمار ۲۸ روز و بصورت گاوژ بود. پس از ۲۸ روز حیوانات بیهوش شدند و برای جمع‌آوری نمونه‌های اسپرم، اپی دیدیم چپ در شرایط استریل جدا شد و درون فالكون حاوی ۱ میلی لیتر محلول + T6 حاوی ۱۰ درصد BSA ۱۵ درصد که از قبل در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد قرار داده شد و اپی دیدیم به قطعاتی تقسیم شد. با مشاهده محلول همگن اطمینان از استخراج اسپرم‌ها حاصل شد. برای تخلیه کامل اسپرم‌ها درون محلول، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۵ درصد CO_2 قرار داده شد. مایع کدر رنگی حاصل شد که برای مخلوط کردن چندبار پیپت شد. ۱۰ میکرولیتر از محلول حاصل بر روی لام گذاشته شد. برای بررسی تعداد اسپرم‌ها از لام هماسیتومتر استفاده شد. محلولی حاوی ۵ میکرولیتر فرمالین (شامل $NaHCO_3$ ۵ درصد و تریپان بلوی ۲۵/۰ درصد) با ۹۵ میکرولیتر محلول اسپرم مخلوط

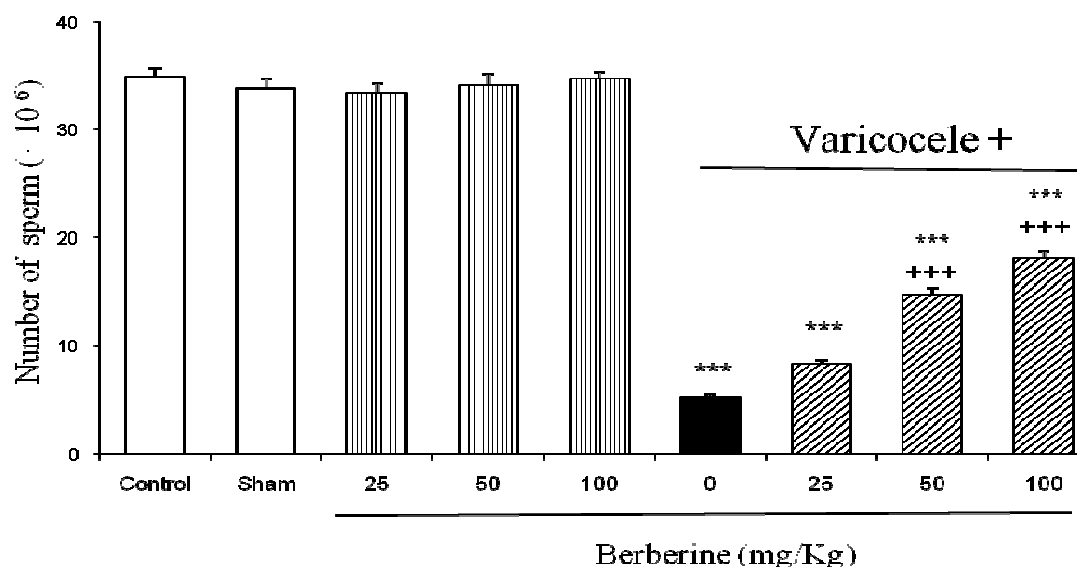
شد. این مخلوط، در لام بارگذاری شد. ۴ مربع ۱۶ خانه‌ای (متوسط) از لام هماسیتومتر با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ مورد شمارش قرار گرفت (۸). از رنگ‌آمیزی اتوزین-نکروزین برای بررسی میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها مورد استفاده قرار گرفت. از نسبت ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپرم به ۱۰۰ میکرولیتر محلول استفاده شد. اتوزین ۱ درصد به میکروتیوب وارد شد و به دنبال آن محلول فوق به مدت ۳۰ ثانیه در مجاورت ۱۵۰ میکرولیتر نکروزین ۱۰ درصد قرار گرفت. پس از یکنواخت شدن رنگ و سوسپانسیون اسپرم، یک قطره از سوسپانسیون رنگ شده روی لام گذاشته شد و اسمیر ایجاد شد. اسمیر حاصل در هوا خشک شده و مستقیماً زیر میکروسکوپ (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan) با بزرگنمایی ۱۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفت و ۲۰۰ اسپرم در یک زمان شمارش گردید. به این صورت که اسپرم‌های مرده به رنگ صورتی تا قرمز در می آیند و اسپرم‌های زنده بدون رنگ می‌مانند (۵). جهت بررسی تحرک اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم بر روی لامی که از قبل گرم شده بود گذاشته شد. ۱۰ میدان میکروسکوپی با استفاده از یک میکروسکوپ معمولی با بزرگنمایی ۴۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. سه نوع حرکت پیشرونده (Progressive Motility)، حرکت غیرپیشرونده (Non-progressive motility) و بدون‌تحرک (Immotile) مورد بررسی قرار گرفت. درصد تحرک اسپرم با کمک میکروسکوپ کنتراست فاز معکوس ثبت گردید (۵). برای بررسی مورفولوژی اسپرم یک قطره از سوسپانسیون اسپرم بر روی لام گذاشته شد و در هوا خشک شد. اسلاید با الکل ۹۵ درصد تثبیت شد و سپس طبق پروتکل Sperm Blue رنگ‌آمیزی انجام گرفت. ۳۰۰ اسپرم در هر حیوان از نظر شکل با بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی شد و درصد اسپرم‌های

حرکت پیشرونده، حرکت غیر پیشرونده و زنده‌مانی و مورفولوژی اسپرم در حیوانات گروه کنترل واریکوسل در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش معنی‌داری نشان داد. درصد اسپرم‌های غیر پیشرونده و بدون حرکت در حیوانات گروه کنترل واریکوسل در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ $p <$ ایجاد نمود. از طرفی، تیمار با بربرین در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن موجب بهبود در پارامترهای فوق گردید. نمودارهای ۱ تا ۶ اثر تیمارها بر پارامترهای مختلف را نشان می‌دهند.

غیرطبیعی ثبت شد (۹). داده‌ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شدند. مقایسه آماری جهت داده‌های کمی به روش ANOVA دوطرفه انجام شد و از آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید.

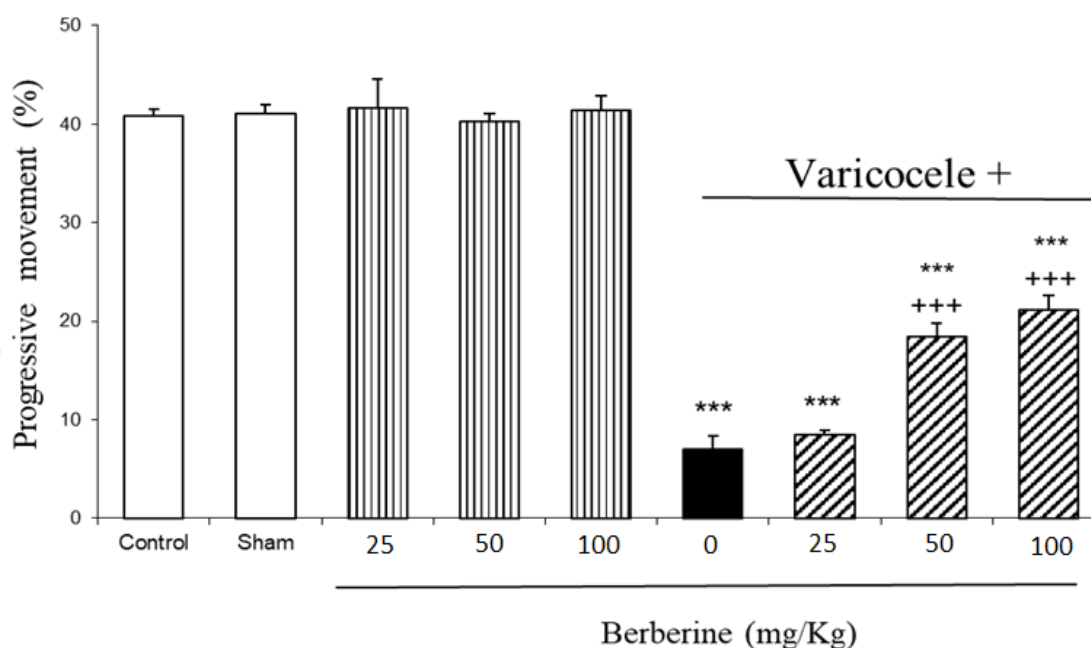
نتایج

پژوهش حاضر نشان داد که تیمار حیوانات سالم با بربرین در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، تغییر معنی‌داری در تعداد، حرکت پیشرونده، اسپرم‌های بدون حرکت، زنده‌مانی و مورفولوژی اسپرم در مقایسه با حیوانات گروه کنترل سالم ایجاد نکرد. نتایج گویای آن است که تعداد،



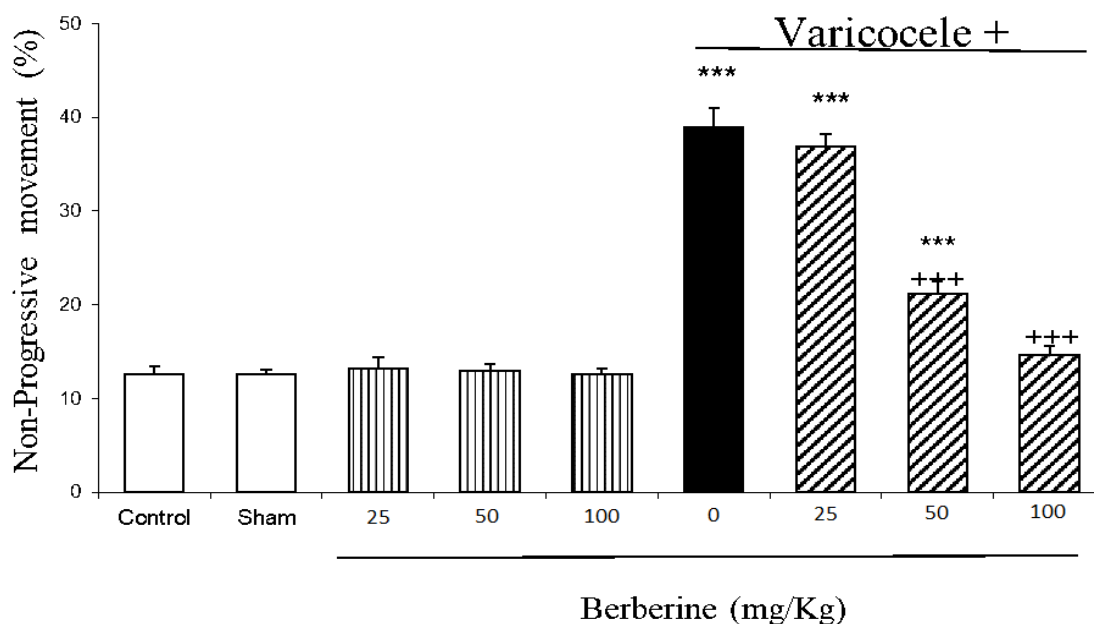
نمودار ۱- اثر تیمار خوراکی بربرین در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر تعداد اسپرم در رت‌های نر سالم و نابارور القا شده توسط واریکوسل. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار میانگین برای ۶ سر رت در هر گروه ارائه شده است. $0/001 < p < ***$ اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $0/001 < p < +++$ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

Fig. 1. Effect of oral berberine treatment at doses of 25, 50 and 100 mg/kg body weight on sperm count in healthy and infertile male rats induced by varicocele. Results are presented as $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ for 6 rats in each group. $***p < 0.001$ indicates difference from healthy control group. $+++p < 0.001$ indicates difference from varicocele control group.



نمودار ۲- اثر تیمار خوراکی بربرین در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر حرکت پیشرونده اسپرم در رت-های نر سالم و نابارور القا شده توسط واریکوسل. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار میانگین برای ۶ سر رت در هر گروه ارائه شده است. $p < 0/001$ *** اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $p < 0/001$ +++ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

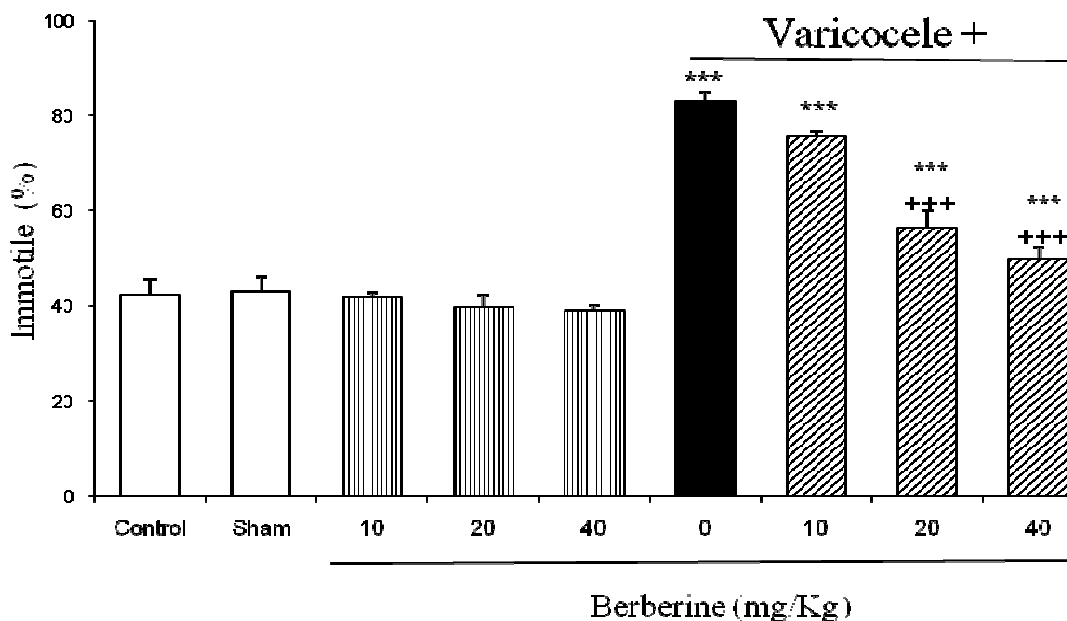
Fig. 2. Effect of oral berberine treatment at doses of 25, 50 and 100 mg/kg body weight on sperm motility in healthy and infertile male rats induced by varicocele. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. *** $p < 0.001$ indicates difference from healthy control group. +++ $p < 0.001$ indicates difference from varicocele control group.



نمودار ۳- اثر تیمار خوراکی بربرین در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر حرکت غیرپیشرونده اسپرم در

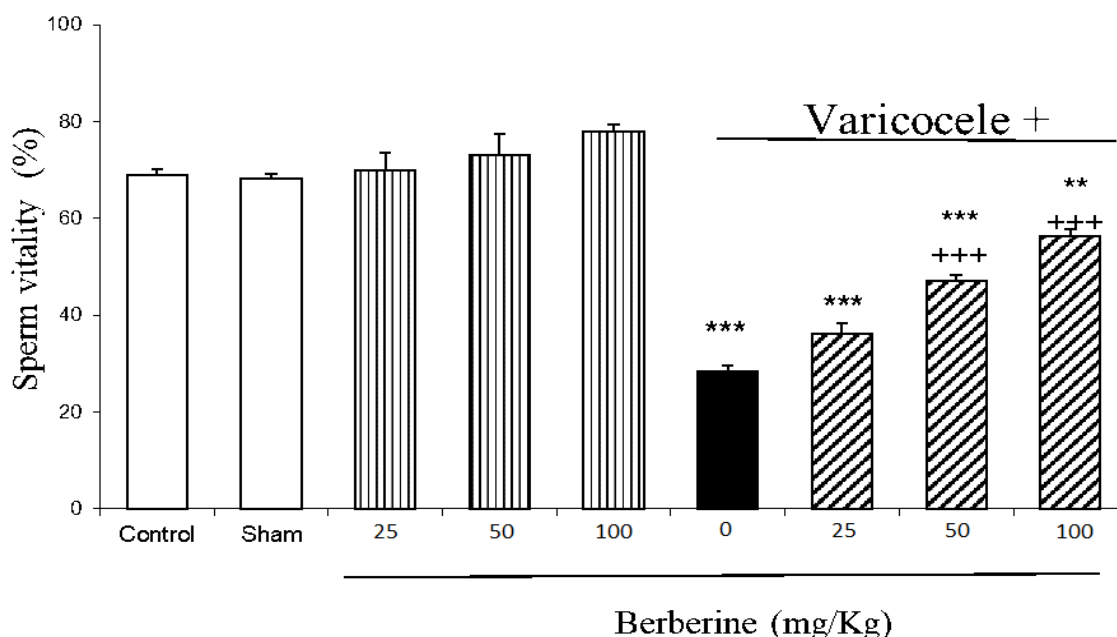
رت‌های نر سالم و نابارور القا شده توسط واریکوسل. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار میانگین برای ۶ سر رت در هر گروه ارائه شده است. $p < 0.001$ *** اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $p < 0.001$ +++ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

Fig. 3. Effect of oral barbering treatment at doses of 25, 50 and 100 mg/kg body weight on non-progressive sperm motility in healthy and infertile male rats induced by varicocele. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. *** $p < 0.001$ indicates difference from healthy control group. +++ $p < 0.001$ indicates difference from varicocele control group.



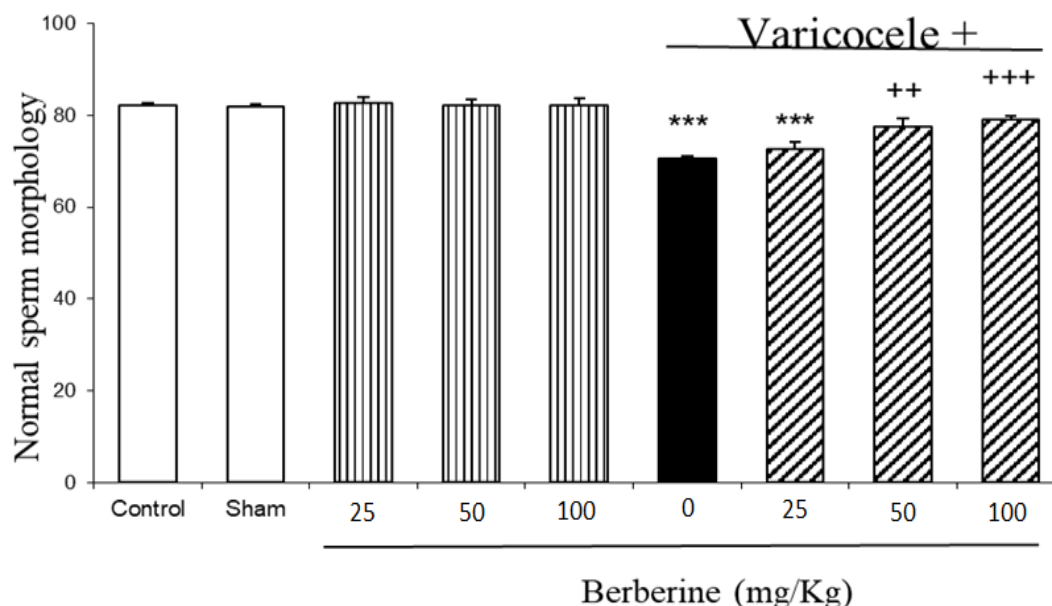
نمودار ۴- بررسی اثر تیمار خوراکی بربرین در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر تعداد اسپرم‌های بدون حرکت در رت‌های نر سالم و نابارور القا شده توسط واریکوسل. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار میانگین برای ۶ سر رت در هر گروه ارائه شده است. $p < 0.001$ *** اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $p < 0.001$ +++ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

Fig 4. Study of the effect of oral barbering treatment at doses of 25, 50 and 100 mg/kg body weight on the number of non-motile sperm in healthy and infertile male rats induced by varicocele. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. *** $p < 0.001$ indicates difference from the healthy control group. +++ $p < 0.001$ indicates difference from the varicocele control group.



نمودار ۵- اثر تیمار خوراکی بربرین در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر زنده‌مانی اسپرم در رت‌های نر سالم و نابارور القا شده توسط واریکوسل. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار میانگین برای ۶ سر رت در هر گروه ارائه شده است. $p < 0.001$ ، $***$ ؛ $p < 0.01$ ، $**$ اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $p < 0.001$ ، $+++$ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

Fig. 5. Effect of oral berberine treatment at doses of 25, 50 and 100 mg/kg body weight on sperm viability in healthy and infertile male rats induced by varicocele. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. $***p < 0.001$, $**p < 0.01$ indicates difference from healthy control group. $+++p < 0.001$ indicates difference from varicocele control group.



نمودار ۶- اثر تیمار خوراکی بربرین در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر مرفولوژی اسپرم در رت‌های نر سالم و نابارور القا شده توسط واریکوسل. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار میانگین برای ۶ سر رت در هر گروه ارائه شده است.

شده است. $p < 0/001$ *** اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $p < 0/001$ +++، $p < 0/01$ ++ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

Fig. 6. Effect of oral berberine treatment at doses of 25, 50 and 100 mg/kg body weight on sperm morphology in healthy male rats and infertile male rats induced by varicocele. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. *** $p < 0.001$ indicates difference from the healthy control group. +++ $p < 0.01$ indicates difference from the varicocele control group.

بحث

پروستاگلاندین‌ها سبب کاهش تعداد سلول‌های لیدیک و کاهش سطح هورمون تستوسترون می‌گردد. تستوسترون برای بلوغ لوله‌های منی ساز لازم است و ترشح آن سبب گسترش و رشد لوله‌های منی‌ساز می‌شود (۱۴). به نظر می‌رسد که هیپوکسی و استرس اکسیداتیو ناشی از واریکوسل ممکن است باعث کاهش حرکت پیشرونده اسپرم‌ها شوند. تحرک اسپرم یکی از عوامل اصلی تعیین کننده در ظرفیت اسپرم برای عبور از لوله‌های فالوپ به منظور لقاح است. آنتی‌اکسیدان‌ها با تنظیم عملکردهای مختلف بر روی حرکت اسپرم موثر واقع می‌شوند (۱۵). رسپتورهای جهت بیان آنزیم سیکلواکسیژناز و پروستاگلاندین E2 در سلول‌های اسپرماتوژنیک وجود دارد که تولید پروستاگلاندین‌ها به‌خصوص پروستاگلاندین E2 در سلول‌های اسپرم‌ساز بر مورفولوژی اسپرم تاثیر می‌گذارد و میزان باروری را کاهش می‌دهند. اینترفرون گاما، اینترلوکین-۱۰ و اینترلوکین-۸ باعث لیپید پراکسیداسیون در غشا اسپرم شده و میزان MDA را افزایش می‌دهند که در نهایت سبب کاهش ظرفیت اسپرم و ناباروری می‌گردند (۱۶). همچنین شاخص‌های التهابی دخیل در بیماری واریکوسل سبب افزایش میزان تولید نیتریک اکساید می‌شوند که تحرک اسپرم را کاهش می‌دهند (۱۷). خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی ناشی از بربرین و همچنین اثر غیرسمی آن بر بافت‌های انسانی، آن را به عنوان یک عامل درمانی تازه کشف شده تبدیل کرده است. مسیرهای

نتایج این مطالعه نشان داد که القا واریکوسل باعث کاهش تعداد اسپرم، حرکت پیشرونده، افزایش اسپرم‌های غیرپیشرونده یا بدون حرکت شده است. از طرفی القا واریکوسل سبب کاهش تعداد اسپرم با مورفولوژی طبیعی گردید. تیمار بربرین در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم باعث بهبود پارامترهای اسپرمی می‌شود. القا واریکوسل با ایجاد تغییرات در پارامترهای اسپرم توسط مکانیسم‌های زمینه‌ای مختلف از جمله استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز منجر به ناباروری می‌گردد (۱۰). در مطالعه‌ای توسط Russo در سال ۲۰۲۴ صورت گرفته است نقش بالقوه استرس اکسیداتیو در پاتوژنز بیضه با آسیب واریکوسل تایید گردیده است (۱۰). القا واریکوسل مرتبط با افزایش استرس اکسیداتیو است که با افزایش سطوح MDA در بافت بیضه می‌باشد. MDA محصول جانبی پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از عدم تعادل ROS است و به عنوان نشانگر استرس اکسیداتیو عمل می‌کند. در مراحل اولیه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند تا حدی کیفیت پارامترهای اسپرمی را بهبود ببخشد (۱۰). تحرک اسپرم در بسیاری از مردان نابارور مبتلا به واریکوسل به تنهایی یا همراه با سایر پارامترهای اسپرمی تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۱۱). Gabriela و همکاران نشان دادند که واریکوسل باعث کاهش تحرک اسپرم می‌شود و تعداد اسپرم‌های با شکل غیرطبیعی در گروه واریکوسل بیشتر است (۱۲، ۱۳). واریکوسل با افزایش سطح

سیگنالینگ که از طریق آن بربرین اثرات خود را اعمال می‌کند حائز اهمیت می‌باشد. بربرین استرس اکسیداتیو را از طریق القای مسیر فاکتور هسته‌ای فاکتور ۲ (Nrf2) مرتبط با اریترئید ۲ سرکوب می‌کند. Nrf2 یک فاکتور رونویسی است که منجر به رونویسی آنزیم‌های فاز II و ژن‌های پروتئین‌های محافظ سلولی مانند NAD(P)H کینون اکسیدوردوکتاز-۱ (NQO-1) و هم اکسیژناز-۱ می‌شود. (HO-1) با طیف گسترده‌ای از فعالیت‌ها در تنظیم حالت ردوکس و متابولیسم انرژی در سلول‌ها نقش دارد. Nrf2 به‌عنوان یک واسطه مهم بربرین در کاهش استرس اکسیداتیو شناخته شده است، زیرا مسدود کردن Nrf2 فعالیت آنتی‌اکسیدانی بربرین را از بین می‌برد. بربرین از طریق مکانیسم‌های پیچیده التهاب را سرکوب می‌کند. علاوه بر فعالیت آنتی-اکسیدانی، مسیر AMPK نیز برای اثر ضدالتهابی بربرین مهم است. مسدود کردن AMPK می‌تواند اثر مهار بربرین را بر تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند نیتریک اکسید سنتاز القایی (iNOS) و COX2 در ماکروفاژها از بین ببرد (۱۸). از بربرین به علت داشتن خواص آنتی‌اکسیدان، ضد آپوپتوز و ضد ایسکمی می‌توان برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند سرطان و بیماری‌های گوارشی، متابولیک، قلبی عروقی و عصبی استفاده کرد (۱۹). این گیاه در سیستم تولیدمثلی بویژه در مردان موثر واقع شده است. بربرین در ترکیب با کوآنزیم Co Q10 و/یا به تنهایی، پارامترهای اسپرم را افزایش داده و آسیب DNA اسپرم را در موش‌های مبتلا به واریکوسل کاهش می‌دهد. بربرین افزایش سطح تستوسترون و اینهیین خون، توانایی غدد درون ریز بیضه را افزایش می‌دهد و از سلول‌های لیدیگ در برابر آسیب‌های التهابی و استرس اکسیداتیو ناشی از واریکوسل محافظت می‌کند. علاوه بر این، بربرین سطح هورمون‌های جنسی

سرم را در واریکوسل تجربی افزایش می‌دهد و با کاهش فعالیت LH، FSH، GnRH و آکالین فسفاتاز، پاسخ‌های التهابی ناشی از واریکوسل را کاهش می‌دهد (۲۰). حسنی بافرانی و همکاران نشان دادند که تیمار با بربرین زنده‌مانی، تعداد و حرکت اسپرم‌ها را افزایش داد که به علت کاهش پارامترهای التهابی IL-6 و TNF- α و کاهش MDA و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی SOD بود (۶). همچنین نجاران و همکاران گزارش کردند که تیمار با بربرین تعداد، حرکت، مورفولوژی و زنده‌مانی اسپرم‌ها را بهبود بخشیده است (۲۱). تحقیق حاضر نشان داد که واریکوسل تعداد، درصد اسپرم‌ها با حرکت پیشرونده و بدون حرکت، مورفولوژی طبیعی اسپرم‌ها را دستخوش تغییر می‌کند. تمامی پارامترهای اسپرمی از جمله تراکم، تحرک و مورفولوژی در افراد مبتلا به واریکوسل نسبت به افراد سالم غیرطبیعی می‌باشند.

نتیجه‌گیری

بربرین با خواص آنتی‌اکسیدانی خود باعث بهبود پارامترهای اسپرمی از طریق کاهش مکانیسم‌های زمینه‌ای از جمله استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی واریکوسلی گردیده است.

منابع

1. Jensen CFS, Østergren P, Dupree JM, Ohl DA, Sønksen J, Fode M. Varicocele and male infertility. *Nat Rev Urol*. 2017;14(9):523-533.
2. Jarow JP, Coburn M, Sigman M. Incidence of varicoceles in men with primary and secondary infertility. *Urology*. 1996;47(1):73-76.
3. Marmar JL. Varicocele and male infertility: part II: the pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. *Hum Reprod Update*. 2001; 7(5):461-472.

varicocele-induced adult rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 1:2172981.

13. Vazquez-Levin MH, Friedmann P, Goldberg SI, Medley NE, Nagler HM. Response of routine semen analysis and critical assessment of sperm morphology by Kruger classification to therapeutic varicocelectomy. *J Urol*. 1997;158(5):1804-1807.

14. Walczak-Jedrzejowska R, Slowikowska-Hilczek J, Marchlewski K, Oszukowska E, Kula K. During seminiferous tubule maturation testosterone and synergistic action of FSH with estradiol support germ cell survival while estradiol alone has pro-apoptotic effect. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007;45(I):59-64.

15. Hamada A, Sharma R, Du Plessis SS, Willard B, Yadav SP, Sabanegh E, Agarwal A. Two-dimensional differential in-gel electrophoresis-based proteomics of male gametes in relation to oxidative stress. *Fertil Steril*. 2013;99(5):1216-1226.

16. Martínez P, Proverbio F, Camejo MI. Sperm lipid peroxidation and pro-inflammatory cytokines. *Asian J Androl*. 2007; 9(1):102-107.

17. Lampiao F, du Plessis SS. TNF- α and IL-6 affect human sperm function by elevating nitric oxide production. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(5):628-31.

18. Cicero AF, Baggioni A. Berberine and Its Role in Chronic Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2016;928:27-45.

19. Song D, Hao J, Fan D. Biological properties and clinical applications of berberine. *Front Med*. 2020; 14:564-582.

20. Mushtaq Z, Imran M, Saeed F, Imran A, Ali SW, Shahbaz M, et al. Berberine: A comprehensive Approach to combat human maladies. *Int J Food Prop*. 2023;26(1):787-807.

21. Najaran H, Rashtbari H, Mohammadi A, Soleimanifar F, Izadpanah F, Haddad

4. Saleh RA, HCLD AA. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl*. 2002;23(6):737-752.

5. Lorian K, Kadkhodae M, Kianian F, Abdi A, Ranjbaran M, Ashabi G, Seifi B. Long-term NaHS administration reduces oxidative stress and apoptosis in a rat model of left-side varicocele. *Andrologia*. 2020; 52(2):e13496.

6. Hassani-Bafrani H, Najaran H, Razi M, Rashtbari H. Berberine ameliorates experimental varicocele-induced damages at testis and sperm levels; evidences for oxidative stress and inflammation. *Andrologia*. 2019;51(2):e13179.

7. Turner T. The study of varicocele through the use of animal models. *Hum Reprod Update*. 2001;7(1):78-84.

8. Kuster C. Sperm concentration determination between hemacytometric and CASA systems: Why they can be different. *Theriogenology*. 2005;64(3):614-617.

9. Van der Horst G, Maree L. SpermBlue®: a new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis. *Biotech Histochem*. 2010;84(6):299-308.

10. Russo GI, Saleh R, Finocchi F, Juma AR, Durairajanayagam D, Kahraman O, et al. Impact of Varicocele on Testicular Oxidative Stress and Sperm Parameters in Experimental Animals: A Systematic Review and Meta-Analysis. *World J Mens Health*. 2024;42(3):563.

11. Villanueva-Diaz C, Vega-Hernandez E, Diaz-Perez M, Echavarria-Sanchez M, Karchmer-Krivitsky S. Sperm dysfunction in subfertile patients with varicocele and marginal semen analysis. *Andrologia*. 1999; 31(5):263-267.

12. Missassi G, dos Santos Borges C, de Lima Rosa J, Villela e Silva P, da Cunha Martins Jr A, Barbosa Jr F, De Grava Kempinas W. Chrysin administration protects against oxidative damage in

Kashani H, Hassani Bafrani H. The protective effect of coenzyme Q10 and berberine on sperm parameters, with and without varicocelelectomy in rats with surgically induced varicoceles. *Comp Clin Pathol*. 2019;28:479-485.

Research Article

The Status of Broiler Farms in Terms of the Distribution Pattern of Resistant *Escherichia coli* Bacteria and Resistance Genes to Fluoroquinolone Antibiotics Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Method

Darioush Behzadpour^{1*}, Kaveh Madhoush², Behzad Kaviani³, Seyyed Mohammad Reza Tabatabaei Mehr¹

1- Department of Veterinary Medicine, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

2- Health Monitoring System, Rasht, Guilan, Iran

3- Department of Horticultural Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

*Corresponding author: dbehzadpour@gmail.com

Received: 18 February 2025

Accepted: 12 May 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1199960

Abstract

Poultry colibacillosis is one of the most common pathogens in poultry and antibiotics play a significant role in controlling this disease. The aim of the present study was to study the frequency of *Escherichia coli* bacteria in broiler chickens in Guilan province and investigate the pattern of drug resistance due to the horizontal transfer of genes through plasmid-type resistance genes to quinolones and the detection of *qnrA* and *qnrB* genes in antibiotic-resistant isolates. *E. coli* bacteria were collected from pericarditis and perihepatitis lesions of 128 broiler chickens belonging to 26 broiler farms in Guilan province. The antibiotic sensitivity of each isolate was evaluated by disc diffusion method. The presence of *qnrA* and *qnrB* plasmid genes were checked by polymerase chain reaction using specific primers. Results showed that out of 128 pieces of chicken carcasses collected in autumn and winter, 21 pieces contained bacteria, and in 4 pieces, these bacteria were isolated from both liver and heart tissues. From 25 isolates of *Escherichia coli*; 24 isolates showed resistance to enrofloxacin, 23 isolates to danofloxacin, 24 isolates to flumequin and 16 isolates to norfloxacin. Out of 16 isolates resistant to all four quinolone antibiotics, 14 isolates carried *qnrA* and *qnrB* genes, 8 isolates had *qnrA* gene, 13 isolates had *qnrB* gene, and 7 isolates had both genes. Totally, the results of this research showed that the resistance to quinolone antibiotics is high and *qnrA* and *qnrB* genes are spread in Guilan province and *qnrB* gene is more abundant.

Keywords: Antibiotics, Drug resistance genes, Poultry, *E. coli*, PCR.



مقاله پژوهشی

وضعیت مرغداری‌های گوشتی از نظر الگوی پراکندگی باکتری‌های مقاوم/شرشیا کولی و ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

داریوش بهزادپور^{۱*}، کاوه مدهوش^۲، بهزاد کاویانی^۳، سید محمدرضا طباطبائی مهر^۱

۱- گروه دامپزشکی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲- سامانه پایش سلامت، رشت، گیلان، ایران

۳- گروه باغبانی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

*مسئول مکاتبات: dbehzadpour@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۳۰

DOI: 10.60833/ascij.2025.1199960

چکیده

کلی‌باسیلوز طیور یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زای طیور می‌باشد و آنتی‌بیوتیک‌ها نقش بارزی در کنترل این بیماری بر عهده دارند. هدف از پژوهش حاضر، مطالعه فراوانی باکتری/شرشیا کولی (*E. coli*) در جوجه‌های گوشتی استان گیلان و بررسی الگوی مقاومت دارویی به دلیل انتقال افقی ژن‌ها، به واسطه ژن‌های مقاومت از نوع پلاسمیدی به کینولون‌ها و ردیابی ژن‌های *qnrA* و *qnrB* در جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بود. باکتری‌های *E. coli* از ضایعات پری‌کاردیت و پری‌هپاتیت ۱۲۸ قطعه مرغ گوشتی متعلق به ۲۶ مرغداری گوشتی استان گیلان جمع‌آوری شدند. حساسیت آنتی‌بیوتیکی هر یک از جدایه‌ها به روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت. حضور ژن‌های پلاسمیدی *qnrA* و *qnrB* به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بررسی گردیدند. نتایج نشان داد که از ۱۲۸ قطعه تلفات مرغداری که در فصول پاییز و زمستان جمع‌آوری شدند، ۲۱ قطعه حاوی باکتری بودند و در ۴ قطعه از هر دو بافت کبد و قلب این باکتری جدا شد. از ۲۵ جدایه *E. coli*؛ ۲۴ جدایه به انروفلوکسازین، ۲۳ جدایه به دانوفلوکسازین، ۲۴ جدایه به فلومکوئین و ۱۶ جدایه به نورفلوکسازین مقاومت نشان دادند. از ۱۶ جدایه مقاوم به هر چهار آنتی‌بیوتیک کینولون، ۱۴ جدایه حامل ژن‌های *qnrA* و *qnrB* بودند که ۸ جدایه دارای ژن *qnrA* و ۱۳ جدایه دارای ژن *qnrB* و ۷ جدایه دارای هر دو ژن بودند. در مجموع، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کینولون در صد بالایی را نشان می‌دهد و ژن‌های *qnrA* و *qnrB* در استان گیلان گسترش یافته و ژن *qnrB* فراوانی بیشتری دارد.

کلمات کلیدی: آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های مقاومت دارویی، طیور، شرشیا کولی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

مقدمه

بیماری‌زا، یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زا در طیور (با میزان مرگ و میر ۵ تا ۵۰ درصد) به‌شمار می‌رود. باکتری *E. coli* مولد کلی‌باسیلوز پرنندگان (APEC) با اخذ ژن‌های عفونت‌زا از سایر باکتری‌ها تبدیل به یک باکتری عفونت‌زای خارج روده‌ای شده و با تضعیف

شرشیا کولی (*Escherichia coli*)، نوعی باسیل گرم-منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که به‌طور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد. وجود این باکتری در آب و غذا معرف آلودگی آن با مدفوع می‌باشد. *E. coli* به تنهایی و یا همراه با سایر عوامل

سیستم ایمنی بدن انسان و حیوانات، ایجاد بیماری می‌کند (۱، ۲). مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک به بزرگ‌ترین تهدید سلامت جهانی و امنیت غذایی تبدیل شده است. یک مشکل روزافزون در مورد *E. coli* و بسیاری از باکتری‌های دیگر، بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این میکروارگانیسم‌ها است. بخشی از این مشکل، در اثر مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک توسط انسان به وجود آمده است، اما بخش دیگر را می‌توان یکی از عواقب استفاده از این ترکیبات، به‌عنوان محرک‌های رشد در غذای حیوانات دانست (۳). کینولون‌ها آنتی‌بیوتیک‌های با طیف وسیعی هستند که روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مؤثرند. فلوروکینولون‌ها به‌طور مستقیم با مهار DNA-جیراز، به‌ویژه در باکتری‌های گرم منفی و توپوایزومراز IV، به‌ویژه در باکتری‌های گرم مثبت، در سنتز DNA باکتری‌ها تداخل ایجاد می‌کنند. مهار توپوایزومراز IV توسط فلوروکینولون‌ها باعث جلوگیری از تکرار مرحله‌ای که برای رونویسی و تکثیر طبیعی لازم است، می‌شود. بهره‌گیری از فلوروکینولون‌ها در درمان پنومونی بسیار مرسوم است، اما مقاومت به این دارو نیز سیر صعودی پیدا کرده است (۴، ۵). ژن‌های پلاسمیدی خانواده *qnr* که به ژن‌های *PMQR* شهرت دارند متعلق به یک خانواده پنتاپتیدهای تکراری بوده و با مهار اتصال کینولون‌ها به DNA-جیراز و توپوایزومراز IV از DNA حفاظت می‌کنند. این ژن‌ها منجر به افزایش ۸ تا ۳۲ برابری در میزان MIC کینولون‌ها می‌شوند (۶). تا کنون تعداد کثیری از ال‌های ژن *qnr* در کروموزوم و پلاسمیدهای خانواده انتروباکتریاسه شناسایی شده‌اند که تعدادشان بالغ بر ۱۰۰ ژن *qnr* می‌باشد که در قالب ۵ خانواده از ژن‌های *qnr* یعنی *qnrA*، *qnrB*، *qnrC*، *qnrD* و *qnrS* طبقه‌بندی می‌شوند (۷). برای مطالعه عناصر ژنتیکی مرتبط با مقاومت ضد میکروبی بین جدایه‌های *E. coli*

در بیماری‌های طیور گوشتی، بررسی نتایج آنتی‌بیوگرام نشان داده است که بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، اسید نالیدیکسیک و کلرامفنیکل وجود دارد. مقاومت در برابر کینولون *gyrA* برابر ۵۶/۳ درصد بود (۸). مکانیسم‌های مقاومت در ۳۶ گونه *E. coli* جدا شده از نمونه‌های زباله، بستر، خاک و آب مزارع مرغداری در جنوب غربی نیجریه مقاومت ۳۰ جدایه (۹۴ درصد) را به بیش از یک آنتی‌بیوتیک نشان داد (۹). غربالگری ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و آنالیز ژنومیک مقایسه‌ای *E. coli* نشان داد که سویه‌های *E. coli* از روده حیوانات و انسان‌ها، دارای محدوده وسیعی از ژن‌های مقاومت به دارو هستند. بسیاری از جدایه‌ها به بیش از یک آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. ژنوم *D107* تعداد قابل توجهی از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها مانند *ermA* و *mphD* را نشان داد که در ژنوم *D4* وجود ندارد. محیط مزارع مرغداری در کشورهای مختلف ممکن است به‌عنوان یک مخزن بالقوه ژن‌های مقاومت ضد میکروبی عمل کرده و همچنین تفاوت‌های تکاملی سویه‌ها از نظر بیان ژن‌های مقاوم را نشان دهد (۱۰). در مطالعه‌ای که در کشور کره در سال ۲۰۲۱ میلادی روی جوجه‌های گوشتی انجام شد، از تعداد ۲۳ جدایه *E. coli* مقاوم به کینولون‌ها که دارای ژن‌های *qnr* بودند، ۹/۴ درصد مربوط به *qnrS*، ۶/۶ درصد *qnrA* و ۳/۸ درصد از نوع *qnrB* بوده‌اند (۱۱). در پژوهشی دیگر، از ۹۶ جدایه *E. coli* مورد بررسی، ۵۳ جدایه (۴۰/۱۶ درصد) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه فلوروکینولون‌ها مقاوم بودند. همچنین، حضور ژن *qnrA* در ۱۸ جدایه (۳۳/۹۶ درصد)، ژن *qnrB* در ۸ جدایه (۱۵/۱۰ درصد) و ژن *qnrS* در ۵ جدایه (۹/۴۳ درصد) از ۵۳ جدایه مقاوم نسبت به فلوروکینولون توسط آزمون PCR تأیید گردید (۱۲). همچنین در

مطالعه دیگری در ایران ۱۷ الگوی مقاومت دارویی در بین ۳۰ جدایه *E. coli* نسبت به ۱۵ آنتی‌بیوتیک پرمصرف در صنعت طیور شناسایی گردید که ۲۶ جدایه (۸۶/۶۷ درصد) به بیش از یک الگو تعلق داشتند، در حالی که ۴ جدایه دیگر (۱۳/۳۳ درصد) هر کدام فقط به یک الگو تعلق داشتند. نتایج این بررسی نشان داد که مقاومت جدایه‌ها نسبت به اکثریت داروهای با مصرف رایج در صنعت طیور ایران بالا می‌باشد که لزوم اجرای قوی طرح پایش ملی برای مقاومت ضد میکروبی و مصرف اصولی آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری به نظر می‌رسد (۱۳). با توجه به اهمیت موضوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شیوع آن در طیور پرورشی استان، هدف از پژوهش حاضر بررسی اختصاصی الگوی پراکندگی باکتری‌های مقاوم *E. coli* و ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون در مرغداری‌های گوشتی با استفاده از روش PCR بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های اخذ شده در این پژوهش، تعداد ۱۲۸ قطعه از تلفات مرغداری‌های گوشتی بوده که به صورت تصادفی از ۲۶ فارم، از مرغداری‌های سراسر استان گیلان جمع‌آوری شده و در اسرع وقت به آزمایشگاه انتقال داده شدند. از هر سالن مرغداری، بین ۲ تا ۴ نمونه اخذ گردید. نمونه‌ها از مرغداری‌هایی جمع‌آوری شدند که تلفات غیر عادی نداشتند. در آزمایشگاه پس از کالبد گشایی، از قلب و کبد لاشه‌ها در شرایط استریل کنار شعله با سوزاندن سطح قلب و کبد نمونه‌برداری شد و به وسیله سوآپ استریل در محیط‌های کشت بلاد آگار، مکانیکی آگار و ائوزین متیلن بلو آگار مرک ساخت آلمان کشت داده شد. در نمونه‌برداری از لاشه‌ها، به علت اینکه غیر از *E. coli*، سایر باکتری‌ها حائز اهمیت نبودند، از نمونه‌برداری از نای، مفاصل و کیسه صفرا صرف‌نظر گردید. سپس

پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از خروج پلیت‌ها از انکوباتور و بررسی آنها، نمونه‌هایی که هیچ رشدی در آنها صورت نگرفته بود، کنار گذاشته شدند. کلنی‌های باکتریایی که فقط در بلاد آگار رشد کردند و در بقیه محیط‌ها رشدی نداشتند، به عنوان گرم مثبت تلقی شده و کنار گذاشته شدند. نمونه‌هایی که در محیط مکانیکی آگار رشد کردند و رنگ محیط را به زرد تغییر دادند، *E. coli* منفی تلقی شدند و کنار گذاشته شدند. نمونه‌هایی که در محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار، جلای سبز فلزی نشان دادند و همچنین در محیط مک‌کانکی آگار تشکیل کلنی صورتی دادند به احتمال قریب به یقین *E. coli* مثبت بودند که پس از رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده باسیل‌های گرم منفی کشت افتراقی جهت تایید انجام شد. در مورد بقیه نمونه‌ها که در هر سه محیط رشد داشتند ولی تشخیص با قطعیت ممکن نبود و نمونه‌هایی که احتمالاً *E. coli* مثبت بودند، برای اطمینان پس از رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده باسیل‌های گرم منفی اکسیداز منفی کشت افتراقی (اندول، متیل رد، ووگس پروسکوئر، سیترات، اوره و لایزین آیرون آگار) با استفاده از محیط‌های کشت ساخت شرکت مرک انجام شد. در نهایت، ۲۵ جدایه *E. coli* به دست آمد. بعد از تفکیک ۲۵ جدایه باکتریایی، از کلونی‌های خالص *E. coli* هر جدایه موصوف جهت تهیه غلظت، معادل کدورت نیم مک‌فارلند برداشته شد. برای تهیه کدورت، از دستگاه اسپکتروفتومتر UNICO ساخت آمریکا در طول موج ۶۲۵ نانومتر استفاده شد. جذب‌های بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ معادل کدورت نیم مک‌فارلند بودند. از کدورت مذکور توسط سوآپ استریل روی محیط کشت مولر هیتون آگار مرک ساخت کشور آلمان جهت انجام آنتی‌بیوگرام به روش انتشار دیسک Kirby-Bauer

گرفت شامل ژن‌های *qnrA* و *qnrB* بودند. توالی ژن‌های موصوف با استفاده از سایت NCBI برای دو ژن مذکور به‌دست آمد و پرایمرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار Oligo نسخه ۷، به‌منظور تکثیر آنها طراحی و سپس بلاست گردید. توالی‌های طراحی‌شده برای ساخت به شرکت سینا کلون داده شد. برای تکثیر ژن‌های *qnrA* و *qnrB* آزمون PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری و ویال مستر میکس حاوی دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات، Taq-پلیمراز، بافر، کلرید منیزیم، آب دو بار تقطیر شده استریل، پرایمرهای فروروار، ریورس و DNA الگو استخراجی با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر شرکت Applied Biosystem مدل en61327 و بر اساس اطلاعات مندرج در جدول ۱ انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز حاوی رنگ Safe stain در حضور لدر DNA کنترل مثبت و کنترل منفی روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و باندهای تشکیل‌شده روی ژل بر اساس اندازه، تحت نور ماورای بنفش ارزیابی گردیدند. سپس ژل آگارز از قالب خارج شده و داخل دستگاه ژل داک ساخت شرکت دنا ژن تجهیز قرار داده شد و از آن عکس تهیه گردید. با توجه به طول ژن که قبلاً محاسبه شده بود و از مقایسه باندهای تشکیل شده با لدر وجود یا عدم وجود ژن‌های مورد نظر تحت بررسی قرار گرفت.

کشت داده سپس دیسک‌های آنتی‌بیوگرام با استفاده از پنس و در شرایط استریل با فاصله حداقل دو سانتی‌متر از هم و یک سانتی‌متر از لبه پلیت‌ها قرار داده شدند و پلیت‌ها به‌مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت انکوباسیون قرار گرفتند. اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد هر داروی ضد میکروبی بر اساس جداول استاندارد CLSI انجام شد و باکتری در یکی از دسته‌های مقاوم، نیمه‌حساس و حساس قرار گرفت (۱۴، ۱۵). در پژوهش حاضر، برای ۲۵ جدایه *E. coli*، از چهار دیسک آنتی‌بیوتیک: انروفلوکساسین (Enrofloxacin) ۵ میکروگرم، دانوفلوکساسین (Danofloxacin) ۱۰ میکروگرم، فلومکوئین (Flumequine) ۳۰ میکروگرم و نورفلوکساسین (Norfloxacin) ۱۰ میکروگرم، ساخت شرکت پادتن طب استفاده شد. برای استخراج DNA پلاسمیدی، ابتدا باکتری *E. coli* در محیط LB (Lauria Bertani Broth) مرک ساخت آلمان کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. سپس محتویات لوله کشت، سانتریفیوژ گردید و از رسوب حاصل برای استخراج پلاسمید استفاده شد. استخراج DNA پلاسمیدی بر اساس شیوه‌نامه کیت استخراج، ساخت شرکت سیناژن انجام شد. ژن‌های مقاومت در برابر فلوروکینولون که در این پژوهش مورد بررسی قرار

جدول ۱- پرایمرهای طراحی شده

Table 1. Designed primers

Gene name	Primer sequence	Annealing temperature	Gene length
<i>qnrA</i>	(F) 5-AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG-3	58°C for 60 sec.	562 bp
	(R) 5-TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC-3		
<i>qnrB</i>	(F) 5-ATG ACG CCA TTA CTG TAT AA-3	48°C for 60 sec.	562 bp
	(R) 5-GAT CGC AAT GTG TGA AGT TT-3		

نتایج

۲۱ نمونه (۱۶/۴ درصد) حاوی باکتری *E. coli* بود، که در ۴ مورد از نمونه‌های مورد بررسی، از هر دو

در مجموع، ۱۲۸ نمونه از ۲۶ فارم مرغداری، بین سنین ۳ تا ۴۷ روز جمع‌آوری شدند که از این تعداد،

بافت کبد و قلب این باکتری جدا شد. بنابراین، ۲۵ جدایه اشرشیا کولی (۱۹/۵۳ درصد)، از ۱۲۸ نمونه جوجه گوشتی مورد بررسی به‌دست آمد. پراکندگی نمونه‌های مثبت از نظر جدایه *E. coli* از نظر آماری معنادار بود ($p \leq 0/05$). بیشترین فراوانی (۲۰ درصد) مربوط به شهرهای رشت، آستانه اشرفیه و املش بود (جدول ۲، شکل ۱). همه نمونه‌های مورد بررسی از شهرستان املش از نظر *E. coli* آلوده بودند. حساسیت باکتری‌های جدا شده به داروهای ضد میکروبی نشان داد که فقط یک مورد از باکتری‌های جدا شده (۴ درصد) به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی حساس بود. بیشترین مقاومت، نسبت به آنتی‌بیوتیک نورفلوکساسین بود که سه مورد از جدایه‌ها (۱۲ درصد) نسبت به آن حساس و ۱۶ جدایه (۶۴ درصد) مقاوم بودند. حساسیت نسبت به سه آنتی‌بیوتیک دیگر مشابه و برابر ۴ درصد از موارد جداسازی شده بود. مقاومت همزمان نسبت به دو آنتی‌بیوتیک، در ۲۴ جدایه (۹۶ درصد) مشاهده شد، همچنین تعداد ۲۳ (۹۲ درصد) و ۱۶ (۶۴ درصد) مورد از جدایه‌ها به‌ترتیب همزمان به سه و چهار آنتی‌بیوتیک مورد بررسی مقاوم بودند. جداول ۳ و ۴ و شکل ۲ توزیع الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ۲۵ جدایه / اشرشیا کولی به‌دست آمده از نمونه‌های مرغ را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی نشان می‌دهد. میانگین سن گله در نمونه‌های جوجه‌های گوشتی مثبت از نظر جدایه اشرشیا کولی، ۲۵/۴۴ و در نمونه‌های منفی، ۲۵/۴۳ روز بود که از نظر آماری معنادار نبود ($p \geq 0/05$). تعداد ۱۵ مورد از ۲۵ جدایه به‌دست آمده (۶۰ درصد)، در محیط کشت EMB جلای فلزی داشتند، که از این تعداد ۹ جدایه (۳۶ درصد) از کبد و ۱۶ مورد (۶۴ درصد) از قلب نمونه‌های مرغ به‌دست آمدند. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که ارتباط بین بافت و جلای فلزی در محیط EMB از

نظر آماری معنادار بود، به طوری که ۱۰۰ درصد جدایه‌های کبد فاقد جلای فلزی در محیط EMB و ۹۳/۷۵ درصد از جدایه‌های قلب دارای جلای فلزی بودند (روش آماری K2، $p \leq 0/05$). تعداد ۱۶ نمونه از ۲۵ نمونه *E. coli* که به هر چهار آنتی‌بیوتیک کینولون مقاومت نشان داده بودند، برای انجام PCR جدا شده و در مرحله بعد، تخلیص ژنومی جدایه‌های *E. coli* انجام شد. درجه خلوص و غلظت DNA موجود در جدایه‌ها توسط الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگاروز یک درصد (شکل ۳) تعیین گردید که همه نمونه‌ها از درجه خلوص و غلظت مناسبی برخوردار بودند. سپس، تکثیر ژن‌های *qnrA* و *qnrB* در جدایه‌های *E. coli* با پرایمرهای مورد نظر و برنامه PCR بهینه‌شده انجام شد و نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نشان‌دهنده تکثیر ژن‌های مورد بررسی در ۱۴ جدایه از ۱۶ جدایه بود. بر اساس شکل ۳، هر دو ژن *qnrA* و *qnrB* باندی معادل ۵۶۲ جفت باز را روی ژل آگاروز نشان دادند. تعداد ۱۴ جدایه از ۱۶ جدایه مورد بررسی (۸۷/۵ درصد)، حداقل یکی از ژن‌های *qnrA* یا *qnrB* را حمل می‌کنند. همچنین، ارزیابی فراوانی ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کینولون نشان داد که از میان ژن‌های مورد بررسی، ژن *qnrB* دارای بیشترین فراوانی می‌باشد. نتایج بررسی حالت‌های مختلف ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *E. coli* در جدول ۵ و شکل ۴ نشان داده شده است. کلیه جدایه‌های حامل هر دو ژن مورد بررسی، از بافت قلب به‌دست آمدند (۷ جدایه از ۱۶ جدایه، معادل ۴۳/۷۵ درصد). از طرف دیگر، کلیه جدایه‌های استخراج شده از بافت کبد نیز تنها حامل ژن *qnrB* بودند (۲۵ درصد) (جدول ۶). بررسی فراوانی ژن‌های *qnrA* و *qnrB* نشان داد که از ۱۶ جدایه *E. coli* مقاوم به هر چهار نوع آنتی‌بیوتیک، ۸ جدایه (۵۰ درصد) دارای ژن *qnrA* بودند که از این میان، ۷ جدایه (۸۷/۵

درصد) دارای جلای فلزی بودند. همچنین، تعداد ۱۳ جدایه (۸۱/۲۵ درصد) دارای ژن *qnrB* بودند که از این میان، ۸ جدایه (۶۱/۵۳ درصد) جلای فلزی داشتند و ۵ جدایه (۳۸/۴۶ درصد) فاقد جلای فلزی بودند. فقط یک جدایه از مجموع ۸ جدایه دارای ژن *qnrA* و فاقد ژن *qnrB* بودند. به عبارت دیگر، ۷ جدایه (۴۳/۷۵ درصد) از مجموع ۱۶ جدایه مورد بررسی دارای هر دو ژن *qnrA* و *qnrB* بودند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که حضور همزمان ژن‌های *qnrA* و *qnrB* در ۷ جدایه از ۱۶ جدایه مورد بررسی، سبب افزایش قابل توجه مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی شده است.

جدول ۲ - توزیع پراکندگی نمونه‌های منفی و مثبت از نظر جدایه *E. coli* در سطح استان گیلان

Table 2. Distribution of negative and positive samples in terms of *E. coli* isolates in Guilan province

City	Positive [No. (%)]	Negative [No. (%)]
Rasht	5 (20)	29 (27.1)
Langaroud	4 (16)	10 (9.3)
Roudbar	2 (8)	9 (8.4)
Roudsar	2 (8)	12 (11.12)
Anzali	0 (0)	8 (7.5)
Shaft	0 (0)	4 (3.7)
Astaneh Ashrafieh	5 (20)	3 (2.8)
Rezvanshahr	0 (0)	11 (10.3)
Sowme éh Sara	1 (4)	8 (7.5)
Amlash	5 (20)	0 (0)
Lahidjan	1 (4)	5 (4.7)
Fooman	0 (0)	8 (7.5)

جدول ۳ - الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ۲۵ جدایه *E. coli* به‌دست آمده از جوجه‌های گوشتی نسبت به چهار آنتی‌بیوتیک مورد بررسی

Table 3. Antibiotic resistance pattern in 25 *E. coli* isolates obtained from broiler chickens to the four antibiotics studied

Resistant cases [No. (%)]	Semi-sensitive cases [No. (%)]	Sensitive cases [No. (%)]	Antibiotic type
24 (96)	0	1 (4)	Enrofloxacin
23 (92)	1 (4)	1 (4)	Danofloxacin
24 (96)	0	1 (4)	Flumequine
16 (64)	6 (24)	3 (12)	Norfloxacin

جدول ۴ - مقاومت همزمان به آنتی‌بیوتیک‌ها در ۲۵ نمونه باکتری *E. coli* جدا شده از جوجه‌های گوشتی در گیلان

Table 4. Simultaneous resistance to antibiotics in 25 *E. coli* bacteria samples isolated from broilers in Guilan

Resistant cases [No. (%)]	Antibiotic type
24 (96)	Flumequine + Enrofloxacin
23 (92)	Danofloxacin + Flumequine + Enrofloxacin
16 (64)	Norfloxacin + Danofloxacin + Flumequine + Enrofloxacin

جدول ۵ - فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *E. coli*

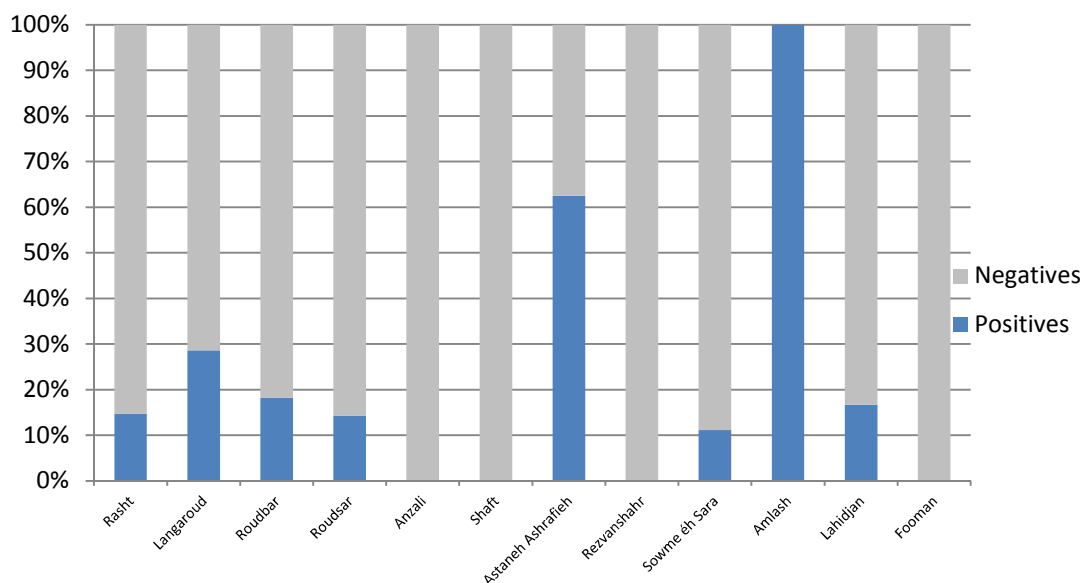
Table 5. Frequency of antibiotic resistance genes in *E. coli* bacteria

Evaluated genes	Number	Percentage
<i>qnrA</i>	8	50
<i>qnrB</i>	13	81.25
<i>qnrB</i> و <i>qnrA</i>	7	43.75

جدول ۶- فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بافت‌های مورد بررسی

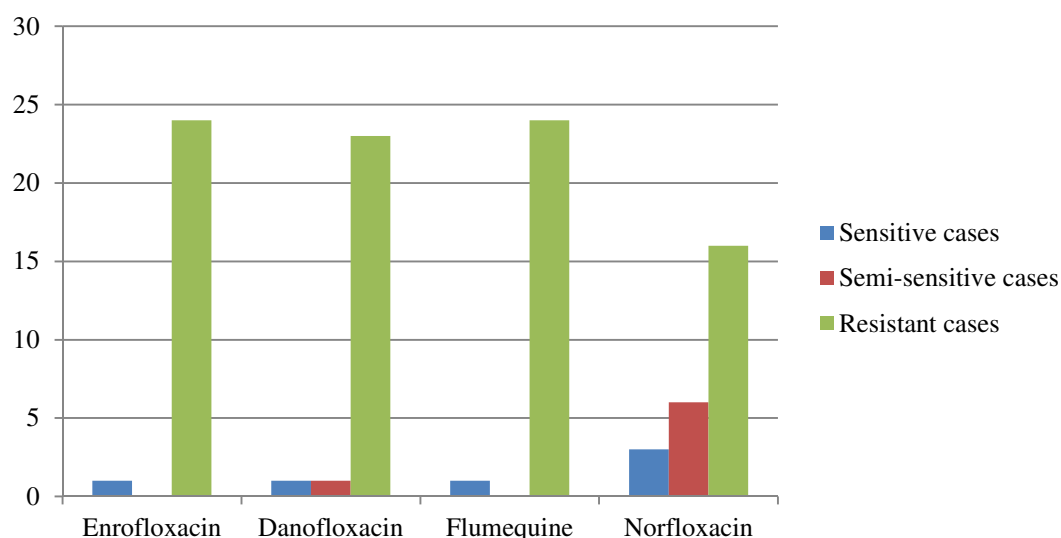
Table 6. Frequency of antibiotic resistance genes in the investigated tissues

Tissue	Percentage	Number	Antibiotic resistant gene	
			<i>qnrB</i>	<i>qnrA</i>
Heart	43.75	7	+	+
Heart	6.25	1	-	+
Heart	12.5	2	+	-
Heart	12.5	2	-	-
Liver	25	4	+	-



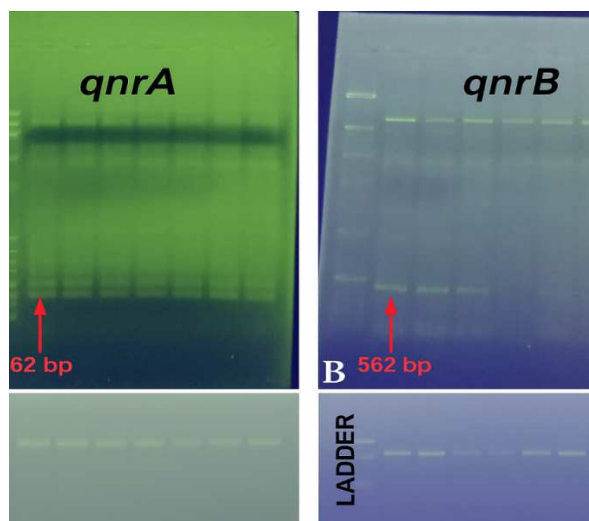
شکل ۱- درصد نمونه‌های مثبت به کل نمونه‌های اخذ شده در هر شهرستان

Fig 1. The percentage of positive samples to the total samples taken in each city

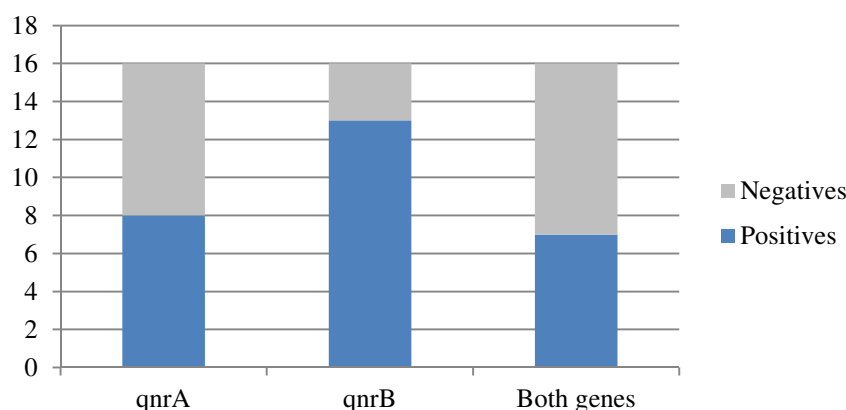


شکل ۲- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ۲۵ جدایه *E. coli* به‌دست آمده از جوجه‌های گوشتی نسبت به چهار آنتی‌بیوتیک مورد بررسی

Fig 2. Antibiotic resistance pattern in 25 *E. coli* isolates obtained from broiler chickens to the four antibiotics studied



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR ژن *qnrA* (A) و *qnrB* (B) روی ژل آگاروز
Fig 3. Electrophoresis of *qnrA* (A) and *qnrB* (B) gene PCR product on agarose gel



شکل ۴- فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *E. coli*
Fig 4. Frequency of antibiotic resistance genes in *E. coli* bacteria

بحث

تغذیه حیوان ایفا می‌کند. یک مطالعه نشان داد که ۲۱ درصد از تغییرات توده چربی شکم مرغ را می‌توان به ترکیب میکروبیوتای روده نسبت داد (۱۶). میکروفلور روده به عنوان یک مانع موثر در برابر میکروارگانیسم‌های فرصت‌طلب و بیماری‌زا عمل می‌کند و "مقاومت میکروبی" یکی از مهمترین عملکردهای آن است. متابولیسم باکتری می‌تواند منجر به اثرات سودمند از جمله تولید ویتامین‌ها، تعدیل سیستم ایمنی، افزایش هضم و جذب خوراک، مهار گونه‌های مضر و حذف مواد سرطان‌زا و سایر سموم شود. با وجود تمام پیشرفت‌هایی که در صنعت

آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل نوع عملکردشان در رشد و پیشگیری از بیماری‌ها، به طور گسترده‌ای در صنعت دامپروری استفاده می‌شوند و این موضوع باعث مقاومت میکروب‌ها به آنتی‌بیوتیک در دام، طیور و انسان شده است. پتانسیل دستکاری میکروبیوتا در طیور برای افزایش بیشتر در بهره‌وری، از اهمیت تجاری و علمی زیادی برخوردار است که منجر به استفاده از پروبیوتیک‌ها در صنعت طیور می‌شود. میکروبیوتای موجود در دستگاه گوارش طیور، علاوه بر ایفای نقش مهم در حفاظت از پرنده در مقابل پاتوژن‌ها و توسعه سیستم ایمنی، نقش مهمی در

پرورش طیور گوشتی و خصوصاً مرغ انجام شده است، باز هم بیماری‌های منتقل شونده از طریق مصرف گوشت آلوده گریبان‌گیر بسیاری از اقشار جامعه است. از بین مطالعاتی که در این زمینه انجام شده‌اند، توانایی بالای باکتری *E. coli* به عنوان عاملی برای فساد گوشت مرغ، به مراتب بیشتر گزارش شده است (۱۷). *E. coli* مهمترین پاتوژن گرم منفی و میله‌ای شکلی است که موجب بروز مسمومیت غذایی مهلک در انسان می‌گردد. این باکتری قابلیت انتقال از حیوانات به ویژه طیور را به علت تماس نزدیک با انسان و مصرف گوشت آن داشته و می‌تواند خطر بالقوه در انتقال سویه‌های مقاوم و عوامل حدت داشته باشد. عفونت‌های ناشی از *E. coli* از اهمیت ویژه‌ای در صنعت طیور برخوردار است. بررسی الگوی پراکندگی باکتری‌های مقاوم *E. coli* و بررسی ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون در مرغداری‌های گوشتی با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و نتایج به دست آمده از آنتی‌بیوگرام سویه‌های *E. coli* جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور در مطالعه اخیر نشان می‌دهد که درصد بالایی از جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون که جزء آنتی‌بیوتیک‌های معمول و رایج در صنعت طیور هستند، مقاومت نشان می‌دهند. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که آلودگی به *E. coli* در جوجه‌های گوشتی استان گیلان، درصد نسبتاً بالایی را به خود اختصاص داده است. باکتری *E. coli* در هر سنی در جوجه‌های گوشتی مشاهده شده و شدت آن وابسته به سن نیست. به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت مرغداری کشور، مقاومت دارویی چندگانه در باکتری *E. coli* فزونی یافته و شایع‌ترین آن به دلیل مقاومت به واسطه پلاسمید می‌باشد که از مشکلات عمده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سراسر جهان نیز محسوب می‌گردد. در ارتباط با مقاومت به

آنتی‌بیوتیک‌های کینولون مورد آزمایش در این پژوهش، بیشترین مقاومت مربوط به انروفلوکساسین و فلومکوئین و کمترین مقاومت مربوط به نورفلوکساسین بود که دلیل آن را می‌توان به عدم استفاده از نورفلوکساسین در صنعت طیور کشور نسبت داد، در صورتی که انروفلوکساسین بیشترین استفاده را در صنعت طیور به خود اختصاص داده است. برخی مطالعات، مقاومت به انروفلوکساسین را در جوجه‌های گوشتی، ۸۱ درصد گزارش کردند (۱۸)، در صورتی که در پژوهش حاضر مقاومت به این آنتی‌بیوتیک، ۹۶ درصد بود. این یافته، لزوم جلوگیری از استفاده بی‌رویه و بی‌دلیل از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت طیور توسط مرغداران را برجسته‌تر می‌کند. اما سایر مطالعات در ایران مربوط به استان‌های فارس، تهران، خوزستان و آذربایجان شرقی نشان می‌دهد که این الگو تا حدود زیادی مشابه است و نشان از توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *E. coli* دارد. در همین رابطه، جعفری و همکاران (۲۰۱۴) بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را در جدایه‌های *E. coli* طیور در اهواز با ۹۰ درصد مقاومت نسبت به انروفلوکساسین مشاهده کردند (۱۹). قانع و همکاران (۲۰۱۴) در تحقیقی که در استان اصفهان به عنوان قطب صنعتی کشور به انجام رساندند اعلام داشتند که مقاومت ۷۰ درصدی در برابر انروفلوکساسین و نیز مقاومت ۵۰ درصدی در برابر سولفانامید به علاوه تری‌متوپریم نشان‌دهنده مقاومت بالای جدایه‌های *E. coli* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پرمصرف در صنعت پرورش طیور در اصفهان است (۲۰). رفیعی طباطبایی و نصیریان (۲۰۰۳) در تهران بیشترین مقاومت را مربوط به تتراسایکلین (۹۴ درصد) و سپس سولتریم (۵۶ درصد) و انروفلوکساسین (۴۴ درصد) گزارش کردند (۲۱). زهرایی صالحی و فراشی بناب (۲۰۰۶) در

تبریز نیز بیشترین مقاومت را نسبت به داکسی‌سایکلین گزارش کردند (۸۸ درصد) اما مقاومت در برابر انروفلوکساسین نیز با ۷۶ درصد در رده سوم قرار داشت (۲۲). مصرف گسترده انروفلوکساسین به تنهایی و مصرف هم‌زمان با برخی از خانواده‌های آنتی‌بیوتیکی می‌تواند دلیل این مقاومت بالا باشد که در مزارع پرورش طیور در سراسر ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر آن، مطالعات خارج از کشور نیز نشان می‌دهد که این آنتی‌بیوتیک در سایر کشورها نیز از مقاومت بالایی برخوردار است و بیشترین درصد مقاومت را به خود اختصاص داده است. در بررسی Gregova و همکاران (۲۰۱۲) در اسلواکی و Yang و همکاران (۲۰۰۴) در چین نیز بیشترین مقاومت در جدایه‌های *E. coli* طیور نسبت به انروفلوکساسین گزارش شده است (۲۳، ۲۴). وجود مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی نسبت به انروفلوکساسین، سولفونامید به همراه متوپریم، فلورفنیکل و داکسی‌سایکلین می‌تواند به دلیل استفاده متداول از این آنتی‌بیوتیک‌ها در کنترل بیماری کلی باسیلوز باشد که تجویز پی در پی این آنتی‌بیوتیک‌ها، گاهی بدون انجام آزمون‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی باعث ظهور و گسترش میکروارگانیسم‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. از آن جایی که ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گسترش مقاومت در بین میکروارگانیسم‌ها نقش عمده‌ای دارند، اخیراً برای شناسایی سویه‌های مقاوم بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه حری و غلامی آهنگران (۲۰۲۲) در اصفهان به پایش ژن‌های مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون و سولفونامید که از نظر دامپزشکی و پزشکی واجد اهمیت هستند، پرداخته شد (۲۵). در مطالعه اخیر از ۵۰ سویه *E. coli* مورد بررسی، ۲۱ جدایه (۴۲ درصد) دارای ژن مقاومت به کینولون و ۱۵ جدایه (۳۰ درصد) دارای ژن مقاومت

به سولفانامیدها بودند (۳). در همین راستا، Ponce-Rivas و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که حدود ۵۲ درصد از جدایه‌های *E. coli* واجد ژن *qnrA* بوده و در مجموع حدود ۷۳ درصد از جدایه‌ها یکی از ژن‌های مقاومت کینولون را دارا بودند که در بسیاری از جدایه‌ها ژن‌های *qnr* همراه با کلاس یک ایتتگرون ردیابی نمودند (۲۶). فراوانی بالا و حدود ۴۸ درصدی *SulI* (ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک سولفانامید) در سویه‌های مقاوم علیه سولفانامیدها و نیز ردیابی ۵۴ درصدی ژن *qnrA* در سویه‌های مقاوم به کینولون‌ها نشان می‌دهد که علاوه بر ژن‌های مورد بررسی، ژن‌های دیگری هم در مقاومت علیه سولفانامیدها و کینولون‌ها نقش دارند و بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی مستلزم وجود ژن و بیان مناسب ژن است تا منجر به ظهور فنوتیپ مقاومت شود. سویه‌های حامل ژن‌های مقاومت و بیماری‌زا می‌توانند به عنوان مخزن ژن‌های مقاومت در محصولات طیور و مصرف کننده نهایی یعنی انسان باشند (۳). با توجه به گسترش ژن‌های مقاومت به واسطه پلاسمید، ممانعت از مصرف خودسرانه و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در مرغداری‌های کشور به‌طور اکید توصیه می‌گردد. چنانچه ژن‌های مذکور در سویه‌های *E. coli* حساس به کینولون‌ها مشاهده شوند، احتمال ایجاد موتاسیون در ایجاد این وضعیت خارج از تصور نخواهد بود. طی مطالعات انجام شده امکان جهش در کدون‌های ۸۳ و ۸۷ از *gyrA* و کدون‌های ۴۲۶ و ۴۶۶ از *gyrB* نشان داده شده است (۱). یافته‌های این مطالعه نشان داد که ژن *qnrB* تنها در جدایه‌های کبدی باکتری *E. coli* حضور داشت، در حالی که در جدایه‌های قلبی هر دو ژن *qnrA* و *qnrB* شناسایی شدند. این الگوی پراکندگی ممکن است به واسطه مجموعه‌ای از عوامل بیولوژیکی و اکولوژیکی تبیین گردد. نخست، تفاوت‌های فیزیولوژیکی بین بافت کبد و قلب

آموزشی و قانونی گسترده، روند گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مرغداری‌ها، به‌ویژه در سویه‌های *E. coli*، می‌تواند به یک تهدید جدی برای سلامت عمومی منجر شود.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد که درصد قابل توجهی از قطعات تلفات مرغداری‌ها در استان گیلان به باکتری *E. coli* آلوده هستند. این آلودگی‌ها به‌ویژه در رابطه با مقاومت بالای جدایه‌های این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده کینولون، از جمله انروفلوکساسین و دانوفلوکساسین، اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. در این مطالعه، ۹۶ درصد از جدایه‌های *E. coli* به انروفلوکساسین و ۹۲ درصد به دانوفلوکساسین مقاومت نشان دادند. در میان سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، بیش از ۸۷ درصد حامل ژن‌های مقاومت *qnrA* و *qnrB* بودند که به وضوح نشان‌دهنده گسترش این ژن‌های مقاومت در استان گیلان است. از طرفی، این یافته‌ها بر لزوم توجه به پایش و کنترل دقیق مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت طیور تأکید می‌کند. ایجاد مقاومت دارویی در باکتری‌ها، می‌تواند به انتقال این مقاومت‌ها از طریق زنجیره غذایی به انسان‌ها منجر شود. بنابراین، نظارت دقیق و مدیریت بهینه مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت طیور، به‌ویژه از طریق پایش مولکولی ژن‌های مقاومت، برای حفاظت از سلامت انسان و حفظ اثربخشی درمان‌ها ضروری است. در این راستا، استفاده از روش‌های جایگزین مانند پروبیوتیک‌ها، که می‌توانند به کنترل عفونت‌ها و ارتقاء سلامت روده کمک کنند، می‌تواند به‌عنوان یک راهکار مؤثر در بهبود عملکرد صنعت طیور و حفاظت از سلامت انسان مطرح گردد.

می‌تواند در بقای پلاسمیدها و بیان ژن‌های مقاومتی نقش ایفا کند؛ به‌ویژه اینکه کبد به‌عنوان اندامی غنی از آنزیم‌های متابولیک و سم‌زدا، ممکن است محیطی انتخابی علیه پلاسمیدهای بزرگ‌تر و پرهزینه‌تر نظیر آن‌هایی که *qnrA* را حمل می‌کنند، فراهم کند (۲۷). از سوی دیگر، حضور هم‌زمان دو ژن *qnrA* و *qnrB* در جدایه‌های قلبی ممکن است منعکس‌کننده ورود چندین کلون متفاوت از *E. coli* به این اندام باشد یا ناشی از سازگاری بهتر پلاسمیدهای ترکیبی با شرایط خاص فیزیولوژیکی و همودینامیکی قلب باشد (۲۸). همچنین تنظیم اپی‌ژنتیکی بیان ژن‌های مقاومت توسط عوامل درون‌زای میزبان نظیر سطح اکسیژن، pH و میزان فلزات سنگین می‌تواند به سرکوب یا افزایش بیان برخی ژن‌ها در بافت‌های خاص منجر گردد. در نهایت، هزینه زیستی مرتبط با هر پلاسمید نیز نقش تعیین‌کننده‌ای دارد؛ به‌گونه‌ای که پلاسمیدهای حامل *qnrA* در مقایسه با *qnrB* بار متابولیکی بیشتری برای سلول میزبان ایجاد می‌کنند که ممکن است در محیط‌های پرتنش مانند کبد، موجب حذف انتخابی آن‌ها شود (۲۹). توجه به استانداردها و مقررات ایمنی زیستی در مرغداری‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. در ایران، علی‌رغم وجود برخی چارچوب‌های قانونی، نظارت بر مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در مرغداری‌ها همچنان ناکافی است. برای کاهش این بحران، اجرای مجموعه‌ای از اقدامات ایمنی زیستی بر اساس استانداردهای سازمان جهانی بهداشت دام (WOAH) و سازمان جهانی بهداشت (WHO) ضروری است (۳۰، ۳۱). همچنین استفاده از روش‌های آزمایشگاهی دقیق‌تر برای شناسایی ژن‌های مقاومت، همچون Real-time PCR یا توالی‌یابی کل ژنوم، می‌تواند در آینده اطلاعات ژرف‌تری برای سیاست‌گذاری ارائه دهد. در مجموع، بررسی‌های حاضر نشان داد که بدون دخالت‌های مدیریتی،

منابع

9. Adelowo OO, Fagade OE, Agersø Y. Antibiotic resistance and resistance genes in *Escherichia coli* from poultry farms, southwest Nigeria. J. Infection Dev. Countries. 2014;8(9):1103-1012.
10. Abdelgader SA, Shi D, Chen M, Zhang L, Hejair HMA, Muhammad U., et al. Antibiotics resistance genes screening and comparative genomics analysis of commensal *Escherichia coli* isolated from poultry farms between China and Sudan. Biomed. Res. Int. 2018;26:5327450.
11. Seo KW, Lee YJ. Molecular characteristics of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* from broiler breeder farms. Poultry Sci. 2021;100:101250.
12. Ebrahimian M, Mohammadi-Sichani M. The frequency of plasmid *qnr* genes in quinolone-resistant isolates of *Escherichia coli* causing urinary tract infection. J Isfahan Univ Med Sci. 2018;36(499):1213-1218. [In Persian]
13. Ghasemian SO, Mahmoudipour H. Isolation, identification and antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with Coli Bacillus to fifteen common antibiotics in Iran's poultry industry. Vet Microbiol. 2024;19(1):80-90. [In Persian]
14. Belotindos LP. Characteristics of *Escherichia coli* isolated from livestock and related materials in the Philippines. Ph.D. Thesis. Hokkaido Univ. Collection Scholarly Acad. Papers. 2021; HUSCAP.
15. CLSI. 2018. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 4th Ed. CLSI Supplement VET08. Wayne, PA: Clinic. Lab. Standards Instit. 2018.
16. Zaghari M, Zhendi M, Parhizkar S. Evaluation of the effects of *Bacillus coagulans* on functional traits and microbial flora of the gastrointestinal tract of broilers. Res. Anim Prod. 2023;13(38):19-27. [In Persian]
1. Karimi P, Jafarpour M, Nazemi A. Molecular identification of enrofloxacin resistance genes in *Escherichia coli* isolated from broiler chickens in Tehran and Tonekabon. Vet J. 2011;5(2):61-68. [In Persian]
2. Shams Goli S, Moradli GhA, Amini K. Molecular identification of adhesion virulence, necrosis and hemolysin genes in UPEC and APEC strains isolated from clinical and poultry samples. Appl Biol. 2016;7(26):35-42. [In Persian]
3. Naimi S. Resistance to antibiotics (antimicrobial drugs), the sixth book "Rational Use of Drugs". From the Training Set for Health Volunteers. Deputy Health Minister of the Ministry of Health and Medical Education. 2015. [In Persian]
4. Dolatyabi S, Peyghambari SM. A review of fluoroquinolones and their use in poultry. The 7th Scientific Research Conference, Development and Promotion of Agricultural Sciences and Natural Resources of Iran.. Tehran, 2020.
5. Katzung BG, Kruidering-Hall M, Trevor AJ. Katzung and Trevor's Pharmacology Examination and Board Review. 12th Edition. 2019; 592 p.
6. Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J Infect Chemother. 2011;17(2):149-182.
7. Salah FD, Soubeiga ST, Ouattara AK, Sadjji AY, Metuor-Dabire A, Obiri-Yeboah D. Distribution of quinolone resistance gene (*qnr*) in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Lomé, Togo. Antimicrob. Resist. Infect Control. 2019; 8:104.
8. Awad A, Arafat N, Elhadidy M. Genetic elements associated with antimicrobial resistance among avian pathogenic *Escherichia coli*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2016;15(59):1-8.

- diseased chickens and swine in China. J Clin Microbiol. 2004;42:3483-3489.
25. Horri M, Gholami-Ahangaran M. The frequency of *qnrA* and *sulI* genes in *Escherichia coli* isolated from pericarditis and perihepatitis lesions of broilers in Isfahan province. Anim Physiol Dev. 2022; 15(2):47-58. [In Persian]
 26. Ponce-Rivas E, Muñoz-Márquez M-E, Khan AA. Identification and molecular characterization of class 1 integrons in multiresistant *Escherichia coli* isolates from poultry litter. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(15):5444-5447.
 27. Vanacker M, Lenuzza N, Rasigade J-P. The fitness cost of horizontally transferred and mutational antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. Front Microbiol. 2023; 14: 1186920.
 28. Helekal D, Keeling M, Grad YH, Didelot X. Estimating the fitness cost and benefit of antimicrobial resistance from pathogen genomic data. J R Soc Interface. 2023; 20(203):20230074.
 29. San Millan A, MacLean RC. Fitness costs of plasmids: a limit to plasmid transmission. Microbiol Spectr. 2017;5(5): MTBP-0016-2016.
 30. WHO (World Health Organization). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. 6th Revision, Geneva. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528>. 2019.
 31. WOAH (World Organization for Animal Health). OIE standards, guidelines and recommendations on antimicrobial resistance and the use of antimicrobial agents. Paris. Available from: <https://www.woah.org/en/what-we-do/global-initiatives/antimicrobial-resistance>. 2021.
 17. Gholami F, Mehrabian S, Tabarsi Z, Amini K. Investigation of isolated enterobactin genes isolated from food (poultry meat) by multiplex-PCR method. J Comp Pathobiol. 2019;16(2):2819-2826. [In Persian]
 18. Liu B-T, Liao X-P, Yang S-S, Wang X-M, Li L-L, Sun J. Detection of mutations in the *gyrA* and *parC* genes in *Escherichia coli* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance genes from diseased food-producing animals. J Med Biotechnol. 2012;61:1591-1599.
 19. Jafari R, Ghanbarpour R, Ghorbanpour Najafabadi M, Miyahi M. Determination of antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* isolated from healthy broiler chickens and those suffering from septicemia in air. J Vet Microbiol. 2014;11(2):116-109. [In Persian]
 20. Ghaniei A, Mojaverrostami S, Lotfallahzadeh B, Darzi Lemraski M, Sepehrnia P, Imani Jajarmi A. Geographical and seasonal variation in antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken carcasses in Iran. Eur J Exp Biol. 2014;4:173-177.
 21. Tabatabaei R, Nasirian A. Isolation, identification and antimicrobial resistance patterns of *E. coli* isolated from chicken flocks. Iran J Pharmacol Ther. 2003; 2(2):39-42.
 22. Zahraei Salehi T, Farashi Bonab S. Antibiotics susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Tabriz province, Iran. Int J Poult Sci. 2006;5:677-684.
 23. Gregova G, Kmetova M, Kmet V, Venglovsky J, Feher A. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from a poultry slaughterhouse. Ann Agric Environ Med. 2012;19:75-77.
 24. Yang H, Chen S, White DG, Zhao S, McDermott P, Walker R, Meng J. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from

Research Article

Investigation of the Cellular, Molecular and Anti-Apoptotic Effects of Lipid Nanoparticles Containing *Artemisia aucheri* Essential Oil on Ovarian Cancer Cells

Farnaz Aboutalebi, Maryam Teimouri^{2*}

1- Department of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

*Corresponding author: Teimourimaryam93@gmail.com

Received: 17 March 2025

Accepted: 18 June 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1208943

Abstract

Ovarian cancer is one of the 9 most common cancers and one of the 5 leading causes of cancer death in women. *Artemisia aucheri* Boiss belongs to the Asteraceae family, and many studies have reported the effectiveness of its essential oil and extract on inhibiting the growth of cancer cells. Today, nanocarriers are used to load various plant essential oils to prevent oxidation of essential oils and their stability, in addition to better targeting and effectiveness. Solid lipid nanoparticles (SLN) are used in many studies today as carrier systems for loading vitamins, drugs, and essential oils. Given the importance of ovarian cancer and the antioxidant potential of *Artemisia aucheri*, in this study, the essential oil of *Artemisia aucheri* was loaded into lipid nanoparticles with the aim of investigating cellular, molecular, and anti-apoptotic effects on ovarian cancer cells. First, nanoparticles containing Artemisia essential oil were synthesized using a homogenizer plus sonication method and subsequently their physicochemical properties (such as particle size, particle size distribution, zeta potential, percentage of essential oil loading efficiency, particle shape) were determined. The findings showed that increasing the concentration of lipid nanoparticles containing Artemisia essential oil led to a decrease in the viability of ovarian cancer cells (Hella) compared to pure essential oil. The results of the present study showed that lipid nanoparticles containing *Artemisia* extract activated the apoptosis pathway in ovarian cancer cells and consequently stopped tumor growth.

Keywords: Solid Lipid Nanoparticle, Ovarian cancer, *Artemisia aucheri*, Anti-apoptotic.

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات سلولی و ملکولی و ضدآپوپتوتیک نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس گیاه درمنه کوهی (*Artemisia aucheri*) بر سلول‌های سرطان تخمدان

فرناز ابوطالبی^۱، مریم تیموری^{۲*}

۱- گروه داروسازی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد روده‌ن، دانشگاه آزاد اسلامی، روده‌ن، ایران

*مسئول مکاتبات: teimourimaryam93@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۷

DOI: 10.60833/ascij.2025.1208943

چکیده

سرطان تخمدان یکی از نه سرطان رایج می‌باشد و یکی از پنج دلیل مهم مرگ ناشی از سرطان در زنان است. گیاه درمنه با نام علمی *Artemisia aucheri* Boiss متعلق به خانواده Asteraceae می‌باشد که در تحقیقات زیادی اثربخشی اسانس و عصاره این گیاه بر روی مهار رشد سلول‌های سرطانی گزارش شده است. امروزه از حامل‌های نانو به منظور بارگیری اسانس‌های مختلف گیاهی به جهت جلوگیری از اکسیداسیون اسانس‌ها و پایدار ماندن آنها علاوه بر هدفمند کردن و اثر بخشی بهتر استفاده می‌شود. نانو ذرات لیپیدی جامد SLN امروزه در تحقیقات بسیاری به عنوان سیستم‌های حامل برای بارگذاری ویتامین‌ها، داروها و اسانس‌ها استفاده می‌شوند. با توجه به اهمیت سرطان تخمدان و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی گیاه درمنه کوهی، در این مطالعه اسانس گیاه درمنه در نانو ذرات لیپیدی با هدف بررسی اثرات سلولی و ملکولی و ضدآپوپتوتیک بر سلول‌های سرطان تخمدان بارگذاری شد. ابتدا نانوذرات حاوی اسانس درمنه با روش هموژنایزر بعلاوه سونیکاسیون ستنز و متعاقباً خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنها (مثل اندازه ذرات، توزیع اندازه ذره‌ای، پتانسیل زتا، میزان درصد بارگذاری اسانس، شکل ذرات) تعیین شدند. یافته‌ها نشان داد که افزایش غلظت نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس گیاه درمنه کوهی منجر به کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطان تخمدان (Hella) در مقایسه با اسانس خالص شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نانوذرات لیپیدی حاوی عصاره گیاه آرتیمیسیا، مسیر آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی تخمدان فعال کرده و در نتیجه باعث توقف رشد تومور شد.

کلمات کلیدی: نانوذرات لیپیدی، سرطان تخمدان، گیاه درمنه کوهی، ضدآپوپتوتیک.

مقدمه

بینی می‌شود که در سال ۲۰۲۵ به ۱۹/۳ میلیون نفر برسد (۱). در ایران، میانگین میزان ابتلا به سرطان حدود ۷/۱ در هر ۱۰۰۰۰۰ جمعیت می‌باشد و تخمین زده می‌شود که در هر سال ۸۵۰۰۰ فرد مبتلا به سرطان می‌شوند و تقریباً ۵۵۰۰۰ نفر به علت سرطان در هر سال جان خود را از دست می‌دهند (۲). در

سرطان یکی از دلایل اصلی مرگ‌ومیر در بیش از یک سوم جمعیت جهانی است و باعث بیش از ۲۰ درصد کل مرگ و میر در سراسر جهان می‌شود. طبق گزارش آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان سازمان بهداشت جهانی که در سال ۲۰۱۴ منتشر شده است، میزان بروز سرطان در حدود ۱۴ میلیون مورد جدید بوده و پیش-

به خانواده *Asteraceae* است (۹). بسیاری از گونه‌های این خانواده خواص درمانی از خود نشان داده‌اند که به واسطه حضور متابولیت‌هایی از جمله فلاونوئیدها، کومارین‌ها، استروئید، پلی اتیلن، مونو و سسکویتپنس و لاکتون سوزویتروپن می‌باشد (۱۰). اسانس‌های گیاهی منابعی سرشار از مواد فعال طبیعی و ضروری بیولوژیک هستند که دارای اثرات چون خاصیت ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی، حشره‌کش، آنتی‌اکسیدانت و ضدسرطان می‌باشند (۴). گیاه درمنه یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که برای درمان انواع بیماری‌ها از جمله سرفه، عفونت گوش میانی و درد در کشورهای شرقی شناخته می‌شود (۳). این گیاه دارویی به دلیل داشتن مواد فعال ویژه انواع فعالیت‌های دارویی مانند اثرات ضد التهابی، ضد ویروسی و ضد سرطان را دارا می‌باشد (۱۱، ۱۲). انکپسوله کردن اسانس‌های گیاهی یکی از کارآمدترین روش‌ها برای افزایش حلالیت و پایداری اسانس‌ها در شرایط نامساعد محیطی و کنترل ترکیبات فعال آن است. توسعه فرمولاسیون‌های نانو سایز از ترکیبات فعال زیستی به دلیل اندازه کوچک آن دارای مزیت‌های بیشتری در مقایسه با سایر سیستم‌های انکپسولاسیون می‌باشد. این سیستم‌ها به دلیل سایز کم جذب داخل سلولی بالاتری داشته و هدفمند عمل می‌کند. با توجه به ماهیت چرب اسانس‌های گیاهی، نانوذرات لیپید جامد (SLN) به دلیل دارا بودن زیست سازگاری، سمیت کم و تجزیه پذیری مناسب به همراه توانایی کپسوله کردن ترکیبات بیولوژیکی آبریز می‌توانند به عنوان گزینه ای بسیار سودمند برای حمل اسانس‌های گیاهی مورد استفاده قرار گیرند (۱۲). با توجه به اهمیت سرطان تخمدان و اثر سمیت برخی از گونه‌های درمنه بر سلول‌های سرطانی (۱۱، ۱۲). در این مطالعه ترکیبات شیمیایی اسانس با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی جرمی (GC/MS) بررسی شد.

این میان، سرطان تخمدان دومین سرطان زنان و دلیل مرگ و میر ناشی از سرطان دستگاه تناسلی بدخیم زنان است. همچنین، سرطان تخمدان یکی از ۹ سرطان رایج می‌باشد و یکی از پنج دلیل مهم مرگ ناشی از سرطان در زنان است که به راحتی در مراحل اولیه قابل تشخیص و درمان است (۳). اما اگر به تعویق افتد، درمان مشکل و گاهی ناموفق خواهد بود (۴). رایج‌ترین شکل سرطان تخمدان سرطان تخمدان اپیتلیالی است که تاحد زیادی بدون علامت است و بیش از ۷۰ درصد بیماران در مرحله پیشرفته بیماری تشخیص داده می‌شوند که خط اول درمان استاندارد شامل تعیین حجم تومور بوسیله جراحی و درمان مبنی بر شیمی‌درمانی ترکیبی است (۵). درمان اولیه سرطان تخمدان نتایج کلینیکی خوبی را نشان می‌دهد اما بیماران پس از مدتی به درمان مقاوم می‌شوند (۶). بنابراین، مقاومت به شیمی‌درمانی سدی در برابر درمان سرطان تخمدان به وجود می‌آورد. در راستای غلبه بر این سد، یافتن داروهایی موثرتر یا مکمل درمان، همراه با عوارض جانبی کمتر برای افزایش طول عمر این بیماران ضروری است. شواهد سازمان بهداشت جهانی نشان می‌دهد که حدود ۷۰ درصد از جمعیت در سراسر جهان ترجیح می‌دهند از داروهای سنتی و گیاهی برای درمان بیماری‌های خود استفاده کنند. در ایران نیز، استفاده از داروهای جایگزین مکمل در دهه گذشته به طور چشمگیری افزایش یافته است (۷). بطوریکه تقریباً ۶۰ درصد از عوامل ضد سرطان از گیاهان دارویی و دیگر منابع طبیعی حاصل می‌شود (۸). با این حال هنوز تعداد زیادی از گیاهان دارای پتانسیل ضد سرطانی هستند که هنوز مورد بررسی قرار نگرفته‌اند. بنابراین راه حل متناوب برای اثرات مضر داروهای مصنوعی، استفاده از داروهای جایگزین مکمل است. یکی از این گیاهان دارویی ارزشمند، گیاه درمنه با نام علمی *Artemisia* می‌باشد که متعلق

شیر اضافه می‌شود. سپس انتشار اولیه با فشار ۲۵۰ بار در سه چرخه متوالی توسط فشار بالا همگن می‌شود. هموژنایزر پس از همه، نمونه تا دمای محیط خنک می‌شود تا نانوذرات تشکیل شود. دارونما نیز طبق روش فوق تهیه شد.

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات: تعیین اندازه ذره‌ای، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا: اندازه گیری پارامترها در دمای اتاق با زاویه ۹۰ درجه با استفاده از دستگاه زتاسایزر (مالورن انگلستان سری (ZS) انجام شد. برای بررسی پارامترهای مورد نظر، دستگاه بر اساس فاز آبی ($RI = 1/3$) کالیبره شده و سپس از فیلتر سر سرنگی با اندازه ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شدند و اندازه ذره‌ای، پتانسیل زتا و توزیع اندازه ذره‌ای در ۳ تکرار مورد آنالیز قرار گرفت.

کشت سلولی و گروه‌بندی: رده سلولی سرطان تخمدان انسان (کد ATCC: HTB-77 SKOV-3) و همچنین رده سلولی طبیعی (HEK293) طبق پروتکل ارائه شده توسط بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. کشت در مکمل محیطی PRMI با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و همچنین پنی سیلین در انکوبه CO₂ در ۳۵ درجه سانتی‌گراد دو رده سلولی به مدت ۲۴ ساعت با ویسکوزیته متفاوت نانوذرات مشاهده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

رده سلولی SKOV-3: گروه اول (کنترل، SKOV-3 بدون درمان)، گروه دوم (SKOV-3 + ۲۵ میکرولیتر نانو اسانس حاوی دارو) گروه سوم (سلول‌های SKOV-3 + ۵۰ میکرولیتر اسانس نانودارویی) گروه چهارم (سلول‌های SKOV-3 + ۱۰۰ میکرولیتر اسانس نانودارویی).

رده سلولی HEK-293: گروه اول (کنترل، HEK-293 بدون درمان)، گروه دوم (HEK-293 + ۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر نانو حاوی اسانس)، گروه سوم (HEK-293 + ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر نانو اسانس) و

سپس. طی فرمولاسیون‌های مختلف با استفاده از سورفکتانت‌ها و چربی‌های مختلف اسانس در داخل نانوذرات لیپیدی جامد (AR-SLN) با استفاده از هموژنایزر بارگذاری و خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانو ذرات چون اندازه ذره‌ای، شاخص پراکندگی PDI و پتانسیل زتا با استفاده از دستگاه زتا سایزر مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین میزان بازدهی بارگذاری اسانس در نانو ذرات (EE%) با استفاده از دستگاه UV بررسی و میزان آزادسازی اسانس از نانو ذرات در بافر با استفاده از کیسه دیالیز بررسی و در نهایت فعالیت سیتوتوکسیک اسانس بارگذاری شده در نانوذرات در مقایسه با اسانس خالص بر روی رده سلولی Hella در مقایسه با سلول‌های نرمال HEK-293 با استفاده از روش رنگ‌سنجی مبتنی بر تتراسولیوم کمی (MTT) بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی ترکیبات درمنه: برای این تحقیق، سر شاخه‌های هوایی درمنه وحشی با نام علمی *Artemisia Aucheri Boiss* از منطقه جغرافیایی کرمان جمع‌آوری سپس طی مرحله خشک کردن گیاه خشک شده آسیاب شد و اسانس توسط کلونجر جمع‌آوری شد.

روش تهیه نانو ذرات حاوی درمنه: برای ساخت نانوذرات از روش هموژنایزر فشار بالا مذاب استفاده شد. برای این مطالعه، دو نوع سورفکتانت لیپوفیلیک (جامد دهانه ۶۰، دهانه مایع ۸۰) و یک سورفکتانت هیدروفیل و پنج نوع جامد لیپید (اسید استئاریک، اسید پالمیتیک، کلسترول، بیسموت و گلیسرین مونو استئارات) انتخاب شدند. در این در مورد، فاز لیپیدی حاوی سورفکتانت چربی دوست اسانس و چربی در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد است. به فاز آبی حاوی سورفکتانت هم دما فاز لیپیدی تحت هموژنایزرهای

نتایج

با بررسی طیف‌های حاصل از گاز کروماتوگرافی (GC/MS)، محاسبه اندیس‌های بازداری و مقایسه طیف‌های جرمی ترکیب‌ها با ترکیب‌های استاندارد، ۵۶ ترکیب مختلف در اسانس درمنه شناسایی شد. بازدیمی اسانس ۱/۵ سی‌سی برآورد شد. ترکیب‌های عمده آن به ترتیب عبارتند از: cis-Thujone (۲۷/۶۷ درصد)، trans-Thujone (۱۴/۷۸ درصد) Camphor (۱۶/۷۹) و trans-Verbenol (۷ درصد) می‌باشد. تجزیه و تحلیل خصوصیات فیزیکی و شیمیایی SLN، توسط UV-VIS، حداکثر جذب اسانس ۲۷۴ نانومتر است که منحنی کالیبراسیون اسانس در شکل ۱، میانگین جذب و انحراف معیار در ۲۵۴ نانومتر ترسیم شده است. اولین نشانه تولید نانوذرات لیپیدی تغییر رنگ ذرات سنتز شده است. تغییر رنگ پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون به دست آمد. مطالعه DLS نشان داد که اندازه متوسط نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس درمنه ۱۱۲/۸ نانومتر است که در شکل ۲ نشان داده شده است. نمودار (شکل ۲). ما همچنین پتانسیل زتا را برای ترکیب سنتز شده گزارش می‌کنیم (شکل ۳). در تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM تایید (شکل ۴) این تصویر نشان می‌دهد که لیپید نانوذرات حاوی یک اسانس کروی مصنوعی هستند و به خوبی پراکنده می‌شوند. پس زمینه روشن اطراف نانوذرات کروی مربوط به حلال است. این تضاد به دلیل تفاوت در ویسکوزیته است نانوذرات سنتز شده و حلال مورد استفاده رهاسازی دارو با توجه به نمودار، مشاهده شد که فاز لیپیدی نانو استتارات و سورفکتانت گلیسرول در محدوده ۸۰ آزادسازی بالاتری نسبت به فاز لیپیدی گلیسرول مونو استتارات و سورفکتانت اسپان ۶۰ داشت. RA-SLN فرمولاسیون ۴۷ درصد اسانس را در ۲ ساعت اول و ۵۴ درصد اسانس را در ۲۴ ساعت اول آزاد کرد. در حالی که در فرمولاسیون RA-SLN4 39

گروه چهارم (HEK-293 + ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر نانو حاوی اسانس).

تعیین مقادیر IC50 سنجش MTT: در این آزمون مبنای سنجش، قرار دادن سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلف اسانس و سنجش تعداد سلول‌های مرده بود. بدین منظور از ماده موثر زرد رنگ تترازولیوم و ایجاد کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول فورمازان در روش MTT استفاده شد. در این روش، ۲۴ ساعت پس از کشت سلول‌ها با غلظت مورد نظر، محیط کشت رویی سلول‌ها تعویض شده و سلول‌ها به مدت ۳ ساعت به همراه محیط کشت حاوی رنگ تترازولیوم کشت داده شدند. در ادامه، محیط با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفیدکسید ترکیب شده و میزان و شدت جذب وری با استفاده از الیزا ریدر با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

تست فلوسایتومتری: برای اندازه‌گیری میزان مهار رشد سلولی، از روش فلوسایتومتری استفاده شد. به این صورت که سلول‌ها پس از تیمارهای مربوطه، تریپسینه شده، سپس آنها را در دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ کرده و دوباره این کار با ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات انجام شد. بعد از سانتریفیوژ مجدد، یک میلی‌لیتر از بافر مخصوص کیت اضافه نموده و بعد از پیتاژ شدید، ۵ میکرولیتر از انکسین وی اضافه نموده و ۱۵ دقیقه در محیط تاریک انکوبه شد. در پایان هم ۴ میکرولیتر محلول پروپیدیوم یدید اضافه کرده و با دستگاه فلوسایتومتری آنالیز صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۶ و روش t-test استفاده شد و معناداری نتایج در سطح $p < 0/05$ سنجیده شد. بعد از انجام واکنش Real PCR Time، داده‌های دستگاه در فرمول‌های مربوطه محاسبه شد و مقادیر $2-\Delta\Delta Ct$ با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون Tukey و One Way ANOVA مورد بررسی قرار گرفت.

درصد در ۲ ساعت اول و در ۵۰ درصد در ۲۴ ساعت آزاد شد. همچنین مشخص می‌شود که آزاد شدن اسانس کمتر از فرمولاسیون است. بنابراین، لیپید نانوحامل‌ها سرعت آزادسازی اسانس را نسبت به اسانس خالص افزایش دادند. جدول ۱ خواص فیزیکوشیمیایی نانوذرات حاوی استخراج درمنه (درصد وزنی/وزن). فرمولاسیون سه بار تکرار شد و جدول با استاندارد گزارش شد. آزمایش MTT ویسکوزیته ۰،۱، ۰،۲۵، ۰،۵۰، ۱۰۰ میلی مولار عصاره گیاه درمنه را نشان می‌دهد. بعد از ۲۴ ساعت همانطور که با افزایش ویسکوزیته اسانس، قابلیت زنده ماندن SKOV-3 و EK-293 مشاهده می‌شود. رده های سلولی کاهش یافته و نتایج نشان داد که کمترین میزان زنده‌مانی در سلول‌های سرطانی SKOV-3 مشاهده شد. در ۱۰۰ میلی‌مولار و در سلول‌های نرمال در ۱۰۰ میلی‌مولار اسانس به دست آمد. بالاترین قابلیت زنده ماندن SKOV-3 و رده‌های سلولی HEK-293 در ویسکوزیته اسانس ۰ و ۱ میلی‌مولار به دست آمد. با توجه به نتایج، ۵۰ درصد مرگ سلولی برای SKOV-3، رده‌های سلولی سرطانی، در ویسکوزیته سلولی ۱۰۰ میلی‌مولار و برای HEK-293، IC50 در ویسکوزیته ۱۰۰ میلی‌مولار گزارش شده است. در IC50 زیر ویسکوزیته اسانس درمنه و همچنین نانوذرات حاوی استخراج درمنه به طور معنی‌داری آپوپتوز را نسبت به شاهد افزایش داد ($p < 0/001$). همچنین نتایج نشان دهنده افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطانی SKOV-3 بود. به عبارت دیگر تیمار نانوذرات با عصاره گیاه درمنه به طور قابل توجهی آپوپتوز را افزایش داد ($p < 0/001$). نانوذرات حاوی اسانس درمنه باعث آپوپتوز بیشتر در SKOV-3 و سلول‌های رده HEK-293 نسبت به گروه اسانس درمنه می‌شوند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نانو ذرات درمنه یکی از داروهای ضد سرطان است و

مکانیسم سیتوتوکسیک نانوذرات حاوی درمنه باعث افزایش آپوپتوز سرطان می‌شود. لازم به ذکر است که درصد سلول‌های آپوپتوز در سلول‌های لاین SKOV-3 و HEK-293 نسبت به گروه کنترل به طور قابل توجهی افزایش یافت

تجزیه و تحلیل نتایج مولکولی: نتایج ارزیابی مولکول‌های RNA استخراج شده توسط اسپکتروفتومتر، روی هم نشان داد که نسبت OD 260/280 تمام نمونه‌های استخراج شده حدود ۱/۹۲ تا ۱/۹۷ بود که نشان دهنده کیفیت خوب استخراج است. همچنین ارزیابی مولکول RNA استخراج شده با روش الکتروفورز ژل حدود ۱ میکروگرم از نمونه با الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. باندهای ۱۸ و ۲۸ مرتبط با RNA ریبوزومی به عنوان شاخص کیفیت RNA استخراج شده در نظر گرفته شد که نتایج حاصل شده نشان داد که خالص‌سازی مولکول RNA برای ادامه این روش کیفیت خوبی دارد. همچنین سنتز DNA برای یک واکنش زنجیره ای پلیمرز، با استفاده از BAX و BCL2 و ژن اکتین FxR انجام شد و آغازگرها پس از پایان واکنش تکثیر، ۵ میکرولیتر از نمونه مجدداً در ژل آگارز ۲ درصد معلق شدند. ارزیابی کیفیت cDNA سنتز شده نتایج تجزیه و تحلیل سنتز cDNA نشان داد که کیفیت استخراج بالا است. همچنین کیفیت سنتز شده برای واکنش های Real-Time PCR مناسب است. برای انجام واکنش پلیمرز در دستگاه Real-Time PCR ابتدا ویسکوزیته فوروارد و آغازگرهای معکوس بهینه شدند. مقادیر آغازگرها پس از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای کنترل ژن‌های β -اکتین، Bax و BCL2 مشخص شد. منحنی ذوب واحد نشان‌دهنده عدم وجود محصول غیراختصاصی است. پس از واکنش Real-Time، داده‌های دستگاه در فرمول‌های مربوطه محاسبه و مقادیر آن محاسبه شد. با استفاده از نرم‌افزار

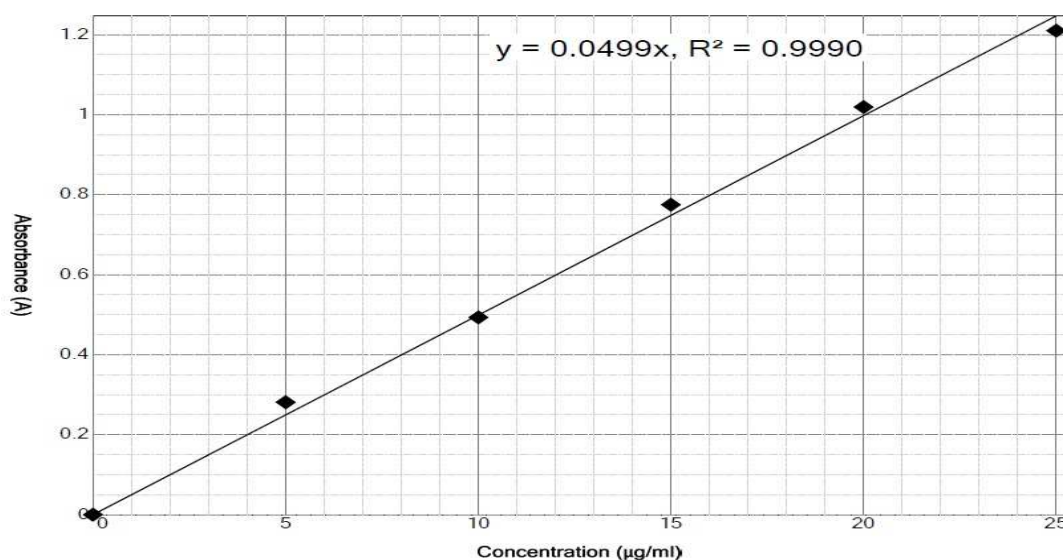
SPSS، آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه Turkey و آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد. سطح بیان Bax و Bcl2، نشان داد که ژن‌ها در مقایسه با ژن مرجع داخلی GAPDH افزایش یافته است. بیان ژن BAX در مقایسه با β -اکتین داخلی حدود ۲٫۶ افزایش یافته است (ژن کنترل)، اما بیان ژن BCL2 در مقایسه با کنترل داخلی حدود ۱٫۷ افزایش داشت. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که اسانس حاوی نانوذرات لیپیدی بیان BAX و BCL2 را افزایش می‌دهد. درواقع نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس مسیر آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی تخمدان فعال کرده و متعاقباً باعث ایجاد رشد تومور متوقف شود.

جدول ۱- خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانو ذرات حاوی اسانس درمنه (% وزنی/وزنی) هر فرمولاسیون سه بار تکرار

Table 1 Physicochemical properties of Nanoparticles containing *Artemisia* extraction (weight percent/ weight)

Formula	Size (nm)	PDI	ZP (mv)	EE%
AR-SLN1	329.73±21.64	0.291±0.015	-14.96±0.75	45.60±1.52
AR-SLN2	352.8±13.95	0.335±0.061	-9.86±2.034	51.12±0.62
AR-SLN3	156.97±7.15	0.388±0.004	-27.67±1.89	59.02±0.74
AR-SLN4	176.33±19.44	0.424±0.009	-24.93±0.55	58.90±0.20
AR-SLN5	268.2±7.84	0.230±0.009	-19.3±1.04	54.46±3.93
AR-SLN6	392.13±28.79	0.274±0.06	-3.18±1.11	59.47±0.47
AR-SLN7	198.53±22.55	0.322±0.045	-21.8±2.43	56.96±2.47
AR-SLN8	303.03±8.25	0.259±0.018	-11.37±5.74	52.69±0.93

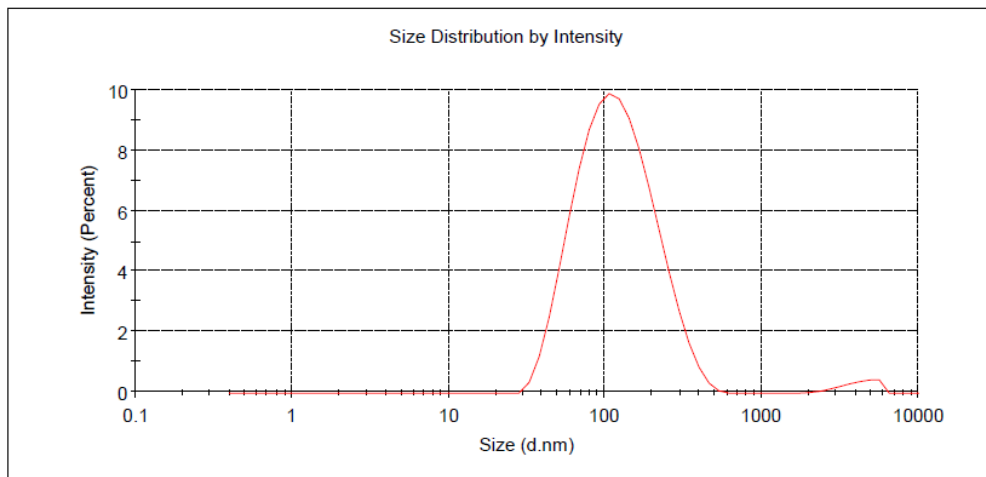
AR: Artemisia; Col: cholesterol; BW: bees wax; GMS; glycerol monostearate; SA: stearic acid; PA: palmitic acid; T 20: tween 20; Sp60: span60; PDI: polydispersity index; ZP: zeta potential; EE: entrapment efficiency



شکل ۱- منحنی استاندارد اسانس درمنه در طول موج ۲۷۴ نانومتر

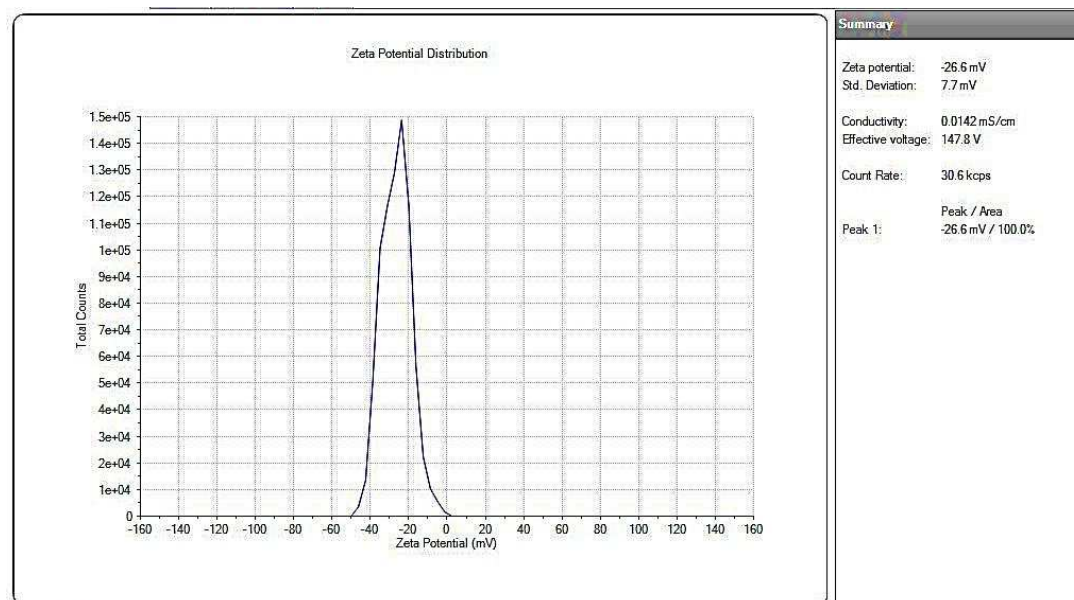
Fig. 1. Standard curve of Artemisia extraction at 274 nm of wavelength

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 113.20	Peak 1: 104.5	98.0	75.33
Pdl: 0.216	Peak 2: 4244	2.0	988.8
Intercept: 0.917	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



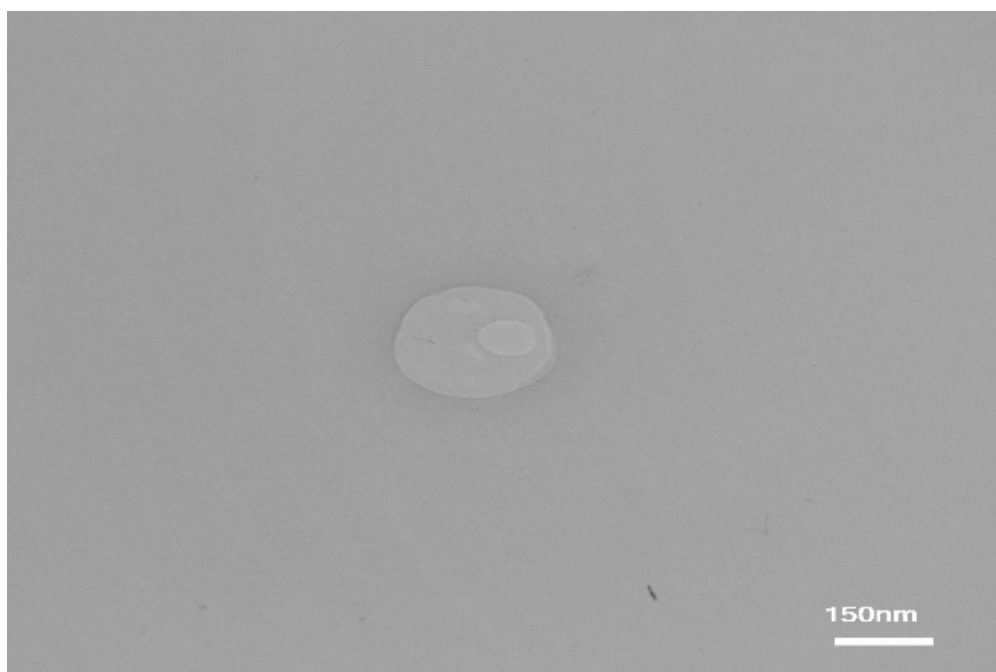
شکل ۲- نمونه‌ای از طیف حاصل از تعیین اندازه ذره‌ای و شاخص پراکندگی در فرمولاسیون AR-SLN3

Fig. 2. An example of the spectrum obtained from particle size determination and dispersion index in the ARSLN3 formulation



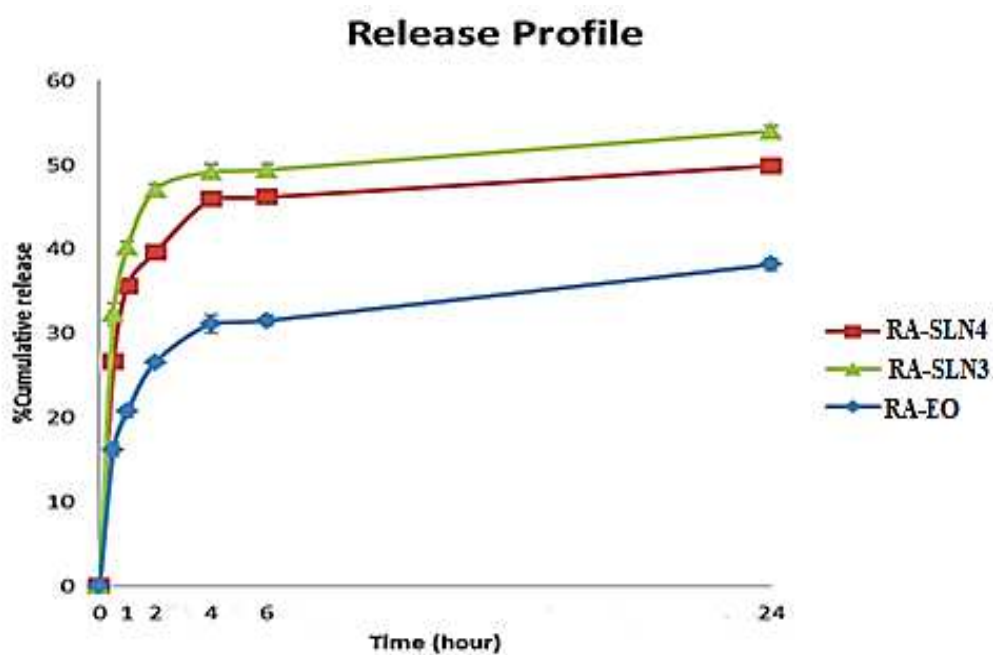
شکل ۳- نمونه‌ای از پتانسیل زتا در فرمولاسیون AR-SLN3

Fig. 3. An example of zeta potential in the AR-SLN3 formulation



شکل ۴- عکس TEM مربوط به SLN حاوی اسانس درمنه

Fig. 4. TEM image of SLN containing spherical Artemisia extraction



شکل ۵- نمودار مقایسه‌ای آزادسازی شاهد، فرمولاسیون RA-SLN3 و RA-SLN4 در محیط بافر pH = 7.4

Fig. 5. Comparative graph of control release, RA-SLN4 and RA-SLN3 formulation in buffer environment PH=7.4

بحث

با توجه به اهمیت سرطان تخمدان و پتانسیل آنتی-اکسیدانی درمنه، این مطالعه با هدف بررسی اثرات سلولی، مولکولی و ضدآپوپتوز اسانس بر روی نانوذرات لیپیدی در سلول‌های سرطانی تخمدان می‌باشد. ترکیبات اصلی نانوذرات لیپیدی شامل لیپید جامد، سورفکتانت‌ها و آب بود. انتخاب مناسب چربی‌ها، سورفکتانت‌ها، ترکیبات و مقادیر آنها می‌تواند بر اندازه ذرات، پایداری ذخیره‌سازی طولانی مدت، بارگیری دارو و آزاد سازی دارو مؤثر می‌باشد. این بدان معناست که هر دارو به فرمول خاصی برای SLN نیاز دارد (۱۶، ۱۷). مطالعه قبلی روی اسانس درمنه وجود آلفا پینن، بتا - پینن، D ژرماکرن و لیمونن، گزارش شد که از رشد سلول‌های سرطانی سینه، کبد و ملانوم انسان جلوگیری می‌کند. جوپاتولین همچنین یکی از القاء کننده‌های آپوپتوز در سلول‌های HL-60 و سرطان معده است (۱۸). SLN‌ها از یک یا مخلوطی از لیپیدها ساخته شده اند که در دمای محیط و دمای بدن جامد هستند. نوع و مقدار لیپیدها بر اندازه ذرات نانوذرات تأثیر می‌گذارد. هر لیپید دارای چندین ترکیب شیمیایی است (۱۹). مقدار ویسکوزیته لیپید مورد استفاده نانوذرات می‌تواند متفاوت از ۲ تا ۸ درصد مقدار لیپید مورد استفاده بستگی به تکنیک تولید نانوذرات دارد. مطالعات نشان داده‌اند که افزایش ویسکوزیته لیپید با افزایش ورود دارو به داخل بدن همراه است. از طرف دیگر، افزایش محتوای لیپید باعث افزایش اندازه ذرات می‌شود (۲۰). در این مطالعه، محتوای لیپید چهار بار استفاده شد و به دلیل مقدار کم اسانس استخراج شده گیاه تنها چهار فرمول با استفاده از دو نوع لیپید و دو نوع سورفکتانت تهیه شد. سپس تفاوت نوع لیپید و سورفکتانت به عنوان عامل مؤثر بر نانوذرات تهیه شده پارامترهایی مانند اندازه ذرات و توزیع مورد

بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه آکروت و همکاران وی نشان داد که عصاره متانولی تهیه شده از قسمت‌های مختلف درمنه وحشی دارای خواص سیتوتوکسیک بر سلول‌های می‌باشد (۲۱). در یک مطالعه مشابه، گوردانیان و همکارانش گزارش کردند که سمیت در قسمت‌های هوایی درمنه نسبت به سایر اندام‌ها بالاتر است. علت آن را تجمع مواد آنتی-اکسیدانی در سر شاخه‌های هوایی گزارش کرده‌اند، نوع و مقدار سورفکتانت مهم‌ترین عامل مؤثر بر کیفیت نانو ذرات است. استفاده نامطلوب و کم از سورفکتانت‌ها نه تنها باعث افزایش اندازه ذرات می‌شود گاهی موجب عدم ایجاد نانوذره می‌شود (۲۲)، (۲۳). سورفکتانت‌های مختلف توزیع متفاوتی بر روی سطح نانوذرات دارند. استفاده از چندین سورفکتانت برای دستیابی به اندازه و پایداری ذرات بهینه است (۲۴). تحقیقات نشان داده است که استفاده از سورفکتانت با لیپوفیل HLB در کنار سورفکتانت با HLB هیدروفیل پتانسیل زتا را افزایش می‌دهد و در نتیجه پایداری را افزایش می‌دهد. به همین دلیل، در این مطالعه ترکیب دو سورفکتانت Twin 80 با HLB Hydrophilic و Span 60 با HLB ۴/۳ استفاده شد. از سوی دیگر، مطالعات نشان داده است که با افزایش سورفکتانت با هیپوفیلیک HLB، اندازه ذرات افزایش می‌یابد، یکی از مزایای Real-Time PCR ترسیم منحنی ذوب است که پس از PCR تکمیل شد. نتایج حاصل از اثرات سلولی اسانس نانوذرات لیپیدی بر سلول‌های سرطانی تخمدان نشان داد که افزایش ویسکوزیته نانوذرات لیپیدی حاوی درمنه باعث کاهش بقا می‌شود. سلول‌های هلا نتایج ما با یافته‌های اصغری و همکاران (۱۳۹۱) که در مطالعه آنها انجام شده، مطابقت دارد. در بررسی اثر عصاره متانولی درمنه نشان دادند که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی

6. Moore RG, Brown AK, Miller MC, Skates S, Allard WJ, Verch T et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol*. 2008; 108:402-408.

7. Bookman MA. First-line chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Clin Obstet Gynecol*. 2012;55:96-113.

8. Ehsanfar P, Teimouri M, Pooladi M. Investigating characterizations and antifungal effects of solid lipid nanoparticles (SLNs) loaded with essential oil of *Citrus aurantifolia* on isolated *Malassezia* strains. *Arch Adv Biosci*. 2020;11:43-55.

9. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *Cancer J Clin*. 2019;69:7-34.

10. Wang CZ, Calway T, Yuan CS. Herbal medicines as adjuvants for cancer therapeutics. *Am J Chin Med*. 2012;40:657-669.

11. Salimifar M, Fatehi-Hassanabad Z, Fatehi M. A review on natural products for controlling type 2 diabetes with an emphasis on their mechanisms of actions. *Curr Diabetes Rev*. 2013;9:402-411.

12. Jafariparizi M, Afsharzadeh S, Akkafi HR, Abbasi S. Floristic study of *Artemisia aucheri* Boiss. rangelands in Isfahan Province, Iran. *Nova Biologica Reperta* 2017;4:236-245.

13. Bora KS, Sharma A. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. *Pharm Biol*. 2011;49:101-109.

14. Lai F, Sinico C, De Logu A, Zaru M, Müller RH, Fadda AM. SLN as a topical delivery system for *Artemisia arborescens* essential oil: in vitro antiviral activity and skin permeation study. *Int J Nanomed*. 2007; 2:419.

15. Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the

است و خواص کشنده سلولی و پتانسیل استفاده در درمان سرطان را دارد. آنها همچنین نشان دادند که با افزایش ویسکوزیته عصاره درمنه باعث کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطانی وابسته به دوز شد. (۲۶) به طور مشابه، قره ماتروسیان و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که عصاره متانولی درمنه توانایی مهار رشد سلولی به روشی وابسته به غلظت را دارا می‌باشد (۲۶).

نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج مطالعه نشان داد که نانوذرات لیپیدی حاوی عصاره گیاه آرتمیسیا، مسیر آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی تخمدان فعال کرده و در نتیجه باعث توقف رشد تومور شد.

منابع

1. Pooladi M, Abad SK, Hashemi M. Proteomics analysis of human brain glial cell proteome by 2D gel. *Indian J Cancer*. 2014;51:159.
2. Teimouri M, Pooladi M. Anti-angiogenic and anti-proliferative effects of physalis alkekengi hydroalcoholic extract on breast cancer in mice. *J Fasa Univ of Med Sci*. 2021;10:3684-3691.
3. Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, Li Y. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem J*. 2012; 441:61-76.
4. Ebrahimi M, Teimouri M, Pooladi M. The synergistic anticancer traits of graphene oxide plus doxorubicin against BT474 and MCF7 breast cancer stem cells in vitro. *Appl Biochem Biotechnol*. 2021;2021:1-6.
5. Teimouri M, Odoumizadeh M. Cytotoxicity of *Artemisia vulgaris* essential oil encapsulated in SLN on breast cancer cell line (MCF7). *Arch Adv Biosci*. 2021;12:11-26.

cytotoxic activity of flower, leaf, stem and root extracts of five *Artemisia* species. Res Pharm Sci. 2014; 9:91.

23. Emami SA, Rabe SZ, Ahi A, Mahmoudi M, Tabasi N. Study the cytotoxic and pro-apoptotic activity of *Artemisia annua* extracts. Pharmacol Online. 2009; 3:1062-1069.

24. Mahmoudi M, Rabe SZ, Ahi A, Emami SA. Evaluation of the cytotoxic activity of different *Artemisia khorassanica* samples on cancer cell lines. Pharmacol Online. 2009; 2:778-786

25. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques. 2005;39:75-85.

26. Asghari G, Jalali M, Sadoughi E. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from the seeds of *Artemisia aucheri* Boiss. Jundishapur J Nat Pharm Prod. 2012;7:11.

27. Gharehmatrossian S, Popov YU, Ghorbanli M, Safaeian S. Antioxidant activities and cytotoxic effects of whole plant and isolated culture of *Artemisia aucheri* Boiss. Asian J Pharm Clin Res. 2012;5:95-98.

art. Eur J Pharma Biopharm. 2000;50:161-177.

16. Mukherjee S, Ray S, Thakur RS. Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. Indian J Pharm Sci. 2009; 71:349.

17. Teoh DG, Secord AA. Antiangiogenic therapies in epithelial ovarian cancer. Cancer Control. 2011; 18:31-43.

18. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. Trends Biochem Sci. 2000; 25:502-508.

19. Bobrowski K. Free radicals in chemistry, biology and medicine: contribution of radiation chemistry. Nukleonika. 2005; 50:67-76.

20. Lingayat VJ, Zarekar NS, Shendge RS. Solid lipid nanoparticles: a review. Nanosci Nanotechnol Res. 2017;2:67-72.

21. Akrouit A, Chemli R, Chreïf I, Hammami M. Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. Flavour Fragr J. 2000;16:337-339.

22. Gordanian B, Behbahani M, Carapetian J, Fazilati M. In vitro evaluation of

Research Article

The Effect of Four-Week Co-Supplementation of Magnesium and Vitamin D on Sleep Quality and Circadian Rhythm in Cadets of Imam Ali Officers' University

Hekmat Ehsanbakhsh¹, Hamid Yousefi¹, Ehsan Yousefalizadeh^{2*}

1- Department of Health and Medicine, Faculty of Basic Sciences, Imam Ali Officers' University, Tehran, Iran

2- Department of Sport Physiology, Faculty of Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

*Corresponding author: ehsanyosofalizade@gmail.com

Received: 28 March 2025

Accepted: 25 June 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1208208

Abstract

Sleep disorders are a common issue among university students, particularly military cadets who are exposed to greater physical and psychological stress. This study aimed to examine the effects of a four-week co-supplementation of magnesium and vitamin D on sleep quality and circadian rhythm in cadets of Imam Ali Officers' University. This quasi-experimental, double-blind study followed a pretest-posttest design with a control group. A total of 30 cadets were randomly assigned to either the experimental group (receiving magnesium and vitamin D supplements) or the control group (receiving a placebo). Sleep quality was assessed using the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI), and biochemical levels of serum melatonin, 25-hydroxyvitamin D, and magnesium were measured. Paired t-tests, analysis of covariance (ANCOVA), and multivariate analysis of covariance (MANCOVA) were used to test the hypotheses at a significance level of 0.05. The results showed that in the supplement group, serum levels of melatonin, magnesium, and 25-hydroxyvitamin D significantly increased, and overall sleep quality scores improved. However, multivariate between-group analysis did not confirm significant differences across all sleep components. These findings suggest that the combined intake of magnesium and vitamin D may lead to partial improvement in certain aspects of sleep and circadian rhythm regulation. The use of these supplements is recommended as a simple and practical approach to enhance sleep quality among military students.

Keywords: Magnesium, Vitamin D, Sleep Quality, Circadian Rhythm, Military Students.

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر مصرف همزمان منیزیم و ویتامین D به مدت چهار هفته بر کیفیت خواب و ریتم شبانه‌روزی در دانشجویان دانشگاه افسری امام علی (ع)

حکمت احسان‌بخش^۱، حمید یوسفی^۱، احسان یوسفعلی‌زاده^{۲*}

۱- گروه بهداشت و طب رزم، دانشکده علوم پایه، دانشگاه افسری امام علی، تهران، ایران

۲- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

*مسئول مکاتبات: ehsanyosofalizade@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۰۸

DOI: 10.60833/ascij.2025.1208208

چکیده

اختلالات خواب یکی از مشکلات رایج در میان دانشجویان به‌ویژه دانشجویان نظامی است که تحت فشارهای جسمی و روانی بیشتری قرار دارند. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر مصرف همزمان منیزیم و ویتامین D به مدت چهار هفته بر کیفیت خواب و ریتم شبانه‌روزی در دانشجویان دانشگاه افسری امام علی (ع) انجام گرفت. پژوهش حاضر به‌صورت نیمه‌تجربی، دوسوکور، با طراحی پیش‌آزمون و پس‌آزمون با گروه کنترل انجام شد. تعداد ۳۰ دانشجو به‌صورت تصادفی به دو گروه آزمایش (مکمل منیزیم و ویتامین D و کنترل (دارونما) تقسیم شدند. ارزیابی کیفیت خواب با استفاده از پرسشنامه پیتزبورگ (PSQI) و اندازه‌گیری سطوح بیوشیمیایی ملاتونین، ۲۵-هیدروکسی ویتامین D و منیزیم سرم انجام گرفت. از آزمون t زوجی، تحلیل کوواریانس و تحلیل کوواریانس چندمتغیره در سطح معناداری ۰/۰۵ برای آزمون فرضیه‌ها استفاده گردید. یافته‌ها نشان داد که در گروه دریافت‌کننده مکمل، سطوح سرمی ملاتونین، منیزیم و ۲۵-هیدروکسی ویتامین D به‌طور معناداری افزایش یافت و نمره کل کیفیت خواب بهبود پیدا کرد. با این حال، تحلیل چندمتغیره بین‌گروهی، تفاوت معناداری در همه مؤلفه‌های خواب را تأیید نکرد. این نتایج نشان می‌دهد که مصرف همزمان منیزیم و ویتامین D می‌تواند در بهبود نسبی برخی جنبه‌های خواب و تنظیم ریتم شبانه‌روزی مؤثر باشد. استفاده از این مکمل‌ها به‌عنوان رویکردی ساده و قابل اجرا برای بهبود وضعیت خواب در دانشجویان نظامی توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: منیزیم، ویتامین D، کیفیت خواب، ریتم شبانه‌روزی، دانشجویان نظامی.

مقدمه

افزایش خطر افسردگی، چاقی، دیابت نوع دو و بیماری‌های قلبی-عروقی همراه است (۲). این اهمیت دوچندان می‌شود وقتی صحبت از گروه‌هایی مانند دانشجویان نظامی به میان می‌آید که هم‌زمان با فشارهای جسمی، روانی و محیطی، مسئولیت‌های پیچیده و شرایط سخت آموزش را تجربه می‌کنند.

خواب یکی از مهم‌ترین نیازهای زیستی انسان است که نه‌تنها بر حفظ انرژی و بازسازی فیزیولوژیکی تأثیر دارد، بلکه نقش کلیدی در عملکرد شناختی، تنظیم احساسات، حفظ ایمنی بدن و تعادل هورمونی ایفا می‌کند (۱). اختلال در الگوی خواب با پیامدهای منفی متعددی از جمله کاهش تمرکز، ضعف حافظه،

پژوهش‌ها نشان می‌دهند که دانشجویان نظامی نسبت به جمعیت عمومی در معرض اختلالات خواب بیشتری هستند. شیفت‌های شبانه، خواب منقطع، استرس مزمن، محیط‌های خواب اشتراکی، و نوسانات شبانه‌روزی از جمله عواملی هستند که در کیفیت پایین خواب این گروه مؤثرند (۳). مطالعات گذشته نشان داده‌اند که اختلال در خواب در جمعیت‌های نظامی با افزایش خطر بروز مشکلات روان‌پزشکی مانند اضطراب، اختلال استرس پس از سانحه (PTSD) و کاهش عملکرد شناختی در مأموریت‌ها مرتبط است (۴). این وضعیت نه تنها بر سلامت فردی افراد، بلکه بر اثربخشی عملکرد جمعی نیروهای مسلح نیز تأثیرگذار است. ریتم شبانه‌روزی (سیرکادین) که به‌عنوان ساعت بیولوژیکی بدن شناخته می‌شود، در تنظیم چرخه خواب و بیداری نقش اساسی دارد. این ریتم تحت تأثیر عوامل محیطی نظیر نور، فعالیت بدنی، دما و تغذیه قرار می‌گیرد (۵). اختلال در این چرخه می‌تواند منجر به تغییر در ترشح هورمون‌هایی مانند ملاتونین و کورتیزول شود که نتیجه آن اختلال در آغاز، تداوم یا عمق خواب خواهد بود. در این زمینه، پژوهشگران در سال‌های اخیر به بررسی نقش ریزمغذی‌هایی چون منیزیم و ویتامین D در تنظیم خواب و ریتم شبانه‌روزی علاقه‌مند شده‌اند. منیزیم یکی از مهم‌ترین مواد معدنی بدن است که در بیش از ۳۰۰ واکنش بیوشیمیایی، از جمله عملکرد گیرنده‌های گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA)، تنظیم سیستم عصبی مرکزی، سنتز پروتئین و کنترل قند خون نقش دارد (۶). مطالعات متعددی رابطه مستقیم بین کمبود منیزیم و بی‌خوابی، خواب‌رفتگی، خواب منقطع و اضطراب پیش از خواب را گزارش کرده‌اند (۷، ۸). به‌طور خاص، منیزیم با تقویت عملکرد انتقال‌دهنده‌های عصبی مهاری و کاهش تحریک‌پذیری نورون‌ها، زمینه‌ساز ورود به فاز خواب

عمیق می‌شود (۹). همچنین شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد کمبود منیزیم سطح کورتیزول را در ساعات غروب افزایش داده و بدین‌ترتیب فرآیند طبیعی القای خواب را مختل می‌کند (۱۰). در کنار منیزیم، ویتامین D نیز از جمله عوامل تغذیه‌ای مؤثر در تنظیم خواب است که از طریق تأثیر بر هورمون ملاتونین و تعامل با گیرنده‌های مغزی، بر ریتم شبانه‌روزی تأثیر می‌گذارد. گیرنده‌های ویتامین D در نواحی مختلف مغز از جمله هیپوتالاموس و هسته سوپراکیاسماتیک که مرکز اصلی تنظیم ساعت زیستی است، یافت می‌شوند (۱۱). مطالعات بالینی نشان داده‌اند که کمبود ویتامین D با افزایش خطر ابتلا به بی‌خوابی، کاهش مدت زمان خواب، و افزایش بیداری‌های شبانه همراه است (۱۲). از سوی دیگر، افزایش سطح ویتامین D می‌تواند سطح ملاتونین را از طریق افزایش بیان ژن تریتوفان هیدروکسیلاز ۲ (TPH2) و تنظیم چرخه سروتونین-ملاتونین بهبود بخشد (۱۳). ترکیب منیزیم و ویتامین D ممکن است اثر هم‌افزایی در بهبود خواب داشته باشد. یک مطالعه مقطعی در سال ۲۰۲۳ نشان داد افرادی که هم‌زمان سطوح پایین منیزیم و ویتامین D داشتند، کیفیت خواب پایین‌تری نسبت به افرادی با سطوح نرمال داشتند (۱۴). همچنین پژوهش‌های مداخله‌ای نیز پیشنهاد کرده‌اند که مکمل‌یاری هم‌زمان این دو ریزمغذی می‌تواند سطح ملاتونین شبانه را افزایش داده و موجب بهبود مؤلفه‌های اصلی خواب مانند زمان به خواب رفتن، مدت خواب و کیفیت کلی شود (۱۵، ۱۶). با در نظر گرفتن اینکه جمعیت دانشجویان نظامی به دلیل تمرینات شدید بدنی، قرارگیری کمتر در معرض نور طبیعی، تغذیه کنترل‌شده، و سبک زندگی پرتنش، در معرض کمبود هر دو ریزمغذی فوق هستند، ارزیابی اثربخشی مکمل‌یاری ترکیبی منیزیم و ویتامین D بر کیفیت خواب این گروه از

اهمیت خاصی برخوردار است. این موضوع نه تنها از منظر بالینی و بهداشتی حائز اهمیت است، بلکه می‌تواند در طراحی مداخلات ساده، غیرتهاجمی و مقرون به صرفه در ارتقاء عملکرد عملیاتی نیروهای نظامی مؤثر واقع شود. بر همین اساس، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر مکمل‌یاری چهار هفته‌ای منیزیم و ویتامین D بر کیفیت خواب و ریتم شبانه‌روزی در دانشجویان دانشگاه افسری امام علی (ع) طراحی گردیده است. با استفاده از ابزارهای استاندارد سنجش خواب و تحلیل بیوشیمیایی سطح ملاتونین، ۲۵-هیدروکسی ویتامین D و منیزیم، این مطالعه تلاش دارد تا با ارائه شواهد علمی دقیق، پاسخی برای یکی از دغدغه‌های مهم بهداشتی در میان جمعیت نظامی کشور فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع نیمه‌تجربی به صورت کارآزمایی بالینی تصادفی‌سازی شده، دوسوکور و با طرح پیش‌آزمون-پس‌آزمون با گروه کنترل انجام شد. جامعه آماری شامل دانشجویان پسر ۱۸ تا ۲۳ سال دانشگاه افسری امام علی (ع) در سال تحصیلی ۱۴۰۳-۱۴۰۴ بود. از میان داوطلبان واجد شرایط، پس از بررسی معیارهای ورود و خروج و دریافت رضایت‌نامه آگاهانه، ۳۰ نفر به صورت تصادفی ساده انتخاب و با استفاده از جدول اعداد تصادفی در دو گروه مساوی آزمایش (۱۵ نفر) و کنترل (۱۵ نفر) تقسیم شدند. معیارهای ورود شامل سن ۱۸ تا ۲۳ سال، سلامت عمومی تأیید شده، عدم مصرف مکمل، دارو، مواد محرک، مخدر یا دخانیات طی ۶ ماه گذشته، و نداشتن سابقه اختلال خواب یا بیماری روان‌پزشکی بود. از معیارهای خروج می‌توان به مصرف نکردن منظم مکمل یا دارو، استفاده از داروهای خواب‌آور، بروز بیماری حاد یا انصراف از پژوهش اشاره کرد.

گروه آزمایش به مدت ۴ هفته روزانه مکمل ترکیبی شامل ۱۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3 و ۱۰۰ میلی‌گرم منیزیم (محصول شرکت Holistica فرانسه) مصرف کرد. گروه کنترل دارونمایی مشابه از نظر شکل و طعم (مالتودکسترین) دریافت نمود. پژوهش به صورت دوسوکور انجام شد؛ به طوری که آزمودنی‌ها و پژوهشگر از نوع ماده مصرفی آگاه نبودند. برای ارزیابی کیفیت خواب، از پرسشنامه استاندارد و فارسی‌شده‌ی کیفیت خواب پیترزبورگ (PSQI) استفاده شد که شامل ۷ مؤلفه و ۱۹ سؤال بود (۱۷). به ترتیب ۷ مؤلفه اصلی شامل، کیفیت ذهنی خواب، تأخیر در به خواب رفتن، مدت زمان خواب، کارایی خواب، اختلالات خواب، مصرف داروهای خواب‌آور و اختلالات روزانه بود. نمره‌گذاری بر اساس جمع امتیازات مؤلفه‌ها انجام می‌شود و دامنه کل نمره از ۰ تا ۲۱ متغیر است. نمرات بالاتر از ۵ نشان‌دهنده اختلال در کیفیت خواب هستند. در نهایت نمره کلی کیفیت خواب بدست می‌آید. این پرسشنامه در مطالعات متعددی در ایران اعتباریابی شده و از روایی و پایایی مطلوب برخوردار است (۱۸). همچنین برای بررسی ریتم شبانه‌روزی (سیرکادین)، سطح سرمی هورمون ملاتونین پیش و پس از مداخله اندازه‌گیری شد (۱۹). دیگر متغیرهای زیستی شامل سطح سرمی منیزیم و ۲۵-هیدروکسی ویتامین D بود (۲۰). خون‌گیری در هر دو مرحله (پیش‌آزمون و پس‌آزمون) رأس ساعت ۱۳:۰۰، پس از صرف صبحانه استاندارد و با رعایت شرایط محیطی یکسان انجام شد. حدود ۵ میلی‌لیتر خون از ورید بازویی جمع‌آوری (در لوله‌های مخصوص حاوی EDTA) و با استفاده از کیت‌های الایزا در آزمایشگاه معتبر تحلیل گردید. برای کنترل متغیرهای مخدوش‌کننده، شرایط خواب، رژیم غذایی و زمان نمونه‌گیری یکسان‌سازی شد. متغیرهای مداخله‌گر مانند سن، سابقه مصرف مکمل، وضعیت

سلامت و شرایط محیطی کنترل گردیدند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ تحلیل شد. برای توصیف داده‌ها از شاخص‌های مرکزی و پراکندگی استفاده شد. آزمون شاپیرو-ویلک برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها و آزمون لوین برای برابری واریانس‌ها به کار رفت. در تحلیل استنباطی، از آزمون تی زوجی، تحلیل کوواریانس (آنکوا) و تحلیل کوواریانس چندمتغیره (مانکوا) در سطح معناداری ۰/۰۵ برای آزمون فرضیه‌ها استفاده گردید.

نتایج

در ابتدا داده‌های جمعیت‌شناختی آزمودنی‌ها بررسی شد. آزمون تی مستقل نشان داد که بین دو گروه از نظر سن، قد، وزن و شاخص توده بدنی (BMI) تفاوت معناداری وجود نداشت (همه $p > ۰/۰۵$)، که نشان‌دهنده همگنی اولیه بین گروه‌ها بود (جدول ۱). در بخش یافته‌های بیوشیمیایی جدول ۲، بررسی سطح سرمی ملاتونین نشان داد که مصرف چهار هفته مکمل منیزیم و ویتامین D باعث افزایش معنادار این هورمون در گروه آزمایش شد ($d = ۰/۶۰$ ، $p = ۰/۰۳۵$ ، $t = -۲/۳۳$)، در حالی که در گروه کنترل تغییر معناداری مشاهده نشد ($p = ۰/۸۵۶$). تحلیل کوواریانس نیز تفاوت بین دو گروه را معنادار نشان داد ($\eta^2 = ۰/۱۴۳$)، $F = ۴/۵۲$ ، $p = ۰/۰۴۳$). سطح سرمی ۲۵-هیدروکسی ویتامین D نیز پس از مداخله در گروه دریافت‌کننده مکمل افزایش معناداری داشت ($d = ۰/۵۸$ ، $t = -۲/۲۵$ ، $p = ۰/۰۴۱$)، در حالی که در گروه کنترل تفاوت

معناداری گزارش نشد ($p = ۰/۷۱۲$). تحلیل کوواریانس بین‌گروهی این افزایش را تأیید کرد ($\eta^2 = ۰/۲۵۲$ ، $p = ۰/۰۰۵$ ، $F = ۹/۱۰$). همچنین سطح سرمی منیزیم در گروه مداخله به‌طور معناداری افزایش یافت ($d = ۰/۸۸$ ، $p = ۰/۰۰۴$ ، $t = -۳/۴۱$)، ولی در گروه کنترل این تغییر از نظر آماری معنادار نبود ($p = ۰/۱۲۹$). تحلیل آنکوا نیز نشان داد که تفاوت بین دو گروه از نظر سطح منیزیم معنادار است ($\eta^2 = ۰/۲۵۴$ ، $p = ۰/۰۰۵$ ، $F = ۹/۲۱$). در بررسی کیفیت خواب، نمره کل PSQI در گروه آزمایش به‌طور معناداری کاهش یافت (از $۹/۲۶ \pm ۲/۳۴$ به $۲/۲۷ \pm ۶/۲۰$ ، $p = ۰/۰۰۳$) که نشان‌دهنده بهبود کیفیت خواب بود. همچنین، مؤلفه‌های کیفیت ذهنی خواب ($p = ۰/۰۲۲$)، تأخیر در به خواب رفتن ($p = ۰/۰۴۱$) و مدت زمان خواب ($p = ۰/۰۴۳$) نیز بهبود معناداری نشان دادند. اما تحلیل کوواریانس چندمتغیره (مانکوا) برای مقایسه بین گروهی مؤلفه‌های کیفیت خواب تفاوت معناداری را تأیید نکرد ($p = ۰/۱۷۰$). $F = ۱/۷۵$ ، $\lambda = ۰/۵۴$ (Wilks' Lambda). یافته‌ها مربوط به کیفیت خواب در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج حاصل از آزمون شاپیرو-ویلک نیز نشان داد که توزیع داده‌ها برای تمام متغیرهای اصلی از نرمال بودن پیروی می‌کند ($p > ۰/۰۵$)، بنابراین استفاده از آزمون‌های آماری پارامتریک در تجزیه و تحلیل مناسب بود.

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار مربوط به سن و سابقه ورزشی آزمودنی‌ها

Table 1. Mean and standard deviation related to age and sports history of the subjects

Variable	Group	Number	Mean	SD	Independent t-test
Age (years)	Mg and vitamin D intake	15	20.93	2.37	$t = -0.35, p = 0.726$
	Control	15	21.20	1.69	
Height (cm)	Mg and vitamin D intake	15	178.26	8.11	$t = 0.15, p = 0.888$

	Control	15	177.80	8.75	
Weight (kg)	Mg and vitamin D intake	15	72.20	6.03	$t = -0.11, p = 0.906$
	Control	15	72.46	6.22	
BMI (kg/m ²)	Mg and vitamin D intake	15	22.74	1.54	$t = -0.36, p = 0.715$
	Control	15	22.93	1.31	

جدول ۲- سطح معنی‌داری آزمون شاپیرو ویلک برای بررسی نرمال بودن متغیرهای تحقیق.

Table 2. Significance level of the Shapiro-Wilk test to check the normality of the research variables.

Variable	Group	Measurement stage	Statistics	<i>p</i>
Melatonin (Pg/ml)	Mg and vitamin D intake	Pre-test	0.90	0.09
		Post-test	0.90	0.132
	Control	Pre-test	0.90	0.121
		Post-test	0.90	0.122
25-hydroxyvitamin D (ng/ml)	Mg and vitamin D intake	Pre-test	0.92	0.205
		Post-test	0.93	0.280
	Control	Pre-test	0.94	0.498
		Post-test	0.95	0.573
Magnesium (mg/dl)	Mg and vitamin D intake	Pre-test	0.94	0.420
		Post-test	0.93	0.320
	Control	Pre-test	0.94	0.473
		Post-test	0.95	0.578
Sleep quality	Mg and vitamin D intake	Pre-test	0.90	0.105
		Post-test	0.94	0.398
	Control	Pre-test	0.96	0.811
		Post-test	0.89	0.068

جدول ۳- نتایج آزمون تی وابسته در متغیر ابعاد سلامت کیفیت خواب.

Table 3. Results of the dependent t-test on the health dimension variable of sleep quality.

Variable	Group	Effect size (Cohen's d)	<i>p</i>	T	df	Mean difference
Subjective quality of sleep	Mg and vitamin D intake	0.66	0.022	2.56	14	0.80
	Control	0.03	0.887	0.14	14	0.06
Delayed falling asleep	Mg and vitamin D intake	0.58	0.041	2.25	14	0.80
	Control	0.03	0.887	0.14	14	0.06
Sleep duration	Mg and vitamin D intake	0.57	0.043	2.22	14	0.86
	Control	0.18	0.484	0.71	14	0.26
Sleep efficiency	Mg and vitamin D intake	0.11	0.670	0.43	14	0.13
	Control	0.11	0.653	0.45	14	0.13
Sleep disorder	Mg and vitamin D intake	0.03	0.869	0.16	14	0.06
	Control	0.05	0.818	0.23	14	0.06
Sleeping medicine	Mg and vitamin D intake	0.13	0.610	0.52	14	0.13
	Control	0.07	0.751	0.32	14	0.06
Daily functioning impairment	Mg and vitamin D intake	0.27	0.301	1.07	14	0.26
	Control	0.10	0.683	0.41	14	0.20
Total sleep quality score	Mg and vitamin D intake	0.93	0.003	3.64	14	3.06
	Control	0.03	0.882	-0.15	14	-0.20

بحث

یافته‌های این پژوهش نشان داد که مصرف همزمان مکمل منیزیم و ویتامین D به مدت ۴ هفته منجر به افزایش معنادار سطوح هورمون ملاتونین در گروه تجربی شد ($p = ۰/۰۳۵$). این نتیجه در آزمون تحلیل کوواریانس نیز تأیید گردید ($p = ۰/۰۴۳$ ، $q = ۰/۱۴۳$) که بیانگر اثربخشی واقعی مداخله حتی با کنترل η^2 پیش‌آزمون است. هورمون ملاتونین به‌عنوان تنظیم‌کننده اصلی چرخه خواب و بیداری شناخته می‌شود که از غده پینه‌آل در پاسخ به تاریکی ترشح می‌گردد (۱۵). مطالعات متعددی به بررسی ارتباط سطوح ویتامین D و ملاتونین پرداخته‌اند. به‌عنوان نمونه، تحقیق مک‌کارتی و چسون (۲۰۱۴) نشان داد که کمبود ویتامین D منجر به کاهش بیوستز ملاتونین در مغز می‌شود (۱۳). همچنین گومیناک و استامپف (۲۰۱۲) پیشنهاد کرده‌اند که گیرنده‌های ویتامین D در هیپوتالاموس بر تولید ملاتونین تأثیر غیرمستقیم دارند (۱۱). منیزیم نیز با تأثیر بر عملکرد گیرنده‌های GABA، که نقش مهمی در سیستم عصبی مرکزی دارند، به کاهش تحریک‌پذیری نورونی و در نتیجه، بهبود کیفیت خواب و افزایش ترشح ملاتونین منجر می‌شود (۷). مطالعات نیز نشان داده‌اند که سطوح پایین منیزیم با کاهش ترشح ملاتونین و بی‌نظمی در ریتم سیرکادین همراه است (۲۱). این یافته‌ها مؤید این موضوع‌اند که مکمل‌سازی همزمان ویتامین D و منیزیم می‌تواند اثر هم‌افزا در تنظیم چرخه شبانه‌روزی ایفا کند. چنین تأثیری، به‌ویژه در جمعیت‌هایی با سطح بالای استرس و خواب ناکافی، مانند دانشجویان نظامی، از اهمیت بالایی برخوردار است. در این مطالعه، سطح ۲۵-هیدروکسی ویتامین D در گروه مداخله به‌طور معناداری افزایش یافت ($p = ۰/۰۰۵$) که نشان‌دهنده اثربخشی مصرف مکمل بود. از آنجا که ویتامین D یکی از ویتامین‌های محلول در چربی است

که از طریق نور خورشید و رژیم غذایی تأمین می‌شود، کمبود آن در افرادی که زمان کمی در فضای باز می‌گذرانند یا دارای سبک زندگی پرتنش هستند، شایع است (۲۲). مطالعات جدیدی نشان داده‌اند که ویتامین D در تنظیم عملکرد عصبی، تعادل هورمونی، و تعدیل التهاب نقش دارد. به‌عنوان نمونه، تحقیق پیوکوری و همکاران (۲۰۱۲) رابطه مستقیمی میان سطح ویتامین D و کیفیت خواب گزارش کرد (۱۶). همچنین در مطالعه ژانگ و همکاران (۲۰۲۱)، مصرف مکمل ویتامین D در افراد دارای اختلال خواب باعث کاهش زمان به خواب رفتن و افزایش زمان خواب با کیفیت شد (۱۲). از سوی دیگر، ویتامین D از طریق بهبود وضعیت روانی (کاهش افسردگی و اضطراب) نیز می‌تواند به‌صورت غیرمستقیم موجب بهبود خواب گردد. این نکته در پژوهش‌های روان‌پزشکی نیز مطرح شده است که ویتامین D با تعدیل فعالیت سیستم سروتونرژیک و تنظیم ریتم کورتیزول، نقش حمایتی در آرام‌سازی روان دارد (۱۱). افزایش سطح منیزیم سرم در گروه مداخله ($p = ۰/۰۰۵$) از دیگر یافته‌های مهم این مطالعه بود. منیزیم یکی از فراوان‌ترین عناصر معدنی در بدن است که در بیش از ۳۰۰ واکنش آنزیمی نقش دارد. در زمینه خواب، منیزیم با تنظیم کانال‌های یونی، افزایش سنتز ملاتونین، فعال‌سازی گیرنده‌های GABA، و کاهش سطوح کورتیزول می‌تواند خواب را تسهیل کند (۹). مطالعه عباسی و همکاران (۲۰۱۲) در سالمندان ایرانی نشان داد که مصرف منیزیم به‌مدت ۸ هفته موجب بهبود کیفیت و مدت خواب شد (۷). مطالعه دیگری توسط نیلسن و همکاران (۲۰۱۰) نیز تأیید کرد که مصرف منیزیم در بزرگسالان موجب کاهش التهاب سیستمیک و بهبود شاخص‌های خواب گردید (۲۳). همچنین در برخی مطالعات گزارش شده است که کمبود مزمن منیزیم با

افزایش احتمال ابتلا به افسردگی، اضطراب و اختلالات خواب مرتبط است (۱۴). در این راستا، افزایش سطح منیزیم سرم در گروه مداخله این پژوهش می‌تواند از نظر بالینی دارای اهمیت درمانی باشد. بر اساس یافته‌های این پژوهش، گرچه نمره کل کیفیت خواب در گروه تجربی بهبود معناداری یافت ($p = ۰/۰۰۳$)، اما در تحلیل چندمتغیره (MANOVA) تفاوت معناداری بین گروه‌ها مشاهده نشد ($۰/۱۷۰ = p$). با این حال، تحلیل‌های تک‌متغیره نشان داد که برخی از مؤلفه‌های کیفیت خواب مانند کیفیت ذهنی خواب، مدت زمان خواب و تاخیر در به خواب رفتن، به‌طور معناداری بهبود یافته‌اند. مطالعه بینکس و همکاران (۲۰۲۰) نیز اشاره کرده است که مداخلات تغذیه‌ای معمولاً اثرات معنی‌دار خود را ابتدا بر مؤلفه‌های خاص خواب نشان می‌دهند و برای ایجاد تفاوت بین گروهی در تحلیل‌های چندمتغیره، به زمان طولانی‌تری نیاز دارند (۲۴). این موضوع می‌تواند توضیح دهد چرا در این مطالعه، باوجود بهبود مؤلفه‌ها، تفاوت کلی بین گروه‌ها در سطح مانکوا معنادار نبود. همچنین باید به این نکته توجه داشت که عوامل روان‌شناختی مانند اضطراب امتحان، فشار تمرینات نظامی، و سبک زندگی محدودشده نیز می‌توانند بر خواب اثر بگذارند و مانع از مشاهده کامل اثر مداخله شوند. لذا توصیه می‌شود در مطالعات آینده، این متغیرها به‌صورت همزمان اندازه‌گیری و کنترل شوند. با توجه به جدول ۳، مؤلفه‌هایی از خواب که به‌طور معنادار بهبود یافته‌اند (مانند کیفیت ذهنی خواب، تاخیر در به خواب رفتن و مدت زمان خواب)، نشان‌دهنده تأثیر عملکرد مکمل‌ها بر مرحله شروع خواب و عمق خواب هستند. به‌ویژه شاخص اندازه اثر (Cohen's d) در این مؤلفه‌ها (بین ۰/۵۷ تا ۰/۶۶) در بازه‌ی اثر متوسط تا زیاد قرار دارد که به لحاظ عملی نیز قابل‌توجه است (۲۵). به‌عبارت دیگر،

گرچه تحلیل چندمتغیره تفاوت کلی بین گروه‌ها را نشان نداد، اما در سطح تک‌متغیره، اثر قابل‌توجهی در برخی ابعاد خواب مشاهده شد. مطالعات مشابه نیز تأیید کرده‌اند که منیزیم بیشتر بر کیفیت آغاز خواب و کاهش اضطراب پیش از خواب مؤثر است (۸). در مطالعه‌ای توسط روندانلی و همکاران (۲۰۱۱)، مصرف ترکیبی منیزیم، ملاتونین و زینک باعث کاهش قابل‌توجه در مدت زمان به خواب رفتن شد (۲۱). یافته حاضر در راستای این پژوهش‌ها قرار دارد و تقویت عملکرد فاز آغازین خواب را نشان می‌دهد. در مؤلفه‌هایی مانند اختلال عملکرد روزانه، کارایی خواب و اختلالات خواب، تغییر معناداری مشاهده نشد. این موضوع می‌تواند ناشی از طبیعت ساختاریافته محیط نظامی باشد که فعالیت‌های روزانه، برنامه‌ی خواب و بیداری افراد را با محدودیت‌هایی مواجه می‌کند. همچنین تغییر در این مؤلفه‌ها معمولاً نیازمند مداخلاتی با مدت طولانی‌تر یا همراه با مداخلات روان‌شناختی است (۲۶). از نظر فیزیولوژیکی، افزایش سطح منیزیم سرم در گروه مداخله، نقش تنظیمی منیزیم را بر گیرنده‌های NMDA/ان-متیل-دی-آسپاراتات، کاهش تحریک‌پذیری عصبی و همچنین کاهش سطح کورتیزول صبحگاهی توجیه می‌کند؛ کورتیزول بالا در صبح یکی از عوامل اصلی در بروز اختلالات خواب، به‌ویژه بیدار شدن‌های مکرر و زود هنگام است (۹). نتایج مطالعه حاضر با این سازوکار همخوان است. افزون بر آن، افزایش سطح ویتامین D می‌تواند به کاهش التهاب عصبی منجر شود، که یک مکانیزم نوظهور در تبیین اختلالات خواب است. برخی مطالعات نشان داده‌اند که ویتامین D می‌تواند سطح فاکتور نکروز تومور آلفا ($TNF-\alpha$) و اینترلوکین ۶- (IL-6) یک از سایتوکاین‌های التهابی مؤثر در خواب را کاهش دهد (۲۷). بنابراین، بخشی از اثرات مثبت

منابع

1. Walker M. Why we sleep: Unlocking the power of sleep and dreams. Simon and Schuster, Scribner. 2017, 368 p.
2. Medic G, Wille M, Hemels ME. Short- and long-term health consequences of sleep disruption. *Nat Sci Sleep*. 2017;9:151-161.
3. Miller MA, Kruisbrink M, Wallace J, Ji C, Cappuccio FP. Sleep duration and incidence of obesity in infants, children, and adolescents: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Sleep*. 2018;41(4).doi: 10.1093/sleep/zsy018.
4. Pruiksma KE, Taylor DJ, Wachen JS, Mintz J, Young-McCaughan S, Peterson AL, et al. Residual sleep disturbances following PTSD treatment in active duty military personnel. *Psychol Trauma*. 2016; 8(6):697.
5. Mistlberger RE, Skene DJ. Social influences on mammalian circadian rhythms: animal and human studies. *Biological Reviews*. 2004;79(3):533-556.
6. Barbagallo M, Veronese N, Dominguez LJ. Magnesium in aging, health and diseases. *Nutrients*. 2021;13(2):463.
7. Abbasi M, Yazdi Z, Rezaie N. Sleep disturbances in patients with rheumatoid arthritis. *Nigerian Journal of Medicine*. 2013;22(3):181-186.
8. Schrempf W, Katona I, Dogan I, Felbert V, Wienecke M, Heller J, et al. Reduced intraepidermal nerve fiber density in patients with REM sleep behavior disorder. *Parkinsonism relat disord*. 2016;29:10-16.
9. Gröber U, Schmidt J, Kisters K. Magnesium in prevention and therapy. *Nutrients*. 2015;7(9):8199-8226.
10. Carlos RM, Matias CN, Cavaca ML, Cardoso S, Santos DA, Giro R, et al. The effects of melatonin and magnesium in a novel supplement delivery system on sleep scores, body composition and metabolism in otherwise healthy individuals with sleep disturbances. *Chronobiol Int*. 2024;41(6): 817-828.

بر خواب، ممکن است از مسیرهای غیرمستقیم ایمنی-عصبی نیز حاصل شده باشد. نکته حائز اهمیت دیگر، اندازه اثر بسیار بالای کاهش نمره کل PSQI در گروه مداخله است ($d = ۰/۹۳$)، که نشان‌دهنده اثربخشی بالای مکمل در بهبود کلی ادراک کیفیت خواب است، حتی اگر برخی مؤلفه‌ها به لحاظ آماری تغییر نداشته‌اند. این یافته اهمیت بررسی عمیق‌تر تجربه ذهنی خواب را در کنار پارامترهای عینی برجسته می‌کند. در نهایت، محدودیت مهمی که باید در تفسیر نتایج مدنظر قرار گیرد، حجم نمونه نسبتاً کوچک و مدت مداخله کوتاه است. با این حال، مشاهده اثرات معنی‌دار در چنین شرایطی، خود نشانه‌ای از پتانسیل قابل‌توجه مکمل‌درمانی در جمعیت‌های نظامی است. انجام مطالعات طولی با طراحی سه‌گروهی (مثلاً مکمل منیزیم تنها، ویتامین D تنها، و ترکیب هر دو) می‌تواند در آینده به تبیین سهم نسبی هر جزء کمک کند.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این تحقیق نشان داد که مکمل‌سازی همزمان منیزیم و ویتامین D به مدت چهار هفته می‌تواند منجر به بهبود سطح ریزمغذی‌ها، افزایش ترشح ملاتونین، و بهبود نسبی برخی مؤلفه‌های کیفیت خواب شود. این مداخله اگرچه در ارزیابی کلی چندمتغیره تغییر معناداری ایجاد نکرد، اما شواهد اولیه‌ای از اثربخشی آن در شرایط واقعی و پرتنش دانشجویان نظامی ارائه داد. در نتیجه، مصرف این دو مکمل می‌تواند به عنوان بخشی از برنامه‌های بهبود سلامت خواب در جمعیت‌های پرخطر مد نظر قرار گیرد. به‌ویژه با توجه به ماهیت کم‌عارضه، کم‌هزینه و دسترسی‌پذیر این مکمل‌ها، توصیه می‌شود در چارچوب راهبردهای سلامت عمومی در نیروهای نظامی گنجانده شوند.

- and associations with metabolic syndrome components. *Physiol Behavior*. 2014; 123:231-235.
20. Minoretti P, Santiago Sáez A, García Martín Á, Liaño Riera M, Gómez Serrano M, Emanuele E. Serum Calcium and Magnesium Levels, Not 25-Hydroxyvitamin D, Are Associated With Sleep Quality in Airline Pilots. *Cureus*. 2023;15(12):e50940.
21. Rondanelli M, Opizzi A, Monteferrario F, Antoniello N, Manni R, Klersy C. The effect of melatonin, magnesium, and zinc on primary insomnia in long-term care facility residents in Italy: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Am Geriatr Soc*. 2011;59(1):82-90.
22. Lavie CJ, Holick MF. Vitamin D supplementation for cardiovascular disease prevention. *JAMA*. 2011;306(14):1546-1548.
23. Nielsen TA, Paquette T, Solomonova E, Lara-Carrasco J, Popova A, Levrier K. REM sleep characteristics of nightmare sufferers before and after REM sleep deprivation. *Sleep Med*. 2010;11(2):172-179.
24. Binks H, E. Vincent G, Gupta C, Irwin C, Khalesi S. Effects of diet on sleep: a narrative review. *Nutrients*. 2020;12(4): 936.
25. Cohen J. A power primer. *Psychol Bull*. 1992;112(1):155.
26. Irish LA, Kline CE, Gunn HE, Buysse DJ, Hall MH. The role of sleep hygiene in promoting public health: A review of empirical evidence. *Sleep Med Rev*. 2015; 22:23-36.
27. Massa J, Stone KL, Wei EK, Harrison SL, Barrett-Connor E, Lane NE, et al. Vitamin D and actigraphic sleep outcomes in older community-dwelling men: the MrOS sleep study. *Sleep*. 2015;38(2):251-257.
11. Gominak S, Stumpf W. The world epidemic of sleep disorders is linked to vitamin D deficiency. *Med Hypotheses*. 2012;79(2):132-135.
12. Zhang Y, Ren R, Yang L, Zhang H, Shi Y, Okhravi HR, et al. Sleep in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of polysomnographic findings. *Transl Psychiatry*. 2022;12(1):136.
13. McCarty DE, Chesson Jr AL, Jain SK, Marino AA. The link between vitamin D metabolism and sleep medicine. *Sleep Med Rev*. 2014;18(4):311-319.
14. Arab A, Rafie N, Amani R, Shirani F. The role of magnesium in sleep health: a systematic review of available literature. *Biol Trace Elem Res*. 2023;201(1):121-128.
15. Slominski AT, Zmijewski MA, Skobowiat C, Zbytek B, Slominski RM, Steketee JD. Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2012;212(v, vii):1-115.
16. Peuhkuri K, Sihvola N, Korpela R. Diet promotes sleep duration and quality. *Nutr Res*. 2012;32(5):309-319.
17. Gao X, Qiao Y, Chen Q, Wang C, Zhang P. Effects of different types of exercise on sleep quality based on Pittsburgh Sleep Quality Index in middle-aged and older adults: a network meta-analysis. *J Clin Sleep Med*. 2024; 20(7):1193-204.
18. Asoudi, Mohammad Jafar, Mo'takaffar, Rezai Koucheksaraei. Investigating the effectiveness of online mindfulness-based cognitive therapy on sleep quality and obsessive thoughts caused by the coronavirus in patients with generalized anxiety disorder. *J New Strat Psychol Educ*. 2021;11(3):1-11. [In Persian].
19. Corbalán-Tutau D, Madrid JA, Nicolás F, Garaulet M. Daily profile in two circadian markers "melatonin and cortisol"

Research Article

The Effectiveness of *Micrococcus luteus* Bacteria on Some Blood and Immune Indices of Common Carp Fry

Mehran Avakh Keysami^{1*}, Alireza Akbari¹, Hamid Abdollahpour Biria², Maryam Avakh Keysami³

1- Department of Fisheries and Aquatics, Mirzakocheh Khan Fisheries Sciences and Industries Training Unit, Agricultural Research, Education and Extension Organization Rasht, Iran.

2- Department of Fisheries, Tal.C, Islamic Azad University, Talash, Iran

3- Research Department of Experimental Sciences Education, General Directorate of Education, Gilan Province, Bint Al-Hoda Sadr Educational Campus, Rasht, Iran

*Corresponding author: dr.keysami@gmail.com

Received: 10 April 2025

Accepted: 24 June 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1206510

Abstract

This research was conducted to investigate the effect of *Micrococcus luteus* bacteria on the blood indices, and immunology of common carp fry (*Cyprinus carpio*) in Mirzakocheh Khan Fisheries Science and Industry Training Center and Shahid Ansari Bony Fish Reserve Reproduction and Regeneration Center in Gilan was carried out during May to August 2023. In this experiment, *Micrococcus luteus* isolated from the digestive tract of common carp was fed to commercial pellet food of 300 pieces of common carp juveniles (28.018 ± 2.87) for 8 weeks in a completely randomized design with 5 treatments and 3 replications (20 pieces of fish in each tank) used. Mixing fish feed in the suspension of *Micrococcus luteus*, 5 types of diets with different concentrations of *Micrococcus* in the pellet including 10^6 , 10^7 cells/g were prepared as treatments 1, 2 and control without bacteria. After 56 days of feeding with these treatments, different levels of *Micrococcus luteus* bacteria in the diet of common carp fry increase the amount of The values of hematocrit, red blood cells, and hemoglobin, values of MCV and MCH MCHC, neutrophil and monocyte, sodium, lysozyme, and C3 in treatments 1 and 2 were significantly higher than the control treatment. In this regard, treatment 3 had the highest values, but the amounts of calcium, phosphorus, IGM, and C4 in the control treatments, treatments 1 and 2 did not have a statistically significant difference. There was a significant difference between the number of gram-positive and gram-negative bacteria in the digestive tract and water of the rearing tanks compared to the control treatment ($p < 0.05$). Analysis of the results showed the benefits of using *M. luteus* probiotic in the diet of common carp fry in some cases. *M. luteus* is usually not pathogenic for fish. Therefore, the use of this probiotic in common carp farming to increase the ability deal with diseases is recommended.

Keywords: Common carp, *Micrococcus luteus*, Blood indices, Immune indices.



مقاله پژوهشی

اثربخشی باکتری *Micrococcus luteus* بر روی برخی شاخص‌های خونی و ایمنی بچه‌ماهی کپور معمولی

مهران آوخ کیسمی^{۱*}، علیرضا اکبری^۱، حمید عبدالله‌پور بی‌ریا^۲، مریم آوخ کیسمی^۳

۱- بخش تحقیقات شیلات و آبزیان، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

۲- گروه شیلات، واحد تالش، دانشگاه آزاد اسلامی، تالش، ایران

۳- بخش تحقیقات گروه آموزشی علوم تجربی، اداره کل آموزش و پرورش استان گیلان، پردیس آموزشی بنت‌الهدی صدر، رشت، ایران
*مسئول مکاتبات: dr.keysami@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۲۱

DOI: 10.60833/ascij.2025.1206510

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی تأثیر باکتری *Micrococcus luteus* بر شاخص‌های خونی، ایمنی بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مرکز آموزش علوم و صنایع شیلاتی میرزا کوچک خان و مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی شهید انصاری گیلان در خلال ماه‌های اردیبهشت تا مرداد ۱۴۰۲ انجام شد. در این آزمایش *M. luteus* جداسده از دستگاه گوارش ماهی کپور معمولی به غذای تجاری پلت ۳۰۰ قطعه بچه‌ماهی کپور معمولی ($2/87 \pm 2/18$) به مدت ۸ هفته به صورت یک طرح کاملاً تصادفی در ۳ تیمار و ۳ تکرار (۲۰ قطعه ماهی در هر تانک) استفاده شد. با مخلوط کردن غذای ماهی در سوسپانسیون *M. luteus*، نوع جیره با غلظت‌های مختلف *M. luteus* در پلت شامل: 10^6 ، 10^7 سلول در گرم به عنوان تیمارهای ۱، ۲ و شاهد بدون باکتری تهیه شد. بعد از ۵۶ روز غذادهی با سطوح مختلف باکتری *M. luteus* در جیره بچه‌ماهیان کپور معمولی مقادیر هماتوکریت، گلبول قرمز خون و هموگلوبین، مقادیر *MCV* و *MCHC*، نوتروفیل و مونوسیت، سدیم، لیزوزیم و C_3 در تیمار ۱ و ۲ به شکل معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود. در این رابطه تیمار ۱ بیشترین مقادیر را دارا بود. اما مقادیر کلسیم، فسفر، *IGM* و C_4 در تیمار شاهد، تیمار ۲ تفاوت معنی‌دار آماری نداشت. بین تعداد باکتری‌های گرم مثبت و باکتری‌های گرم منفی موجود در دستگاه گوارش و آب تانک‌های پرورش نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0/05$). نتایج حاصل، فواید استفاده از پروبیوتیک *M. luteus* در جیره غذایی بچه‌ماهیان کپور معمولی را در برخی موارد نشان داد. *M. luteus* معمولاً برای ماهی‌های بیماری‌زا نیست. از این رو استفاده از این پروبیوتیک در پرورش ماهی کپور معمولی جهت افزایش توان مقابله با بیماری‌ها قابل پیشنهاد است.

کلمات کلیدی: کپور معمولی، *Micrococcus luteus*، شاخص‌های خونی، شاخص‌های ایمنی.

مقدمه

بیماری‌های ماهی، به ویژه عفونت‌های باکتریایی، مشکل عمده‌ای است که صنعت پرورش ماهی با آن مواجه است که در حال حاضر با افزایش سالانه حدود ۱۲ درصد به سرعت در حال رشد است (۱، ۲). گروه متحرک *Aeromonas*، به ویژه *Aeromonas hydrophila* انواع گسترده‌ای از گونه‌های ماهی‌های

آب شیرین و گاهی اوقات ماهی‌های دریایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳). ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) یک‌گونه مهم برای آبی‌پروری آب شیرین است و بهبود مدیریت پرورش با افزایش مقاومت این گونه در برابر بیماری‌ها چالش بزرگی است که پرورش‌دهندگان ماهی با آن مواجه هستند. پیشگیری و درمان بیماری با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند باعث ظهور میکروارگانیزم‌های مقاوم به دارو شود و بقایای آنتی‌بیوتیک‌ها را در ماهی و محیط به‌جا بگذارد (۴). علاوه بر این، شیمی‌درمانی ممکن است میکرو فلور طبیعی در دستگاه گوارش را که برای ماهی مفید است، مهار کند (۵، ۶، ۷). چندین استراتژی جایگزین برای استفاده از ضد میکروبی‌ها پیشنهاد شده است، مانند استفاده از پروبیوتیک تا به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیکی، پروبیوتیک به‌عنوان میکروارگانیزم‌های زنده شامل بسیاری از مخمرها و باکتری‌ها تعریف می‌شوند که در صورت تجویز به مقدار کافی می‌توانند رشد و سلامت میزبان را افزایش دهند (۸، ۹). افزودن پروبیوتیک باعث کاهش هزینه‌های پرورش کپور معمولی شده است (۴). مخمر *Saccharomyces cerevisiae* و برخی سویه‌های میکروبی به‌عنوان پروبیوتیک در آبی‌پروری استفاده می‌شوند. آنها بیماری‌زا نیستند، غیرسمی‌اند و می‌توانند در روده و احشا بقا داشته باشند و در شرایط انبار کردن به مدت طولانی زنده بمانند. امروزه استفاده از پروبیوتیک‌ها به دلیل بهبود تعادل میکروبی روده، هضم و جذب بهتر مواد غذایی در دستگاه گوارش و بهره‌وری بیشتر از مواد غذایی استفاده‌شده و کاهش هزینه و افزایش درآمد در دام‌پروری‌ها، مرغداری‌ها و مراکز آبی‌پروری رو به افزایش است (۴۹). از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان محرک رشد و جهت تحریک سیستم ایمنی استفاده می‌شود (۶). پروبیوتیک‌ها یا میکروارگانیزم‌های زنده به‌عنوان راه‌حلی مطمئن و

طبیعی برای کنترل اکوسیستم‌های میکروبیولوژیکی محسوب می‌شوند (۱۰). استفاده از باکتری‌ها برای پیشگیری از بیماری‌ها بهترین جایگزین استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر ارپترومایسین و فلورفنیکل هست (۳). هدف همیشگی تولید آبزیان به حداکثر رساندن کارایی و بازده تولید برای حداکثر سوددهی است. جیره غذایی حاوی پروبیوتیک‌ها نه‌تنها مواد مغذی ضروری را تأمین می‌کند، بلکه می‌تواند یکی از بهترین راهکارها برای حفظ سلامت آبزیان پرورشی و افزایش مقاومت آن‌ها به استرس و عوامل بیماری‌زا باشد. همچنین عملکرد پروبیوتیک‌ها در بهبود محیط آبی از طریق کاهش باکتری‌های بیماری‌زا است (۱۱). تحقیقات زیادی در خصوص کاربرد باکتری‌های پروبیوتیک در آبی‌پروری صورت گرفته و برخی از عملکردهای اثبات‌شده در خصوص این باکتری‌ها شامل دفع رقابتی برای سایر باکتری‌ها و همین‌طور بازدارنده‌های پروبیوتیکی برای جلوگیری از کلنی شدن باکتری‌های بیماری‌زا در لوله گوارشی میزبان از طریق ترشح ترکیبات بازدارنده، رشد دیگر باکتری‌ها و یا رقابت برای غذا و مکان و تحریک سیستم ایمنی میزبان در جهت تحمل بهتر محرک‌های محیطی و رشد را می‌توان ذکر کرد (۱۲). افزودن پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی ماهی باعث ایجاد تعادل میکروبی روده، ساختن ترکیبات مفید از جمله ویتامین‌ها و برخی از آنزیم‌ها، تحریک و افزایش کارایی سیستم ایمنی، افزایش فعالیت‌های گوارشی و آنزیمی و به دنبال آن افزایش رشد و توسعه سطوح غذایی می‌شود (۱۳، ۱۴). پارامترهای هماتولوژی شاخص خوبی برای ارزیابی سلامت ماهی هستند. تجویز پروبیوتیک همراه با جیره غذایی می‌تواند موجب بهبود شاخص‌های خونی و ایمنی در ماهی شود (۷، ۱۵، ۱۶). مطالعات محدودی در ارتباط با تأثیر پروبیوتیک‌ها بر شاخص تعداد گلبول سفید خون

انصاری گیلان در خلال ماه‌های اردیبهشت تا مرداد ۱۴۰۲ انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق *M. luteus* جدا شده از دستگاه گوارش ماهی کپور معمولی به غذای تجاری پلت ۳۰۰ قطعه بچه‌ماهی کپور معمولی (۲,۸۷±۲۸,۰۱۸) به مدت ۸ هفته به صورت یک طرح کاملاً تصادفی در ۳ تیمار و ۳ تکرار (۲۰ قطعه ماهی در هر تانک) استفاده شد. غذای تجاری مورد استفاده در این آزمایش از شرکت آتا تهیه گردید. باکتری پروبیوتیک مورد استفاده در این آزمایش از آزمایشگاه مرکز میرزا کوچک خان از محل پروژه تخصصی رشته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی آبزیان که قبلاً بروس‌های بیوشیمیایی و ملکولی شناسایی گردیده بود تهیه شد. این فرآورده میکروبی، *M. luteus* بود و کشت‌های باکتریایی در محیط کشت (TSA) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد و پس از آن تعداد پرگنه‌های تشکیل شده در هر پلت شمارش و تعداد به ازای هر میلی‌لیتر تعیین گردید (۲۷). از هر یک از سوسپانسیون‌های مای تهیه شده با سمپلر برداشته و پس از اضافه نمودن آب مقطر و ۲ غلظت از باکتری تهیه شد (۱۰^۶ و ۱۰^۷ سلول/گرم). ریزپوشانی باکتری‌ها با آلزینات سدیم در شرایط استریل و به روش امولسیون انجام شد (۲۸)، (۲۹). جیره‌های تهیه شده به خوبی با این غلظت‌ها هم زده شده و سپس در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در مدت ۵ ساعت خشک گردید و با ۱۰ درصد رطوبت بر اساس برنامه زمان‌بندی غذایی در اختیار لاروها قرار گرفت (۳۰). جیره بچه ماهیان کپور معمولی در تیمار شاهد با استفاده از فرآیند ذکر شده ساخته شد، ولی به آن‌ها *M. luteus* پروبیوتیکی اضافه نگردید. بچه‌ماهی‌های کپور معمولی به منظور سازگاری با شرایط آزمایش به مدت ۳ روز ۳ وعده

ماهیان انجام شده ولی مشخص شده است که تحریک ایمنی با افزایش سطح آنتی‌بادی‌ها ارتباط دارد (۱۶) چرا که برخی عوامل سلولی از قبیل عملکرد فاگوسیتوزی گلبول‌های سفید و فعالیت لنفوسیت‌ها نقش مهمی را در سیستم ایمنی ماهی‌ها ایفا می‌کند. در این ارتباط گزارشی پیرامون تنظیم ایمنی گلبول‌های سفید انسان توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود است (۱۷). برجسته‌ترین اعضای باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتیریا هستند که معمولاً با محصولات لبنی تخمیر شده مرتبط هستند. سایر باکتری‌های پروبیوتیکی شامل *M. luteus*, *coli*, *Streptococcus*, *Lactococcus lactis*, *Escherichia*, *Bacillus* و *Enterococcus durans* *aerophilus* *Coagulans* می‌باشند (۳، ۱۸). *M. luteus* جدا شده از دستگاه گوارش *Oreochromis niloticus* ظاهراً سالم، برای *O. Niloticus* بی‌خطر بود و اثر آنتاگونیستی علیه باکتری بیماری‌زا *Aeromonas hydrophila* عامل سپتی سمی *Aeromonas* در ماهیان آب شیرین داشت (۱۵). به طور کلی، باکتری *M. luteus* به دلیل ویژگی‌هایی که دارد، به طور متعدد برای تخمیرهای مختلف مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته است و حتی در پیشگیری از رشد باکتری‌های مضر، کمک می‌کند (۱۹، ۲۰، ۲۱). همچنین بسیاری از باکتری‌ها (باسیل‌ها، باکتری‌های اسیدلاکتیک و سودومونادها) به عنوان پروبیوتیک برای حیوانات آبی ارزیابی شده‌اند (۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۶). اما جستجو برای میکروارگانیسم‌های جدیدی که به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار گیرند همچنان در اولویت است. بنابراین، مطالعه حاضر به منظور بررسی تأثیر باکتری *M. luteus* بر شاخص‌های خونی، ایمنی بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مرکز آموزش علوم و صنایع شیلاتی میرزا کوچک خان و مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی شهید

در روز با غذای پلت (کارخانه آتا) غذادهی شده و در شرایط آزمایش نگهداری شدند. طی دوره آزمایش، تلفات به‌طور روزانه شمارش و ثبت می‌شد. کیفیت آب به‌طور روزانه اندازه‌گیری شد. درجه حرارت و pH به‌وسیله یک دستگاه pH متر و درجه حرارت‌سنج YSI اندازه‌گیری گردید. اکسیژن محلول نیز با اکسیژن متر YSI، مدل ۵V (USA) و آمونیاک با استفاده از آمونیاک سنج هانا، (HI ۹۳۷۱۵, Taiwan) اندازه‌گیری گردید. پس از اتمام دوره پرورش ماهیان موجود در هر تیمار شمارش و با استفاده از فرمول زیر درصد بازماندگی هر یک از تیمارها و تکرارها محاسبه شد.

$100 \times \text{تعداد ماهی در ابتدای دوره} / \text{تعداد ماهی در پایان دوره} =$
درصد بقاء ماهی (%)

تعیین تعداد کلنی‌های باکتریایی: به‌منظور بررسی تغییرات در تشکیل کلنی باکتریایی در انتهای دوره نمونه‌برداری انجام شد. ابتدا دو روز قبل از نمونه‌برداری تغذیه ماهیان قطع‌شده و در ادامه از هر تکرار ۳ عدد ماهی به‌طور تصادفی گرفته شد. از هرکدام از آکواریوم‌ها نمونه آب و ۳ عدد ماهی نمونه‌برداری شده و از روده و معده آن‌ها برای کشت و شمارش باکتریایی نمونه‌برداری گردید. شمارش باکتریایی با تهیه رقت‌های سریالی در محلول نرمال سالین (۸/۵ گرم در لیتر نمک طعام) در ۱۰ رقت و سپس در نوترینت آگار TSA پخش گردید. بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت از پرورش کشت باکتریایی در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد پرگنه‌های رشدیافته شمارش و ثبت گردیدند (۱۸). شمارش توسط دستگاه کلنی‌کانت و شناسایی مجدد باکتری جداسازی شده به روش‌های شیمیایی و مولکولی انجام گرفت (۳۰).

سنجش شاخص‌های خون‌شناسی: در پایان دوره، آزمایش، فاکتورهای خون‌شناسی شامل هماتوکریت (Hct)، میزان گلبول‌های سفید (WBC)، میزان

گلبول‌های قرمز (RBC)، مقدار هموگلوبین (Hb)، میانگین حجم یک گلبول قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین یک گلبول قرمز (MCH)، میانگین درصد غلظت هموگلوبین در یک گلبول قرمز (MCHC) و پارامترهای بیوشیمیایی خون شامل سدیم، فسفر و کلسیم در تعداد ۵ عدد ماهی از هر مخزن (صید تصادفی) اندازه‌گیری شد (۳۱). پس از بی‌هوش نمودن ماهی‌ها به‌وسیله پودر گل میخک (۲۵۰ ppm)، خون‌گیری از سیاهرگ وریدی انتهای باله انجام شد. ۰/۵ میلی‌لیتر خون در سرنگ ۲ میلی‌لیتری هپارینه جهت بررسی‌های خون‌شناسی و با استفاده از سرنگ پلاستیکی ۲ میلی‌لیتری فاقد ماده ضدانعقاد، ۱/۵ میلی‌لیتر خون جهت شاخص‌های بیوشیمیایی برداشت و در ظروف اپندورف نگهداری شد. برای جداسازی سرم، نمونه‌های خون به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سرم جداسازی شده تا زمان اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی، در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تعیین هماتوکریت (Hct): از روش میکرو هماتوکریت استفاده شد (۳۲).

تعیین مقدار هموگلوبین (Hb): از روش سیانومت هموگلوبین و دستگاه Sysmexlys استفاده شد (۲۴). جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. درنهایت، مقدار هموگلوبین نمونه‌ی موردنظر با توجه به منحنی استاندارد و بر اساس رابطه‌ی زیر برحسب گرم/دسی-لیتر تعیین گردید.

غلظت استاندارد $\times$ (OD استاندارد/OD نمونه) = $\text{Hb (g dL}^{-1}\text{)}$
شمارش گلبول قرمز (RBC): از هماتوسیتومتر استفاده شد. عدسی میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰ روی مربع ۲۵ تایی تنظیم گردید و گلبول‌های موجود در ۴ مربع کوچک کناری و ۱ مربع کوچک وسطی از ۲۵ مربع کوچک شمارش شد (۳۱).

تعیین شاخص‌های گلبول قرمز: میانگین حجم یک گلبول قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین یک گلبول قرمز (MCH) و میانگین درصد غلظت هموگلوبین در یک گلبول قرمز (MCHC) بر اساس روابط زیر محاسبه شد (۳۱).

[تعداد گلبول‌های قرمز (۱۰۰۰۰۰۰ در میلی‌متر مکعب) / هماتوکریت (درصد)] $\times 10 =$ MCV (فمتولتر)
[تعداد گلبول‌های قرمز (۱۰۰۰۰۰۰ در میلی‌متر مکعب) / هموگلوبین (گرم/دسی‌لیتر)] $\times 10 =$ MCH (پیکوگرم در سلول)
[هماتوکریت (درصد) / هموگلوبین (گرم/دسی‌لیتر)] $\times 100 =$ MCHC (گرم/دسی‌لیتر)

شمارش گلبول سفید (WBC): شمارش تعداد گلبول‌های سفید، با استفاده از پیت حباب‌دار (ملانژور) سفید (مخصوص شمارش گلبول‌های سفید) صورت گرفت.

تعیین درصد افتراقی گلبول‌های سفید: یک قطره از نمونه‌ی خون در یک سانتی‌متری انتهای لام قرار داده شد و لبه‌ی لام دیگر با زاویه‌ی ۳۰ تا ۴۵ درجه بر روی قطره‌ی خون قرار گرفت. وقتی خون در سراسر لبه‌ی لام ۲ (فصل مشترک ۲ لام) انتشار یافت، با ۱ فشار ملایم و با سرعت یکنواخت، لام ۲ در سطح لام ۱ به سمت جلو حرکت داده و یک گسترش شعله مانند ایجاد شد. پس از خشک شدن کامل گسترش خونی در هوای آزمایشگاه، خون‌روی لام توسط الکل متانول خالص تثبیت شد. در پایان با محلول گیمسا رنگ‌آمیزی شد. پس از آن لام‌ها با آب شستشو و در دمای اتاق خشک شد. برای شمارش گلبول‌های سفید از میکروسکوپ نوری با عدسی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون استفاده شد. برای این کار قسمتی از گسترش که دارای الایه‌ی سلولی و رنگ‌آمیزی بهتر بود زیر عدسی قرار گرفت و شمارش به‌صورت مارپیچی تا رسیدن تعداد سلول‌ها به عدد ۲۰۰ انجام شد. سرانجام درصد هر ۱ از گلبول‌های سفید خون محاسبه شد (۳۱، ۳۳).

اندازه‌گیری پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین: مقدار پروتئین کل و آلبومین با واحد گرم/دسی‌لیتر به روش رنگ‌سنجی و با استفاده از کیت زیست‌شیمی (تهران، ایران) و دستگاه اسپکتروفتومتر به ترتیب با طول‌موج ۵۴۶ نانومتر و ۵۸۵ نانومتر موردسنجش قرار گرفت. مقدار گلوبولین با تفریق میزان آلبومین از پروتئین کل برای هر نمونه محاسبه شد (۳۴).

اندازه‌گیری یون‌های سدیم، کلسیم و فسفر: یون سدیم با واحد میلی‌مول بر لیتر به روش شعله سنجی با فلیم فتومتر اندازه‌گیری شد (۵). سنجش مقدار کلسیم برحسب واحد میلی‌گرم/دسی‌لیتر به روش رنگ‌سنجی و با استفاده از کیت مربوطه صورت گرفت و برای اندازه‌گیری میزان جذب نوری از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول‌موج ۵۰۰ نانومتر استفاده خواهد شد. مقدار فسفر با استفاده از کیت مربوطه به روش فتومتریک و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول‌موج ۳۴۰ نانومتر و با واحد mg dl⁻¹ اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری کمپلمان‌های C3 و C4: بر اساس همولیز گلبول‌های قرمز گوسفند (SRBC) و با روش Al-Dohail و همکاران (۲۰۰۹). اندازه‌گیری شد (۵). **IgM:** از روش ایمونوتوربیدیتریکی استفاده شد.

میزان فعالیت لایزوزیم: از روش Clerton و همکاران (۲۰۰۱) استفاده شد. از لایزوزیم استخراج‌شده از سفیده‌ی تخم‌مرغ برای تهیه‌ی منحنی استاندارد استفاده شد. هر واحد از فعالیت لایزوزیم بر اساس کاهش جذب (۰/۰۰۱ در دقیقه) تعیین و نتایج برحسب u ml⁻¹ min⁻¹ محاسبه شد (۳۱).

تجزیه و تحلیل آماری: از نرم‌افزار SPSS 21 و آزمون نرمال بودن الگوی پراکنش داده‌ها و نیز آنالیز واریانس یک‌طرفه (تست توکی)، کروسکال والیس و من ویتنی (بررسی وجود تفاوت بین گروه شاهد و

تیمارها) و آزمون نا پارامتریک مربع کای (بررسی تفاوت درصدها) استفاده شد.

نتایج

نتایج شمارش باکتری در گروه های تیمار و شاهد در شرایط آزمایشگاهی در جداول ۱ و ۲ بیان گردیده است. بر اساس در بررسی های انجام شده در مورد تعداد باکتری های موجود در دستگاه گوارش بچه- ماهیان کپور مشاهده گردید که تعداد کل باکتری ها در همه تیمارها ثابت بوده و تفاوت آنها در تعداد باکتری های گرم مثبت و گرم منفی هست در باکتری های گرم مثبت بیشترین تعداد باکتری ها در تیمارهای ۱ و ۲ مشاهده گردید. کمترین تعداد باکتری های گرم مثبت و بیشترین تعداد باکتری های گرم منفی در تیمار شاهد مشاهده گردید. کمترین تعداد باکتری های گرم منفی در تیمارهای ۱ و ۲ مشاهده گردید. با توجه به آمارها و بررسی های انجام شده افزایش مقدار باکتری *M. luteus* در جیره غذایی بچه- ماهیان کپور معمولی باعث افزایش تعداد باکتری های گرم مثبت در دستگاه گوارش گردید که این امر می تواند باعث افزایش مقاومت ماهی ها در مقابل بیماری ها و افزایش تولید ماهی کپور در مزارع گردد. با بررسی های انجام شده از آب مخازن پرورش بچه- کپور ماهیانی که با جیره های حاوی باکتری *M. luteus* تغذیه شده بودند و گروه شاهد که فاقد باکتری *M. luteus* در جیره غذایی بود مشخص گردید آب مخازنی که بچه ماهیان کپور معمولی با جیره های حاوی این باکتری تغذیه شده بودند و یا جیره آنها فاقد باکتری *M. luteus* بود تعداد باکتری های کل در مخازن تقریباً باهم برابر بود و اختلاف آنها در تعداد

باکتری های گرم منفی و گرم مثبت بود. در مخازنی که در جیره غذایی آنها در صد باکتری *M. luteus* بالاتر بود تعداد باکتری های گرم مثبت بیشتر گردید. تیمار شاهد که جیره غذایی بچه ماهیان کپور آنها فاقد باکتری *M. luteus* بود تعداد باکتری های گرم منفی در آنها به حداکثر رسیده بود. با بررسی های انجام شده به نظر می رسد که افزایش مقدار باکتری *M. luteus* در جیره غذایی باعث افزایش تعداد باکتری های گرم مثبت در آب مخازن پرورش گردید که این غلبه و افزایش تراکم *M. luteus* بود که باعث رشد باکتری های مفید و بهبود شرایط پرورش گردید. در آنالیز آماری نتایج به دست آمده از بررسی متغیرهای فیزیکی و شیمیایی آب بین تیمارها و تکرارها اختلاف معنی دار نبود. متغیرهای فیزیکی و شیمیایی درجه حرارت، اکسیژن محلول، pH و آمونیاک به ترتیب در محدوده ۲۶-۳۰ درجه سانتی گراد، ۷/۳-۸/۷ میلی گرم/لیتر، ۷/۲-۷/۲۷ و ۰/۰۱۱-۰/۰۲ میلی گرم/لیتر به دست آمد. نتایج به دست آمده نرمال بوده و در محدوده کیفیت مناسب پرورش بچه ماهی کپور معمولی بود (۵۱). بین کیفیت آب گروه های تیمار شاهد اختلاف معنی دار مشاهده نگردید و بین کیفیت آب تیمارهای مختلف نیز اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ($p > 0/05$). بررسی فاکتورهای خون شناسی و بیوشیمیایی خون و درصد بقاء بچه- ماهی کپور معمولی تحت تغذیه با تیمار حاوی *M. luteus* و شاهد در مدت ۸ هفته پرورش اختلاف معنی دار آماری در افزایش کیفیت این فاکتورها و درصد بقاء بچه ماهی ها نسبت به شاهد نشان داد (جدول ۳، $p < 0/05$).

جدول ۱- لگاریتم تعداد باکتری‌های شمارش شده از دستگاه گوارش کپور معمولی تغذیه شده با غلظت‌های مختلف *M. luteus* در گروه‌ها
Table 1. Logarithm of bacteria counted from the digestive tract of common carp fed with different concentrations of *M. luteus* bacteria in groups

Variable	Control	Treatment1	Treatment2
Logarithm of total bacterial counted (CFU/g)	7.8 ^a	7.9 ^a	7.9 ^a
Logarithm of Gram-positive bacteria counted (CFU/g)	1 ^a	7.5 ^b	7.5 ^b
Logarithm of Gram-negative bacteria counted (CFU/g)	5.9 ^a	2.01 ^b	2.01 ^b

حروف غیر همسان لاتین در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$), کنترل (تغذیه شده با غلظت صفر سلول *M. luteus* در گرم غذا), تیمار ۱ (تغذیه شده با غلظت 10^6 سلول *M. luteus* در گرم غذا), تیمار ۲ (تغذیه شده با غلظت 10^7 سلول *M. luteus* در گرم غذا)

Non-identical Latin letters in each row indicate significant differences ($p < 0.05$). Control (fed with zero concentration of *M. luteus* cells per gram of food), treatment 1 (fed with a concentration of 10^6 *M. luteus* cells/g of food), treatment 2 (fed with a concentration of 10^7 *M. luteus* cells per gram of food)

جدول ۲- لگاریتم تعداد باکتری‌های شمارش شده از مخزن آب کپور معمولی تغذیه شده با غلظت‌های مختلف *M. luteus* در گروه‌ها
Table 2. Logarithm of bacteria counted from the water tank of common carp fed with different concentrations of *M. luteus* bacteria in groups

Variables	Control	Treatment1	Treatment2
Logarithm of total bacterial counted (CFU/ml)	5.9 ^a	5.9 ^a	5.9 ^a
Logarithm of Gram-positive bacteria counted (CFU/ml)	1 ^a	5.01 ^b	4.09 ^b
Logarithm of Gram-negative bacteria counted (CFU/ml)	5.3 ^a	2.3 ^b	2.3 ^b

جدول ۳- فاکتورهای خون‌شناسی، پارامترهای بیوشیمیایی خون و درصد بقاء بچه‌ماهی کپور معمولی (میانگین $\pm$ انحراف معیار)
Table 3. Hematological factors, blood biochemical parameters and survival rate of common carp fry (Mean $\pm$ SD)

Variables	Control	Treatment1	Treatment2
RBC (Number in microliters $\times 10^6$)	15016 $\pm$ 6251 ^b	16071 $\pm$ 6052 ^a	15423 $\pm$ 3516 ^b
WBC (Number in microliters $\times 10^3$)	521 $\pm$ 156 ^b	732 $\pm$ 251 ^a	731 $\pm$ 225 ^a
Hb(g/dl)	7.6 $\pm$ 0.2 ^b	8.6 $\pm$ 0.1 ^a	8 $\pm$ 0.1 ^b
Hct(%)	35.2 $\pm$ 0.77 ^b	39.4 $\pm$ 0.5 ^a	37.1 $\pm$ 0.92 ^a
MCV(fl)	267 $\pm$ 3.2 ^b	273 $\pm$ 0.9 ^a	269 $\pm$ 0.5 ^b
MCH(pg)	51 $\pm$ 0.5 ^b	55 $\pm$ 0.1 ^a	54.4 $\pm$ 0.5 ^b
MCHC(g/dl; %)	20.4 $\pm$ 0.1 ^a	20.5 $\pm$ 0.1 ^a	20.4 $\pm$ 0.1 ^a
Neutrophil(%)	18 $\pm$ 0.9 ^b	24.8 $\pm$ 0.9 ^a	24.8 $\pm$ 1.2 ^a
lymphocyte(%)	71 $\pm$ 0.6 ^b	78.6 $\pm$ 0.5 ^a	78.4 $\pm$ 0.5 ^a
Monocyte(%)	3.4 $\pm$ 0.5 ^b	4 $\pm$ 0.0 ^a	4.1 $\pm$ 0.5 ^a
Na (mg/dl)	134 $\pm$ 0.38 ^b	140 $\pm$ 1.2 ^a	136 $\pm$ 1.7 ^b
C3(mg/dl)	12.4 $\pm$ 0.5 ^b	15.4 $\pm$ 0.5 ^a	15.8 $\pm$ 1 ^a
C4(mg/dl)	8 $\pm$ 0.0 ^b	12 $\pm$ 0.0 ^a	12.08 $\pm$ 1 ^a
Lysozyme(u/ml/min)	13.6 $\pm$ 1 ^b	16.6 $\pm$ 1.2 ^a	16.4 $\pm$ 1 ^a
Ca(mg/dl)	11 $\pm$ 0.0 ^b	12 $\pm$ 1 ^a	12 $\pm$ 0.5 ^a
P (mg/dl)	13.6 $\pm$ 1 ^b	15 $\pm$ 0.5 ^a	15 $\pm$ 0.0 ^a
IGM(mg/dl)	19.6 $\pm$ 0.5 ^b	23 $\pm$ 1.3 ^a	24 $\pm$ 1.8 ^a
Survival percentage (%)	85.3 $\pm$ 0.17 ^b	97.5 $\pm$ 1.19 ^a	83.3 $\pm$ 0.97 ^b

حروف غیر همسان لاتین در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$). هماتوکریت (Hct), میزان گلبول‌های سفید (WBC), میزان گلبول‌های قرمز (RBC), مقدار هموگلوبین (Hb), میانگین حجم یک گلبول قرمز (MCV), میانگین هموگلوبین یک گلبول قرمز (MCH), میانگین درصد غلظت هموگلوبین در یک گلبول قرمز (MCHC)

Non-identical Latin letters in each row indicate significant differences ($p < 0.05$). Hematocrit (Hct), White Blood Cell Count (WBC), Red Blood Cell Count (RBC), Hemoglobin (Hb), Mean Red Blood Cell Volume (MCV), Mean Cell Hemoglobin (MCH), Mean Cell Hemoglobin Concentration percentage (MCHC)

بحث

نتایج ۵۶ روز غذادهی با غذای حاوی *M. luteus* تأثیر معنی‌داری بر تعداد زیادی از فاکتورهای خون‌شناسی بچه‌ماهی کپور معمولی داشت. *M. luteus* در تجزیه مواد آلی در سیستم های آبی نقش دارد که ممکن است به چرخه مواد مغذی کمک کند. این می‌تواند کیفیت آب را افزایش داده و محیط سالم تری را برای کپور معمولی ایجاد کند. گونه‌های خاصی از میکروکوکوس می‌توانند مواد محرک رشد تولید کنند یا باکتری‌های بیماری‌زا را مهار کنند و به طور بالقوه برای ماهی‌ها در اکوسیستم آنها مفید باشند. *M. luteus* معمولاً برای ماهی بیماری‌زا نیست و براینکه این خواص در کاهش استرس آبی‌زی پرورشی موثر است (۹، ۳۲). *M. luteus* انواع مختلفی از پروتئاز و سایر انواع آنزیم‌ها را تولید می‌کند که می‌تواند انواع مواد آلی و مواد غذایی را تجزیه نموده و به مواد مغذی قابل‌جذب تبدیل کند. از طرف دیگر *M. luteus* با تولید مواد آنت باکتریال و رقابت در جذب املاح غذایی و حتی با ازدیاد و تجمع باکتری‌های پاتوژن در دستگاه گوارش لارو جلوگیری می‌کند (۳۵). در این تحقیق جیره با سطح ۱۰^۶ سلول در گرم غذا به‌طور معنی‌داری از سایر سطوح *M. luteus* در تیمارها و شاهد اثربخش‌تر بود. اثربخشی پروبیوتیک در سطح ۱۰^۶ توسط مطالعات متعددی تأیید گردید (۳۶، ۳۷، ۳۸). تأثیر کمتر در سطح بالاتر *M. luteus* در تیمار ۲، قبلاً در تحقیق Panigrahi و همکاران (۲۰۰۴) تأیید گردیده بود (۳۹) که در آن اثربخشی پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس، وقتی که غلظت باکتری بالاتر رفت کاهش پیدا کرد. در اینکه چرا غلظت پائین تر باکتری اثربخشی بالاتری نشان داد شاید تأثیر کمتر در غلظت بالاتر به جنبه‌های محیط زیستی آبی‌زی مربوط باشد، زیرا افزایش غلظت باکتری در آب استرس‌زا بوده و میزان تغذیه لارو را کاهش می‌دهد. این مطالعه نشان

داد که غلظت پروبیوتیک به‌منظور جلوگیری از مصرف میزان بالا و در نتیجه کاهش اثربخشی و افزایش هزینه تولید باید به‌خوبی و با دقت بکار برود (۳۰). نتایج شمارش باکتری‌ها در لاشه بچه‌ماهی‌های کپور معمولی و آب مخازن پرورش اختلاف معنی‌داری را بین باکتری‌های تیمارها و شاهد نشان داد ($p < 0.05$). تراکم باکتری‌های گرم منفی در گروه شاهد از گروه‌های تیمار بالاتر بود، این شاید بدین دلیل باشد که *M. luteus* به مقدار زیادی مواد آنت باکتریال و ترکیبات آنتی‌بیوتیکی در محیط پرورش خود رهاسازی می‌کند (۱۸، ۳۲، ۴۰). *M. luteus* تولید آنتی‌بیوتیک‌هایی می‌کند که می‌تواند طیف وسیعی از باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی را از بین ببرد (۳۲). همچنین *M. luteus* تولید بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های معمول همچون باکتریوسین می‌کند (۴۱). بنابراین به نظر می‌رسد که باکتری‌های گرم منفی در تیمارها به‌وسیله باکتری‌های *M. luteus* کشته‌شده و با *M. luteus* جایگزین شده باشد (۴۲). افزایش تراکم *M. luteus* در لاشه بچه‌ماهی‌ها و آب مخازن پرورش تیمار در این تحقیق می‌تواند نشان‌دهنده تجمع و جاگیری *M. luteus* در بدن بچه‌ماهی‌ها و آب مخازن باشد. به نظر می‌رسد باکتری‌هایی که بتوانند در دستگاه گوارش بچه‌ماهی‌ها غالب شوند و تجمع یابند شاید گزینه خوبی برای حذف باکتری‌های بیماری‌زا از دستگاه گوارش آبی‌زی و شروع فعالیت پروبیوتیکی باشند (۳۶، ۴۲، ۴۳). نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌های این تحقیق نشان داد که استفاده از پروبیوتیک *M. luteus* تأثیر معنی‌داری بر تعداد زیادی از فاکتورهای خونی و ایمنی بچه‌ماهی کپور معمولی داشت. در مطالعه حاضر گروه‌های تیمار تغذیه‌شده با پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار در تعداد گلبول قرمز خون، هموگلوبین و همتوکریت

نسبت به گروه شاهد یافته است که با بررسی اثر *Carnobacterium* بر پارامترهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، Khattab و همکاران (۲۰۰۶)، بررسی اثر پروبیوتیک *Micrococcus luteus* و *Psuedomonas* بر پارامترهای خونی ماهی تیلاپیا *Oreochromis niloticus* شباهت دارد (۲۱). Ferguson و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که کاهش معنی‌داری در حجم هماتوکریت در ماهیان تغذیه‌شده با پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* مشاهده می‌شود ولی در مورد تعداد گلبول قرمز و حجم هموگلوبین، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (۲۵). افزایش تعداد گلبول قرمز و در نتیجه کاهش اندازه آن، نشان‌دهنده کاهش مسیر انتشار اکسیژن به بافت‌هاست، به عبارت دیگر، با افزایش غلظت گلبول قرمز، قابلیت جذب بیشتر اکسیژن از آب‌شش و انتشار اکسیژن در بافت‌ها بالاتر می‌رود (۴۴). میزان کمتر هموگلوبین و به تبع آن کاهش ظرفیت حمل اکسیژن، ممکن است منجر به کاهش سطح اکسیژن خون در ماهیان گروه شاهد، شده که به تبع آن، ماهیانی که تنها از جیره پایه بدون افزودن پروبیوتیک تغذیه می‌شدند، ممکن است توانایی محدودتری در تأمین اکسیژن در شرایط غیر بهینه که نیاز به اکسیژن افزایش می‌یابد از جمله دمای بالا، تراکم بستر و غیره (داشته باشند) میزان فعالیت ماهی، تغییرات فصلی، دمای آب، درجه شوری، آلودگی آب، سن و تغذیه ماهی بر غلظت هموگلوبین خون مؤثرند (۴۵). گروه‌های تغذیه‌شده با پروبیوتیک مقدار گلبول قرمز و هموگلوبین بالاتری نسبت به گروه شاهد داشتند و تقریباً تمامی اکسیژن خون به وسیله هموگلوبین گلبول‌های قرمز انتقال می‌یابد. هموگلوبین ۹۵ درصد از کل پروتئین داخل سلولی گلبول قرمز را شامل می‌شود. از این رو شباهت الگوی تغییرات میزان گلبول‌های قرمز و هموگلوبین خون توجیه‌پذیر است. تلقیح باکتری‌های اسیدلاکتیک موجب افزایش لنفوسیت‌ها می‌شود که آثار مفید این عمل منجر به افزایش مقاومت آبی در برابر بیماری‌ها است (۴۶). دیواره سلولی گلیکوپپتیدی باسیلوس‌ها ممکن است از طریق فعال‌سازی لنفوسیت‌ها به افزایش پاسخ ایمنی موجود آبی منجر شود (۴۷). تحریک سلولی (افزایش لنفوسیت‌ها، گلبول سفید و کل تعداد ماکروفاژها و افزایش بیگانه‌خواری) بیش‌تر از ایمنی همورال دارای اهمیت است (۱۶). همچنین ماکروفاژهای تیمار پروبیوتیکی نسبت به گروه شاهد توانایی بیش‌تری برای بیگانه‌خواری دارند (۱۵). افزودن پروبیوتیک به خوراک آبیان موجب کاهش تعداد گلبول‌های قرمز می‌شود کاهش تعداد گلبول‌های قرمز و هماتوکریت تیلاپای آلوده‌شده به پاتوژن *Mycobacterium marinum* می‌تواند به گسترش هیپوکرومیک و آنمی میکروسیتیک منجر شود (۱۷). بر اساس نتایج این تحقیق، استفاده از پروبیوتیک *M. luteus* تأثیر معنی‌داری بر افزایش مقادیر هموگلوبین خون بچه‌ماهیان کپور معمولی داشت. در تحقیق، Al-Dohail و همکاران (۲۰۰۹) بر روی گربه‌ماهی آفریقایی نیز این نتیجه حاصل شد (۵). افزایش سطح فاکتورهای خون‌شناسی موردسنجش در این آزمایش می‌تواند به عنوان شاخصی جهت بهبود سیستم ایمنی ماهی کپور معمولی به دنبال تغذیه با جیره حاوی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس باشد (۴۸). کامپلمنت‌ها از اصلی‌ترین اجزای پاسخ همورال هستند که در بروز خطر در سیستم ایمنی نقشی مهم دارند. لایزوزیم یک آنزیم کاتیونی است که توانایی تجزیه انواع باکتری‌های گرم مثبت را دارد. همچنین نقشی مهم در ترکیب با کامپلمنت برخی باکتری‌های گرم منفی دارد (۴۹). بر اساس نتایج تحقیق Abd El-Rhman و همکاران (۲۰۰۹) از انواع عملکردهای پروبیوتیک‌ها، تحریک پاسخ ایمنی خونی و سلولی است (۱). نتایج حاصل از بررسی فعالیت آلترناتیو

در تحقیق حاضر موجب افزایش یون سدیم و در نهایت به‌عنوان محرک ایمنی و افزایش درصد بقاء عمل می‌کند. عملکرد پروبیوتیک‌ها در بهبود محیط آبی از طریق کاهش باکتری‌های بیماری‌زا است (۵۱). اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها در آبزیان پرورشی، با دیدگاه متفاوتی نظیر بهینه‌سازی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی محیط پرورشی آن‌ها، پیشگیری از ابتلا و مبارزه با عوامل بیماری‌زا و همچنین ارتقاء پارامترهای خونی و ایمنی و در نتیجه درصد بقاء آبزیان پرورشی در تحقیقات بی‌شماری توسط محققین شیلاتی تأیید شده است (۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵، ۴۲).

نتیجه‌گیری

جیره غذایی حاوی پروبیوتیک‌ها نه تنها مواد مغذی ضروری را تأمین می‌کند، بلکه می‌تواند یکی از بهترین راهکارها برای حفظ سلامت آبزیان پرورشی و افزایش مقاومت آن‌ها به استرس و عوامل بیماری‌زا باشد. باکتری *Micrococcus luteus* می‌تواند به‌عنوان پروبیوتیک در بچه‌ماهی کپور معمولی بکار رود. می‌توان این باکتری‌ها را با غلظت 10^6 سلول در گرم غذا، به غذای بچه‌ماهی کپور معمولی وارد نموده و فاکتورهای خونی و ایمنی در نتیجه عملکرد رشد و درصد بقاء بچه‌ماهی کپور معمولی را بهبود بخشید.

منابع

1. Abd El-Rhman AM, Khattab YA, Shalaby AM. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Shellfish Immunol. 2009; 27(2):175-180.
2. Garibaldi L. The FAO global capture production database: a six-decade effort to catch the trend. Mar. Policy. 2012; 36(3):760-768.
3. Aubin J, Gatesoupe FJ, Labbé L, Lebrun L. Trial of probiotics to prevent the

کمپلمان C3 و C4 نشان داد که میزان C3 در گروه تغذیه‌شده با پروبیوتیک *M. luteus* بیشترین مقدار را داشت درحالی‌که در گروه شاهد و تیمار ۲ مقادیر کمتر بود. این نتیجه بیانگر تأثیر نسبی و مثبت پروبیوتیک *M. luteus* بر فعالیت کامپلنت‌های همورال کپور معمولی است. همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده تأثیر مثبت پروبیوتیک مورد استفاده بر افزایش مقادیر لایوزیم همورال بود. درعین حال مقدار این متغیر در تیمار تغذیه‌شده با پروبیوتیک *M. luteus* به شکل معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد و تغذیه‌شده با تیمار ۲ بود. لایوزیم در گلبول‌های سفید تولید می‌شود و کم‌تر تولید شدن این عامل دفاعی در تیمار مورد تغذیه با جیره شاهد می‌تواند به دلیل تأثیر تحریکی این پروبیوتیک بر سیستم ایمنی بچه‌ماهیان کپور معمولی باشد (۱). مقادیر IgM (شاخص ارزیابی واکنش ایمنی‌شناختی خون) در گروه تیمار ۱ و ۲ بیشتر از گروه شاهد بود. درعین حال که تفاوت مشاهده‌شده معنی‌دار نبود، اما ایمونوژن با توجه به این‌که باکتری‌های پروبیوتیکی تولید آنتی‌بادی را در بدن تحریک می‌کنند، بنابراین افزایش سطح IgM در تیمارهای پروبیوتیکی قابل‌انتظار است (۹، ۲۵). لذا استفاده پروبیوتیک موردبررسی در تحقیق حاضر با تحریک سیستم ایمنی بدن، مقاومت در برابر بیماری‌ها را افزایش می‌دهد (۲۷). نتایج نشان داد که در تیمار ۲ (با استفاده از *M. luteus* با غلظت بیشتر)، عامل سدیم خون به شکل معنی‌داری بیشتر از تیمار ۱ و شاهد است. همسویی با یافته‌های این تحقیق، نتایج ارائه‌شده توسط Taati و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که پری بیوتیک مانان الیگوساکارید به‌عنوان محرک ایمنی و رشد، دارای اثرات قابل توجهی در افزایش اسمولاریته و Ca^{2+} ، K^{+} ، Na^{+} و Mg^{2+} در سرم خون فیل‌ماهیان جوان تغذیه‌شده با این پری‌بیوتیک می‌باشند (۵۰). لذا استفاده از پروبیوتیک موردبررسی

- cholerae and other beneficial properties. J. Food Sci. Technol. 2014; 51:3072-3082.
13. Kim DH, Austin B. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. Fish Shellfish Immunol. 2006 Nov 1; 21(5):513-524.
 14. Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol Mol Biol Rev. 2000; 64(4):655-671.
 15. Brunt J, Austin B. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 2005; 28(12):693-701.
 16. Irianto A, Austin B. Probiotics in aquaculture. J. Fish Dis. 2002; 25(11):633-642.
 17. Oyetayo VO, Oyetayo FL. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. Afr. J. Biotechnol. 2005; 4(2):123-127.
 18. Hoseinifar SH, Roosta Z, Hajimoradloo A, Vakili F. The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). Fish Shellfish Immunol. 2015; 42(2):533-538.
 19. Aly SM, Ahmed YA, Ghareeb AA, Mohamed MF. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish Shellfish Immunol. 2008; 25(1-2):128-136.
 20. Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquac. J. 2008; 274(1):1-4.
 21. Khattab YA, Shalaby AM, Abdel-Rhman A. Use of probiotic bacteria as growth promoters, anti-bacterial and their effects on physiological parameters of vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquac. Res. 2005; 36(8):758-767.
 4. Yahav D, Franceschini E, Koppel F, Turjeman A, Babich T, Bitterman R, Neuberger A, Ghanem-Zoubi N, Santoro A, Eliakim-Raz N, Pertzov B. Seven versus 14 days of antibiotic therapy for uncomplicated gram-negative bacteremia: a noninferiority randomized controlled trial. Clin. Infect. Dis. 2019; 69(7):1091-1098.
 5. Al-Dohail MA, Hashim R, Aliyu-Paiko M. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. Aquac. Res. 2009; 40(14):1642-1652.
 6. Ali A. Probiotics in fish farming. Evaluation of a bacterial mixture. Rapport-Sveriges Lantbruksuniversitet, Vattenbruksinstitutionen (Sweden). 2000.
 7. Ali FH. "Probiotics feed supplement" to improve quality of broiler chicken carcasses. WJDFS. 2010; 5(1): 93-99
 8. Anderson DP, Roberson BS, Dixon OW. Plaque-forming cells and humoral antibody in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) induced by immersion in a *Yersinia ruckeri* O-antigen preparation. J. Fish. Res. Board Can. 1979; 36(6):636-9.
 9. Balcázar JL, De Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D, Múzquiz JL. The role of probiotics in aquaculture. Vet. Microbiol. 2006; 114(3-4):173-186.
 10. Weston DP. Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture. 1996: 140-165.
 11. Vine NG, Leukes WD, Kaiser H. Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiol. Rev. 2006; 30(3):404-427.
 12. VidyaLaxme B, Rovetto A, Grau R, Agrawal R. Synergistic effects of probiotic *Leuconostoc mesenteroides* and *Bacillus subtilis* in malted ragi (*Eleusine corocana*) food for antagonistic activity against V.

- challenges for industrial applications. Eur. Food Res. Technol. 2010;231(1):1-2.
30. Keysami MA, Mohammadpour M, Saad CR. Probiotic activity of *Bacillus subtilis* in juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) at different methods of administration to the feed. Aquac. Int. 2012 Jun; 20:499-511.
 31. Blaxhall PC, Daisley KW. Routine haematological methods for use with fish blood. J. Fish Biol. 1973;5(6):771-781.
 32. Nwachukwu U, George-Okafor U, Ozoani U, Ojiagu N. Assessment of probiotic potentials of *Lactobacillus plantarum* CS and *Micrococcus luteus* CS from fermented milled corn-soybean waste-meal. Sci. Afr. 2019;6:e00183.
 33. Carnevali O, de Vivo L, Sulpizio R, Gioacchini G, Olivotto I, Silvi S, Cresci A. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. Aquac. J. 2006; 258(1-4):430-438.
 34. Lee JS, Cheng H, Damte D, Lee SJ, Kim JC, Rhee MH, Suh JW, Park SC. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus pentosus* PL11 on the growth performance, immune and antioxidant systems of Japanese eel *Anguilla japonica* challenged with *Edwardsiella tarda*. Fish Shellfish Immunol. 2013; 34(3):756-761.
 35. Wang YB. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquac. J. 2007; 269(1-4):259-264.
 36. Keysami MA, Shalmani AZ, Mojdehi MA. Effectiveness of *Bacillus subtilis* on growth and survival of common carp larva in non-earthen ponds. Anim. Environ. J. 2021;13(3):261-268 [In Persian].
 37. Reid G, Sanders ME, Gaskins HR, Gibson GR, Mercenier A, Rastall R, Roberfroid M, Rowland I, Cherbut C, Klaenhammer TR. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. J Clin Gastroenterol. 2003;37(2):105-118.
 - Oreochromis niloticus. In Proceedings of international symposium on Nile Tilapia in Aquac. J. 2005;7:156-165.
 22. Brunt J, Newaj-Fyzul A, Austin B. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 2007;30(10):573-579.
 23. Dimitroglou A, Merrifield DL, Moate R, Davies SJ, Spring P, Sweetman J, Bradley G. Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Anim. Sci. 2009; 87(10):3226-3234.
 24. Drabkin DI. Crystallographic and optical properties of human hemoglobin. A proposal for the standarization of hemoglobin. Am. J. Med. 1945;209:268-270.
 25. Ferguson RM, Merrifield DL, Harper GM, Rawling MD, Mustafa S, Picchiatti S, Balcàzar JL, Davies SJ. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). J. Appl. Microbiol. 2010;109(3):851-862.
 26. Hoseinifar SH, Khalili M, Rostami HK, Esteban MÁ. Dietary galactooligosaccharide affects intestinal microbiota, stress resistance, and performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. Fish Shellfish Immunol. 2013; 35(5):1416-1420.
 27. Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, Menasaveta P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquac. J. 2000; 191(4):271-288.
 28. Mortazavian A, Razavi SH, Ehsani MR, Sohrabvandi S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. Iran. J. Biotechnol. 2007; 5(1):1-18.
 29. Rokka S, Rantamäki P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation:

- auratus) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Exp. Biol. 1974 Oct 1; 61(2):455-461.
46. McLoughlin IJ, Voss AL, Hale JD, Jain R. Cosmetic efficacy of the topical probiotic *Micrococcus luteus* Q24 in healthy human adults. Cosmet. 2024; 11(4):122.
47. Vázquez JA, González M, Murado MA. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. Aquac. J. 2005; 245(1-4):149-161.
48. Talas ZS, Gulhan MF. Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 2009; 72(7):1994-1998.
49. Sun YZ, Yang HL, Ma RL, Lin WY. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. Fish Shellfish Immunol. 2010; 29(5):803-809.
50. Taati R, Soltani M, Bahmani M, Zamini AA. Growth performance, carcass composition, and immunophysiological indices in juvenile great sturgeon (*Huso huso*) fed on commercial prebiotic, Immunoster. Iran J Fish Sci. 2011;10(2):324-335.
51. Jöborn A, Olsson JC, Westerdahl A, Conway PL, Kjelleberg S. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. J. Fish Dis. 1997; 20(5):383-392.
38. Tookmehchi A, Shamsi H, Meshkini S, Delshad R, Ghasemi Moghanjoei A. Dietary administration of vitamin C and *Lactobacillus rhamnosus* in combination enhanced the growth and innate immune response of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. ISFJ. 2012; 21(3):13-22.
39. Panigrahi A, Kiron V, Kobayashi T, Puangkaew J, Satoh S, Sugita H. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. Vet. Immunol. Immunopathol. 2004; 102(4):379-388.
40. Keysami MA, Mohammadpour M. Effect of *Bacillus subtilis* on *Aeromonas hydrophila* infection resistance in juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquac Int. 2013; 21:553-562.
41. Sugita H, Miyajima C, Deguchi Y. The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. Aquac. J. 1991; 92:267-276.
42. Moriarty DJ. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. Microbiology in poecilotherms. 1990:217-222.
43. Mazurkiewicz J, Przybył A, Sip A, Grajek W. Effect of *Carnobacterium divergens* and *Enterococcus hirae* as probiotic bacteria in feed for common carp, *Cyprinus carpio* L. Fish Aquat Sci. 2007; 15(2):79-92.
45. Houston AH, Cyr D. Thermoacclimatory variation in the haemoglobin systems of goldfish (*Carassius*

*Research Article***Induction of Apoptosis in Ovarian Cancer Cell Lines By *Galium verum* Extract****Fatemeh Keshvari¹, Somayeh Arabzadeh¹, Masoomeh Hasanbarani¹, Fatemeh Akbarian¹, Shadi Hajrasouliha^{2*}**

1- Department of Biology, Faculty of Basic Science, Ale Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran

2- Herbal Pharmacology Research Center, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author: Sh.Hajrasouliha@iautmu.ac.ir

Received: 5 January 2025

Accepted: 20 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1195633

Abstract

Ovarian cancer has the highest mortality rate among cancers due to its asymptomatic course, late diagnosis, and recurrence. The first treatment approach for ovarian cancer is chemotherapy. However, due to many side effects, the response is transient and accompanied by relapse. Therefore, developing new treatment approaches for this disease is very important. Previous studies showed that milk cheese plant extract has anti-cancer properties and reduces cell proliferation. This study investigated the effect of *Galium Verum* leaf extract on proliferation behavior and induction of apoptosis in A2780 cancer cells in laboratory conditions. Cells were grown and multiplied in laboratory conditions. Then they were treated with concentrations (6.2-12.5-25-50-100 mM) of milk cheese plant extract for 24, 48, and 72 hours. The percentage of cell viability was evaluated by the MTT method. Changes in the expression levels of SORT1 and BIM genes in treatment and control conditions were evaluated by quantitative Real-Time PCR technique. Our results showed that the concentration of 25 mM of the extract caused a 50% decrease in the survival of the ovarian cancer cell line A2780 cells. At the same time, it did not significantly change the survival percentage of the fibroblast cells. Also, treatment with plant extract caused a twofold increase in the expression of the BIM apoptosis gene in cancer cells compared to control cells. The expression of the SORT1 gene in cancer cells treated with plant extract increased by 4 times compared to the control state. Therefore, from the observed results, we can understand the possible role of milk cheese plant extract in controlling the growth of ovarian cancer cells and inducing apoptosis in them.

Keywords: Ovarian cancer, Apoptoiss, *Galium verum*, BIM, SORT1.

مقاله پژوهشی

القای آپتوز در دودمان سلولی سرطان تخمدان توسط عصاره گیاه شیرپنیر (*Galium verum*)فاطمه کشوری^۱، سمیه عرب‌زاده^۱، معصومه حسن بارانی^۱، فاطمه اکبریان^۱، شادی حاج‌رسولیا^{۳*}

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، موسسه آموزش عالی غیرانتفاعی آل طه، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: Sh.Hajrasouliha@iautmu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۶

DOI: 10.60833/ascij.2025.1195633

چکیده

سرطان تخمدان به دلیل سیر بدون علامت، تشخیص دیر هنگام و عود، بالاترین میزان مرگ و میر را در بین سرطان‌ها دارد. اولین رویکرد درمانی برای سرطان تخمدان، شیمی‌درمانی می‌باشد. اما به علت عوارض جانبی زیاد، پاسخ به آن گذرا و برگشت‌پذیر می‌باشد. بنابراین توسعه‌ی رویکردهای درمانی جدید برای این بیماری بسیار اهمیت دارد. مطالعات قبلی نشان دادند که عصاره گیاه شیرپنیر خواص ضدسرطانی و کاهش‌دهنده تکثیر سلول‌ها را دارد. در این مطالعه تأثیر عصاره برگ گیاه شیرپنیر *Galium verum* بر رفتار تکثیری و القای آپتوز در سلول‌های سرطان تخمدان رده‌ی A2780 بررسی شد. سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی رشد و تکثیر داده شدند. سپس با غلظت‌های ۶/۲، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار از عصاره گیاه شیرپنیر به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. درصد زنده‌مانی سلول‌ها توسط روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات میزان بیان ژن‌های BIM و SORT1 در شرایط تیمار و کنترل توسط تکنیک کمی Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ما نشان داد، غلظت ۲۵ mM از عصاره موجب کاهش ۵۰ درصدی زنده‌مانی سلول‌های رده سلولی سرطان تخمدان A2780 شد، درحالی‌که بر درصد زنده‌مانی سلول‌های فیروبلاست تغییر معناداری ایجاد نکرد. همچنین عصاره گیاه شیرپنیر موجب افزایش دوبرابری بیان ژن آپتوزی BIM در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های کنترل شد. بیان ژن SORT1 در سلول‌های سرطانی تحت تیمار با عصاره گیاهی به میزان چهار برابر نسبت به حالت کنترل افزایش یافت. بنابراین از نتایج مشاهده شده می‌توان به نقش احتمالی عصاره گیاه شیرپنیر در کنترل رشد سلول‌های سرطان تخمدان و القای آپتوز در آنها پی برد.

کلمات کلیدی: سرطان تخمدان، گیاه شیرپنیر، آپتوز، *Galium verum*، BIM، SORT1.

مقدمه

علائم خاص و تشخیص دیر هنگام، ازجمله کشنده‌ترین نوع سرطان‌های زنان محسوب می‌شود و معمولاً در ۷۰ درصد موارد زمانی که بیماری به مراحل پیشرفته رسیده است، تشخیص داده شده و عمدتاً غیرقابل درمان می‌باشد. بنابراین، شناسایی عوامل ایجاد کننده بیماری و نشانه‌های اولیه سرطان تخمدان برای تشخیص

سرطان تخمدان در میان زنان ایرانی هشتمین سرطان شایع است؛ میزان بقای پنج ساله بیماران مبتلا به سرطان تخمدان در ایران ۳/۶ درصد می‌باشد (۱). خطر بروز سرطان تخمدان در زندگی خانم‌ها حدود ۵/۱ درصد و خطر مرگ به دلیل سرطان تخمدان تقریباً یک درصد گزارش شده است (۲). سرطان تخمدان به دلیل نداشتن

به‌موقع و مدیریت درمان این بیماری ضروری است (۳). تخمدان دارای سه بخش قشر بیرونی، مدولای مرکزی و شبکه‌ی تخمدانی است. بیرونی‌ترین بخش قشری، تونیکا آلبوژینا نام دارد که با یک لایه اپی‌تلیوم مکعبی پوشیده می‌شود. این لایه، اپی‌تلیوم سطحی تخمدان یا مزوتلیوم تخمدان نامیده می‌شود. تقریباً ۹۰ درصد سرطان‌های تخمدان را سرطان اپی‌تلیال تخمدان تشکیل می‌دهند که هتروژن بوده و رده‌بندی آنها براساس نوع سلول درگیر شامل نوع سروزی، موسینوسی و اندومتريال می‌باشد (۲). هر یک از این تومورها به نوبه‌ی خود به سه گروه خوش‌خیم، بینابینی و بدخیم تقسیم می‌شوند. تومورهای موسینوس و اندومتريال معمولاً کارسینومای بدخیم و مهاجم هستند. اما تومورهای سروزی معمولاً مهاجم نیستند (۴). مصرف قرص‌های پیشگیری از بارداری، بستن لوله‌ها، داشتن سابقه خانوادگی در سرطان تخمدان و سینه، عوامل هورمونی، داشتن سابقه آندومتريوز احتمال ابتلا به سرطان تخمدان را افزایش می‌دهند (۵). آزمایش‌های بالینی نشان می‌دهند که شیمی‌درمانی نقش مهمی در درمان سرطان تخمدان داشته و علاوه بر مهار رشد سلول‌ها قادر به از بین بردن سلول‌های سرطانی هم می‌باشند. محققان دریافته‌اند که استفاده مداوم از داروهای شیمی‌درمانی دارای معایب خاصی از جمله سمیت و مقاومت دارویی است. متأسفانه این معایب مهم‌ترین عواملی هستند که باعث عدم موفقیت شیمی‌درمانی و عود مجدد تومور می‌شود (۵). بنابراین، یافتن داروهای جدید برای درمان سرطان تخمدان که دارای سمیت کمتر و ایمنی و اثرگذاری بیشتر باشند از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. از این‌رو، به‌کارگیری ترکیبات مؤثر فرآورده‌های گیاهی همچون گیاهان دارویی برای نیل به اهداف فوق، امروزه به‌عنوان یک استراتژی جدید برای مقابله با سرطان مطرح‌گردیده تا اثرات جانبی درمان، هزینه کمتری بدن‌بال داشته باشد. در دو دهه اخیر توجه

محققان به داروهای گیاهی به عنوان عوامل ضدتوموری و ضدسرطانی بیشتر شده است. امروزه داروهای گیاهی به عنوان یک شیوه درمانی مکمل یا جایگزین برای معالجه سرطان کاربرد دارند. هدف از تجویز این نوع داروها حفظ سلامت بدن و تنظیم عملکرد دستگاه‌ها می‌باشد (۶). *Galium verum* یک گونه علفی چندساله از خانواده روبیاسه است که بیشتر در اروپا و آسیا، نواحی معتدل و شمال آفریقا پراکنده شده است. ارتفاع گیاه بین ۳۰ تا ۱۸۰۰ متر از سطح دریا در زیستگاه‌های مختلف از جمله علفزارهای شنی خشک، فضای خالی سنگ‌ها، کنار جاده‌ها، تپه‌های شنی و سواحل دریا رشد می‌کند. گیاه شیرپنیر درهم تنیده یا درهم پیچیده می‌باشد (روی یک ساقه، چند ساقه با هم تنیده)، و ساقه‌هایی به ارتفاع ۶۰ تا ۱۲۰ سانتی‌متر دارد که در تماس با خاک اغلب ریشه ایجاد می‌کنند. برگ‌های خطی سوزنی شکل، به رنگ سبز تیره براق، با حاشیه‌های برجسته و چرخشی، در حلقه‌های هشت تا دوازده‌تایی درون خوشه‌های متراکم تجمع یافته‌اند. از خرداد تا شهریور شکوفا می‌شود و گل‌های زرد معطر تولید می‌کند (۷). با توجه به درمان‌های جایگزین سرطان در صنعت گیاه پزشکی رویکرد خوبی برای مطالعه در این زمینه وجود دارد، قسمت‌های هوایی بریده و خشک شده گیاه شیرپنیر برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (۸). آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، یکی از راهکارهای اصلی است که بدن، سلول‌های ناخواسته را حذف می‌کند. سیستم ایمنی بدن برای از بین بردن سلول‌های سرطانی از آپوپتوز استفاده می‌کند. مسیر پیام‌رسانی آپوپتوز شامل مولکول‌های مختلفی است از جمله فاکتور Bim که یک ژن میتوکندریایی با ماهیت نوکلئوتیدی است و جزء خانواده BCL-2 از مهم‌ترین ژن‌های مسیر داخلی آپوپتوز می‌باشد (۹). BCL-2 یک پروتئین غشایی است که در غشای خارجی میتوکندری

گیاه شیر پنیر *Galium verum* بر رفتار تکثیری و القای آپتوز در سلول‌های سرطان تخمدان رده A2780 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی: گیاه شیر پنیر (*Galium verum*) از روستای قودجان (شهرستان خوانسار) جمع‌آوری گردید. سپس در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آل طه مورد شناسایی قرار گرفت و با کد هرباریومی ۰۰۱ ثبت گردید.

تهیه عصاره گیاهی: نمونه مورد نظر پس از خشک شدن توسط آسیاب خرد گردید. سپس عصاره‌گیری به روش ماسراسیون (خیساندن) انجام شد. برای تهیه عصاره الکلی ۱۰ گرم از پودر خشک شده گیاه را در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۷۰ درصد حل کرده، به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق روی شیکر مگنتی آلفا (HB850) ساخت ایران قرار گرفت، سپس توسط کاغذ صافی واتمن صاف شد.

تیمار سلول‌ها توسط عصاره گیاهی: رده سلولی (A2780) سرطان تخمدان از انستیتو پاستور تهران خریداری شد. پس از دفریز کردن سلول‌ها درون فلاسک کشت داده شد. برای کشت سلول‌ها از محیط کشت حاوی FBS ۱۰ درصد، آنتی‌بیوتیک ۱ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد استفاده شد. ۴۸ ساعت پس از کشت سلول‌ها و رسیدن به تراکم ۷۰ درصد، تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مخفف عصاره گیاهی (۶/۲ - ۱۲/۵ - ۲۵ - ۵۰-۱۰۰ میکرومولار) انجام شد. پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت درصد زنده‌مانی سلول‌ها با روش MTT بررسی شد تا بهینه غلظت جهت تیمارهای بعدی بدست آید.

اندازه‌گیری درصد زنده‌مانی سلول‌ها با روش MTT: به منظور بررسی اثر سمیت عصاره گیاه شیر پنیر بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و فیروبلاستی و تعیین

قرار داشته و دارای نوزده عضو است. این خانواده چهار موتیف (BH4-BH3-BH2-BH1) حفاظت شده دارد که با توجه به فعالیت و ساختار به سه دسته تقسیم شده‌اند: پروتئین‌های آپتوزی (Bad·Bim·Bik)، پروتئین‌های ضدآپتوزی (Bcl، XL-Bcl) و پروتئین‌های پروآپتوزی (BCL-2-like protein 11). پروتئین BCL-2 در گروه پروتئین‌های ضد آپتوزی قرار دارد که اغلب در سلول‌های بدخیم بیان می‌شود (۱۰). فاکتور BIM پروتئینی است که در انسان توسط ژن BCL2L11 تولید می‌شود و به عنوان یک فاکتور آپتوزی عمل می‌کند. این پروتئین یکی از مناطق هومولوگ اعضای خانواده BCL-2 را به نام BH3 دارد. این دومین آغازگر ضروری مرگ سلولی یا آپتوز است (۱۱). ژن SORT1 (به عنوان گیرنده NTR3 نیز شناخته می‌شود)، رمزگذار Sortilin3/NTR است که در انسان، دارای ۲۲ اگزون است و روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۱ قرار دارد. لیگاندهای متفاوتی از جمله فاکتور رشد عصب (proNGF)، لیپوپروتئین لیپاز (LPL)، پرتئین مرتبط با گیرنده (RAP)، نوروتنسن ۳ (NT3) و تیروگلوبولین به این گیرنده متصل می‌شوند. بسته به نوع لیگاند، SORT1 عملکردهای متفاوتی نشان می‌دهد (۱۲، ۱۳). بیان ژن SORT1 اغلب در تیروئید، قلب، مغز، ماهیچه‌های اسکلتی، نخاع، جفت و بیضه‌ها مشاهده می‌شود، در حالی که در بافت تخمدان یافت نمی‌شود (۱۲). افزایش بیان چهار برابری در کارسینمای تخمدان برخلاف تخمدان سالم گزارش شده است (۱۴). مسیر سانی ژن Sortilin3 نقش مشخصی در مسیر آپتوز ناشی از نوروتروفین در شرایط پاتولوژیک، همچنین در مراحل خاص تکوین و پیری عصبی دارد. ژن Sort1 یکی از انکوژن‌های کاندید در کارسینمای سلول کبدی گزارش شده است، به‌طوری‌که کاهش بیان آن منجر به کاهش سرعت پیشرفت سرطان می‌گردد (۱۵). هدف از این مطالعه تأثیر عصاره برگ

پرایمرها ارائه شده است (جدول ۱). RNA کل، از سلول‌ها توسط محلول RNX-plus (SinaClon; RN7713C) استخراج شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت پارس توس (A101161) استخراج و براساس پروتکل شرکت انجام شد. در نهایت با استفاده از کیت و دستگاه PCR (Lab cycler) Sens&uest به تعداد ۳۵ سیکل بیان کمی ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. از ژن β -actin به عنوان ژن رفرنس استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: توصیف کمی داده‌ها با استفاده از شاخص‌های پراکندگی مرکزی از قبیل میانگین و انحراف استاندارد انجام شد. از آزمون Sample-KS جهت بررسی توزیع نرمال داده‌ها استفاده شد. همچنین برای بررسی معنی داری متغیرها بین گروه‌ها از روش آنالیز واریانس یکطرفه و در صورت مشاهده تفاوت از تست‌های تعقیبی توکی در آزمون ANOVA استفاده شد. سطح معنی داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. کلیه آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 23 انجام شد.

IC50 از تکنیک MTT استفاده شد. در این روش، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت غلظت-های مختلف عصاره ($6/2 - 12/5 - 25 - 50 - 100$ میکرومولار) به هر چاهک اضافه شد. سپس، نمونه‌ها در دوره‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. در نهایت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه خواننده الیزا اندازه‌گیری شد و میزان IC50 پس از رسم منحنی با به کارگیری غلظت-های مختلف عصاره و درصد زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\% \text{Cytotoxicity} = 1 - \left[\frac{(\text{OD extract treated} - \text{OD blank})}{(\text{OD control} - \text{OD blank})} \right] \times 100$$

روش Real-Time PCR: به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر، توسط نرم‌افزار Gene-Runner پرایمرهای اختصاصی هر ژن طراحی و سپس از شرکت سینا کلون خریداری گشت. در جدول زیر توالی

جدول ۱- توالی پرایمرهای ژن‌های BCL2، SORT1 و β -actin

Gene	Forward primer	Reverse primer
BCL2	5'-CTCCCTGCTGTCTCGATCCT-3'	5'-TCTCCAATACGCCGCAACTC5-3'
SORT1	5'-TGAGAACTCTGGAAGGTGGTG-3'	5'-TGAGTGAGAGGATGAAAAGGGAG-3'
β -ACTIN	5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3'	5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'

نتایج

اثر عصاره گیاه شیرپنیر بر رشد سلول‌های سرطان تخمدان انسانی: پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطان تخمدانی در شرایط تیمار با غلظت ۲۵ میکرومولار نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.00$). همچنین تیمار با غلظت ۲۵ میکرومولار عصاره گیاهی نسبت به غلظت‌های ۱۲/۵ و ۶/۲ میکرومولار نیز تفاوت معناداری را در درصد زنده‌مانی سلول‌ها نشان داد ($p < 0.001$). درصد زنده‌مانی سلول‌ها در شرایط تیمار

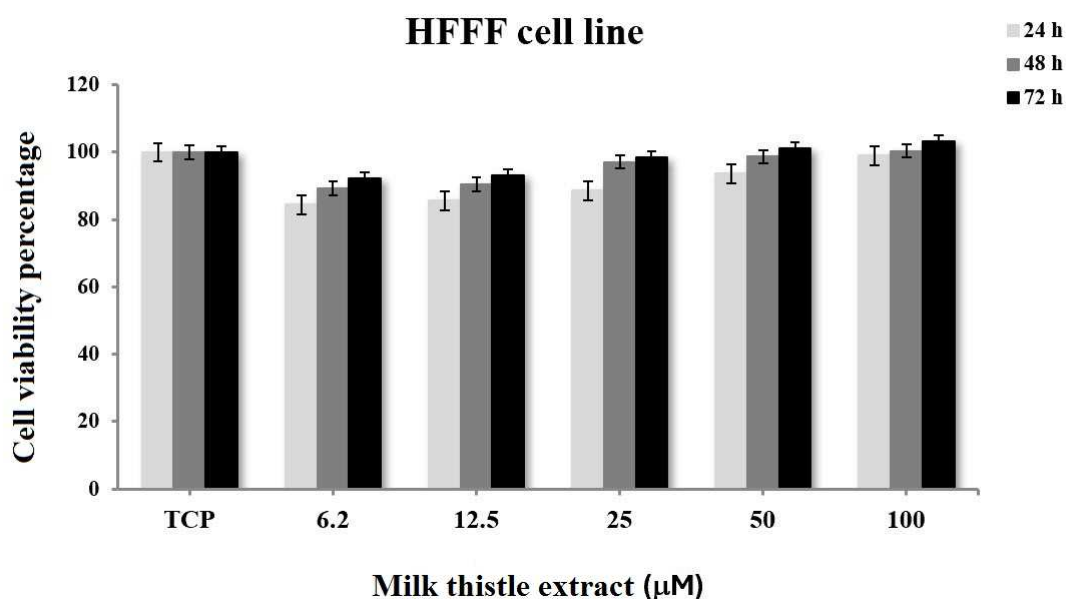
اثر عصاره گیاه شیرپنیر بر رشد سلول‌های نرمال فیروپلاست انسانی: پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار سلول‌های نرمال HFFF با غلظت‌های مختلف عصاره، تفاوت معنی داری در میانگین درصد سلول‌های مرده بین زمان‌های مختلف تیمار با عصاره گیاهی مشاهده نشد. همچنین تفاوت معنی داری در میزان زنده‌مانی سلول‌ها بین غلظت‌های مختلف تیمار با عصاره گیاهی (۶/۲، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) نیز مشاهده نشد (شکل ۱).

معناداری در میزان بیان ژن BIM ایجاد نکرد. در حالی که در دودمان سلولی سرطان تخمدان انسانی A2780، این عصاره گیاهی موجب افزایش دو برابری در میزان بیان ژن BIM شد که این افزایش از لحاظ آماری معنادار بود ($p < 0/05$) (شکل ۳).

اثر عصاره گیاه شیرپنیر بر بیان ژن *SORT1*: عصاره سیتروولوس به تنهایی منجر به کاهش معنی‌دار ۸ برابری در بیان ژن *SORT1* در سلول‌های نرمال HFF شد ($p < 0/05$). در حالی که این عصاره گیاهی سبب افزایش دو برابری بیان ژن *SORT1* در سلول‌های سرطان تخمدان شد ($p < 0/05$) (شکل ۴).

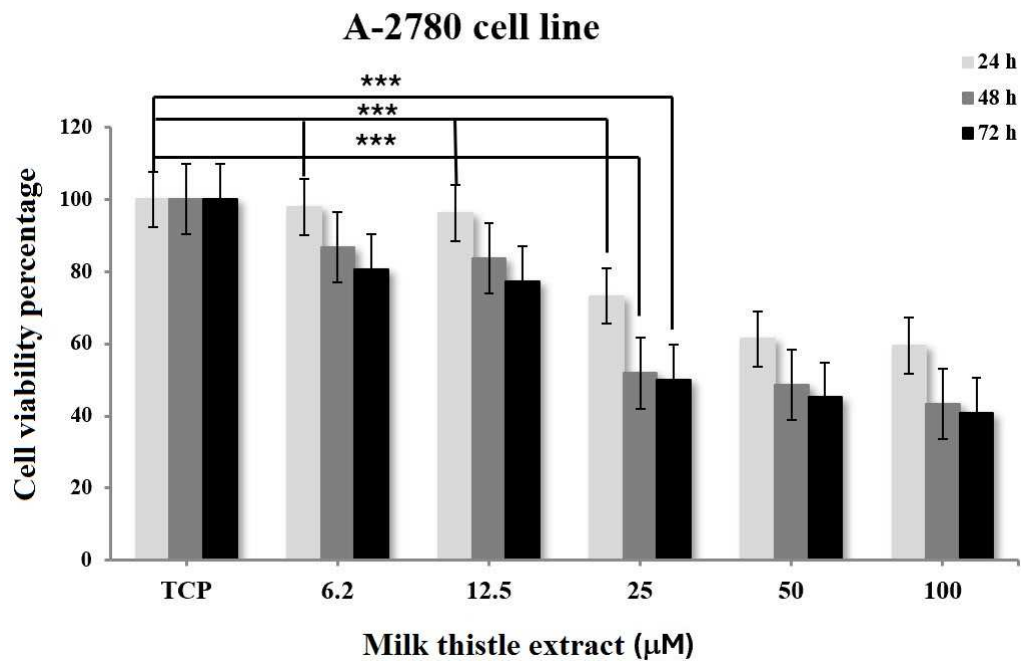
با غلظت ۲۵ میکرومولار عصاره گیاهی بین گروه ۲۴ ساعت و دو گروه دیگر (۴۸ و ۷۲ ساعت) نیز متفاوت بود. این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0/05$). درحالی‌که بین دو گروه ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معناداری در میزان زنده‌مانی سلول‌ها مشاهده نشد. سایر غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نیز نتایجی مانند غلظت ۲۵ میکرومولار نشان دادند (شکل ۲). بنابراین کمترین غلظت موثر عصاره گیاهی (۲۵ میکرومولار) که ۵۰ درصد سلول‌ها را از بین می‌برد برای ادامه پژوهش انتخاب شد.

اثر عصاره گیاه شیرپنیر بر بیان ژن *BIM* تیمار سلول‌های نرمال HFFF با عصاره گیاه شیرپنیر تغییر



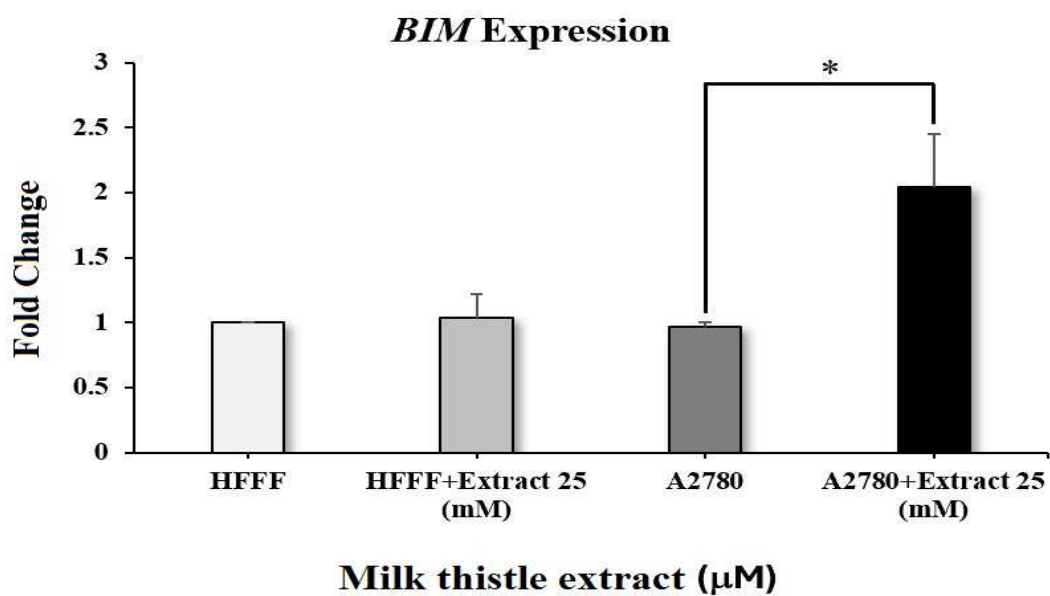
شکل ۱- اثر عصاره گیاه شیرپنیر بر رشد سلول‌های نرمال فیبروبلاست انسانی

Fig 1. Effect of milk thistle plant extract on the growth of normal human fibroblast cells



شکل ۲- اثر عصاره گیاه شیرپنیر بر رشد سلول‌های سرطان تخمدان انسانی

Fig 2. Effect of milk thistle plant extract on the growth of human ovarian cancer cells



شکل ۳- اثر عصاره گیاه شیرپنیر بر بیان ژن BIM

Figure 3- Effect of milk thistle plant extract on BIM gene expression



شکل ۴- اثر عصاره گیاه شیرپنیر بر بیان ژن *SORT1*
 Fig 4. Effect of milk thistle plant extract on *SORT1* gene expression

بحث

فارماکولوژیک و توسعه‌ی دارو کاربرد دارند (۱۷). گیاه *Galium verum* (شیرپنیر) یک گیاه چند ساله علفی از خانواده روبیاسه، بومی اروپا و آسیا است که عمدتاً منشأ آن قاره آسیاست، جایی که طب سنتی بیشتر در فرهنگ آن گنجانده شده است. با توجه به درمان‌های جایگزین سرطان در صنعت گیاه پزشکی رویکرد خوبی برای مطالعه در این زمینه وجود دارد، قسمت‌های هوایی بریده و خشک شده گیاه شیرپنیر برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (۸). بررسی نتایج این مطالعه نشان داد، عصاره گیاه شیرپنیر با غلظت ۲۵ میلی‌مولار موجب کاهش ۵۰ درصدی زنده‌مانی دردهمان سلول‌های سرطان تخمدان انسانی شد. همچنین بیان ژن آپتوزی BIM را در این سلول‌ها تا دو برابر نسبت به سلول‌های کنترل افزایش داد. میزان بیان ژن *SORT1* نیز پس از تیمار با عصاره گیاه شیرپنیر تا ۴ برابر گروه کنترل افزایش یافت. در این راستا امینی فارسانی و همکاران در سال ۱۳۹۵ نشان دادند،

سرطان تخمدان سومین بدخیمی شایع زنان در سراسر جهان است. با اینحال، به دلیل سیر بدون علامت، تشخیص دیر هنگام، بالاترین میزان مرگ و میر را در بین سرطان‌ها دارد (۱۶). هنگامی که سرطان تخمدان تشخیص داده می‌شود، معمولاً با آسیت بدخیم و متاستاز داخل صفاقی همراه است (۱۷). شایع‌ترین نوع سرطان تخمدان، سرطان تخمدان اپیتلیال است. از آنجایی که این تومورهای سرطانی به سرعت تکثیر می‌شوند و اندام‌های احشایی را درگیر می‌کنند و فقط به طور موقت به شیمی درمانی حساس هستند، این بیماری یک بیماری کشنده با نرخ درمان حدود ۳۰ درصد می‌باشد (۱۸). اولین رویکرد درمانی برای درمان سرطان تخمدان، شیمی درمانی می‌باشد، اما به علت عوارض جانبی زیاد، پاسخ به این درمان گذرا و با بازگشت همراه است. امروزه توجه زیادی به استفاده از گیاهان دارویی شده است. گیاهان دارویی نه تنها به عنوان عوامل درمانی، بلکه برای تحقیقات

والپروئیک اسید سبب کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطان تخمدان رده A2780 می‌شود (۱۹). دکتر نیایی و همکارانش در سال ۱۴۰۰ بر روی تأثیر اسانس گیاه رزماری بر بیان ژن آپوپتوتیک BIM در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان کار کردند و گزارش کردند کمترین میزان بقای سلول‌ها (۱۹ درصد) پس از ۷۲ ساعت تیمار مشاهده شد و با افزایش غلظت اسانس، مرگ سلولی نیز افزایش یافت (۲۰). آتماکا و همکاران در آپریل ۲۰۱۶ بر روی اثرات عصاره گالیوم آپارین بر زنده ماندن سلولی، چرخه سلولی و مرگ سلولی در رده‌های سلولی سرطان پستان مطالعاتی انجام دادند و نتیجه گرفتند گونه‌های گالیوم به طور سنتی به دلیل اثرات ضدسرطانی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد میکروبی و محافظت از قلب در طب عامیانه استفاده می‌شود. گالیوم آپارین (GA) یک گیاه معمولی بالارونده است که در آناتولی رشد می‌کند (۲۱). امینی و همکاران نشان دادند، عصاره الکلی برگ گیاه به لیمو درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی A2780 را کاهش می‌دهند و اثراتی بر مهار متاستاز سلول‌های سرطانی از طریق بازیابی بیان E-Cadherin دارد (۲۲). جوانی و همکاران در سال ۲۰۲۲ اثرات ضدسرطانی سم مار را بر سلول‌های سرطانی HeLa در مقایسه با داروی شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین نشان دادند (۲۳). نیک فرجام و همکاران در سال ۱۴۰۰ به بررسی اثر سمیت عصاره متانولی آرتیمیسیا (*Artemisia absinthium*) بر سلول سرطان تخمدان انسانی و تغییرات سطح بیان ژن‌های آپوپتوزی پرداختند و نتیجه گرفتند، استفاده از عصاره متانولی باعث افزایش سطح بیان ژن‌های آپوپتوزی در سلول‌های سرطانی تحت تیمار می‌شود (۲۴). منفرد و همکاران در سال ۱۴۰۱ بر روی عصاره گیاه اسپند توسط نانو ذرات به بررسی سمیت و القاء آپوپتوز سلول‌های سرطانی رده A2780 پرداختند. تغییرات بیان ژن کاسپاز-۳ در سلول‌های تیمار شده با

نانوکیتوسان بارگذاری شده توسط دود گیاه اسپند نشان داد که بیان این ژن در نمونه‌های تحت تیمار به صورت وابسته به غلظت افزایش می‌یابد (۲۵). چینگ دینگ و همکاران در ژولای ۲۰۱۵ بر روی سنجش مقاومت ماده شیمیایی ۸-برومو-۷-متوکسی کریزین توسط بیان ژن‌های Akt/FOXO3a در حساسیت به سیس پلاتین در سلول‌های سرطان تخمدان کار کردند و متوجه شدند که سلول‌های تخمدان از طریق تنظیم بیان ژن‌های آپوپتوزی با رونویسی ژن Bim باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان تخمدان حساس به سیس پلاتین می‌شوند (۲۶). نتایج حاصله از این مقاله بیان ژن آپوپتوزی و مهار رشد سلول‌های سرطانی نتایج مطالعه پیشرو را تایید کرده و نشان داد عوارض ناشی از داروهای شیمیایی می‌تواند با داروهای گیاهی مهار شود تا اثرات بهتری را در بهبود بیماران سرطانی شاهد باشیم. جینگ یوآن و همکاران در ژوئن ۲۰۲۰ حساسیت شیمیایی سلول‌های سرطان تخمدان و بیان ژن Bcl-2 را بررسی کردند و پیش‌بینی کردند و بیان داشتند، بیان ژن‌های آپوپتوزی در سرطان تخمدان پتانسیل بالایی در تحقیقات پزشکی دارا می‌باشد (۲۷). رومن فلورنت و همکاران در سال ۲۰۲۰ اثرات نفتوپیدیل بر سرطان تخمدان را ارزیابی کردند و نشان دادند که نفتوپیدیل رشد سلولی و بیان پروتئین‌های Bim را افزایش می‌دهد. بیان ژن Bim، سلول سرطان تخمدان را به BH3 حساس می‌کند (۲۸). آلدو تاوا و همکاران بر روی شناسایی اجزای فرار *Galium verum* L مطالعاتی را انجام دادند و نشان دادند که اسانس برگ‌های شیرینیر دارای مقدار زیادی ۲-متیل بنزالدئید می‌باشد. این ماده ترکیبی است که به طور طبیعی در سایر گیاهان معطر نیز وجود دارد (۲۹). با روش کروماتوگرافی ۷ ماده موثره جدید نیز در این گیاه مشاهده شده است. ایروانی و همکاران در اکتبر ۲۰۲۱ بر روی اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های الکلی

Biebersteinia multifida در تیمار سلول‌های سرطان تخمدان A2780 مطالعه کردند و اثرات آپوپتوزی و نکروزه آن را گزارش کردند. همچنین نتایج آن‌ها اثرات ضد سرطانی عصاره متانولی ریشه این گیاه را تایید کرد (۳۰). دنيسا سمنسکو و همکاران در سال ۲۰۲۳ بر روی غربالگری فیتوشیمیایی اتانول و فازهای اتیل استات *Galium verum* مطالعاتی انجام دادند و مشاهده کردند، مشخصات بیولوژیکی گیاه شیر پنیر و اثر اتانول و اتیل استات با خواص آنتی اکسیدان، اثرات ضد میکروبی و ضد توموری خود، در بهبود سرطان پوست انسان تاثیر گذار بوده است (۳۱). پیل رین لانت و همکاران در سال ۲۰۲۳ ماده موثره و فعالیت آنتی اکسیدانی تمام گونه‌های گالیوم را مورد ارزیابی قرار دادند و نتیجه گرفتند، در عصاره شکوفه‌های *Galium verum* مقایسه با عصاره گالیوم استونیایی، قسمت هوایی گیاه بیشترین میزان آسپروولوزید دیده می‌شود. همچنین عصاره هیدروآتانولی گالیوم/استونیایی سرشار از پلی فنولیک‌ها به ویژه اسیدکلروژنیک و روتین است که این یک مزیت برای کاربردهای زیستی محسوب می‌شود (۳۲). با توجه به تحقیقات انجام شده فعالیت آنتی اکسیدانی و آپوپتوزی در سلول‌های سرطانی با بیان ژن Bim به اثبات رسیده است. نتایج مطالعات موکان و همکارانش نشان داد که عصاره انواع گالیوم حاوی بالاترین خاصیت فنلی هستند. محتویات فلاونوئیدی عصاره *G. purpureum* و فعال‌ترین عصاره از نظر ظرفیت آنتی اکسیدانی، عصاره *G. verum* قوی‌ترین اثر بازدارندگی در برابر تیروزیناز را ایفا می‌کند. نتایج حاصله نشان داد که عصاره های گالیم پتانسیل استفاده به عنوان منبع جایگزین عوامل چند منظوره را دارند (۳۳). مطالعات کروماتوگرافی بر روی خواص عصاره، نشان داد، مواد موثره (سیکلو هیتاسیلوکسان، پنتاسیلوکسان، N-بنزن N-اتیل، بنزوکینولین، تراسیلوکسان، متیل ایزوتیازولو، ۱،۲ - بیس (تری متیل

سیلیل) بنزن، متیل تریس (تری متیل سیلوکسی) سیلان، اسید آرسنوس، اسید سیلیسیک، ۱- دی اتیل) می‌تواند اثر آنتی اکسیدانی مورد نظر را روی سلول‌های سرطانی داشته باشد (۳۴). میونا وولتیک و همکاران در سال ۲۰۲۲ به ارزیابی خواص شفابخش گالیوم وروم مبتنی بر ژل خوراکی در استوماتیت آفتی در موش صحرایی پرداختند. نتایج آن‌ها نشان دادند، ژل خوراکی چسبنده بر پایه عصاره اتانولی این گیاه موجب کاهش قابل توجهی در اندازه زخم از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش محتوای کلاژن در بافت زخم می‌شود (۳۵). مطالعات دیگری گزارش کردند که عصاره *G. verum* بر عملکرد انقباض قلب و همچنین تنظیم ریتم قلبی اثر مثبتی دارد. علاوه بر این، عصاره شیرپنیر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را تعدیل می‌کند و تولید پرواکسیدان‌ها را کاهش می‌دهد (۳۶). اسلان ترک و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی مکانیسم عمل عصاره متانولی *G. verum* بر روی سلول‌های فیبروبلاست انسان کارکردند و نتیجه گرفتند ترکیباتی مانند فلاونوئیدها دارای فعالیت‌های زیستی هستند. با افزایش تکثیر سلول‌های فیبروبلاست انسان، به نظر می‌رسد که فلاونوئیدهای این عصاره می‌توانند ROS داخل سلولی را افزایش دهند (۳۷). سالیوان و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی اثرات آپوپتوزی عصاره برگ به لیمو بر روی سلول‌های سرطان تخمدان A2780 پرداختند و مشاهده کردند که عصاره برگ به لیمو قادر به القای آپوپتوز در شرایط تنش‌های محیطی، فقدان اکسیژن یا مواد مغذی، PH پایین، گونه‌های فعال اکسیژن، بصورت واسطه‌های پاسخ التهابی می‌باشد (۳۸). در مطالعه ما نیز فعالیت آپوپتوزی با افزایش بیان ژن BIM اثبات شد. پاشاپور و همکاران در سال ۲۰۲۲ بر روی اثر عصاره متانولی کامل شیرپنیر بر رده سلولی فیبروبلاست AGO کار کردند و نتیجه گرفتند، در بیان ژن BCL2 در سلول‌های فیبروبلاست کاهش نسبی وجود دارد و

یا مکانیسم‌های بیوشیمیایی متفاوتی صورت گرفته باشد. بنابراین عصاره گیاه شیرپنیر می‌تواند به عنوان یک داروی گیاهی برای درمان و کنترل سرطان در نظر گرفته شود.

منابع

1. Rezaianzadeh A, Mokhtari AM, Hassanipour S, Maharlouei N. The age-standardized incidence rate of ovarian cancer in Iranian women: A systematic review and meta-analysis. *Middle East J Cancer*. 2018;9(3):171-178.
2. Jonathan S. Berek and Novak's Gynecology. 16th, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2019.
3. Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health*. 2019;11:287-99.
4. Seidman JD, Cho KR, Ronnett BM, Kurman RJ. Surface epithelial tumors of the ovary. In: Blaustein's pathology of the female genital tract. Springer, Boston, MA; 2011.
5. Rasmussen CB, Kjaer SK, Albieri V, Bandera EV, Doherty JA, Høgdall E, et al. Pelvic inflammatory disease and the risk of ovarian cancer and borderline ovarian tumors: A pooled analysis of 13 case-control studies. *Am J Epidemiol*. 2017;185(1):8-20.
6. Sarkhosh A, Zamani Z, Fatahi R, Gardiner SE. Genetic diversity of Iranian soft-seed pomegranate genotypes as revealed by fluorescent-AFLP markers. *Physiol Mol Biol Plants*. 2011;17(3):305-311.
7. Lorenzoni FC, Giorato M, Marcer G. Phenological and aerobiological monitoring of allergenic flora in Padua (Italy). Preliminary data. *Aerobiologia*. 1998; 14:285-289.
8. Schmidt M, Polednik C, Roller J, Hagen R. *Galium verum* aqueous extract strongly inhibits the motility of head and neck cancer

در گروه تیمار شده با عصاره، بیان ژن BAX افزایش می‌یابد. علاوه بر این، میانگین نسبت بیان ژن BAX به BCL2LX افزایش می‌یابد (۳۹). اشمیت و همکاران نشان دادند عصاره آبی گیاه شیرپنیر موجب کاهش مهاجرت سلولی در رده سلول‌های سرطانی HLaC78 شدند (۸). همچنین یانگ‌شن و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی مقاومت الکتروئید پاکلیاکسل در شیمی درمانی بر روی رده سلولی سرطان تخمدان A2780 مطالعاتی را انجام دادند. نتایج آنها نشان داد به تدریج با افزایش غلظت الکتروئید به روش وابسته به غلظت و زمان، تکثیر سلول‌های A2780 مهار شد (۳۱). همچنین ما در این مطالعه در ماده موثره گیاه شیرپنیر، سیکلومتیکون (مخلوط) و سیلوکسان‌های حلقوی با طول زنجیره خاص (۴-۷n) را مشاهده کردیم. با توجه به اینکه تاثیرگذاری عصاره گیاه شیرپنیر بر روی سلول‌های سرطانی به اثبات رسیده و بر اساس علم روز که در شیمی درمانی برای سرطان تخمدان معمولاً داروهایی که تجویز می‌شود، دارای ترکیبات پلاتین، مانند پاکلیاکسل یا دوساکسل می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت که ماده موثره این گیاه دارای یکی از این ترکیبات سیس پلاتین یا کربوپلاتین و تاکسان‌ها می‌باشد (۴۰). با توجه به اثرگذاری بر روی لایه اپیتلیومی پوست این اثر بر روی سرطان‌هایی که منشا اپیتلیومی دارند دیده شده و به لحاظ کم کردن عوارض مواد شیمیایی داروی بهتری برای درمان سرطان می‌باشد. در سایر مطالعات نیز به اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه شیرپنیر اشاره شده است (۴۱، ۴۲).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که عصاره هیدروالکلی برگ گیاه شیر پنیر بر کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی و القای آپتوز موثر واقع شده است. ممکن است این فرآیند از طریق مسیرهای مولکولی و

17. Sari U, Zaman F. Effects of rosmarinic acid and doxorubicine on an ovarian adenocarcinoma cell line (OVCAR3) via the EGFR pathway. *Acta Cir Bras.* 2024; 39:e390524.
18. Ahn HR, Kim S, Baek GO, Yoon MG, Kang M, Ng JT, et al. Effect of Sortilin1 on promoting angiogenesis and systemic metastasis in hepatocellular carcinoma via the Notch signaling pathway and CD133. *Cell Death Dis.* 2024;15:634.
19. Semenescu AD, Moacă EA, Iftode A, Dehelean CA, Tchiakpe-Antal DS, Vlase L, et al. Recent updates regarding the antiproliferative activity of *Galium verum* extracts on A375 human malignant melanoma cell line. *Life (Basel).* 2024; 14(1):112.
20. Shakhseeniaie M, Nikoonahad Lotfabadi N, Haghirossadat F. Effect of rosemary essential oil on the expression of BCL-XL, an anti-apoptotic gene, in MCF-7 cell line breast cancer. *Daneshvar Med.* 2019;27(4): 45-52. [In Persian]
21. Atmaca H, Bozkurt E, Cittan M, Dilek Tepe H. Effects of *Galium aparine* extract on the cell viability, cell cycle, and cell death in breast cancer cell lines. *J Ethnopharmacol.* 2016;186:305-310.
22. Amini E, Nabiuni M, Baharara J, Behzad SB, Seyfi D, Salek F. Investigating the anticancer effect of *Lippia citriodora* leaf alcoholic extract: in suppression of A2780 ovarian cancer cell metastasis via restoration of E-cadherin expression. *Cell Tissue J.* 2019;10(1):24-33. [In Persian]
23. Javani Jouni F, Zafari J, Shams E, Abdolmaleki P, Rastegari A. Evaluation of anti-cancer effects of caspian viper (*Naja naja oxiana*) venom in comparison with doxorubicin in HeLa cancer cell line and normal HFF fibroblast. *J Ilam Univ Med Sci.* 2022;29(6):20-27. [In Persian]
24. Khang nikfarjam S, Baharara J, Nejad shahrokhaby K. Cytotoxic Effects of Artemisia Absinthium Extract on A2780 Cell Line (Ovarian Cancer) And Alteration cell lines and protects mucosal keratinocytes against toxic DNA damage. *Oncol Rep.* 2014;32(3):1296-1302.
9. Mohsin MA, Morris SJ, Smith H, Sweet C. Correlation between levels of apoptosis, levels of infection, and haemagglutinin receptor binding interaction of various subtypes of influenza virus: does the viral neuraminidase have a role in these associations? *Virus Res.* 2002;85(2).
10. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):47-59.
11. Rezaianzadeh A, Mokhtari AM, Hassanipour S, Maharlouei N. The age-standardized incidence rate of ovarian cancer in Iranian women: A systematic review and meta-analysis. *Middle East J Cancer.* 2018;9(3):171-178.
12. Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A, et al. Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from the human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem.* 1997;272(6):3599-3605.
13. Staib-Lasarik I, Götz C, Bobkiewicz W, Somnuk P, Sebastiani A, Thal SC, et al. Sortilin is dispensable for secondary injury processes following traumatic brain injury in mice. *Heliyon.* 2024;10(15):e35198.
14. Donniger H, Bonome T, Radonovich M, et al. Whole genome expression profiling of advanced-stage papillary serous ovarian cancer reveals activated pathways. *Oncogene.* 2004;23(49):8065-8077.
15. Amini-Farsani Z, Sangtarash M, Teimori H, Shamsara M. Effect of valproic acid on expression of Bim gene and viability of ovarian cancer cell line A2780. *J Gorgan Univ Med Sci.* 2017;19(3):60-66.
16. Webb PM, Jordan SJ. Global epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2024;21(5):389-400

33. Mocan A, Diuzheva A, Bădăraș S, Moldovan C, Andruch V, Carradori S, et al. Liquid phase and microwave-assisted extractions for multicomponent phenolic pattern determination of five romanian *Galium* species coupled with bioassays. *Molecules*. 2019;24:1226.
34. Zhao CC, Shao JH, Li X, Xu J, Wang JH. A new anthraquinone from *Galium verum* L. *Nat Prod Res*. 2006;20(11):981-984.
35. Monfared M, Neamati A, Homayouni M. Loading of pecan smoke extract by chitosan nanoparticles and evaluation of its toxicity and induction of apoptosis on cancer cells A2780. *Stud Med Sci*. 2022; 33(5):350-360. [In Persian]
36. Bradic J, Jeremic N, Petkovic A, Jeremic J, Zivkovic V, Srejsovic I, et al. Cardioprotective effects of *Galium verum* L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arch Physiol Biochem*. 2020;126(5):408-415.
37. Aslantürk ÖS, Çelik TA, Karabey B, Karabey F. Apoptotic activities of ethyl acetate and methanol extracts of *Galium aparine* L. *J Pharm Res Int*. 2017;15(6):1-16.
38. Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab*. 2014;2:17.
39. Pashapour Z, Heshmati M, Mousavi Z, Esmaeili S. Effect of whole methanolic extract of *Galium verum* on AGO cell line. *Toxicol Commun*. 2022;4(2):10.
40. Vuletic M, Jakovljevic V, Zivanovic S, Papic M, Mladenovic R, Zivkovic V, et al. The evaluation of healing properties of *Galium verum*-based oral gel in aphthous stomatitis in rats. *Molecules*. 2022;27(15):4680.
41. Turcov D, Barna AS, Trifan A, Blaga AC, Tanasă AM, Suteu D. Antioxidants from *Galium verum* as ingredients for the design of new dermatocosmetic products. *Plants*. 2022;11:2454.
- Of Apoptotic Genes Expression Levels. *Stud Med Sci*. 2021;32(5):317-328.
25. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol*. 2010;177(3):1053-1064.
26. Ding Q, Chen Y, Zhang Q, Guo Y, Huang Z, Dai L, et al. 8-bromo-7-methoxychrysin induces apoptosis by regulating Akt/FOXO3a pathway in cisplatin-sensitive and resistant ovarian cancer cells. *Mol Med Rep*. 2015; 12(4):5100-5108.
27. Yuan J, Lan H, Jiang X, Zeng D, Xiao S. Bcl-2 Family: Novel insight into individualized therapy for ovarian cancer (Review). *Int J Mol Med*. 2020;46:1255-1265.
28. Florent R, Weiswal LB, Lambert B, et al. Bim, Puma, and Noxa upregulation by naftopidil sensitizes ovarian cancer to the BH3-mimetic ABT-737 and the MEK inhibitor trametinib. *Cell Death Dis*. 2020;11:380.
29. Tava A, Biazzi E, Ronga D, Avato P. Identification of the Volatile Components of *Galium verum* L. and *Cruciata leavipes* Opiz from the western Italian Alps. *Molecules*. 2020;25:2333.
30. Irvani Z, Mehrbani M, Farzin H, Majidi B, Mohammadi A, Toroghi R, et al. Cytotoxic effect of *Biebersteinia multifida* alcoholic extracts on MCF-7, HeLa, and A2780 cell lines. *Arch Razi Inst*. 2021;76(3):609-619.
31. Shen Y, Zhang X, Chen X, Ren M, Cai Y. Octreotide reverses the resistance of A2780/Paclitaxel ovarian cancer cell line to paclitaxel chemotherapy in vitro. *J Cancer Res Ther*. 2016;12(2):657-662.
32. Laanet PR, Saar-Reismaa P, Jõul P, Bragina O, Vaher M. Phytochemical screening and antioxidant activity of selected estonian *Galium* species. *Molecules*. 2023;28:2867.

verum extract during acute restraint and dark stress in female rats. PLoS One. 2018;13(7): e0200022.

42. Farcas AD, Mot AC, Zagrean-Tuza C, Toma V, Cimpoiu C, Hosu A, et al. Chemo-mapping and biochemical-modulatory and antioxidant/prooxidant effect of *Galium*

Research Article**Combined Effects of Reduced pH and Elevated Temperature on Growth of Marine Gastropod, *Nerita textilis*****Mousa Keshavarz¹, Abdol-Ali Hamzei¹, Emad Koochaknejad^{2*}**

1- Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Technologies, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

2- Iranian National Institute for Oceanography and Atmospheric Science, Tehran, Iran

*Corresponding author: emad.koochaknejad@inio.ac.ir

Received: 25 December 2024

Accepted: 12 May 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1194486

Abstract

Global warming, with increasing temperature and acidification of ocean waters, has inevitable consequences for marine life. The aim of this study was to show the simultaneous effect of two factors, temperature and pH, on the growth of intertidal gastropods in the Persian Gulf in the future. For this purpose, 48 samples of *Nerita textilis* gastropods of approximately similar size and weight were collected in July 1402 in the mangrove forests of Bandar Abbas and transferred to the laboratory. Then, initial measurements were made, including the weight, height, length and width of the gastropod shells. The samples were kept in 4 tanks (treatments) for 90 days. The tank conditions were as follows: Tank 1: ambient temperature (30°C) and ambient pH (2.8), Tank 2: ambient temperature (30°C) and lower pH (7.8), Tank 3: higher temperature (34°C) and ambient pH (2.8), Tank 4: higher temperature (34°C) and lower pH (7.8). The tanks were 100 liters and 12 specimens were maintained and cared for in each tank. After the experiment period, the measurements were repeated. Then, one-way ANOVA, Kruskal-Wallis, two-way ANOVA and Tukey's post hoc test were used to analyze the results. Based on the results, it can be confirmed that low pH conditions reduced the density of the intertidal *Nerita textilis* even at ambient temperature. Temperature also had a significant effect on the height (height) of the *Nerita textilis* mussel at the end of the experiment. In addition, during the experimental period, the weight of mussels in the three tanks decreased significantly under the influence of temperature and pH changes. Therefore, the results indicate that the upcoming climate changes in the Persian Gulf can significantly affect the growth parameters of the intertidal gastropod mussel *Nerita textilis*.

Keywords: Climate change, Ocean acidification, Global warming, Gastropods, *Nerita textilis*.

مقاله پژوهشی

اثرات ترکیبی pH و دما بر روی رشد صدف حلزون بین جزرومدی (*Nerita textilis*)موسی کشاورز^۱، عبدالعلی حمزه‌ئی^۱، عماد کوچک‌نژاد^{۲*}

۱- گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

۲- پژوهشگاه ملی اقیانوس‌شناسی و علوم جوی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: emad.koochaknejad@inio.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۰۵

DOI: 10.60833/ascij.2025.1194486

چکیده

گرمایش جهانی با افزایش دما و اسیدی شدن آب‌های اقیانوسی پیامدهای اجتناب‌ناپذیری برای حیات دریایی دارد. هدف این مطالعه نشان دادن تأثیر همزمان دو عامل دما و pH بر رشد صدف شکم‌پای جزر و مدی خلیج فارس در آینده بود. برای این کار تعداد ۴۸ نمونه از شکم‌پای *Nerita textilis* Gmelin, 1791 در تیرماه ۱۴۰۲ با اندازه و وزن تقریباً مشابه در جنگل‌های حرای بندرعباس جمع‌آوری گردید و به آزمایشگاه منتقل شد. سپس اندازه‌گیری‌های اولیه که شامل وزن، قد، طول و عرض صدف شکم‌پاها انجام شد. نمونه‌ها به مدت ۹۰ روز در ۴ تانک (تیمار) نگهداری شدند. شرایط تانک‌ها عبارت بود از تانک: دمای محیط (۳۰ درجه سانتی‌گراد)، pH محیط (۸/۲)، تانک ۲: دمای محیط (۳۰ درجه سانتی‌گراد)، pH پایین‌تر (۷/۸)، تانک ۳: دمای بالاتر (۳۴ درجه سانتی‌گراد)، pH محیط (۸/۲) و تانک ۴: دمای بالاتر (۳۴ درجه سانتی‌گراد) و pH پایین‌تر (۷/۸). تانک‌ها ۱۰۰ لیتری بودند و در هر تانک ۱۲ نمونه نگهداری و مراقبت شد. پس از طی دوره آزمایش اندازه‌گیری‌ها مجدداً تکرار شد. سپس از آزمون‌های آنوای یک‌طرفه، کروسکال والیس، آنوای دوطرفه و آزمون تعقیبی توکی برای تحلیل نتایج استفاده شد. بر اساس نتایج می‌توان تأیید کرد که شرایط pH پایین تراکم صدف شکم‌پای بین جزر و مدی *Nerita textilis* را حتی در دمای محیط کاهش داده است. دما نیز اثر معنی‌داری بر قد (ارتفاع) صدف گونه *Nerita textilis* در انتهای آزمایش داشته است. به علاوه، در طی دوره آزمایش وزن صدف‌ها در سه تانک تحت اثر تغییرات دما و pH به‌طور معنی‌دار کاهش یافته است. بنابراین، نتایج نشان می‌دهد که تغییرات اقلیمی پیش‌رو در خلیج فارس می‌تواند به صورت معنی‌داری بر پارامترهای رشد صدف شکم‌پای جزر و مدی *Nerita textilis* اثرگذار باشد.

کلمات کلیدی: تغییر اقلیم، اسیدی‌شدن اقیانوس، گرمایش جهانی، شکم‌پا.

مقدمه

اسیدی شدن اقیانوس‌ها می‌تواند پیامدهای عمده‌ای برای جانداران دریایی داشته باشد، به‌ویژه برای جاندارانی که برای ساختن اسکلت‌های خود به فرآیند کلسیفیکاسیون متکی هستند (۱، ۲). فرآیند کلسیفیکاسیون در اقیانوس‌ها به دلیل اثرات افزایش CO₂ بر روی شیمی کربنات مختل می‌شود. در واقع،

افزایش سطح دی‌اکسیدکربن اتمسفر سبب شده تا اقیانوس‌های جهان با سرعتی چند برابر بیشتر از شرایط طبیعی اسیدی شوند. pH آب سطحی دریا در حال حاضر ۰/۱ واحد کمتر از مقادیر قبل از صنعتی شدن است و پیش‌بینی می‌شود تا پایان قرن تا ۰/۴ واحد کاهش یابد (۱). تغییرات شیمیایی ناشی از

میلادی بالاترین مقادیر میانگین ماهانه ثبت شده در تاریخ را تجربه کرده است (۱۰). در این مطالعه با هدف بررسی اثر ترکیبی کاهش pH آب و افزایش دمای آب بر میزان رشد صدف جانوران صدف ساز در آب‌های ساحلی خلیج فارس از گونه *Nerita textilis* از خانواده Neritidae استفاده شد. خانواده Neritidae از شناخته شده ترین خانواده های زیررده Neritimorpha هستند که اکثراً گیاه خوار بوده و بر روی صخره ها و قلوه سنگ ها و درون شکاف ها زندگی می کنند. گونه های این خانواده مانند اغلب شکم پایان منطقه یکبار در سال تخم ریزی کرده از لحاظ ویژگی ریخت شناسی این خانواده دارای صدف هایی محکم، حبابی شکل، پیچش کوتاه و پیچش بدنی بزرگ می باشند (۱۱).

مواد و روش ها

نمونه برداری: جمع آوری نمونه *Nerita textilis* در ساعات اوج جزر صورت گرفت. تعداد ۴۸ نمونه از شکم پای *Nerita textilis* با اندازه و وزن تقریباً یکسان در جنگل های حرای بندرعباس با عرض جغرافیایی ۲۷/۱۸۷ و طول جغرافیایی ۵۶/۳۴۹ جمع آوری گردید. برای نگهداری نمونه ها از بطری های ۲۵۰ سی سی پلاستیکی استفاده گردید. برای تبادل هوا روی بدنه هر بطری ۴ عدد سوراخ ایجاد شد. نمونه ها پس از جمع آوری محل کار آزمایشگاهی منتقل گردید. دما و pH آب در محل جمع آوری نمونه ها اندازه گیری شد.

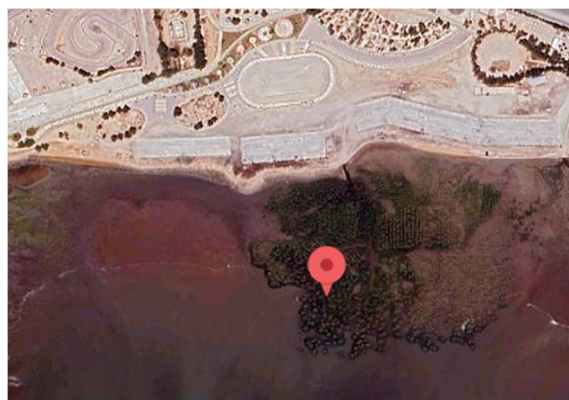
اندازه گیری ها: وزن نمونه با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت صدم گرم وزن گردید. همچنین طول، عرض و قد پوسته شکم پاها با کولیس دیجیتالی با دقت یک دهم میلی متر اندازه گیری شد.

تانک ها و شرایط آزمایشگاهی: نمونه ها به مدت ۹۰ روز در ۴ تانک ۱۰۰ لیتری (تیمار) نگهداری شدند.

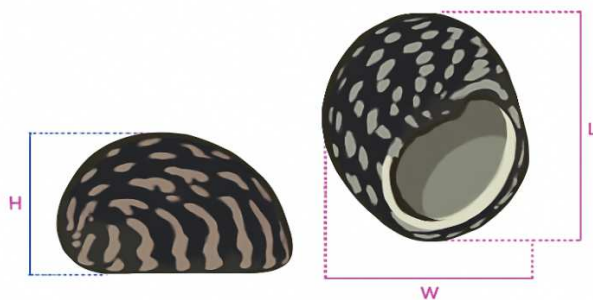
اسکلت های کربنات کلسیمی زمانی که آب دریا با ماده معدنی کربنات کلسیم اشباع نشده باشد، حل می شوند. از آنجایی که ساختارهای آهکی نقش محافظتی و همچنین حمایتی در گروه های متعددی از جانداران دریایی دارند، چنین گونه هایی تحت اثر pH پایین اقیانوس در برابر استرس های محیطی آسیب پذیرتر خواهند بود. گزارش های متعدد نشان می دهد که اثرات اسیدی شدن اقیانوس ها در نرم تنان به سرعت گسترش یافته که نشان دهنده روند کلی کاهش رشد پوسته در شرایط pH پایین است (۳). در عین حال، افزایش انتشار گازهای گلخانه ای (دی اکسید کربن، متان و اکسید نیتروژن) مسئول بیش از نیمی از افزایش مشاهده شده در میانگین دمای سطح جهانی طی ۶۰ سال گذشته است (۴). تغییرات آب و هوا یک واقعیت است: سال های ۲۰۱۲-۱۹۸۳ احتمالاً گرمترین دوره ۱۴۰۰ سال گذشته بوده است. افزایش دما به عنوان یک از پیامدهای مهم حاصل از تغییرات اقلیمی، اثرات عمده ای بر فرآیندهای زیستی مانند واکنش های زیستی، انتشار غشایی و انتقال مواد دارد. تغییر اندک در میزان دما می تواند میزان متابولیسم را افزایش داده و بر پارامترهای تعیین کننده ی یک جمعیت از قبیل رشد و بقا تاثیر بگذارد (۵). در خلیج فارس پیش بینی می شود که مقدار pH تا ۰/۴ واحد تا سال ۲۱۰۰ میلادی آینده کاهش یابد (۶، ۷). میزان حساسیت گونه ها به اسیدی شدن اقیانوس ها متفاوت است (۸). به علاوه اثر ترکیبی کاهش pH در کنار افزایش دمای آب می تواند پاسخ های متفاوتی در آبزیان داشته باشد. زیرا که پیش بینی می شود دمای آب خلیج فارس تا سال ۲۱۰۰ میلادی در ماه آگوست (ماه نمونه برداری در این مطالعه) ۴/۳ درجه سانتی گراد افزایش خواهد داشت (۹). هم اکنون نیز روند افزایش دمای آب اقیانوس ها به خوبی قابل مشاهده است به طوریکه میانگین دمای آب اقیانوس ها در سال ۲۰۲۳

تحلیل داده‌ها: آزمون‌های پارامتریک (آنوای یک-طرفه) و ناپارامتریک (Kruskal-Wallis) برای آزمایش اثر زمان بر روی هر تانک (ابتدا و انتهای آزمایش) برای هر پارامتر اندازه‌گیری شده (قد، طول، عرض و وزن) استفاده شد. از آزمون آنوای دوطرفه برای بررسی معنی داری اثر دما و pH بر رشد صدف شکم‌پای جزر و مدی *Nerita textilis* در انتهای آزمایش استفاده شد. از آزمون تعقیبی tukey برای یافتن اختلاف معنی‌دار بین تانک‌ها بر اساس متغیرهای اندازه‌گیری شده استفاده شد. از نرم‌افزار R 4.3.3 برای انجام کارهای آماری و ترسیم نمودار استفاده شد.

شرایط تانک‌ها عبارت بود از تانک ۱: دمای محیط (۳۰ درجه سانتی‌گراد) و pH محیط (۸/۲)، تانک ۲: دمای محیط (۳۰ درجه سانتی‌گراد) و pH پایین‌تر (۷/۸)، تانک ۳: دمای بالاتر (۳۴ درجه سانتی‌گراد) و pH محیط (۸/۲)، تانک ۴: دمای بالاتر (۳۴ درجه سانتی‌گراد) و pH پایین‌تر (۷/۸). در هر تانک ۱۲ نمونه شکم‌پای نگهداری و مراقبت شد. نمونه‌ها و شرایط تانک‌ها به صورت مستمر پایش شد و تعویض آب هر سه روز یکبار با حفظ شرایط مورد آزمایش انجام می‌گرفت. غذادهی با غذای فرموله‌شده نانوویت (Nanovit) هر ۳ روز یکبار انجام گردید. پس از ۳ ماه اندازه‌گیری‌های ثانویه انجام شد.



شکل ۱ - موقعیت جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری (عرض جغرافیایی ۲۷/۱۸۷ و طول جغرافیایی ۵۶/۳۴۹)
Fig. 1. Geographical location of the sampling sites (latitude 27.187°N and longitude 56.349°E)



شکل ۲ - نحوه اندازه‌گیری مقادیر طول (L)، عرض (W)، و قد (H) صدف در این مطالعه
Fig. 2. Measurement method of shell length (L), width (W), and height (H) in this study

نتایج

(انتهای دور آزمایش) صدف‌ها شروع به از دست دادن رنگ خود کردند، که نشان دهنده بدتر شدن

اثرات pH پایین و دمای بالا در *Nerita textilis* حتی بدون اندازه‌گیری قابل مشاهده بود. پس از سه ماه

(جدول ۲). تجزیه و تحلیل پست هاک (آزمون توکی) اختلاف معنی‌دار بین تانک‌های ۲ و ۴ را تایید می‌کند. میانگین قد صدف‌ها در تانک ۴ (با دمای بالاتر و سطح pH پایین‌تر) افزایش یافته است. برخلاف دما، اثر کاهش pH بر میزان قد گونه معنی‌دار نبوده است ($p > 0.05$) (جدول ۲). علاوه بر این، برهمکنش بین pH و دما در رابطه با اثرگذاری بر مقادیر قد معنی‌دار بود ($p < 0.05$) (جدول ۲). همچنین، تأثیر دما بر مقادیر وزن معنی‌دار نبود، اما تأثیر pH در پایان آزمایش بر مقادیر وزن معنی‌دار بوده است ($p < 0.05$) (جدول ۲). تجزیه و تحلیل آزمون تعقیبی توکی اختلاف معنی‌دار بین تانک‌های ۲ و ۴ و بین تانک‌های ۱ و ۴ را تایید می‌کند (جدول ۳). میانگین وزن صدف‌ها در هر سه تانکی که شرایطی غیر از شرایط محیطی داشته‌اند (تانک‌های ۲، ۳ و ۴) کاهش یافته است. دما و pH و برهم‌کنش آن‌ها اثر معنی‌داری بر طول و عرض در انتهای آزمایش نداشته‌اند.

شرایط پرپیوستراکوم آن‌ها است. رنگ صدف‌ها در طول دوره آزمایش از قهوه‌ای تیره به سبز کمرنگ تغییر پیدا کرد. به علاوه زبری پوسته صدف‌های تحت اثر pH پایین‌تر کاهش یافته بود. مقادیر وزن در بازه زمانی آزمایش به‌طور معنی‌دار کاهش یافته است ($p < 0.05$) (جدول ۱). به‌طوریکه مقادیر وزن شکم‌پاها در پایان آزمایش تانک‌های ۲، ۳ و ۴ کمتر از مقادیر اندازه‌گیری‌شده در آغاز آزمایش است. در تانک ۴ (با دمای بالاتر و سطح pH پایین‌تر) قد صدف در طی زمان افزایش داشته و مقادیر طول کاهش یافته است. میانگین عرض صدف نیز در تانک‌های ۲ و ۴ (سطح pH پایین‌تر) کاهش داشته است. با این‌حال، هیچ‌کدام از مقادیر قد، طول و عرض در بازه زمانی آزمایش تغییر معنی‌داری نکرده است ($p > 0.05$) (جدول ۱). نتایج نشان داد که دما اثر معنی‌داری بر قد (ارتفاع) صدف گونه *Nerita textilis* در انتهای آزمایش داشته است ($p < 0.05$)

جدول ۱- نتایج آنالیز مقادیر قد، وزن، طول و عرض پوسته شکم‌پای *Nerita textilis* در ابتدا و انتهای آزمایش

Table 1. The results of height, weight, length, and width of *Nerita textilis* at the beginning and end of the experiment

One-way ANOVA				Kruskal-Wallis		
Tank1	df	MS	F	p	df	p
Width	1	0.22	0.43	0.51	1	0.36
Length	1	0.30	0.60	0.44	1	0.32
Weight	1	0.02	0.24	0.62	1	0.50
Height	1	0.18	0.93	0.93	1	0.33
Tank 2						
Width	1	0.88	1.79	0.19	1	0.13
Length	1	0.28	1.24	0.27	1	0.28
Weight	1	1.45	13.01	0.00	1	0.00
Height	1	0.28	1.00	0.32	1	0.31
Tank 3						
Width	1	0.54	1.30	0.26	1	0.54
Length	1	0.15	0.21	0.64	1	0.52
Weight	1	0.86	5.53	0.02	1	0.02
Height	1	0.20	0.87	0.70	1	0.27
Tank4						
Width	1	0.54	1.30	0.26	1	0.25
Length	1	0.45	1.22	0.28	1	0.32
Weight	1	1.26	8.51	0.00	1	0.01
Height	1	0.70	2.11	0.16	1	0.17

جدول ۲- نتایج آنالیز اثر مقادیر pH و دما بر قد، وزن، طول و عرض پوسته شکم‌پای *Nerita textilis* در انتهای آزمایش

Table 2. The results of the effects of pH and temperature on height, weight, length, and width of *Nerita textilis* at the end of the experiment

		Two-way ANOVA			
		df	mean sq	F Value	P value
Height	pH	1	0.48	1.87	0.17
	Temperature	1	2.25	8.87	0.00
	pH + Temperature	1	1.68	6.57	0.01
Length	pH	1	0.30	0.68	0.41
	Temperature	1	0.44	1.00	0.32
	pH + Temperature	1	0.00	0.00	0.93
Width	pH	1	0.14	0.32	0.57
	Temperature	1	0.40	0.92	0.34
	pH + Temperature	1	1.40	3.21	0.07
Weight	pH	1	2.17	12.77	0.00
	Temperature	1	0.35	2.07	0.15
	pH + Temperature	1	0.70	4.14	0.04

جدول ۳- جدول مقایسه اثر معنی‌داری مقادیر pH و دما میان تانک‌های مورد آزمایش

Table 3. Comparing the significant effects of pH and temperature among the experimental tanks based

Height					Length				
	Tank 1	Tank 2	Tank 3	Tank 4		Tank 1	Tank 2	Tank 3	Tank 4
Tank 1					Tank 1				
Tank 2					Tank 2				
Tank 3					Tank 3				
Tank 4					Tank 4				
Width					Weight				
	Tank 1	Tank 2	Tank 3	Tank 4		Tank 1	Tank 2	Tank 3	Tank 4
Tank 1					Tank 1				
Tank 2					Tank 2				
Tank 3					Tank 3				
Tank 4					Tank 4				

رنگ قرمز به معنی اختلاف معنی‌دار است.

Red color indicates a significant difference



شکل ۳- تصاویر نمونه‌های شکم‌پای *Nerita textilis* در ابتدا (بالا) و انتهای آزمایش (پایین)

Figure 3. Images of *Nerita textilis* specimens at the beginning (right) and end (left) of the experiment

بحث

صاف شدن ریبیلتهای محوری و مارپیچی، و همچنین گرد شدن راس و شانه‌های چرخشی مشاهده شده است (۱۶). Rodolfo-Metalpa و همکاران (۲۰۱۱) مشاهده کردند که انحلال پوسته صدف در قدیمی‌ترین قسمت‌های لیمپت بالغ مشاهده می‌شود (۱۷). به گفته Nienhuis و همکاران (۲۰۱۰)، اثر افزایش سطح CO_2 بر روی پوسته گاستروپود *Nucella lamellosa* عمدتاً به علت افزایش انحلال پوسته موجود بوده است و نقش نرخ رسوب ناکافی کربنات کلسیم به عنوان ماده پوسته جدید روشن نیست (۳). علاوه بر این، Garrard و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که از نظر بصری انحلال صدف در شکم‌پای *Columbella rustica* قابل مشاهده است

بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان تایید کرد که شرایط pH پایین تراکم پوسته شکم‌پای بین جزر و مدی *Nerita textilis* را حتی در دمای محیط کاهش داده است. تخریب صدف شکم‌پاها در نتیجه تاثیر pH پایین در مطالعات متعددی گزارش شده است (۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵). در مطالعه حاضر، اثرات شرایط اسیدی شده بر روی سطح پوسته و مقدار زبری آن را می‌توان به صورت بصری برای گونه *Nerita textilis* تایید کرد. همچنین از نظر کیفی تغییر رنگ پریوستراکوم به خوبی قابل مشاهده بود. الگوی زوال صدف شکم‌پا در مطالعه حاضر با مشاهدات ثبت شده در مطالعات مشابه دیگر تطابق دارد. به عنوان مثال، در گونه شکم‌پای *Thais gradata* از دست دادن پریوستراکوم،

(۱۸). در طی دوره ۹۰ روزه آزمایش وزن صدف‌ها در سه تانک تحت اثر تغییرات دما و pH به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. شرایط pH پایین (یعنی اسیدی شدن اقیانوس) باعث اسیدوز داخلی در شکم‌پا می‌شود که منجر به اختلال در متابولیسم و کاهش انتقال انرژی (ATP) می‌شود (۱۹، ۲۰). این تغییرات می‌تواند تأثیر منفی بر کانی‌سازی زیستی و کلسیفیکاسیون صدف داشته باشد (۲۱). علاوه بر این، شرایط اسیدی در ترکیب با افزایش دما می‌تواند بر واکنش‌های فنوتیپی و اکولوژیکی مانند آسیب‌پذیری در برابر شکار، مصرف اکسیژن، ظرفیت تناسب اندام، هموستاز و توانایی جلوگیری از دست دادن آب و میزان مقاومت در برابر خشک شدن تأثیر بگذارد (۱۴). اگرچه، اختلاف اندازه‌گیری‌های عرض صدف در ابتدا و انتهای آزمایش در این مطالعه به اندازه کافی معنی‌دار نبوده است، با این حال کاهش اندازه عرض صدف در تانک ۲ و ۴ با سطح pH پایین‌تر می‌تواند نشان‌دهنده فرسایش صدف در طول دوره آزمایش از نواحی کناری صدف است. دما اثر معنی‌داری بر قد (ارتفاع) صدف گونه *Nerita textilis* در انتهای آزمایش داشته است. افزایش دمای محیط به‌طور معمول منجر به افزایش نرخ متابولیک استاندارد در جانوران اکتوترم می‌شود که در نتیجه اثرات افزایش دما بر روی سرعت واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مانند فعالیت‌های میتوکندری، آنزیم‌های متابولیک، کانال‌های یونی و سایر فرآیندهای نیازمند اکسیژن و انرژی (۲۲، ۲۳). بنابراین افزایش قد صدف شکم‌پای *Nerita textilis* بر اثر دمای بالاتر دور از انتظار نبوده است. با این حال این افزایش قد به معنی استحکام بیشتر صدف نیست زیرا که قد صدف معمولاً با استحکام صدف ارتباط معنی‌دار ندارد (۲۴). Calosi و همکاران (۲۰۰۹) آزمایشی را با هدف بررسی اثرات اسیدی شدن اقیانوس ($pH=7$) و دمای بالا (۵ درجه

سانتی‌گراد دمای بالاتر نسبت به محیط) بر طول، عرض و وزن شکم‌پای *Littorina littorea* جزر و مدی انجام دادند و مشاهده کردند که درصد افزایش طول پوسته صدف برای افرادی که تحت اثر ترکیبی از کاهش pH و دمای بالا نگهداری می‌شدند کمتر بوده است (۲۵). در مطالعه مشابه دیگری Chatzinikolaou و همکاران (۲۰۲۰) آزمایشی را با هدف بررسی اثرات اسیدی شدن و گرم شدن اقیانوس‌ها بر روی خواص مورفولوژیکی پوسته گونه شکم‌پای جزر مدی *Nassarius nitidvs* و *Colombella roustica* انجام دادند (۲۶). شرایط آزمایش افزایش دمای ۳ درجه سانتی‌گراد و کاهش ۰/۳ واحد میزان pH و مدت زمان آزمایش ۹۰ روز بوده است. هنگامی که pH در دمای محیط کاهش یافته است تراکم و ضخامت پوسته گونه *Nassarius nitidvs* کمتر بوده اما ترکیب کاهش pH و افزایش دما در مقایسه با شرایط محیط (شاهد) تأثیر محسوسی نداشته است. این واکنش دور از انتظار را می‌توان با افزایش معنی‌دار قد صدف در تانک ۴ در این مطالعه مقایسه کرد. با این حال، پوسته *Colombella roustica* تحت اثر ترکیبی از کاهش pH و دمای بالا نازکی کمتری داشته است. در واقع پاسخ‌های فیزیولوژیک تحت سناریوهای پیش‌بینی‌شده تغییر آب و هوا می‌تواند بین گونه‌های هم‌گروه (شکم‌پاها) یا حتی بین افراد یک گونه متفاوت باشد. Ries و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که گونه‌های مختلف واکنش‌های متفاوتی به شرایط اسیدی شدن اقیانوس دارند: برخی ممکن است میزان کلسیفیکاسیون خود را کاهش دهند (مرجان‌های مناطق معتدل، توتیاهای قلمی، دوکفه‌ای‌ها، شکم‌پاها، کرم‌های سرپولید، و صدف‌های نرم)، برخی دیگر ممکن است کلسیفیکاسیون را افزایش دهند (لیمپت‌ها، توتیای بنفش، جلبک قرمز مرجانی، جلبک سبز آهکی، خرچنگ‌ها، لابسترها و

6. Jiang LQ, Carter BR, Feely RA, Lauvset SK, Olsen A. Surface ocean pH and buffer capacity: Past, present and future. *Sci Rep*. 2019;9(1):18624.

7. Saleh A, Abtahi B, Mirzaei N, Chen CTA, Ershadifar H, Ghaemi M, Hamzehpour A, Abedi E. Hypoxia in the Persian Gulf and the strait of Hormuz. *Mar Pollut Bull*. 2021;167:112354.

8. Shirayama Y, Thornton H. Effect of increased atmospheric CO₂ on shallow water marine benthos. *J Geophys Res. Oceans*. 2005;110(C9):10.1029/2004JC002618.

9. Noori R, Tian F, Berndtsson R, Abbasi MR, Naseh MV, Modabberi A, et al. Recent and future trends in sea surface temperature across the Persian Gulf and Gulf of Oman. *PLOS One*. 2019;14(2):e0212790.

10. Cheng L, Abraham J, Trenberth KE, Boyer T, Mann ME, Zhu J, et al. New Record Ocean Temperatures and related climate indicators in 2023. *Adv Atmospher Sci*. 2024;41(6):1068-1082.

11. Bayrami N, Seyfabadi J, Alavi Yeganeh MS. Morphological identification of species of the genus *Nerita* (family neritidae) in Intertidal area of Bandar-e Lengeh. *J Anim Environ*. 2016;8(3):87-92.

12. Duquette A, McClintock JB, Amsler CD, Pérez-Huerta A, Milazzo M, Hall-Spencer JM. Effects of ocean acidification on the shells of four Mediterranean gastropod species near a CO₂ seep. *Mar Pollut Bull*. 2017;124(2):917-928.

13. Gazeau F, Parker LM, Comeau S, Gattuso JP, O'Connor WA, Martin S, Pörtner HO, Ross PM. Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Mar Biol*. 2013;160:2207-2245.

14. Melatunan S, Calosi P, Rundle S, Widdicombe S, Moody A. Effects of ocean acidification and elevated temperature on shell plasticity and its energetic basis in an

میگو) و در برخی (دوکفه‌ای آبی) ممکن است اثری نداشته باشند (۲۷).

نتیجه‌گیری

مطالعه صدف شکم‌پای جزر و مدی *Nerita textilis* نشان داد که تغییرات اقلیمی پیش‌رو در خلیج فارس می‌تواند به صورت معنی‌داری بر پارامترهای رشد این گونه از شکم پایان اثرگذار باشد. گونه‌های مختلف دریایی آسیب‌پذیری و پاسخ‌های تحمل متفاوتی در مورد اسیدی شدن و گرم شدن اقیانوس‌ها دارند و این پاسخ‌ها بر تعاملات اکولوژیکی و تنوع زیستی دریایی اثرگذار خواهد بود. با توجه به اینکه خلیج فارس در معرض تغییرات اقلیمی گسترده‌ای قرار دارد مطالعات بیشتری درباره اثرات احتمالی تغییرات اقلیمی پیش‌رو بر موجودات زنده خلیج فارس مورد نیاز است.

منابع

1. Orr JC, Pantoja S, Pörtner HO. Introduction to special section: The ocean in a high-CO₂ world. *J Geophys Res Oceans*. 2005;110(C9):C09S01.
2. Riebesell U. Effects of CO₂ enrichment on marine phytoplankton. *J Oceanograph*. 2004;60:719-729.
3. Nienhuis S, Palmer AR, Harley CD. Elevated CO₂ affects shell dissolution rate but not calcification rate in a marine snail. *Proc R Soc B. Biol Sci*. 2010;277(1693):2553-2558.
4. IPCC. Intergovernmental panel on climate change., Ottmar Edenhofer et al., Climate change 2014: Mitigation. Technical Summary, Cambridge University Press, 2014.
5. Schulte PM, Healy TM, Fanguie NA. Thermal performance curves, phenotypic plasticity, and the time scales of temperature exposure. *Integr Comp Biol*. 2011;51(5): 691-702.

21. Findlay, H.S., Wood, H.L., Kendall, M.A., Spicer, J.I., Twitchett, R.J., Widdicombe, S. Comparing the impact of high CO₂ on calcium carbonate structures in different marine organisms. *Mar Biol Res.* 2011;7(6):565-575.
22. Cossins A. Temperature biology of animals. Springer Science and Business Media. New York, USA, 2012.
23. Hochachka PW. The metabolic implications of intracellular circulation. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96(22):12233-12239.
24. Mackenzie CL, Ormondroyd GA, Curling SF, Ball RJ, Whiteley NM, Malham SK. Ocean warming, more than acidification, reduces shell strength in a commercial Shellfish species during food limitation. *PLoS One.* 2014;9(1):e86764.
25. Calosi P, Melatunan S, Turner LM, Artioli Y, Davidson RL, Byrne JJ, et al. Regional adaptation defines sensitivity to future ocean acidification. *Nat Commun.* 2017;8(1):13994.
26. Chatzinikolaou E, Grigoriou P, Keklikoglou K, Faulwetter S, Papageorgiou N. The combined effects of reduced pH and elevated temperature on the shell density of two gastropod species measured using micro-CT imaging. *ICES J Mar Sci.* 2017; 74(4):1135-1149.
27. Ries JB, Cohen AL, McCorkle DC. Marine calcifiers exhibit mixed responses to CO₂-induced Ocean acidification. *Geology.* 2009;37(12):1131-1134.
- intertidal gastropod. *Mar Ecol Prog Ser.* 2013;472:155-168.
15. Parker LM, Ross PM, O'Connor WA, Pörtner HO, Scanes E, Wright JM. Predicting the response of molluscs to the impact of ocean acidification. *Biol.* 2013; 2(2):651-692.
16. Marshall DJ, Santos JH, Leung K.M., Chak, W.H. Correlations between gastropod shell dissolution and water chemical properties in a tropical estuary. *Mar Environ Res.* 2008;66(4):422-429.
17. Rodolfo-Metalpa R, Houlbrèque F, Tambutté É, Boisson F, Baggini C, Patti FP, et al. Coral and mollusc resistance to ocean acidification adversely affected by warming. *Nat Clim Chang.* 2011;1(6):308-312.
18. Garrard SL, Gambi MC, Scipione MB, Patti FP, Lorenti M, Zupo V, et al. Indirect effects may buffer negative responses of seagrass invertebrate communities to ocean acidification. *J Exp Mar Biol Ecol.* 2014; 461:31-38.
19. Melatunan S, Calosi P, Rundle SD, Moody AJ, Widdicombe S. Exposure to elevated temperature and pCO₂ reduces respiration rate and energy status in the periwinkle *Littorina littorea*. *Physiol Biochem Zool.* 2011;84(6):583-594.
20. Pörtner HO, Reipschläger A, Heisler N. Acid-base regulation, metabolism and energetics in *Sipunculus nudus* as a function of ambient carbon dioxide level. *J Exp Biol.* 1998;201(1):43-55.



بسمه تعالی

فرم تعهد نویسندگان مقالات

فصلنامه علمی-پژوهشی زیست شناسی جانوری

دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

مدیر مسئول محترم فصلنامه

با سلام و احترام

اینجانب نویسنده مسئول مقاله تحت عنوان "....." به همراه سایر همکاران این مقاله متعهد می‌شویم که این مقاله دستاوردی جدید حاصل کار تحقیقاتی خودمان بوده و در جای دیگری بطور کامل چاپ یا ارائه نشده است. اسامی نویسندگان طبق ترتیب جدول زیر مورد تایید کلیه نویسندگان بوده و قابل تغییر نخواهد بود.

ردیف	نام و نام خانوادگی نویسندگان (نویسنده مسئول با * مشخص شود)	پست الکترونیک	امضا
۱			
۲			
۳			
۴			
۵			
۶			
۷			

فرم تعارض منافع

فرم تعارض منافع، توافق نامه‌ای است که نویسنده (گان) یک مقاله اعلام می‌کنند که در رابطه با انتشار مقاله ارائه شده به طور کامل از اخلاق نشر، از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده‌اند و منافعی تجاری در این راستا وجود ندارد و نویسندگان در قبال ارائه اثر خود وجهی دریافت ننموده‌اند. فرم تعارض منافع به خوانندگان اثر نشان می‌دهد که متن مقاله چگونه توسط نویسندگان تهیه و ارائه شده است. نویسنده مسئول از جانب سایر نویسندگان این فرم را امضا و تایید می‌نماید و اصالت محتوای آن را اعلام می‌نماید. نویسنده مسئول هم چنین اعلام می‌دارد که این اثر قبلاً در جای دیگری منتشر نشده و همزمان به نشریه دیگری ارائه نگردیده است. همچنین کلیه حقوق استفاده از محتوا، جداول، تصاویر و ... به ناشر محول گردیده است.

نام نویسنده مسئول:		آدرس الکترونیکی:	
وابستگی سازمانی:		تلفن:	
عنوان مقاله:			
آیا نویسندگان یا موسسه مربوطه وجهی از یک شخص ثالث (دولتی، تجاری، بنیاد خصوصی و غیره) برای هر بخشی از مقاله ارائه شده (شامل کمک‌های مالی، نظارت بر داده‌ها، طراحی مطالعه، آماده‌سازی اثر، تجزیه و تحلیل آماری و ...) دریافت نموده است؟			
☐ بلی		☐ خیر	
آیا نویسندگان هرگونه اختراعی که در حال انجام، داوری و یا ثبت شده، مربوط به این اثر را در حال انجام دارند؟			
☐ بلی		☐ خیر	
آیا طرق دسترسی دیگری وجود دارد که خوانندگان بتوانند که اطلاعات اضافی اثر مذکور را از نویسندگان مقاله دریافت نمایند؟			
☐ بلی		☐ خیر	
آیا جنبه‌ای از این اثر مرتبط با حیوانات آزمایشی یا بیماری‌های خاص انسانی است که نیاز به اعلام و تایید اخلاق نشر باشد؟			
☐ بلی		☐ خیر	
نام نویسنده مسئول:		تاریخ:	
		امضا	

راهنمای تهیه و تدوین مقالات (قابل اجرا از از بهار ۱۴۰۴)

- ۱- مقاله در مجله دیگری به چاپ نرسیده یا به طور همزمان برای سایر مجلات ارسال نشده باشد.
- ۲- مقاله پژوهشی حاصل تحقیق نویسندگان و مقالات مروری نیز از اشخاص مجرب پذیرفته می‌شود.
- ۳- مقاله ارسالی حداقل ۱۰ صفحه (با فونت ۱۲ و فاصله سینگل) و حداکثر ۱۴ صفحه (برای مقالات مروری با کیفیت تا ۲۰ صفحه نیز مجاز است) و مشتمل بر عنوان فارسی و انگلیسی، چکیده فارسی و انگلیسی، کلمات کلیدی فارسی و انگلیسی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج، بحث، نتیجه‌گیری و منابع باشد. چکیده بین ۲۰۰ تا ۳۰۰ کلمه و کلمات کلیدی بین ۵ تا ۷ واژه باشد.
- ۴- ترتیب درج اسامی نویسندگان باید مشخص بوده و مسئول مکاتبات نیز با علامت ستاره مشخص شود. در ترتیب اسامی دقت شود تغییر یا اضافه و کم نمودن اسامی با مکاتبات بسیار رسمی و وقت گیر در مراحل اولیه قابل انجام خواهد بود و بعد از پذیرش به هیچ عنوان قابل انجام نخواهد بود پس در ترتیب و املاي اسامی و نحوه آدرس‌دهی دقت و هماهنگی کامل با نویسندگان و مرجع امتیازدهی انجام شود.
- ۵ - مقاله با نرم‌افزار Word (doc یا docx)، قلم B Lotus و Times New Roman تایپ شده باشد و ۳ سانتی متر حاشیه از چهار طرف و در قطع A4 باشد.
- ۶- اندازه قلم عنوان فارسی و انگلیسی مقاله ۱۴ Bold، نام نویسندگان ۱۲ Bold، آدرس نویسندگان و چکیده فارسی ۱۱، چکیده انگلیسی ۱۲، کلمات کلیدی فارسی ۱۰، کلمات کلیدی انگلیسی ۱۱، متن مقاله ۱۲ (واژه‌های انگلیسی ۱۰) باشد. تیتراهای داخل متن ۱۲ Bold، منابع با فونت ۱۱ و اصطلاحات انگلیسی داخل متن با فونت ۱۰ تنظیم گردد. اسامی علمی لاتین باید به صورت ایتالیک تایپ شوند. فاصله خطوط single و در تنظیمات پاراگراف اعداد قبل و بعد صفر و special روی none باشد.
- ۷- رعایت نکات ویرایشی بخصوص نیم‌فاصله‌ها در کل متن فارسی الزامی است.
- ۸- به هیچ عنوان پاورقی استفاده نشود و معادل انگلیسی جلوی واژه و داخل پرانتز گذاشته شود.
- ۹- علائمی مانند نقطه، ویرگول، نقطه ویرگول و ... به کلمه قبلی چسبیده و با کلمه بعدی یک فاصله داشته باشند.
- ۱۰- اعداد داخل متن مقاله (بجز محتوای جداول، نمودارها و تصاویر) به فارسی بوده و اعشارها با ممیز (مانند ۰/۰۵) باشد.
- ۱۱- p معنی‌داری کوچک و ایتالیک باشد. دو طرف علائم =، <، > و $\pm$ یک فاصله باشد (مثال 12 ± 167 یا $0/05 <$ p). مقیاس‌ها در متن فارسی برای مثال بصورت میلی گرم/کیلوگرم یا میلی گرم/میلی لیتر نوشته شوند نه بصورت میلی گرم بر کیلوگرم یا میلی گرم در میلی لیتر.
- ۱۳- متن کلیه جداول، نمودارها و تصاویر به انگلیسی باشد (قلم Times New Roman و چپ چین). اعداد نیز انگلیسی و اعشار آنها با نقطه (0.05) مشخص شود. عنوان جدول در بالای جدول هم به فارسی (با فونت ۱۰ یا ۱۱) و هم در زیر آن به انگلیسی (با فونت ۹ یا ۱۰ بسته به حجم مطلب) ذکر شده و در صورت نیاز به توضیحات بیشتر، در زیر جدول، مطالب هم به فارسی و هم انگلیسی (به ترتیب با فونت ۱۰ و ۹) ارائه گردد. به علاوه هر ستون جدول باید دارای عنوان و واحد مربوط به خود باشد. در جداول خطوط عمودی بی‌رنگ و خطوط افقی نیز بصورت حداقلی مشکی باشد.

۱۴- توضیحات مربوط به منحنی‌ها، تصاویر و نمودارها در زیر آنها ابتدا فارسی با قلم ۱۰ یا ۱۱ و زیر آن انگلیسی با قلم ۹ یا ۱۰ (بسته به حجم مطلب) نوشته شود. عکس‌های ارسالی باید اصل، دارای مقیاس، واضح و دقیق باشند.

۱۵- سیستم رفرنس‌دهی ونکوور (ترتیبی) است. منابع انتهای مقاله همه به انگلیسی (منابع فارسی نیز به انگلیسی برگردانده شده و در پایان رفرنس [In Persian] گذاشته شود) و بر اساس ترتیب استفاده در متن شماره‌گذاری شده و در متن مقاله با شماره و در داخل پرانتز ارجاع داده شود. منابع تکراری با همان شماره اول استفاده شده و شماره جدید به آنها اختصاص داده نشود.

در نگارش منابع موارد زیر رعایت گردد:

الف - اگر منبع کتاب است:

نام خانوادگی و حرف اول نام نویسندگان، عنوان کامل کتاب، شماره چاپ، ناشر، شهر، کشور، سال انتشار، صفحات.

ب- اگر منابع مورد نظر مجله است:

نام خانوادگی و مخفف نام نویسندگان، عنوان مقاله (فقط حرف اول اولین کلمه و اسامی خاص بزرگ نوشته می‌شود بقیه با حروف کوچک)، نام مخفف مجله (Abbreviated)، سال انتشار (ماه و روز لازم نیست)، دوره، شماره، صفحات. مثال:

Gerendai I, Shaha C, Gunsalus GL, Bardin CW. The effects of opioid receptor antagonists suggest that testicular opiates regulate Sertoli and Leydig cell function in the neonatal rat. Endocrinol. 1986;118(5):2039-2044.

- در صورت وجود بیش از ۶ نویسنده، اسم هفتم et al. گذاشته می‌شود.
- در انتهای منابع فارسی استفاده شده که به لاتین ترجمه شده است عبارت [In Persian] داخل کروشه قید گردد.
- ۱۶- مسئولیت صحت و سقم مطالب به عهده نویسندگان است. کلیه نویسندگان باید دو فرم تعهد و تعارض منافع را تکمیل و به همراه فایل مقاله ارسال نمایند.

هزینه‌ها

در هنگام پذیرش اولیه و ارسال مقاله برای داوری مبلغ ۵۰۰ هزار تومان و در زمان پذیرش بعد از اصلاحات در سامانه مبلغ یک میلیون تومان از طریق درگاه سایت مجله به حساب مجلات دانشگاه آزاد اسلامی واریز گردد.

Fattening Lambs with Small Fat Tail Dimensions and Comparing them with Larger Fat Tail on the Growth Performance and Carcass Traits of lambs of Lori Sheep Breeds

Behrouz Yarahmadi, Mohsen Mohamadi Saei, Mir Hassan Beiranvand, Amin Khazmizadeh

13

Description of the Morphologic, Anatomic and Key Characteristics of the Convict Cichlid (*Amatitlania nigrofasciata*)

Babak Moghaddasi, Mahfam Cezawar Ardebily, Dorsa Heidarifar

27

Effects of Quinea Seed Bioactive Peptides Different Levels on Ileum Digestibility, Liver Enzymes Activity, Microbial Population and Intestinal Morphology of Broiler Chickens

Jalil Rezaei, Mohammad Ali Jafari, Kaveh Jafari Khorshidi

41

The Effect of Commercial NPN Product on Dairy Cows in Vitro

Amin Dindar Safa, Mehdi Dehghan Banadaky, Hamed Khalilvandi Behrouzyar, Mehdi Ganjkanlou

55

The Effects of Using Omega-3, Omega-6 Fatty Acids and Their Mixture on Performance, Skeletal and Health Indicators in Nursing Holstein Calves

Esmail Sangin, Ali Nikkhah, Mohammad Chamani, Ali Asghar Sadeghi, Mehdi Amin Afshar

67

Effect of Berberine on Sperm Profile in Varicocele-Induced Rats

Sogol Fami Tafreshi, Akram Eidi, Pejman Mortazavi, Ahmad Asghari

79

The Status of Broiler Farms in Terms of the Distribution Pattern of Resistant *Escherichia coli* Bacteria and Resistance Genes to Fluoroquinolone Antibiotics Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Method

Darioush Behzadpour, Kaveh Madhoush, Behzad Kaviani, Seyyed Mohammad Reza Tabatabaei Mehr

93

Investigation of the Cellular, Molecular and Anti-Apoptotic Effects of Lipid Nanoparticles Containing *Artemisia aucheri* Essential Oil on Ovarian Cancer Cells

Farnaz Aboutalebi, Maryam Teimouri

105

The Effect of Four-Week Co-Supplementation of Magnesium and Vitamin D on Sleep Quality and Circadian Rhythm in Cadets of Imam Ali Officers' University

Hekmat Ehsanbakhsh, Hamid Yousefi¹, Ehsan Yousefalizadeh

The Effectiveness of *Micrococcus luteus* Bacteria on Some Blood and Immune Indices of Common Carp Fry

115

Mehran Avakh Keysami, Alireza Akbari , Hamid Abdullahpour Biria, Maryam Avakh Keysami

Induction of Apoptosis in Ovarian Cancer Cell Lines By *Galium verum* Extract

*

Fatemeh Keshvari, Somayeh Arabzadeh, Masoomeh Hasanbarani¹, Fatemeh Akbarian, Shadi Hajrasouliha

Combined Effects of Reduced pH and Elevated Temperature on Growth of Marine Gastropod, *Nerita textilis*

Mousa Keshavarz, Abdol-Ali Hamzei, Emad Koochaknejad

129

143



Journal of Animal Biology
Azad University, Damghan Branch
17, Summer (2025) . Vol

ISSN: 1735-9724

Publisher License Holder:
Islamic Azad University, Damghan Branch
Deputy of Research and Development

Chairman:
Dr. Hooman Shajiee

Editor in Chief:
Dr. Gholamhassan Vaezi

Executive Editor:
Dr. Vida Hojati

Editorial Board:
Dr. M. Shams Lahijani (Professor), Dr. M.J. Golalipour (Professor), Dr. N. Rastegar Pouyani (Professor),
Dr. Gh. H Vaezi (Professor), Dr. Mokhtar Mokhtari (Professor), Dr. Sh. Pashaei Rad (Associate
Professor), Dr. E. Rastegar Pouyani (Associate Professor), Dr. M. Rahnama (Associate Professor), Dr. F.
Kafilzadeh (Professor), Dr. M. Modaresi (Associate Professor),
Dr. A.H. Shiravi (Associate Professor) and Dr. V. Hojati (Associate Professor)

Editor:
Dr. Vida Hojati

Layout:
Samaneh Marvizadeh

This Journal is indexed in **ISC**, **SID** and **Magiran**

Address: Office of Journal of Animal Biology, *Deputy of Research and Development*
Islamic Azad University, Damghan Branch, Cheshmeh Ali Road, Damghan, Semnan Province, Iran
Tel-fax: 023-35225058

E-mail: faslnameh.zist@gmail.com
Website: <https://sanad.iau.ir/journal/ascij/>

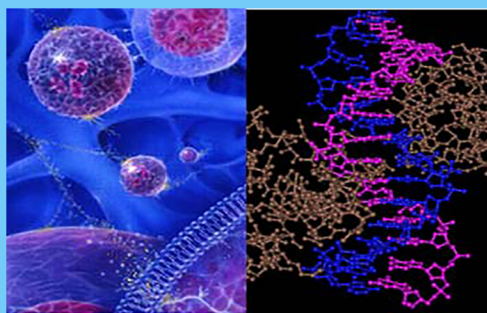
Journal of Animal Biology



Damghan Branch

Vol. 17, Summer 2025, Available online

ISSN:1735-9724



sanad.iau.ir/journal/ascij