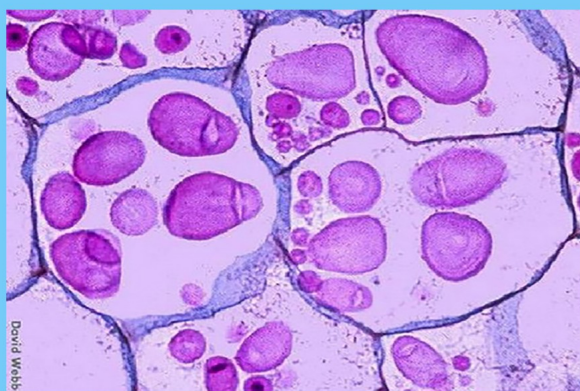




فصلنامه زیست‌شناسی جانوری

ISSN:1735-9724

سال هفدهم، بهار 1404، دارای نماد الکترونیک



sanad.iau.ir/journal/ascij



فصلنامه زیست شناسی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

علمی - پژوهشی، سال هفدهم، بهار 1404

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

مدیرمسئول: دکتر هومن شجعی

سر دبیر: دکتر غلامحسن واعظی

مدیر داخلی: دکتر ویدا حجتی

هیأت تحریریه:

دکتر مریم شمس لاهیجانی (استاد)، دکتر نصرالله رستگارپویانی (استاد)، دکتر محمدجعفر گلعلی پور (استاد)، دکتر غلامحسن 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)

ویراستار: دکتر ویدا حجتی

تنظیم و صفحه آرایی: سمانه مروی زاده

طبق نامه شماره 87/286044 مورخ 84/12/20 سازمان مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی، فصلنامه زیست شناسی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی

واحد دامغان دارای مجوز انتشار می باشد.

طبق مجوز شماره 93/07/14/3/18/125395 مورخ 93/07/14 وزارت علوم، تحقیقات و فناوری حوزه تخصصی مقالات این نشریه **تکوین و فیزیولوژی** می باشد.

طبق مجوز شماره 98/01/11/3/18/865 مورخ 98/01/11 وزارت علوم، تحقیقات و فناوری این مجله دارای رتبه علمی-پژوهشی می باشد.

ISSN: 1735-9724

فصلنامه علمی پژوهشی زیست شناسی جانوری در Academia، Magiran، SID، ISC 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: 023-35225058

پست الکترونیک: Faslnameh.zist@gmail.com

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

1	فرمولاسیون و ارزیابی عصاره میخک بارگذاری شده در هیدروژل کیتوسان بر روی رده سلولی فیبروبلاست موشی سنودا شمشاد، فرشته شریفی
13	بررسی انگل‌های کرمی دستگاه گوارش ماهی کفشک زبان گاوی (<i>Cynogossus bilineatus</i>) صید شده از سواحل بندر عباس عبدالحسین دلیمی، کرانه پری‌زاده
25	بررسی تاثیر سیلیمارین موجود در گیاه خارمریم بر پروفایل چربی، آنزیم‌های کبدی و همچنین سیتوکین‌های التهابی در خون رت‌های نر نژاد ویستار هدی جهانگیری، پریچهره یغمایی، آزاده ابراهیم حبیبی، شهربانو عریان
39	ارزیابی کیفیت و سلامت جنین‌های حاصل از بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) تحت تاثیر سکر توم سلول‌های بنیادی هیلدا رستگاری، نسیم حیاتی رودباری، سمیه کاظم‌نژاد، سهیلا انصاری‌پور
51	اثر محافظتی نانواکسید منیزیم در آسیب ایسکمی/رپرفیوژن کلیه بر عملکرد کلیه و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در موش صحرایی نر مرضیه مینایی، اکرم عیدی، پژمان مرتضوی، احمد اصغری
65	شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی همولنف میگوی ببری سبز (<i>Penaeus semisulcatus</i>) در سیستم آبی‌پروری بیوفلوک: تحت تاثیر سطوح مختلف غذایی محمدحسین خانجانی
77	مطالعه میگوی پا سفید غربی (<i>Litopenaeus vannamei</i>) در مجتمع پرورش میگوی گمیشان استان گلستان از نظر آلودگی به فلزات سنگین و ارزیابی خطر برای مصرف‌کنندگان رضا خلیلی، رضا سلیقه‌زاده، مرجان مسافر
87	تأثیر هیدروکسی سلنومتیونین بر عملکرد، صفات کیفی تخم‌مرغ و فراسنجه‌های خون مرغ‌های مادر گوشتی مسن احمد منافی، یحیی ابراهیم‌نژاد، حبیب اقدم شهریار، عبدالاحد شاددل تلی، ابوالفضل قربانی، ناصر ماهری سیس
99	بررسی اثرات فرم آلی و معدنی عناصر روی، مس و منگنز بر صفات کیفی پوسته تخم‌مرغ‌های مادر گوشتی سیده عطیه مجاوریان، شهاب‌الدین قره‌ویسی، محسن حاجی‌پور
109	الگوی تجمع زیستی فلزات سنگین جیوه، روی و نیکل در بافت‌های نرم خرچنگ شناگر آبی (<i>Portunus segnis</i>) در سواحل مکران سمانه ابراهیمی، محمد منصور توتونی، مهران لقمانی
123	مقایسه تاثیر عصاره زرشک و زعفران همراه با یک دوره فعالیت بدنی استقامتی بر ژن‌های POMC و MC4R در رت‌های ویستار ماده معتاد به مت-آمفتامین دانیال حکاک، رامبد خواجه‌ای، سید جواد ضیاءالحق، اکبر صفی‌پور افشار
137	اثر تمرین تناوبی شدید و رژیم غذایی پرپروتئین بر سطوح پلاسمایی آپولیپوپروتئین A1 و B و پروفایل لیپیدی در موش‌های صحرایی نر چاق مرضیه ثاقب‌جو، مهدی علی‌اکبری، هانیه حبیبی سنگانی

Research Article**Formulation and Evaluation of Clove Extract-Loaded Chitosan Hydrogel on the Mouse Fibroblast Cell Line****Sevda Shemshad¹, Fereshteh Sharifi^{1,2*}**

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

2- Soft Tissue Engineering Research Center, Tissue Engineering and Regenerative Medicine Institute, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author: Fer.sharifi.368@iau.ac.ir

Received: 24 September 2024

Accepted: 27 January 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1184989

Abstract

Severe skin damage or defects can cause various problems in living animals, which could affect a patient's life. Developing wound dressings with acceptable antibacterial activity, besides biocompatibility and biodegradability, is essential in developing wound healing applications for decreasing or limiting synthetic antibiotic abuse. The present study aimed to design, prepare, and develop a functional hydrogel structure based on chitosan (CS) containing clove extract (CEO) with enhanced antibacterial activity, non-toxicity, and wound-healing potential. The hydrogel structure was studied using a scanning electron microscope (SEM) and Fourier transform infrared (FTIR). In addition, the cytotoxicity of the designed hydrogel was assayed by the MTT test. Based on the SEM, adding clove extract increased the pore size of the CS hydrogel. FTIR analysis confirmed the presence and mixture of clove extract with CS in the hydrogel structure. Our investigations displayed that the clove extract-loaded CS hydrogel did not have cytotoxic effects on the mouse fibroblast (L929) cells. In addition, the designed hydrogel showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. According to the results, CS/CEO hydrogel is a great potential candidate for antibiotic-free wound healing applications.

Keywords: Clove extract, Hydrogel, Chitosan, Wound dressing, Antibacterial.



فرمولاسیون و ارزیابی عصاره میخک بارگذاری شده در هیدروژل کیتوسان بر روی رده سلولی فیبروبلاست موشی

سئودا شمشاد^۱، فرشته شریفی^{۱،*}

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

۲- مرکز تحقیقات مهندسی بافت نرم، پژوهشکده مهندسی بافت و طب بازساختی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: Fer.sharifi.368@iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۳

DOI: 10.60833/ascij.2025.1184989

چکیده

آسیب‌ها یا نواقص شدید پوستی می‌تواند عامل بسیاری از مشکلات موجود زنده باشد، که می‌تواند زندگی فرد را تحت تاثیر قرار دهد. وجود فعالیت قابل قبول ضدباکتریایی همراه با زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر بودن نیاز اساس در توسعه‌ی کاربردی زخم‌پوش جهت کاهش یا محدود نمودن سوء مصرف آنتی‌بیوتیک سنتزی است. هدف از مطالعه حاضر طراحی، تهیه و توسعه ساختار هیدروژلی کارآمد بر پایه کیتوسان (CS) حاوی عصاره میخک (CEO) با فعالیت تشدید شده ضدباکتریایی، غیرسمی، و ظرفیت التیام زخم بوده است. ساختار هیدروژل با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و آنالیز طیف جذبی (FTIR) مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین، سمیت هیدروژل طراحی شده با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس تصاویر SEM افزوده شدن عصاره میخک موجب افزایش اندازه منافذ هیدروژل CS شده است. نتیجه آزمون FTIR تأیید کننده حضور و تلفیق عصاره میخک با CS در ساختار هیدروژل بود. تحقیقات ما نشان‌دهنده‌ی عدم اثر سمی عصاره میخک بارگذاری شده در هیدروژل CS بر روی سلول‌های فیبروبلاست موشی (L929) بود. بعلاوه، هیدروژل طراحی شده فعالیت ضد باکتریایی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* بوده است. براساس نتایج بدست آمده، هیدروژل CS/CEO دارای ظرفیت بزرگ کاندید شدن برای کاربرد زخم‌پوش بدون آنتی‌بیوتیک است.

کلمات کلیدی: عصاره میخک، هیدروژل، کیتوسان، زخم‌پوش، ضدباکتریایی.

مقدمه

این هزینه به بیش از ۱۵۰۰۰ دلار می‌رسد. از سوی دیگر با توجه به محدودیت‌های عملکردی فرد بیمار هزینه‌های روانی، خانوادگی و اجتماعی بسیاری بر جامعه تحمیل می‌کند. از این رو، طراحی و تهیه زخم-پوش‌هایی که توانایی تسریع بهبود زخم را داشته باشند یکی از اولویت‌های درمانی کشور می‌باشد.

یکی از چالش‌های مهم حوزه درمان و پزشکی مدیریت صحیح و به موقع زخم‌های پوستی می‌باشد (۱). بر اساس آمارهای ارائه شده توسط دانشگاه علوم پزشکی تهران هزینه درمان زخم به‌طور متوسط بیش از ۲۰۰۰ دلار در مراحل اولیه درمان می‌باشد، که در صورت عدم رسیدگی به موقع و انجام درمان کارآمد

روش‌های متنوعی برای درمان زخم مطرح بوده، که از این جمله می‌توان به پیوندهایی همانند آلوگرفت، اتوگرفت و زئوگرفت، استفاده از پانسمان‌های زخم که موجود در شبکه داروخانه‌ای و پانسمان‌های مدرن تحت عنوان زخم‌پوش اشاره نمود (۲). زخم‌پوش‌ها یا جانشین‌های مهندسی زیستی شده پوست همانند هیدروژل، اسپانچ و پدهای الکترورسی شده عموماً از پلیمرها تهیه می‌شوند (۳). زخم‌پوش‌ها باید ویژگی‌های منحصر به فردی از جمله حفظ رطوبت محل زخم و جلوگیری از خشک شدن محل زخم، محافظت از زخم در برابر عفونت، محافظت فیزیکی از زخم و تسریع روند بهبودی را ارائه دهند. برای تامین مشخصات مطرح شده برای زخم‌پوش دو جنبه مهم که شامل نوع پلیمر سازنده و دیگری روش تهیه زخم‌پوش می‌باشد، موردتوجه است (۴، ۵). پلیمرهای مورد استفاده در ساخت زخم‌پوش از دو منبع طبیعی (کلاژن، الزینات، ژلاتین، هیالورونیک اسید، کیتوسان و ...) و سنتزی (پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌لاکتیک اسید، پلی‌وینیل الکل و...) قابل تهیه می‌باشد (۶). یکی از پلیمرهای طبیعی که به‌طور وسیعی در تهیه زخم‌پوش‌ها مورد استفاده می‌باشد، کیتوسان است (۷، ۸). کیتوسان طی فرآیند داستیلایسیون از پلیمر طبیعی کیتین بدست می‌آید. کیتوسان ویژگی‌های متمایزکننده‌ای نظیر زیست‌سازگاری، غیرسمی بودن، زیست‌تخریب‌پذیر بودن، ضدالتهاب، تسریع روند انعقاد خون و ضد میکروبی می‌باشد (۹-۱۱). ساختارهای متنوعی از زخم‌پوش‌ها در سال‌های اخیر مورد توجه بوده است، که از این جمله می‌توان به پدهای الکترورسی شده، اسپانچ‌ها، ساختارهای پاششی بصورت اسپری، هیدروژل‌ها و غیره می‌توان اشاره نمود (۱۵-۱۲). مشخصه‌هایی همانند قابلیت جذب آب، متورم شدن، قابلیت بارگذاری ترکیبات زیست‌فعال، وجود ماهیت ساختاری مشابه ماتریکس

خارج سلولی طبیعی، روش‌های متنوع در تهیه، قابلیت استفاده از طیف وسیعی از پلیمرها و ترکیبات طبیعی در ساخت موجب مقبولیت و توجه گسترده به هیدروژل‌ها در سال‌های اخیر شده است (۱۲، ۱۶، ۱۷). یکی از معضلات مهم در درمان زخم، جلوگیری از بروز عفونت باکتریایی می‌باشد. به‌طور رایج، آنتی-بیوتیک‌های سنتزی یکی از گزینه‌های مورد توجه برای پیشگیری و در صورت نیاز کنترل عفونت باکتریایی است. اما نکته قابل تامل که در سال‌های اخیر بسیار مدنظر پژوهشگران بوده است، احتمال بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی و یا سوء مصرف آنتی-بیوتیک در بیماران دریافت‌کننده دارو می‌باشد (۱۸، ۱۹). از این رو، استفاده از ترکیباتی که قابلیت ارائه خاصیت ضد میکروبی بویژه ضد باکتریایی را داشته باشند جز اولویت‌های کاربردی در تهیه زخم‌پوش‌ها قرار گرفت. براساس مطالعات انجام شده، استفاده از عصاره میخک موجب ایجاد خاصیت ضد میکروبی و باکتریایی به همراه مشخصه ضدالتهابی که به‌طور موثر در تسریع روند بهبود زخم نقش ایفا میکند (۲۰، ۲۱). تحقیقات بیانگر اثر ضدباکتریایی عصاره میخک بر روی باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس ائورئوس*) و گرم منفی (*شریشیا کلی*) می‌باشد (۲۰). از این رو، استفاده از عصاره میخک نه تنها می‌تواند راه حلی برای کاهش سوء مصرف آنتی‌بیوتیک باشد، بلکه تامین‌کننده خاصیت ضدالتهابی به‌همراه جلوگیری از رشد باکتری‌های شاخص عفونت زخم پوستی می‌باشد خواهد بود. تهیه هیدروژل به روشی که قابلیت حمل و انتقال ماده زیست‌فعال در ترمیم زخم را داشته باشد، یکی از نکات قابل توجه می‌باشد. بر این اساس، ماهیت ساختاری مورد استفاده در این مطالعه هیدروژل تنظیم شده با استفاده از تغییر pH بر پایه پلیمر کیتوسان که عصاره میخک درون محلول پلیمری بارگذاری شده است، انتخاب شد.

مواد و روش‌ها

کیتوسان با میزان ۷۹ درصد داستیلاسیون از Bio Basic (کانادا) خریداری شد. ۳-(۴،۵-دی میتیل تیاژول-۲) ۵، ۲ دی‌پنیل تترازولیوم بروماید (MTT)، دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) از شرکت سیگا-آلدريج (آلمان) تهیه شد. استیک‌اسید، هیدروکسید سدیم (NaOH)، پارافرمالدئید، و اتانول از شرکت مرک (آلمان) خریداری گردید. سلول فیروبلست موشی (L929) و نمونه‌های باکتری *E. coli* و *S. aureus* از مرکز ملی ذخایر ژنتیک (ایران) تهیه شد. محیط کشت سلول (DMEM)، سرم جنین گاوی (FBS)، تریپسین/EDTA از شرکت گیبکو (کانادا) خریداری شد. عصاره میخک بصورت هدیه دریافت شد.

تهیه هیدروژل: برای آماده‌سازی هیدروژل کیتوسان ۱/۵ درصد (w/v) (CS) از پودر توزین شده و در حلال اسید استیک (۱٪) در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت تحت استیرر قرار گرفت. همزمان با هم خوردن محلول تهیه شده، با استفاده از محلول NaOH (۱۰N) میزان pH تا محدوده خنثی افزایش داده می‌شود. برای تهیه هیدروژل کیتوسان حاوی عصاره میخک (CS/CEO) ابتدا محلول کیتوسان ۱/۵ درصد در حلال اسید استیک تهیه می‌شود. سپس عصاره میخک به میزان ۰/۰۶۲۵ درصد به محلول افزوده می‌شده و در نهایت با استفاده از محلول NaOH (۱۰N) میزان pH تا محدوده خنثی تنظیم می‌شود.

بررسی ساختار هیدروژل با میکروسکوپ الکترونی (SEM): ارزیابی ساختار و منافذ هیدروژل‌های تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM (MIRA-III، چک) تحت ولتاژ ۵KV انجام شد. برای این منظور نمونه هیدروژل‌های CS و CS/CEO در محلول ترکیبی گلو تار آلدئید و پارافرمالدئید (۲ درصد) به مدت یک ساعت فرو برده شد. سپس با PBS

شستشو داده و در فریزر ۸۰- درجه به مدت ۴ ساعت قرار گرفت. نمونه فریز شده هیدروژل‌ها با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی (FD-5010-BT، ایران) خشک و با استفاده از پوشش‌دهی لایه طلا برای مشاهده توسط میکروسکوپ الکترونی آماده شد.

آزمون طیف‌سنجی Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy: برای آزمون گروه‌های عاملی و پیوندهای شیمیایی ساختارهای هیدروژل CS به‌طور پایه و تلفیق شده با عصاره میخک CS/CEO از طیف‌سنجی FTIR استفاده شد. طیف‌سنجی FTIR با دستگاه اسپکتوفتومتر Burker (Equinox 55، آلمان) با وضوح 4 cm^{-1} و محدوده $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ انجام شد.

ویژگی‌های ضد میکروبی هیدروژل‌های CS/CEO: جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی هیدروژل‌های تهیه شده از دو سویه باکتری استفاده گردید. مشخصه‌های باکتری‌ها در جدول شماره ۱ ارائه شده است. برای انجام تست ضد میکروبی ابتدا باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* بر روی محیط کشت نوترون آگار با استفاده از سوآپ استریل بصورت یک‌دست کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. سپس، در مرکز پلیت‌ها میزان $300\text{ }\mu\text{l}$ از نمونه‌های عصاره میخک (CEO extract)، هیدروژل کیتوسان (CS) و هیدروژل کیتوسان حاوی عصاره میخک (CS/CEO) افزوده شد. با گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون نمونه‌های تیمار شده در انکوباتور، قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری و بصورت نمودار گزارش شد.

ارزیابی زیست‌سازگاری هیدروژل CS/CEO: به منظور ارزیابی زیست‌سازگاری هیدروژل CS/CEO از کشت سلول فیروبلست موشی (L929) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا سلول‌های L929 به تعداد 10^4 درون چاهک‌های پلیت کشت سلول ۲۴ خانه به مدت

۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس، نمونه هیدروژل CS/CEO در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به محیط اضافه و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفتن. با گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها با هیدروژل CS/CEO مورفولوژی سلول‌ها در مجاورت هیدروژل با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس (Bell, INV-100FL) مشاهده شد. از کشت سلول در پلیت کشت سلول بعنوان نمونه کنترل استفاده شد.

ارزیابی زنده‌مانی سلول L929 در مجاورت هیدروژل CS/CEO: نمونه هیدروژل CS/CEO با pH حدود ۶/۸ به حجم ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به تعداد ۱۰^۴ سلول L929 با آن مخلوط گردید. سپس با استفاده از محلول NaOH میزان pH به حدود خنثی (۷/۲ تا ۷/۴) تنظیم شد. نمونه‌های سلول-هیدروژل با استفاده از PBS و محیط کشت شست و شو داده

شدند. در ادامه، نمونه‌های سلول-هیدروژل آماده سازی شده به پلیت کشت سلول ۹۶ خانه منتقل می‌شود. نمونه‌ها با استفاده از محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد برای بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت درون انکوباتور CO₂ ۵ درصد با رطوبت ۹۵ درصد قرار داده شد. برای هر بازه زمانی تعداد ۳ بار تکرار از نمونه (n = ۳) و کشت در پلیت کشت سلول بعنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد. پس از گذشت بازه‌های زمانی تعریف شده، محلول MTT (۱۰ درصد) از حجم کل محیط کشت تهیه و به هر چاهک افزوده و به مدت ۳ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. بلورهای فرومازون تشکیل شده بعد از ۳ ساعت انکوباسیون، با استفاده از DMSO حل و با استفاده از دستگاه خوانش میکروپلیت (Bio-Tek) در محدوده طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

جدول ۱- مشخصه‌ی باکتری‌های مورد استفاده در تست ضد میکروبی

Table 1. Characteristics of the bacteria used in antibacterial testing

Bacterium name	Standard Number	Gram Reaction
<i>Staphylococcus aureus</i> (S. aureus)	ATTC 25923	Positive
<i>Escherichia coli</i> (E. coli)	ATTC 1330	Negative

نتایج

ساختار هیدروژل با میکروسکوپ الکترونی (SEM): بر اساس تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی (SEM)، ساختار هیدروژل CS دارای منافذ با ابعاد کوچک‌تر و سازمان‌یافته‌تری هستند، درحالی‌که با افزوده شدن عصاره میخک (CS/CEO) اندازه منافذ بزرگتر شده است. همچنین در تصاویر ۱a، هیدروژل CS/CEO دارای سطوح غیر یکدست و خشن می‌باشد. اما نمونه هیدروژل CS دارای سطوحی یکدست و صاف است.

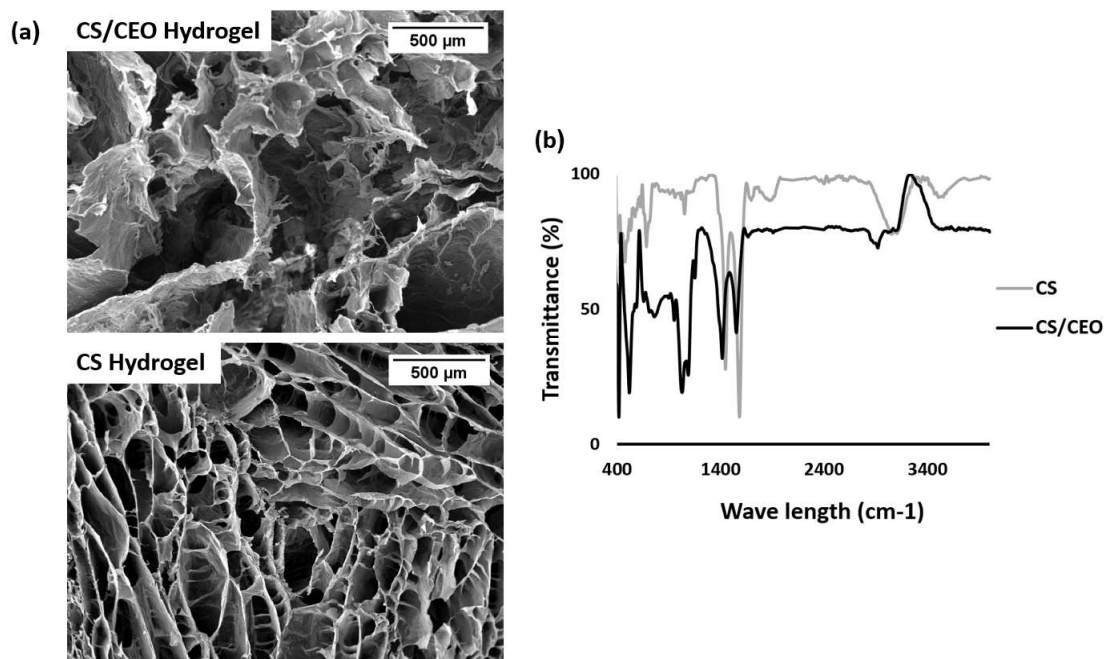
طیف‌سنجی Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR): در تصویر ۱b، طیف جذب

بدست آمده در دو نمونه هیدروژل CS و CS/CEO ارائه شده است. در نمودار پیک جذبی ناحیه cm⁻¹ ۳۴۴۴ مربوط به کشش ارتعاشی پیوندهای N-H و O-H برای گروه‌های آمین و هیدروکسیل می‌باشد (۲۲، ۲۳). پیک‌های ناحیه cm⁻¹ ۱۲۴۵ و ۱۱۶۳ به ترتیب مربوط به کشش ارتعاشی گروه‌های آمین پیوندهای C-N و کشش ارتعاشی نامتقارن پل‌های استری پیوندهای C-O قابل مشاهده است (۲۴). در محدوده cm⁻¹ ۳۵۹۱ و ۱۶۰۹ مربوط به گروه اتوزنول در عصاره میخک می‌باشد (۲۵). براساس پیک‌های قابل مشاهده در نمودار شکل ۱b، وجود پلیمر کیتوسان همراه با عصاره میخک (CS/CEO) قابل تأیید است.

سلول‌های L929 بوده یا به عبارتی زیست‌سازگار می‌باشد. در مقایسه نمونه تیمار شده با هیدروژل CS/CEO با نمونه کنترل تفاوتی در روند رشد و مورفولوژی سلول‌ها دیده نمی‌شود. میزان زنده‌مانی سلول‌های L929 با استفاده از تست MTT در مقایسه هیدروژل CS/CEO با نمونه کنترل در شکل ۳b ارائه شده است. هر دو نمونه مورد مطالعه روند رشد و تکثیر سلول‌های L929 در بازه زمانی ۷۲ ساعت دارای نرخ فزاینده است. سلول‌های L929 تیمار شده با هیدروژل CS/CEO روند رشد افزایشی را در ۳ بازه زمانی نشان می‌دهند، به‌طوری‌که در مقایسه ۲۴ با ۷۲ ساعت دارای سطح معنی‌داری $p < 0/001$ می‌باشد. این درحالی است که رشد سلولی نمونه‌های کنترل در مقایسه با تیمار شده با هیدروژل CS/CEO بیشتر است. این نکته می‌تواند بدلیل حضور عصاره میخک در نمونه هیدروژل CS باشد.

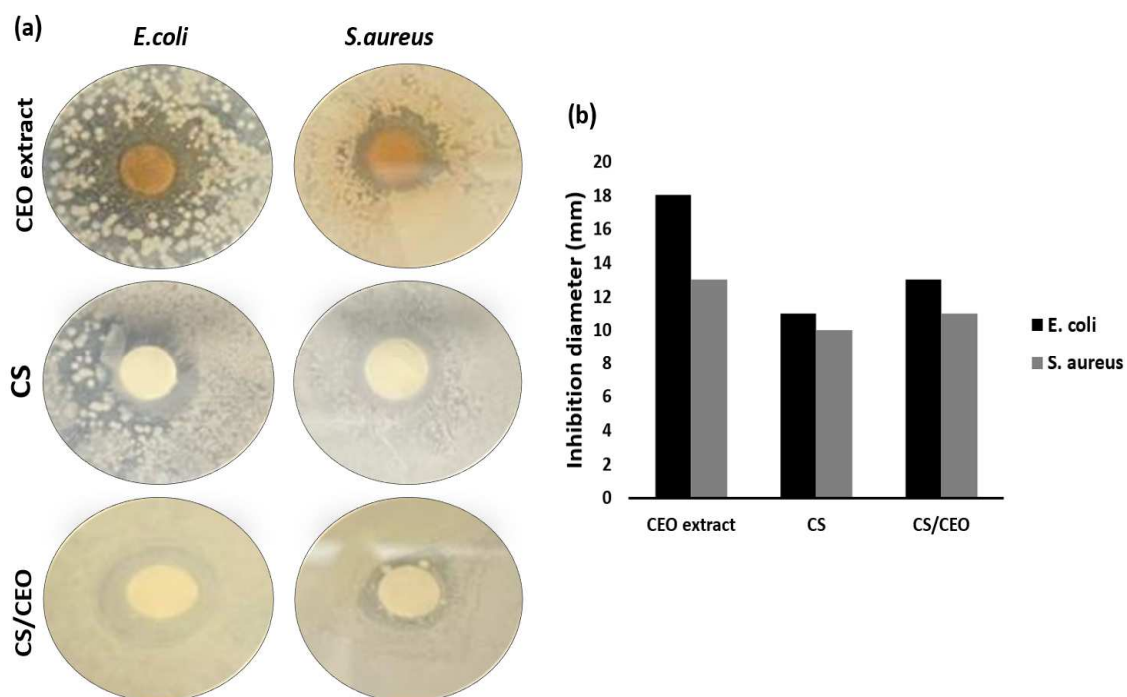
ارزیابی فعالیت ضد میکروبی هیدروژل‌های CS/CEO: به‌منظور ارزیابی و مقایسه فعالیت ضد میکروبی هیدروژل تهیه شده CS/CEO، دو نمونه هیدروژل کیتوسان (CS) و عصاره میخک (CEO extract) نیز مورد مطالعه قرار گرفت. براساس تصاویر و نمودار ارائه شده در شکل ۲a و b، بیشترین فعالیت ضد میکروبی علیه دو باکتری *E. coli* و *S. aureus* مربوط به عصاره استخراج شده از گیاه میخک می‌باشد. نکته قابل توجه وجود فعالیت ضدباکتریایی هیدروژل CS فاقد بارگذاری عصاره میخک است، که تأییدکننده خاصیت ضدباکتریایی کیتوسان می‌باشد. فعالیت ضدباکتریایی هیدروژل‌ها (CS و CS/CEO) و عصاره میخک علیه باکتری *E. coli* بیشتر از باکتری *S. aureus* است.

بررسی زیست‌سازگاری و زنده‌مانی سلول L929 در مجاورت هیدروژل: همانطور که تصاویر ۳a قابل مشاهده است، هیدروژل CS/CEO فاقد سمیت برای



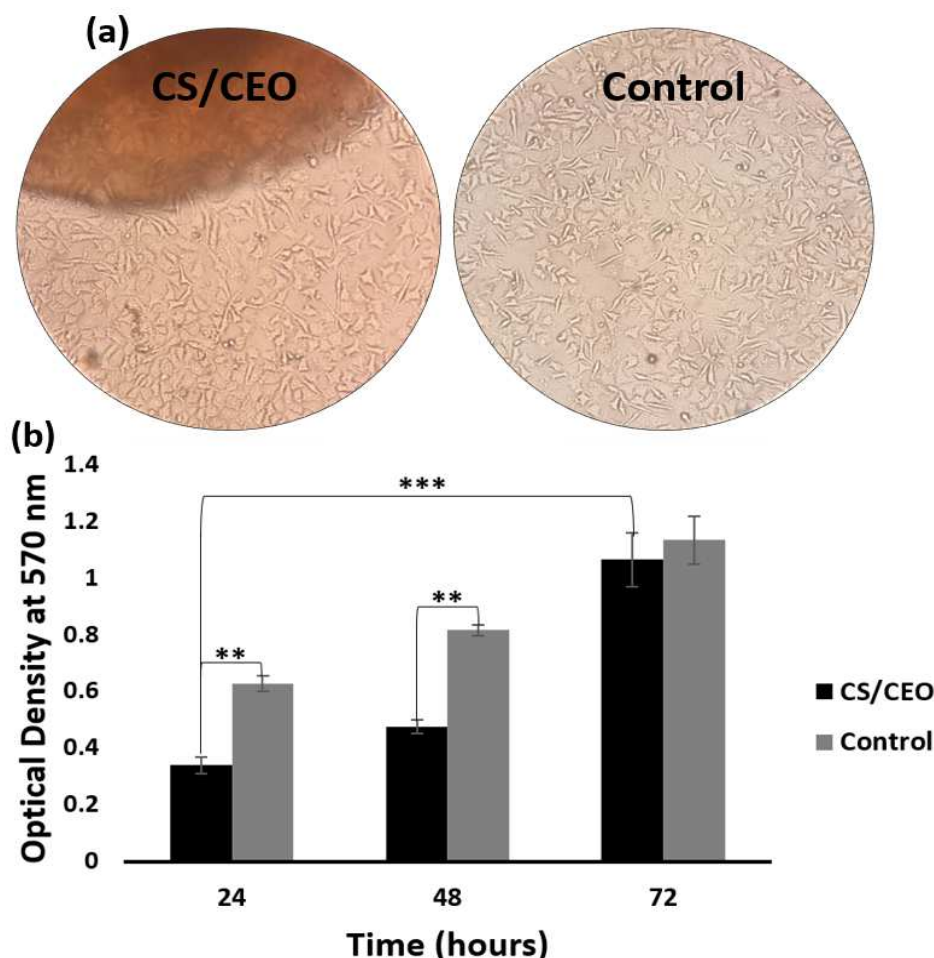
شکل ۱- مشخصه‌یابی هیدروژل‌های سنتز شده. (a) تصاویر SEM از هیدروژل‌های CS و CS/CEO، بزرگنمایی تصاویر: ۵۰۰ میکرون. (b) طیف FTIR هیدروژل‌های CS و CS/CEO.

Fig. 1. The synthesized hydrogels characterization. (a) SEM images of CS and CS/CEO hydrogels Magnification: 500 μm. (b) FTIR spectra of CS and CS/CEO hydrogels.



شکل ۲- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی هیدروژل‌های سنتز شده. (a) تصاویر فعالیت ضد میکروبی هیدروژل‌های CS و CS/CEO در مقابل سویه‌های باکتری *E. coli* and *S. aureus*. (b) نمودار میانگین ناحیه بازدارنده بر روی محیط آگار برای *E. coli* and *S. aureus* بعد از انکوباسیون با هیدروژل‌های CS و CS/CEO.

Fig. 2. The antimicrobial activity assay of synthesized hydrogels. (a) Antimicrobial activity of images of CS and CS/CEO hydrogels against *E. coli* and *S. aureus*. strains (b) Average diameter of inhibition zone area on agar for *E. coli* and *S. aureus* after incubation of CS and CS/CEO hydrogels.



شکل ۳- ارزیابی‌های برون‌تنی. (a) تصاویر میکروسکوپ نوری سلول‌های L929 بر روی هیدروژل CS/CEO بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون. کشت در پلیت کشت سلول بدون هیدروژل بعنوان کنترل در نظر گرفته شد. بزرگنمایی تصاویر ۱۰۰x می‌باشد. (b) زنده‌مانی سلول فیروبلستی موشی (L929) کشت شده بر روی هیدروژل CS/CEO و کنترل در بازه زمانی ۲۴-۷۲ ساعت بعد از انکوباسیون.

Fig. 3. In-vitro assay. (a) Inverted microscopy images of L929 cells on CS/CEO hydrogel after 24h incubation. A plate well without hydrogel was used as a control. The magnification of images is 100x. (b) The cell viability of mouse fibroblast cells (L929) was seeded on CS/CEO hydrogel and controlled after 24-72h incubation.

بحث

باشند. از این رو، مدیریت به موقع و صحیح زخم‌های پوستی یکی از چالش‌های مهم حوزه بهداشت و درمان است. بر این اساس، طراحی و تهیه پانسمان‌های مدرن زخم یا زخم‌پوش جزو حوزه‌های مطالعاتی و تحقیقاتی قابل توجه در زیست‌پزشکی می‌باشد (۸، ۲۶). زخم‌پوش باید قابلیت محافظت از محل آسیب‌دیده به همراه تامین شرایطی از جمله

پوست بعنوان بزرگترین بافت بدن دارای عملکردهای زیستی متنوعی در بدن جانداران از جمله محافظت فیزیکی، ساخت ویتامین D، امکان تعریق و تنظیم دمای بدن می‌باشد. بروز آسیب یا نقصی در ساختار پوست تحت عنوان زخم تعریف می‌شود. زخم‌های پوستی درمان نشده موجب محدودیت عملکرد فرد شده و حتی می‌تواند تهدید کننده حیات موجود زنده

حفظ رطوبت محیط، قابلیت تبادل هوا، امکان تعویض بدون آسیب مجدد به بافت در حال ترمیم، تسریع روند بهبود، التیام بخش و... را داشته باشد (۲۷، ۲۸). جهت تامین مشخصه‌های ذکر شده توجه به دو نکته نوع ماده سازنده و روش ساخت زخم‌پوش حائز اهمیت است. تنوع گسترده‌ای از مواد طبیعی و سنتزی در ساخت زخم‌پوش مورد استفاده قرار می‌گیرند. از جمله مواد طبیعی که در سال‌های اخیر مورد توجه محققین این حوزه قرار گرفته است، پلیمر کیتوسان می‌باشد. کیتوسان محصول داستیلاسیون کیتین منشأ گرفته از سخت‌پوستان است. این بیوپلیمر زیست-سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر بوده که ویژگی‌های اولیه مورد نیاز یک زخم‌پوش می‌باشد. همچنین، خاصیت ضد میکروبی بویژه ضد باکتریایی و ضد قارچی، تسریع روند انعقاد خون، خاصیت آنتی‌اکسیدان، ضد توموری و ماهیت کاتیونیک موجب تمایز غیر قابل اغماض این پلیمر شده است (۱۵، ۲۹، ۳۰). تهیه ساختاری با ماهیت کارآمد بر پایه کیتوسان به عنوان زخم‌پوش یکی از نکات کلیدی می‌باشد. با توجه به ویژگی‌هایی ذکر شده برای زخم‌پوش، هیدروژل‌های تنظیم شونده بواسطه‌ی pH یکی از گزینه‌های مورد توجه محققین می‌باشد (۳۱، ۳۲). هیدروژل ساختاری زیست‌سازگار، منعطف، جاذب رطوبت می‌باشند (۳۱). در میان ساختارهای هیدروژل مطرح شده، هیدروژل‌های تنظیم‌شونده به pH قابلیت بارگذاری ترکیبات زیست‌فعال را دارا می‌باشند (۳۲). یکی از ترکیبات زیست‌فعال مورد توجه در تهیه زخم‌پوش عصاره بدست آمده از گیاه میخک (CEO) است. ساختار هیدروژل CS تهیه شده با استفاده از تنظیم pH و تلفیق شده با CEO بواسطه‌ی تصویر SEM (شکل ۱a) مورد مطالعه قرار گرفت. براساس تصویر شکل ۱a، افزوده شدن CEO موجب افزایش اندازه منافذ نسبت به نمونه فاقد CEO شده است. همچنین بر

اساس نمودار طیف جذبی FTIR و وجود تغییر در پیک‌های جذبی در نمونه حاوی CEO در طول موج-های 1609 cm^{-1} و 3591 که مربوط به گروه عاملی ائوژنول است، نسبت به هیدروژل CS تأیید کننده تلفیق و حضور CEO در هیدروژل تهیه شده است (۲۰) (شکل ۱b). وجود عفونت‌های مقاوم به درمان آنتی‌بیوتیکی در مراکز درمانی نیاز به وجود خاصیت ضد باکتریایی قوی در زخم‌پوش بدون بکارگیری آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی برای درمان بیماران با آسیات پوستی مورد توجه است (۲۰). استفاده از ماده‌ای بجز داروهای آنتی‌بیوتیک رایج جز اولویت‌های تحقیقاتی می‌باشد. ترکیبات موثر بدست آمده از CEO علاوه بر تامین خاصیت ضد میکروبی چشم‌گیر تامین‌کننده ویژگی ضد التهابی نیز می‌باشند. دو مشخصه ضد میکروبی و ضد التهابی در CEO موجب استفاده گسترده از این ترکیب در حوزه‌های مختلف زیست پزشکی شده است (۲۶، ۳۳، ۳۴). در مطالعه در سال ۲۰۱۹، از نانوفیبرهای الکتروریسی شده‌ی پلی-کاپرولاکتون/ژلاتین حاوی روغن میخک به عنوان زخم‌پوش استفاده شد. در این مطالعه روغن میخک جهت ایجاد ویژگی ضد باکتریایی استفاده شد. در این مطالعه افزایش غلظت روغن میخک موجب افزایش مهار رشد باکتری *E. coli* با افزایش زمان تیمار شده است. این در حالی است که در مورد باکتری *S. aureus* تا ۶ ساعت نخست روند کاهش رشد باکتری را مشاهده می‌کنیم ولی پس ۲۴ ساعت از گذشت تیمار میزان مهار رشد نسبت به ۶ ساعت کمتر شده است (۳۳). در مطالعه حاضر استفاده هم‌زمان دو ترکیب با پتانسیل ضد میکروبی پلیمر کیتوسان (CS) و عصاره میخک (CEO) موجب اثر هم‌افزایی در تامین ویژگی ضد باکتریایی می‌گردد. در نتایج تست ضد باکتریایی نیز (شکل ۲)، اثر مهار رشد و تکثیر باکتری در هر یک از ترکیبات به تنهایی و هیدروژل

شده فاقد سمیت برای سلول L929 بوده و به‌طور فعال از رشد باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* جلوگیری کرده است. براساس نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر هیدروژل CS/CEO حساس به pH علاوه بر زیست‌سازگاری دارای ظرفیت آنتی‌باکتریایی می‌باشد. وجود مشخصه ضدباکتریایی با بهره‌گیری از ترکیبات طبیعی می‌تواند راه‌حلی امیدبخش برای کاهش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی در حوزه زیست پزشکی باشد. ساختار هیدروژل CS/CEO دارای قابلیت استفاده بعنوان زخم‌پوش در مطالعات تکمیلی در محیط درون‌تنی (in vivo) می‌باشد.

منابع

1. Anjum S, Arora A, Alam MS, Gupta B. Development of antimicrobial and scar preventive chitosan hydrogel wound dressings. *Int J Pharm.* 2016;508(1-2):92-101.
2. Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, Han C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials.* 2003; 24(26):4833-4841.
3. Akbari A, Rabbani S, Irani S, Zandi M, Sharifi F, Ameli F, Mohamadali M. In vitro and in vivo study of carboxymethyl chitosan/polyvinyl alcohol for wound dressing application. *J Appl Polym Sci.* 2022; 139(10):51764.
4. Khorasani MT, Joorabloo A, Adeli H, Milan PB, Amoupour M. Enhanced antimicrobial and full-thickness wound healing efficiency of hydrogels loaded with heparinized ZnO nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *Int J Biol Macromol.* 2021;166:200-212..
5. Adeli H, Khorasani MT, Parvazinia M. Wound dressing based on electrospun PVA/chitosan/starch nanofibrous mats: Fabrication, antibacterial and cytocompatibility evaluation and in vitro

تلفیقی (CS/CEO) به‌وضوح قابل‌مشاهده است. تمامی ساختارهای تهیه شده در زمینه زخم‌پوش نیاز به تأیید زیست‌سازگاری در شرایط برون تنی (in vitro) دارند. در این مطالعه از رده سلول فیروبیلاست موشی (L929) استفاده گردید. بر اساس تصاویر میکروسکوپی بدست آمده از تیمار سلول‌های L929 با هیدروژل CS/CEO هیچگونه سمیت سلولی مشاهده نشد (شکل ۳a). در ادامه بررسی از آزمون MTT برای تعیین میزان زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده با هیدروژل CS/CEO در بازه زمانی ۲۴ تا ۷۲ ساعت در برابر نمونه سلول L929 کشت شده در کف پلیت مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نمودار ارائه شده در تصویر ۳b، سلول‌های تیمار شده با هیدروژل CS/CEO دارای روند رشد فزاینده بوده است. به‌طوریکه در بازه زمانی ۲۴ تا ۷۲ ساعت دارای سطح معنی‌داری ($p > 0/001$) می‌باشد. در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۲۱، سلول فیروبیلاستی بر روی نانوالیاف کیتوسان/پلی‌اتیلن‌اکساید حاوی عصاره میخک برای مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. در نمونه حاوی عصاره میخک فاقد تفاوت معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل است (۳۴). در مطالعه حاضر سه بازه زمانی بویژه ۲۴ ساعت نخست برای بررسی دقیق ویژگی‌های هیدروژل تهیه شده در برابر سلول‌های فیروبیلاست بعنوان مطالعات پایه جهت تعمیم به مطالعات درون تنی (in vivo) در نظر گرفته شد (شکل ۳b).

نتیجه‌گیری

عصاره میخک (CEO) بارگذاری شده درون هیدروژل بمنظور ارتقا ویژگی‌های هیدروژل تهیه شده از پلیمر کیتوسان با موفقیت انجام شد. ویژگی‌های ساختاری و شیمیایی هیدروژل CS/CEO بواسطه‌ی آزمون‌های SEM و FTIR بررسی شد. ساختار هیدروژل تهیه

- Hassan MA. Development of Polyvinyl Alcohol/Kaolin Sponges Stimulated by Marjoram as Hemostatic, Antibacterial, and Antioxidant Dressings for Wound Healing Promotion. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23): 13050.
15. Moeini A, Pedram P, Makvandi P, Malinconico M, Gomez d'Ayala G. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. *Carbohydr Polym.* 2020; 233:115839..
16. Sharifi F, Hasani M, Atyabi SM, Yu B, Ghalandari B, Li D, et al. Mesenchymal stem cells encapsulation in chitosan and carboxymethyl chitosan hydrogels to enhance osteo-differentiation. *Mol Biol Rep.* 2022; 49(12):12063-12075..
17. Zhang M, Yang M, Woo MW, Li Y, Han W, Dang X. High-mechanical strength carboxymethyl chitosan-based hydrogel film for antibacterial wound dressing. *Carbohydr Polym.* 2021;256:117590.
18. Caldwell MD. Bacteria and Antibiotics in Wound Healing. *Surg Clin North Am.* 2020; 100(4):757-776.
19. Zhang J, Ge J, Xu Y, Chen J, Zhou A, Sun L, Gao Y, Zhang Y, Gu T, Ning X. Bioactive multi-engineered hydrogel offers simultaneous promise against antibiotic resistance and wound damage. *Int J Biol Macromol.* 2020; 164:4466-4474..
20. Banerjee K, Madhyastha H, Sandur VR, Manikandanath NT, Thiagarajan N, Padma T. Anti-inflammatory and wound healing potential of a clove oil emulsion. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2020; 193:111102.
21. Ali R, Khamis T, Enan G, El-Didamony G, Sitohy B, Abdel-Fattah G. The healing capability of clove flower extract (CFE) in streptozotocin-induced (STZ-induced) diabetic rat wounds infected with multidrug resistant bacteria. *Molecules.* 2022;27(7): 2270.
22. Mohammadnezhad J, Khodabakhshi-Soreshjani F, Bakhshi H. Preparation and healing assay. *Int J Biol Macromol.* 2019; 122:238-254.
6. Kabirkoochian A, Bakhshi H, Irani S, Sharifi F. Chemical Immobilization of Carboxymethyl Chitosan on Polycaprolactone Nanofibers as Osteochondral Scaffolds. *Appl Biochem Biotechnol.* 2023;195(6):3888-3899.
7. El-Samad LM, Hassan MA, Basha AA, El-Ashram S, Radwan EH, Abdul Aziz KK, Tamer TM, Augustyniak M, El Wakil A. Carboxymethyl cellulose/sericin-based hydrogels with intrinsic antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory properties promote re-epithelization of diabetic wounds in rats. *Int J Pharm.* 2022; 629:122328.
8. Feng W, Wang Z. Biomedical applications of chitosan-graphene oxide nanocomposites. *iScience.* 2021; 25(1):103629.
9. Mourya VK, Inamdar NN, Tiwari A. Carboxymethyl chitosan and its applications. *Advanced Materials Letters, Review Article Adv. Mat. Lett.* 2010; 1(1):11-33.
10. Fei Liu X, Lin Guan Y, Yang DZ, Li, Z. Yao KD. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J Appl Polym Sci.* 2001;79(7):1324-1335.
11. Li B, Cui J, Xu T, Xu Y, Long M, Li J, Liu M, Yang T, Du Y, Xu Q. Advances in the preparation, characterization, and biological functions of chitosan oligosaccharide derivatives: A review. *Carbohydr Polym.* 2024;332:121914.
12. Dreiss CA. Hydrogel design strategies for drug delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2020;48:1-17.
13. Zhou Y, Yang H, Liu X, Mao J, Gu S, Xu W. Electrospinning of carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol)/silk fibroin nanoparticles for wound dressings. *Int J Biol Macromol.* 2013;53:88-92.
14. Tamer TM, Alsehli MH, Omer AM, Afifi TH, Sabet MM, Mohy-Eldin MS,

- Hydrogels for Skin-Wound Dressings. *Gels*. 2024;10(3):175.
29. Sivanesan I, Hasan N, Muthu M, Blessing G, Gopal J, Chun S, Shin J, Oh JW. Exploring the impact of chitosan composites as artificial organs. *Polymers*. 2022;14(8):1587.
 30. Shah A, Ashames AA, Buabeid M A, Murtaza G. Synthesis, in vitro characterization and antibacterial efficacy of moxifloxacin-loaded chitosan-pullulan-silver-nanocomposite films. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2020;55:101366.
 31. Omid M, Yadegari A, Tayebi L. Wound dressing application of pH-sensitive carbon dots/chitosan hydrogel. *RSC Adv*. 2017;7(18):10638-49.
 32. Arafa AA, Nada AA, Ibrahim AY, Sajkiewicz P, Zahran MK, Hakeim OA. Preparation and characterization of smart therapeutic pH-sensitive wound dressing from red cabbage extract and chitosan hydrogel. *Int J Biol Macromol*. 2021;182:1820-1831.
 33. Unalan I, Endlein SJ, Slavik B, Buettner A, Goldmann WH, Detsch R, Boccaccini AR. Evaluation of electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofiber mats containing clove essential oil for antibacterial wound dressing. *Pharmaceutics*. 2019;11(11):570.
 34. Hameed M, Rasul A, Waqas MK, Saadullah M, Aslam N, Abbas G, et al. Formulation and evaluation of a clove oil-encapsulated nanofiber formulation for effective wound-healing. *Molecules*, 2021; 26(9):2491.
 - evaluation of chitosan-coated eggshell particles as copper (II) biosorbent. *Desalin. Water Treat*. 2016; 57(4):1693-1704.
 23. Ray M, Pal K, Anis A, Banthia AK. Development and characterization of chitosan based polymeric hydrogel membranes. *Des. Monomers Polym*. 2010; 13(3):193-206.
 24. Sharifi F, Atyabi SM, Norouzi D, Zandi M, Irani S, Bakhshi H. Polycaprolactone/carboxymethyl chitosan nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering application. *Int J Biol Macromol*. 2018;115:243-248.
 25. González-Rivera J, Duce C., Falconieri D, Ferrari C, Ghezzi L, Piras A, et al. Coaxial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove buds): Chemical composition and thermal analysis. *Innovative Food Sci Emerg Technol*, 2016;33:308-318.
 26. Parham S, Zargar Kharazi A. Cellulosic textile/clove nanocomposite as an antimicrobial wound dressing: In vitro and in vivo study. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2022;217:112659.
 27. Liang H, Mirinejad MS, Asefnejad A, Baharifar H, Li X, Saber-Samandari S, et al. Fabrication of tragacanthin gum-carboxymethyl chitosan bio-nanocomposite wound dressing with silver-titanium nanoparticles using freeze-drying method. *Mater Chem Phys*. 2022;279(10):125770
 28. Guo W, Ding X, Zhang H, Liu Z, Han Y, Wei Q, Okoro OV, Shavandi A, Nie L. Recent Advances of Chitosan-Based

Research Article**A Survey on Gastrointestinal Helminths of *Cynogossus bilineatus* Caught from the Coasts of Bandar Abbas****Abdolhossein Dalimi^{1*}, Karaneh Parizadeh²**

1- Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University,
P.O.Box:14115-331, Tehran, Iran

2- Payame Noor University, Qeshm International Branch, Qeshm, Iran

*Corresponding author: dalimi_a@modares.ac.ir

Received: 26 February 2025

Accepted: 20 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1200536

Abstract

Studying helminth parasites of the digestive tract of fish can complete our information about parasite distribution, host characteristics, and food safety, especially regarding edible fish in the Persian Gulf. The aim of this study was to investigate helminth parasites in the digestive tract of *Cynogossus bilineatus* caught off the coast of Bandar Abbas. For this purpose, the digestive tract of 50 *C. bilineatus* was examined during the summer of 2017 in Bandar Abbas. After procuring the fishes, they were transferred to the laboratory and different parts of their bodies were measured for morphometric study. Then whole digestive tract of the fishes was removed, opened with a small scissor into a dish and the content digestive tract and body cavity searched for the presence of helminth. Finally, the parasites were then stained and identified with the help of reliable sources. The helminthic parasites that were recovered from the digestive tract of the fishes were identified as follows: The trematodes *Lepocreadioides zebrini* and acanthocephalan *Hemiradinorhynchus leuciscus* were recovered from *C. bilineatus* with 10% and 2% infection rate respectively. In addition, cestodes *Scolex pleuronectis*, *Trypanorhyncha* larvae, as well as *Anisakis* sp each with a 2% infection rate were isolated from *C. bilineatus*. All these parasites are reported for the first time from *C. bilineatus* caught from the coasts of the Persian Gulf. The finding of *Scolex pleuronectis*, *Trypanorhyncha* larvae, and *Anisakis* sp. as new records for *C. bilineatus* highlights the importance of continued parasitological surveys to better understand the biodiversity and ecological relationships within this marine environment.

Keywords: *Cynogossus bilineatus*, Helminth parasites, *Anisakis*, Bandar Abbas.



بررسی انگل‌های کرمی دستگاه گوارش ماهی کفشک زبان گاوی (*Cynoglossus bilineatus*)

صید شده از سواحل بندر عباس

عبدالحسین دلیمی^{۱*}، کرانه پری‌زاده^۲

۱- گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشگاه پیام نور، واحد بین‌الملل قشم، قشم، ایران

*مسئول مکاتبات: dalimi_a@modares.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۰۸

DOI: 10.60833/ascij.2025.1200536

چکیده

بررسی انگل‌های کرمی دستگاه گوارش ماهیان می‌تواند اطلاعات ما را در مورد انتشار انگل، ویژگی میزبان و سلامت مواد غذایی به ویژه در مورد ماهیان خوراکی خلیج فارس کامل نماید. هدف از انجام این مطالعه، بررسی انگل‌های کرمی دستگاه گوارش ماهی کفشک زبان گاوی صید شده در سواحل بندرعباس بوده است. بدین منظور دستگاه گوارش ۵۰ قطعه ماهی کفشک زبان گاوی در طول فصل تابستان سال ۹۶ در بندرعباس مورد بررسی قرار گرفت. ماهیان پس از تهیه به آزمایشگاه منتقل شدند و قسمت‌های مختلف بدن آن‌ها برای بررسی مورفومتریک اندازه‌گیری شد. سپس کل دستگاه گوارش ماهی‌ها از بدن خارج و با قیچی کوچک در ظرف باز شد و محتویات دستگاه گوارش و حفره بدن برای وجود کرم جستجو شد. سپس انگل‌ها رنگ‌آمیزی و با کمک منابع معتبر شناسایی شدند. انگل‌های کرمی که از دستگاه گوارش کفشک زبان گاوی جداسازی و شناسایی شدند شامل ترماتودهای *Lepocreadioides zebrini* و آکانتوسفال *Hemiradinorhynchus leuciscus* به ترتیب با میزان آلودگی ۱۰ و ۲ درصد بوده‌اند. علاوه بر این، سستود *Scolex pleuronectis*، لارو *Trypanorhyncha* و همچنین *Anisakis sp* هر کدام با میزان آلودگی ۲ درصد از کفشک زبان گاوی تشخیص داده شدند. همه این انگل‌ها برای اولین بار از کفشک زبان گاوی صید شده از سواحل خلیج فارس گزارش می‌شوند. گزارش این انگل برای اولین بار از کفشک زبان گاوی، بر اهمیت ادامه بررسی‌های انگلی برای درک بهتر تنوع زیستی و روابط اکولوژیکی در این محیط دریایی تاکید دارد.

کلمات کلیدی: ماهی کفشک زبان گاوی، انگل‌های کرمی، آنیز/کیس، بندرعباس.

مقدمه

بسیار کوچک با فاصله کم هستند. دارای دهان ناتقارن، کوچک و فک پایینی غیربرجسته است. دندان‌ها در هر دو فک ریز و معمولاً فقط در طرف بدون چشم رشد یافته است. باله دمی پیوسته به باله مخرجی و پشتی باله شکمی سمت راست، اغلب توسعه نیافته، فاقد باله سینه‌ای، شروع باله پشتی

ماهی زبان یا کفشک زبان گاوی از خانواده زبان‌ماهیان به راسته پهن‌ماهی‌شکلان (Pleuronectiforms) تعلق دارد. نام علمی آن *Cynoglossus bilineatus* می‌باشد. خانواده زبان‌ماهیان معمولاً در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری پراکنده هستند. از لحاظ خصوصیات ظاهری، هر دو چشم در سمت چپ سر، چشم‌ها

جلوتر یا همسطح چشم پایینی است. تعداد مهره‌ها ۳۳ تا ۶۶ عدد است. طول آن‌ها به ۴۸ سانتی‌متر می‌رسد اما اغلب زیر ۳۰ سانتی‌متر هستند. رنگ آن‌ها قرمز مایل به قهوه‌ای، یک خال سیاه رنگ تیره بر روی پوشش آبششی آن‌ها وجود دارد. ماهی‌های زبانی در آب‌های گرم همه اقیانوس‌ها (بین عرض جغرافیایی ۴۰ درجه) یافت می‌شوند. بیشتر گونه‌ها در آب‌های کم عمق یا خورها زندگی می‌کنند. بسیاری از گونه‌ها از نظر تجاری اهمیت دارند. اغلب گونه‌ای این خانواده در رودخانه‌ها حضور دارند. تغذیه آن‌ها از بی‌مهرگان کفزی می‌باشد. حرکت آن‌ها بسیار کند است. صید آن‌ها از طریق ترال کفروب و رشته قلاب طویل انجام می‌شود (۱). تا کنون شش گونه از خانواده زبان ماهیان از آب‌های خلیج فارس و دریای عمان گزارش شده است که شامل زبان گاوی درشت پولک یا *Cynoglossus arel*، زبان گاوی چهارخط یا *C. bilineatus*؛ زبان گاوی خالدار یا *C. puncticeps*، زبان گاوی فلابدار *C. carpenter*، زبان گاوی سر کوچک *C. kopsii* و زبان گاوی دو خطه *Paraplagusia bilineata* است (۲). ماهیان همواره در معرض انواع آلودگی انگلی قرار دارند. برخی از این انگل‌ها اختصاصاً در ماهی یافت می‌شوند و سلامت آن را در معرض خطر قرار می‌دهند و برخی دیگر ماهی را بعنوان میزبان واسط برمی‌گزینند و به انسان و حیوانات منتقل می‌شوند. گرچه تحقیقات فراوانی در زمینه تشخیص انگل‌های آبزیان در جهان صورت گرفته است ولی در ایران گرچه تحقیقات در این زمینه از قدمت زیادی برخوردار نیست. ولی مطالعات خوبی در خصوص جداسازی و شناسایی انگل‌ها از ماهیان منابع آب‌های داخلی و دریایی کشور صورت گرفته است. در مورد کفشک زبان گاوی چهار خط یا *C. bilineatus* نیز تحقیقات بسیار کم صورت گرفته است. تنها مطالعه انجام شده در این

خصوص مربوط به بررسی عضدی و همکاران در سال ۲۰۱۷ است. در این بررسی، ۸۲ درصد از ماهیان کفشک زبان گاوی خریداری شده از بازار اهواز دارای آلودگی کرمی بوده‌اند. در این مطالعه دو گونه ترماتود و سه گونه نماتود گزارش شده است (۳). اصولاً درک جامع از انگل‌های کفشک زبان گاوی و دیگر گونه‌های ماهی در خلیج فارس برای مدیریت مؤثر شیلات و تلاش‌های حفاظتی حیاتی است. مطالعه فون انگل گونه‌های ماهی خلیج فارس، به‌ویژه ماهیان خوراکی، می‌تواند اطلاعات ما را در زمینه انتشار انگل، ویژگی میزبانان انگل و سلامت و بهداشت مواد غذایی ناشی از مصرف ماهیان را کامل نماید. هدف از این مطالعه، بررسی انگل‌های کرمی دستگاه گوارش ماهی کفشک زبان گاوی صید شده در سواحل بندرعباس بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: در این پژوهش نمونه‌برداری از ماهیان در فصل تابستان (تیر و مرداد ۱۳۹۶) صورت گرفت. تعداد ۵۰ نمونه ماهی کفشک زبان گاوی از صیادان بندرعباس بصورت تصادفی خریداری شد.

زیست‌سنجی ماهیان: بعضی از خصوصیات قابل اندازه‌گیری ماهیان با خط‌کش و ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. این خصوصیات شامل طول استاندارد، طول کل، وزن کل، طول باله پشتی، طول باله شکمی، طول باله دم، طول باله مخرجی، طول باله سینه‌ای، فاصله بین دو چشم، قطر چشم، قاعده باله پشتی، قاعده باله شکمی، قاعده باله دم، قاعده باله مخرجی، قاعده باله سینه‌ای، فاصله پوزه تا چشم، فاصله بین خط جانبی می‌باشد. در هنگام استفاده از تخته اندازه‌گیری و ترازوی دیجیتال، تمام سطوح فلزی آن‌ها که در تماس با ماهی بودند توسط ورقه پلاستیکی پوشانده شده بود و این عمل برای هر ماهی

تکرار گردید.

شناسایی انگل: پس از شکافتن شکم ماهی، نسبت به جداسازی روده اقدام شد روده ها بوسیله قیچی باز شد سپس محتویات روده را در یک پلیت ریخته و به کمک استریومیکروسکوپ انگل‌های کرمی جستجو گردید. در صورت مشاهده انگل آن را بوسیله سوزن و یا پی پت پاستور جدا می‌شد. جهت فیکس نمودن انگل‌ها از فرمالین ۵ درصد و یا الکل اتانول ۷۰ درجه استفاده شد. برای شناسایی انگل جداشده، آن را روی یک لام تمیز داده، یک قطره رنگ آزوکارمن به آن اضافه کرده و روی آن لامل قرار می‌دهیم و با توجه به خصوصیات مرفولوژیک، انگل با استفاده از منابع معتبر بین‌المللی شناسایی گردید (۴، ۵، ۶، ۷). پس از شناسایی، از انگل عکس گرفته و مشخصات مرفولوژیک آن یادداشت و با دستگاه کامالوسیدا ترسیم گردید. در نهایت انگل با استفاده از الکل، آگیری و با گزیلول، شفاف و با کانادا بالزام، مونت گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل از زیست-سنجی ماهیان و میزان آلودگی با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون T-Test و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ مورد مقایسه قرار گرفتند. همچنین جهت رسم نمودارها و جداول از نرم‌افزار اکسل استفاده شد. نمونه‌های مختلف از نظر نوع آلودگی از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون T-Test مقایسه گردیدند. برای تعیین وجود ارتباط خطی و میزان آن بین آلودگی ماهیان و مشخصات زیست‌سنجی از آزمون رگرسیون خطی و همبستگی پیرسون و آزمون-های کندال و اسپیرمن استفاده شد.

نتایج

خصوصیات مورفومتریک کفشک زبان‌گاو صید شده در سواحل بندر عباس: در این بررسی طول کل

در گونه‌ی *Cynogossus bilineatus*، $29/36 \pm$ ۲۸/۱۹ میلی‌متر، طول استاندارد $29/24 \pm$ ۲۱۲/۶۷ میلی‌متر، طول باله پشتی $2/02 \pm$ ۱۰/۲۹۹۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. محدوده‌ی اندازه‌گیری برای سایر ویژگی‌های مورفومتریک به طور کامل در جدول ۱ ارائه شده است.

خصوصیات انگل‌های شناسایی شده

Lepocreadioides zebrini Yamaguti, 1936
بیشترین جنس شناسایی شده از کفشک زبان گاوی بوده است این انگل دارای خصوصیات زیر می‌باشد: بدن پهن و بیضوی، تگومنت نازک و بدون خار. طول بدن: ۹۸۰ میکرون، عرض بدن: ۵۸۸ میکرون؛ اندازه تخم: $51/66$ در 50 میکرون، قطر بادکش دهانی: $98/4$ میکرون. قطر بادکش شکمی: ۱۹۰ میکرون، نسبت قطر بادکش شکمی به بادکش دهانی $1:1/93$ ، بیضه بیضی‌شکل، درکنارهم، قطر بیضه‌ها: ۱۵۵ در $196/8$ میکرون، کیسه سیربلند و در کنار بادکش دهانی باز می‌شود. طول آن: $196/8$ میکرون قطر فارنکس: $66/4$ در $41/8$ میکرون، غدد ویتلین از بالای بادکش شکمی و از محل انشعاب سکوم شروع و تا انتهای بدن ادامه دارد (شکل ۱).

Scolex pleuronectis Müller, 1788
میزان آلودگی ۲ درصد بوده که خصوصیات زیر را دارا می‌باشد. طول بدن: ۴۸۹ میکرون، عرض بدن: ۳۱۵ میکرون، اندازه تخم: $29/52$ در $17/12$ ، اندازه بادکش‌ها: ۱۴۴ میکرون (شکل ۲).

Trypanorhyncha: لارو سستود با میزان آلودگی ۲ درصد بوده که در شکل ۳ نشان داده شده است.

Anisakis Dujardin, 1845
این نماتود با میزان آلودگی ۲ درصد بوده که خصوصیات زیر را دارا می‌باشد. بدن باریک و کشیده، دارای غلاف و سه لب، طول بدن: ۲،۴۵ میلی‌متر، عرض بدن: $127/4$ میکرون (شکل ۴).

همبستگی بین شاخص‌های مختلف بدن ماهی زبان و آلودگی انگلی: با توجه به آزمون همبستگی نتایج نشان داد که بین شاخص‌های مختلف بدن ماهی زبان (وزن، طول بدن و نسبت وزن به ابعاد بدن) و آلودگی انگلی، هیچ گونه همبستگی وجود ندارد (جدول ۳). بر طبق این جدول رابطه معنی‌دار با $p \leq 0.05$ فقط در موارد فاصله پوزه تا منفذ آبششی و فاصله پوزه تا باله پشتی وجود دارد.

Hemirhadinorhynchus leuciscus Krotov & Petrochenko, 1956. این آکانتاسفال با میزان آلودگی ۲ درصد بوده که خصوصیات زیر را دارا می‌باشد. بدن کشیده، پوشش خارجی ضخیم و خاردار، خارها تا انتهای نیمه قدامی بدن ادامه دارد. طول بدن: ۲/۷۸ میلی‌متر، عرض: ۱۶۶ میکرون، طول خرطوم خارج شده: ۱۴۷/۶ میکرون، عرض خرطوم خارج شده: ۶۱/۵ میکرون، خارها در ۱۱ ردیف شش‌تایی، اندازه خار: ۲۰/۳ در ۴۰/۶ میکرون (شکل ۵).

جدول ۱- مشخصات مورفومتریک ماهی‌های زبان صید شده در سواحل بندر عباس

Table 1 Morphometric indicators of tongue soles caught off the coast of in Bandar Abbas coast

Indicators	Size (mm)	
	Average	SE
Total weight (g)	47.63	19.51
Total length (mm)	228.19	29.36
Standard length (mm)	212.67	29.24
Dorsal fin length (mm)	10.99	2.02
Ventral fin length (mm)	11.04	2.21
Distance between eyes (mm)	2.77	2.40
Dorsal fin base (mm)	218.46	27.28
Ventral fin base (mm)	182.02	31.19
Distance from snout to eye (mm)	18.41	3.61

جدول ۲- کرم‌های یافت شده در ۵۰ عدد ماهی زبان *Cynoglossus linnaeus* صید شده در سواحل بندر عباس

Table 2. Helminths found in 50 tongue soles (*Cynoglossus Linnaeus*) caught on the coast of Bandar Abbas

Parsites	Class	No.	Infection %
<i>Lepocreadioides zebrini</i>	Trematode	5	10
<i>Scolex pleuronectis</i>	Cestode	1	2
<i>Trypanorhyncha</i>	Cestode	1	2
<i>Anisakis sp.</i>	Nematode	1	2
<i>Hemirhadinorhynchus leuciscus</i>	Acanthocephala	1	2

جدول ۳- مشخصات مورفومتریک ماهی‌های زبان آلوده و غیرآلوده به انگل کرمی صید شده در سواحل بندرعباس

Table 3. Morphometric characteristics of tongue sole infected and not infected with helminth parasites caught on the coast of Bandar Abbas

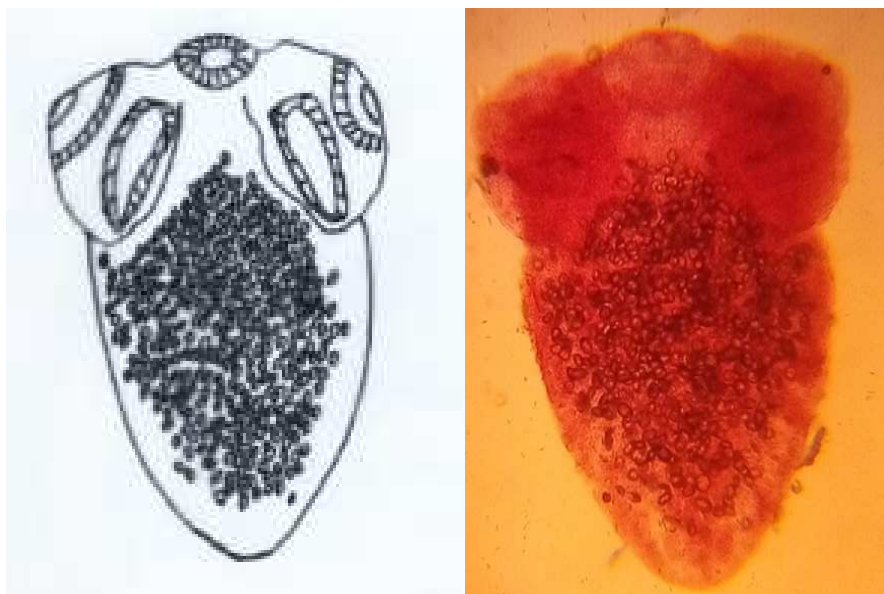
Indecies	Non-infected		Infected		F	p	Correlation
	Mean	SE	Mean	SE			
Total weight (g)	48.14	19.98	44.93	17.74	0.10	0.74	Absent
Total length (mm)	228.19	29.41	228.18	31.15	0.09	0.76	Absent
Standard length (mm)	212.61	29.42	212.93	30.27	0.06	0.79	Absent
Maximum body thickness (mm)	9.04	1.65	8.72	1.67	0.09	0.76	Absent
Dorsal fin base length (mm)	217.28	26.97	224.62	29.98	0.002	0.96	Absent
Ventral fin base length (mm)	183.00	32.11	176.87	27.11	0.59	0.44	Absent
Dorsal fin height (mm)	10.88	1.98	11.59	2.28	0.45	0.50	Absent
Ventral fin height (mm)	11.01	2.21	11.25	2.32	.018	0.89	Absent
Distance from snout to dorsal fin (mm)	14.03	5.46	19.18	3.68	4.64	0.03	Present
Distance from snout to eye (mm)	18.14	3.69	19.82	2.92	0.05	0.81	absent
Distance between two eyes (mm)	2.81	2.61	2.56	.67	0.52	0.47	absent
Left eye diameter (mm)	3.38	.79	3.66	1.04	1.01	0.31	absent
Right eye diameter (mm)	3.09	1.00	3.00	1.41	0.81	0.37	absent

Lateral line to ventral fin distance	24.49	4.54	27.75	6.87	1.78	0.18	Absence
Distance from lateral line to dorsal fin	24.25	4.59	25.09	6.76	0.73	0.39	Absence
Distance from snout to gill opening	36.22	14.02	46.81	7.86	4.31	0.04	Present



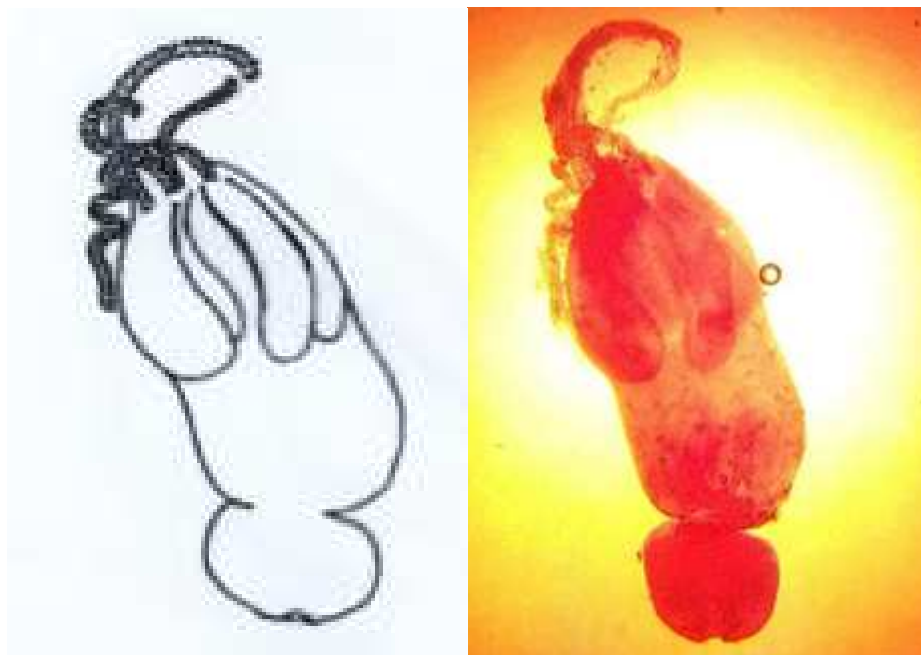
شکل ۱- انگل *Lepocreadioides zebrini*

Fig. 1. *Lepocreadioides zebrine*



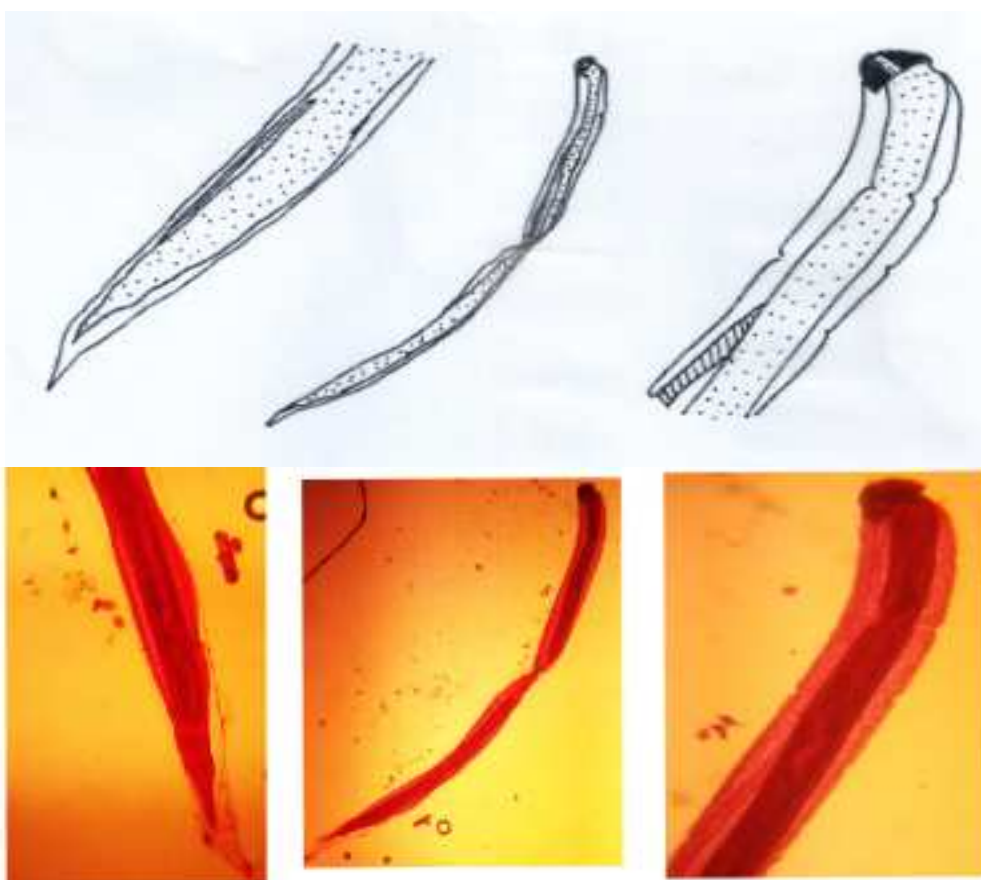
شکل ۲- انگل *Scolex pleuronectis*

Fig. 2. *Scolex pleuronectis* parasite



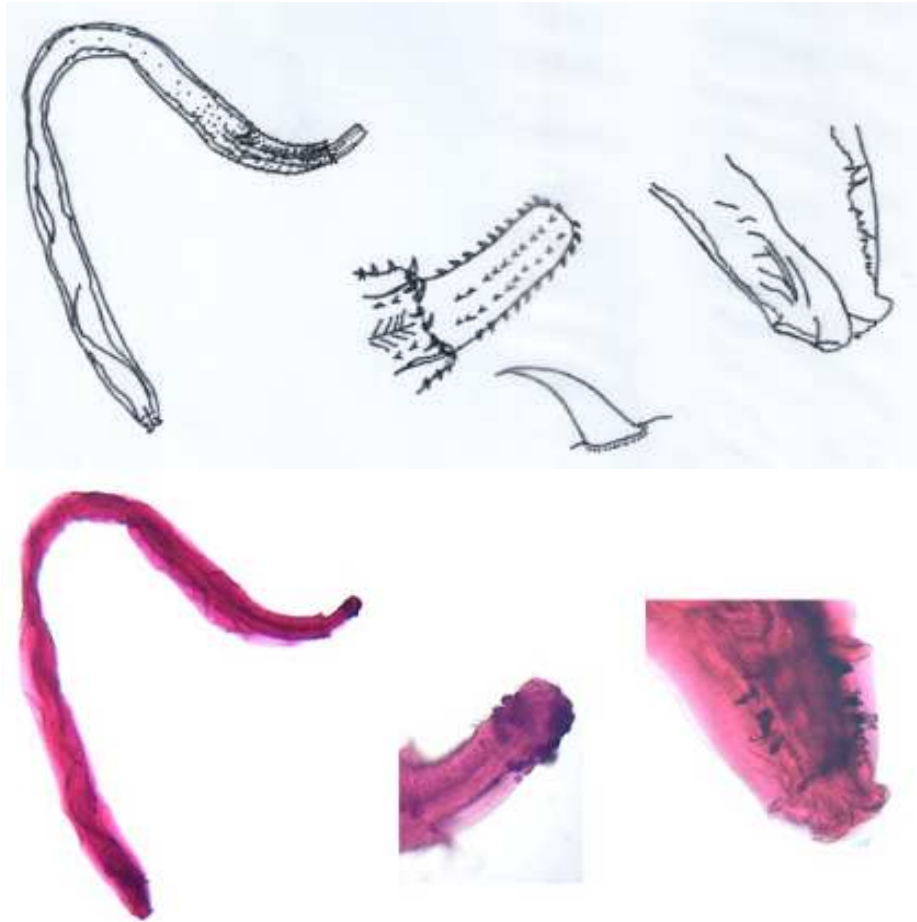
شکل ۳- انگل *Trypanorhyncha*

Fig. 3. *Trypanorhyncha*



شکل ۴- انگل *Anisakis* sp.

Fig. 4. *Anisakis* sp.



شکل ۵- انگل *Hemiradinorhynchus leuciscus*
Fig. 5. Parasite *Hemiradinorhynchus leuciscus*

بحث

آلودگی و سستود *Scolex pleuronectis* با میزان ۲ درصد آلودگی و لارو سستود *Trypanorhyncha* با میزان ۲ درصد آلودگی و نماتود *Anisakis sp.* با آلودگی ۲ درصد یافت شد. که بیشترین آلودگی مربوط به انگل ترماتود *Lepocreadioides zebrini* می‌باشد. این در حالی است که در بررسی عضدی و همکاران در سال ۲۰۱۷، دو نوع ترماتود *Treptodemoides fukenensis* و *Aphanuroides lethrini* و چهار گونه از نماتدهای *Capillaria*، *Procaecum* و *Raphidascaroides nipponensis* از دستگاه

طبق بررسی به عمل آمده مطالعات انگلی و مورفومتریک بسیار کمی بر روی کفشک زبان گاوی صورت گرفته است و این تحقیق جز معدود تحقیقات بروی این گونه از ماهیان است. با توجه به اهمیت کفشک زبان گاوی از لحاظ پرطرفدار بودن و اهمیت اقتصادی بالای آن در حاشیه خلیج فارس (۸). مطالعه حاضر برای تعیین آلودگی انگلی این ماهی صورت گرفت. طی این مطالعه انواع مختلفی از انگل‌های کرمی، شامل ترماتود *Lepocreadioides zebrini* با میزان آلودگی ۱۰ درصد و آکانتوسفال *Hemiradinorhynchus leuciscus* با میزان ۲ درصد

گوارش، کبد و حفره شکمی کفشک زبان گاوی خریداری شده از بازار اهواز گزارش شده است. نتایج این دو گزارش کاملاً متفاوت است. با توجه به اینکه عمده ماهی‌های بازار اهواز از سواحل جنوب خوزستان تامین می‌شود وجود این تفاوت چندان دور از ذهن نیست. نماتود آنیزاکیس شناسایی شده در مطالعه حاضر، تنها انگل قابل سرایت به انسان از طریق مصرف ماهی نیمه خام یا خام است که بیماری آنیزاکیزیس را ایجاد می‌کند. آنیزاکیس بیشتر معده انسان را درگیر می‌کند. معمولاً ۴۸ ساعت پس از مصرف ماهی خام و یا کامل پخته نشده آلوده به انگل، علائم بیماری ظاهر می‌شوند. ولی الگوی بیماری، بسیار متنوع می‌باشد. علائم بیماری بصورت درد شکمی شدید، تهوع، استفراغ و گاهی شبیه آپاندیسیت است. بیماری می‌تواند مزمن شود و گاهی برای ماه‌ها به طول می‌انجامد. این علائم با توده‌های معدی حاوی انگل توأم هستند و گاهی با تومور معدی و آنتریت قابل اشتباه است. لارو آنیزاکیس در غذاهای دریایی گاهی موجب تولید تظاهرات آلرژیک حاد مانند کهیر، آنژیوادم و آنافیلاکسی با و بدون علائم دستگاه گوارشی، در کسانی که ماهی خام مصرف کرده‌اند، می‌شود. بیش از ۹۵ درصد از موارد بالینی این بیماری در ژاپن گزارش می‌شود و کشورهای اروپایی و آمریکایی مقام بعدی را دارند. این انگل از انواع ماهیان جهان و ایران گزارش شده است (۹، ۱۰، ۱۱). در ایران، انگل مذکور از شانک ماهیان زردباله (۹، ۱۲)، ماهی سرخو (۱۳)، و هامور چرب (۱۲، ۱۴) خلیج فارس و اردک ماهیان (۱۵)، ماهیان خاویاری (۱۶) و ماهی سفید دریای خزر (۱۷) و شیربت کرخه (۱۸) گزارش شده است. تا کنون آلودگی انسانی به این انگل در ایران گزارش نشده است ولی بدلیل شیوع آن در طیف وسیعی از ماهیان آب‌های داخلی و دریایی ایران (۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۶) خطر بالقوه ابتلا

خاصه در مناطقی که مصرف‌کننده‌ی عمده ماهی هستند وجود دارد از طرفی علایم الودگی به این انگل مشابه بسیاری از بیماری‌های گوارشی است. لذا لازم است پزشکان این مناطق توجه خاصی به آن بنمایند. *Scolex pleuronectis* گونه‌ای سستود از راسته‌ی *Tetraphyllidea* می‌باشد. پلروسرکوئیدها و بالغ‌ها دارای اسکولکس حاوی انواع مختلف بوترییدیای قلاب‌دار و مکنده راسی برای اتصال به میزبان هستند. لاروها این انگل می‌توانند در برخی از ماهی‌ها به عنوان متاستودها مستقر شوند و شناسایی گونه آن‌ها در این مرحله از آلودگی دشوار است (۱۹)، (۲۰). گونه‌های مختلف طول ۸/۸ - ۰/۱ میلی‌متر و عرض ۰/۱ - ۰/۴ میلی‌متر دارند (۱۹، ۲۱). معمولاً سخت‌پوستان دریایی میزبان واسط مشترک گونه‌های مختلف این انگل هستند. این انگل‌ها در انواع ماهیان دیادروم، دریایی و آب شور از جمله خانواده‌های *Cottidae*، *Salmonidae* و *Clupeidae* شایع هستند. در ماهی‌ها انگل معمولاً بصورت تک بند و دارای یک مجموعه از اندام‌های تولیدمثل نر و ماده است (۱۹، ۲۲). این انگل تاکنون در ماهیان اقیانوس اطلس، اقیانوس آرام، مدیترانه، دریای سیاه، خلیج سنت لورنس و رودخانه‌هایی در سواحل شرقی آمریکای شمالی و حداقل در ۶۰ گونه ماهی از اقیانوس اطلس گزارش شده است. علاوه بر این، در پستانداران دریایی و بی‌مهرگان مختلف نیز دیده شده است (۱۹، ۲۲، ۲۳). ترماتود *zebrini* *Lepocreadioides* تاکنون از ماهیان ژاپن توسط Yamaguti (۱۹۶۳) و چین توسط Shen و Qiu (۱۹۹۵) گزارش شده بود (۲۴، ۲۵). گرچه این انگل قبلاً توسط Bagherpour و همکاران (۲۰۱۱) و Hosseini و همکاران (۲۰۱۳) از کفشک راست‌گرد (*Brachirus orientalis*) خلیج فارس گزارش شده بود (۲۶، ۲۷) ولی بررسی‌ها نشان می‌دهد که

مراحل لاروی مانند لارو تریپانورینکا، که شناسایی آن‌ها صرفاً بر اساس مورفولوژی می‌تواند چالش برانگیز باشد. داده‌های مولکولی همچنین برای روشن کردن روابط فیلوژنتیکی انگل‌ها و میزبان‌های آن‌ها، ارائه بینش‌های بیشتر در مورد تاریخچه تکاملی و جغرافیای زیستی آن‌ها در خلیج فارس ارزشمند است.

نتیجه‌گیری

بطور کلی، در ماهی کفشک زبان گاوی فقط یک گونه ترماتود *Lepocreadioides zebrini* و دو لارو گونه سستود *Scolex pleuronectis* و *Trypanorhyncha* یک نماتود *Anisakis sp* و یک گونه آکانتوسفال *Hemirhadinorhynchus leuciscus* شناسایی شدند. با توجه به سوابق پژوهش‌های انجام شده در مورد این ماهی، همه فوق‌الذکر برای اولین بار از کفشک زبان گاوی سواحل خلیج فارس گزارش می‌شود. این یافته‌ها تأکیدی بر اهمیت ادامه بررسی‌های انگلی برای درک بهتر تنوع زیستی و روابط اکولوژیکی در این محیط دریایی است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از اعضای هیات علمی و کارکنان محترم گروه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور قشم و گروه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تشکر نمایند.

منابع

1. Menon AGK. A systematic monograph of the tongue soles of the genus *Cynoglossus* Hamilton-Buchanan (Pisces: Cynoglossidae). Smithsonian Contributions to Zoology. 1977;238:1-129. doi.org/10.5479/si.00810282.238.
2. Iranian fishes data resource. The Persian Gulf and the Sea of Oman, Family of Cynoglossidae http://fishbase.ir/persiangulf_gulf_of_oman/Cynoglossidae.html.

ترماتودهای شناسایی شده در کفشک زبان گاوی این مطالعه تاکنون در ایران گزارش نشده‌اند. نتایج حاصل نشان داد که رابطه‌ی معنی بین میزان آلودگی انگلی و مشخصات مورفومتریک کفشک زبان گاوی فقط در فاصله بین پوزه تا باله پشتی با آلودگی انگلی معنی دار است ($p \leq 0.05$). شیوع انگل‌های کرمی در کفشک زبان گاوی نشان دهنده یک شبکه تغذیه‌ای پیچیده در اکوسیستم خلیج فارس است. حضور دو ترماتود بالغ و آکانتوسفال، همراه با لارو سستودی، تریپانورینکا و نماتود آنیزاکیس، نشان می‌دهد که کفشک زبان گاوی احتمالاً به عنوان میزبان واسط و قطعی برای گونه‌های مختلف انگل عمل می‌کند. علاوه بر این، مطالعه فون انگل سایر گونه‌های ماهی در منطقه می‌تواند الگوهای گسترده‌تری از پراکنش انگل و ویژگی میزبان را در خلیج فارس نشان دهد. میزان آلودگی نسبتاً پایین مشاهده شده برای اکثر انگل‌ها، به استثنای *Lepocreadioides zebrini* ممکن است منعکس‌کننده عادات تغذیه‌ای کفشک زبان گاوی، محدودیت در معرض قرار گرفتن با مراحل آلودگی، یا پاسخ‌های ایمنی میزبان باشد. همچنین لازم است تأثیر بالقوه عوامل محیطی، مانند آلودگی و تخریب زیستگاه، بر پویایی انتقال انگل در نظر گرفته شود. این عوامل استرس‌زا می‌توانند در آلودگی کفشک زبان گاوی تأثیر بگذارند و یا دسترسی ماهی به میزبان‌های واسط را تغییر دهند. شناسایی آنیزاکیس در این بررسی، به دلیل پتانسیل انتقال به انسان، نگرانی‌هایی را در مورد خطرات بالقوه برای سلامت انسان مرتبط با مصرف غذاهای دریایی خام یا نیم‌پز از خلیج فارس ایجاد می‌کند. اگرچه میزان آلودگی در کفشک زبان گاوی کم بود، ولی پخت و انجماد صحیح ماهی برای از بین بردن خطر آلودگی انسان ضروری است. مطالعات آتی باید بر روی استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای شناسایی دقیق‌تر انگل‌ها تمرکز یابند، به‌ویژه برای

Pathobiol. 11(4):1437-1446. [In Persian]

13. Mokhayr B. Observation of false tongue in redfish (*Lutjanus johnii*) and some other fish of the Persian Gulf, Vet Fac Lett. 1974;30(4):61-75. [In Persian]

14. Payghan R, Haghoghi-Rad N, Yousef Dezfouli A. Investigation of the infection of Silver pomfret (*Pampus argenteus*) and fat grouper (*Epinephelus tauvina*) in the Persian Gulf with helminth parasites. Pazhohesh va Sazandegi. 2004;62:49-55. [In Persian]

15. Eslami A, Mokhayer B. Nematode larvae of medical important found in market fish in Iran. Pahlavi Med J. 1977;8(3):345-348.

16. Mokhayr B. List of parasites of Iranian sturgeon, Vet Fac Bull. 1973;29(1):1-11.

17. Eslami A, Kokneshahri M. Study on the helminthiasis of *Rutilus frisii kutum* from south Caspian Sea. Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia, 1978;70:153-155.

18. Mesbah M., Razi Jalali M.H., Alishahi M., Akbarzadeh A. Investigation of infection of Karkheh *Barbus grypus* with nematodes common to humans. Iran Vet J. 2010;6(3):20-27. [In Persian]

19. Anantaraman S. Larval cestodes in marine invertebrates and fishes with a discussion of the life cycles of the Tetraphyllidea and the Trypanorhyncha. Zeitschrift für Parasitenkunde. 1963; 23:309-314.

20. Fernandez M, Javier Aznar F, Montero FE, Georgiev BB, Raga JA. Gastrointestinal helminths of Cuvier's beaked whales, *Ziphius cavirostris*, from the western Mediterranean. J Parasitol. 2004;90(2):418-420.

21. Chambers C.B., Cribb T.H., Jones M.K. Tetraphyllidean metacestodes of teleosts of the Great Barrier Reef, and the use of in vitro cultivation to identify them. Folia Parasitologica. 2000;47:285-292.

3. Azodi M, Peyghan R, Razi Jalali MH, Ghorbanpour M. Investigation on worm infestation of digestive tract in Persian gulf *Cynoglossus bilineatus*. Vet Res Biol Prod. 2017;30(4):114-124.

4. Schmidt GD. How to know the tapeworms. Wm C. Brown Company Publishers, USA. 1970.

5. Yamaguti S. The digenetic trematodes of vertebrates Part I and II, in Systema helminthum Volume I, (New York) 1958; Pp:1141-1143.

6. Yamaguti S. The nematodes of vertebrates, in Systema Helminthum Volume III (John Wiley and Sons, New York), 1961.

7. Yamaguti S. Acanthocephala in Systema Helminthum, Volume V, (Interscience Publication, New York), 1971.

8. Parvaneh M, Khaivar N, Nikpour Y, Nabavi SM. Heavy metals (Hg, Cd, Pb, Ni, Cu) concentrations in *Euryglossa orientalis* and sediments from Khur-e-Musa Creek in Khuzestan Province. Iran Sci Fish J. 2011; 20(2):17-26.

9. Payghan R, Nabavi L, Kiani F. Infection of yellowfin tuna (*Acanthopagrus latus*) and two-banded tuna in the Persian Gulf with helminth parasites. J Sci Shahid Chamran Univ. 2008;19:111-123. [In Persian]

10. Sharples AD, Evans CW. Taxonomy of the metazoan parasites of the snapper *pagrus auratus* in New Zealand Ectoparasites. New Zealand J Zool. 1995; 2:143-161.

11. Yamaguti S. Studies on the helminthes fauna of Japan. Pt 9. Nematodes of fishes. Japanese Society of Zoo and Wildlife Medicine, 1934;6:334-386.

12. Rasouli S. 2014. Investigation of parasitic nematodes of the Anizakidae family in the yellowfin tuna (*Acanthopagrus latus*) from the northern coast of the Persian Gulf, Iran. Comp

25. Yamaguti S. Studies on the helminth fauna of Japan. Part 16. Trematodes of fishes, III. Published by the author, Kyoto. 1936; pp:1-6.
26. Bagherpour A, Afsharnasab M, Mobedi I, Jalali B, Mesbah M. Prevalence and intensity of internal parasitic helminthes infected black sole fish, *Brachirus orientalis* (Bloch and Schneider, 1801) in the Persian Gulf. Iran J Fish Sci. 2011;10(4):570-584.
27. Hosseini SH, Alinezhad S, Mobedi I, Halajian A, Karimi E, Ahoo MB, Yasemi M. Study on the parasites of *Pseudorhombus elevatus*, *Psettodes erumei* and *Brachirus orientalis* from the Persian Gulf, Iran. Iran J Fish Sci. 2013;12(4): 827-835.
22. Pronin NM, Fleischer GW, Baldanova DR, Pronina SV. Parasites of the recently established round goby (*Neogobius melanostomus*) and tubenose goby (*Proterorhinus marmoratus*) (Gobiidae) from the St. Clair River and Lake St. Clair, Michigan, USA. Folia Parasitologica (Ceske Budejovice), 1997;44(1):1-6.
23. Tavares LER, Bicudo AJA, Luque JL. Metazoan parasites of needlefish *Tylosurus acus* (Lacepede, 1803) (Osteichthyes: Belonidae) from the coastal zone of the State of Rio de Janeiro, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria 2004;13(1):36-40.
24. Shen, J.W., Qiu, Z.Z. Studies on the trematodes of fishes from the Yellow Sea and the Bo Hai Sea. Beijing: Science Press. 1995; pp. 207 [In Chinese].

Research Article

The Effect of Silymarin in Milk Thistle on Lipid Profile, Liver Enzymes and Inflammatory Cytokines in the Blood of Male Wistar Rats

Hoda Jahangiri¹, Parichehreh Yaghmaei¹, Azadeh Ebrahim Habibi², Shahrbanoo Oryan^{3*}

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

2- Endocrinology and Metabolism Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, 1411713137, Tehran, Iran

3- Department of Biology, Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran, Iran

*Corresponding author: sh_oryan@yahoo.com

Received: 31 December 2024

Accepted: 12 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1195164

Abstract

Milk thistle (*Silybum marianum*) is a medicinal plant with anti-inflammatory and antioxidant properties and in the treatment of chronic liver and inflammatory diseases that grows in the Mediterranean region. This study aimed to investigate the effect of silymarin in milk thistle on lipid profile, liver enzymes, and inflammatory cytokines in the blood of male Wistar rats. First, 16 adult rats with an average weight of 180-200 grams were selected and treated with silymarin and accumulated alpha-amylase. Then, by comparing with the control sample, the profile of triglycerides, cholesterol, low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), liver enzymes alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and also, inflammatory cytokines interleukin 6 (IL-6), interleukin 1-beta (IL-1 β), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), nuclear factor kappa B (NF κ B) and C-reactive protein (CRP) with kits specificity and ELISA method were assessed. Data analyzed using ANOVA and Tukey's post hoc tests by the SPSS software. Based on the results, the group treated with silymarin dissolved in 1% dimethyl sulfoxide and agglomerated alpha-amylase showed a significant reduction effect on the level of inflammatory cytokines, liver enzymes, LDL, triglycerides, and cholesterol and also a significant increase in HDL in the blood, compared to other groups. It is concluded that silymarin can potentially protect the liver by modulating the level of liver enzymes. By reducing the lipid profile and inflammatory factors in the blood, it plays an important role in reducing diseases related to the liver, cardiovascular, and immune system, further research should determines the optimal doses and areas and the individual characteristics of the patient and underlying diseases.

Keywords: Milk thistle, Alpha-amylase, Cytokine, Liver enzymes, Lipid profile, *Silybum marianum*.

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر سیلیمارین موجود در گیاه خارمریم بر پروفایل چربی، آنزیم‌های کبدی و همچنین سیتوکین‌های التهابی در خون رت‌های نر نژاد ویستار

هدی جهانگیری^۱، پریچهره یغمایی^۱، آزاده ابراهیم حبیبی^۲، شهربانو عریان^{۳*}

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

۲- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، موسسه علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: sh_oryan@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۱

DOI: 10.60833/ascij.2025.1195164

چکیده

خارمریم (*Silybum marianum*) گیاهی دارویی با خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی است که به‌طور گسترده در منطقه مدیترانه می‌روید. این گیاه در درمان بیماری‌های مزمن کبدی و التهابی مورد توجه قرار گرفته است. مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر سیلیمارین، ترکیب فعال خارمریم، بر پروفایل چربی، آنزیم‌های کبدی و سیتوکین‌های التهابی در خون رت‌های نر نژاد ویستار انجام شد. در این پژوهش، ۱۶ سر رت بالغ با وزن متوسط ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم انتخاب و تحت تیمار با سیلیمارین و همچنین آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته قرار گرفتند. پس از پایان دوره تیمار، مقادیر تری‌گلیسیرید، کلسترول، لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL) و لیپوپروتئین با چگالی زیاد (HDL) در کنار آنزیم‌های کبدی شامل آلانین‌آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) ارزیابی شد. علاوه بر این، سطوح سیتوکین‌های التهابی از جمله اینترلوکین ۶ (IL-6)، اینترلوکین ۱-بتا (IL-1 β)، فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α)، فاکتور هسته‌ای کاپا B (NF- κ B) و پروتئین واکنشی C (CRP) با استفاده از کیت‌های مخصوص و روش الایزا اندازه‌گیری گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون ANOVA و تعقیبی توکی با نرم‌افزار SPSS تحلیل شد. نتایج نشان داد که تیمار با سیلیمارین محلول در دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد به همراه آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته، در مقایسه با سایر گروه‌های تیمار شده، کاهش معنی‌داری در سطح سیتوکین‌های التهابی، آنزیم‌های کبدی، LDL، تری‌گلیسیرید و کلسترول ایجاد کرد، درحالی‌که HDL به‌طور معناداری افزایش یافت. سیلیمارین با تعدیل سطح آنزیم‌های کبدی، نشان‌دهنده پتانسیل محافظتی برای کبد است. همچنین، کاهش پروفایل لیپیدی و فاکتورهای التهابی در خون، نقش مهمی در کاهش خطر بیماری‌های مرتبط با کبد، قلب و عروق، و سیستم ایمنی ایفا می‌کند. انجام تحقیقات بیشتر برای تعیین دوز بهینه و بررسی اثرات آن در شرایط مختلف بالینی، با در نظر گرفتن ویژگی‌های فردی بیماران و بیماری‌های زمینه‌ای، ضروری است.

کلمات کلیدی: خار مریم، آلفا-آمیلاز، سیتوکین، آنزیم‌های کبدی، پروفایل چربی، *Silybum marianum*

مقدمه

محصولات گیاهی، به‌ویژه در بین افراد مبتلا به بیماری‌های مزمن، محبوبیت فزاینده‌ای یافته‌اند. خارمریم (*Silybum marianum*)، گیاهی یک‌ساله یا دوساله از منطقه مدیترانه، قرن‌ها برای تقویت ایمنی

بدن و درمان طیف وسیعی از بیماری‌های کبدی، از جمله کبد چرب، هپاتیت و سیروز، همچنین محافظت از کبد در برابر سموم محیطی مورد استفاده قرار گرفته است (۱). میلیون‌ها نفر برای حفظ عملکرد سالم کبد از این گیاه بهره می‌برند. تحقیقات عمدتاً بر روی سیلیمارین، ترکیبی از فلاونوئیدهای استخراج‌شده از خارمریم، و فعال‌ترین جزء آن، سیلیبین، متمرکز شده است. این ترکیبات به پرکاربردترین عناصر طبیعی گیاهی تبدیل شده‌اند و اغلب به‌طور مشترک به کار می‌روند، هرچند که اهداف بالینی متمایزی دارند و هنوز شواهد قطعی در مورد اثربخشی بالینی آن‌ها ارائه نشده است (۲). خارمریم خواص محافظتی خود را از طریق سه مکانیسم اصلی اعمال می‌کند: آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدفیبروتیک (۳). ویژگی ضدالتهابی آن به توانایی در تنظیم سیتوکین‌های التهاب‌زا نسبت داده می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که این گیاه بیان *COX-2*، که واسطه‌ای کلیدی در مسیرهای التهابی است، را تنظیم و مهار می‌کند (۴). همچنین، سیلیمارین مسیر سیگنالینگ *NF-κB* را مهار کرده و بیان ژن‌های پیش‌التهابی را که در تنظیم سیتوکین‌های مؤثر بر فرآیندهای التهابی نقش دارند، تعدیل می‌کند. افزون بر این، بقای سلول‌های T التهابی را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵). تحقیقات انجام‌شده بر روی موش‌ها نشان داده‌اند که سیلیمارین سطح سیتوکین‌های پیش‌التهابی را در کبد و پلاسما کاهش داده و در مقابل، *IL-10* را که در مهار پاسخ‌های التهابی نقش دارد، افزایش می‌دهد (۶-۸). کبد اندامی حیاتی در سم‌زدایی از بیگانه بیوتیک‌های واردشده از محیط، داروها، الکل و غذاها است (۹). آنزیم‌های آمینوترانسفراز از مهم‌ترین شاخص‌های تشخیصی بیماری‌های کبدی محسوب می‌شوند و شامل آلانین-آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات-آمینوترانسفراز (AST) هستند که توسط سلول‌های پارانشیمی کبد

ترشح شده و افزایش سطح سرمی آن‌ها به‌عنوان نشانگر استاندارد برای ارزیابی سمیت کبدی در نظر گرفته می‌شود (۱۰). شواهد نشان می‌دهد که مصرف خارمریم می‌تواند پارامترهای متابولیک، شیمیایی و التهابی کبد را تعدیل کند و در بهبود سطح سرمی آنزیم‌های کبدی مؤثر باشد (۱۱). آمیلازها گروهی از آنزیم‌های گلیکوزیل‌هیدرولاز هستند که در تجزیه کربوهیدرات‌ها نقش دارند. مطالعات پیشین ارتباط بین تجمع آلفا-آمیلاز و برخی بیماری‌های متابولیکی را در مدل‌های حیوانی نشان داده‌اند (۱۲). تجمع پروتئینی زمانی رخ می‌دهد که یک پروتئین ساختار طبیعی خود را از دست داده و در قالب غیرطبیعی تجمع یابد. از آنجا که احتمال دارد ترکیبات فلاونوئیدی در حذف آمیلوئیدهای پروتئینی نقش داشته باشند، این پژوهش به بررسی اثر مهار احتمالی سیلیمارین در خارمریم بر این فرایند پرداخته است. همچنین، تأثیر سیلیمارین بر پارامترهای بیوشیمیایی، آنزیم‌های کبدی و سیتوکین‌های التهابی در خون رت‌های نر نژاد ویستار مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

گروه‌بندی رت‌ها: در این مطالعه از ۱۰ رت نر نژاد ویستار (۲۵۰-۲۰۰ گرم) که از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند، استفاده شد. تمامی پروتکل‌های مربوط به نگهداری و تیمار حیوانات مورد بازبینی و تأیید کمیته اخلاقی استفاده از حیوانات در گروه علوم زیستی واحد علوم و تحقیقات قرار گرفت. رت‌ها در دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد با چرخه‌ی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تحت رژیم غذایی استاندارد نگهداری شدند. حیوانات به چهار گروه تیماری تقسیم شدند: گروه اول: دریافت ۳ میلی‌گرم آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته در سالی‌ن بافر فسفات، بدون

شد. در نهایت، به منظور اندازه‌گیری فعالیت سه آنزیم در سرم خون از فرمول زیر استفاده شد.

$$\frac{\text{abs Sample } (\Delta\text{abs/min})}{\text{abs Calibrator } (\Delta\text{abs/min})} \times \text{Calibrator activity (IU/L)} = \text{Sample activity (IU/L)}$$

به‌منظور بررسی سیتوکین‌های التهابی (IL-6, IL-1 β), CRP, NF- κ B و TNF- α ، نمونه‌های سرم در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سنجش با استفاده از کیت تجاری (BioScience GmbH, Germany) و قرائت OD در ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه (BI Biotech, Co., India) ELISA Reader انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و روش‌های آماری ANOVA یک‌طرفه و آزمون t زوجی ($p < 0/05$) تجزیه و تحلیل شدند. در صورت مشاهده تفاوت معنادار، آزمون تعقیبی Tukey's post hoc برای تعیین منشأ تفاوت به کار رفت.

نتایج

ارزیابی پارامترهای بیوشیمیایی خون: نتایج آنالیز آماری (شکل ۱) نشان داد که سطح AST در سرم خون رت‌های تیمار شده با آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته (انکوبه شده به مدت ۸ روز) نسبت به گروه دریافت‌کننده آلفا-آمیلاز نرمال (بدون انکوباسیون) افزایش معنی‌داری داشت. علاوه بر این، گروهی که با آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته همراه با سیلیمارین و دی‌متیل سولفوکسید ۱٪ تیمار شدند، کاهش معنی‌داری در سطح AST در مقایسه با گروه‌های آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته انکوبه‌شده و آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته همراه با دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد نشان دادند. به‌طور کلی نتایج نشان داد که داروی سیلیمارین محلول در دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد اثر معنی‌داری بر روی میزان AST خون رت‌های نر نژاد ویستار داشت و باعث کاهش معنی‌داری آن نسبت به گروه تیمار شده با آمیلاز تجمع‌یافته شد ($p < 0/001$). نتایج مشابهی

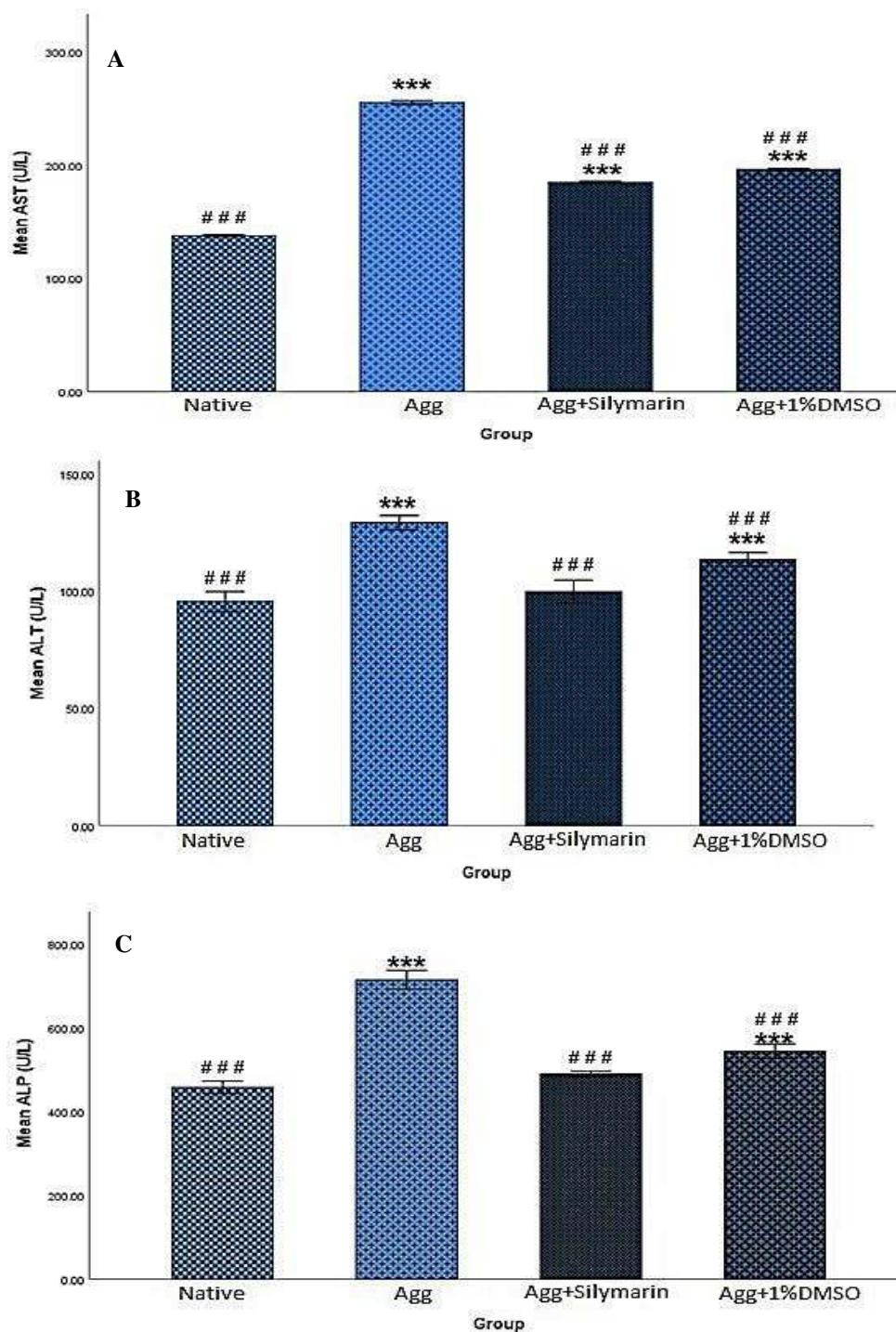
انکوباسیون. گروه دوم: دریافت ۳ میلی‌گرم آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته و نگهداری در شرایط انکوباسیون به مدت ۸ روز. گروه سوم: دریافت ۳ میلی‌گرم آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته به همراه سیلیمارین ۲ میلی‌مولار (محلول در ۱ درصد دی‌متیل سولفوکسید) و انکوباسیون به مدت ۸ روز. گروه چهارم: دریافت ۳ میلی‌گرم آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته همراه با ۱ درصد دی‌متیل سولفوکسید و انکوباسیون به مدت ۸ روز. در پایان دوره تیمار، رت‌ها با کلروفرم بیهوش شده، از قلب آن‌ها خون‌گیری انجام شد و پارامترهای بیوشیمیایی سرم مورد بررسی قرار گرفتند.

اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی و التهابی سرم: فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP با استفاده از کیت اختصاصی (Dialab Co., Austria) مطابق پروتکل سازنده اندازه‌گیری شد. ترکیبات کیت در سه لوله آزمایش برای هر آنزیم تهیه، مخلوط و به مدت ۶۰ ثانیه انکوبه شدند. جذب نوری (OD) در زمان صفر (A1) ثبت شد و تغییرات آن در دقیقه اول (A2)، دوم (A3) و سوم (A4) تعیین گردید. برای کنترل کیفیت داخلی از استانداردهای MAN NORM (ELITROL I, REF: 613046) و MAN PATH (ELITROL II) تهیه‌شده توسط Man Company, Iran استفاده شد. همچنین، کالیبراسیون آزمون‌ها با استاندارد ELICAL2 (REF: 613048) انجام گرفت. اندازه‌گیری مقادیر LDL و HDL سرم طی دو مرحله، شامل حذف سایر لیپوپروتئین‌ها از طریق واکنش آنزیمی و حضور معرف، و در مرحله بعد ترکیب آن‌ها با یک دترجنت به منظور انحلال‌پذیری، از طریق قرائت ODs صورت پذیرفت. همچنین اندازه‌گیری غلظت‌های کلسترول و تری‌گلیسرید به روش آنزیمی رنگ‌سنجی (Point End, Enzymatic, Colorimetric) پس از ۴ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ODs نمونه و استاندارد در مقابل بلانک اندازه‌گیری

برای ALT و ALP مشاهده شد؛ با این تفاوت که در گروه تیمار شده با آلفا-آمیلاز تجمع یافته همراه با سیلیمارین، تغییرات معنی‌دار نبود ($p = ۰/۴۴۶$) و ($p = ۰/۰۶۹$). همچنین، گروه‌های تیماری با آلفا-آمیلاز تجمع یافته همراه با سیلیمارین و آلفا-آمیلاز تجمع یافته همراه با دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد افزایش کمتری را نسبت به گروه آلفا-آمیلاز تجمع یافته انکوبه شده تنها تجربه کردند ($p < ۰/۰۰۱$). شکل ۲ مقادیر LDL در گروه‌های تیماری مختلف را نشان می‌دهد. میزان LDL خون در گروه تیمار شده با آلفا-آمیلاز تجمع یافته در مقایسه با گروه دریافت کننده آلفا-آمیلاز طبیعی (بدون انکوباسیون) افزایش معنی‌داری داشت. بر این اساس، سیلیمارین همراه با آلفا-آمیلاز تجمع یافته در دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد به‌طور معنی‌داری باعث کاهش سطح LDL خون در رت‌ها شد. این کاهش در مقایسه با گروه‌های آلفا-آمیلاز تجمع یافته همراه با دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد و آلفا-آمیلاز تجمع یافته انکوبه شده معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۰۱$). نتایج مشابهی برای تری‌گلیسرید (TG) مشاهده شد، درحالی‌که اثر سیلیمارین بر HDL معکوس بود. به‌طوری‌که سیلیمارین همراه با آلفا-آمیلاز تجمع یافته در دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد باعث افزایش معنی‌دار سطح HDL شد. همچنین، سطح HDL در گروه تیمار شده با آلفا-آمیلاز تجمع یافته انکوبه شده نسبت به گروه دریافت کننده

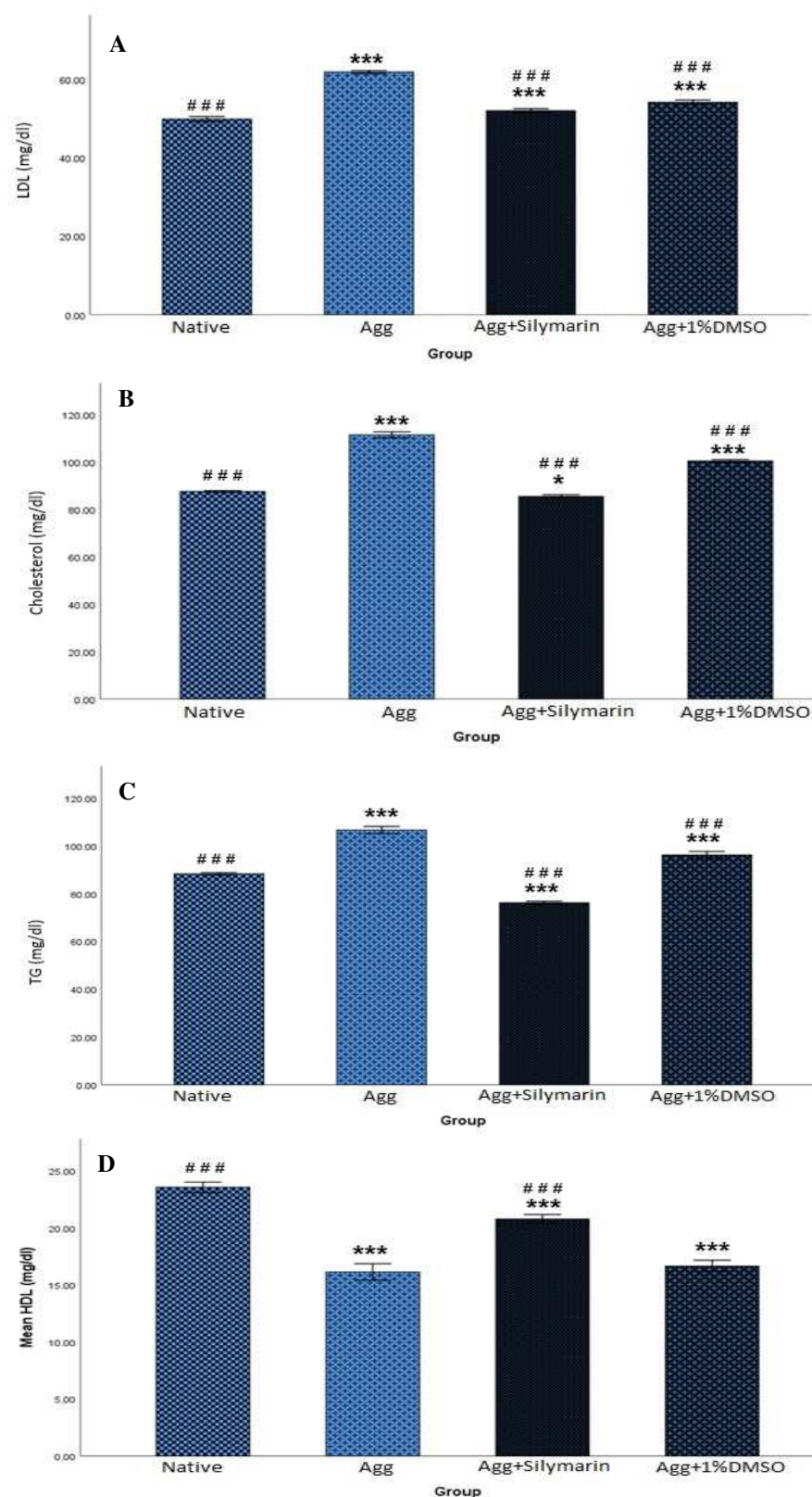
آلفا-آمیلاز طبیعی کاهش معنی‌داری نشان ($p < ۰/۰۰۱$).

ارزیابی سیتوکین‌های التهابی خون: شکل ۳ نتایج آنالیز سطوح پنج سیتوکین التهابی شامل IL-6، IL-1 β ، TNF- α ، NFKB و CRP را در شرایط تیماری مختلف نشان می‌دهد. نتایج آماری نشان داد که سطح این سیتوکین‌ها در گروه تیمار شده با آلفا-آمیلاز تجمع یافته (انکوبه شده) نسبت به گروه دریافت کننده آلفا-آمیلاز طبیعی افزایش معنی‌داری داشت ($p < ۰/۰۰۱$) برای همه موارد). علاوه بر این، در تمام سیتوکین‌ها، گروه‌هایی که با آلفا-آمیلاز تجمع یافته همراه با سیلیمارین و دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد تیمار شده بودند، کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه تیمار شده با آلفا-آمیلاز تجمع یافته همراه با دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد نشان دادند ($p = ۰/۰۰۳$ ، $p = ۰/۰۰۴$ ، $p = ۰/۰۰۱$ ، $p < ۰/۰۰۵$ ، $p = ۰/۰۰۱$ به ترتیب برای IL-6، IL-1 β ، TNF- α ، NFKB و CRP). همچنین، این گروه کاهش معنی‌داری نسبت به گروه دریافت کننده آلفا-آمیلاز تجمع یافته انکوبه شده داشت ($p = ۰/۰۳۷$ ، $p = ۰/۰۰۱$ ، $p < ۰/۰۰۵$ ، $p = ۰/۰۰۱$ ، $p = ۰/۰۰۱$ برای IL-6، IL-1 β ، TNF- α ، NFKB و CRP). نتایج نشان داد که ترکیب سیلیمارین با آلفا-آمیلاز تجمع یافته باعث کاهش سطوح سیتوکین‌های التهابی در مقایسه با آلفا-آمیلاز تجمع یافته تنها شد و اثر ضدالتهابی قابل توجهی داشت.



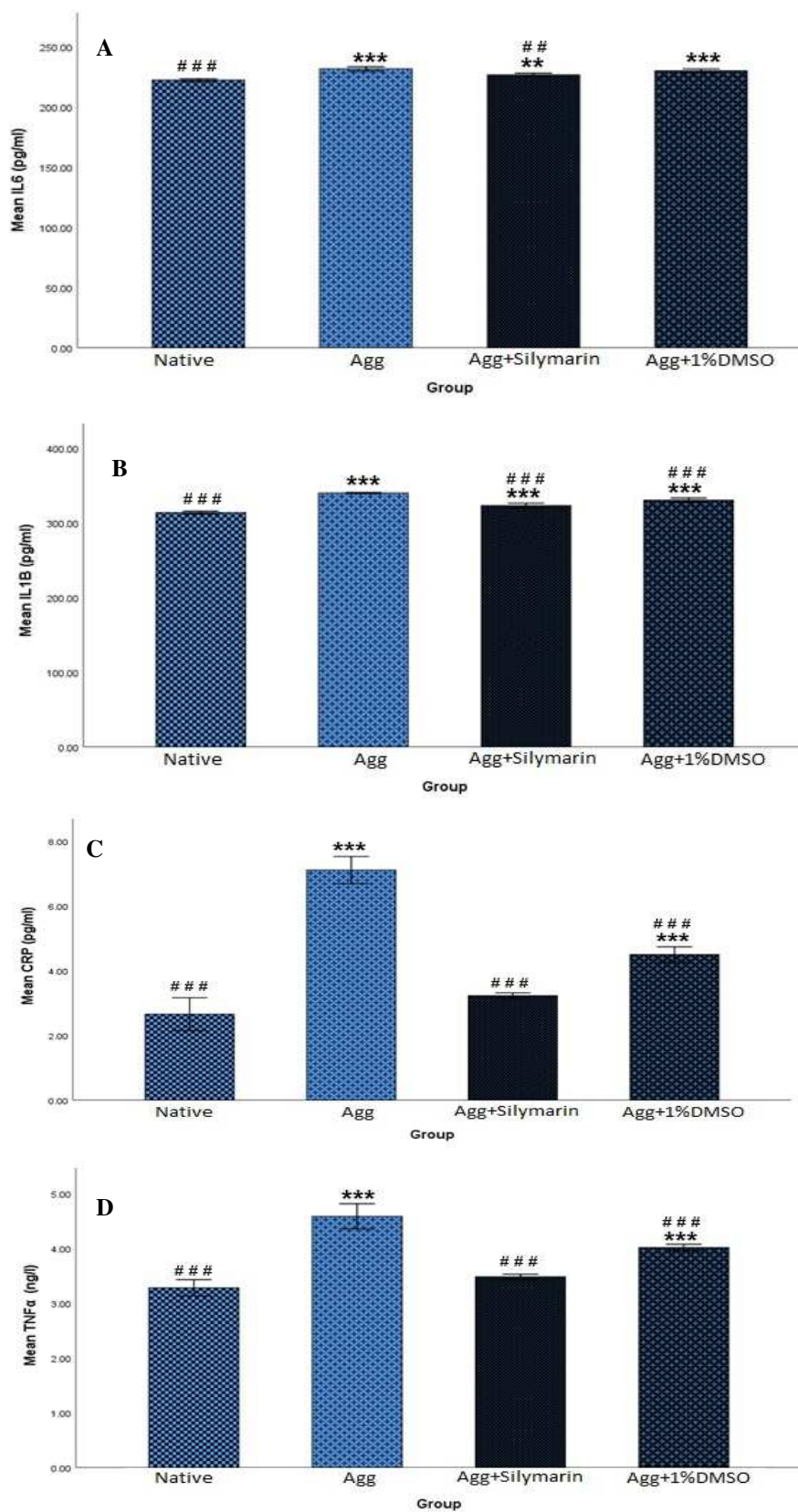
شکل ۱- تأثیر گروه‌های درمانی مورد مطالعه بر سطح (A) AST، (B) ALT و (C) ALP در خون رت‌های نر نژاد ویستار.
(###: $p < 0.001$, ***: $p < 0.001$)

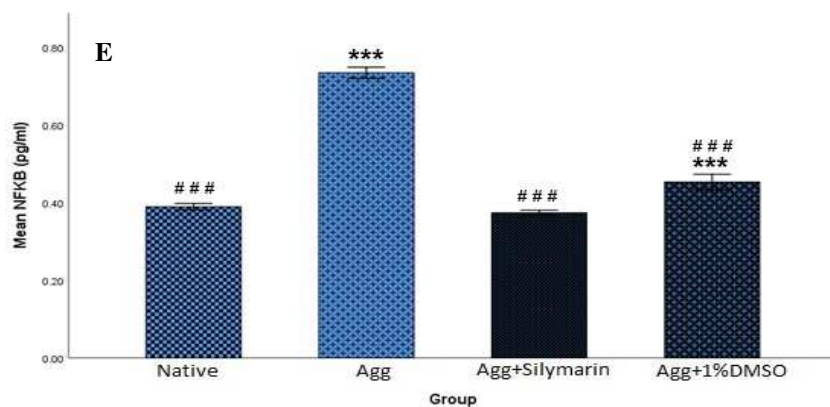
Fig. 1. Effect of the studied treatment groups on the levels of (A) AST, (B) ALT and (C) ALP in the blood of male Wistar rats. ($p < 0.001$:***), ($p < 0.001$:###).



شکل ۲- تأثیر گروه‌های تیماری مورد مطالعه بر سطح (A) LDL، (B) کلسترول، (C) تری گلیسیرید و (D) HDL در خون رت‌های نر نژاد ویستار ($p < 0.001$: ###, $p < 0.001$: ***).

Fig. 2. Effect of the studied treatment groups on the levels of (A) LDL, (B) cholesterol, (C) triglycerides and (D) HDL in the blood of male Wistar rats ($p < 0.001$: ***), ($p < 0.001$: ###).





شکل ۳- تأثیر گروه‌های تیماری مورد مطالعه بر سطح (A) IL6، (B) IL1B، (C) CRP، (D) TNF- α و (E) NFkB در خون رت‌های نر نژاد ویستار ($p < 0.001$:***, $p < 0.001$:###).

Fig. 3. Effect of the studied treatment groups on the levels of (A) IL6, (B) IL1B, (C) CRP, (D) TNF- α and (E) NFkB in the blood of male Wistar rats. ($p < 0.001$:***, $p < 0.001$:###).

بحث

میرزایی و همکاران (۱۴) ۶۷/۷ و ۶۳/۱٪، احمد و همکاران (۱۶) ۷۴/۴ و ۶۵/۵ درصد و جمالیان و همکاران (۱۷)، ۶۲/۳ و ۶۱/۵ درصد کاهش را به ترتیب در ALT و AST را گزارش کرده‌اند. مارتینز و همکاران (۱۸) نیز یک افزایش در سطوح آنزیمی پس از تیمار با سیلیمارین در کبد گزارش کردند، که این موضوع ممکن است به دوز مصرفی و اثربخشی ثابت‌نشده آن مرتبط باشد. هونگ و همکاران (۱۹) این نتایج را با اثرات محافظتی سیلیمارین در کبد مرتبط دانستند. طبق این تحقیقات، سیلیمارین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد مضر و کنترل آنزیم‌هایی که در ایجاد آسیب سلولی کبد نقش دارند، عمل می‌کند. به‌علاوه، افزایش توانایی بازسازی سلول‌های کبد از طریق افزایش سنتز DNA و RNA به دلیل ساختار استروئیدی سیلیمارین (۲۰)، تغییر ساختار غشای خارجی هپاتوسیت برای جلوگیری از ورود بیگانه‌بیوتیک‌ها به داخل سلول، از بین بردن رادیکال‌های آزاد و افزایش محتوای سلولی گلوکاتایون منجر به مهار پراکسیداسیون لیپیدی (۲۱) می‌شود و در نهایت باعث اصلاح ناقل‌ها و

آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP از متداول‌ترین آزمایش‌های بالینی برای ارزیابی سلامت کبد محسوب می‌شوند. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که افزایش سطح این آنزیم‌ها نه تنها با اختلالات کبدی مرتبط است، بلکه می‌تواند با بیماری‌های قلبی-عروقی، افزایش خطر مرگ‌ومیر ناشی از آن‌ها و همچنین ابتلا به دیابت نوع ۲ در ارتباط باشد (۱۳). نتایج این مطالعه نشان داد که آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته همراه با سیلیمارین تأثیر معنی‌داری بر کاهش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی (ALT، AST و ALP) در رت‌ها داشت. کاهش این آنزیم‌ها در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد که سیلیمارین می‌تواند در پیشگیری از آسیب‌های کبدی مؤثر باشد و احتمالاً اثر محافظتی بر عملکرد کبد دارد. در یک بررسی سیستماتیک مشابه توسط مارتینز و همکاران (۱۴)، مشخص شد که سطح آنزیم‌های کبدی پس از تجویز سیلیمارین کاهش می‌یابد، که این موضوع نشان‌دهنده تأثیر مثبت بالقوه بر بهبود علائم مرتبط با کبد و بهزیستی کلی است. تایید مطالعات دیگر نیز این یافته‌ها را تأیید می‌کنند؛ ال کمری و همکاران (۱۵) ۸۸/۲ و ۸۸٪،

گیرنده‌های غشای سلولی (۲۲) می‌گردد. این‌ها احتمالاً از مهمترین مکانیسم‌های عملکردی سیلیمارین در کاهش سطح آنزیم‌های کبدی به‌شمار می‌آیند. با توجه به اینکه افزایش پروفایل چربی یکی از عوامل خطر اصلی برای ایجاد بیماری‌های قلبی است، مطالعات متعددی در حال انجام هستند تا ارتباطات بهتری میان اختلالات در متابولیسم کلسترول، تری گلیسیرید و آتروژنز و همچنین ارزیابی درمان‌های احتمالی ایجاد شود. در این زمینه، گوبالاکریشن و همکاران (۲۳) گزارش دادند که موش‌های تغذیه‌شده با رژیم غذایی با کلسترول بالا افزایش معنی‌داری در کلسترول تام سرم، تری‌گلیسیرید، LDL و لیپوپروتئین‌های با چگالی بسیار پایین (VLDL) نشان دادند. تیمار با سیلیمین باعث کاهش معنی‌دار کلسترول تام سرم (۲۴ درصد) تری‌گلیسیرید (۲۱ درصد) و LDL-C (۲۴ درصد) به صورت وابسته به دوز شد. موش‌های تیمار شده با سیلیمین (۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) افزایش معنی‌داری در HDL-C کبدی و کاهش سایر پروفایل‌های لیپیدی نشان دادند که این نتایج با مطالعه حاضر و مطالعات پیشین نیز هماهنگ است (۲۶-۲۴). در شرایط معمول، ۹۵ درصد از اسیدهای صفراوی دوباره جذب می‌شوند. دفع افزایش‌یافته اسیدهای صفراوی مدفوع توسط سیلیمارین باعث تخلیه اسیدهای صفراوی می‌شود که در نتیجه منجر به افزایش سنتز اسیدهای صفراوی کبدی می‌گردد. به دنبال آن، کلسترول کبدی کاهش می‌یابد و تولید گیرنده‌های LDL کبدی تحریک می‌شود که این فرآیند موجب افزایش پاکسازی LDL، لیپوپروتئین‌های با چگالی متوسط (IDL) و به‌طور غیرمستقیم VLDL می‌شود. این می‌تواند یکی از مکانیسم‌های احتمالی اثر هیپولیپیدمیک سیلیمارین باشد. این مکانیسم مشابه با سازوکارهای جداکننده اسیدهای صفراوی است (۲۴). در این مطالعه، تیمار با

سیلیمارین همراه با آلفا-آمیلاز تجمع یافته سبب کاهش معنی‌دار سطح سیتوکین‌های IL-6 و IL-1 β و CRP، NF-KB و TNF- α در خون نسبت به گروه کنترل شد. سیلیمارین با مسدود کردن فعال‌سازی NF-kB، به‌طور موثری با التهاب ناشی از TNF- α مقابله می‌کند. این امر با مهار فسفوریلاسیون و تخریب kBa، یک بازدارنده NF-kB حاصل می‌شود (۲۷). در مطالعه قو و همکاران (۲۸)، مشخص گردید که سیلیمارین با مهار فعال‌سازی NF-kB از آسیب کبدی در موش‌ها جلوگیری می‌کند که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. سیلیمارین ممکن است بر روی پروتئین‌های تنظیم‌کننده NF-kB مانند p65 و p50 تأثیر بگذارد. به‌عنوان مثال، سیلیمارین می‌تواند با کاهش بیان این پروتئین‌ها، از فعال‌سازی NF-kB جلوگیری کند (۲۹). همچنین سیلیمارین می‌تواند بر روی چندین مسیر سیگنالی که به فعال‌سازی NF-kB منجر می‌شوند، تأثیر بگذارد. به‌عنوان مثال، این ترکیب می‌تواند مسیر پروتئین کیناز فعال شده با میتوز و مسیر PI3K/Akt را مهار کند که هر دو در فعال‌سازی NF-kB نقش دارند (۵). در این رابطه فرزندگان و همکاران (۳۰) بیان کردند که سیلیمارین به‌طور قابل توجهی باعث کاهش سطوح سیتوکین TNF- α شده که همسو با بررسی کنونی و مطالعه فوردهام و همکاران (۵۸) است که تأثیر سیلیمارین را در مهار NF-KB و IL-6 نشان دادند. به‌طور مشابه، سه مطالعه دیگر بر روی سلول‌های القا شده با لیپوپلی ساکارید برای ارزیابی اثرات سیلیمارین توسط کانگ و همکاران (۳۱)، کیم و همکاران (۳۲) و بلوچی و همکاران (۳۳) انجام گردیدند که به ترتیب نشان دهنده کاهش قابل توجه در سطوح TNF- α و NF-KB و در نهایت CRP، TGF β ، IL-10، IL-17 و IL-23 بود. الهی و همکاران (۳۴) و گرگانی و همکاران (۳۵) بیان کردند که مکمل‌سازی با سیلیمارین می‌تواند به کاهش

مارکرهای التهابی از جمله CRP به ترتیب در بیماران روماتوئید و دیابت نوع ۲ کمک کند که تایید کننده نتایج این بررسی است. سیلیمارین می‌تواند به بهبود حساسیت به انسولین و تنظیم سطح قند خون کمک کند. افزایش سطح قند خون و مقاومت به انسولین می‌تواند منجر به التهاب و افزایش CRP شود. بنابراین، بهبود این عوامل با کمک سیلیمارین می‌تواند به کاهش CRP منجر شود (۳۶). علاوه بر این، سیلیمارین به بهبود متابولیسم لیپیدها و کاهش چربی‌های کبدی کمک می‌کند. کاهش چربی‌های کبدی می‌تواند به کاهش التهاب و در نتیجه کاهش تولید CRP منجر شود (۳۷). در نهایت، برخی از تحقیقات نشان داده‌اند که سیلیمارین می‌تواند بر میکروبیوم روده تأثیر بگذارد. تغییر در ترکیب میکروبیوم روده می‌تواند به کاهش التهاب مزمن و در نتیجه کاهش سطح CRP کمک کند (۳۸). با این وجود برخی مطالعات نتایج معکوسی به دست آوردند که هم راستا با نتایج بررسی حاضر نیست. شاوندی و همکاران (۳۶) بیان کردند که افزودن سیلیمارین به رژیم درمانی بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید پایدار اثر قابل توجهی بر سطوح سرمی $TNF-\alpha$ و $IL-1\beta$ ندارد. در مطالعه چن و همکاران (۳۹) گزارش شد که سیلیمارین می‌تواند سطوح $IL-6$ و $IL-1\beta$ را در موش‌های آزمایشگاهی که به‌وسیله لیپوپلی‌ساکارید تحریک شده بودند، کاهش دهد که در توافق با مطالعه حاضر و همچنین تحقیق ژانگ و همکاران (۲۹) است که گزارش کردند سیلیمارین با کاهش سطوح $IL-6$ و $IL-1\beta$ می‌تواند از آسیب‌های حاد ریه محافظت کند. شریف و همکاران (۴۰) نیز نتایج مشابه مطالعات مذکور را کسب کردند. سیلیمارین می‌تواند از طریق چندین مکانیسم مولکولی بر کاهش سطوح اینترلوکین‌ها، به‌ویژه $IL-6$ و $IL-1\beta$ تأثیر بگذارد. سیلیمارین می‌تواند با مهار مسیر $NF-\kappa B$ که یک

تنظیم‌کننده کلیدی در تولید سیتوکین‌های التهابی است، از ترشح $IL-6$ و $IL-1\beta$ جلوگیری کند (۴۱). این مسیر معمولاً در پاسخ به استرس‌های التهابی فعال می‌شود و باعث تولید سیتوکین‌ها می‌شود. همچنین سیلیمارین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی عمل می‌کند و می‌تواند سطح رادیکال‌های آزاد را کاهش دهد. این امر به نوبه خود می‌تواند از فعال شدن مسیرهای التهابی جلوگیری کند و در نتیجه تولید $IL-6$ و $IL-1\beta$ را کاهش دهد (۴۲). به علاوه، سیلیمارین می‌تواند بر روی عملکرد سلول‌های ایمنی مانند ماکروفاژها تأثیر بگذارد. با کاهش فعالیت ماکروفاژها و تولید سیتوکین‌های التهابی، سطوح $IL-6$ و $IL-1\beta$ کاهش می‌یابد (۴۳). در نهایت، سیلیمارین می‌تواند بیان ژن‌های مرتبط با التهاب را تنظیم کند. به عنوان مثال، می‌تواند از افزایش بیان ژن‌های تولیدکننده $IL-6$ و $IL-1\beta$ جلوگیری کند. این ترکیب می‌تواند فعالیت آنزیم‌هایی مانند سیکلو‌اکسیژناز و لیپوکسیژناز که در تولید سیتوکین‌های التهابی نقش دارند را مهار کند (۴۴).

نتیجه‌گیری

تیمار با سیلیمارین به‌طور قابل توجهی باعث کاهش پروفایل لیپیدی و سیتوکین‌های التهابی و در نهایت تعدیل آنزیم‌های کبدی از راه‌های مختلفی می‌شود که استفاده از آن را به عنوان یک گزینه درمانی مناسب در اختلالات کبدی مطرح می‌کند.

منابع

1. Nawaz A, Zaib S, Khan I, Ahmed A, Shahzadi K, Riaz H. Silybum marianum: An overview of its phytochemistry and pharmacological activities with emphasis on potential anticancer properties. Anticancer Agents Med Chem. 2023;23(13):1519-1534.
2. Dwyer JT, Coates PM, Smith MJ. Dietary supplements: regulatory challenges

- milk thistle, green tea, and cinnamon beverages on liver enzymes of operating room Anesthesia personnel. *J Adv Immunopharmacol*. 2023;3(1):e136000.
12. Rahmati F, Hosseini SS, Mahuti Safai S, Asgari Lajayer B, Hatami M. New insights into the role of nanotechnology in microbial food safety. *3 Biotech*. 2020;10(10):425.
 13. Rahmati F. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* in Eudragit S100 and alginate chitosan under gastrointestinal and normal conditions. *Appl Nanosci*. 2020;10(2):391-399.
 14. Mirzaei E, Sabetian G, Masjedi M, Heidari R, Mirjalili M, Dehghanian A, et al. The effect of silymarin on liver enzymes and antioxidant status in trauma patients in the intensive care unit: a randomized double blinded placebo-controlled clinical trial. *Clin Exp Hepatol*. 2021;7(2):149-155.
 15. El-Kamary SS, Shardell MD, Abdel-Hamid M, Ismail S, El-Ateek M, Metwally M, et al. A randomized controlled trial to assess the safety and efficacy of silymarin on symptoms, signs and biomarkers of acute hepatitis. *Phytomedicine*. 2009;16(5):391-400.
 16. Ahmed S, Ullah N, Parveen S, Javed I, Jalil NAC, Murtey MD, et al. Effect of silymarin as an adjunct therapy in combination with sofosbuvir and ribavirin in hepatitis C patients: a miniature clinical trial. *Oxid Med Cell Longev*. 2022; 2022(1):9199190.
 17. Jamalain M, Mahmodiyeh B, Saveiee S, Solhi H. Investigating the impact of silymarin on liver oxidative injury. *J Famil Med Prim Care*. 2020;9(3):1707-1711.
 18. Martinez EC, Herrera D, Mogan S, Hameed Z, Jangda AA, Khan TJ, et al. Impact of silymarin supplements on liver enzyme levels: a systematic review. *Cureus*. 2023;15(10):e47608.
 - and research resources. *Nutrients*. 2018; 10(1):41.
 3. Fanoudi S, Alavi MS, Karimi G, Hosseinzadeh H. Milk thistle (*Silybum Marianum*) as an antidote or a protective agent against natural or chemical toxicities: a review. *Drug Chem Toxicol*. 2020; 43(3):240-254.
 4. Achufusi TGO, Pellegrini MV, Patel RK. Milk Thistle. [Updated 2024 Feb 28]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541075/>.
 5. Surai PF, Surai A. Silymarin and NF- κ B. Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands. 2023:151-177.
 6. Ali SO, Darwish HA, Ismail NA. Curcumin, Silybin Phytosome® and α -R-Lipoic Acid Mitigate Chronic Hepatitis in Rat by Inhibiting Oxidative Stress and Inflammatory Cytokines Production. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2016;118(5):369-380.
 7. García-Muñoz AM, Victoria-Montesinos D, Ballester P, Cerdá B, Zafrilla P. A Descriptive Review of the Antioxidant Effects and Mechanisms of Action of Berberine and Silymarin. *Molecules*. 2024; 29(19):4576.
 8. MI H. Therapeutic roles of silymarin or/and Taurine on nonalcoholic fatty liver disease associated with metabolic syndrome in rats. *J Sci Res Sci*. 2015;32(2):283-310.
 9. Dutta S, Mishra SP, Sahu AK, Mishra K, Kashyap P, Sahu B. Hepatocytes and their role in metabolism. *Drug Metab*. 2021; <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.99083>
 10. Giashuddin S, Alawad M. Histopathological diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Methods Mol Biol*. 2022;2455:1-18.
 11. Kheirandish V, Mard-Soltani M, Mojab F, Shakerian N, Nanaie F. The effect of

- lung diseases. *Chem-Biol Interact.* 2022;354:109842.
28. Ou Q, Weng Y, Wang S, Zhao Y, Zhang F, Zhou J, et al. Silybin alleviates hepatic steatosis and fibrosis in NASH mice by inhibiting oxidative stress and involvement with the Nf- κ B pathway. *Dig Dis Sci.* 2018; 63:3398-3408.
29. Zhang B, Wang B, Cao S, Wang Y, Wu D. Silybin attenuates LPS-induced lung injury in mice by inhibiting NF- κ B signaling and NLRP3 activation. *Int J Mol Med.* 2017; 39(5):1111-1118.
30. Farzanegan A, Shokuhian M, Jafari S, Shirazi FS, Shahidi M. Anti-histaminic effects of resveratrol and silymarin on human gingival fibroblasts. *Inflammation.* 2019;42:1622-1629.
31. Kang JS, Park S-K, Yang K-H, Kim HM. Silymarin inhibits TNF- α -induced expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Lett.* 2003;550(1-3):89-93.
32. Kim EJ, Lee MY, Jeon YJ. Silymarin inhibits morphological changes in LPS-stimulated macrophages by blocking NF- κ B pathway. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2015;19(3):211-218.
33. Balouchi S, Gharagozloo M, Esmaeil N, Mirmoghtadaei M, Moayedi B. Serum levels of TGF β , IL-10, IL-17, and IL-23 cytokines in β -thalassemia major patients: the impact of silymarin therapy. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2014;36(4):271-274.
34. Elahi ME, Elieh-Ali-Komi D, Goudarzi F, Mohammadi-Noori E, Assar S, Shavandi M, et al. Effects of silymarin as adjuvant drug on serum levels of CTRP3, anti-cyclic citrullinated peptide (CCP), and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) in rheumatoid arthritis patients. *Mol Biol Res Commun.* 2024;13(3):137-145.
35. Gargari BP, Mobasser M, Valizadeh H, Asghari-Jafarabadi M. Effects of *Silybum marianum* (L.) Gaertn.(silymarin) extract
19. Hong M, Li S, Tan HY, Wang N, Tsao SW, Feng Y. Current status of herbal medicines in chronic liver disease therapy: the biological effects, molecular targets and future prospects. *Int J Mol Sci.* 2015;16(12): 28705-28745.
20. Singh D, Cho WC, Upadhyay G. Drug-induced liver toxicity and prevention by herbal antioxidants: an overview. *Front Physiol.* 2016;6:363.
21. Karimi G, Vahabzadeh M, Lari P, Rashedinia M, Moshiri M. "Silymarin", a promising pharmacological agent for treatment of diseases. *Iran J Basic Med Sci.* 2011;14(4):308.
22. Rahmati F. Characterization of *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Saccharomyces* isolated from Iranian traditional dairy products for potential sources of starter cultures. *AIMS Microbio.* 2017;3(4):815.
23. Gobalakrishnan S, Asirvatham SS, Janarthanam V. Effect of silybin on lipid profile in hypercholesterolaemic rats. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(4):FF01.
24. Mohammadi H, Hadi A, Arab A, Moradi S, Rouhani MH. Effects of silymarin supplementation on blood lipids: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Phytother Res.* 2019; 33(4):871-880.
25. Mohebbati R, Momeni-Moghaddam MA, Asghari R, Abbasnezhad A, Bideskan AEZ, Salarbashi D, et al. The comparison of the effects of nano-silymarin and silymarin on high-fat diet-induced fatty liver of adult male rats. *Avicenna J Phytomed.* 2024;14(3):365.
26. Metwally M, El-Gellal A, El-Sawaisi S. Effects of silymarin on lipid metabolism in rats. *World Appl Sci J.* 2009;6(12):1634-1637.
27. Alharbi KS, Afzal O, Kazmi I, Shaikh MAJ, Thangavelu L, Gulati M, et al. Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) inhibition as a therapeutic target for plant nutraceuticals in mitigating inflammatory

40. Sherif IO, Al-Gayyar M. Antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of silymarin on hepatic dysfunction induced by sodium nitrite. *Eur Cytokine Netw.* 2013;24(3):114-121.
41. Toklu HZ, Akbay TT, Velioglu-Ogunc A, Ercan F, Gedik N, Keyer-Uysal M, et al. Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, prevents sepsis-induced acute lung and brain injury. *J Surg Res.* 2008;145(2):214-222.
42. Celep NA, Erbaş E, Kara H, Kara A. Silymarin Reduces Paclitaxel-induced Lung Damage Via Down-regulating P2X7R Expression and Inhibiting Inflammation and Apoptosis in the Rats. *Pak Vet J.* 2024; 44(1):169-175.
43. Jin Y, Zhao X, Zhang H, Li Q, Lu G, Zhao X. Modulatory effect of silymarin on pulmonary vascular dysfunction through HIF-1 α -iNOS following rat lung ischemia-reperfusion injury. *Exp Therap Med.* 2016;12(2):1135-1140.
44. Li D, Hu J, Wang T, Zhang X, Liu L, Wang H, et al. Silymarin attenuates cigarette smoke extract-induced inflammation via simultaneous inhibition of autophagy and ERK/p38 MAPK pathway in human bronchial epithelial cells. *Sci Rep.* 2016; 6(1):37751.
- supplementation on antioxidant status and hs-CRP in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytomedicine.* 2015;22(2):290-296.
36. Shavandi M, Yazdani Y, Asar S, Mohammadi A, Mohammadi-Noori E, Kiani A. The Effect of Oral Administration of Silymarin on Serum Levels of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Iran J Immunol.* 2022;19(4):427-435.
37. Jaffar HM, Bader ul Ain H, Tufail T, Hanif A, Malik T. Impact of silymarin-supplemented cookies on liver enzyme and inflammatory markers in non-alcoholic fatty liver disease patients. *Food Sci Nutr.* 2024; 12(10):7273-7286.
38. Xiao F, Gao F, Zhou S, Wang L. The therapeutic effects of silymarin for patients with glucose/lipid metabolic dysfunction: A meta-analysis. *Medicine.* 2020;99(40): e22249.
39. Chen J, Li D-L, Xie L-N, Ma Y-r, Wu P-P, Li C, et al. Synergistic anti-inflammatory effects of silibinin and thymol combination on LPS-induced RAW264. 7 cells by inhibition of NF- κ B and MAPK activation. *Phytomedicine.* 2020;78:153309.

*Research Article***Evaluation of the Quality and Health of Embryos Resulting from In Vitro Maturation (IVM) under the Influence of Stem Cell Secretome****Hilda Rastegari¹, Nasim Hayati Roudbari^{1*}, Somayeh Kazemnezhad², Soheila Ansaripour²**

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

2- Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran

*Corresponding author: hayati@iau.ac.ir

Received: 18 March 2025

Accepted: 13 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1202355

Abstract

The role of mesenchymal stem cells (MSCs) is mainly dependent on their paracrine components, namely their secretome. The use of stem cells has been recognized as a novel approach in the treatment of infertility and in vitro oocyte maturation (IVM) and has shown promising results, especially in women with polycystic ovary syndrome (PCOS). However, the health of the resulting embryos remains a major challenge. In this study, menstrual blood stem cell secretome was used for in vitro oocyte maturation in 100 patients with PCOS, and the health of the embryos was assessed by preimplantation genetic screening for aneuploidy (PGT-A). The resulting embryos were cultured to the blastocyst stage and their chromosomal status was assessed by next-generation sequencing (NGS). The results showed that the total number of embryos produced did not differ significantly between the two groups. In the age group under 30 years, the difference in the total number of embryos between the control and experimental groups was not statistically significant, and although the percentage of high-quality embryos in the secretome group increased compared to the control group, this difference was not statistically significant ($p = 0.207$). In the age group over 30 years, the number of embryos between the two groups was not significantly different, but the percentage of high-quality embryos in the secretome group was significantly higher than the control group. Also, in people over 30 years, the quality of the embryos improved and there was no significant difference in terms of aneuploidy, euploidy, and mosaicism. IVM had no significant effect on the health of the embryos in terms of aneuploidy and mosaicism. These findings indicate the safety and efficacy of the in vitro maturation method of oocytes using stem cell secretome in the treatment of infertility.

Keywords: Stem cells, In Vitro Maturations, Polycystic Ovary, Preimplantation Genetic Screening, Aneuploidy.



ارزیابی کیفیت و سلامت جنین‌های حاصل از بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) تحت تأثیر سکرتوم سلول‌های بنیادی

هیلدا رستگاری^۱، نسیم حیاتی رودباری^{۱*}، سمیه کاظم‌نژاد^۲، سهیلا انصاری‌پور^۲

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

۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی، ابن سینا، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: hayati@iaui.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۸

DOI: 10.60833/ascij.2025.1202355

چکیده

نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) عمدتاً به اجزای پاراکرین آن‌ها، یعنی سکرتوم آن‌ها بستگی دارد. استفاده از سلول‌های بنیادی به‌عنوان روشی نوین در درمان ناباروری و بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) شناخته شده و نتایج امیدوارکننده‌ای به‌ویژه در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) نشان داده است. با این حال، سلامت جنین‌های حاصل یکی از چالش‌های مهم است. در این مطالعه، سکرتوم سلول‌های بنیادی خون قاعدگی برای بلوغ آزمایشگاهی تخمک در ۱۰۰ بیمار مبتلا به PCOS استفاده شد و سلامت جنین‌ها با روش غربالگری ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی برای آنوپلوئیدی (PGT-A) بررسی گردید. جنین‌های حاصل تا مرحله بلاستوسیست کشت داده شدند و وضعیت کروموزومی آن‌ها با تکنیک توالی‌یابی نسل جدید (NGS) بررسی شد. نتایج نشان داد که تعداد کل جنین‌های حاصل بین دو گروه اختلاف معنی‌داری نشان نداد. در گروه سنی زیر ۳۰ سال، اختلاف در تعداد کل جنین‌ها بین گروه کنترل و آزمایش از نظر آماری معنی‌دار نبود و با اینکه درصد جنین‌های با کیفیت عالی در گروه سکرتوم نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد، اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p = 0/207$). در گروه سنی بالای ۳۰ سال، تعداد جنین‌ها بین دو گروه دارای اختلاف معنی‌دار نبود اما درصد جنین‌های با کیفیت عالی در گروه سکرتوم نسبت به گروه کنترل بطور قابل توجهی بیشتر بود. همچنین در افراد بالای ۳۰ سال، کیفیت جنین‌ها بهبود یافت و تفاوت معنی‌داری از نظر آنوپلوئیدی، یوپلوئیدی و موزایسم وجود نداشت. IVM تأثیر معنی‌داری بر سلامت جنین‌ها از نظر آنوپلوئیدی و موزایسم نداشت. این یافته‌ها حاکی از ایمنی و کارایی روش بلوغ آزمایشگاهی تخمک با استفاده از سکرتوم سلول‌های بنیادی در درمان ناباروری است.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی، بلوغ آزمایشگاهی تخمک، تخمدان پلی‌کیستیک، غربالگری ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی، آنوپلوئیدی.

مقدمه

فاکتورهای پاراکرینی ترشح شده یا سکرتوم سلول-های بنیادی به‌طور رو به افزایشی به‌عنوان عاملی برای بازسازی بافت مورد قبول قرار گرفته‌اند. این فاکتورها شامل طیفی از پروتئین‌ها، لیپیدها، میکروRNAها و وزیکول‌های خارج‌سلولی مانند اگزوزوم‌ها و میکروذره‌ها هستند. بلوغ آزمایشگاهی تخمک یا (In Vitro Maturation) IVM یک انتخاب مناسب برای زنانی که پاسخ ضعیفی به درمان

گنادوتروپین می‌دهند، دارای ذخیره تخمدان پایین و نارسایی زودرس تخمدان هستند و به ویژه بیماران با سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS: Polycystic Ovary Syndrome) می‌باشد (۱). حدود ۱۵ درصد از تخمک‌های حاصل از سیکل‌های روش‌های کمکی درمان ناباروری (ART: Assisted Reproductive Technologies) نابالغ هستند (۲). با این حال، کیفیت تخمک‌های بالغ شده در محیط آزمایشگاه اغلب پایین‌تر از تخمک‌های بالغ شده در بدن است، که این امر می‌تواند منجر به کاهش نرخ لقاح و کیفیت جنین شود. به همین دلیل، بهبود محیط کشت IVM به عنوان یک چالش مهم در تحقیقات تولیدمثل مطرح شده است. استفاده از سلول‌های بنیادی در فرآیند IVM به عنوان یک روش نویدبخش در درمان ناباروری مطرح شده است (۳). سلول‌های بنیادی با توانایی تمایز به انواع سلول‌ها و ترشح فاکتورهای رشد، می‌توانند محیطی مناسب برای بلوغ تخمک‌ها فراهم کنند. استفاده از سکرئوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC-CM) به عنوان یک افزودنی به محیط کشت IVM، به دلیل توانایی آن در تأمین فاکتورهای رشد و سایر مولکول‌های ضروری، می‌تواند راهکاری امیدوارکننده برای بهبود بلوغ تخمک و کیفیت جنین باشد که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۴، ۵). در شرایط سنتی، محیط‌های کشت IVM به دلیل کمبود برخی فاکتورهای زیستی، اغلب قادر به فراهم‌آوری شرایط ایده‌آل برای بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک نیستند. مطالعات جدید نشان داده‌اند که افزودن سکرئوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند این نواقص را جبران نموده و باعث افزایش نرخ بلوغ تخمک، بهبود کیفیت جنین و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با تکثیر و تمایز سلولی شود. برای مثال، پژوهش‌های انجام‌شده بر روی مدل‌های حیوانی و

انسانی نشان داده است که افزودن سکرئوم MSCs به محیط کشت IVM منجر به افزایش بلوغ تخمک و بهبود پارامترهای جنینی مانند تعداد سلول‌های جداره بلاستوسیست و کاهش آپوپتوز می‌شود (۶، ۷). علاوه بر این برخی از تحقیقات تأیید کرده‌اند که محیط‌های غنی‌شده با کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) میزان تولید جنین‌های با کیفیت بالاتر را افزایش داده است (۸، ۹). یکی از منابع سلولی که اخیراً بواسطه دسترسی آسان و غیرتهاجمی و توانایی تمایز به انواع سلول‌ها، به‌عنوان منبعی ارزشمند در پزشکی بازساختی و درمان بیماری‌های زنان مورد توجه قرار گرفته سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی (MenSCs) است. سکرئوم این سلول‌ها که حاوی فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و آگروم‌ها است، به‌عنوان یک ماده غنی‌ساز برای بهبود بلوغ تخمک و کیفیت جنین مورد بررسی قرار گرفته که نتایج امیدبخشی داشته است (۴). از سوی دیگر، پتانسیل لانه‌گزینی جنین‌های انسانی همچنان پایین است. یکی از دلایل این است که جنین‌های انسانی تولید شده در محیط آزمایشگاه ممکن است از نظر کروموزومی غیرطبیعی باشند، در حالی که انتخاب جنین‌ها بر اساس معیارهای مورفولوژیکی همیشه روشی قطعی برای تشخیص قابلیت باروری و رشد تخمک و جنین نیست. در مطالعه‌ای بر روی بیش از ۶۰۰۰ جنین نشان داده شد که ناهنجاری‌های کروموزومی فارغ از سن مادر و مورفولوژی جنین به طور گسترده‌ای وجود دارند. متأسفانه، ارزیابی سیتوژنتیک با آزمایش اجسام قطبی و بلاستومرها اطلاعات کمی در مورد فرآیندهای ژنتیکی که در تخمک رخ می‌دهند، ارائه می‌دهد. همچنین، ارتباط بین مورفولوژی جنین و آنوپلوئیدی همچنان نامشخص است (۱۰). آنوپلوئیدی شایع‌ترین نوع ناهنجاری کروموزومی و عامل شکست لانه‌گزینی و

بلوغ آزمایشگاهی با استفاده از سکرئوم سلول‌های بنیادی حاصل از خون قاعدگی بود (۵، ۶، ۱۲).

مواد و روش‌ها

شرکت‌کننده‌ها: این مطالعه به بررسی تأثیر محیط کشت غنی‌شده با سکرئوم سلول‌های بنیادی بر کیفیت و سلامت جنین‌های حاصل از بلوغ آزمایشگاهی تخمک در بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک پرداخته است. در این پژوهش، ۱۰۰ بیمار با بازه سنی ۲۰ تا ۴۰ سال که بر اساس معیارهای تعیین‌شده توسط انجمن تولیدمثل انسان و جنین‌شناسی اروپا (روتردام) و انجمن پزشکی تولیدمثل آمریکا (۲۰۰۳) تشخیص PCOS دریافت کرده بودند، در مرکز ابن‌سینا تحت درمان IVF قرار گرفتند. جنین‌های حاصل از تخمک‌های بالغ شده به روش بلوغ آزمایشگاهی در دو گروه کنترل و گروه کشت غنی‌شده با سکرئوم سلول‌های بنیادی از نظر کیفیت و سلامت مورد ارزیابی قرار گرفتند. پیش از آغاز مطالعه، به تمام شرکت‌کنندگان اطلاعات کامل درباره شرایط پژوهش ارائه شد و رضایت آگاهانه کتبی از آنان اخذ گردید.

بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM): بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نابالغ حاصل از سیکل IVF با استفاده از سکرئوم حاصل از سلول‌های بنیادی خون قاعدگی تهیه شده از بانک سلول پژوهشگاه ابن‌سینا انجام شد. سکرئوم سلولی طبق پروتکل استفاده شده توسط فتحی‌کازرونی و همکاران تهیه شد (۶). پس از ذوب سلول‌های بنیادی در محیط کشت DMEM-F12 حاوی Dulbecco's platelet lysate کشت داده شدند تا به تراکم ۷۰ درصد رسیدند. پس از دور ریختن محیط اضافی، سلول‌ها در محیط DMEM-F12 بدون فنول قرار داده شدند و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۵ درصد

سقط جنین است. تشخیص ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی یا PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis) و غربال‌گری ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی یا PGS (Preimplantation Genetic Screening) می‌توانند منجر به افزایش نرخ بارداری در IVF و تولد نوزادان سالم بیشتر شوند. با این حال اطلاعات کمی در مورد فراوانی آنوپلوئیدی در جنین‌های تولید شده از طریق IVM وجود دارد و همواره نگرانی‌هایی در مورد تأثیرات احتمالی این روش بر سلامت جنین وجود دارد. مطالعات نشان داده‌اند که جنین‌های حاصل از تخمک‌های بلوغ‌یافته در محیط آزمایشگاهی ممکن است با افزایش خطر ناهنجاری‌های ژنتیکی، اختلالات میتواسیون DNA و مشکلات تکوینی مواجه شوند (۱۱) که می‌توانند ناشی از تغییرات اپی‌ژنتیکی یا استرس‌های محیطی در طول فرآیند IVM باشند. علاوه بر این، تخمک‌های نابالغ به دست آمده در سیکل ICSI دور انداخته می‌شوند در حالی که شواهد قابل استنادی مبنی بر نرخ بالاتر آنوپلوئیدی بر اساس وضعیت بلوغ تخمک‌ها در روز تخمک‌گیری وجود ندارد. برخی مطالعات روی جنین‌های انسانی تولید شده با ART، نرخ بالای آنوپلوئیدی را با استفاده از PGS نشان داده‌اند. همچنین، PGS اغلب برای بررسی میزان آنوپلوئیدی در جنین‌های IVM، در افرادی که به دلیل سابقه سقط مکرر کاندیدای غربالگری ژنتیکی بودند، استفاده می‌شد. امروزه روش‌های پیشرفته‌ای مانند توالی‌یابی نسل جدید یا NGS (Next Generation Sequencing) مورد استفاده قرار می‌گیرند. تاکنون مطالعه موردی-شاهدی در مورد سلامت جنین‌های حاصل از تخمک‌های بالغ شده در آزمایشگاه با استفاده از سکرئوم سلول‌های بنیادی، منتشر نشده است. بنابراین، هدف این مطالعه بررسی کیفیت جنین و نرخ آنوپلوئیدی در جنین‌های بلاستوسیست تکوین یافته از تخمک‌های حاصل از

دی‌اکسید کربن انکوبه شدند. سپس، مایع رویی از فیلتر سرنگ ۰/۲ میکرومتری عبور داده شد و در نهایت، بخش محلول جمع‌آوری شده و در میکروتیوب‌های ۵ میلی‌لیتری بسته‌بندی و ذخیره گردید. تخمک‌های نابالغ در مرحله ژرمینال وزیکل (GV) تازه به‌دست‌آمده از عمل تخمک‌گیری از زنان مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک که کیفیت قابل قبولی داشتند در دو گروه سکرئوم حاوی ۴۰ درصد سکرئوم + ۶۰ درصد محیط کلیو و گروه کنترل (محیط کلیو که محیط روتین و پایه آزمایشگاه برای کشت و بلوغ تخمک می‌باشد) با غلظت مشابه مطالعات انجام شده (۱۳، ۱۴) در شرایط ۶ درصد CO₂ و ۲۰ درصد اکسیژن کشت داده شدند.

لقاح و کشت جنین: تخمک‌های بالغ شده حاصل از لقاح آزمایشگاهی بعد از تزریق توسط اسپرم به روش داخل سیتوپلاسمی یا ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) در دو گروه کنترل و سکرئوم در انکوباتور دمای ۳ درجه و میزان CO₂ ۶ درصد در محیط Cleav کشت داده شدند و جنین‌های حاصل بعد از ۷۲ ساعت در روز سوم در مرحله کلیواژ و با تعویض محیط کشت به Blast بعد از ۱۲۰ ساعت در روز پنجم کشت در مرحله بلاستوسیت از نظر تکوین جنین و کیفیت با استفاده از استریو میکروسکوپ (Nikon, SMZ800N, Japan) مورد ارزیابی قرار گرفته و بین دو گروه مقایسه شدند.

بررسی ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی برای آنیوپلوئیدی یا PGT-A به کمک NGS: همه جنین‌های تشکیل شده در محیط Blast شرکت Origio تا روز پنجم و رسیدن به مرحله بلاستوسیت کشت داده شدند و جنین‌هایی که در هر دو گروه به این مرحله رسیدند با استفاده از روش هیچینگ کمکی (Assisted Hatching) به کمک لیزر هچ شدند و بر اساس سیستم درجه‌بندی گاردنر (۱۵) از نظر میزان انبساط،

کیفیت توده سلولی داخلی و تروفکتودرم (TE) مورد ارزیابی قرار گرفتند. بیوپسی TE روی بلاستوسیت‌های روز ۵ با درجه بهتر از ۳ BB انجام شد. ۵ تا ۱۰ سلول برای آزمایش ژنتیکی جمع‌آوری شد. از سلول‌های جمع‌آوری شده DNA استخراج شد. پس از آن، روش تکثیر کل ژنوم روی تمام نمونه‌های فردی و همچنین کنترل خالی انجام شد. مقدار غلظت واجد شرایط برای نمونه‌های فردی باید بین ۲۰ تا ۸۰ نانوگرم بر میکرولیتر باشد. برای بررسی آنیوپلوئیدی از روش توالی‌یابی کل ژنوم یا WGS (Whole Genome Sequencing) آماده‌سازی کتابخانه با استفاده از نمونه‌های DNA که به صورت تصادفی به اندازه ۲۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز قطعه‌قطعه شده بودند و از بلاستوسیت‌های بیوپسی‌شده در روز ۵ به دست آمده بودند (کیت توالی‌یابی Ion SingleSeq، شرکت Thermo Fisher Scientific) انجام شد. به انتهای قطعات DNA، آداپتورهای اختصاصی متصل شدند تا امکان توالی‌یابی در پلتفرم‌های توالی‌یابی نسل جدید (NGS) مانند Ion Torrent فراهم شود. آماده‌سازی نمونه و ایجاد قالب (Templating) روی دستگاه خودکار Ion Chef شرکت Thermo Fisher Scientific آمریکا انجام شد. تراشه‌های قالب‌بندی‌شده با استفاده از سیستم Ion S5 توالی‌یابی شدند. تحلیل داده‌های حاصل از توالی‌یابی با نرم‌افزار Ion Reporter انجام شد. نتایج با ژنوم مرجع انسانی با استفاده از سایت <https://www.pgxccloud.com> هم‌تراز شدند. قابل توجه است که وضعیت پلوئیدی به عنوان یوپلوئید (با درصد آنوپلوئیدی کمتر از ۲۰ درصد)، آنوپلوئید (با درصد آنوپلوئیدی بیش از ۸۰ درصد) یا موزائیسیم (با درصد آنوپلوئیدی بین ۲۰ تا ۸۰ درصد) گزارش شد.

تجزیه و تحلیل آماری: با استفاده از SPSS نسخه ۱۸ و رسم نمودارها بوسیله نرم‌افزار Graphpad PRISM

9.4.1 انجام شد. برای مقایسه تعداد و کیفیت جنین‌ها بین دو گروه از نرم‌افزار SPSS و با توجه به کوچک بودن حجم نمونه از تست‌های Fisher's Exact Test و Mann-Whitney U Test استفاده شد. برای بررسی نتایج حاصل از PGT-A و تفاوت معنی‌داری بین درصد توزیع یوپلوئیدی، آنوپلوئیدی و موزایسم در گروه کنترل و آزمایش، از آزمون آماری Chi-Square (کای-دو) استفاده شد.

نتایج

کیفیت جنین‌های مرحله کلیواژ در گروه سنی زیر ۳۰ و بالای ۳۰ سال: تأثیر استفاده از سکرئوم سلول‌های بنیادی بر افزایش تعداد و کیفیت جنین‌ها در دو گروه سنی (زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال) بررسی شد. جنین‌های حاصل از زنان با تخمدان پلی-کیستیک و میانگین سنی $37/5 \pm 32/77$ و هورمون آنتی‌مولرین بالاتر از $3/63 \pm 4/14$ (نانوگرم/میلی‌لیتر) از نظر کیفیت ارزیابی شده و در دو گروه سنی زیر و بالای ۳۰ سال دسته‌بندی شدند. مقایسه تعداد کل جنین‌های حاصل بین دو گروه اختلاف معنی‌داری نشان نداد. در گروه سنی زیر ۳۰ سال، اختلاف در تعداد کل جنین‌ها بین گروه کنترل و آزمایش از نظر

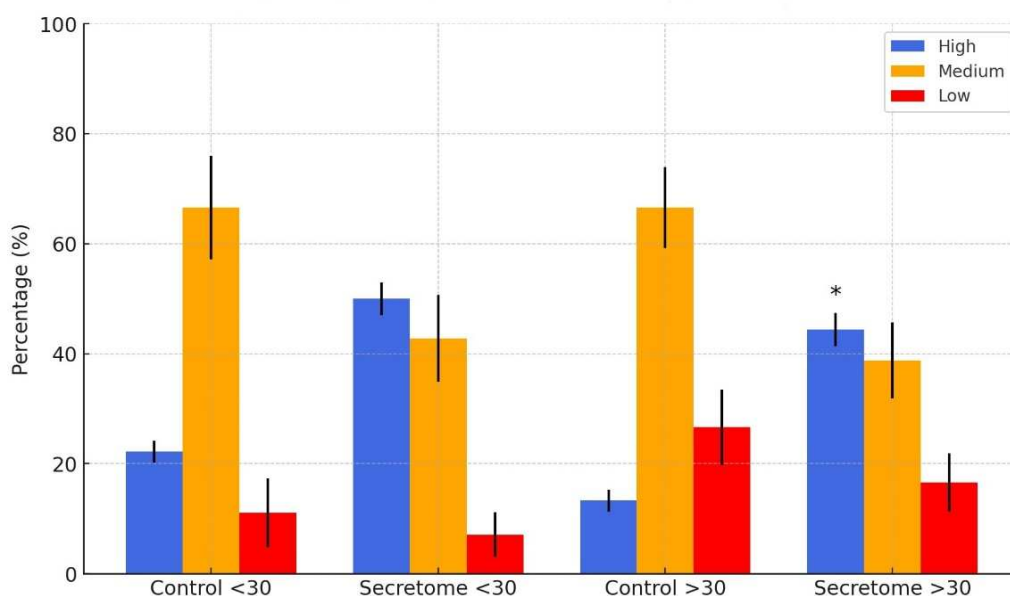
آماري معنی‌دار نبود ($p = 0/082$). همچنین درصد جنین‌های با کیفیت عالی در گروه آزمایش (۵۰ درصد) نسبت به گروه کنترل (۲۲/۲ درصد) افزایش نشان داد، اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p = 0/207$). در گروه سنی بالای ۳۰ سال از نظر تعداد بین دو گروه اختلاف معنی‌دار نبود ($p = 0/317$) اما درصد جنین‌های با کیفیت عالی در گروه سکرئوم نسبت به گروه کنترل به طور قابل‌توجهی بیشتر بود ($p = 0/049$). در حالیکه در هر دو گروه سنی (زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال)، تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و سکرئوم در جنین‌های با کیفیت متوسط و بد مشاهده نشد ($p > 0/05$) (جدول ۱، شکل ۱).

سلامت جنین‌ها: تفاوت کلی بین گروه کنترل و آزمایش از نظر توزیع یوپلوئیدی ($p = 0/76$)، آنوپلوئیدی ($p = 0/65$) و موزایسم ($p = 0/90$) معنی‌دار نیست و IVM باعث افزایش معنی‌دار آنوپلوئیدی یا کاهش معنی‌دار یوپلوئیدی نشده است ($p = 0/85$). این نتایج نشان می‌دهد که تأثیر معنی‌داری بر سلامت جنین‌ها از نظر آنوپلوئیدی و موزایسم ندارد (جدول ۱، شکل ۲).

جدول ۱- مقایسه ویژگی‌های جنین‌های حاصل در گروه‌های مداخله و گروه کنترل در گروه سنی زیر و بالای ۳۰ سال

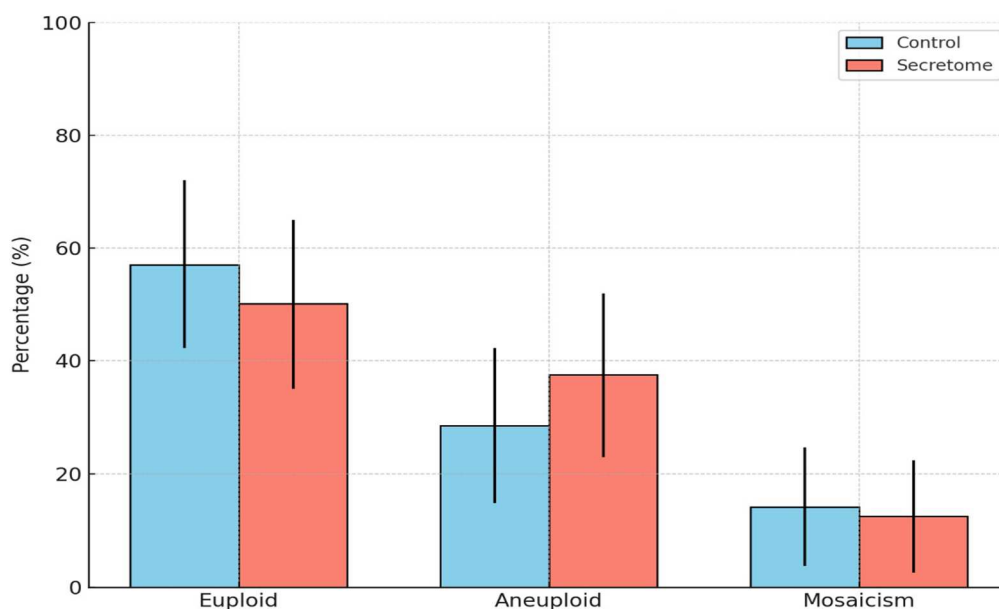
Table 1. Comparison of characteristics of embryos obtained in the intervention and control groups in the age group under and over 30 years

	Control < 30	Control > 30	Secretome < 30	Secretome > 30
Number of oocytes	100	100	100	100
Grade A embryos	2.9 (22.2%)	2.15 (13.3%)	7.14 (50%)	8.18 (44.4%)
Grade B embryos	6.9 (66.6%)	10.15 (66.6 %)	6.14 (42.8 %)	7.18 (38.8%)
Grade B and C embryos	1.9 (11.1%)	4.15 (26.6%)	1.14 (7.1%)	3.18 (18.8%)
Aneuploid Blastocysts	(28.5 %) (ns)		(37.5 %) (ns)	
Euploid Blastocysts	(57.1 %) (ns)		(50 %) (ns)	
Mosaicism Blastocysts	(14.2 %) (ns)		(12.5 %) (ns)	



شکل ۱- نمودار مقایسه کیفیت جنین‌های تکوین یافته در روز سوم کشت (مرحله کلیواژ) در گروه سکرِتوم و کنترل بین زنان زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال. * نشان‌دهنده اختلاف $p \leq 0.05$ نسبت به گروه کنترل می‌باشد. تعداد جنین‌ها به تعداد کل جنین‌ها در هر گروه بصورت درصد محاسبه شده است.

Fig 1. Graph comparing the quality of embryos developed on the third day of culture (cleavage stage) in the secretome and control groups between women under 30 years and over 30 years of age. * indicates a difference of $p \leq 0.05$ compared to the control group. The number of embryos was calculated as a percentage of the total number of embryos in each group.



شکل ۲- نمودار مقایسه سلامت جنین‌های تکوین یافته در روز پنجم کشت (مرحله بلاستوسیت) در گروه سکرِتوم و کنترل. تعداد جنین‌ها به تعداد کل جنین‌ها در هر گروه بصورت درصد محاسبه شده است و اختلاف بین گروه‌ها معنی‌دار نبود ($p > 0.05$).

Fig 2. Graph comparing the health of embryos developed on the fifth day of culture (blastocyst stage) in the secretome and control groups. The number of embryos was calculated as a percentage of the total number of embryos in each group, and the difference between the groups was not significant ($p > 0.05$).

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از سکرئوم سلول‌های بنیادی ممکن است به بهبود کیفیت جنین‌ها، به ویژه در بیمارانی بالای ۳۰ سال، کمک کند. این یافته با مطالعات قبلی همسو است که نشان داده‌اند سکرئوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC-CM) حاوی فاکتورهای رشد، سایتوکاین‌ها و miRNAهایی است که می‌توانند محیط تخمدان و رحم را برای بهبود کیفیت اووسیت‌ها و جنین‌ها بهینه کنند. تاثیر مثبت کاندیشن مدیوم حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در انواعی از بیماری‌ها و نیز بلوغ تخمک در مطالعات مختلف اثبات شده است که می‌تواند به مکانیسم‌های گسترده‌ای مربوط باشد (۱۶). همچنین در مطالعات جدید وجود وزیکل‌های خارج سلولی مترشح‌ه از این سلول‌ها بویژه سلول‌های مشتق از خون قاعدگی مورد بحث می‌باشد که مکانیسم اثر آنها به این صورت است که می‌توانند بعنوان حامل-هایی برای مولکول‌های زیستی باشند که اثرات ذکر شده را القا کنند همچنین انواعی از لیپیدها و پروتئین‌ها و RNA micro ها را در خود حمل می‌کنند (۱۷). به عنوان مثال، مکانیسم‌های مولکولی از طریق مسیرهای سیگنالینگ، مانند مسیر PI3K/AKT و MAPK/ERK، فاکتورهای رشد مانند IGF-1، VEGF و $TGF-\beta$ موجود در سکرئوم می‌توانند باعث افزایش بلوغ اووسیت‌ها، بهبود تکثیر سلول‌های گرانولوزا و کاهش استرس اکسیداتیو شوند (۱۸). این مکانیسم‌ها ممکن است توضیح‌دهنده بهبود کیفیت جنین‌ها در گروه آزمایش باشد. در این راستا نتایج یک مطالعه حیوانی توسط امینی و همکاران نشان داد استفاده از مواد مغذی سلول‌های بنیادی خون قاعدگی در تشکیل جنین‌های بلاستوسیست با کیفیت تاثیر گذار می‌باشد (۸). به این ترتیب، عدم معنی‌داری اختلاف در تعداد کل جنین‌ها ممکن است نشان‌دهنده این باشد که

سکرئوم سلول‌های بنیادی بیشتر بر کیفیت جنین‌ها تاثیر می‌گذارد تا بر تعداد آنها که این امر می‌تواند ناشی از عدم بلوغ سیتوپلاسمی تخمک‌ها باشد که منجر به کاهش نرخ بلوغ و در نتیجه تشکیل جنین خواهد شد (۱۴). همچنین، تفاوت نتایج بین دو گروه سنی ممکن است به دلیل کاهش ذخیره تخمدانی و افزایش استرس اکسیداتیو در بیمارانی بالای ۳۰ سال باشد، که باعث می‌شود این گروه بیشتر از تأثیرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی سکرئوم سلول‌های بنیادی مثل IL-10 و SOD بهره‌مند شوند. همچنین در مطالعه دیگر با استفاده از کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی بهبود تشکیل جنین در مدل موشی گزارش شد و این امر می‌تواند به احتمال وجود اختلاف در ترکیبات کاندیشن مدیو و سکرئوم نیز نسبت داده شود. از سوی دیگر یکی از دلایل احتمالی عدم بهبود قابل‌توجه در تعداد و نیز کیفیت جنین در گروه سنی زیر ۳۰ سال می‌تواند حذف سلول‌های کومولوس در طی فرآیند بلوغ آزمایشگاهی باشد. سلول‌های کومولوس نقش حیاتی در بلوغ و کیفیت تخمک‌ها ایفا می‌کنند. این سلول‌ها از طریق اتصالات شکاف‌دار با تخمک‌ها در ارتباط بوده و تبادل مولکول‌های سیگنالینگ و مواد مغذی بین آنها صورت می‌گیرد. حذف یا آسیب به این سلول‌ها می‌تواند منجر به کاهش کیفیت تخمک و در نتیجه کاهش کیفیت جنین شود (۱۹). اما چنانچه میدانیم مکانیسم‌های بین سلولی و ارتباط و تبادل بین سلول‌های گرانولوزا و تخمک تاثیر زیادی بر بلوغ تخمک و مسیرهای منجر به آن دارد اما در آزمایشگاه-های درمان ناباروری برای تشخیص مرحله بلوغ تخمک حذف این کمپلکس‌های سلولی از اطراف تخمک گریزناپذیر است. در همین راستا مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که بیان ژن‌های خاص در

سلول‌های کومولوس با کیفیت تخمک و جنین مرتبط است. به عنوان مثال، افزایش بیان ژن‌های GDF9 و BMP15 در سلول‌های کومولوس با بهبود بلوغ تخمک، لقاح و کیفیت جنین همراه بوده است (۲۰). بنابراین، در حالی که سکرئوم MSC ممکن است فاکتورهای ضروری برای بلوغ تخمک را فراهم کند، حذف سلول‌های کومولوس می‌تواند تأثیرات منفی بر کیفیت جنین داشته باشد. در نتیجه غنی‌سازی محیط IVM با استفاده از سکرئوم می‌تواند برای بلوغ هسته‌های مفید باشد اما از نظر مکانیسم‌های دخیل این امر کافی نیست تا دیسمتیلیسیون ناشی از کشت IVM را جبران کند یا قابلیت رشد و پیشرفت جنین را پس از آن بهبود بخشد (۱۴). کیفیت جنین همیشه معیار کاملاً دقیقی مبنی برای سلامت جنین نیست و مطالعات نشان می‌دهند که تنها معیار ظاهری نمی‌تواند تضمین‌کننده انتقال مثبت باشد. انتخاب یک جنین مناسب برای انتقال که منجر به یک لانه‌گزینی و بارداری موفق می‌شود در کلینیک‌های درمان ناباروری اهمیت بسزایی دارد اما جنین‌های یوپلوئید که دارای مجموعه کروموزومی طبیعی انسان شامل ۴۶ کروموزوم هستند، به‌طور ترجیحی برای انتقال انتخاب می‌شوند تا جنین‌های آنوپلوئید (مجموعه کروموزومی غیرطبیعی)، زیرا با نتایج بالینی بهتری همراه هستند. یکی از مباحث مورد توجه سلامت جنین‌های حاصل در آزمایشگاه است و بویژه با توجه به استفاده از تخمک‌های نابالغ و تأثیرات منفی احتمالی زمان کشت و محیط کشت‌های مورد استفاده برای بلوغ آزمایشگاهی تخمک بررسی سلامت جنین‌های حاصل از این روش‌ها برای استفاده کلینیکی و درمان ناباروری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که مطالعات بسیار محدودی در این زمینه منتشر شده است. همچنین برخی بیماران به دلیل ناباروری با علت نامشخص و سقط برای بررسی آنیوپلوئیدی که

یکی از دلایل مهم در شکست لانه‌گزینی است معرفی می‌شوند. اما نتایج این مطالعه نشان داد که از نظر میزان آنیوپلوئیدی و یوپلوئیدی و همچنین جنین‌های موزاییک در گروه تیمار شده با سکرئوم سلول‌های بنیادی خون قاعدگی تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل وجود ندارد. به این معنی که ترکیبات موجود در محیط کشت بلوغ آزمایشگاهی تخمک نسبت به محیط تجاری روتین آزمایشگاه منجر به ایجاد ناهنجاری در جنین نمی‌شوند. علاوه بر این، اووسیت‌های نابالغ که در طول چرخه‌های IVF تحریک‌شده با گنادوتروپین بازیابی می‌شوند، معمولاً در کلینیک‌ها دور انداخته می‌شوند؛ در حالی که هیچ شواهد جامع و قابل استنادی مبنی بر نرخ بالاتر آنوپلوئیدی بر اساس وضعیت بلوغ اووسیت‌ها در روز بازیابی وجود ندارد (۲۱). همچنین در مطالعه دیگری همراه با نتایج ما نشان داده شد که بلوغ آزمایشگاهی تخمک میزان تشکیل جنین‌های آنیوپلوئیدی را افزایش نداد (۹). و مطالعه ما نیز نشان داد تغییرات اپی‌ژنتیکی یا استرس‌های محیطی احتمالی در طول فرآیند IVM منجر به تشکیل جنین‌هایی با نرخ آنیوپلوئیدی بالاتر نشد که این امر می‌تواند ناشی از تأثیر آنتی‌اکسیدانی سکرئوم سلول‌های بنیادی خون قاعدگی باشد (۱۸، ۲۲). اما ارتباط بین مورفولوژی جنین و آنوپلوئیدی همچنان نامشخص است و برخی مطالعات نشان می‌دهند که صرفاً انتخاب یک جنین بر اساس ویژگی‌های ظاهری با گرید خوب نمی‌تواند دلیلی بر سلامت جنین و لانه‌گزینی موفق شود و با توجه به کوچک بودن حجم نمونه مطالعه ما از نظر تعداد جنین‌های حاصل امکان بررسی ارتباط بین سن و سلامت و مورفولوژی جنین‌ها در این تحقیق وجود نداشت. در هر صورت باید در نظر گرفت که تخمک زنان PCO با وجود کاندید بودن برای مطالعات از نظر کیفیت در مقایسه با

نتایج نشان داد که استفاده از محیط کشت غنی شده با این ترکیب مغذی در گروه سنی بالای سی سال در بهبود کیفیت جنین موثر بود اما میزان ناهنجاری‌های کروموزومی (آنپلوئیدی) را در جنین‌ها بواسطه تأثیرات کشت بیش از آنچه در سایر چرخه‌های درمان ناباروری گزارش شده است، افزایش نداد و نتایج این مطالعه همراه با سایر تحقیقات بود. در نتیجه ترکیب IVM یا PGT-A می‌تواند دقت انتخاب جنین‌های سالم را افزایش داده و نتایج درمان را بهبود بخشد. استفاده از روش‌های غربالگری در کلینیک‌های درمان ناباروری با در نظر گرفتن شرایط بیمار برای افزایش نرخ لانه‌گزینی و همچنین مطالعات بیشتر در زمینه ارتباط بین مورفولوژی و سلامت جنین پیشنهاد می‌شود.

منابع

1. Walls M, Hunter T, Ryan JP, Keelan JA, Nathan E, Hart RJ. In vitro maturation as an alternative to standard in vitro fertilization for patients diagnosed with polycystic ovaries: a comparative analysis of fresh, frozen and cumulative cycle outcomes. *Hum Reprod.* 2015;30(1):88-96.
2. Halvaei I, Ali Khalili M, Razi MH, Nottola SA. The effect of immature oocytes quantity on the rates of oocytes maturity and morphology, fertilization, and embryo development in ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29:803-810.
3. Chen L, Qu J, Cheng T, Chen X, Xiang C. Menstrual blood-derived stem cells: toward therapeutic mechanisms, novel strategies, and future perspectives in the treatment of diseases. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):406.
4. Rastegari H, Kazemnejad S, Hayati Roodbari N, Ansari-pour S. Role of menstrual blood stem cell-derived secretome, follicular fluid, and melatonin in oocyte maturation and embryo development in polycystic ovary syndrome. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2025;20(3):291-301.

افراد غیر پلی‌کیستیک در درجه پایینتری هستند و بر طبق نتایج برخی مطالعات بر نتایج بلوغ آزمایشگاهی تخمک و نرخ تشکیل جنین و کیفیت جنین‌های حاصل موثر خواهد بود اما طبق بررسی‌های انجام شده همسو با تحقیق ما، نمی‌تواند عامل قطعی موثر بر عدم سلامت جنین‌های حاصل باشد (۲۱). در نتیجه روش بلوغ آزمایشگاهی تخمک با استفاده از سلول‌های بنیادی برای درمان ناباروری همچنان می‌تواند در زنان دارای تخمدان پلی‌کیستیک به عنوان یک گزینه امید بخش در نظر گرفته شود (۲۳) و گرچه نتایج متناقضی در مورد ارزشمند بودن روش‌های بیوپسی یک جنین برای بررسی وضعیت کروموزومی و وضعیت کشت جنین ارایه می‌شود اما در نهایت با اینکه ممکن است PGT-A یک تست مرسوم برای کمک به بیماران در سیکل IVF نباشد هر کلینیک باید اثربخشی استفاده از آن را بر اساس مهارت و محدودیت‌ها و بیمارانش ارزیابی کند (۲۴). اغلب مطالعات انجام شده گذشته‌نگر یا با سبب نمونه کوچک هستند در نتیجه برای حصول نتیجه‌ای قابل استنادتر مطالعات وسیع‌تر با جامعه آماری بزرگتر و یا استفاده از روش‌های غیرتهاجمی و بررسی سلامت بر اساس مورفولوژی به‌ویژه با استفاده از پلتفرم‌های هوش مصنوعی پیشنهاد می‌گردد که در طرح‌های آتی گروه ما مورد بررسی قرار خواهد گرفت. با توجه به شیوع نرخ آنپلوئیدی در جنین‌های آزمایشگاهی استفاده از روش‌های غربالگری با توجه به شرایط بیماران در کلینیک‌های درمان ناباروری در حصول نتایج بهتر توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر تأثیر استفاده از سکرئوم سلول‌های بنیادی خون قاعدگی بر جنین‌های حاصل از بلوغ آزمایشگاهی تخمک مورد بررسی قرار گرفت که

- frozen embryo transfer: a cohort study of 337,148 in vitro fertilisation cycles. *BMC Med.* 2019;17(1):202.
12. Li J, Chen J, Sun T, Zhang S, Jiao T, Chian RC, Li Y, Xu Y. Chromosome aneuploidy analysis in embryos derived from in vivo and in vitro matured human oocytes. *J Transl Med.* 2021;19(1):416.
13. Jafarzadeh H, Nazarian H, Ghaffari Novin M, Shams Mofarahe Z, Eini F, Piryaee A., Improvement of oocyte in vitro maturation from mice with polycystic ovary syndrome by human mesenchymal stromal cell-conditioned media. *J Cell Biochem.* 2018;119(12):10365-10375.
14. Madkour A, Bouamoud N, Kaarouch I, Louanjli N, Saadani B, Assou S, Aboulmaouahib S, Sefrioui O, Amzazi S, Copin H, Benkhalifa M. Follicular fluid and supernatant from cultured cumulus-granulosa cells improve in vitro maturation in patients with polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril.* 2018;110(4):710-719.
15. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* 2000;73(6):1155-1158.
16. Chen L, Qu J, Xiang C. The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):1-10.
17. He Y, Chen D, Yang L, Hou Q, Ma H, Xu X. The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in premature ovarian failure. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):263.
18. Chen L, Qu J, Mei Q, Chen X, Fang Y, Chen L, Li Y, Xiang C. Small extracellular vesicles from menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MenSCs) as a novel therapeutic impetus in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):433.20.
5. Zafardoust S, Kazemnejad S, Darzi M, Fathi-Kazerooni M, Rastegari H, Mohammadzadeh A. Improvement of pregnancy rate and live birth rate in poor ovarian responders by intraovarian administration of autologous menstrual blood derived-mesenchymal stromal cells: phase I/II clinical trial. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2020;16(4):755-763.
6. Fathi-Kazerooni M, Fattah-Ghazi S, Darzi M, Makarem J, Nasiri R, Salahshour F, Dehghan-Manshadi SA, Kazemnejad S. Safety and efficacy study of allogeneic human menstrual blood stromal cells secretome to treat severe COVID-19 patients: clinical trial phase I & II. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):96.
7. Fesahat F, Kalantar SM, Sheikhha MH, Saeedi H, Montazeri F, Firouzabadi RD, Khalili MA. Developmental and cytogenetic assessments of preimplantation embryos derived from in-vivo or in-vitro matured human oocytes. *Eur J Med Genet.* 2018;61(4):235-241.
8. Amini MS, Naderi MM, Shirazi A, Aminafshar M, Boroujeni SB, Pournourali M, Malekpour A. Bioactive materials derived from menstrual blood stem cells enhance the quality of in vitro bovine embryos. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2022;14(4):287.
9. Lee SH. Effects of human endothelial progenitor cell and its conditioned medium on oocyte development and subsequent embryo development. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):7983.
10. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine, the Society of Reproductive Biologists and Technologists, and the Society for Assisted Reproductive Technology. Electronic address: jgoldstein@asrm.org. In vitro maturation: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2021;115(2):298-304.
11. Smith AD, Tilling K, Lawlor DA, Nelson SM. Live birth rates and perinatal outcomes when all embryos are frozen compared with conventional fresh and

- ovarian senescence by relieving oxidative stress-induced inflammation. *Reprod Sci.* 2025; 32(5):1566-1579.
23. Morales C. Current applications and controversies in preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) in In vitro fertilization. *Reprod Sci.* 2024;31(1):66-80.
24. Siristatidis C, Sergeantanis TN, Vogiatzi P., Kanavidis P, Chrelias C, Papantoniou N, Psaltopoulou T. In vitro maturation in women with vs. without polycystic ovarian syndrome: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134696.
25. Fesahat F, Montazeri F, Hoseini SM. Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2020;49(5):101723.
19. Nikoloff N. The key role of cumulus cells in oocytes in vitro maturation protocols. *Fertil Steril.* 2021;116(6):1663.
20. Massoud G, Spann M, Vaught KC, Das S, Dow M, Cochran R, et al. Biomarkers assessing the role of cumulus cells on IVF outcomes: a systematic review. *J Assist Reprod Genet.* 2024;41(2):253-275.
21. Montazeri F, Kalantar M, Hoseini SM, Agha-Miri A, Abdoli M, Nikuei P. Comparing aneuploidy rate in arrested human embryos derived from in-vivo and in-vitro matured oocytes, 19 September 2023, PREPRINT (Version 1) available at Research Square, 2023; <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3309756/v1>
22. Song H, Zhang R, Liu Y, Wu J, Fan W, Wu J, Liu Y, Lin J. Menstrual blood-derived endometrial stem cells ameliorate

Research Article

Protective Effect of Nano Magnesium Oxide on Renal Ischemia/Reperfusion Injury on Renal Function and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Male Wistar Rats

Marzieh Minaei¹, Akram Eidi^{1*}, Pejman Mortazavi², Ahmad Asghari³

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

2- Department of Veterinary Pathobiology, 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: 15 January 2025

Accepted: 2 January 2024

DOI: 10.60833/ascij.2025.1196659

Abstract

Ischemia/reperfusion (I/R) injury is characterized by the restriction of blood supply to the organ followed by the return of blood flow and reoxygenation. The aim of this study was to measure Protective effect of nano magnesium oxide (MgO) on I/R on renal function and vascular endothelial growth factor (VEGF) in male Wistar rats. In this study, 54 adults male Wistar rats were randomly divided into 9 groups of 6 rats, including healthy control, control, I/R control, three healthy experimental groups, and three I/R experimental groups. I/R injury was induced by ligation of the left renal pedicle for 20 minutes. Animals were tested using MgO (doses of 1.25, 2.5 and 5 mg/kg) for 30 days via gavage and finally serum samples were collected to assess renal function. In addition, after sacrificing the animals, kidney tissue was obtained for immunohistochemical examination of VEGF expression and the resulting data were statistically analyzed ($p < 0.05$). The results showed that I/R mice that were intervened with MgO significantly reduced serum urea and creatinine levels at concentrations of 2.5 and 5 mg/kg. Renal function and VEGF expression also showed significant improvement. MgO, as a potent vasodilator, were able to improve serum urea and creatinine levels as indicators of renal cell damage in I/R groups. Also, by reducing the expression level of VEGF in MgO-treated groups, MgO may effectively mediate the protection against hypoxia induced by I/R injury.

Keywords: Nano magnesium oxide, Ischemia/reperfusion, Kidney, VEGF.



مقاله پژوهشی

اثر محافظتی نانو اکسید منیزیم در آسیب ایسکمی/پرپیوژن کلیه بر عملکرد کلیه و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در موش صحرایی نر

مرضیه مینایی^۱، اکرم عیدی^{۱*}، پژمان مرتضوی^۲، احمد اصغری^۳

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

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

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

*مسئول مکاتبات: akeidi@iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۲۶

DOI: 10.60833/ascij.2025.1196659

چکیده

آسیب ایسکمی/پرپیوژن مجدد (I/R) با محدود شدن خون‌رسانی به اندام و به دنبال آن بازگشت جریان خون و اکسیژن‌رسانی مجدد مشخص می‌شود. هدف از این مطالعه، سنجش اثر محافظتی نانو اکسید منیزیم (MgO) در آسیب ایسکمی/پرپیوژن کلیه بر عملکرد کلیوی و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در موش صحرایی نر می‌باشد. در این مطالعه ۵۴ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به طور تصادفی به ۹ گروه ۶ تایی شامل گروه‌های کنترل سالم، شاهد، کنترل I/R، سه گروه تجربی سالم و سه گروه تجربی I/R تقسیم شدند. القای آسیب I/R از طریق بستن پدیکل کلیوی چپ به مدت ۲۰ دقیقه ایجاد شد. حیوانات با استفاده از MgO (دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) به مدت ۳۰ روز از طریق گاوژ مورد آزمایش قرار گرفتند و در نهایت نمونه‌های سرم برای بررسی عملکرد کلیه جمع‌آوری شد. به علاوه با قربانی شدن حیوانات، بافت کلیه برای بررسی ایمونوهیستوشیمی میزان بیان VEGF اخذ شد و داده‌های حاصل مورد آنالیز آماری قرار گرفت ($p < 0/05$). نتایج نشان داد که موش‌های I/R که با نانو اکسید منیزیم مداخله شدند، در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم سطوح اوره و کراتینین سرم را به طور معنی‌داری کاهش دادند. همچنین عملکرد کلیوی و بیان VEGF، بهبود معنی‌داری نشان داد. MgO توانسته به عنوان یک وازودیلاتور قوی، سطوح اوره و کراتینین سرم را به عنوان شاخص‌های آسیب سلول‌های کلیوی، در گروه‌های I/R، بهبود بخشد. همچنین با کاهش سطح بیان VEGF در گروه‌های تحت درمان MgO، ممکن است نانو اکسید منیزیم برای محافظت از هیپوکسی ناشی از آسیب I/R به طور مؤثری واسطه شود.

کلمات کلیدی: نانو اکسید منیزیم، ایسکمی/پرپیوژن، کلیه، VEGF.

مقدمه

NPs برای کاربردهای بیولوژیکی باید به گونه‌ای ساخته شوند که وقتی روی سلول‌ها، بافت‌ها یا سرم اعمال می‌شوند، ویژگی‌های مطلوبی داشته باشند (۲). از آنجایی که NPs نسبت سطح به حجم بیشتری

حوزه نانوپزشکی به سرعت در حال پیشرفت و گسترش است. ذرات بسیار ریزی که دارای اندازه بیشتر از ۱ نانومتر و کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر باشد، نانوذرات (Nanoparticles, NPs) نامیده می‌شوند (۱).

نسبت به ذرات بزرگتر دارند، تأثیر بیشتری بر محیط دارند و با مواد دیگر به شدت تعامل می‌کنند (۳). NPs قابلیت مصرف بهتر، پایداری کلئیدی در محیط‌های بیولوژیکی، راندمان درونی سازی بالا و سمیت کمتری نسبت به میکروذرات نشان می‌دهند. نفوذپذیری سلولی بالاتر و اثرات کوانتومی بیشتر به عنوان تابعی از اندازه نانوذرات، دلیل منحصر به فرد بودن آنهاست (۴). مهم‌ترین ویژگی این داروها، اندازه ذرات، وزن مولکولی، pH، قدرت یونی، غلظت مونومر و بار سطحی می‌باشد (۵). منیزیم (Mg) کاتیون و ماده معدنی مهم درون سلولی در سلول‌های بدن انسان است (۶) همچنین یک عنصر مهم برای حفظ عملکرد طبیعی تقریباً سیصد آنزیم سلولی بدن می‌باشد (۷). در میان نانومواد اکسید فلزی، نانو اکسید منیزیم (MgO) به عنوان ماده‌ای کم‌هزینه و سازگار با محیط زیست در نظر گرفته شده است. سمیت MgO کمتر از سایر نانوذرات اکسیدی فلزی می‌باشد (۶). نانوذرات MgO اثرات مفیدی در سلول‌ها نشان می‌دهند (۸، ۹). نمک‌های منیزیم حاوی MgO به عنوان مکمل منیزیم درمانی می‌تواند باعث افزایش غلظت منیزیم کبدی، افزایش بیان mRNA ی کاتالاز و در نتیجه افزایش فعالیت کاتالاز گردد (۱۰). اکسید منیزیم فراهمی‌زیستی نسبتاً ضعیفی دارد (۱۱) و دست‌کاری مشخصه‌های فیزیکوشیمیایی ذرات MgO به فرم نانو می‌تواند فراهمی‌زیستی آن را افزایش دهد (۱۲). در ارزیابی اثر ضد تشنج در موش گزارش شده است که نانوذرات اکسید منیزیم مؤثرتر از شکل معمول آن بوده است که مربوط به خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانو MgO می‌باشد (۱۳). مکانیسم اصلی عملکرد نانوذرات، هنوز شناخته نشده است. با این وجود، با توجه به ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی نانومواد، پیش‌بینی می‌شود که این مواد با اجزای زیستی برهم‌کنش داشته باشند و اثرات زیادی بر رفتار

و خصوصیات ماکرومولکول، سلول و بدن موجود زنده به جای بگذارند (۱۴). علاوه بر این، گزارش شده است که آن‌ها شاخص‌های استرس اکسیداتیو نظیر گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر را کاهش داده و باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدها نیز می‌شوند (۱۵). آن‌ها سمیت ژنی قابل‌توجهی نشان ندادند که کاربردهای بالقوه آن‌ها را در داروهای نانو به عنوان یک ابزار تشخیصی و درمانی نشان می‌دهد (۹). آسیب ایسکمی رپرفیوژن Ischemia-Reperfusion Injury/ IRI) کلیوی، کاهش جریان خون قشری است که باعث هیپوپرفیوژن بافتی شده و می‌تواند در اثر بیماری‌هایی مانند سپسیس، افت فشار خون، تنگی شریان کلیوی پس از نفرکتومی جزئی و یا در حین پیوند کلیه ایجاد شود. پس از ایسکمی کلیوی، جریان خون کلیه به حالت عادی باز می‌گردد، اما تغییرات ناحیه ای رخ می‌دهد. ناحیه مدولاری بیرونی در شرایط عادی به‌طور حاشیه‌ای اکسیژنه می‌شود و به ویژه شاخه ضخیم صعودی توبول کلیوی، نیازهای انرژی بالایی دارد (۱۶، ۱۷). جریان خون در این ناحیه پس از خون‌رسانی مجدد به حدود ۱۰ درصد طبیعی می‌رسد که منجر به ادم، جریان خون ضعیف، محرومیت از مواد مغذی و از دست دادن ATP می‌شود (۱۸). محصولات تخریب ATP مانند هیپوگزانتین می‌توانند از سلول‌ها نشت کنند و توسط گزانتین اکسیداز به اسید اوریک تبدیل می‌شود. در این فرآیند گونه‌های اکسیژن فعال تشکیل شده که منجر به آسیب ایسکمیک گردیده و تداوم بیشتر ایسکمی و آسیب سلولی توبولی را منجر می‌شود. تورم سلول‌های توبولی در فضای محدود مدولای خارجی به‌طور مکانیکی به انسداد مویرگی می‌افزاید و باعث کاهش جریان خون مدولاری و تداوم بیشتر ایسکمی و آسیب سلولی توبولار می‌شود (۲). بیماری حاد کلیوی مرتبط با I/R، یک مشکل بالینی شایع با مرگ

نشان‌دهنده‌ی میزان فیلتراسیون گلوبرولی است (۳۲)، از این رو اندازه‌گیری آن‌ها به عنوان مارکرهای بیوشیمیایی برای ارزیابی عملکرد کلیه (۳۳)، می‌تواند معیار مهمی در بررسی‌های I/R کلیه به حساب آید.

مواد و روش‌ها

نانوذره اکسید منیزیم کروی با درجه خلوص ۹۹ درصد و اندازه ۶۰-۲۰ نانومتر از شرکت پیشگامان خریداری گردید و از آب مقطر برای حل شدن نانوذرات MgO استفاده شد. کیت اندازه‌گیری اوره و کراتینین سرم از شرکت پارس آزمون (ایران) و کیت ایمونوهیستوشیمی (IHC) VEGF از شرکت Dako، United States and Canada، تهیه گردید.

حیوانات آزمایشگاهی: این مطالعه بر روی ۵۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم انجام شد. حیوانات از انستیتو پاستور تهران تهیه شدند و تحت شرایط استاندارد در قفس‌های پلی‌کربنات در دمای محیط 22 ± 2 سانتی‌گراد با چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. تمامی آزمایشات بر روی حیوانات بر اساس دستورالعمل‌های کمیته اخلاق حمایت از حقوق حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات با شناسه کد اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1398.136 انجام گردید.

روش جراحی: به منظور ایجاد ایسکمی رپرفیوژن، حیوانات توسط کتامین هیدروکلراید (۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) با تزریق داخل صفاقی بیهوش شدند (۷، ۳۴). جهت ایجاد ایسکمی رپرفیوژن، خط میانی شکم برش داده شد و عروق کلیوی توسط پنس غیر ضربه‌ای (Non-traumatic) بسته شده و بعد از ۲۰ دقیقه آزاد گردیدند. جهت مرطوب نگاه داشتن ناحیه، از تامپون

و میر و عوارض بالاست (۱۹، ۲۰). علاوه بر این، پاتورنز I/R کلیه ممکن است در ارتباط با مکانیسم‌هایی از جمله اختلال عملکرد اندوتلیال، پاسخ‌های التهابی سیستمیک و موضعی، استرس اکسیداتیو، آپوپتوز و نکروز باشد (۲۱، ۲۲). با این‌حال، علت و مکانیسم دقیق I/R کلیه هنوز نامشخص است. فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) میتوزن اختصاصی سلول اندوتلیال و یک پروتئین دایمری مخفی است که به روش‌های مختلف می‌تواند رگ‌زایی را القا کند (۲۳، ۲۴). رگ‌زایی در بسیاری از شرایط پاتولوژیک همچون رشد تومور، متاستاز، نفروپاتی دیابتی، دژنراسیون ماکولا، آرتریت روماتوئید و پسوریازیس نقش کلیدی ایفا می‌کند (۲۵، ۲۶). همچنین با تومور کلیه و بیماری کلیه پلی‌کیستیک نیز مرتبط است (۵). از بین تمام مولکول‌های شناخته شده رگ‌زایی، VEGF احتمالاً فاکتور رشد رگ‌زایی اولیه و بهترین تعدیل‌کننده در الگوسازی عروق است که مسئول تمایز آنژیوبلاست و تشکیل لوله است و فعالیت بیولوژیک خود را از طریق اتصال به دو گیرنده تیروزین‌کینازی به نام گیرنده‌های Flt-1 (VEGFR₁) و KDR (VEGFR₂) اعمال می‌کند (۲۷، ۲۸). علاوه بر این، نقش VEGF در رگ‌زایی برای ایجاد ایسکمی خون‌رسانی مجدد بافت و همچنین برای تشکیل تومور بسیار مهم است (۲۹، ۳۰، ۳۱). هیپوکسی یک تنظیم‌کننده کلیدی بیان ژن VEGF است. علاوه بر هیپوکسی، بسیاری از سیتوکین‌ها، هورمون‌ها و فاکتورهای رشد می‌توانند بیان mRNA VEGF را در انواع مختلف سلول تنظیم کنند (۵). در این مطالعه، از یک مدل I/R کلیوی برای بررسی اثر MgO در بیان سیتوکین‌های محافظ از جمله VEGF در کلیه ایسکمیک موش صحرایی استفاده شده است. با توجه به این‌که مقدار سرمی کراتینین و اوره

خیس شده با نرمال سالین گرم استفاده شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه، آن‌ها را برداشته و خط میانی شکم طبق روش‌های متداول (عضلات با نخ ویکریل ۰۳ و پوست با نخ نایلون ۰۳) بخیه گردید (۷، ۳۵).

گروه‌های مورد مطالعه: مطالعات در تمام گروه‌ها طی زمان‌های یکسان به‌عمل آمد. موش‌ها به صورت تصادفی به ۹ گروه ۶ تایی تقسیم شدند: گروه ۱ (کنترل سالم): حیوانات دست نخورده، همراه با گاوآز آب مقطر، گروه ۲ (شاهد): حیوانات تحت جراحی sham، همراه با گاوآز آب مقطر، گروه‌های ۳-۵ (تجربی سالم): حیوانات سالم با تیمار نانوآکسیدمینیزیم ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم بصورت گاوآز روزانه (۳۶، ۳۷)، گروه ۶ (کنترل I/R): حیوانات تحت جراحی ایسکمی/رپرفیوژن همراه با گاوآز آب مقطر و گروه‌های ۷-۹ (تجربی I/R): حیوانات تحت جراحی ایسکمی/رپرفیوژن با تیمار نانوآکسیدمینیزیم ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم بصورت گاوآز روزانه.

آزمایشات سرولوژیک: ۳۰ روز پس از گاوآز نانوآکسیدمینیزیم با ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم (۱۲، ۳۶)، خون از قلب حیوانات جمع‌آوری شد. سرم تهیه شده و سطوح نیتروژن اوره سرم (BUN) و کراتینین سرم (Scr) با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون (ایران) اندازه‌گیری شد (۳۸).

ارزیابی ایمونوهیستوشیمی: پس از شکافتن حفره شکمی بافت کلیه به دقت جدا و برای فیکساسیون کلیه‌ها در فرمالین بافر شده با فسفات (۱۰ درصد) نگهداری شدند. سپس مراحل پاساژ بافتی، تهیه بلوک‌های پارافینی، تهیه برش‌های ۳ میکرونی و مرحله رنگ‌آمیزی به روش ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry, IHC) دقیقاً مطابق روش انجام آزمایش که در بروشور کیت توصیه شده بود، رفتار شد و به ترتیب زیر انجام شد. نمونه‌ها را درون

اتوکلاو ۱۰۰ درجه، سپس درون بافر سیترات ۰/۰۲ مولار با $\text{pH} = 6$ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده سپس خارج کرده و درون بافر P.B.S با $\text{pH} = 7.4$ به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم و سپس اطراف نمونه را کاملاً خشک کرده، در مرحله‌ی بعد پروتئین بلاک را به مدت ۵ دقیقه بر روی لام‌ها ریخته و مجدداً در دو ظرف P.B.S آن‌را شستشو داده، بعد از این مرحله ابتدا لام‌ها را از داخل P.B.S برداشته کاملاً خشک می‌کنیم و آنتی‌بادی رقیق شده یک دوم را به مدت یک ساعت اضافه کردیم، سپس لام‌ها را مجدداً در P.B.S قرار می‌دهیم، خشک می‌کنیم و لام‌ها را در P.B.S قرار داده، خشک می‌کنیم و محلول Novolink.polymer به مدت ۳۰ دقیقه اضافه کرده، مجدداً در P.B.S قرار می‌دهیم و لام‌ها را تمیز نموده و بعد DAB را به مدت ۱۰ دقیقه روی سطح نمونه می‌ریزیم. سپس به مدت ۸ دقیقه مستقیماً وارد هماتوکسیلین کردیم و به ترتیب وارد آب جاری، اسید الکل ضعیف، آب جاری، کربنات لیتیم ۱ درصد و آب جاری کردیم. مرحله‌ی آبگیری با الکل‌های صعودی ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ هرکدام به مدت ۲ دقیقه و با گزیل ۱ و ۲ لام‌ها را شفاف نموده و بعد با چسب مونته می‌کنیم.

بررسی میزان واکنش‌پذیری VEGF در نمونه‌ها: اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده و نتایج از طریق میکروسکوپ نوری (Olympus، آلمان) تفسیر شد. بر این اساس، در هر لام به طور تصادفی در زیر میکروسکوپ، ده میدان انتخاب و ۱۰۰ سلول اپیتلیال توبول با بزرگنمایی $\times 400$ محاسبه شد و نسبت هسته‌ای ایمونوراکتیو به‌دست آمد و در انتها درصد هسته‌های رنگ‌گرفته در بین ۱۰۰۰ سلول اپیتلیال مشخص شد. ایمونوراکتیویته زیر ۵ درصد منفی و بالای ۵ درصد مثبت قلمداد گردید. کنترل منفی، رنگ‌آمیزی اسلایدها بدون آنتی‌بادی ثانویه بود. میزان

ایمونو واکنش پذیری هسته‌ای به صورت درصد تعریف شد. به‌طوری‌که، بین ۵ تا ۳۰ درصد = ۱، ۳۰ تا ۶۵ درصد = ۲ و بالای ۶۵ درصد = ۳ ارزیابی شد (۳۹، ۴۰).

تجزیه و تحلیل آماری: از نرم‌افزار SPSS ۲۱، آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و تست تعقیبی Tukey استفاده شد. اختلاف در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سطح کراتینین و اوره سرم افزایش معنی‌داری ($p < 0.001$) در موش‌های کنترل I/R در مقایسه با کنترل سالم نشان داد. تیمار نانو اکسید منیزیم در دوزهای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم باعث کاهش معنی‌دار ($p < 0.001$) در غلظت‌های کراتینین و اوره در موش‌های I/R نسبت به موش‌های کنترل I/R شد. تیمار نانو اکسید منیزیم (۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) تغییری در غلظت کراتینین و اوره سرم در موش‌های سالم ایجاد نکرد (جدول ۱). نتایج حاصل از تکنیک ایمونوهیستوشیمی در مورد تغییرات بیان ژن VEGF در بافت کلیه نشان داد که در گروه کنترل سالم، گروه شاهد جراحی،

گروه‌های سالم تجربی دریافت‌کننده نانو MgO با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، ساختار کلیوی طبیعی همراه با گلومرول‌های طبیعی است و بیان خفیف VEGF در گلومرول‌ها و لوله‌های کلیوی مشاهده گردید. در صورتی‌که موش‌های صحرایی گروه کنترل ایسکمی/ریپرفیوژن با بیان شدید VEGF در لوله‌های کلیوی مشاهده شدند، همچنین گروه‌های تجربی I/R دریافت‌کننده نانو MgO با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، بیان متوسط تا خفیف VEGF را در لوله‌های کلیوی نشان دادند (شکل ۱). در بررسی میزان ایمونو واکنش پذیری هسته‌ای به صورت درصد نیز شدت بروز نشانگر VEGF در گروه‌های کنترل سالم و سالم تجربی دریافت‌کننده نانو MgO با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم VEGF امتیاز ۱ درصد (بیان خفیف) را دریافت کردند. در صورتی‌که گروه کنترل I/R امتیاز ۳ درصدی (بیان شدید VEGF) و گروه‌های تجربی I/R دریافت‌کننده نانو MgO با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم امتیاز ۲ درصدی (بیان متوسط تا خفیف VEGF) را نشان دادند (جدول ۲).

جدول ۱- اثر نانو اکسید منیزیم بر سطوح اوره و کراتینین سرمی در موش‌های سالم و I/R

Table 1. Effect of nano-MgO on levels of Serum Urea and Creatinine in normal and I/R rats

Group	Urea (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Normal Control	14.83 ± 0.48	0.67 ± 0.17
Sham-operated	14.48 ± 0.52	0.68 ± 0.02
Normal Experimental + Nano-MgO (mg/kg)		
1.25	14.50 ± 0.43	0.68 ± 0.01
2.5	14.50 ± 0.56	0.69 ± 0.01
5	15.33 ± 0.42	0.70 ± 0.01
I/R Control	70.83 ± 2.33 ***	2.91 ± 0.05 ***
I/R Experimental + Nano-MgO (mg/kg)		
1.25	68.01 ± 1.29 ***	2.68 ± 0.91 ***
2.5	62.33 ± 1.54 ***+++	2.52 ± 0.91 ***+++
5	46.50 ± 1.18 ***+++	1.83 ± 0.63 ***+++

مقادیر بعنوان میانگین $\pm$ انحراف معیار برای شش موش بیان می‌شوند. *** $p < 0.001$ اختلاف معنی‌دار از گروه کنترل سالم و +++ $p < 0.001$

$p < 0.001$ اختلاف معنی‌دار از گروه کنترل I/R

Values are expressed as mean $\pm$ SEM for six rats. *** $p < 0.001$ significantly different from the normal control group and +++ $p < 0.001$ significantly different from the I/R control group.

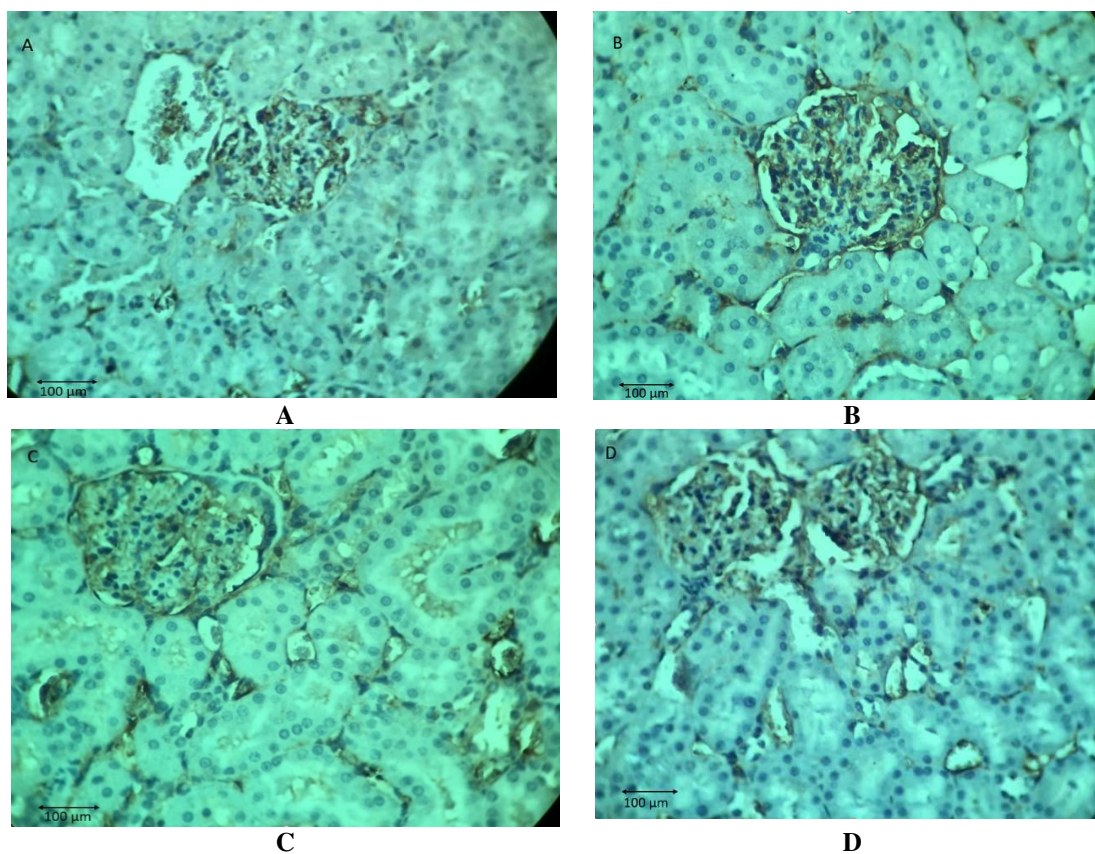
جدول ۲- اثر نانو MgO بر میزان ایمونواکنش‌پذیری هسته‌ای VEGF در بافت کلیه موش‌های صحرایی سالم و I/R

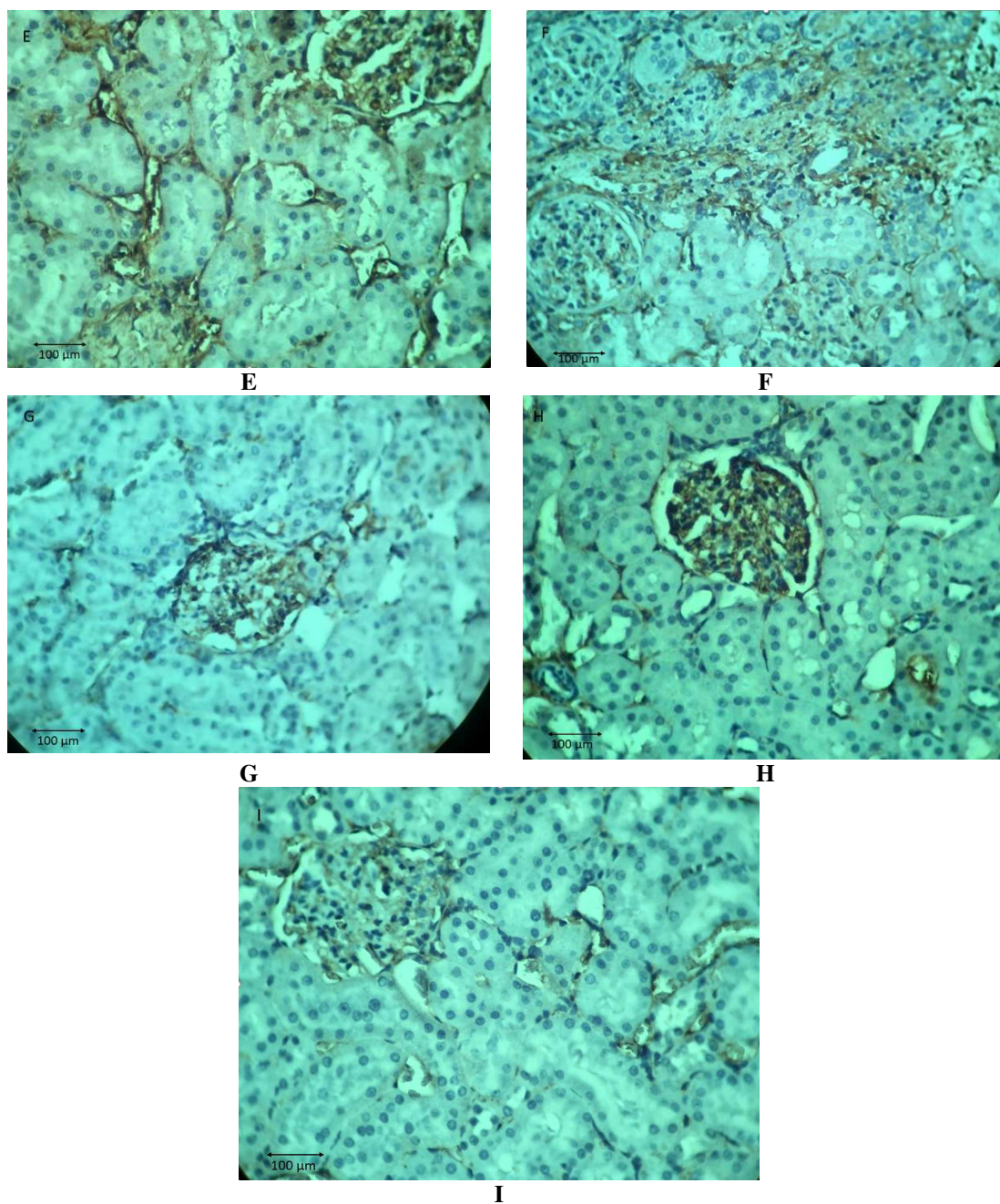
Table 2. Effect of nano-MgO on VEGF expression levels in normal and I/R rats

Group	VEGF Expression rate
Normal Control	1.0 ± 0.00
Sham-operated	1.0 ± 0.00
Normal Experimental + Nano-MgO (mg/kg)	
1.25	1 ± 0
2.5	1 ± 0
5	1 ± 0
I/R Control	3 ± 0.2 ***
I/R Experimental + Nano-MgO (mg/kg)	
1.25	2.6 ± 0.2 ***
2.5	1.8 ± 0.4 **+++
5	1.4 ± 0.3 +++

مقادیر به‌عنوان میانگین $\pm$ انحراف معیار برای شش موش بیان می‌شوند. $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.001$ +++ اختلاف معنی‌دار از گروه کنترل نرمال و ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ اختلاف معنی‌دار از گروه کنترل I/R.

Values are expressed as mean $\pm$ SEM for six rats. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significantly different from the normal control group and ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ significantly different from the I/R control group.





شکل ۱. بیان VEGF در بافت کلیه در تمام گروه‌های مختلف مطالعه. A: گروه کنترل سالم، B: گروه شاهد جراحی، C-E: گروه‌های سالم تجربی دریافت‌کننده نانو MgO (۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) با ساختار کلیوی طبیعی با گلومرول‌های طبیعی و بیان خفیف VEGF در گلومرول‌ها و لوله‌های کلیوی؛ F: موش‌های صحرایی کنترل ایسکمی/ریپرفیوژن (I/R) با بیان شدید VEGF لوله‌های کلیوی، G-I: گروه‌های تجربی I/R دریافت‌کننده نانو MgO (۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) با بیان متوسط تا خفیف VEGF در لوله‌های کلیوی (IHC). 400×

Fig. 1. VEGF expression in renal tissue in all experimental groups. A, normal control group; B sham-operated group; C-E experimental normal groups receiving nano- MgO (1.25, 2.5, and 5 mg/kg) with normal renal structure with normal glomeruli and mild expression of VEGF in glomeruli and renal tubules; F, ischemia/reperfusion (I/R) control rats with a severe expression of VEGF in renal tubules; G-I experimental I/R groups receiving nano- MgO (1.25, 2.5, and 5 mg/kg) with moderate to a mild expression of VEGF in renal tubules (IHC). 400x

بحث

آسیب ایسکمیک رپرفیوژن کلیه یک فرآیند پاتوفیزیولوژیک پیچیده است (۴۱، ۴۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ۲۰ دقیقه ایسکمی و به دنبال آن، بازخونسازی موجب اختلال در عملکرد کلیوی می‌شود. تیمار خوراکی نانوآکسیدمنیزیم موش‌های صحرایی به مدت ۳۰ روز می‌تواند فعالیت کلیوی را بهبود بخشد. میزان کراتینین و اوره در سرم گروه کنترل ایسکمیک رپرفیوژن به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل سالم بود که نشان‌دهنده نوعی آسیب به کلیه و تغییر عملکرد کلیه است. از طرف دیگر تیمار نانوآکسیدمنیزیم توانست کاهش معنی‌داری ($p < 0/001$) در میزان اوره و کراتینین سرم ایجاد کند. اوره آخرین محصول ایجاد شده از متابولیسم اسیدهای آمینه و کاهش پروتئین‌ها است و افزایش مقدار کراتینین در پلاسما گویای کاهش تصفیه گلومرولی و اختلال در عملکرد کلیه است (۴۳) و شاخص‌های شناخته شده‌ای برای نظارت بر عملکرد کلیه (۴۴) و عملکرد صحیح مویرگ‌های گلومرولی و آسیب‌های کپسول بومن هستند (۴۵). نانوآکسیدمنیزیم به‌صورت معنی‌داری سطح کراتینین و اوره را در موش‌های I/R نسبت به موش‌های کنترل I/R کاهش می‌دهد که احتمالاً به دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی و تعدیل سیستم‌ایمنی است (۴۶). در پژوهش پاندير و همکاران (۲۰۱۳) نیز سطوح اوره و کراتینین سرم در موش‌های صحرایی با مدل ایسکمیک ۴۰ دقیقه‌ای، افزایش معنی‌داری ($p < 0/005$) ایجاد کرده است (۴۷). همان‌گونه که در مطالعه‌ی شی و همکاران (۲۰۱۰) نیز I/R در کلیه منجر به بالا رفتن غلظت‌های پلاسمایی کراتینین و اوره نسبت به گروه شاهد گردیده بود (۴۸). مکانیسم‌های نهفته در I/R کلیه‌ها احتمالاً چند فاکتوری و وابسته به یکدیگرند و شامل هیپوکسی، آسیب استرس‌اکسیداتیو و پاسخ‌های التهابی

می‌باشند (۴۹). در پژوهش حاضر در گروه‌های I/R نیز با القاء آپوپتوز و آسیب به بافت کلیه، افزایش فاکتورهای بیوشیمیایی کلیه مانند کراتینین و اوره سرم مشاهده شد. استرس‌اکسیداتیو سبب آسیب گلومرولی شده و افزایش اوره و کراتینین به دنبال القای I/R نشان‌دهنده ایجاد آسیب گلومرولی است (۵۰). ایسکمیک رپرفیوژن باعث افزایش سطح اوره خون می‌شود که به دلیل افزایش کاتابولیسم پروتئین و خروج گروه آمین از اسیدهای آمینه ایجاد می‌شود. تجزیه پورین‌ها یا ناتوانی کلیه در از بین بردن آن‌ها هر دو به افزایش اسید اوریک کمک می‌کنند. فیلتراسیون غیرطبیعی ذرات توسط کلیه با افزایش کراتینین در سرم خون مرتبط است (۵۱) و MgO توانسته به‌صورت موفق در کاهش میزان اوره و کراتینین سرم در گروه‌های تجربی ایسکمیک دریافت‌کننده دوزهای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت معنی‌دار ($p < 0/001$) عمل کند. این نتایج با آنچه توسط نات در سال ۲۰۰۰ گزارش شده بود مطابقت داشت که نشان داد پیش‌درمانی با استفاده از منیزیم منجر به کاهش قابل‌توجهی در عملکرد کلیوی حیوانات آزمایشگاهی می‌شود و باعث ایجاد برخی تغییرات در کراتینین و کلیرانس کراتینین سرم می‌شود (۵۲). همچنین با آنچه توسط ژائو و همکارانش (۲۰۱۷) یافت شد، که تأیید کرد منیزیم با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور قابل‌توجهی I/R را مهار می‌کند. سطوح BUN و Cr ناشی از القای I/R را در موش I/R مجدداً بهبود می‌بخشد، مطابقت دارد. (۵۳). به دلیل نقش کلیدی رگ‌زایی در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک، کنترل این پدیده در روش‌های درمانی بسیار حائز اهمیت است. رگ‌زایی پاتولوژیک در رشد تومور، متاستاز، بیماری‌های ایسکمیک، رتنوپاتی دیابتی، دژنراسیون ماکولا، آرتریت روماتوئید و

پسوریازیس رخ می‌دهد (۲۶، ۵۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که گروه‌های کنترل سالم، شاهد جراحی و سالم تجربی دریافت‌کننده نانو MgO با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، بیان خفیف VEGF در گلوپرونها و لوله‌های کلیوی را نشان دادند در حالی که گروه‌های تجربی ایسکمی دریافت‌کننده نانو MgO به ترتیب در دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، بیان متوسط تا خفیف VEGF در لوله‌های کلیوی را نشان دادند و باعث بهبود عملکرد کلیوی گردید ولی در گروه کنترل ایسکمی، بیان شدید VEGF در بافت کلیه مشاهده گردید. فاکتورهای رشد متعددی در القاء پدیده رگ‌زایی نقش ایفا می‌کنند که مهمترین و کلیدی‌ترین آن‌ها VEGF است (۳۰). بیان این پروتئین همودایمر در تمامی شرایط پاتولوژیک نام‌برده به شدت افزایش می‌یابد (۵۴). با توجه به نقش اساسی VEGF به عنوان حیاتی‌ترین فاکتور دخیل در پدیده رگ‌زایی، این مولکول در زمره اهداف درمانی کلیدی قرار گرفته و مطالعات بسیاری در زمینه مهار آن انجام شده است. برخی مطالعات نشان دادند که VEGF در افراد I/R در مقایسه با افراد سالم بالاتر بود و I/R با افزایش سطوح VEGF بدون توجه به عوامل مخدوش‌کننده، مرتبط بود که به دلیل هیپوکسی رخ داده در ایسکمی، توجیه‌پذیر است (۵۵، ۵۶). سطح بیان بالای VEGF را می‌توان با هیپوکسی از طریق فاکتور القا کننده هیپوکسی توجیه کرد (۵۷). بنابراین، VEGF ممکن است نقش مهمی در تشدید I/R حاد کلیه، ارتقاء تکثیر سلولی و ژئوژنز داشته باشد و این مکانیسم‌ها را می‌توان به ورود به سلول‌های آسیب دیده و اثرات پاراکرین VEGF نسبت داد (۵۸، ۵۹، ۶۰، ۶۱). VEGF به عنوان یک میتوژن مهم رگ‌زایی، می‌تواند رگ‌زایی را تحریک کرده و تراکم مویرگی بافت را بهبود بخشد (۶۲). هیپوکسی عمدتاً بیان VEGF

تنظیم می‌کند. Rajnoch و همکاران (۲۰۰۵) یک واگرایی در بیان mRNA VEGF و پروتئین VEGF پس از ایسکمی نشان دادند (۶۳). نتایج مطالعه‌ی Zhou و همکاران در سال ۲۰۲۴ نشان داد که KIT-PR1P/VEGF می‌تواند به طور خاص کلیه ایسکمیک را هدف قرار دهد و VEGF بیشتری را در بافت کلیه پس از I/R ذخیره کند. علاوه بر این، رگ‌زایی را بشدت افزایش داد (۶۴). نتایج این مطالعه نشان داد که گروه کنترل ایسکمی، VEGF بسیار بیشتری را در بافت کلیه پس از I/R بیان می‌کند. بنابراین VEGF ممکن است نقش مهمی در تشدید I/R حاد کلیه در گروه کنترل ایسکمی داشته باشد، که احتمالاً به دلیل هیپوکسی ایجاد شده در ایسکمی رخ داده است. سپس اثر حفاظتی نانواکسید منیزیم بر کلیه ایسکمیک به روش ایمونوهیستوشیمی بررسی گردید و گروه‌های تجربی ایسکمی دریافت‌کننده نانو MgO به ترتیب در دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، بیان متوسط تا خفیف VEGF در لوله‌های کلیوی را نشان دادند و باعث بهبود عملکرد کلیوی گردید که احتمالاً نانواکسید منیزیم توانسته است به طور مؤثر عمل کند.

نتیجه‌گیری

نانواکسید منیزیم به صورت معنی‌داری اختلال عملکرد کلیه را از طریق کاهش سطوح اوره و کراتینین سرم و میزان بیان VEGF در گروه‌های درمان شده ایسکمی پرفیوژن مجدد کلیه چپ، بهبود می‌بخشد. بنابراین، نانو MgO به عنوان یک عامل محافظ قوی در پاسخ به آسیب‌های I/R کلیوی در موش‌ها احتمالاً عمل می‌کند و می‌تواند عملکرد کلیه را در برابر I/R محافظت نماید.

منابع

1. Neuwelt EA, Hamilton BE, Varallyay CG, Rooney WR, Edelman RD, Jacobs PM,

- Physiol. Renal Physiol. 2017;313(2):339-350.
9. Kumaran RS, Choi YK, Singh V, Song HJ, Song KG, Kim KJ, Kim HJ. In vitro cytotoxic evaluation of MgO nanoparticles and their effect on the expression of ROS genes. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(4):7551-7564.
10. Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *J. Inorg. Biochem.* 2009;130(1):41-50.
11. Jahangiri L, Kesmati M, Najafzadeh H. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory effect of nanoparticles of magnesium oxide in mice with and without ketamine. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2013;17(20):2706-2710.
12. Kellum JA, Unruh M.L, Murugan R. Acute kidney injury. *BMJ clinical evidence*, Published online 2011 Mar 28.
13. Jin T, He Y. Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens. *J. Nanopart. Res.* 2011;13(12):6877-6885.
14. Revell PA. The biological effects of nanoparticles. *Nanotechnol. Percept.* 2006; 2(1):283-298.
15. Sinha MK. Role of 'Ischemia-modified albumin', a new biochemical marker of myocardial ischemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg. Med.* 2004; 21(1):29-34.
16. Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney int.* 1993;43(5): 1160-1178.
17. Padanilam BJ. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003;284(4):608-627.
18. Vetterlein F, Bludau J, Petho-Schramm A, Schmidt G. Reconstruction of blood flow distribution in the rat kidney during postischemic renal failure. *Nephron.* 1994;66(2):208-214.
- Watnick SG. Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF)?. *Kidney Int.* 2009;75(5): 465-474.
2. Brede CH, Labhasetwar V. Applications of Nanoparticles in the Detection and Treatment of Kidney Diseases. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2013;20(6):454-465.
3. Badawy MM, Sayed-Ahmed MZ, Almoshari Y, Alqahtani SS, Alshahrani S, Mabrouk HAA, Abd-Elsalam MM, Alkashif K, Ahmad S, El-Sebaey AM, Hamama MG, Moustafa Ahmed DA. Magnesium Supplementation Alleviates the Toxic Effects of Silica Nanoparticles on the Kidneys, Liver, and Adrenal Glands in Rats. *Toxics.* 2023;11(4):381.
4. Vask A, Titma T, Visnapuu M, Vija H, Kakinen A, Sihtmae M, Pokhrel S, Madler L, Heinlaan M, Kisand V, Shimmo R, Kahru A. Toxicity of 11 Metal Oxide Nanoparticles to Three Mammalian Cell Types In Vitro. *Curr. Top. Med. Chem.* 2015;15(18):1914-1929.
5. Kim BS, Goligorsky MS. Role of VEGF in kidney development, microvascular maintenance and pathophysiology of renal disease. *Korean J Intern Med.* 2003;18(2): 65-75.
6. Vidic J, Stankic S, Haque F, Ciric D, Goffic RL, Vidy A, Jupille J, Delmas B. Selective antibacterial effects of mixed ZnMgO nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* 2013;15(5): 1595–1604.
7. Hajimiresmaiel J, Davoodi H, Namazi N, Javedan GH, Pazoki-Toroudi H, Ajami M. Effect of omega 3 fatty acids on oxidative stress in acute renal failure induced by ischemia reperfusion. *Iran J Nutr Sci Food Technol.* 2014;8(4): 155-162. [In Persian]
8. Kumar G, Solanki MH, Xue X, Mintz R, Madankumar S, Chatterjee PK, Metz CN. Magnesium improves cisplatin-mediated tumor killing while protecting against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Am. J.*

- clinical studies. *Cell Tissue Res.* 2009;335(1):261-269.
28. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *The oncologist.* 2004;9(1):2-10.
29. Costache MI, Ioana M, Iordache S, Ene D, Costache CA, Săftoiu A. VEGF expression in pancreatic cancer and other malignancies: a review of the literature. *Rom. J. Intern. Med.* 2015;53(3):199-208.
30. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer.* 2002;2(10):795-803.
31. Ivy SP, Wick JY, Kaufman BM. An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2009;6(10):569-579.
32. Liu Y, Guo Y, Wang Z, Nie W. Effects of source and level of magnesium on catalase activity and its gene expression in livers of broiler chickens. *Arch. Anim. Nutr.* 2007;61(4):292-300.
33. Wei CC, Wu K, Gao Y, Zhang LH, Li DD, Luo Z. Magnesium Reduces Hepatic Lipd Accumulation in Yellow Catfish (*Pelteobagrusfulvidraco*) and Modulates Lipogenesis and Lipolysis via PPARA, JAK-STAT, and AMPK Pathways in Hepatocytes. *J. Nutr.* 2017;47(6):1070-1078.
34. Asghari A, Jamshidi N, Neshat M.. Serologic evaluation of the effect of administration of magnesium sulfate on the subsequent renal function Induction of reperfusion ischemia in rats. *Comparative Pathobiology. Sci. Res. J.* 2016;13(1):1805-1812.
35. Chien CH, Lee P, Chen CH, Ma M, Lai M, Hsu S. De Novo Demonstration and Co-localization of Free-Radical Production and Apoptosis Formation in Rat Kidney Subjected to Ischemia/Reperfusion. *ASN and JASN.* 2001;12(5):973-982.
36. Kesmati M, Konani M, Torabi M, Khajepour L. Magnesium oxide nanoparticles reduce anxiety induced by
19. Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D, Ince C. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Mol. Med.* 2008;14(7-8):502-516.
20. Onorati F, Rubino AS, Nucera S, Foti D, Sica V, Santini F, Gulletta E, Renzulli A. Off-pump coronary artery bypass surgery versus standard linear or pulsatile cardiopulmonary bypass: endothelial activation and inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010;37(4):897-904.
21. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and prevention of ischemiareperfusion injury. *Anesthesiol. J.* 2001;94(6):1133-1138.
22. Tsutsui H, Sugiura T, Hayashi K, Ohkita M, Takaoka M, Yukimura T, Matsumura Y. Moxonidine prevents ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2009;603(1-3):73-78.
23. Dzietko M, Derugin N, Wendland MF, Vexler ZS, Ferriero D.M. Delayed VEGF treatment enhances angiogenesis and recovery after neonatal focal rodent stroke. *Transl. Stroke Res.* 2013;4(2):189-200.
24. Holzer LA, Cör A, Pfandlsteiner G, Holzer G. Expression of VEGF, its receptors, and HIF-1alpha in Dupuytren's disease. *Acta Orthop.* 2013;84(4):420-425.
25. Ghavamipour F, Shahangian SH, Sajedi R., Arab SH, Mansouri K, Aghamaali MR. Development of a highly-potent anti-angiogenic VEGF8-109 heterodimer by directed blocking of its VEGFR-2 binding site. *FEBS J.* 2014;281(19):4479-4494.
26. Sousa Moreira IP, Alexandrino Fernandes, and M. Joao Ramos, Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition-a critical review. *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.* 2007;7(2):223-245.
27. Crawford Y, Ferrara N. VEGF inhibition: insights from preclinical and

46. Moeini-Nodeh S, Rahimifard M, Baeri M, Abdollahi M. Functional Improvement in Rats' Pancreatic Islets Using Magnesium Oxide Nanoparticles Through Antiapoptotic and Antioxidant Pathways. *Biol Trace Elem Res.* 2017;175(1):146-155.
47. Pundir M, Arora S, Kaur T, Singh Pal R, Singh A. Effect of modulating the allosteric sites of N-methyl-D-aspartate receptors in ischemia-reperfusion induced acute kidney injury. *J Surg Res.* 2013;183(2):668-677.
48. Shi LE, Xing L, Hou B, Ge H, Guo X, Tang ZH. Inorganic nano metal oxides used as antimicroorganism agents for pathogen control, current research. *Technol Edu Topics.* 2010; 2010:361-368.
49. Paller MS. The cell biology of reperfusion injury in the kidney. *J. INVEST MED.* 1994;42(4):632-639.
50. Choi EK, Jung H, Kwak KH, Yi SJ, Lim JA, Park SH, Park JM, Kim S, Jee D, Lim DG. Inhibition of Oxidative Stress in Renal Ischemia- Reperfusion Injury. *Anesth Analg.* 2017;124(1):204-213.
51. Horibata K, Tanoue A, Ito M, Takemura Y. Relationship between renal function and serum magnesium concentration in elderly outpatients treated with magnesium oxide. *Geriatr Gerontol Int.* 2016;16(5):600-605
52. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am. J. Med.* 2000;109(8):65-78.
53. Zhao ZH, Tang ZH, Zhang W, Liu J, Li B. Magnesium isoglycyrrhizinate protects against renal-ischemia-reperfusion injury in a rat model via anti-inflammation, anti-oxidation and anti-apoptosis. *Mol. Med. Rep.* 2017;16(3):3627-3633.
54. Sousa Moreira I, Fernandes PA, Ramos MJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition-a critical review. *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.* 2007; 7(2):223-245.
- morphine withdrawal in adult male mice. *Physiol. Pharmacol.* 2016;20(3):197-205.
37. Mangalampalli B, Dumala N, Perumalla Venkata R, Grove P. Genotoxicity, biochemical, and biodistribution studies of magnesium oxide nano and microparticles in albino wistar rats after 28-day repeated oral exposure. *Environ. Toxicol.* 2018;33(4):396-410.
38. Taheri YA, Neshat M, Garjani A, Doustar NY. Study the effects of metformin on renal function and structure after unilateral ischemia-reperfusion in rat. *Res Pharm Sci.* 2012;7(5):77.
39. Asgari M, Hafezi Ahmadi MR. Value of Immunohistochemistry in Comparison to Immunofluorescence for Detecting Immune Deposits in renal Biopsy. *Iran. J. Med. Sci.* 2007;14(55):141-148. [In Persian]
40. Dabbs DJ. *Diagnostic Immunohistochemistry*, 5th Edition, Elsevier. 2019.
41. Almond PS, Matas AJ, Gillingham K, Dunn DL, Payne WD, Gores P, Gruessner R, Najarian JS. Predictors of chronic rejection in renal transplant recipients. *Transplant. Proc.* 1993;25(1-2):936.
42. Baker GL, Corry RJ, Autor AP. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. Protective effect of superoxide dismutase. *Ann. Surg.* 1985;202(5):628-641.
43. Tietz NW. *Clinical guide to laboratory tests*. 3 th ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1995; pp:22-23.
44. Lajer H, Daugaard G. Cisplatin and hypomagnesemia. *Cancer Treat. Rev.* 1999;25(1):47-58.
45. Lippi G, Montagnana M, Guidi GC. Albumin cobalt binding and ischemia modified albumin generation: an endogenous response to ischemia?. *Int. J. Cardiol.* 2006;108(3):410- 411.

- KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circ.* 2003; 107(8):1164-1169.
61. Yu Y, Gao Y, Qin J, Kuang CY, Song MB, Yu SY, Cui B, Chen JF, Huang L. Promotes the differentiation of endothelial progenitor cells and reendothelialization in the early phase after vascular injury. *Basic Res Cardiol.* 2010;105(6):713-724.
62. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989; 246(4935):1306-1309.
63. Rajnoch A, Lodererova A, Szabo, E, Honsova A, Vannay S, Bloudickova I, Viklicky OM. Regulators of angiogenesis in renal Ischemia/Reperfusion Injury in Normotensive and Hypertensive Rats: Effect of Tacrolimus. *Transplant Proc.* 2005;37(1):352-354.
64. Zhou R, Liu H, Hou X, Liu Q, Sun SH, Li W, Cao W, Nie W, Shi CH, Chen W. Bi-functional KIT-PR1P peptides combine with VEGF to protect ischemic kidney in rats by targeting to Kim-1. *Regen. Ther.* 2024;25(1):162-173.
55. Gozal D, Lipton AJ, Jones KL. Circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep.* 2002; 25(1):59-65.
56. Schulz R, Hummel C, Heinemann S, Seeger W, Grimminger F. Serum levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea and severe nighttime hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(1):67-70.
57. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992;359(6398):843-845.
58. Chen L, Wu F, Xia WH, Zhang YY, Xu SY, Cheng F, Liu X, Zhang XY, Wang SM, Tao J. Gene transfer contributes to in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells. *Cardiovasc. Res.* 2010; 88(3):462-470.
59. Kwon O, Miller S, Li N, Khan A, Kadry Z, Uemura T. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells and endothelial cells may contribute to endothelial repair in the kidney immediately after ischemia-reperfusion. *J Histochem Cytochem.* 2010; 58(8):687-694.
60. Rehman J, Li J, Orschell CM, March

Research Article

Hemolymph Biochemical and Immune Indices of Green Tiger Shrimp (*Penaeus semisulcatus*) in a Biofloc Aquaculture System: Influenced By Different Feeding Levels

Mohammad Hossein Khanjani*

Department of Fisheries Sciences and Engineering, Faculty of Natural Resources, University of Jiroft, Jiroft, Kerman, Iran

*Corresponding author: M.h.khanjani@ujiroft.ac.ir

Received: 28 February 2025

Accepted: 20 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1200709

Abstract

The effect of different feeding levels on the biochemical indicators and immunity of green tiger shrimp in a biofloc aquaculture system was investigated. The experiment was conducted for 45 days with shrimps with an average weight of 2.85 g. Rearing tanks was filled with 150 liters of filtered water with a sand filter, and then 53 individual shrimps were stored in each tank. 7 experimental groups were considered for this research, which included three control groups with different feeding levels in terms of body weight, 6% (CW6), 4% (CW4) and 2% of body weight (CW2), and four biofloc treatments of 6% (BFT6), 4% (BFT4), 2% (BFT2) and 0% (BFT0). The results showed that the highest levels of triglyceride (175.0 mg/dl) and cholesterol (142 mg/dl) were observed in the CW2 treatment. The highest amount of glucose (47 mg/dl) was obtained in BFT0 treatment and the lowest amount was 35.66 and 36.35 in BFT6 and BFT4 treatments, which showed a significant difference with other treatments ($p < 0.05$). The highest value of lysozyme activity was obtained in BFT6 and BFT4 treatments (24.6 and 24.3 u/ml/min), respectively, and the lowest value was obtained in BFT0 treatment (15 u/ml/min), which showed a significant difference with other treatments ($p > 0.05$). The highest amount of phenol oxidase activity was the highest in BFT6 (0.74 u/ml) and BFT4 (0.75 u/ml) treatments, and the lowest value was obtained in BFT0 treatment (0.37 u/ml). In general, the results showed that different feed levels affect the biochemical activities and immunity of green tiger shrimp hemolymph. Feeding with food levels of 6 and 4% in biofloc system leads to improvement of lysozyme, total immunoglobulin and phenol oxidase activities in green tiger shrimp.

Keywords: Green tiger shrimp, Biofloc, Immunity, Hemolymph.

مقاله پژوهشی

شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی همولنف میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) در

سیستم آبی‌پروری بیوفلوک: تحت تاثیر سطوح مختلف غذایی

محمدحسین خانجانی*

گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، کرمان، ایران

*مسئول مکاتبات: m.h.khanjani@ujiroft.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۱۰

DOI: 10.60833/ascij.2025.1200709

چکیده

تأثیر سطوح مختلف غذایی بر شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی میگوی ببری سبز در سیستم آبی‌پروری بیوفلوک مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به مدت ۴۵ روز با میگوهای با میانگین وزن ۲/۸۵ گرم انجام شد. مخازن پرورش با ۱۵۰ لیتر آب تصفیه شده با فیلتر شنی پر شدند و سپس تعداد ۵۳ قطعه میگو در هر مخزن ذخیره‌سازی شد. ۷ گروه آزمایشی برای تحقیق حاضر در نظر گرفته شد که شامل سه گروه کنترل با سطوح مختلف غذایی بر حسب درصد وزن بدن، ۶ درصد (CW6)، ۴ درصد (CW4) و ۲ درصد (CW2) و چهار تیمار بیوفلوک ۶ درصد (BFT6)، ۴ درصد (BFT4)، ۲ درصد (BFT2) و ۰ درصد (BFT0) بود. نتایج نشان داد، بالاترین میزان تری‌گلیسرید (۱۷۵/۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) و کلسترول (۱۴۲ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) در تیمار CW2 بدست آمد. بالاترین میزان گلوکز (۴۷ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) در تیمار BFT0 و کمترین مقدار آن ۳۵/۶۶ و ۳۶/۳۵ به ترتیب در تیمارهای BFT6 و BFT4 مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد ($p < 0/05$). بالاترین مقدار فعالیت لیزوزیم در تیمارهای BFT6 و BFT4 به ترتیب ۲۴/۶ و ۲۴/۳ واحد/میلی‌لیتر/دقیقه و کمترین مقدار آن در تیمار BFT0 (۱۵ واحد/میلی‌لیتر/دقیقه) بدست آمد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد ($p < 0/05$). بالاترین میزان فعالیت فنول اکسیداز در تیمارهای BFT6 (۰/۷۴ واحد/میلی‌لیتر) و BFT4 (۰/۷۵ واحد/میلی‌لیتر) بالاترین بود و کمترین مقدار آن در تیمار BFT0 (۰/۳۷ u/ml واحد/میلی‌لیتر) بدست آمد. نتایج نشان داد، سطوح مختلف غذایی بر فعالیت‌های بیوشیمیایی و ایمنی همولنف میگوی ببری سبز تأثیر می‌گذارد. تغذیه با سطوح غذایی ۶ و ۴ درصد در سیستم بیوفلوک منجر به بهبود فعالیت‌های لیزوزیم، ایمونوگلوبولین کل و فنول اکسیداز در میگوی ببری سبز می‌شود.

کلمات کلیدی: میگوی ببری سبز، بیوفلوک، ایمنی، همولنف.

مقدمه

عملکرد رشد مورد استفاده قرار گرفته است، با این حال گسترش پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک گزارش شده است (۱). شیوع بیماری‌ها، کیفیت پست لارو، مدیریت محیط زیست مزرعه پرورش، کیفیت غذا و مدیریت غذادهی از فاکتورهای مهم در تولید

پرورش میگو به صورت متراکم و فوق متراکم در دنیا در حال گسترش است. با توسعه آبی‌پروری میگو، چالش‌های نظیر کاهش کیفیت آب، گسترش عوامل بیماری‌زا و پاتوژن‌ها رخ می‌دهد. در دهه‌های اخیر انواع آنتی‌بیوتیک‌ها جهت مدیریت بیماری‌ها و بهبود

میگو می‌باشد. از فاکتورهای محدود کننده تولید میگو، بیماری‌های باکتریایی و ویروسی، ترکیبات سمی در آب، شرایط آب و هوایی نامساعد، کمبود خوراک مناسب، تجمع مواد آلی و یوتریفیکاسیون می‌باشد (۲، ۳). تکنولوژی بایوفلاک، تکنولوژی جدیدی است که چالش‌های آبی‌پروری سنتی را ندارد. تولید بالاتر، بازیافت پروتئین خوراک، بهبود کیفیت آب و کنترل عوامل بیماری‌زا از ویژگی‌های برجسته این تکنولوژی می‌باشد (۴). همچنین در این سیستم با تنظیم نسبت کربن به نیتروژن، باکتری‌های هتروتروف موجود در آب فعال شده و ترکیبات زائد نیتروژن دار را مصرف کرده و منجر به بهبود کیفیت آب می‌شود. در سال‌های اخیر تکنولوژی بایوفلاک در آبی‌پروری میگو شامل *Peneaus vannamei* (۵)، *Peneaus monodon* (۶)، *Penaeus Fenneropenaeus merguensis* (۷)، *semisulcatus* (۸) به طور گسترده استفاده شده است. میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) از خانواده پنائیده و یکی از گونه‌های مهم و تجاری خلیج فارس و دریای عمان می‌باشد (۹). این گونه تقاضای بازار بالایی در مناطق پراکنش طبیعی دارد و صیادان با صید و خرید و فروش این گونه به کسب درآمد می‌پردازند (۸). در محیط طبیعی رفتار تغذیه‌ای میگوی ببری سبز مطالعه شده و نشان می‌دهد این گونه بیشتر از کرم‌ها، خرچنگ‌ها، نرم‌تنان، روزنه‌داران، کرم‌های پرتار، دیاتومه‌ها، دینوفلاژله‌ها و سخت‌پوستان تغذیه می‌کنند (۹). یک استراتژی خوب تغذیه‌ای در پرورش میگو با کارایی بالای خوراک و تاثیر کمتر بر کیفیت آب منجر به بهبود عملکرد تولید می‌شود (۸). در آبی‌پروری مهم است که اپتیمم سطح غذادهی را بر حسب وزن بدن برای بهبود تولید و سوددهی بهتر محاسبه کنیم. سطوح مختلف غذادهی بر کیفیت آب، عملکرد رشد، فعالیت‌های ایمنی و آنتی‌اکسیدانتی آبی‌پرورش یافته تاثیر می‌

گذارد (۱۰). در تولید تجاری میگو، پرورش دهنده سطح غذادهی را بر اساس وزن هفتگی، شرایط محیطی پرورش، آلودگی آب و ضریب تبدیل غذایی خوراک تعیین می‌کند (۱۱). میگوها فاقد سیستم ایمنی خاص و سازگار هستند و با استفاده از مکانیسم‌های ایمنی ذاتی مانند سلولی (فاگوسیتوز) و پاسخ هومورال (پپتید ضد میکروبی و لیزوزیم) به عوامل بیماری‌زا مانند ویروس‌ها و باکتری‌ها پاسخ می‌دهند (۱۲). در آبی‌پروری میگو، کاهش ایمنی و عملکرد آنتی‌اکسیدانی می‌تواند منجر به بدتر شدن مقاومت در برابر بیماری شود که می‌تواند منجر به زیان اقتصادی گسترده به دلیل مرگ‌ومیر انبوه و شیوع بیماری شود (۱۳). بیوفلوک‌ها باکتری‌های مفیدی هستند که با تشکیل جامعه میکروبی روده، ایمنی میگو را تقویت می‌کنند و سیستم ایمنی غیر اختصاصی میگو را تحریک می‌کنند، زیرا سرشار از مواد فعال زیستی از جمله بروموفنول‌ها، فیتواستروها، ویتامین‌ها، گلوکاتایون، قندهای آمینه، کاروتنوئیدها و ترکیبات ضد باکتری هستند (۱۴). سیستم بایوفلاک علاوه بر بهبود کیفیت آب، خوراک مکمل برای آبی‌پرورش یافته در ۲۴ ساعت شبانه روز فراهم می‌کند (۱۵). در مطالعه حاضر تاثیر سطوح مختلف غذادهی بر پارامترهای بیوشیمیایی و ایمنی همولنف میگوی ببری سبز در سیستم بیوفلوک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش، شرایط و جیره‌ها: پست لاروهای میگوی ببری سبز از مرکز تکثیر میگو در جاسک، هرمزگان تهیه و به مدت ۴۵ روز در مرکز تکثیر بندر کلاهی، میناب، هرمزگان در استخرهای ۱۵۰ مترمربعی نگهداری شدند تا به وزن مناسب برای آزمایش رسیدند. آزمایش به مدت ۴۵ روز با میگوهای ببری سبز با میانگین وزن ۲/۸۵ گرم انجام شد. ۲۱ تانک

مدور پلی اتیلن برای این آزمایش در نظر گرفته شد. هر یک از مخازن با ۱۵۰ لیتر آب تصفیه شده با فیلتر شنی پر شدند و سپس تعداد ۵۳ قطعه میگو (تقریباً ۱ گرم در لیتر) در هر تانک ذخیره سازی شد. ۷ گروه آزمایشی برای تحقیق حاضر در نظر گرفته شد که شامل سه گروه کنترل با سطوح مختلف غذایی بر حسب درصد وزن بدن، ۶ درصد (CW6)، ۴ درصد (CW4) و ۲ درصد وزن بدن (CW2) که روزانه ۳۵ تا ۵۰ درصد آب داخل مخزن پرورش با آب تازه با شوری یکسان قبل از غذادهی تعویض می شد. چهار تیمار بایوفلاک ۶ درصد (BFT6)، ۴ درصد (BFT4)، ۲ درصد (BFT2) و درصد ۰ (BFT0) که روزانه ۰/۵ تا ۱ درصد آب داخل مخزن پرورش تعویض می شد (جدول ۱). غذادهی بر حسب درصد وزن بدن به ترتیب ۶، ۴ و ۲ در ابتدای دوره آزمایش در نظر گرفته شد و کاهش میزان غذادهی در هر تیمار در طول دوره پرورش متناسب با افزایش رشد به نسبت یکسان انجام شد (جدول ۱). در تیمارهای بدون تعویض آب، قبل از ذخیره سازی میگو، نیم میلی لیتر فلاک به ازای هر لیتر به عنوان استوک اولیه به مخازن اضافه شد. غذادهی ۳ مرتبه در روز (۸ صبح، ۱۴ عصر، ۲۰ شب) با نسبت های مختلف با جیره حاوی ۳۸ درصد پروتئین انجام شد در تانک های ۲۰۰۰ لیتری ۲۰ روز قبل از شروع آمایش تولید بایوفلاک برای استفاده در تانک های پرورش شروع شد. از ماده کربن دار ملاس (۵۵/۱۸ درصد ماده خشک، ۴۶/۲۵ درصد کربوهیدرات) جهت تنظیم نسبت کربن (۱۵) به نیتروژن (۱) استفاده شد (۱۶).

آنالیز بیوشیمیایی همولنف: در انتهای آزمایش، از همولنف میگوهای پرورش یافته در تیمارهای مختلف نمونه برداری صورت گرفت. در ابتدا بعد از قطع غذادهی به مدت زمان ۲۴ ساعت، از هر تانک بطور تصادفی ۱۰ میگو انتخاب و به مدت ۱۵ دقیقه در

داخل تشت حاوی یخ با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (به منظور جلوگیری از بروز استرس و کاهش تحرک میگوها) قرار داده شد. از یک سرنگ انسولین استریل یک میلی لیتری دارای سر سوزن شماره G26 که درون سرنگ جهت جلوگیری از انعقاد با ۰/۴ میلی لیتر محلول ضد انعقاد آلزور (سدیم سیترات ۲۷ میلی مول، کلرید سدیم ۳۳۶ میلی مول، EDTA ۹ میلی مول، گلوکز ۱۱۵ میلی مول با PH ۷) ریخته شده بود (۱۷) برای تهیه همولنف استفاده شد. همولنف از ناحیه سینوس شکمی (پاهای اول و دوم شنا در کنار طناب عصبی شکمی) جمع آوری شد (۱۲). نوک سوزن سرنگ با زاویه مورب ۴۵ درجه در زیر لایه قشری پوسته به آرامی فرو گردید و از هر میگو (حدود ۰/۳ میلی لیتر) گرفته شد و پس از آن سرنگ های نمونه گیری، تکان داده شد تا همولنف میگو با محلول ضدانعقاد مخلوط گردد. نمونه های همولنف گرفته شده تا مرحله آنالیز نمونه ها، در میکروتیوب های جداگانه و در فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. میکروتیوب های حاوی نمونه پس از انتقال از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد به محل آزمایشگاه با دمای اتاق (۲۷ درجه سانتی‌گراد) عمل یخ‌زدایی صورت گرفت و سپس با کمک دستگاه ورتکس در مدت زمان ۳۰ ثانیه نمونه ها همگن و برای انجام آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت (۱۸و۱۹). برای اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی همولنف، نمونه ها جهت جداسازی پلاسما در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ (در دقیقه) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس مایع بالایی جدا و برای آنالیز پارامترها مورد استفاده قرار گرفت. گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسرید با استفاده از اسپکتوفتومتر به روش رنگ‌سنجی با استفاده از کیت‌های تشخیص تجاری (پارس آزمون، ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ آنالیز گردید. به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) استفاده شد. سپس برای مقایسه میانگین بین تیمارها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) با استفاده از آزمون چنددامنه-ای دانکن (Duncan's multiple range) در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده گردید. از نرم‌افزارهای میکروسافت آفیس (ورد و اکسل، نسخه ۲۰۱۳) برای رسم نمودن نمودارها استفاده شد.

سنجش قرار گرفتند. میزان فعالیت لیزوزیم با روش کدورت‌سنجی و با استفاده از باکتری *Micrococcus lysodeikticus* به عنوان سوبسترا و لیزوزیم سفیده تخم مرغ به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (۲۰). میزان فعالیت فنول اکسیداز با استفاده از روش کدورت‌سنجی، پس از اکسیداسیون سوبسترا L-DOPA (Sigma) تعیین شد (۲۲). میزان ایمنوگلوبولین کل با استفاده از پلی اتیلن گلیکول ۱۲٪ جهت تفریق و ته‌نشست ایمنوگلوبولین از پروتئین کل تعیین شد (۲۳).

جدول ۱- سطوح مختلف غذایی و تیمارهای آزمایش

Table 1. Different feeding levels and experimental treatments

DTD	1-10	11-20	21-30	31-45	WE (daily)	AN
	6				35-50%	CW6
	6				0.5-1%	BFT6
	4				35-50%	CW4
	4				0.5-1%	BFT4
	2				35-50%	CW2
	2				0.5-1%	BFT2
	0 (Biofloc only, 5 to 10 ml/l)				0.5-1%	BFT0

Abbreviation: DTD: different test days, WE: Water exchange, AN: Abbreviated number

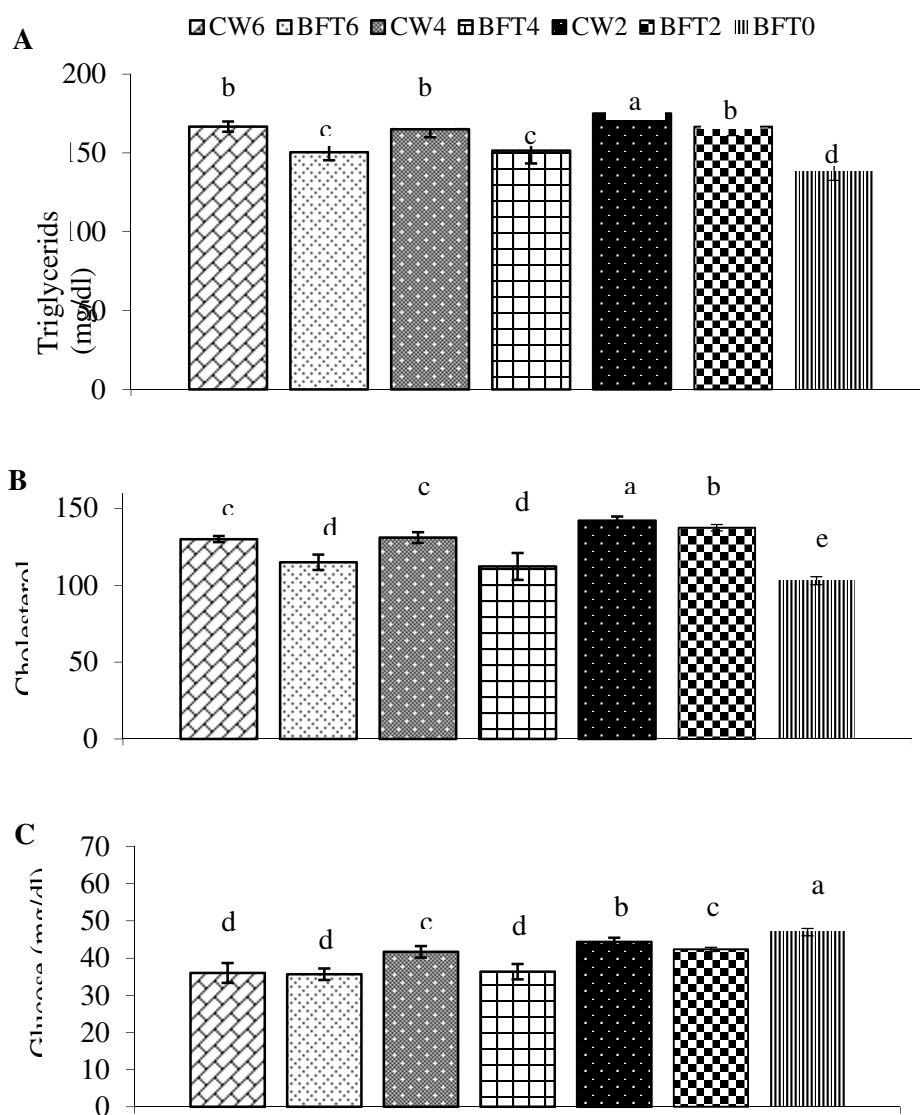
نتایج

تیمارهای BFT4 و BFT6 بدست آمد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد ($p < 0.05$) (شکل ۱، C). بطور کلی نتایج بیوشیمیایی همولنف میگوی ببری سبز نشان داد که در سیستم بیوفلوک مقادیر تری‌گلیسرید و کلسترول نسبت به گروه‌های کنترل کاهش می‌یابد. تغذیه بدون جیره تجاری در سیستم بیوفلوک منجر به افزایش مقادیر گلوکز در میگوی ببری سبز می‌شود. نتایج بدست آمده از فعالیت‌های ایمنی، همولنف میگوی ببری سبز در شکل ۲ ارائه شده است. طبق نتایج بالاترین مقدار فعالیت لیزوزیم در تیمارهای BFT4 و BFT6 به ترتیب ۲۴/۶ و ۲۴/۳ واحد/میلی‌لیتر/دقیقه و کمترین مقدار آن در تیمار BFT0 (۱۵ واحد/میلی‌لیتر/دقیقه) بدست آمد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها

نتایج حاصل از مقادیر پارامترهای مختلف بیوشیمیایی همولنف میگوی ببری سبز در شکل ۱ ارائه شده است. طبق نتایج بالاترین میزان تری‌گلیسرید (۱۷۵/۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) در تیمار CW2 (گروه کنترل، تغذیه با ۲ درصد وزن بدن) مشاهده شد و کمترین مقادیر آن (۱۳۸/۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) در تیمار BFT0 (تغذیه بدون جیره تجاری، در سیستم بیوفلوک) بدست آمد، که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد ($p < 0.05$) (شکل ۱، A). بالاترین میزان کلسترول (۱۴۲ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) در تیمار CW2 و کمترین مقدار آن (۱۰۳ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) در تیمار BFT0 مشاهده شد (شکل ۱، B). بالاترین میزان گلوکز (۴۷ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) در تیمار BFT0 و کمترین مقدار آن ۳۵/۶۶ و ۳۶/۳۵ به ترتیب در

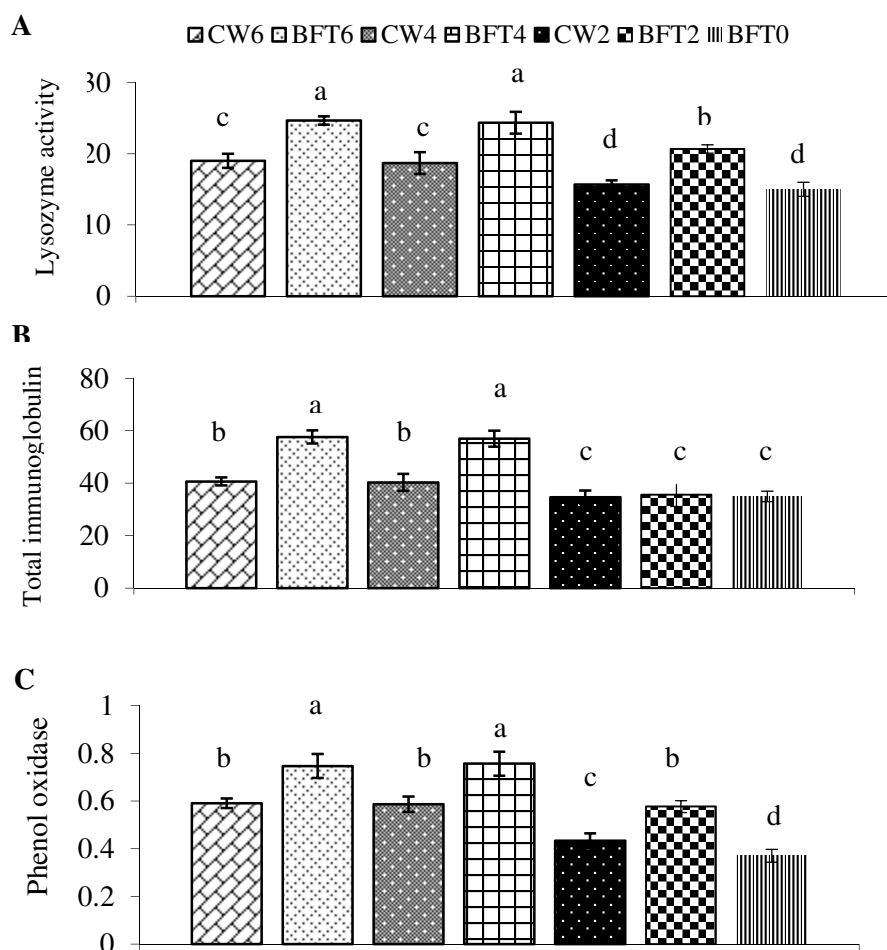
(شکل ۲، C). بطور کلی نتایج فعالیت‌های ایمنی همولنف نشان داد که تغذیه با سطوح غذایی ۶ و ۴ درصد در سیستم بیوفلوک منجر به بهبود فعالیت‌های لیروزیم، ایمنوگلوبولین کل و فنول اکسیداز در میگوی ببری سبز می‌شود که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها دارد.

نشان داد ($p < 0.05$) (شکل ۲، A). بالاترین میزان ایمنوگلوبولین کل در تیمارهای BFT6 و BFT4 به ترتیب ۵۷/۶ و ۵۷ میلی‌گرم/میلی‌لیتر مشاهده شد (شکل ۲، B)، همچنین فعالیت فنول اکسیداز در در تیمارهای BFT6 (۰/۷۴ واحد/میلی‌لیتر) و BFT4 (۰/۷۵ واحد/میلی‌لیتر) بالاترین بود و کمترین مقدار آن در تیمار BFT0 (۰/۳۷ واحد/میلی‌لیتر) بدست آمد



شکل ۱- تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی همولنف میگوی ببری سبز تحت تاثیر تیمارهای مختلف در سیستم آبی‌پروری بیوفلوک

Fig. 1. Changes in hemolymph biochemical indices of green tiger shrimp under the influence of different treatments in a biofloc aquaculture system



شکل ۲- تغییرات شاخص‌های ایمنی همولنف میگوی ببری سبز تحت تاثیر تیمارهای مختلف در سیستم آبی‌پروری بیوفلوک

Fig. 2. Changes in hemolymph immunity indices of green tiger shrimp under the influence of different treatments in a biofloc aquaculture system

بحث

محیطی با کمبود خوراک، استرس زیادی به میگو وارد می‌کند و باعث کاهش میزان تری‌گلیسرید همولنف می‌گردد. کلسترول موجود در میگو جزئی از غشای سلولی و ساختارهای درون سلولی است و به عنوان پیش‌ساز هورمون‌های استروئیدی و هورمون‌های پوست‌اندازی مانند اکدیسون (Ecdysone) عمل می‌کند. غلظت کلسترول شاخصی برای ارزیابی سطح متابولیسم لیپید (کاتابولیسم و اکسیداسیون) در میگو است، زیرا لیپیدها توسط همولنف منتقل می‌شوند (۲۶). در مطالعه Martinez-Porchas و همکاران (۲۰۲۰) کاهش قابل توجهی در کلسترول همولنف

در مطالعه حاضر کمترین میزان تری‌گلیسرید همولنف در تیمار BFT0 (بدون تغذیه با جیره غذایی) مشاهده گردید (شکل ۱، A). در مطالعه Guemez-Sorhouet و همکاران (۲۰۱۹) مقدار تری‌گلیسرید همولنف در تیمارهای بیوفلوک با گروه‌های کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد، در تیمارهای بیوفلوک مقدار تری‌گلیسرید ۳۶/۱، ۳۶/۶ و ۳۲/۸ میلی‌گرم/دسی‌لیتر به ترتیب در تراکم‌های ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ پست لارو بر متر مکعب مشاهده شد (۲۴). با افزایش میزان استرس، سطح تری‌گلیسرید همولنف میگوی سفید غربی کاهش می‌یابد (۲۵). میگوی ببری سبز در

همکاران (۲۰۱۷) مشخص شد، منابع مختلف کربن و سطوح مختلف پروتئین در سیستم بیوفلوک بر مقادیر گلوکز در همولنف میگوی سفید غربی تاثیر می‌گذارد، حضور بیوفلوک منجر به افزایش سطح گلوکز در سرم میگوی سفید غربی نسبت به گروه‌های کنترل می‌شود (۶). در مطالعه حاضر تغذیه بدون جیره تجاری منجر به افزایش سطح گلوکز همولنف میگوی ببری سبز شد (شکل ۱، C)، که احتمالاً نشان‌دهنده این است که میگو تحت استرس غذایی قرار گرفته است. سیستم ایمنی در عملکردهای فیزیولوژیکی برای حفظ سلامت و دستیابی به رشد بالا در آبی‌پروری میگو در برابر تنش‌های مختلف مانند تغییرات محیطی/آلودگی و عوامل بیماری‌زا ضروری است (۳۲). مهره داران از فعالیت لیزوزیم به عنوان یک مکانیسم دفاعی استفاده می‌کنند. لیزوزیم نقش مهمی در ایمنی ذاتی ایفا می‌کند و فاگوسیتوز را تحریک می‌کند. لیزوزیم به دلیل توانایی آن در برهم زدن دیواره سلولی پاتوژن، یک آنتاگونیست طبیعی برای انگل‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها است (۴). در مطالعه حاضر بالاترین میزان فعالیت لیزوزیم در تیمارهای BFT4 و BFT6 بدست آمد (شکل ۲، A) که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد. در مطالعه Long و همکاران (۲۰۲۳)، در سیستم بیوفلوک در شوری‌های ۵-۱۵ درصد مقدار لیزوزیم همولنف میگوی سفید غربی ۰/۹۵ - ۰/۷۵ واحد/میلی‌لیتر گزارش شد (۳۳). سیستم‌های آبی‌پروری مبتنی بر بیوفلوک می‌توانند فعالیت لیزوزیم را در گونه‌های آبی‌پرورش‌یافته افزایش دهند (۳۳، ۳۴، ۳۵، ۳۶). در مطالعه حاضر بالاترین مقدار ایمونوگلوبولین کل در تیمارهای BFT6 (۵۷/۶) و BFT4 (۵۷/۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد (شکل ۲، B). در مطالعه Lee و همکاران (۲۰۱۷)، ایمونوگلوبولین کل در همولنف میگوی سفید غربی

میگوی سفید غربی با بیوفلوک گزارش شد (۲۷)، درحالی‌که Hussain و همکاران (۲۰۲۱) افزایش قابل توجهی در همولنف میگوی سفید غربی با بیوفلوک گزارش کردند (۲۸). در مطالعه حاضر، کمترین میزان کلسترول در تیمار بدون تغذیه با جیره تجاری مشاهده شد (شکل ۱، B)، که نشان دهنده این است تغذیه فقط با بیوفلوک منجر به افزایش کلسترول همولنف نمی‌شود. میگو و باکتری نمی‌توانند کلسترول جدید را سنتز کنند، در حالی که برخی از جلبک‌ها می‌توانند مقداری استرول (دموسترول) تولید کنند، درحالی‌که باکتری‌ها هاپانوئیدها (hopanoids) را به عنوان آنالوگ‌های عملکردی کلسترول سنتز می‌کنند (۲۹). در مطالعه حاضر میزان کلسترول در تیمارهای بیوفلوک کمتر از گروه‌های کنترل مشاهده شد (شکل ۱) که با نتایج محققین دیگر مطابقت دارد (۲۷). در مطالعه Martinez-Porchas و همکاران (۲۰۲۰) مقدار کلسترول در همولنف میگوی سفید غربی در گروه کنترل (۱۱۹/۷) بیشتر از تیمارهای بیوفلوک هتروترفیک (۶/۴۸) و فتواتوتروفیک (۳/۲۹ میلی-گرم/دسی‌لیتر) بدست آمد (۲۷). میگو تحت شرایط تنش‌زا جهت تامین انرژی از کلسترول و تری‌گلیسرید استفاده می‌کند (۳۰)، بنابراین علت کاهش سطح کلسترول و تری‌گلیسرید همولنف در تیمار BFT0 (بدون تغذیه با جیره غذایی) قابل توجیه می‌باشد. گلوکز از طریق فرآیند گلیکوژنولیز به پلازما می‌رسد، که عمدتاً در هیپوتوپانکراس، ماهیچه‌ها و سلول‌های خونی اتفاق می‌افتد، تغییرات گلوکز در همولنف میگو زمانی مشاهده می‌شود که میگو تحت استرس قرار می‌گیرند (۳۱). در بسیاری از مطالعات، محیط بیوفلوک تحت شرایط مختلف هیچ تغییر قابل توجهی در گلوکز میگو نشان نداد، اما در برخی شرایط افزایش یا کاهش قابل توجهی نیز مشاهده شد (۶، ۲۴، ۲۷). در مطالعه Kumar و

۳۱/۲، ۴۴/۹، ۳۰/۶، ۳۸/۱، ۳۹/۶، ۴۳/۶ و ۳۷/۴ میلی- گرم/میلی‌لیتر به ترتیب در گروه کنترل و گروه‌های بیوفلوک جایگزین شده در جیره تجاری (۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۶ و ۸ درصد) گزارش شد، که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (۳۷). در سیستم بیوفلوک فعالیت ایمنوگلوبولین همولنف افزایش می‌یابد. مطالعات نشان داده جوامع میکروبی حاوی ترکیبات زیست‌فعال (از قبیل پلی‌ساکاریدها و کاروتنوئیدها) در بیوفلوک وجود دارند، زمانی که میگو بطور پیوسته از آنها تغذیه می‌کند منجر به تحریک ایمنی میگو می‌گردد (۳۸). فنول‌اکسیداز و لیزوزیم از جمله مهم‌ترین شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی سخت‌پوستان محسوب می‌گردد که تاثیر قابل توجهی بر از بین بردن باکتری‌ها ایفا می‌کند و میزان فعالیت این آنزیم‌ها نشانه‌ای از عملکرد مناسب ایمنی و سلامت این آبزیان به شمار می‌آید (۳۹). افزایش سطوح فعالیت این آنزیم‌ها بیانگر نقش موثر بیوفلوک بر روی قابلیت ایمنی غیراختصاصی میگوی ببری سبز می‌باشد. سیستم بیوفلوک قادر است ایمنی غیراختصاصی میگو را تقویت کند (۱۲، ۴۰). فنول‌اکسیداز یک آنزیم اصلی مکانیسم دفاعی در ایمنی میگو است و از انتشار مواد خارجی در سراسر بدن با ملانیزاسیون و غیرفعال شدن سلول‌های خارجی جلوگیری می‌کند، که عموماً توسط اجزای دیواره سلولی میکروبی (مانند لیپوپلی- ساکاریدها و بتا ۱،۳ گلوکان) به عنوان یک محرک برای سیستم پروفنولاکسیداز فعال می‌شود (۴۱). فنول‌اکسیداز به عنوان یک فرآیند گام‌به‌گام تحت فعال شدن یک پاتوژن مهاجم تحریک می‌شود که منجر به محصور شدن پاتوژن توسط ملانوزن می‌گردد (۴۲). فنول‌اکسیداز در کنترل بار باکتریایی همولنف (۴۳)، شناسایی عوامل غیرخودی و حفاظت در برابر باکتری‌های بیماری‌زا (۴۴) نقش محوری دارد. فعالیت فنول‌اکسیداز می‌تواند به عنوان شاخص

سلامت مطرح باشد، زیرا تغییرات این فاکتور به طور مستقیم به وضعیت بیماری و تغییرات محیطی وابسته می‌باشد. در مطالعه حاضر مقادیر بالاتر فنول‌اکسیداز در تیمارهای تغذیه شده با ۴ و ۶ درصد وزن بدن در سیستم بیوفلوک مشاهده شد (شکل ۲، C)، که با نتایج سایر محققین مشابهت دارد (۴۵، ۴۶). افزایش فعالیت فنول‌اکسیداز در جهت اثر تحریکی بیوفلوک مصرف شده است (۴۵). میگوها در سیستم‌های بیوفلوک در مخازن پرورش بیوفلوک را در ۲۴ ساعت شبانه روز مصرف می‌کنند (۱۵). مطالعه حاضر در رابطه با بهبود ایمنی ناشی از بیوفلوک با مطالعات قبلی مطابقت دارد (۴۵، ۴۶، ۴۷). سیستم ایمنی میگو عمدتاً توسط مواد دیواره سلولی میکروبی متشکل از پپتیدوگلیکان، لیپوپلی‌ساکاریدها و بتا ۱ و ۳ گلوکان‌ها فعال می‌شود (۴۸، ۴۹). محیط‌های پرورش با بیوفلوک حاوی محرک‌های ایمنی مثل پپتیدوگلیکان‌ها، بتاگلوکان‌ها و لیپوپلی‌ساکاریدها هستند که می‌توانند به عنوان پروبیوتیک در سیستم عمل کنند. ترکیب پلی-بتا‌هیدروکسی‌بوتیرات با بیوفلوک می‌تواند اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه با خواص و کارایی پروبیوتیک تولید کند و پاسخ ایمنی ماهیان پرورشی را بیشتر تقویت کند (۵۰، ۵۱).

نتیجه‌گیری

در پرورش میگوی ببری سبز، سطوح مختلف غذایی در سیستم بیوفلوک منجر به تغییرات معناداری در سطوح ترکیبات بیوشیمیایی (تری‌گلیسرید، کلسترول و گلوکز) و فعالیت‌های ایمنی همولنف (فنل‌اکسیداز، لیزوزیم و ایمنوگلوبولین کل) می‌شود. در سیستم بیوفلوک مقادیر تری‌گلیسرید و کلسترول نسبت به گروه‌های کنترل کاهش می‌یابد. تغذیه با سطوح مختلف غذایی ۶ و ۴ درصد وزن بدن در سیستم بیوفلوک منجر به بهبود فعالیت‌های لیزوزیم،

rates and stocking densities. *Aquaculture*. 2020;528:735526.

9. Mohammad Moradi S, Safaei M, Saraji F. Feeding habits of green tiger prawn, *Penaeus semisulcatus* (De Hann, 1848) in the coastal waters of the Persian Gulf (Hormozgan Province). *Iran Fish Sci J*. 2023;32(1):73-83. (In Persian)

10. Sarsangi Aliabad H, Naji A, Mortezaei SRS, Sourinejad I, Akbarzadeh A. Effects of restricted feeding levels and stocking densities on water quality, growth performance, body composition and mucosal innate immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry in a biofloc system. *Aquaculture*. 2022;546:737320.

11. Ullman C, Rhodes MA, Allen Davis D. Feed management and the use of automatic feeders in the pond production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 2019;498:44-49.

12. Xu WJ, Pan LQ. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. *Aquaculture*. 2013;412:117-124.

13. Liu G, Zhu S, Liu D, Guo X, Ye Z. Effects of stocking density of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) on immunities, antioxidant status, and resistance against *Vibrio harveyi* in a biofloc system. *Fish Shellfish Immunol*. 2017;67:19-26.

14. Chen J, Ren Y, Wang G, Xia B, Li Y. Dietary supplementation of biofloc influences growth performance, physiological stress, antioxidant status and immune response of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Fish Shellfish Immunol*. 2018;72:143-152.

15. Khanjani MH, Sharifinia M, Emerenciano MGC. Biofloc technology (BFT) in aquaculture: what goes right, what goes wrong? a scientific-based snapshot. *Aquac Nutr*. 2024; 2024:7496572.

16. Avnimelech Y. Biofloc Technology-A Practical Guide Book, 2nd ed.; The World Aquaculture Society: Baton Rouge, LA, USA, 2015; 268p.

17. Jones CM, Ng WK, King M. Alsever's solution: a review of its history, chemistry,

ایمنوگلوبولین کل و فنول اکسیداز می‌شود که نشان-

دهنده این است که با استفاده از سیستم بیوفلوک

می‌توان ایمنی و سلامت کلی میگوی ببری سبز را

بهبود بخشید.

منابع

1. Yuan X, Lv Z, Zhang Z, Han Y, Liu Z, Zhang H. A review of antibiotics, antibiotic resistant bacteria, and resistance genes in aquaculture: occurrence, contamination, and transmission. *Toxics*. 2023;11(5):420.

2. Lee D, Yu YB, Choi JH, Jo AH, Hong SM, Kang JC, Kim JH. Viral shrimp diseases listed by the OIE: A review. *Viruses*. 2022;14(3):585.

3. Yu YB, Choi JH, Kang JC, Kim HJ, Kim JH. Shrimp bacterial and parasitic disease listed in the OIE: A review. *Microb Pathog*. 2022;166:105545.

4. Khanjani MH, Sharifinia M, Emerenciano MGC. A detailed look at the impacts of biofloc on immunological and hematological parameters and improving resistance to diseases. *Fish Shellfish Immunol*. 2023;137:108796.

5. Khanjani MH, Eslami J, Emerenciano MGC. Wheat flour as carbon source on water quality, growth performance, hemolymph biochemical and immune parameters of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) juveniles in biofloc technology (BFT). *Aquac Rep*. 2025;40:102623.

6. Kumar S, Anand PS, De D, Deo AD, Ghoshal TK, Sundaray JK, et al. Effects of biofloc under different carbon sources and protein levels on water quality, growth performance and immune responses in black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1978). *Aquac Res*. 2017;48:1168-1182.

7. Khanjani MH, Sharifinia M. Biofloc as a food source for Banana shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*) postlarvae. *North Am J Aquac*. 2022;45(4):469-479.

8. Kaya D, Genc E, Genc MA, Aktas M, Eroldogan OT, Guroy D. Biofloc technology in recirculating aquaculture system as a culture model for green tiger shrimp, *Penaeus semisulcatus*: Effects of different feeding

- Litopenaeus vannamei*, with different ammonia-N tolerances. *Comp Biochem Physiol C*. 2019; 221:73-81.
27. Martinez-Porchas M, Ezquerro-Brauer M, Mendoza-Cano F, Higuera JEC, Vargas-Albores F, Martinez-Cordova LR. Effect of supplementing heterotrophic and photoautotrophic biofloc, on the production response, physiological condition and post-harvest quality of the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Rep*. 2020;16:100257.
28. Hussain AS, Mohammad DA, Sallam WS, Shoukry NM, Davis DA. Effects of culturing the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* in biofloc vs synbiotic systems on the growth and immune system. *Aquaculture*, 2021;542:736905.
29. Kannenberg EL, Poralla K. Hopanoid biosynthesis and function in bacteria. *Naturwissenschaften*. 1999;86(4):168-176
30. Annies J, Rosamma P. Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immune competence to white spot syndrome virus infection. *Aquaculture*. 2007;272: 87-97.
31. Yong ASK, Mok WY, Tamrin MLM, Shapawi R, Kim YS. Effects of dietary nucleotides on growth, survival and metabolic response in whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* against ammonia stress condition. *Aquac Res*. 2020;51:2252-2260.
32. Xu WJ, Pan LQ. Evaluation of dietary protein level on selected parameters of immune and antioxidant systems, and growth performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks. *Aquaculture*. 2014;426:181-188.
33. Long L, Liu H, Lu S. Effects of Low Salinity on Growth, Digestive Enzyme Activity, Antioxidant and Immune Status, and the Microbial Community of *Litopenaeus vannamei* in biofloc technology aquaculture systems. *J Mai Sci Eng*. 2023;11:2076.
34. Outama P, Xuan CL, Wannavijit S, Lumsangkul C, Linh NV, Montha N, et al. Modulation of growth, immune response, and immune antioxidant related gene expression of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared and production. *Transfus Med Rev*. 2010;24:259-267.
18. Liu T, Zhang G, Feng Y, Kong C, Ayisi CL, Huang X, Hua X. Dietary soybean antigen impairs growth and health through stress-induced non-specific immune responses in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*. 2019;84:124-129
19. Xu Z, Guan W, Xie D, Lu W, Ren X, Yuan J, Mao L. Evaluation of immunological response in shrimp *Penaeus vannamei* submitted to low temperature and air exposure. *Dev Comp Immunol*. 2019;100:103413.
20. Ellis AE. Lysozyme Assays. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. and Van Muiswinkel, W.B., Eds., *Techniques in Fish Immunology*, SOS Publications, Fair Haven, 1990;101-103.
21. Nayak B, Kumar S, Collins PL, Samal SK. Molecular characterization and complete genome sequence of avian paramyxovirus type 4 prototype strain duck/Hong Kong/D3/75. *Virology*. 2008;5:24.
22. Söderhäll K, Hall L. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *BBA-Bioenergetics*, 1984;797:99-104.
23. Cuesta A, Meseguer J, Esteban MA. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.), *Veterinary Immunol Immunopathol*. 2004;101(3-4):203-210.
24. Gomez-Sorhouet E, Villarreal H, Racotta IS, Naranjo J, Mercier L. Zootechnical and physiological responses of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae reared in bioflocs and subjected to stress conditions during nursery phase. *Aquac Res*. 2019;50:1198-1211.
25. Mercier L, Palacios E, Campa-Córdova A, Tovar-Ramírez D, Hernández-Herrera R, Racotta I. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture*. 2006;258:633-640.
26. Shan H, Geng Z, Ma S, Wang T. Comparative study of the key enzymes and biochemical substances involved in the energy metabolism of Pacific white shrimp,

- absence of prophenoloxidase. FEBS J. 2009; 276:5298-5306.
44. Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A. Two prophenol oxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. Dev Comp Immunol. 2009; 33:247-256.
45. Panigrahi A, Sundaram M, Saranya C., Satish Kumar R, Syama Dayal J, Saraswathy R, et al. Influence of differential protein levels of feed on production performance and immune response of pacific white leg shrimp in a biofloc-based system. Aquaculture. 2019; 503:118-127.
46. Panigrahi A, Sundaram M, Saranya C, Swain S, Dash RR, Syama Dayal J. Carbohydrate sources differentially influence growth performances, microbial dynamics and immunomodulation in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under biofloc system. Fish Shellfish Immunol. 2019;86:1207-1216.
47. Ekasari J, Azhar MH, Surawidjaja EH, Nuryati S, De Schryver P, Bossier P. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources, Fish Shellfish Immunol. 2014;41(2):332-339.
48. Rao XJ, Ling E, Yu XQ. The role of lysozyme in the prophenoloxidase activation system of *Manduca sexta*: an in vitro approach, Dev Comp Immunol. 2010; 34(3):264-271.
49. Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens, Fish Shellfish Immunol. 2013;34(4):990-1001.
50. Qiao G, Chen P, Sun Q, Zhang M, Zhang J, Li Z, Li Q. Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) in bioflocs alters intestinal microbial community structure, immunerelated gene expression and early Cyprinid herpesvirus 2 replication in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), Fish Shellfish Immunol. 2020; 97:72-82.
51. Crab R., Chielens B., Wille M., Bossier P., Verstraete W. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for (*Macrobrachium rosenbergii*) postlarvae. Aquac Res. 2010; 41:559-567.
- under biofloc system using mango peel powder, Fish Shellfish Immunol. 2022;131:1136-1143.
35. Haridas H, Verma AK, Rathore G, Prakash C, Sawant PB, Babitha Rani AM. Enhanced growth and immuno-physiological response of genetically improved farmed tilapia in indoor biofloc units at different stocking densities, Aquac Res. 2017;48:4346-4355,
36. Liu G, Ye Z, Liu D, Zhao J, Sivaramasamy E, Deng Y, Zhu S. Influence of stocking density on growth, digestive enzyme activities, immune responses, antioxidant of *Oreochromis niloticus* fingerlings in biofloc systems, Fish Shellfish Immunol. 2018;81:416-422.
37. Lee C, Kim S, Lim SJ, Lee KJ. Supplemental effects of biofloc powder on growth performance, innate immunity, and disease resistance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish Aquat Sci. 2017;20:15.
38. Ju ZY, Forster IP, Conquest L, Dominy W. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc or floc fractions to a formulated diet. Aquac Nutr. 2008;14:533-43
39. Zhang J, Duan Y, Zhang Z, Dong H, Li Z. Research progress of intestinal microbial flora in shrimp. South China Fish Sci. 2015;11(6):114-119.
40. Kim SK, Pang Z, Seo HC, Cho YR, Samocha T, Jang I.K. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Aquac Res. 2014;45(2):362-371.
41. Promthale P, Pongtippatee P, Withyachumnarnkul B, Wongprasert K. Bioflocs substituted fishmeal feed stimulates immune response and protects shrimp from *Vibrio parahaemolyticus* infection. Fish Shellfish Immunol. 2019;93: 1067–1075.
42. Fan T, Jing Z, Fan X, Yu M, Jiang G. Purification and characterization of phenoloxidase from brine shrimp *Artemia sinica*. Acta Biochim Biophys Sin. 2011; 43:722-728.
43. Fagutao FF, Koyama T, Kaizu A, Saito-Taki T, Kondo H, Aoki T, Hirono I. Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the

Research Article

Study of White Leg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) of Shrimp Farming Complexes in Gomishan, Golestan Province, with the Perspective of Contamination by Heavy Metals and Risk Evaluation for Consumer

Reza Khalili¹, Reza Salighehzadeh^{1*}, Marjan Mosafer²

1- Department of Veterinary, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran

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

*Corresponding author: rezasalighehzadeh@yahoo.com

Received: 15 August 2024

Accepted: 27 January 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1129216

Abstract

Heavy metal pollution directly affects marine aquaculture such as shrimp farming. Heavy metals in the shrimp can be transferred to humans through the food chain. In this research, the concentration of heavy metals in the muscle tissue of western white-legged shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was determined and the risk for consumers was assessed in the Gamishan shrimp breeding station of Golestan province. For this purpose, 30 samples were analyzed by atomic absorption after drying and chemical digestion. The data were analyzed using SPSS software. The different heavy metals were identified in shrimp samples, including arsenic (As), cadmium (Cd), mercury (Hg), lead (Pb), iron (Fe), copper (Cu), cobalt (Co), chromium (Cr), manganese (Mn), molybdenum (Mo), nickel (Ni), tin (Sn) and zinc (Zn). The average amount of As, Cd, Hg and Pb was 0.11-0.08, 0.01, 0.01 and 0.38-0.14 mg/kg, respectively. Sn and Ni had a lower average than other metals. Fe and Cu were the highest level, followed Zn and Mn. Co, Cr and Mo were the lowest level. A significant difference was reported between different sites in regarding Zn ($p < 0.05$). The concentration of all heavy metals was according to the standard limit (FAO/WHO). Continuous and daily consumption of this product for different age groups is not safe in terms of As and there is a risk, but it is safe for other metals. The results of this study suggest that the measurements to prevent the pollution of breeding ponds in Golestan province should be taken by the responsible authorities. It is possible to reduce the dangerous effects of heavy metals by monitoring, regularly examining and evaluating these mineral pollutants.

Keywords: White Leg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*), Golestan Province, Heavy Metals, Risk Assessment.



مطالعه میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مجتمع پرورش میگوی گمیشان استان گلستان از نظر آلودگی به فلزات سنگین و ارزیابی خطر برای مصرف‌کنندگان

رضا خلیلی^۱، رضا سلیقه‌زاده^{۱*}، مرجان مسافر^۲

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

۲- گروه بیولوژی دریا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: rezasalighehzadeh@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۵

DOI: 10.60833/ascij.2025.1129216

چکیده

امروزه تاثیر مستقیم آلودگی با فلزات سنگین بر سلامت آبزیانی مانند میگو بر کسی پوشیده نیست. فلزات سنگین انباشته شده در بدن میگو می‌توانند از طریق زنجیره غذایی به انسان منتقل و سبب بروز بیماری و مشکلات عدیده‌ای گردند. از این‌رو بررسی سطح سلامت بافت عضله این جانداران از لحاظ فلزات سنگین حائز اهمیت می‌باشد. در این تحقیق غلظت فلزات سنگین بافت عضله میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مجتمع پرورش میگوی گمیشان استان گلستان تعیین و ارزیابی خطر برای مصرف‌کنندگان انجام شد. برای این منظور، تعداد ۳۰ نمونه میگوی پا سفید غربی پس از خشک شدن، پودر شدن و هضم شیمیایی برای تعیین میزان غلظت فلزات سنگین توسط دستگاه جذب اتمی مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد. فلزات سنگین متنوعی در میگوی پاسفید غربی شناسایی شد که شامل آرسنیک، کادمیوم، جیوه، سرب، آهن، مس، کبالت، کروم، منگنز، مولیبدن، نیکل، قلع و روی بودند. فلزات آرسنیک و آهن بیشترین میزان را به ترتیب میان فلزات غیر ضروری و ضروری به خود اختصاص دادند. از نظر میزان باقیمانده فلز روی بین سایت‌های مختلف اختلاف معنی‌دار گزارش شد ($p < 0/05$). غلظت تمامی عناصر مورد در محدوده مجاز تعیین شده توسط استانداردهای جهانی (FAO/WHO) بود. مصرف مداوم و روزانه این محصول برای گروه‌های سنی مختلف از نظر آرسنیک ایمن نبوده و مخاطره‌ای برای آنها وجود دارد. ولی از نظر سایر فلزات ایمن بود. نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که اقدامات لازم جهت پیشگیری از آلودگی آب‌های استخرهای پرورشی استان گلستان توسط مقامات مسئول صورت پذیرد. کاهش اثرات خطرناک فلزات سنگین با پایش، بررسی منظم و ارزیابی آلاینده‌های معدنی امکان پذیر می‌باشد.

کلمات کلیدی: میگوی پاسفید غربی، فلزات سنگین، ارزیابی خطر، استان گلستان.

مقدمه

تولید جهانی آبزیان برای مصرف انسانی طی پنج دهه اخیر از رشد جمعیت جهانی پیشی گرفته است. بر اساس آمار رسمی FAO تولیدات جهانی آبزیان ۲۱۲ میلیون تن بوده که ۵/۱۱۴ میلیون تن آن معادل ۵۴ درصد مربوط به آبزی‌پروری و ۵/۹۷ میلیون تن آن برداشت از منابع طبیعی (صید و صیادی) معادل ۴۶ درصد بوده است. کشور ایران نیز از این قاعده مستثنی نبوده و بر اساس آخرین آمار اعلام شده تا پایان سال

۱۳۹۸ میزان تولیدات آبی‌پروری ۵۲۶ هزار تن معادل ۴۱ درصد و ۷۵۹ هزار تن معادل ۵۹ درصد از طریق صید و صیادی از مجموع کل ۱ میلیون و ۲۸۵ هزار تن انواع ماهی، میگو و سایر آبزیان در کل کشور به ویژه در آب‌های استان‌های ساحلی بوده است. پرورش میگو به عنوان یکی از فعالیت‌های مهم آبی‌پروری در جهان و همسو با آن در ایران در حال گسترش و توسعه می‌باشد. در میان آبزیان، میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) از جمله گونه‌های مرغوبی است که می‌توان به صورت گسترده تکثیر و پرورش نمود. یکی از موضوعاتی که با جست و جویی کوتاه در زمینه بررسی آبزیان توجه همگان را به خود جلب می‌نماید، بررسی میزان فلزات سنگین و ارزیابی خطر ریسک با ارزش می‌باشد (۱). محققان زیادی روی فلزات سنگین در آبزیان تحقیق کرده‌اند (۲، ۳، ۴، ۵، ۶). طی سال‌های اخیر همسو با صنعتی شدن جوامع، آلاینده‌های مختلفی به محیط وارد می‌گردد (۷). منابع متعددی از جمله معدن کاری فلزات، صنایع کشاورزی، صنایع متالورژیکی، صنایع الکترونیک، باتری سازی و پساب‌های صنعتی به طور عمده سبب ورود فلزات سنگین به محیط می‌گردند (۸، ۹، ۱۰). فلزات سنگین با ورود به زیست بوم آبی و به دنبال آن ورود به بدن جانداران آبی، از طریق چرخه غذایی به بدن انسان وارد می‌شوند. این عناصر در مقادیر کم به طور طبیعی برای بدن انسان لازم و ضروری می‌باشند اما در غلظت‌های بالاتر خطرات زیست‌محیطی فراوانی را به بار می‌آورند. از مهمترین اختلالات و عوارض که تجمع فلزات سنگین به دنبال دارد می‌توان به سرطان‌زایی، اثر بر سیستم اعصاب مرکزی و محیطی، اثر بر روی پوست، اثر بر روی سیستم خون‌ساز، اثر بر سیستم قلبی و عروقی، آسیب به کلیه‌ها و تجمع در بافت‌ها اشاره نمود (۱۱، ۱۲). با در نظر گرفتن گستردگی آسیب‌های ناشی از وجود

فلزات سنگین در بافت موجودات آبی از جمله گونه مورد مطالعه، و رشد روز افزون استان گلستان در زمینه آبی‌پروری به ویژه پرورش میگو تا کنون مطالعه‌ای در خصوص بررسی میگوی پا سفید غربی از نظر آلودگی به فلزات سنگین و ارزیابی خطر برای مصرف‌کنندگان در این استان انجام نشده است. از این رو انجام مطالعه‌ای با هدف بررسی سطح غلظت فلزات سنگین ضروری در بافت عضله میگوی پا سفید غربی در سایت پرورش میگوی گمیشان و مقایسه آن با استانداردهای جهانی و بین‌المللی امری ضروری بوده و نتایج آن می‌تواند سطح سلامت بافت عضله میگوی پا سفید غربی از لحاظ غلظت فلزات سنگین را نشان دهد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۳۰ نمونه میگوی پا سفید غربی از سایت پرورش میگوی گمیشان استان گلستان جمع آوری شد. در پایان دوره پرورش تهیه شد. ابتدا نمونه‌ها با قرار گرفتن در آب یخ بی حرکت و بی‌هوش شده سپس با رعایت ملاحظات اخلاق زیستی، بافت عضله جدا شده و به عنوان نمونه برداشت شد. به منظور تعیین غلظت به ازای وزن خشک نمونه، نمونه‌ها در آون با دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس خشک شد، سپس در هاون چینی تبدیل به پودر تبدیل شد. آماده‌سازی نمونه به روش توصیف شده توسط غلامحسینی و همکاران (۲۰۲۱) از طریق هضم شیمیایی نمونه‌ها با ترکیب اسید نیتریک و اسید پرکلریک (نسبت ۱:۷) انجام شد (۱۳). سنجش غلظت فلزات سنگین باقیمانده در عضله میگوها، از طریق دستگاه طیف بینی جذب اتمی اندازه‌گیری شد و با استفاده از منحنی کالیبراسیون مقادیر جذب به غلظت تبدیل و مقدار نهایی گزارش گردید. به منظور دستیابی به غلظت مورد نظر فلز از استاندارد مرجع

(SRM 2977 Muscle Tissue) استفاده شد. به منظور ترسیم منحنی کالیبراسیون عناصر، طیفی از رقت‌های مختلف به دستگاه تزریق گردید. خطای نسبی، راندمان و حد تشخیص دستگاه به ترتیب برابر با ۵/۴، ۹۴/۶ درصد و ۰/۰۰۲ قسمت در میلیون از طریق معادلات ذیل محاسبه شد.

$$RE\% = \frac{MEASURED\ VALUE * NOMINAL\ VALUE}{MEASURED\ VALUE} * 100$$

$$LOD = \frac{SD_{intercept}}{x-variable} * 3.3 \quad R\% = (100 - RE\%)$$

در این مطالعه Sd انحراف معیار، intercept عرض از مبدا (b) و x-variable شیب خط (a) هستند. به منظور ارزیابی خطر بهداشتی مصرف این محصولات دریایی، شاخصی با عنوان دریافت روزانه (DI) بکار گرفته شد. $DI = \frac{CM \times IR}{BW}$ که CM غلظت اندازه‌گیری شده در بافت خوراکی (عضله) میگو بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر است. از آنجایی که میگوها به شکل تازه (بدون فرایند خشک کردن) توسط مصرف‌کنندگان مورد تغذیه قرار می‌گیرند، غلظت‌های سنجیده شده بر حسب وزن خشک نمونه از طریق رابطه زیر به وزن تر تبدیل شد.

Con. in WW = ((100-70% of water)/100)* Con in (DW) که BW وزن بدن که در این تحقیق به تفکیک بزرگسالان و کودکان (زیر ۱۸ سال) به ترتیب معادل ۷۰ و ۴۰ کیلوگرم و IR میزان مصرف روزانه میگو در جامعه مصرف‌کنندگان برابر با ۱۱/۲۳ گرم در روز در نظر گرفته می‌شود. با توجه به اینکه تقریباً ۹۰ درصد میگوی پرورشی کشور به آسیا و اروپا صادر می‌شود و طبق آخرین گزارش رسمی فائو، میانگین سرانه مصرف آبزیان در دنیا معادل ۲۰/۵ کیلوگرم در سال می‌باشد، که ۲۰ درصد این مقدار را میگو تشکیل می‌دهد (۸).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: ابتدا نرمال بودن آنها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. سپس مقایسه

داده‌های فلزات سنگین مزارع با یکدیگر برای گروه‌هایی دارای پراکنش نرمال از آنالیز واریانس یک-طرفه استفاده شد و در صورت وجود اختلاف معنی-دار، برای جداسازی گروه‌ها از آزمون توکی در سطح اطمینان ۵ درصد استفاده گردید. همچنین، از آزمون تی تک نمونه‌ای برای مقایسه غلظت عناصر سنگین با مقادیر مندرج در استانداردهای بهداشتی معتبر بین-المللی استفاده شد. کلیه عملیات آماری در محیط نرم-افزار SPSS انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد در میان فلزات غیر ضروری مقدار آرسنیک بیشترین میزان غلظت را دارا بود. در میان فلزات ضروری، آهن بیشترین میزان را به خود اختصاص دادند و مس، روی، منگنز، کروم، نیکل به ترتیب در رتبه‌های بعد قرار گرفتند. از نظر میزان باقیمانده فلز روی بین سایت‌های مختلف اختلاف معنی‌دار گزارش شد ($p < 0/05$) (جدول ۱). نتایج آنالیز واریانس باقیمانده فلزات سنگین در گوشت میگوی پرورشی نشان داد از نظر میزان باقیمانده فلز روی بین سایت‌های مختلف اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($p < 0/05$) (جدول ۲). چنانچه در جدول ۳ نمایان می‌دهد مقدار میانگین آرسنیک، کادمیوم، جیوه و سرب طبق استانداردهای بین‌المللی ۰/۵، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۴ ppm بود. همچنین نتایج نشان داد که غلظت تمامی عناصر مورد بررسی کمتر از حد مجاز بود. میزان دریافت روزانه و حداکثر مصرف روزانه قابل تحمل (MTDI) فلزات سنگین نشان داد که آهن، مس، قلع و رویدارای حد مجاز بالاتری از سایر فلزات بودند. حداکثر مصرف روزانه قابل تحمل برای آرسنیک و کادمیوم کمتر از سایر فلزات می‌باشد (جدول ۴).

جدول ۱- میانگین $\pm$ انحراف معیار میزان فلزات سنگین در میگوی پرورشی استان گلستان (میلی‌گرم/کیلوگرم وزن خشک)

Table 1. Mean $\pm$ SD of heavy metal levels in farmed shrimp in Golestan Province (mg/kg dry weight)

Heavy metals	Site 1	Site 2	Site 3
As	0.44 $\pm$ 0.11	0.43 $\pm$ 0.08	0.40 $\pm$ 0.11
Cd	0.03 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01
Co	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01
Cr	0.56 $\pm$ 0.19	0.65 $\pm$ 0.18	0.54 $\pm$ 0.26
Cu	21.77 $\pm$ 4.50	19.04 $\pm$ 2.49	15.66 $\pm$ 3.27
Fe	40.40 $\pm$ 4.65	38.07 $\pm$ 2.97	21.95 $\pm$ 6.84
Hg	0.16 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01
Mn	1.17 $\pm$ 0.87	1.03 $\pm$ 0.54	0.78 $\pm$ 0.22
Mo	0.03 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01
Ni	0.14 $\pm$ 0.0*	0.22 $\pm$ 0.11	0.20 $\pm$ 0.10
Pb	0.43 $\pm$ 0.38	0.22 $\pm$ 0.14	0.28 $\pm$ 0.23
Sn	0.31 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.01
Zn	34.85 $\pm$ 1.90b	33.68 $\pm$ 1.25b	27.51 $\pm$ 5.21a

*حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است ($p < 0.05$)

*Different letters indicate significant differences between experimental groups ($p < 0.05$)

جدول ۲- نتایج تحلیل واریانس (ANOVA) فلزات سنگین باقیمانده در گوشت میگوی پرورشی استان گلستان

Table 2. Results of analysis of variance of residual heavy metals in farmed shrimp meat in Golestan Province

Heavy metals		Sum of squares	df	Mean squares	Calculated surface (Fe)	p
As	betweengroups	0.004	2	0.002	0.164	0.852
	Within-Group	0.099	9	0.011		
	Total	0.102	11			
Cd	betweengroups	0	2	0	0.201	0.821
	Within-Group	0.002	9	0		
	Total	0.002	11			
Co	betweengroups	0	2	0	2.07	0.182
	Within-Group	0.001	9	0		
	Total	0.001	11			
Cr	betweengroups	0.031	2	0.015	0.322	0.733
	Within-Group	0.429	9	0.048		
	Total	0.46	11			
Cu	betweengroups	74.993	2	37.496	3.023	0.099
	Within-Group	111.635	9	12.404		
	Total	186.628	11			
Fe	betweengroups	808.074	2	404.037	0.391	0.687
	Within-Group	9294.394	9	1032.71		
	Total	10102.468	11			
Hg	betweengroups	0	2	0	0	1
	Within-Group	0	9	0		
	Total	0	11			
Mn	betweengroups	0.301	2	0.151	0.405	0.679
	Within-Group	0.347	9	0.372		
	Total	3.648	11			
Mo	betweengroups	0	2	0	0	1
	Within-Group	0	9	0		
	Total	0	11			
Ni	betweengroups	0.014	2	0.007	0.836	0.464
	Within-Group	0.076	9	0.008		
	Total	0.09	11			
Pb	betweengroups	0.111	2	0.055	0.664	0.538
	Within-Group	0.75	9	0.083		

	Total	0.861	11			
Sn	between groups	0	2	0	1.059	0.386
	Within-Group	0	9	0		
	Total	0	11			
Zn	between groups	124.324	2	62.162	5.76	0.025
	Within-Group	97.133	9	10793		
	Total	221.456	11			

جدول ۳- مقایسه میزان فلزات سنگین میگوی پرورشی استان گلستان با استانداردهای جهانی (FAO/WHO)

Table 3. Comparison of heavy metal levels in farmed shrimp in Golestan Province with international standards (FAO/WHO)

Heavy metals	Standard value (ppm)	Standardized mean difference	t	df	p
As	0.5	-0.07183	-2.579	11	0.026
Cd	0.2	-0.16856	-43.934	11	0.000
Co	50	-49.97966	-1.515	11	0.000
Cr	30	-29.41064	-498.450	11	0.000
Cu	100	-81.16996	-68.264	11	0.000
Fe	100	-66.52135	-7.604	11	0.000
Hg	0.2	-0.03550	-1.236	11	0.000
Mn	50	-49.00097	-294.755	11	0.000
Mo	150	-149.96590	-2.088	11	0.000
Ni	0.5	-0.31169	-11.955	11	0.000
Pb	0.4	-0.10293	-1.274	11	0.229
Sn	250	-249.69152	-2.175	11	0.000
Zn	150	-117.98085	-91.087	11	0.000

جدول ۴- ارزیابی ریسک سلامت میگوی پرورشی استان گلستان نسبت به فلزات سنگین

Table 4. Health risk assessment of farmed shrimp in Golestan province with respect to heavy metals

Heavy metals	Daily intake (mg/g body weight per day)		MTDI (mg.g-1 BW/day)
	Children	Adults	
As	1.98×10^{-1}	1.13×10^{-1}	5×10^{-2}
Cd	1.45×10^{-2}	8.31×10^{-3}	6×10^{-2}
Co	9.4×10^{-3}	5.37×10^{-1}	-
Cr	2.72×10^{-1}	1.55×10^{-1}	2
Cu	8.71	4.97	3×10^{-1}
Fe	15.48	8.84	5×10^{-2}
Hg	7.6×10^{-2}	4.34×10^{-2}	-
Mn	4.62×10^{-1}	2.64×10^{-1}	-
Mo	1.57×10^{-2}	9.01×10^{-3}	-
Ni	8.71×10^{-2}	4.97×10^{-2}	3×10^{-1}
Pb	1.37×10^{-1}	7.85×10^{-2}	2.1×10^{-1}
Sn	1.42×10^{-1}	8.15×10^{-2}	-
Zn	14.81	8.46	6×10^{-1}

MTDI: Maximum Tolerable Daily Intake

بحث

زیست‌بوم‌ها با سرعت بیشتری انتقال می‌یابد. از اینرو آلودگی‌ها از مزارع مختلف و سایت‌های گوناگون به سرعت به سایر مزارع انتقال می‌یابد. فلز آهن نقش بسزایی در رشد و سوخت و ساز بدن آبزیان ایفا

صنعتی شدن و افزایش فعالیت‌های انسانی در دوران اخیر، سبب گسترش بیش از پیش آلودگی‌ها در محیط آبی شده است. گسترش آلودگی در اکوسیستم‌های آبی به دلیل سیالیت آب نسبت به سایر

می‌کند. پژوهش‌ها بیان می‌دارند میگوها قابلیت بالایی در جذب فلز آهن از زیست‌بوم آبی و رسوبات دارند (۱۴). از این‌رو بیشترین بودن میزان غلظت فلز آهن نسبت به سایر فلزات توجیح علمی خواهد داشت. مطالعات بسیاری به بیشتر بودن میزان غلظت فلزات سنگین در میگو نسبت به سایر فلزات اشاره نموده‌اند. لقمانی و شریفیان (۲۰۲۰) در بررسی بافت خوراکی میگوی سفید هندی در مناطق صیادی سواحل دریای مکران (۱۵)، Ezemonye و همکاران در بررسی غلظت فلزات سنگین در میگوی *Macrobrachium macrobrachion* و ماهی *Brycinus longipinnis* از رودخانه Benin (۱۶)، Askari Sarmowr و همکاران در بررسی میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مجتمع‌های پرورش میگوی استان بوشهر (۱۷)، Modheji و همکاران طی مطالعه ارزیابی فلزات سنگین در ماهی‌های سرخو، شوریده، زبان، کفشک، حلوا سفید و میگو در بازار ماهی‌فروشی خرمشهر (۱۸) بیان نمودند که در میان فلزات مختلف، آهن بیشترین میزان تجمع را به خود اختصاص داده است. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که غلظت عناصر ارزیابی شده در نمونه‌های میگو از حد مجاز FAO/WHO (۱۹) تجاوز نمی‌کند. با این حال با توجه به آنکه برخی از فلزات سنگین بسیار خطرناک برای سلامتی مصرف‌کنندگان (مانند جیوه) نزدیک به حد مجاز اعلام شده هستند، نظارت منظم بر عناصر سمی در جهت جلوگیری از آثار احتمالی مضر مصرف میگو بر سلامت انسان امری ضروری خواهد بود (۲۰). همسو با نتایج حاصل از این مطالعه مطالعات متعددی کمتر بودن غلظت فلزات سنگین در اقصی نقاط دنیا گزارش نموده‌اند (۱۳، ۱۶، ۲۱، ۲۲، ۲۳). این پژوهش نمایان ساخت که با توجه به شاخص میزان دریافت قابل تحمل مصرف گونه مورد مطالعه از لحاظ فلز آرسنیک مخاطره‌آمیز خواهد بود.

فلز آرسنیک از جمله فلزات غیرضروری می‌باشد که سبب بروز طیف وسیعی از بیماری‌ها خواهد شد. آسیب گسترده به کبد و مختل کردن سیستم گوارشی تنها بخشی از آسیب‌های ناشی از تجمع فلز آرسنیک می‌باشد (۲۴). در این مطالعه حداکثر مصرف روزانه قابل تحمل (MTDI) برای آرسنیک و کادمیوم کمتر از سایر فلزات بود. از این رو مصرف مداوم و روزانه این محصول برای گروه‌های سنی مختلف از نظر آرسنیک ایمن نبوده و مخاطره‌ای برای آنها وجود دارد. ولی از نظر سایر فلزات ایمن است. غلامحسینی و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی میگوهای صید شده از بندر جاسک، تنگه هرمز و خلیج چابهار در سواحل شمالی دریای عمان بیان نمودند شاخص THQ کل برای گروه‌های سنی کودکان و بزرگسالان کمتر از ۱ بود (۱۳). Ezemonye و همکاران (۲۰۱۹) در بررسی سلامتی غلظت فلزات سنگین در سطح آب، میگوی *Macrobrachium macrobrachion* و ماهی *Brycinus longipinnis* از رودخانه Benin، نیجریه بیان نمود میزان THQ در میگو کمتر از یک بود (۱۶). Askari Sarmowr و همکاران در سال ۲۰۲۲ در بررسی میگوی پا سفید غربی در مجتمع‌های پرورش میگوی استان بوشهر بیان نمود که با توجه به حداکثر مصرف روزانه قابل تحمل (MTDI) فلزات سنگین، مصرف روزانه و مداوم میگوها توسط مصرف‌کنندگان در گروه‌های سنی مختلف (کودکان، بزرگسالان) کاملاً ایمن بوده و حتی علیرغم مقادیر زیاد عناصر نیکل و مس، خطری جدی متوجه مصرف‌کنندگان نمی‌شود (۱۷). بر اساس مطالعه لقمانی و شریفیان بیشترین کمترین تخمین میزان خطر (THQ) به ترتیب ناشی از فلز آرسنیک و فلز قلع به دست آمد. تخمین میزان خطر برای تمامی فلزات و همچنین مجموع میزان خطر (TTHQ) کمتر از ۱ بود (۲۲). نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که اقدامات لازم جهت پیشگیری از

In summer and winter seasons. J Mar Sci Technol. 2021;20(1):48-60. [In Persian]

2. Biswas A, Kanon KF, Rahman A, Shafiqul Alam M, Ghosh S, Farid F. Assessment of human health hazard associated with heavy metal accumulation in popular freshwater, coastal and marine fishes from south-west region, Bangladesh. Heliyon. 2023;9:e20514.

3. Etefaghdoost M, AlafNovirian H. Measurement of the concentration of heavy elements in the muscle tissue of kamel fish (*Rutilus rutilus caspicus*, Yakovlev, 1870) case study: Darvishan Black River, Gilan Province. Environ Sci Technol. 2019; 22(8):236-223. [In Persian]

4. Velayatzadeh M, Koshafar A. Pollution Assessment some of Heavy Metals in Water and Surface Sediments of Nasserri Wetland (Khorramshahr). J Sch Public Health Inst Public Health Res. 2019;17(2):157-168. [In Persian]

5. Hossain MN, Rahaman A, Jawad Hasan MD, Minhaz Uddin MD, Khatun N, Shamsuddin S. Comparative seasonal assessment of pollution and health risks associated with heavy metals in water, sediment and Fish of Buriganga and Turag River in Dhaka City, Bangladesh. SN Appl Sci. 2021;3(4):1-16.

6. Farahbakhsh Z, Akbarzadeh A, Amiri P, Naji A. The risk assessment potential of heavy metals (Cu, Zn, Ni) for human health caused by consumption of muscle tissue of golden mullet (*Risso, 1810*) *Liza aurata* in Anzali wetland, Caspian Sea. Health Environ. 2018;12(2):193-202. [In Persian]

7. Ali H, Khan E, Ilahi I. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity and bioaccumulation. J Chem. 2019; 6730305:1-14.

8. Qouti N, Mohammadi S, Mohammadi W. Comparison of hardness and alkalinity changes with heavy metal zinc poisoning in common carp (*Cyprinus carpio*). J Wetland. 2011;2(8):21-28 [In Persian]

آلودگی آب‌های استخرهای پرورشی استان گلستان توسط مقامات مسئول صورت پذیرد. کاهش اثرات خطرناک فلزات سنگین بر روی اکوسیستم، صنعت آبی‌پروری و نیز انسان که از آبریان تغذیه می‌کند، با پایش، بررسی منظم و ارزیابی آلاینده‌های معدنی در آب‌های ساحلی، خورها، خلیج‌ها، رسوبات کف و بافت‌های بدن آبریان امکان‌پذیر می‌باشد (۲۵).

نتیجه‌گیری

انباشتگی فلزات سنگین که در اثر فاضلاب‌های صنعتی، شهری و کشاورزی به وجود می‌آیند معمولاً در مقابل تصفیه شیمیایی مقاوم می‌باشند. این گونه فلزات به راحتی می‌توانند باعث آلودگی زیست محیطی آبریان به خصوص میگوها شوند. سنجش فلزات سنگین در آب، رسوب و ماهیان، همیشه معیاری برای سنجش آلودگی محیط و میزان تأثیر آن بر اکوسیستم انسانی بوده است. با توجه به اهمیت بررسی آلودگی‌های مربوط به فلزات سنگین در آبریان خوراکی بدلیل احتمال تجمع فلزات سنگین و همچنین بعنوان شاخصی از آلودگی آب‌ها، هدف از این مطالعه، تعیین غلظت فلزات سنگین بافت عضله میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) مزارع پرورشی سایت‌های مجتمع پرورش میگوی گمیشان استان گلستان بود. نتایج این پژوهش نشان داد که سطح فلزات سنگین در میگو نسبت به استانداردهای بین‌المللی پایین بود، اما با توجه به خاصیت تجمع زیستی و سمیت فلزات سنگین، پایش دوره‌ای فلزات سنگین نیاز می‌باشد.

منابع

1. Koshafer A, Sawari A, Sakhaei N, Archengi B, Karimi-Organ F. Comparison of bioaccumulation of heavy metals in Bayah fish (*Liza abu*) and yellow fin shank (*Acanthopagrus latus*) of Bahmanshir river.

- A, Gholipour M. Study of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Bushehr province shrimp complexes with the perspective of contamination by heavy metals (As, Cd, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, and Zn) and risk evaluation for consumer. *J Aqua Eco*. 2022;12(2):58-69. [In Persian]
18. Modheji A, NikpourQanawati Y, Larki A, Bouadhar F. Measuring the concentration of heavy metals Pb, Cd, Ni, Fe, Zn and Cu in Sarkho, Shoshak, Tonga, Shorideh, Halva and *Metapenaeus affinis* shrimps. *J Mar Sci Technol*. 2023;22(3):27-39. [In Persian]
19. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), Species Fact Sheets. FAO (Fisheries and Aquaculture Department), 2016; No. 123.
20. Mumtazan M, Asefi M, Zamani A, Mahmoudi R. Comparing the correlation of age, length and weight with mercury concentration in the muscle of two species of fish, Shirbat and Hamri, from Maroon Behbahan river. *Water and Sewage*, 2015;54-60:(2)27. [In Persian]
21. Koosaj N, Jafarian H, Rahmani R, Patimar A, Gholipour H. Investing some heavy metals in the muscle of Sartiz shrimp (*Metapenaeus affinis*) and evaluating its risk for human consumption in Hormozgan province. *Environ Res*. 2019;10(19):245-254. [In Persian]
22. Loqmani M, Sadeghi P, Jadgal N. Investigating the accumulation of heavy metals (cadmium, copper, iron, tin, arsenic, lead and mercury) in the muscle tissue of Indian white shrimp (*Penaeus indicus*) in the ports of Bryce, Goiter and Kanark. *J Iran Fish*. 2018;28(3):153-173. [In Persian]
23. Moradi Z, Selgi I., The study of Sartiz white shrimp (*Metapenaeus affinis*) in Bushehr beaches in term of contamination with heavy metals iron, zinc, copper, manganese and nickel and risk estimation for the consumer. *Animal Research Iranian BIOLOGU*, 2017;31(4):395-405. [In Persian]
9. Riahi A, Ismaili A, Savari A. Determining the amount of heavy metals (Ni, Zn, Cu, Cd, Co, Pb) in water, sediments and aquatic species of Karun River (73-72). *Iran J Nat Resour*. 2008;52(2):46-37. [In Persian]
10. Velayatzadeh M, Tabibzadeh M. The importance and application of aquatic plants in biological monitoring of heavy metals, the first specialized bioremediation conference, Tehran, 2013. [In Persian]
11. Abedi SZ, Khalesi MK, Eskandari Mountain S. Comparison of cadmium heavy metal absorption in common carp (*Cyprinus carpio*) without *Pangasius hypophthalmus* cat scales. *J Anim Biol*. 2012;5(2):46-35. [In Persian]
12. Adeli A. Properties of fish and its nutritional value for humans. *J Fish*. 2015;9(3):61-68. [In Persian]
13. Gholamhosseini A, Shiry N, Soltanian S, Banaee M. Bioaccumulation of metals in marine fish species captured from the northern shores of the Gulf of Oman, Iran. *Reg Stud Mar Sci*. 2021;41:101599. [In Persian]
14. Wu XY, Yang YF. Heavy metal (Pb, Co, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn and Zn) concentration in harvest size white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) tissues from aquaculture and wild source. *J. Food Compos. Anal*. 2011;24(1):62-65.
15. Loqmani M, Sharifian S, Risk assessment of heavy metal risk for consumers of Indian white shrimp (*Penaeus indicus*). *Scientific J Iran Fish*. 2020;29(1):169-174. [In Persian]
16. Ezemoneya LI, Adebayoa PO, Enunekuc AA, Tongoa I, Ogbomidab E. Potential health risk consequences of heavy metal concentrations in surface water, shrimp (*Macrobrachium macrobrachion*) and fish (*Brycinus longipinnis*) from Benin River, Nigeria. *Toxicol Rep*. 2019;6:1-9.
17. Askari Sarmowr F, Hosseinienezhad M, Salighehzadeh R, Shiry N, Gholamhossein

Investigating the concentration of heavy metals (copper, zinc and nickel) in the muscle tissue of western white leg shrimp in the breeding farms of Bushehr province. Mar Sci Technol J. 2013;12(3):91-100. [In Persian]

24. Witkowska D, Słowik J, Chilicka K. Heavy metals and human health: Possible exposure pathways and the competition for protein binding sites. Molecules. 2021;26(19):6060.

25. Khoramabadi A, Alizadeh Doghiklai A, Mohammadi M, Ain Elahi F.

Research Article

The Effect of Hydroxyl Selenomethionine on Performance, Egg Quality Traits and Blood Parameters Old Broiler Breeders

Ahmad Manafi, Yahya Ebrahimnezhad*, Habib Aghdam Shahriar, Abdolahad Shaddel Telli, Abolfazl Ghorbani, Naser Maheri-Sis

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

*Corresponding author: ebrahimnezhad@iau.ir

Received: 13 August 2025

Accepted: 13 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1129024

Abstract

Selenium (Se) is an essential rare element that plays a vital role in the health and performance of animals. This study was conducted with the aim of investigating the effect of hydroxyl selenomethionine (OH-SeMet) in the diet of broiler breeder and old broiler breeder roosters on production performance, quality traits of eggs and blood parameters. For this purpose, 260 broiler breeders Ross 308 (45 weeks old) were used in a completely randomized design with four treatments and five repetitions (13 hens and one rooster in each replication). Experimental treatments included: 1) a basal diet without OH-SeMet (control), 2) a broiler breeder diet without OH-SeMet and a rooster diet containing 0.1 mg/kg OH-SeMet, 3) broiler breeder diet containing 0.1 mg/kg OH-SeMet and rooster diet without OH-SeMet and 4) broiler breeder and rooster diet containing 0.1 mg/kg OH-SeMet. Performance and quality traits of eggs were measured weekly at 50, 55 and 60 weeks of age. The results showed that the use of 0.1 mg/kg OH-SeMet in the broiler breeder diet and the broiler breeder and rooster diet improved the laying percentage, egg weight, egg mass and feed conversion ratio compared to the control treatment ($p < 0.05$). Feeding broiler breeder and rooster with diet containing OH-SeMet improved the mentioned parameters compared to feeding broiler breeders alone ($p < 0.05$). Eggshell strength increased in treatments 3 and 4 compared to control and treatment 2 ($p < 0.05$). The concentration of selenium and glutathione peroxidase in the treatments fed with OH-SeMet was significantly higher than the control treatment ($p < 0.05$). The use of 0.1 mg/kg of OH-SeMet may be a practical approach to help production performance and eggshell strength in old broiler breeders.

Keywords: Hydroxy selenomethionine, Broiler breeders, Broiler breeder roosters, Laying, Eggs.



مقاله پژوهشی

تأثیر هیدروکسی سلنومیتونین بر عملکرد، صفات کیفی تخم‌مرغ و فراسنجه‌های خون مرغ‌های مادر گوشتی مسن

احمد منافى، یحیی ابراهیم‌نژاد*، حبیب اقدم شهریار، عبدالاحد شاددل تلی، ابوالفضل قربانی، ناصر ماهری سیس

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

*مسئول مکاتبات: ebrahimnezhad@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۳

DOI: 10.60833/ascij.2025.1129024

چکیده

سلنیوم (Se) یک عنصر ضروری کمیاب است که نقش حیاتی در سلامت و عملکرد حیوانات دارد. این مطالعه با هدف بررسی اثر هیدروکسی سلنومیتونین در جیره غذایی مرغ‌ها و خروس‌های مادر گوشتی مسن بر عملکرد تولیدی، صفات کیفی تخم‌مرغ و فراسنجه‌های خون انجام شد. از ۲۶۰ مرغ مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ (۴۵ هفته) در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و پنج تکرار (۱۳ قطعه مرغ و یک خروس در هر تکرار) استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) جیره پایه بدون هیدروکسی سلنومیتونین (شاهد)، (۲) جیره مرغ‌های مادر بدون هیدروکسی سلنومیتونین و جیره خروس‌ها حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومیتونین، (۳) جیره مرغ‌های مادر حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومیتونین و جیره خروس‌ها بدون هیدروکسی سلنومیتونین و (۴) جیره خروس‌ها و مرغ‌های مادر گوشتی حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومیتونین بودند. عملکرد به‌صورت هفتگی و صفات کیفی تخم‌مرغ در سنین ۵۰، ۵۵ و ۶۰ هفتگی اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که استفاده از ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومیتونین در جیره مرغ‌های مادر گوشتی و جیره مرغ و خروس‌های مادر گوشتی باعث بهبود درصد تخم‌گذاری، وزن تخم‌مرغ، توده تخم‌مرغ و ضریب تبدیل خوراک در مقایسه با تیمار شاهد شد ($p < 0/05$). تغذیه مرغ و خروس با جیره حاوی هیدروکسی سلنومیتونین باعث بهبود فراسنجه‌های ذکر شده در مقایسه با تغذیه مرغ‌های مادر گوشتی به‌تنهایی شد ($p < 0/05$). استحکام پوسته تخم‌مرغ در تیمارهای ۳ و ۴ نسبت به تیمار شاهد و ۲ افزایش یافت ($p < 0/05$). غلظت سلنیوم و گلوکاتایون پراکسیداز خون در تیمارهای تغذیه شده با هیدروکسی سلنومیتونین به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود ($p < 0/05$). استفاده از ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومیتونین در جیره مرغ و هم خروس مادر گوشتی ممکن است یک رویکرد عملی برای کمک به عملکرد تولید و استحکام پوسته تخم‌مرغ در مرغ‌های مادر گوشتی مسن باشد.

کلمات کلیدی: هیدروکسی سلنومیتونین، مرغ مادر گوشتی، خروس مادر گوشتی، تخم‌گذاری، تخم‌مرغ.

مقدمه

آنزیم‌های حیاتی سلنوپروتئین‌ها است (۲). سلنیوم نقش مهمی در ساختار گلوکاتایون پراکسیداز دارد و از این طریق، آسیب‌های اکسیداتیو را کاهش داده (۳) و قابلیت جوجه‌درآوری تخم‌مرغ‌های بارور را بهبود

سلنیوم عنصری ضروری در تغذیه طیور است که تأثیر قابل‌توجهی بر عملکرد تولیدی و تولیدمثلی گله‌های مادر دارد (۱). خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدویروسی سلنیوم، ناشی از نقش آن در ساختار

می‌بخشد (۴). سلنیوم به دو شکل آلی و معدنی وجود دارد، با این وجود ویژگی‌های نامطلوب شکل معدنی آن نظیر زیست‌فراهمی و کارایی پایین، سمیت، اثرات متقابل با سایر مواد معدنی و ناتوانی در حفظ ذخایر سلنیوم بدن، تمایل به استفاده از سلنیوم آلی در جیره را افزایش داده است (۵). دو حوزه اصلی باید در رابطه با تغذیه سلنیوم در مرغ مادر در نظر گرفته شود. اولاً، مشخص شده که سلنیوم نقش مهمی در حفظ کیفیت مایع منی ایفا می‌کند و وضعیت بهینه سلنیوم در خروس عامل مهمی برای اطمینان از باروری در نظر گرفته می‌شود (۶). ثانیاً، وضعیت سلنیوم تخم-مرغ‌های مرغ مادر برای حفظ سیستم آنتی‌اکسیدانی جنین در حال رشد، اهمیت زیادی دارد. به‌طور کلی پذیرفته شده است که فرآیند جوجه‌کشی باعث تنش اکسیداتیو می‌شود و بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی جنین، پتانسیل افزایش قابلیت جوجه‌کشی را دارد (۷).

علاوه بر این، زمانی که کمبود سلنیوم در جیره‌ها وجود دارد یا زمانی که نیاز سلنیوم به‌طور کامل پوشش داده نمی‌شود، مرغ‌های مادر و جوجه‌های گوشتی ممکن است کاهش عملکرد کلی را نشان دهند (۸). از آنجایی که بسیاری از مواد تشکیل‌دهنده خوراک دارای سلنیوم کم هستند، جیره غذایی طيور تجاری همیشه با سلنیوم از طریق پیش مخلوط‌ها به مقدار ۰/۲ تا ۰/۳ میلی‌گرم/کیلوگرم بسته به منبع، تکمیل می‌شوند تا از کمبود آن جلوگیری شود. سلنیوم را می‌توان به‌صورت غیر آلی (سدیم سلنیت)، یا آلی مانند مخمرهای سلنیزه شده یا به شکل‌های شیمیایی خالص مانند هیدروکسی سلنومتیونین یا L-سلنومتیونین به جیره طيور اضافه کرد. به تازگی، منبع جدیدی از سلنیوم آلی پایدار که هیدروکسی آنالوگ سلنومتیونین است، به‌وجود آمده و به‌جای سلنومتیونین که در فرم خالص، ناپایدار است و به سادگی اکسید می‌شود، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

زیست‌فراهمی بالاتر ترکیب سلنو آمینواسید در مقایسه با سایر اشکال آلی یا معدنی در گذشته تایید شده است (۹). این امر مقدار مکمل سلنیوم مورد استفاده در جیره را کاهش می‌دهد. چندین گزارش حاکی از بهبود در تولیدی مرغ‌های مادر گوشتی در پایان دوره تخم‌گذاری در اثر سلنیوم آلی است. به‌عنوان مثال، در پایان دوره تولیدمثلی (۵۰ هفته)، در مرغ‌هایی که با جیره‌ی حاوی سلنیوم آلی تغذیه شدند، درصد تولید و تخم‌های قابل جوجه‌کشی به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت (۱۰). بیشتر تحقیقات در مورد سلنیوم در تغذیه مرغ مادر با ۰/۳ میلی‌گرم/کیلوگرم خوراک انجام شده است (۱۱؛ ۱۲). با این حال، اتحادیه اروپا مقدار سلنیوم جیره را به ۰/۲ میلی‌گرم/کیلوگرم خوراک محدود کرده است (۱۳). علاوه بر این، صنعت طيور به‌دنبال منابع مؤثرتری از ترکیبات آلی سلنیوم می‌باشد تا بالاترین زیست‌فراهمی را داشته باشد و نیازهای سلنیوم را در شرایط چالش‌برانگیز برآورده کند. از آن-جایی که هیدروکسی سلنومتیونین بسیار مؤثرتر از منابع دیگر سلنیوم به تخم‌مرغ منتقل می‌شود (۱۴) این فرضیه وجود دارد که جایگزینی منابع مختلف سلنیوم، در سطح تجاری توسط هیدروکسی سلنومتیونین در دز ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم جیره مرغ‌های مادر گوشتی و خروس‌ها می‌تواند وضعیت و عملکرد آن‌ها را به-طور بالقوه بهبود بخشد. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر هیدروکسی سلنومتیونین در جیره مرغ و خروس‌های مادر گوشتی مسن بر عملکرد تولیدی، صفات کیفی تخم‌مرغ و فراسنجه‌های خون انجام شد.

مواد و روش‌ها

پرندگان، تیمارها و مدیریت: این آزمایش با استفاده از ۲۶۰ مرغ مادر گوشتی و ۲۰ خروس مادر گوشتی (۴۵ هفته‌ای) از سویه راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً

تصادفی با پنج تکرار (۱۳ مرغ و یک خروس در هر تکرار) به مدت ۹۰ روز انجام شد. دستورالعمل‌های پرورش مرغ‌های مادر گوشتی شامل کنترل نوردی، دما، تهویه، آب آشامیدنی، واکسیناسیون و غیره برای تمامی تیمارها یکسان و بر اساس شرایط استاندارد سویه اجرا شد (۱۵). تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) جیره پایه بدون هیدروکسی سلنومتیونین (شاهد)، (۲) جیره مرغ‌های مادر بدون هیدروکسی سلنومتیونین و جیره خروس‌ها حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین، (۳) جیره مرغ‌های مادر حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین و جیره خروس‌ها بدون هیدروکسی سلنومتیونین و (۴) جیره مرغ‌ها و خروس‌های مادر گوشتی حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین بودند. قبل از تنظیم جیره‌های آزمایشی، ابتدا مواد خوراکی مصرفی طبق روش (۱۶) از نظر ماده خشک، انرژی خام، پروتئین خام، عصاره اتری و فیبر خام مورد آنالیز قرار گرفتند. جیره‌ها از لحاظ میزان ترکیبات مواد مغذی یکسان بودند. دان مصرفی در گروه‌های آزمایشی، مطابق با استانداردهای شرکت (۱۵) محاسبه و در اختیار پرندگان قرار گرفت (۱۶۲ گرم به ازای هر مرغ و ۱۴۵ گرم به ازای هر خروس از هفته ۴۵ تا ۶۰). جیره‌های آزمایشی به صورت آردی و به روش دستی به پرندگان داده شد. هیدروکسی سلنومتیونین نیز به صورت پودر به جیره‌ها اضافه شد.

عملکرد تولیدی: تخم‌مرغ‌ها دو بار در روز جمع‌آوری شدند و تعداد تخم‌ها و میانگین وزن تخم-مرغ در پایان هر روز ثبت شد. توده تخم‌مرغ و ضریب تبدیل خوراک به صورت هفتگی محاسبه شدند. علاوه بر این، درصد تولید با تقسیم تعداد کل تخم‌مرغ تولید شده در هر تکرار بر روز مرغ ارزیابی شد. توده تخم‌مرغ با ضرب میانگین وزن تخم‌مرغ هر تکرار در درصد تولید آن تکرار محاسبه شد. علاوه بر

این، مصرف خوراک هفتگی برای تخمین ضریب تبدیل خوراک به توده تخم‌مرغ تقسیم شد. **صفات کیفی تخم مرغ:** در سنین ۵۰، ۵۵ و ۶۰ هفتگی از هر تکرار دو عدد تخم‌مرغ جمع‌آوری شد و مهم‌ترین صفات کیفی داخلی تخم‌مرغ شامل وزن آلبومین، وزن زرده، وزن پوسته، ارتفاع آلبومین و واحد هاو اندازه‌گیری شد. ارتفاع آلبومین تخم‌مرغ با استفاده از میکرومتر دستی اندازه‌گیری شد. بدین صورت که پس از شکستن تخم‌مرغ‌ها، سفیده‌ها روی سطح صاف قرار گرفته و سپس مقادیر ارتفاع آلبومین در هر نقطه‌ای که نوک ارتفاع سنج سفیده تخم‌مرغ را لمس می‌کرد (با فاصله یک سانتی‌متر از زرده)، ثبت شد. از معادله زیر برای محاسبه واحد هاو استفاده شد (۱۷):

$$HU = \log (AH - 1.7 \text{ EW}^{0.37 + 7.57})$$

HU: واحد هاو، AH: ارتفاع آلبومین تخم‌مرغ (میلی-متر)، EW: وزن تخم‌مرغ (گرم)، لگاریتم بر اساس ۱۰ **فراسنجه‌های خون:** در پایان آزمایش، خون از ورید بال دو پرند (یک قطعه مرغ و یک قطعه خروس) در هر تکرار جمع‌آوری شد. نمونه‌های خون با دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند تا پلاسما به دست آید. نمونه‌های پلاسما هپارینه شده به دست آمده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان اندازه‌گیری فراسنجه‌های خون ذخیره شدند. اندازه‌گیری فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون (گلوکز، تری-گلیسرید، پروتئین تام، آلبومین، سلیوم، کلسترول، HDL و LDL)، عوامل آنتی‌اکسیدانی (فعالیت سوپراکسید دسموتاز، فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز و فعالیت مالون دی‌آلدهید) و آنزیم‌های کبدی (آسپارات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز) سرم خون با استفاده از کیت‌های آنزیمی تجاری (Pars Azmoon Kits, Pars Azmoon

داده‌های عملکرد تولیدی و صفات کیفی تخم‌مرغ از رویه MIXED و برای فراسنجه‌های خون از رویه تجزیه و تحلیل آماری: نرمال بودن داده‌ها با آزمون UNIVARIATE PROC و Shapiro-Wilk در SAS 9.4 مورد بررسی قرار گرفتند. برای تجزیه و تحلیل داده‌های عملکرد تولیدی و صفات کیفی تخم‌مرغ از رویه MIXED و برای فراسنجه‌های خون از رویه تجزیه و تحلیل آماری: نرمال بودن داده‌ها با آزمون UNIVARIATE PROC و Shapiro-Wilk در SAS 9.4 مورد بررسی قرار گرفتند. برای تجزیه و تحلیل داده‌های عملکرد تولیدی و صفات کیفی تخم‌مرغ از رویه MIXED و برای فراسنجه‌های خون از رویه تجزیه و تحلیل آماری: نرمال بودن داده‌ها با آزمون UNIVARIATE PROC و Shapiro-Wilk در SAS 9.4 مورد بررسی قرار گرفتند. برای تجزیه و تحلیل

جدول ۱- ترکیب جیره پایه مرغ و خروس‌های مادر گوشتی

Table 1. Composition of the basal diet of broiler breeders and roosters

Ingredient, g/kg	Broiler breeders	Broiler breeder roosters
Corn grain	625.0	532.7
Soybean meal (44% CP)	165.0	55.0
Wheat grain	40.0	65.0
Barley grain	0.0	50.0
Wheat bran	40.0	234.0
Soybean oil	12.0	8.0
Di-calcium phosphate	16.4	12.8
Bentonite	7.05	9.55
Calcium carbonate	77.2	15.4
Vitamin premix ^a	2.5	2.5
Mineral premix ^b	2.5	2.5
Salt	2.2	2.0
Sodium bicarbonate	2.2	2.35
Potassium bicarbonate	1.5	1.5
DL-methionine	1.8	1.4
L-lysine HCL	0.6	0.8
L-threonine	0.8	0.8
Choline chloride	1.0	1.0
Antioxidants	0.2	0.2
Toxin binder	1.0	1.0
Anti-ammonium extra	1.0	1.0
Phytase	0.05	0.05
Total	1000.0	1000.0
Calculated composition		
Metabolizable energy (kcal/kg)	2800	2825
Crude protein (%)	13.52	11.77
Crude fiber (%)	3.02	4.63
Calcium (%)	3.20	0.90
Available P (%)	0.34	0.30
Lysine (SID) (%)	0.60	0.43
Methionine (SID) (%)	0.38	0.30
Met + Cys (SID) (%)	0.61	0.48
Threonine (SID) (%)	0.55	0.39
DCAB (mEq/kg)	203.00	200.00

a-مکمل ویتامینه ارائه شده به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی: ۱۵۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A؛ ۵۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3؛ ۱۳۰ واحد بین‌المللی ویتامین E؛ ۹ میلی‌گرم ویتامین K3؛ ۶ میلی‌گرم ویتامین B1؛ ۲۰ میلی‌گرم ویتامین B2؛ ۸ میلی‌گرم ویتامین B6؛ ۵ میلی‌گرم ویتامین B9؛ ۰/۰۷ میلی‌گرم ویتامین B12؛ ۰/۶ میلی‌گرم بیوتین؛ ۷۰ میلی‌گرم نیاسین؛ ۲۵ میلی‌گرم اسید پانتوتیک. b-مکمل مواد معدنی ارائه شده به ازای هر کیلوگرم جیره: ۵۰ میلی‌گرم آهن، ۱۶ میلی‌گرم مس، ۱۲۰ میلی‌گرم منگنز، ۱۲۰ میلی‌گرم روی، ۳ میلی‌گرم ید، ۰/۳ میلی‌گرم سلنیوم.

^a Vitamin premix provided per kilogram of diet: Vitamin A, 15,000 IU; vitamin D₃, 5,000 IU; vitamin E, 130 IU; vitamin K₃, 9 mg; Vitamin B₁, 6 mg; Vitamin B₂, 20 mg; vitamin B₆, 8 mg; vitamin B₉, 5 mg; vitamin B₁₂, 0.07 mg; biotin, 0.6 mg; niacin, 70 mg; pantothenic acid, 25 mg. ^b Mineral premix provided per kilogram of diet: Fe, 50 mg; Cu, 16 mg; Mn, 120 mg; Zn, 120 mg; I, 3 mg; Se, 0.3 mg.

نتایج

عملکرد: جدول ۲ اثر تیمارهای آزمایشی مختلف را بر عملکرد تولیدی مرغ‌های مادر گوشتی نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که درصد تولید، وزن و توده تخم‌مرغ و ضریب تبدیل خوراک تحت تأثیر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار و زمان قرار گرفتند. استفاده از ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین در جیره مرغ‌های مادر گوشتی و جیره مرغ و خروس‌های مادر گوشتی، باعث بهبود درصد تخم‌گذاری، وزن تخم‌مرغ، توده تخم‌مرغ و ضریب تبدیل خوراک در مقایسه با تیمار شاهد شد ($p < 0.05$).

کیفیت تخم‌مرغ: اثر هیدروکسی سلنومتیونین در جیره بر صفات کیفی تخم‌مرغ مرغ‌های مادر گوشتی در جدول ۳ گزارش شده است. با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که وزن زرده، وزن سفیده، وزن پوسته، ارتفاع آلبومین و واحد هاو تحت تأثیر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار و زمان قرار نگرفتند. اثر تیمار و زمان بر استحکام پوسته تخم‌مرغ تأثیر معنی‌داری داشت. استحکام پوسته تخم‌مرغ در تیمار ۰/۱ میلی-

گرم هیدروکسی سلنومتیونین در جیره مرغ‌های مادر گوشتی و تیمار هیدروکسی سلنومتیونین در جیره مرغ و خروس‌های مادر گوشتی نسبت به تیمار شاهد و ۰/۱ میلی‌گرم هیدروکسی سلنومتیونین در جیره خروس‌های مادر گوشتی افزایش یافت ($p < 0.05$).

فراسنجه‌های خون: نتایج مربوط به اثر هیدروکسی سلنومتیونین در جیره بر فراسنجه‌های خون، آنزیم‌های کبدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مرغ و خروس‌های مادر گوشتی در جدول ۴ و ۵ آورده شده است. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که غلظت گلوکز، تری-گلیسرید، کلسترول، HDL، LDL، پروتئین کل، آلبومین، آلکالین فسفاتاز، آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز، مالون دی‌آلدهید و سوپراکسید دسموتاز تحت تأثیر هیدروکسی سلنومتیونین قرار نگرفتند. غلظت سلیوم و گلوکاتایون پراکسیداز در تیمارهای تغذیه‌شده با هیدروکسی سلنومتیونین به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود ($p < 0.05$).

جدول ۲- اثر تیمارهای آزمایشی بر عملکرد تولیدی مرغ‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ (۶۰-۴۵ هفتگی)

Table 2. Effects of hydroxy-selenomethionine on the production performance of Ross 308 broiler breeders (45-60 weeks old)

Item		Egg production (%)	Egg weight (g)	Egg mass (g)	FCR
Treatments ¹	1	68.86 ^c	66.41 ^c	45.56 ^b	3.50 ^a
	2	69.55 ^c	66.38 ^c	45.97 ^b	3.46 ^a
	3	70.98 ^b	67.90 ^b	48.08 ^a	3.31 ^b
	4	72.99 ^a	68.23 ^a	49.66 ^a	3.20 ^c
SEM		0.18	0.05	0.11	0.01
p	Treat	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	Time	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	Treat × Time	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) جیره پایه بدون هیدروکسی سلنومتیونین (شاهد)، (۲) جیره مرغ‌های مادر بدون هیدروکسی سلنومتیونین و جیره خروس‌ها حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین، (۳) جیره مرغ‌های مادر حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین و جیره خروس‌ها بدون هیدروکسی سلنومتیونین و (۴) جیره مرغ‌های مادر و خروس‌ها حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین. SEM: میانگین خطای استاندارد، ^{a,b}-حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ است.

¹Experimental treatments include 1) a basal diet without OH-SeMet, 2) a chicken diet without OH-SeMet and a rooster diet containing 0.1 mg/kg OH-SeMet, 3) chicken diet containing 0.1 mg/kg OH-SeMet and rooster diet without OH-SeMet and 4) chicken and rooster diet contained 0.1 mg/kg OH-SeMet. ^{a, b} Means within the same column with different letters differ significantly ($p < 0.05$). SEM, standard error of means.

جدول ۳- اثر تیمارهای آزمایشی بر صفات کیفی تخم‌مرغ مرغ‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ (۶۰-۴۵ هفتگی)

Table 3. Effect of experimental treatments on egg quality traits of Ross 308 broiler breeders (45-60 weeks old)

Item		Yolk weight (%)	Albumen weight (%)	Shell weight (%)	Albumen height (mm)	Haugh unit	Shell strength (kg/m ²)
Treatments	1	28.52	62.14	9.33	6.35	76.43	2.53 ^b
	2	28.68	61.86	9.45	6.56	78.28	2.74 ^b
	3	27.96	62.57	9.46	6.70	78.44	3.26 ^a
	4	27.65	62.98	9.36	6.81	79.90	3.14 ^a
SEM		1.35	2.38	0.86	0.26	2.14	0.36
p	Treat	0.14	0.12	0.91	0.27	0.13	0.006
	Time	0.29	0.87	0.15	0.41	0.06	0.001
	Treat×Time	0.16	0.34	0.88	0.53	0.74	0.16

جدول ۴- اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های خون مرغ و خروس‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ (۶۰-۴۵ هفتگی)

Table 4. Effect of experimental treatments on blood parameters of Ross 308 broiler breeder hens and roosters (45-60 weeks old)

Treatments	Glucose (mg/dL)	Triglycerides (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Total Protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	Selenium (μg/dL)
1	322.40	3282.57	143.43	82.09	34.57	7.51	2.81	133.23 ^b
2	326.10	3016.08	149.71	88.33	33.75	9.05	2.18	146.47 ^{ab}
3	312.60	2894.28	162.78	95.61	40.98	9.59	2.90	155.26 ^a
4	305.60	2463.20	167.94	62.09	35.45	9.73	2.47	152.08 ^a
SEM	18.94	305.98	12.08	9.90	2.67	0.72	0.40	3.40
p	0.86	0.30	0.46	0.11	0.23	0.13	0.58	0.01

جدول ۵- اثر تیمارهای آزمایشی بر آنزیم‌های کبدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مرغ و خروس‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ (۶۰-۴۵ هفتگی)

Table 5. Effect of experimental treatments on liver enzymes and antioxidant capacity of Ross 308 broiler breeder hens and roosters (45-60 weeks old)

Treatments	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	MDA (mmol/mL)	SOD (U/mL)	GPx (U/mL)
1	1823.30	241.30	109.82	3.78	379.14	76.18 ^b
2	1849.40	227.10	109.02	3.16	341.80	83.64 ^a
3	1857.60	219.20	111.15	3.45	333.35	82.62 ^a
4	1810.50	226.20	97.34	3.75	392.74	84.33 ^a
SEM	20.59	10.32	9.49	0.44	23.41	2.88
p	0.33	0.49	0.71	0.73	0.23	0.03

بحث

داد. مطالعات نشان داده است که سلنیوم اثرات مثبتی بر عملکرد مرغ‌های مادر گوشتی دارد (۷). نتایج Li و همکاران (۲۰) نشان دادند که سلنیوم مخمر و سلنومتیونین، درصد تخم‌گذاری را در مقایسه با سلنیت سدیم افزایش می‌دهد، در حالی که سطوح مختلف سلنیوم هیچ تأثیری نداشت. برخی از مطالعات در مورد تأثیر منابع سلنیوم بر عملکرد طیور یافته‌های متناقضی را ارائه کرده‌اند. به گفته Liu و همکاران (۲۱)، جیره‌های غذایی با منابع و غلظت‌های مختلف

در مرغ‌های مادر گوشتی با افزایش سن به تدریج عملکرد و نسبت تولید تخم‌مرغ کاهش می‌یابد (۱۹). پیری تخمدان باعث کاهش شدید تولید تخم‌مرغ پس از ۴۰ تا ۴۸۰ روزگی می‌شود که ارزش تجاری و تولید تخم‌مرغ را کاهش می‌دهد. مطالعه حاضر نشان داد که افزودن ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین به جیره مرغ‌های مادر گوشتی باعث افزایش تخم‌گذاری، وزن و توده تخم‌مرغ شده و ضریب تبدیل خوراک را نسبت به گروه شاهد کاهش

شود. صفات کیفی تخم‌مرغ به‌جز استحکام پوسته تخم‌مرغ، تحت تأثیر مکمل هیدروکسی سلنومیتونین قرار نگرفتند. صفات کیفی تخم‌مرغ می‌تواند تحت تأثیر عوامل متعددی قرار گیرد که از جمله آنها می‌توان به منشاء ژنتیکی سویه، تغذیه، سلامت، شرایط محیطی و امکانات مورد استفاده اشاره کرد. در مطابقت نتایج تحقیق حاضر با نتایج سایر محققین، محققین نشان دادند که شکل آلی سلنیوم بر کیفیت پوسته تخم‌مرغ تأثیر می‌گذارد (۲۹)، اگرچه Pavlović و همکاران (۳۰) در مخالفت گزارش کردند که نه شکل و نه سطح سلنیوم بر کیفیت پوسته تخم‌مرغ تأثیر نمی‌گذارد. قدرت شکستن پوسته تخم‌مرغ تحت تأثیر سلنیوم جیره غذایی در این مطالعه قرار گرفت و این با یافته‌های Invernizzi و همکاران (۳۱) مطابقت دارد که اهمیت شکل آلی سلنیوم را از نظر زیست-فراهمی و جذب بیشتر به غشای پوسته تخم‌مرغ گزارش کردند که به‌نوبه خود می‌تواند دلیل بالا بودن استحکام پوسته باشد. مکمل‌های معدنی کم‌نیاز، هم-جوشی اولیه را در مراحل اولیه تشکیل پوسته افزایش داده و از این رو استحکام مکانیکی تخم‌مرغ را بدون توجه به ضخامت پوسته بهبود می‌بخشد (۳۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که واحد هاو تحت تأثیر مکمل هیدروکسی سلنومیتونین قرار نگرفت. این نتایج مطابق با یافته‌های Liu و همکاران (۲۱) بود که پس از مقایسه منابع سلنیوم در سطوح بالا و پایین مشاهده کردند، بر خلاف نتایج این تحقیق، Arpášová و همکاران (۳۳) واحد هاو بهتری را در پرندگان تغذیه-شده با مخمر سلنیزه شده گزارش کردند. سایر فراسنجه‌ها مانند وزن سفیده و زرده و ارتفاع آلبومین تحت تأثیر جیره‌های غذایی قرار نگرفتند که با گزارش Skřivan و همکاران (۳۴) مطابقت دارد. در میان تمام عوامل القاکننده پیری تخمدان، تنش اکسیداتیو که ناشی از تجمع گونه‌های فعال اکسیژن

سلنیوم به‌طور قابل‌توجهی بر مصرف خوراک روزانه و درصد تولید تخم‌مرغ تأثیر دارد، اما بر میانگین وزن تخم‌مرغ یا ضریب تبدیل خوراک تأثیری نداشت. با این حال، در مطالعات دیگر هیچ‌گونه تغییری در تأثیر منابع سلنیوم بر عملکرد تولید یافت نشد (۲۲). تناقض در نتایج می‌تواند ناشی از عواملی از جمله نوع پرند، جیره غذایی و محیط، مقدار سلنیوم اضافه شده، منبع و طول آزمایش باشد. سلنیوم یک جزء ضروری دیودیناز است که به حفظ سطح هورمون تیروئید از طریق متابولیسم کمک می‌کند (۲۳). Wang و همکاران (۲۴) از ال-سلنومیتونین به‌جای سلنیت سدیم استفاده کردند و افزایش قابل‌توجهی در سطح mRNA دیودیناز-۱ در کبد جوجه‌های یک‌روزه گزارش کردند. این نشان می‌دهد که استفاده از سلنیوم آلی می‌تواند هورمون‌های تیروئید را بهتر فعال کرده، قابلیت هضم پروتئین را بهبود بخشیده و سوخت‌وساز انرژی را در مقایسه با فرم‌های معدنی بهبود بخشد (۲۵). دلیل بالقوه دیگر، زیست‌فراهمی بالای هیدروکسی سلنومیتونین است، زیرا ساختار شیمیایی هیدروکسی سلنومیتونین بسیار شبیه متیونین است و Met-tRNA نمی‌تواند بین متیونین و هیدروکسی سلنومیتونین تمایز قائل شود. این به هیدروکسی سلنومیتونین اجازه می‌دهد تا مستقیماً با پروتئین‌ها در بدن ترکیب شده و به‌عنوان منبع سلنیوم مورد استفاده قرار گیرد (۲۶). پیشنهاد شده است که بیان بیشتر سلنوپروتئین ممکن است وضعیت تغذیه و عملکرد متابولیکی سلنیوم را بهتر نشان دهد (۲۴). سلنوپروتئین برای انتقال سریع کلسیم در سلول‌های ایمنی، تکثیر سلول‌های T و تراگذاری یا دیپدز نوتروفیل‌ها ضروری است (۲۷) و در جابه‌جایی پروتئین‌های کژتابیده در شبکه آندوپلاسمی نقش دارد (۲۸). در نهایت، این مکانیسم‌ها می‌تواند منجر به بهبود عملکرد تولید در مرغ‌های مادر گوشتی مسن

خون، پروتئین کل و فراسنجه‌های لیپیدی خون تأثیری ندارد که با مطالعه Liu و همکاران (۲۱) مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزودن ۰/۱ میلی-گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین در جیره مرغ‌های مادر گوشتی مسن، تولید تخم‌مرغ، وزن تخم‌مرغ و ضریب تبدیل خوراک در مقایسه با تیمار شاهد بهبود یافت. بنابراین، استفاده از هیدروکسی-سلنومتیونین ممکن است یک رویکرد عملی برای کمک به عملکرد تولیدی در مرغ‌های مادر گوشتی مسن باشد. همچنین می‌توان اظهار داشت که یک جیره پایه، سلنیوم مورد نیاز مرغ‌های مادر گوشتی و خروس‌ها را به‌طور کامل تامین نمی‌کند. مکمل هیدروکسی سلنومتیونین در جیره تأثیر مثبتی بر استحکام پوسته تخم‌مرغ و غلظت سلنیوم و گلوکاتیون پراکسیداز خون داشت، با این حال پیشنهاد می‌شود غلظت سلنیوم تخم‌مرغ نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

منابع

1. Surai PF, Fisinin VI. Selenium in poultry breeder nutrition: An update. *Anim Feed Sci Technol.* 2014;191:1-15.
2. Sharideh H, Zhandi M, Zaghari M, Akhlaghi A, Hussaini SMH, Yousefi AR. Changes in broiler breeder hen's immunity by zinc oxide and phytase. *Iran J Vet Res.* 2019;20(2):120-131.
3. Surai PF. Antioxidant systems in poultry biology: superoxide dismutase. *J Anim Res Nutr.* 2016;1(1):8-23.
4. Surai PF. Selenium in nutrition and health (Vol. 974). Nottingham: Nottingham university press. 2006.
5. Han F, Chen D, Yu B, Luo W. Effects of different selenium sources and levels on serum biochemical parameters and tissue selenium retention in rats. *Front Agric China.* 2009;3:221-225.

تولید شده در طول فعالیت متابولیک است، یکی از غالب‌ترین عوامل است (۳۵). از آنجایی که سلنیوم در حفظ تعادل ردوکس نقش اساسی دارد، می‌توان از آن به‌عنوان یک استراتژی تغذیه برای کمک به حیوانات برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از پیری استفاده کرد (۶). با این حال، همان‌طور که در این مطالعه مشاهده شد، مکمل هیدروکسی سلنومتیونین می‌تواند در حمایت از عملکرد پرندگان کارآمدتر باشد. طبق نتایج ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نشان داده شده در این مطالعه، فعالیت گلوکاتیون پراکسیداز خون پرندگان تحت تأثیر منبع سلنیوم می‌باشد. نتایج مطالعات قبلی این یافته‌ها را تأیید می‌کند که در آن فعالیت بالاتر گلوکاتیون پراکسیداز هنگام تغذیه هیدروکسی سلنومتیونین در مقایسه با سلنیت سدیم مشاهده شد (۳۶). گلوکاتیون پراکسیداز یک سلنوپروتئین است که نقش مهمی در پاسخ به تنش اکسیداتیو برای حفظ هموستاز ایفا می‌کند (۳۷) و در دفاع آنزیمی در برابر تخریب گونه‌های فعال اکسیژن، که به‌طور طبیعی توسط پرندگان تولید می‌شوند، نقش دارد (۳۸). غلظت بالاتر گلوکاتیون پراکسیداز در پرندگان تغذیه-شده با هیدروکسی سلنومتیونین پتانسیل بیشتری را برای مبارزه با تنش اکسیداتیو نشان می‌دهد و بیان بازده تولید بالاتر در مرغ‌های مادر گوشتی مسن را تضمین می‌کند (۱۴). آلبومین یکی از منابع مهم پروتئینی است که در کبد سنتز می‌شود و وظایف اصلی آن شامل حفظ فشار اسمزی پلاسما، تامین انرژی و ترمیم بافت و به‌عنوان یک حامل درگیر در انتقال مواد مغذی برای حفظ تعادل دینامیکی پروتئین بافت بدن است (۳۹). Yang و همکاران (۴۰) با افزودن ۰/۱۵، ۰/۳۰، ۰/۴۵ و ۰/۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم سلنیت سدیم تفاوت معنی‌داری در پروتئین کل و آلبومین مشاهده نکردند. در مطالعه حاضر مشخص شده که مکمل هیدروکسی سلنومتیونین بر آلبومین

14. Brito ANEF, Kaneko IN, Cavalcante, DT, Cardoso AS, Givisiez PEN, Costa, FG. Hydroxy-selenomethionine enhances the productivity and egg quality of 50-to 70-week-old semi-heavy laying hens under heat stress. *Poult Sci.* 2023;102(2):102320.
15. Aviagen. Ross 308 parent stock: nutrition specifications. Accessed Apr. http://eu.aviagen.com/assets/Tech-Center/Ross_PS/Ross308-PS-NS-2016-EN.pdf. 2018.
16. AOAC. Official methods of analysis (16th Ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists. 1995.
17. Haugh R. The haugh unit for measuring egg quality. *U S Egg Poult Mag.* 1937;43:522-555.
18. SAS. STAT User's Guide, Version 9.2. SAS Inst. Inc., Cary, NC. 2009.
19. Dunn IC. Long Life Layer; genetic and physiological limitations to extend the laying period. In *Proceedings of the 19th European Symposium on Poultry Nutrition*. 2013;19:124-129.
20. Li Y, Mu T, Li R, Miao S, Jian H, Dong X, Zou X. Effects of different selenium sources and levels on the physiological state, selenoprotein expression, and production and preservation of selenium-enriched eggs in laying hens. *Poult Sci.* 2024;103(2):103347.
21. Liu H, Yu Q, Fang C, Chen S, Tang X, Ajuwon KM, Fang R. Effect of selenium source and level on performance, egg quality, egg selenium content, and serum biochemical parameters in laying hens. *Foods.* 2020;9(1):68-79.
22. Woods SL, Sobolewska S, Rose SP, Whiting IM, Blanchard A, Ionescu C, et al. Effect of feeding different sources of selenium on growth performance and antioxidant status of broilers. *Br Poult Sci.* 2020;61(3):274-280.
23. Daniels LA. Selenium metabolism and bioavailability. *Biol Trace Elem Res.* 1996;54:185-199.
6. Surai PF, Surai, PF. Molecular mechanisms of selenium action: selenoproteins. *Selenium in Poultry Nutrition and Health*. Wageningen, Netherlands: Wageningen Academic Publishers. 2018; 67-122.
7. Rajashree K, Muthukumar T, Karthikeyan N. Comparative study of the effects of organic selenium on hen performance and productivity of broiler breeders. *Br Poult Sci.* 2014;55(3):367-374.
8. Zhao R, Li K, Wang J, Wang Y, Wu R, Zhan X. Effects of different forms and levels of selenomethionine on productive performance and antioxidant status of broiler breeders and its offspring. *Biol Trace Elem Res.* 2019;188:478-484.
9. Couloigner F, Jlali M, Briens M, Rouffineau F, Geraert PA, Mercier Y. Selenium deposition kinetics of different selenium sources in muscle and feathers of broilers. *Poult Sci.* 2015;94(11): 2708-2714.
10. Khan MT, Mahmud A, Zahoor I, Javed K. Organic and inorganic selenium in Aseel chicken diets: Effect on hatching traits. *Poult Sci.* 2017; 96(5):1466-1472.
11. Zhang L, Wang YX, Zhou Y, Zheng L, Zhan XA, Pu QH. Different sources of maternal selenium affect selenium retention, antioxidant status, and meat quality of 56-day-old offspring of broiler breeders. *Poult Sci.* 2014; 93(9):2210-2219.
12. Emamverdi M, Zare-Shahneh A, Zhandi M, Zaghari M, Minai-Tehrani D, Khodaei-Motlagh M. An improvement in productive and reproductive performance of aged broiler breeder hens by dietary supplementation of organic selenium. *Theriogenology.* 2019; 126:279-285.
13. EC—European Commission. Commission executive regulations (EU) No 427/2013 of 8 May 2013 concerning the authorisation of selenomethionine produced by *Saccharomyces cerevisiae*. 2013.

32. Mabe I, Rapp C, Bain MM, Nys Y. Supplementation of a corn-soybean meal diet with manganese, copper, and zinc from organic or inorganic sources improves eggshell quality in aged laying hens. *Poult Sci.* 2003;82(12):1903-1913.
33. Arpášová H, Petrovič V, Mellen M, Kačániová M, Čobanová K, Leng L. The effects of supplementing sodium selenite and selenized yeast to the diet for laying hens on the quality and mineral content of eggs. *J Anim Feed Sci.* 2009;18(18):90-100.
34. Skrivan M, Simane J, Dlouhá G, Doucha J. Effect of dietary sodium selenite, Se-enriched yeast and Se-enriched *Chlorella* on egg Se concentration, physical parameters of eggs and laying hen production. *Czech J Anim Sci.* 2006;51(4):163.
35. Liu X, Lin X, Zhang S, Guo C, Li J, Mi Y, et al. Lycopene ameliorates oxidative stress in the aging chicken ovary via activation of Nrf2/HO-1 pathway. *Aging.* 2018;10(8):21162.
36. Sun H, Zhao L, Xu ZJ, De Marco M, Briens M, Yan XH, et al. Hydroxy-selenomethionine improves the selenium status and helps to maintain broiler performances under a high stocking density and heat stress conditions through a better redox and immune response. *Antioxidants.* 2021;10(10):1542.
37. Wang X, Wu Q, Wan D, Liu Q, Chen, D, Liu Z, et al. Fumonisin: oxidative stress-mediated toxicity and metabolism *in vivo* and *in vitro*. *Arch Toxicol.* 2016;90:81-101.
38. Panda AK, Cherian G. Role of vitamin E in counteracting oxidative stress in poultry. *J Poult Sci.* 2014;51(2):109-117.
39. Ahmed AF, Constable PD, Misk NA. Effect of feeding frequency and route of administration on abomasal luminal pH in dairy calves fed milk replacer. *J Dairy Sci.* 2002;85(6):1502-1508.
24. Wang Z, Kong L, Zhu L, Hu X, Su P, Song Z. The mixed application of organic and inorganic selenium shows better effects on incubation and progeny parameters. *Poult Sci.* 2021;100(2):1132-1141.
25. Saleh AA. Effect of dietary mixture of *Aspergillus* probiotic and selenium nanoparticles on growth, nutrient digestibilities, selected blood parameters and muscle fatty acid profile in broiler chickens. *Anim Sci Pap Rep.* 2014;32(1):65-79.
26. Hachemi MA, Cardoso D, De Marco M, Geraert PA, Briens M. Inorganic and organic selenium speciation of seleno-yeasts used as feed additives: new insights from elemental selenium determination. *Biol Trace Elem Res.* 2023;201(12): 5839-5847.
27. Zoidis E, Seremelis I, Kontopoulos N, Danezis GP. Selenium-dependent antioxidant enzymes: Actions and properties of selenoproteins. *Antioxidants.* 2018;7(5):66-82.
28. Curran JE, Jowett JB, Elliott KS, Gao Y, Gluschenko K, Wang J, et al. Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nat Genet.* 2005;37(11):1234-1241.
29. Kieliszek M, Błażej S. Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: a review. *Molecules.* 2016;21(5):609.
30. Pavlović Z, Miletic I, Jokić Ž, Pavlovski Z, Škrbić Z, Šobajić S. The effect of level and source of dietary selenium supplementation on eggshell quality. *Biol Trace Elem Res.* 2010;133:197-202.
31. Invernizzi G, Agazzi A, Ferroni M, Rebucci R, Fanelli A, Baldi A, et al. Effects of inclusion of selenium-enriched yeast in the diet of laying hens on performance, eggshell quality, and selenium tissue deposition. *Ital J Anim Sci.* 2013;12(1):1-13.

tissues of Juvenile Cobia. Chin J Anim Nutr. 2016;28(12):3894-3904.

40. Yang YuanZhi YY, Nie JiaQuan NJ, Tan BeiPing TB, Dong XiaoHui DX, Yang QiHui YQ, Chi ShuYan CS. Effects of selenium source and selenium level on growth performance, liver and serum antioxidant indices and selenium content in

Research Article

Investigating the Effects of Organic and Inorganic Forms of Zinc, Copper and Manganese on the Qualitative Traits of the Broiler Breeder Eggshell

Seyede Atiye Mojaverian, Shahabodin Gharahveysi*, Mohsen Hajipour

Department of Animal Sciences, QaS.C., Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

*Corresponding author: s.gharavysi@qaemiau.ac.ir

Received: 4 May 2024

Accepted: 13 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1118943

Abstract

One of the main concerns in achieving peak production in broiler breeders is eggshell quality traits, which are very important and effective in the profitability of the breeder flock. The present study was conducted to investigate the effects of organic and inorganic forms of copper, zinc, and manganese on egg quality traits of Ross 308 broiler breeder hens. 30 pens were used, and 8 hens and one rooster were placed in each pen. This research was conducted as a factorial experiment in a completely randomized design. The first factor included organic and inorganic forms and the second factor included zinc, copper, and manganese elements. The number of treatments and replications were 6 and 5, respectively. Eggshell quality traits of broiler breeder hens were measured at weeks 33, 37, and 40. The collected data were analyzed using the LSmeans procedure using SAS statistical software. The results showed that organic zinc significantly increased eggshell weight ($p < 0.05$). Organic manganese improved eggshell thickness and strength ($p < 0.05$). The use of organic forms of zinc and manganese in the diet of broiler breeders was effective in improving the quality traits of their eggs, therefore, the use of organic forms of manganese, copper, and especially zinc in the diet of broiler breeders is recommended.

Keywords: Broiler Breeder, Copper, Eggshell, Manganese, Organic Zinc.



بررسی اثرات فرم آلی و معدنی عناصر روی، مس و منگنز بر صفات کیفی پوسته تخم‌مرغ‌های مادر گوشتی

سیده عطیه مجاوریان، شهاب‌الدین قره‌ویسی، محسن حاجی‌پور*

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

*مسئول مکاتبات: s.gharavysi@qaemiau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۱۵

DOI: 10.60833/ascij.2025.1118943

چکیده

یکی از دغدغه‌های اصلی در دستیابی به پیک تولید در مرغ‌های مادر گوشتی، صفات کیفی پوسته تخم است که بسیار مهم بوده و در سودآوری گله مرغ مادر موثر است. مطالعه حاضر برای بررسی اثرات اشکال آلی و معدنی مس، روی و منگنز بر صفات کیفی تخم‌های مرغ مادر گوشتی راس ۳۰۸ در یک فارم مرغ مادر واقع در شهرستان قائم‌شهر انجام شد. ۲۴۰ مرغ مادر گوشتی و ۳۰ خروس گوشتی به طور تصادفی به شش تیمار آزمایشی و پنج تکرار اختصاص یافتند. از ۳۰ پن استفاده شد و در هر پن هشت مرغ و یک خروس قرار گرفت. این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتور اول شامل اشکال آلی و معدنی و فاکتور دوم شامل عناصر روی، مس و منگنز بود. تعداد تیمار و تکرار به ترتیب شش و پنج بود. صفات کیفی پوسته تخم‌مرغان مادر گوشتی در هفته‌های ۳۳، ۳۷ و ۴۰ اندازه‌گیری شد. داده‌های جمع‌آوری شده با رویه LSmeans توسط نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که روی آلی باعث افزایش معنی‌دار وزن پوسته تخم ($p < 0/05$) و منگنز آلی باعث بهبود ضخامت و استحکام پوسته تخم شدند ($p < 0/05$). از آنجا که استفاده از اشکال آلی روی و منگنز در جیره غذایی مرغان مادر گوشتی در بهبود صفات کیفی تخم آن‌ها موثر بوده است، بنابراین استفاده از اشکال آلی منگنز، مس و بخصوص روی در جیره مرغ‌های مادر گوشتی توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: پوسته تخم، روی آلی، مس، مرغ مادر، منگنز.

مقدمه

اندازه تخم، کیفیت پوسته و تولید تخم می‌شوند (۱). عناصر معدنی کم‌نیاز، مس، روی و آهن به دلیل نقش‌های ویژه در واکنش‌های آنزیمی و متابولیکی بدن موجودات زنده از اهمیت بالایی برخوردارند و به همین دلیل، همواره به‌عنوان مکمل در جیره غذایی مورد توجه قرار می‌گیرند (۲) که این عناصر به‌عنوان کوفاکتور کاتالیزورهای زیستی در بسیاری از واکنش‌های متابولیکی بدن مشارکت دارند و برای

مرغ‌های مادر گوشتی یکی از اجزای اصلی در چرخه صنعت طیور هستند که در تولید گوشت، تخم‌مرغ و تأمین نیاز پروتئین انسان‌ها نقش کلیدی دارد. علاوه بر نکات مدیریتی در پرورش مرغ‌های مادر، توجه به برنامه‌های تغذیه‌ای و تهیه جیره‌های مناسب جهت حداکثر تولید تخم و جوجه درآوری، بسیار مهم بوده و سودآوری به‌ازای تعداد جوجه تولیدی بیشتر را در پی خواهد داشت. مواد معدنی کم‌مصرف سبب بهبود

رشد و توسعه اندام‌های بدن و عملکرد تولیدی مناسب، ضروری هستند (۳). تحقیقات نشان دادند که ۱۱ درصد از کل تخم‌مرغ‌های تولیدی را تخم‌هایی با پوسته‌های ضعیف و آسیب‌دیده تشکیل می‌دهد که منجر به زیان‌های بزرگ اقتصادی می‌گردد (۴). یکی از مشکلات اصلی در رسیدن به پیک تولید در مرغ‌های مادر گوشتی، کاهش کیفیت پوسته است که بسیار مهم بوده و سودآوری در ازای تعداد جوجه تولیدی بیشتر را در پی نخواهد داشت. پوسته تخم پرندگان، به‌عنوان یک بسته‌بندی طبیعی از مواد موجود در تخم در برابر آسیب‌های میکروبی و مکانیکی محافظت می‌کند (۵) و کاهش کیفیت پوسته به معنی کاهش شمار تخم‌های قابل جوجه‌کشی و افت میزان تفریخ تخم‌های بارور، به علت خروج بیشتر رطوبت از پوسته‌های نازک‌تر و ورود آلودگی به درون تخم‌مرغ است (۶). مکمل غذایی منگنز بر تشکیل پوسته تخم‌مرغ با افزایش تراکم محل‌های هسته‌زایی تأثیر می‌گذارد (جایی که کریستال‌های کلسیت در ابتدا روی غشای پوسته داخلی رسوب می‌کنند و شروع به رشد پوسته تخم‌مرغ می‌کنند) و در نهایت ضخامت پوسته و استحکام پوسته را افزایش می‌دهد (۷). منگنز همچنین ممکن است مورفولوژی کریستال کلسیت را تغییر دهد که می‌تواند بر ساختار و بافت پوسته تخم‌مرغ تأثیر بگذارد (۸). مس در فعالیت آمین‌اکسیداز شرکت می‌کند که در جیره‌های غذایی با کمبود مس منجر به کاهش فعالیت آنزیمی می‌شود که تولید الاستین را کاهش می‌دهد، که از اتصال عرضی کافی پروتئین‌های غشایی جلوگیری می‌کند و تخم‌هایی با بافت، شکل و اندازه‌های غیرطبیعی یا تخم‌های بدون پوسته تولید می‌کند (۹). روی یک عامل کمکی آنزیم کربنیک‌انهدراز است که یون‌های کربنات را در طول تشکیل پوسته تخم‌مرغ تامین می‌کند. در نتیجه، کمبود روی منجر به کاهش وزن

پوسته تخم‌مرغ می‌شود (۸). این مواد معدنی نه تنها نقش مهمی در عملکرد فیزیولوژیکی و تشکیل تخم دارند، بلکه با سایر مواد معدنی نیز تعامل هستند و برخی ممکن است با دیگری در تضاد هم باشند که در هنگام سمیت حاد مفید است (۱۰)، اما در نهایت ممکن است منجر به کمبود در بدن شوند. مواد معدنی کمپلکس شده با اسیدآمین به نظر تغذیه‌ای در دسترس‌تر می‌باشند بنابراین در حفظ فرایندهای فیزیولوژیکی نسبت به فرم سولفات کارآمدتر هستند (۱۱). گروهی از محققین دریافتند که زینک-آمینواسید از زینک-سولفات زیست‌فراهمی بیشتری دارند (۱۲) همچنین در مرغ‌هایی که با آب آشامیدنی شور به چالش کشیده می‌شوند، افزودن کمپلکس روی-متیونین باعث افزایش وزن پوسته و استحکام پوسته می‌شود (۱۳). تحقیقات اندکی در مورد بررسی اثرات مواد معدنی کمپاب روی، مس و منگنز در مرغ‌های مادر گوشتی انجام شده است و هدف از این مطالعه بررسی اثرات اشکال آلی و معدنی روی، مس و منگنز بر صفات کیفیت پوسته تخم‌های مرغ مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ در پیک تولید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

موقعیت مکانی و زمانی انجام تحقیق: محل انجام این مطالعه در یک فارم مرغ مادر واقع در شهرستان قائم‌شهر و زمان انجام مطالعات مزرعه، مرداد تا شهریور ۱۴۰۲ می‌باشد.

پرنده‌های موردنیاز و شرایط انجام آزمایش: در این تحقیق ۲۷۰ قطعه پرنده استفاده شد. ۲۴۰ مرغ مادر گوشتی و ۳۰ خروس گوشتی سویه راس ۳۰۸ به طور تصادفی به شش تیمار آزمایشی و پنج تکرار اختصاص‌یافته و بین ۳۰ پن (در هر پن هشت قطعه مرغ و یک قطعه خروس) قرار گرفتند که ابعاد هر پن ۱/۵×۲/۵ متر مکعب می‌باشد. مطالعه بر روی مرغ‌های

مادر گوشتی راس ۳۰۸ از سن ۳۳ هفتگی تا ۴۰ هفتگی (پیک تولید) انجام شد. هفته‌های ۲۹ تا ۳۳ به عنوان دوره سازگاری در نظر گرفته شد. پرندگان در معرض ۱۴ ساعت نور و ۱۰ ساعت تاریکی قرار گرفتند. خروس‌ها قبل از تاریکی هوا از واحدهای آزمایشی جمع‌آوری شدند و روز بعد پس از روشن شدن و تغذیه، به هر واحد آزمایشی یک خروس به صورت تصادفی اضافه شد. سایر پارامترهای محیطی شامل دما (۲۲ درجه سانتی‌گراد)، آبخوری (انیپل/۹ پرنده)، فضای تغذیه (۱۵ سانتی‌متر/پرنده)، تراکم پرنده (۳/۵-۵/۵ پرنده در مترمربع)، رطوبت (۶۵-۹۰ درصد)، نور (۶۰ لوکس) و تهویه برای همه تیمارها یکسان بود. به همه گروه‌های جیره آزمایشی، خوراک و آب یکسانی داده شد و پرندگان روزانه تحت پایش قرار گرفتند و هرگونه ناهنجاری و بیماری ثبت و در صورت لزوم تحت درمان قرار گرفتند.

جیره‌های آزمایشی: کلیه جیره‌ها بر اساس دستورالعمل کاتالوگ راس ۳۰۸ (۲۰۲۱) تنظیم شده و جیره پایه بر اساس پیشنهادهای جدول احتیاجات غذایی طیور (NRC) تنظیم شدند (جدول ۱). مقدار و شکل آلی و معدنی روی، مس و منگنز در تیمارهای مختلف متفاوت بود. البته در جیره پایه از اشکال معدنی عناصر مذکور استفاده شد. از سولفات مس ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)، سولفات روی ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) و سولفات منگنز ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) تولید شرکت گیوان شیمی (تهران - ایران) به‌عنوان منابع معدنی و از مس-متیونین ($\text{Zinpro}^\circ \text{ Availa}^\circ \text{ Cu-10.0\%}$)، روی-متیونین ($\text{Zinpro}^\circ \text{ Availa}^\circ \text{ Zn-12.0\%}$) و منگنز-متیونین ($\text{Zinpro}^\circ \text{ Availa}^\circ \text{ Mn-8.0\%}$) تولید شرکت Zinpro° آمریکا برای تأمین منابع آلی مورد مطالعه استفاده شد. مقدار مورد نیاز عناصر به شکل سولفات برای مرغ‌های مادر گوشتی راس طبق دستورالعمل کاتالوگ راس ۳۰۸ (۲۰۲۱) تعیین شد.

این مقادیر برای مس ۱۶ میلی‌گرم/کیلوگرم، روی ۹۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و منگنز ۱۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بود. با توجه به قابلیت زیست‌فراهمی بالای عناصر معدنی با ترکیب آلی، مقدار مورد نظر برای تأمین نیاز بدن پرنده از عناصر با ترکیب معدنی کمتر بود. طبق دستورالعمل کاتالوگ شرکت تولید کننده، قابلیت زیست‌فراهمی مس، روی و منگنز آلی به ترتیب ۱۲۰، ۱۸۵ و ۱۷۶ درصد بود. پس، مقدار توصیه شده عناصر به شکل آلی طبق نظر شرکت سازنده در تحقیق حاضر برای مس ۱۳/۳۳ میلی‌گرم/کیلوگرم، روی ۴۸/۶۵ میلی‌گرم/کیلوگرم و منگنز ۷۳/۸۶ میلی‌گرم/کیلوگرم بود. برای تولید جیره‌های آزمایشی، ابتدا کیلات‌های آلی مس، روی و منگنز خریداری شد. سپس کیلات‌های مذکور به یک کارخانه مکمل سازی واقع در شهرک صنعتی بشل قائم‌شهر منتقل شد و مکمل‌های معدنی با ترکیب آلی که حاوی عناصر مورد بررسی بود، تولید شد. در مرحله تحقیقات فارمی، مکمل‌ها به فارم منتقل شد و تیمارهای (جیره‌های) آزمایشی تولید شده و به مصرف پرندگان تحت آزمایش رسید. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) جیره حاوی مکمل عنصر کم‌نیاز معدنی روی، (۲) جیره حاوی مکمل عنصر کم‌نیاز آلی روی، (۳) جیره حاوی مکمل عنصر کم‌نیاز معدنی مس، (۴) جیره حاوی مکمل عنصر کم‌نیاز آلی مس، (۵) جیره حاوی مکمل عنصر کم‌نیاز معدنی منگنز و (۶) جیره حاوی مکمل عنصر کم‌نیاز آلی منگنز بود.

صفات کمی تخم‌های تولیدی: به‌صورت هفتگی، از تخم‌مرغ‌های تولیدی در آخرین روز هفته، تعداد ۲ تخم به ازاء هر پن به‌طور جداگانه به‌عنوان نمونه برداشت شده و به آزمایشگاه منتقل و صفات کمی پوسته تخم محاسبه گردید.

مقاومت پوسته: مقاومت پوسته با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری مقاومت مدل OSK-13473 اندازه‌گیری

سپس با ترازوی دیجیتالی بادقت ۰/۰۱ گرم وزن پسته اندازه گیری و ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های حاصل از تحقیق با استفاده از آزمایش فاکتوریل (۳×۲) در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) و برنامه نرم‌افزاری SAS مورد آنالیز قرار گرفت و برای مقایسه میانگین تیمارها از رویه LSMeans استفاده شد. مدل آماری مورد استفاده به شرح زیر است: $Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + e_{ijk}$ که e_{ijk} میانگین کل (جامعه)، A_i اثر فاکتور A (در دو سطح اشکال آلی و معدنی)، B_j اثر فاکتور B (در سه سطح اثر عناصر روی، مس و منگنز)، $(AB)_{ij}$ اثر متقابل دو فاکتور (اشکال آلی و معدنی و عناصر)، e_{ijk} اثر عوامل باقیمانده (خطای آزمایشی تصادفی)

می‌شود و طرز قرارگیری تخم‌ها در دستگاه به‌صورت ایستاده می‌باشد، به‌طوری‌که انتهای پهن تخم بر روی سینی قرار داده شده و مقاومت پسته اندازه‌گیری و ثبت گردید.

ضخامت پسته: ضخامت پسته‌ی تخم‌مرغ‌ها با استفاده از میکرومتر دیجیتالی سوزنی ۰/۰۰۱ میلی‌متر داسکوا (مدل DASQUA) ساخت کشور ایتالیا، در وسط پسته تخم و حداقل از سه ناحیه کمری (سه نقطه) اندازه‌گیری شده و میانگین اندازه ۳ نقطه ثبت گردید (۱۴).

وزن پسته: برای تعیین وزن پسته، در ابتدا محتویات درون تخم‌مرغ به‌صورت کامل خالی شده و

جدول ۱- ترکیبات غذایی جیره پایه مرغ‌های مادر گوشتی در هفته ۴۰-۳۳

Table 1. Composition of basal diet supplied to broiler breeder hens from 33 to 40 week of age

Ingredient composition	(%)	Nutrient composition	(%)
Corn	60.00	Metabolizable energy (kcal/kg)	2795.00
Soybean meal (44%)	17.50	Crude protein (%)	14.45
Wheat meal	9.5	Lysine (%)	0.56
Soybean oil	3.00	Methionine (%)	0.35
Dicalcium phosphate	1.25	Methionine + cysteine (%)	0.57
oyster shell powder	4.52	Threonine (%)	0.53
Calcium carbonate	3.00	Calcium (%)	3.20
Sodium bicarbonate	0.25	Available phosphorus (%)	0.34
Salt	0.22	Sodium (%)	0.18
Methionine	0.17	Chlorine (%)	0.18
Threonine	0.04		
Choline chloride	0.05		
Mineral premix ¹	0.25		
Vitamin premix ²	0.25		

۱- در این جیره‌ها از مکمل معدنی بدون مس، روی و منگنز استفاده شده است. ۲- ترکیب مکمل‌های ویتامینی و مکمل‌های معدنی برای هر کیلوگرم جیره شامل: ویتامین A: ۱۰۰۰۰ واحد، ویتامین D3: ۳۲۰۰ واحد، ویتامین E: ۱۳۰ واحد، ویتامین K: ۹ میلی‌گرم، ویتامین B12: ۰/۰۷ میلی‌گرم، ریبوفلاوین: ۲۰ میلی‌گرم، کلسیم پانتوتنات: ۱۵ میلی‌گرم، نیاسین: ۷۰ میلی‌گرم، کولین کلراید: ۱۰۰۰ میلی‌گرم، بیوتین: ۰/۶ میلی‌گرم، تیامین: ۶ میلی‌گرم، پیریدوکسین: ۸ میلی‌گرم، اسید فولیک: ۵ میلی‌گرم، ید: ۲ میلی‌گرم، آهن: ۵۰ میلی‌گرم، سلنیوم: ۲۰۰ میکروگرم، کبالت: ۵۰۰ میکروگرم.

1- A mineral supplement without copper, zinc and manganese has been used in these rations. 2- The composition of vitamin supplements and mineral supplements for each kilogram of ration includes: Vitamin A, 10000 units., Vitamin D3, 3200 units., Vitamin E: 130 units., K: 9 mg., Vitamin B12: 0.07 mg., Riboflavin: 20 mg., Calcium pantothenate: 15 mg., Niacin: 70 mg., choline chloride: 1000 mg., biotin: 0.6 mg., thiamine: 6 mg., pyridoxine: 8 mg., folic acid: 5 mg., iodine: 2 mg., iron: 50 mg., selenium: 200 micrograms., cobalt: 500 micrograms.

نتایج

استحکام پوسته را در طول آزمایش نشان داد (۲/۹۶) ولی از لحاظ عددی در تمامی تیمارها، استحکام پوسته با گذر زمان دچار کاهش شده است به طوری که در پایان دوره بالاترین سطح استحکام پوسته تخم مربوط به تیمار حاوی منگنز آلی (۲/۱۲) بود.

ضخامت پوسته: با بررسی نتایج حاصل از آنالیز کیفی صفات پوسته در پایان دوره آزمایشی (جدول ۲ تا ۴) اثر اشکال معدنی، آلی و اثر متقابل آن‌ها بر یکدیگر بر ضخامت پوسته در تمامی هفته‌های آزمایش معنی‌دار شده است ($p < 0.05$)، در تیمارهای حاوی منگنز بیشترین ضخامت در طول آزمایش دیده شده است؛ ولی در تمامی تیمارها مقدار عددی ضخامت پوسته، با گذر زمان دچار کاهش شده است به طوری که بیشترین ضخامت پوسته مربوط به تیمار حاوی منگنز در هفته ۳۳ آزمایش ۰/۴۲۲ بوده است.

وزن پوسته: اثر جیره‌های آزمایشی بر صفات کیفی تخم‌های تولیدی در مرغ‌های مادر گوشتی در جداول ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است. اثر اشکال آلی و معدنی روی، مس و منگنز و همچنین اثر متقابل آن‌ها بر یکدیگر بر وزن پوسته در تمام هفته‌های آزمایش معنی‌دار شده است ($p < 0.05$)، به طوری که در هفته ابتدایی آزمایش، بیشترین وزن پوسته مربوط به تیمار حاوی روی آلی می‌باشد که با گذشت زمان، میزان عددی وزن پوسته افزایش پیدا کرده و در هفته ۴۰ آزمایش (جدول ۵)، بیشترین وزن پوسته مربوط به تیمار حاوی روی آلی (۷/۲۸) می‌باشد.

استحکام پوسته: اثر اشکال معدنی، آلی و اثر متقابل روی، مس و منگنز بر استحکام پوسته از ابتدای هفته ۳۳ تا پایان هفته ۴۰ آزمایش معنی‌دار شد ($p < 0.05$) در هفته ۳۳ آزمایش، تیمار حاوی منگنز بیشترین

جدول ۲- بررسی اشکال آلی و معدنی عناصر مس، روی و منگنز بر صفات کیفیت پوسته تخم مرغ‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ در هفته ۳۳.

Table 2. The effect of trace elements (Zn, Cu, and Mn), mineral forms (organic and inorganic), and their interaction on Ross 308 broiler breeder' hen Eggshell quality at 33 weeks

Treatment	Egg shell weight (g)	Shell thickness (mm)	Shell strength (kg/cm ²)
Trace elements			
Zinc	6.36 ^a	0.396 ^b	2.57 ^b
Copper	6.07 ^b	0.385 ^b	2.67 ^b
Manganese	6.05 ^b	0.422 ^a	2.84 ^a
SEM	0.38	0.014	0.05
<i>p</i> .value	0.02	0.03	0.02
Mineral forms			
Inorganic Minerals	5.99 ^b	0.396 ^b	2.57 ^b
Organic Minerals	6.42 ^a	0.416 ^a	2.79 ^a
SEM	0.46	0.016	0.08
<i>p</i> .value	0.02	0.02	0.02
Trace elements × Mineral forms			
Inorganic zinc	6.20 ^b	0.393 ^b	2.62 ^b
Organic zinc	6.50 ^a	0.395 ^b	2.66 ^b
Inorganic copper	6.01 ^b	0.390 ^b	2.64 ^b
Organic copper	6.11 ^b	0.395 ^b	2.65 ^b
Inorganic manganese	6.07 ^b	0.394 ^b	2.65 ^b
Organic manganese	6.12 ^b	0.419 ^a	2.81 ^a
SEM	0.30	0.011	0.04
<i>p</i> .value	0.03	0.03	0.02

بالانویس‌های غیرمشترک در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار ($p < 0.05$)، SEM: خطای استاندارد میانگین، *p*.value: مقدار احتمال

Non common superscripts in each column are indicate the significant statistical difference ($p < 0.05$), SEM: Standard error of the mean, *p*.value: Probability value.

جدول ۳- بررسی اشکال آلی و معدنی عناصر مس، روی و منگنز بر صفات کیفیت پوسته تخم‌مرغ‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ در هفته ۳۷.

Table 3. The effect of trace elements (Zn, Cu, and Mn), mineral forms (organic and inorganic), and their interaction on Ross 308 broiler breeder' hen Eggshell quality at 37 weeks.

Treatment	Egg shell weight (g)	Shell thickness (mm)	Shell strength (kg/cm ²)
Trace elements			
Zinc	6.85 ^a	0.383 ^b	2.09 ^b
Copper	6.51 ^b	0.372 ^b	2.20 ^b
Manganese	6.44 ^b	0.406 ^a	2.38 ^a
SEM	0.40	0.015	0.07
<i>p</i> .value	0.02	0.03	0.02
Mineral forms			
Inorganic Minerals	6.52 ^b	0.380 ^b	2.10 ^b
Organic Minerals	6.82 ^a	0.401 ^a	2.31 ^a
SEM	0.49	0.016	0.06
<i>p</i> .value	0.02	0.02	0.02
Trace elements × Mineral forms			
Inorganic zinc	6.57 ^b	0.378 ^b	2.22 ^b
Organic zinc	6.93 ^a	0.380 ^b	2.23 ^b
Inorganic copper	6.50 ^b	0.376 ^b	2.16 ^b
Organic copper	6.49 ^b	0.378 ^b	2.15 ^b
Inorganic manganese	6.46 ^b	0.379 ^b	2.15 ^b
Organic manganese	6.63 ^b	0.404 ^a	2.40 ^a
SEM	0.33	0.010	0.05
<i>p</i> .value	0.03	0.03	0.02

جدول ۴- بررسی اشکال آلی و معدنی عناصر مس، روی و منگنز بر صفات کیفیت پوسته تخم‌مرغ‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ در هفته ۴۰.

Table 4. The effect of trace elements (Zn, Cu, and Mn), mineral forms (organic and inorganic), and their interaction on Ross 308 broiler breeder' hen Eggshell quality at 40 weeks.

Treatment	Egg shell weight (g)	Shell thickness (mm)	Shell strength (kg/cm ²)
Trace elements			
Zinc	7.25 ^a	0.370 ^b	1.75 ^b
Copper	6.84 ^b	0.359 ^b	1.79 ^b
Manganese	6.75 ^b	0.394 ^a	2.02 ^a
SEM	0.48	0.018	0.07
<i>p</i> .value	0.02	0.03	0.02
Mineral forms			
Inorganic Minerals	6.83 ^b	0.365 ^b	1.79 ^b
Organic Minerals	6.25 ^a	0.389 ^a	1.99 ^a
SEM	0.56	0.016	0.05
<i>p</i> .value	0.02	0.02	0.02
Trace elements × Mineral forms			
Inorganic zinc	6.90 ^b	0.368 ^b	1.89 ^b
Organic zinc	6.28 ^a	0.370 ^b	2.90 ^b
Inorganic copper	6.83 ^b	0.368 ^b	2.93 ^b
Organic copper	6.79 ^b	0.367 ^b	2.92 ^b
Inorganic manganese	6.80 ^b	0.367 ^b	2.91 ^b
Organic manganese	6.93 ^b	0.395 ^a	2.12 ^a
SEM	0.39	0.013	0.04
<i>p</i> .value	0.03	0.03	0.03

بحث

این زمان توقف، در نژادهای مختلف متفاوت است و عوامل تغذیه‌ای نقش کمتری در زمان ماندگاری دارند.

اصلی‌ترین عامل را در تشکیل پوسته‌ی تخم، زمان توقف تخم را در رحم اعلام کردند و نتیجه گرفتند که

همچنین اعلام کردند که علاوه بر مواد معدنی، نوع و میزان پروتئین جیره غذایی نیز بر درصد صفات پوسته مؤثر است (۸). اکثر مواد معدنی کمیاب نقش‌های متفاوتی در تشکیل پوسته تخم و در نتیجه کیفیت پوسته تخم‌مرغ دارند (۱۵) که از میان مکمل‌های معدنی کم‌نیاز، روی، منگنز و مس نقش عمده‌ای بر کیفیت پوسته تخم به‌عنوان کوفاکتورهای آنزیم‌های دخیل در تشکیل غشای تخم و تشکیل پوسته دارند (۱۶). از آنجایی که مرغ‌ها فقط می‌توانند مقدار محدودی از پوسته را رسوب دهند، با افزایش وزن تخم، کیفیت کلی تخم کاهش می‌یابد (۱۷). روی جزء ضروری آنزیم کربنیک‌انهدراز است و این آنزیم مسئول ترشح یون کربنات و در نتیجه مینراله شدن و افزایش وزن پوسته می‌باشد (۱۸) و همچنین با توجه به جذب بالاتر روی آلی و اثر مثبت بر آنزیم کربنیک‌انهدراز، تشکیل ستون‌های کلسیت را افزایش داده و موجب وزن بالاتر پوسته می‌گردد. در مطالعه‌ای بهبود کیفیت پوسته تخم نیز با استفاده از منابع آلی مواد معدنی کم مصرف در مرغ‌های مادر گوشتی (۱۹) و تخم‌گذار (۲۰) گزارش شده است. منگنز موجب فعالیت بهتر آنزیم کربنیک‌انهدراز می‌شود که از طریق پروتئین‌های پوسته، بر ستون‌های کلسیت و نظم و هماهنگی آن‌ها تأثیر مثبت می‌گذارند که منجر به استحکام پوسته می‌شود و حتی منجر به افزایش ارتفاع ستون‌ها و وزن بالاتر خاکستر می‌گردند (۸). از عوامل مؤثر بر کلسیمی شدن پوسته تخم، پروتئین‌هایی مانند اووترانسفرین و اووآلبومین و پروتئوگلیکان‌هایی مانند کراتان سولفات می‌باشند که منگنز در ساخت آن‌ها نقش دارد و از طریق آن‌ها بر روی وزن پوسته اثر می‌گذارد (۲۱). موافق با نتایج آزمایش انجام‌شده، آزمایشی بر روی منابع آلی و غیر آلی عناصر مورد استفاده در جیره انجام شده است که استفاده از منابع آلی، ضخامت پوسته تخم‌مرغ را بهبود بخشید (۸).

گروهی از دانشمندان بیان نمودند که جایگزینی اکسید روی (۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و منگنز (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) با منبع آلی روی و منگنز، باعث بهبود کیفیت پوسته تخم در فاز آخر سیکل تخم‌گذاری در مرغ‌های تخم‌گذار می‌شود (۲۲). برخلاف یافته‌های پژوهش حاضر، گروهی اعلام کردند که مکمل‌های روی، منگنز و مس آلی به جیره غذایی، تأثیری بر ضخامت پوسته تخم نداشته است (۲۳). فلزات معدنی کم مصرف از طریق نقش آن‌ها در آنزیم‌های کلیدی درگیر در ساخت غشاء و پوسته تخم، در استحکام پوسته نقش دارند تا به طور مستقیم در شکل‌گیری کریستال‌های کلسیت نقش داشته باشند (۸). گروهی از دانشمندان دریافتند که مکمل منگنز در رژیم غذایی به فرم ارگانیک، می‌تواند استحکام و کیفیت پوسته تخم را به‌ویژه در شرایط دمایی بالا بهبود بخشد (۲۴)، همچنین گروهی دیگر گزارش دادند استفاده از مکمل منگنز، استحکام تخم را در مرغ‌های مادر گوشتی افزایش می‌دهد (۲۵). در یک مقایسه کلی از تحقیقات انجام شده، استفاده از کیلات‌های آلی نسبت به عناصر معدنی و مخلوط عناصر آلی و معدنی منجر به افزایش مقاومت پوسته شده است (۲۶). گزارش‌ها نشان دادند که تغذیه ترکیب روی و منگنز در مرغ‌های تخم‌گذار سبب استحکام پوسته تخم می‌شوند (۲۷)، موافق این آزمایش، گزارش شده که استفاده از منگنز باعث استحکام پوسته شد ولی درصد پوسته را نسبت به شاهد کاهش داد که دلیل آن را نقش منگنز در سنتز ماتریکس پروتئینی اعلام کرد (۲۸). بعضی از عناصر معدنی کم‌نیاز می‌توانند شکل بلورهای کلسیمی را تحت تأثیر قرار دهند. برای مثال، منگنز در موازی بودن محور رشد بلورها و طویل شدن آن‌ها دخیل می‌باشد، بنابر این منگنز بر بافت بلوری تخم‌مرغ و خواص مکانیکی آن تأثیرگذار است (۲۹). مخالف نتایج حاصل، گزارش شده که استفاده

antioxidant activity, immune system and egg manganese enrichment in the aged laying hens. Vet Med Sci. 2023;9(1):217-225. (In Persian)

5. Aghkhani MH, Baghani M. Engineering properties of Japanese quail eggs in different levels of dietary calcium. J Agric Machin. 2020;10(1):93-102. (In Persian).

6. Summers, J.D. and Leeson, S., 1976. Poultry nutrition handbook.

7. Zhang YN, Zhang HJ, Wu SG, Wang J, Qi GH. Dietary manganese supplementation modulated mechanical and ultrastructural changes during eggshell formation in laying hens. Poult Sci. 2017; 96:2699-2707.

8. Mabe I, Rapp C, Bain MM, Nys Y. Supplementation of a Corn-Soybean Meal Diet with Manganese, Copper, and Zinc from Organic or Inorganic Sources Improves Eggshell Quality in Aged Laying Hens. Poult Sci. 2003;82:1903-1913.

9. Chowdhury SD. Shell membrane protein system in relation to lathrogen toxicity and copper deficiency. World Poult Sci J. 1990; 46:153-169.

10. Watts DL. The nutritional relationships of manganese. J. Orthomol Med. 1990; 5:219-222.

11. Wedekind KJ, Hortin AE, Baker DH. Methodology for assessing zinc bioavailability: Efficacy estimates for zinc-methionine, zinc sulfate, and zinc oxide. J Anim Sci. 1992;70:178-187.

12. Star L, van der Klis JD, Rapp C, Ward TL. Bioavailability of organic and inorganic zinc sources in male broilers. Poult Sci. 2012;91:3115-3120.

13. Moreng RE, Balnave D, Zhang D. Dietary zinc methionine effect on eggshell quality of hens drinking saline water. Poult Sci. 1992;71:1163-1167.

14. Divari N, Kianfar R, Mirghelenj SA, Janmohammadi H. Effects of raw and autoclaved amaranth grain on performance

از ۳۰، ۳۰ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم روی، منگنز و مس به فرم آلی در مرغ‌های تخم‌گذار موجب کاهش استحکام پوسته تخم در ۶۹ تا ۸۲ هفتگی می‌شود (۸).

نتیجه‌گیری

توجه به قابلیت زیست‌فراهمی مس، روی و منگنز در جیره غذایی برای به حداکثر رساندن عملکرد تولیدی و تولیدمثلی مرغ‌های مادر اهمیت دارد. مس، روی و منگنز با ترکیب آلی نسبت به همتایان غیرآلی خود دسترسی زیستی بیشتری دارند؛ بنابراین طیور می‌توانند آن‌ها را به‌طور مؤثری جذب و استفاده کنند. بهبود خصوصیات کیفی پوسته تخم (ضخامت، وزن، استحکام) به طور قابل‌توجهی بر عملکرد تولیدمثلی مرغ‌های مادر گوشتی و کیفیت جوجه‌های تولید شده تأثیر می‌گذارد. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، روی آلی و منگنز آلی موجب بهبود ضخامت، وزن و استحکام تخم مرغ شد؛ بنابراین استفاده از اشکال آلی منگنز، مس و به‌خصوص روی در جیره مرغ‌های مادر گوشتی توصیه می‌شود.

منابع

1. Park SY, Birkhold SG, Kubena LF, Nisbet DJ, Ricke SC. Effects of high zinc diets using zinc propionate on molt induction, organs, and postmolt egg production and quality in laying hens. Poult Sci. 2004;83:24-33.
2. Richards JD, Zhao J, Harrell RJ, Atwell CA, Dibner JJ. Trace mineral nutrition in poultry and swine. Asian-Australas J Anim Sci. 2010;23(11):1527-1534.
3. Lopes M, Paroul N, Barbosa J, Valduga E, Cansian RL, Toniazzi G, Oliveira D. Effect of partial and total replacement of inorganic by organic microminerals sources on the quality of broiler carcasses. Braz Arch Biol Technol. 2017;60:e17160082.
4. Khoshbin MR, Vakili R, Tahmasbi AM. Manganese-methionine chelate improves

- laying hens on eggshell and bones quality. *Vet Med-Czech*. 2008;53(10):555-563.
23. Maciel MP, Saraiva EP, Aguiar EF, Ribeiro PAP, Passos DP, Silva JB. Effect of using organic microminerals on performance and external quality of eggs of commercial laying hens at the end of laying. *Rev Bras Zootec*. 2010;39:344-348.
24. Zhu YW, Xie JJ, Li WX, Lu L, Zhang LY, Ji C, et al. Effects of environmental temperature and dietary manganese on egg production performance, egg quality, and some plasma biochemical traits of broiler breeders. *J Anim Sci*. 2015;93(7):3431-40.
25. Xie J, Tian C, Zhu Y, Zhang L, Lu L, Luo X. Effects of inorganic and organic manganese supplementation on gonadotropin-releasing hormone-I and follicle-stimulating hormone expression and reproductive performance of broiler breeder hens. *Poult Sci*. 2014;93(4):959-969.
26. Fakler T, Ward TL, Kuhl HJ. Zinc amino acid complexes improve layer production and egg quality. *Poult Sci*. 2002;81:120.
27. Swiatkiewicz S, Koreleski J, Arczewska A. Laying performance and eggshell quality in laying hens fed diets supplemented with prebiotics and organic acids. *Czech J Anim Sci*. 2010;7:294-304.
28. NRC. Nutrient requirements of poultry. 9th revised edition, National Academy Press, Washington, D.C., 1994.
29. Xiao JF, Wu SG, Zhang HJ, Yue HY, Wang J, Ji F, et al. Bioefficacy comparison of organic manganese with inorganic manganese for eggshell quality in Hy-Line Brown laying hens. *Poult Sci*. 2015; 94(8):1871-1878.
- and egg quality of layer hens. *Res Anim Prod*. 2020;11(28):32-40. (In Persian).
15. Mayer AN, Vieira SL, Berwanger E, Angel CR, Kindlein L, França I, Noetzold TL. Zinc requirements of broiler breeder hens. *Poult Sci*. 2019;98(3):1288-1301.
16. Noetzold TL, Vieira SL, Favero A, Horn RM, Silva CM, Martins GB. Manganese requirements of broiler breeder hens. *Poult Sci*. 2020;99(11):5814-5826.
17. Tůmová E, Gous RM. Interaction of hen production type, age, and temperature on laying pattern and egg quality. *Poult Sci*. 2012;91(5):1269-1275.
18. Gheisari AA, Sanei A, Samie A, Gheisari MM, Toghyani M. Effect of diets supplemented with different levels of manganese, zinc, and copper from their organic or inorganic sources on egg production and quality characteristics in laying hens. *Biol Trace Elem Res*. 2011;3:557-571. (In Persian)
19. Araújo CSS, Hermes RG, Bittencourt LC, Silva CC, Araújo LF, Granghelli CA, et al. Different dietary trace mineral sources for broiler breeders and their progenies. *Poult Sci*. 2019;98(10):4716-4721
20. Qiu JL, Zhou Q, Zhu JM, Lu XT, Liu B, Yu DY, et al. Organic trace minerals improve eggshell quality by improving the eggshell ultrastructure of laying hens during the late laying period. *Poult Sci*. 2020; 99(3):1483-1490.
21. Zhang YN, Wang J, Zhang HJ, Wu SG, Qi GH. Effect of dietary supplementation of organic or inorganic manganese on eggshell quality, ultrastructure, and components in laying hens. *Poult Sci*. 2017;96(7):2184-2193.
22. Swiatkiewicz S, Koreleski J. The effect of zinc and manganese source in the diet for

Research Article**The Pattern of Bioaccumulation of Heavy Metals Mercury, Zinc and Nickel in the Soft Tissues of the Blue Swimming Crab (*Portunus segnis*) in Makoran Coasts****Samaneh Ebrahimi, Mohammad Mansour Tootooni, Mehran Loghmani***

Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

*Corresponding author: loghmani.mehran@gmail.com

Received: 19 November 2024

Accepted: 14 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1190962

Abstract

The aim of the present study, considering the increasing level of heavy metal pollution and their impact on the environment, was to evaluate the bioaccumulation of heavy metals mercury, zinc and nickel in soft tissues (muscle and hepatopancreas) of the blue swimming crab (*Portunus segnis*) on the coasts of Makoran (Bris, Pesem and Tis). 18 crab samples and 9 surface sediment samples were collected in the winter of 2019 and the concentrations of mercury, zinc and nickel in the hepatopancreas and muscle tissues of the crab and sediments of the sampling areas were measured by atomic absorption spectrometry. In all three stations, the concentration of zinc in the hepatopancreas was higher than in the muscle and there was a statistically significant difference between all stations ($p < 0.05$). The overall average accumulation of mercury, zinc and nickel metals in mg/kg in hepatopancreas was 0.85 ± 0.7 , 240.81 ± 101.41 and 69.24 ± 33.58 in muscle 0.37 ± 0.04 , 78.45 ± 14.02 and 33.01 ± 9.12 and in sediment 0.96 ± 0.6 , 26.4 ± 14.45 and 21.49 ± 6.21 . The pattern of heavy metal accumulation in tissue and sediment was obtained as mercury < nickel < zinc. Comparison of metal concentrations in the muscle of the blue-swimming crab of the study area with international standards (UK MAFF, FDA, NHMRC, WHO and FAO) showed that the mercury concentration was lower than the NHMRC standard and close to other standards, the zinc concentration was higher than the permissible limit compared to only some standards, and the nickel concentration was lower than the permissible limit announced by the FDA. Therefore, the consumption of the studied crab meat in terms of mercury and especially zinc may be harmful to health. Comparison of the average concentration of heavy metals in sediments sampled from the stations with sediment quality standards showed low concentrations of zinc, nickel and mercury.

Keywords: Heavy metals, Blue-swimming crab, Makoran coasts, Hepatopancreas.

مقاله پژوهشی

الگوی تجمع زیستی فلزات سنگین جیوه، روی و نیکل در بافت‌های نرم خرچنگ شناگر آبی
(*Portunus segnis*) در سواحل مکران

سمانه ابراهیمی، محمد منصور توتونی، مهران لقمانی*

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

*مسئول مکاتبات: loghmani.mehran@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۹

DOI: 10.60833/ascij.2025.1190962

چکیده

با توجه به افزایش میزان آلودگی فلزات سنگین و تأثیر آن‌ها بر محیط زیست، هدف مطالعه حاضر ارزیابی تجمع زیستی فلزات سنگین جیوه، روی و نیکل در بافت‌های نرم (عضله و هپاتوپانکراس) خرچنگ شناگر آبی (*Portunus segnis*) در سواحل مکران (بریس، پزم و تیس) بود. هجده نمونه خرچنگ و ۹ نمونه رسوب سطحی در زمستان ۱۳۹۹ جمع‌آوری و غلظت فلزات جیوه، روی و نیکل در بافت‌های هپاتوپانکراس و عضله خرچنگ و رسوبات مناطق نمونه‌برداری توسط دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد. در هر سه ایستگاه، غلظت فلز روی در هپاتوپانکراس بیش از عضله بود و اختلاف آماری معنی‌داری بین تمام ایستگاه‌ها وجود داشت ($p < 0/05$). میانگین کلی تجمع فلزات جیوه، روی و نیکل بر حسب میلی‌گرم/کیلوگرم در هپاتوپانکراس به ترتیب، $0/7 \pm 0/85$ ، $101/41 \pm 240/81$ و $33/58 \pm 69/24$ ؛ در عضله $0/04 \pm 0/37$ ، $14/02 \pm 78/45$ و $9/12 \pm 33/01$ و در رسوب $0/6 \pm 0/96$ ، $14/45 \pm 26/4$ و $6/21 \pm 21/49$ بود. الگوی تجمع فلزات سنگین در بافت و رسوب به صورت جیوه > نیکل > روی به دست آمد. مقایسه غلظت فلزات در عضله خرچنگ شناگر آبی منطقه مورد مطالعه با استانداردهای بین‌المللی (FAO و WHO، NHMRC، FDA، UK MAFF) نشان داد که غلظت جیوه، پایین‌تر از استاندارد NHMRC و نزدیک به سایر استانداردها، غلظت روی در مقایسه با فقط بعضی از استانداردها بالاتر از حد مجاز بوده و غلظت نیکل نیز کمتر از حد مجاز اعلام شده توسط FDA بود. بنابراین، مصرف گوشت خرچنگ مورد مطالعه از نظر جیوه و به ویژه، روی ممکن است برای سلامتی مضر باشد. مقایسه میانگین غلظت فلزات سنگین در رسوبات نمونه‌برداری شده از ایستگاه‌ها با استانداردهای کیفیت رسوب، نشان از پایین بودن غلظت روی و نیکل و جیوه داشت.

کلمات کلیدی: فلزات سنگین، خرچنگ شناگر آبی، سواحل مکران، هپاتوپانکراس.

مقدمه

می‌باشد. باتوجه به افزایش فعالیت‌های تجاری و صنعتی در دهه اخیر، انتظار می‌رود که این فعالیت‌ها بر تجمع آلودگی انسانی در رسوبات ساحلی و دریایی تأثیر بگذارد (۱). آلاینده‌های ره‌اشده از صنایع به‌صورت محلول در آب بوده و روی بستر ته‌نشین و

دریای عمان مسیر حمل‌ونقل محموله‌های نفتی است و در خط ساحلی مکران، در استان سیستان و بلوچستان و در جنوب شرقی ایران خلیج و بندر آزاد چابهار واقع شده‌اند. اهمیت ویژه خلیج چابهار به دلیل شکل امگایی و گردش محدود آب در آن

سپس، توسط موجودات زنده جذب می‌شوند (۲). آلودگی به فلزات نادر یک مشکل جهانی برای اکوسیستم آبی است و به دلیل سمیت، عدم تجزیه و بزرگ‌نمایی زیستی در زنجیره غذایی، نوعی تهدید زیست‌محیطی جدی نیز برای موجودات آبی محسوب می‌شود. مناطق ساحلی به‌عنوان پرورشگاه دوره نوزادی برای بسیاری از موجودات زنده عمل می‌کند و به‌این‌ترتیب، این آلودگی می‌تواند اکوسیستم و تولیدات شیلات را تحت‌تأثیر قرار دهد (۳). موجودات کف‌زی جزء جدایی‌ناپذیر جوامع و عناصر حیاتی زنجیره غذایی‌اند که نسبت به تغییرات زیست‌بوم بسیار حساس هستند. رسوبات، سطوح بالایی از فلزات سنگین را در خود انباشته می‌کنند و موجودات کف‌زی تمایل به تجمع فلزات در بافت‌های بدن خود دارند؛ بنابراین، کف‌زیان بیش از موجودات شناور در معرض فلزات سنگین هستند. خرچنگ‌ها پتانسیل بالایی در جمع‌آوری فلزات از محیط دارند؛ بنابراین، می‌توان آن‌ها را به‌عنوان شاخصی برای پایش غلظت این عناصر و تأثیر بر محیط آبی، به کار برد (۴). در این تحقیق، اندام‌هایی مثل هپاتوپانکراس و عضله خرچنگ برای آنالیز فلزات سنگین به دلیل نقش مهم آن‌ها در پردازش انواع فرایندهای سازگاری زیستی، انتخاب شدند (۵). هپاتوپانکراس سطوح بالایی از متالوتیونین را سنتز می‌کند که با نقش آن به‌عنوان یک بافت مهم مرتبط با سم‌زدایی فلزات سنگین سازگار است. مطالعات متعدد نشان داده است که هپاتوپانکراس در تجمع فلزات مختلف در ده‌پایان نقش دارد (۶). از سوی دیگر، بافت منحصربه‌فرد ماهیچه‌ای، به دلیل کیفیت مطلوب و طعم و مزه خاص، یک ماده باارزش غذایی بوده و در بیشتر مناطق دنیا گوشت خرچنگ جایگاه ویژه‌ای در بین غذاهای دریایی رستوران‌ها دارد (۷). *Portunus segnis* یا خرچنگ شناگری، یکی از

گونه‌های مهم تجاری است که در گستره وسیعی از مناطق ساحلی و فلات قاره از جمله شنی، گلی، زیستگاه‌های علف دریایی از منطقه جزرومدی تا عمق ۵۰ متر حضور دارد. این گونه، اغلب گوشت‌خوار و کف‌زی است و به طور عمده، از نرم‌تنان چسبنده و دیگر بی‌مهرگان تغذیه می‌کند. در سال ۲۰۱۳ میزان صید جهانی این خرچنگ ۲۰۰،۰۰۰ تن بوده است. به دلیل ارزش غذایی و اقتصادی آن، سنجش غلظت فلزات سنگین در بافت عضلانی خرچنگ شناگر آبی بسیار مهم است (۴). هدف از این مطالعه بررسی غلظت فلزات سنگین جیوه، روی و نیکل در بافت‌های نرم خرچنگ *P. segnis* از سواحل مکران (بریس، پزم و تیس) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور مطالعه و بررسی غلظت فلزات سنگین در خرچنگ شناگر آبی (*Portunus segnis*) نمونه‌برداری از سواحل بریس، پزم و تیس در امتداد سواحل شمالی مکران (سال ۱۳۹۹) انجام شد. موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌ها با استفاده از دستگاه GPS مدل GPSMAP 64S ثبت گردید (شکل ۱). سپس، تمام نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به تفکیک ایستگاه درون جعبه‌های حاوی پودر یخ به مجتمع آزمایشگاهی منتقل شدند. رسوبات سطحی نیز با استفاده از ظروف لوله‌ای فالکون در سه تکرار از هر ایستگاه جمع‌آوری و درون پلاستیک‌های پلی‌اتیلنی در جعبه‌های حاوی پودر یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در آزمایشگاه قبل از شروع کار، ابتدا تمام وسایل و ظروف مورد نیاز شیشه‌ای و پلاستیکی به‌دقت با آب گرم و اسید نیتریک ۱۰ درصد یا اسیدکلریدریک و در نهایت، با آب دیونیزه شستشو شدند و به مدت ۲۴ ساعت در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردیدند. سپس، خرچنگ‌های هر ایستگاه نیز به طور جداگانه با آب

نمونه‌های حاصل از هضم شیمیایی توسط دستگاه طیف‌سنج جذب اتمی مدل Spect Varian AA220 استفاده شد.

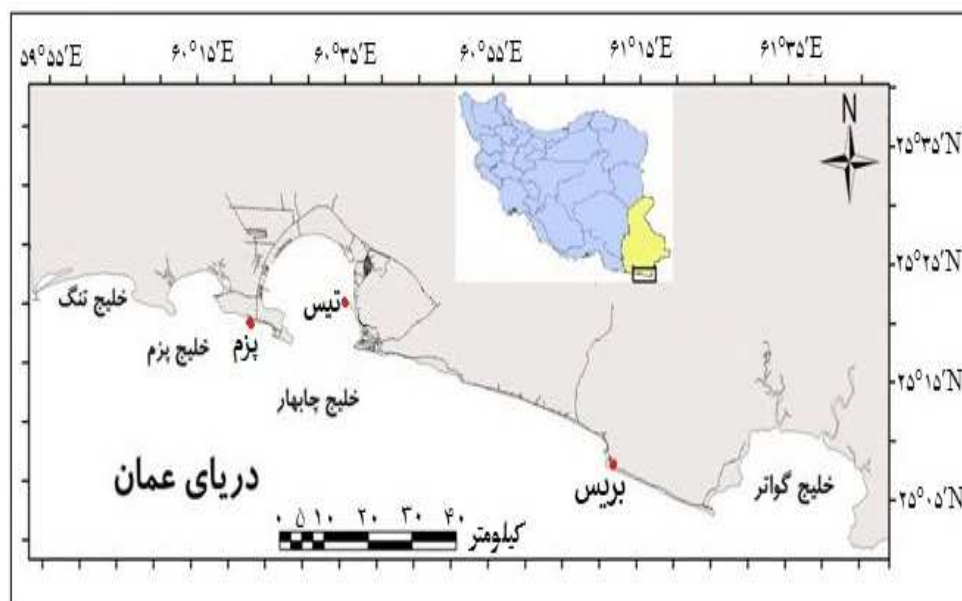
سنجش فلزات سنگین در رسوب: جهت تعیین غلظت فلزات جیوه، روی و نیکل، نمونه‌های رسوب در دمای محیط خشک گردید و با الک ۶۳ میکرون الک شد. سپس، ۱ گرم از رسوب الک شده را وزن کرده و به داخل ظرف پلی‌اتیلن ریخته و مخلوطی از سه اسید شامل اسید نیتریک، اسیدفلوئوریدریک و اسیدکلریدریک به مقدار ۸، ۲ و ۴ میلی‌لیتر به آن اضافه و روی هیتز به مدت یک ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و ۳ ساعت در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا عمل هضم انجام شود. سپس، نمونه‌های هضم شده از فیلتر واتمن شماره ۴۲ عبور داده و در نهایت، با آب یون‌زدایی شده به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. برای اندازه‌گیری غلظت فلزات سنگین از دستگاه اسپکتروفتومتری جذب اتمی با روش طیف‌سنجی جذب اتمی بدون غنی‌سازی استفاده و غلظت فلزات سنگین بر حسب میکروگرم/گرم وزن خشک محاسبه شد (۱۰).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد و بعد از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون کولموگرواف - اسمیرنوف، برای بررسی اختلاف آماری معنی‌دار تجمع فلزات سنگین بین دو بافت از آزمون t-test و جهت بررسی اختلاف آماری هر کدام از فلزات سنگین بین سه ایستگاه، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و در صورت وجود اختلاف آماری معنی‌دار، جهت بررسی دقیق‌تر معنی‌داری بین ایستگاه‌ها، از پس‌آزمون توکی استفاده شد. جهت بررسی همبستگی بین غلظت فلزات سنگین در بافت و رسوب، آزمون همبستگی پیرسون و در رسم نمودارها، نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ (Excel, 2013) مورد استفاده قرار گرفت.

دیونیزه و به طور کامل شستشو شدند (۸). پس از گذشت زمان کافی برای خروج آب اضافه، تمامی نمونه‌ها کدگذاری و سپس، بیومتری آن‌ها انجام شد. طول و عرض کاراپاس نمونه‌ها توسط کولیس با دقت ۰/۰۱ میلیمتر و وزن کل آن‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال AMD، EK-610i با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری (۹) و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به مرحله آنالیز و هضم شیمیایی نگهداری شدند. به‌منظور هضم شیمیایی نمونه‌ها، ابتدا بافت نرم (عضله و هپاتوپانکراس) را جدا کرده (۸) و تا زمان انجام آزمایش، جهت اندازه‌گیری غلظت فلزات سنگین در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (۹).

سنجش فلزات سنگین: جهت هضم شیمیایی نمونه‌ها ابتدا بافت نرم (عضله و هپاتوپانکراس) خردچنگ جهت خشک‌کردن درون شیشه‌های ساعت در داخل آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. سپس، نمونه‌های خشک شده درون هاون چینی جهت هموژن کردن پودر گردیدند تا برای هضم شیمیایی آماده شوند جهت انجام هضم شیمیایی نمونه‌ها، به یک گرم نمونه پودر شده ۶ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ (۶۵ درصد) اضافه شد. پس از صرف زمان حداقل ۳ ساعت، جهت انجام عمل هضم مقدماتی در دمای اتاق، برای هضم کامل نمونه‌ها از پلیت داغ در دمای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت استفاده شد.

پس از اتمام عمل هضم، نمونه‌ها در معرض گرما قرار گرفت و قبل از این‌که به طور کامل خشک شوند از روی پلیت داغ برداشته شدند. نمونه‌ها با اسید نیتریک ۰/۰۴ رقیق شدند، سپس توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲ میکرون صاف گردیده و پس از انتقال به بالن‌های حجم‌سنجی ۲۵ میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم رسانده شدند (۹). جهت اندازه‌گیری فلزات در



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های نمونه‌برداری خرچنگ شناگر آبی
Fig. 1. Geographical location of blue swimming crab sampling stations

نتایج

داد که این فلز بین سه ایستگاه دارای اختلاف آماری معنی‌دار بوده است. پس‌آزمون توکی برای فلز جیوه نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین هر سه ایستگاه بود و در بافت هیپاتوپانکراس نیز بین ایستگاه‌های نمونه‌برداری اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشته است ($p < 0/05$).

تجمع زیستی روی در بافت عضله و هیپاتوپانکراس خرچنگ: نتایج بررسی نشان داد که فلز روی در هر سه ایستگاه، در بافت هیپاتوپانکراس دارای بیشترین و در بافت عضله دارای کمترین غلظت است. نتایج میانگین کل غلظت روی در بافت عضله و هیپاتوپانکراس بین سه ایستگاه به‌ترتیب، $14/02 \pm$ و $78/45$ و $101/41 \pm$ میلی‌گرم/کیلوگرم به دست آمد (جدول ۳). آزمون آماری بین دو بافت عضله و هیپاتوپانکراس در هر ایستگاه دارای اختلاف معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$)، همچنین طبق نتایج برای غلظت روی در بافت عضله عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار را بین ایستگاه‌های مورد مطالعه نشان

زیست‌سنجی خرچنگ شناگر آبی: نتایج حاصل از زیست‌سنجی طول و عرض کاراپاس و وزن نمونه‌های خرچنگ در ایستگاه‌های مختلف به تفکیک جنسیت در جدول ۱ ارائه شده است. اختلاف معنی‌داری میان ایستگاه‌های در مقایسه پارامترهای مورد سنجش مشاهده نگردید ($p > 0/05$).

تجمع زیستی جیوه در بافت عضله و هیپاتوپانکراس: طبق نتایج (جدول ۲ و شکل ۱) هر سه ایستگاه در بافت هیپاتوپانکراس غلظت جیوه نسبت به بافت عضله بالاتر بوده است و میانگین کل غلظت جیوه بین سه ایستگاه در عضله، $0/37 \pm 0/04$ میلی‌گرم/کیلوگرم و در هیپاتوپانکراس، $0/85 \pm 0/7$ میلی‌گرم/کیلوگرم بدست آمد. نتایج آزمون نشان داد که فلز جیوه بین بافت عضله و هیپاتوپانکراس در دو ایستگاه تیس و بریس فاقد اختلاف آماری معنی‌دار بود ($p > 0/05$). اما، در ایستگاه پزم بین دو بافت اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده شد ($p < 0/05$). نتایج آزمون ANOVA برای فلز جیوه در بافت عضله نشان

داد ($p > 0/05$). نتایج آزمون برای غلظت روی در بافت هیپاتوپانکراس نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بوده است (شکل ۲).

تجمع زیستی نیکل در بافت عضله و هیپاتوپانکراس:
بر اساس نتایج بیشترین و کمترین غلظت نیکل در هر یک از ایستگاه‌ها به ترتیب، در بافت هیپاتوپانکراس و عضله مشاهده شد. میانگین کل غلظت فلز نیکل بین سه ایستگاه در بافت عضله و هیپاتوپانکراس به ترتیب $9/12 \pm 33/01$ و $69/24 \pm 33/58$ میلی‌گرم/کیلوگرم مشاهده شد (جدول ۴). نتایج آزمون t-test نشان داد که دارای اختلاف آماری معنی‌دار در هر سه ایستگاه بین دو بافت می‌باشد ($p < 0/05$). آزمون آنالیز واریانس برای غلظت نیکل در بافت عضله نشان دهنده وجود اختلاف آماری بین ایستگاه‌های تیس و پزم معنی‌دار بود به علاوه، در بافت هیپاتوپانکراس بین ایستگاه‌های نمونه‌برداری نیز اختلاف آماری معنی‌دار بدست آمد (شکل ۳).

غلظت فلزات سنگین در رسوبات مناطق مورد مطالعه: نتایج میانگین غلظت فلزات سنگین نشان داد که برای فلز جیوه بیشترین غلظت در ایستگاه پزم $1/46 \pm 0/88$ میلی‌گرم/کیلوگرم و کمترین در ایستگاه

بریس $0/25 \pm 0/63$ میلی‌گرم/کیلوگرم است و بیشترین غلظت فلز روی در رسوبات برای ایستگاه بریس $18/31 \pm 41/25$ میلی‌گرم/کیلوگرم و کمترین غلظت برای ایستگاه تیس $1/52 \pm 18/74$ میلی‌گرم/کیلوگرم ثبت شد همچنین تجمع زیستی فلز نیکل در ایستگاه بریس $1/87 \pm 27/81$ میلی‌گرم/کیلوگرم دارای بیشترین و در ایستگاه پزم کمترین غلظت $3/85 \pm 14/45$ میلی‌گرم/کیلوگرم را داشته است (شکل ۴). آزمون آنها نشان داد که غلظت جیوه بین سه ایستگاه فاقد اختلاف آماری معنی‌دار است ($p > 0/05$) ولی برای فلز نیکل فقط بین ایستگاه پزم با ایستگاه تیس و بریس و برای فلز روی بین ایستگاه بریس با دو ایستگاه تیس و پزم عدم اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید.

همبستگی بین غلظت فلزات در بافت‌ها و رسوب:
به‌طور کلی بر اساس آزمون همبستگی پیرسون بین غلظت فلزات در رسوبات و میزان تجمع آنها در دو بافت عضله و هیپاتوپانکراس خرچنگ شناگر آبی همبستگی معنی‌داری را نشان نداد؛ ولی در برخی همبستگی بین دو فلز در رسوب معنی‌دار به دست آمد که به تفکیک در جدول ۵ نشان داده شده است.

جدول ۱- میانگین $\pm$ انحراف معیار فاکتورهای زیست‌سنجی خرچنگ در ایستگاه‌های نمونه‌برداری

Table 1. Mean $\pm$ standard deviation of biometric factors of the crab at the sampling stations

	Beris	Pozm	Tis
Carapace Length (mm)	66.32 $\pm$ 12.36	65.32 $\pm$ 12.67	67.17 $\pm$ 9.87
Carapace Width (mm)	105.45 $\pm$ 23.22	116.33 $\pm$ 23.17	113.21 $\pm$ 18.13
Weight (g)	Male	213.41 $\pm$ 65.11	185.59 $\pm$ 55.87
	Female	119.13 $\pm$ 17.14	182.65 $\pm$ 77.83

جدول ۲- مقایسه میانگین $\pm$ انحراف معیار غلظت جیوه (میلی‌گرم/کیلوگرم) در بافت‌های مورد بررسی

Table 3. Mean $\pm$ standard deviation of mercury concentration (mg/kg) in the analyzed tissues

	Beris	Pozm	Tis	Total Mean
Muscle	0.71 $\pm$ 0.45 ^a	0.055 $\pm$ 0 ^a	0.34 $\pm$ 0.08 ^a	0.37 $\pm$ 0.04
Hepatopancreas	1.24 $\pm$ 0.73 ^a	0.73 $\pm$ 0.66 ^b	0.57 $\pm$ 0.05 ^a	0.85 $\pm$ 0.7

جدول ۳- میانگین $\pm$ انحراف معیار غلظت روی (میلی‌گرم/کیلوگرم) در بافت‌های مورد بررسی

Table 3. Mean $\pm$ standard deviation of zinc concentration (mg/kg) in the analyzed tissues

	Beris	Pozm	Tis	Total Mean
Muscle	77.83 $\pm$ 10.09 ^b	70.27 $\pm$ 16.58 ^b	87.25 $\pm$ 7.93 ^b	78.45 $\pm$ 14.02
Hepatopancreas	240.21 $\pm$ 125.13 ^b	217.07 $\pm$ 74.07 ^a	265.15 $\pm$ 106.48 ^b	240.81 $\pm$ 101.41

جدول ۴- میانگین $\pm$ انحراف معیار غلظت نیکل (میلی‌گرم/کیلوگرم) در بافت‌های مورد بررسی

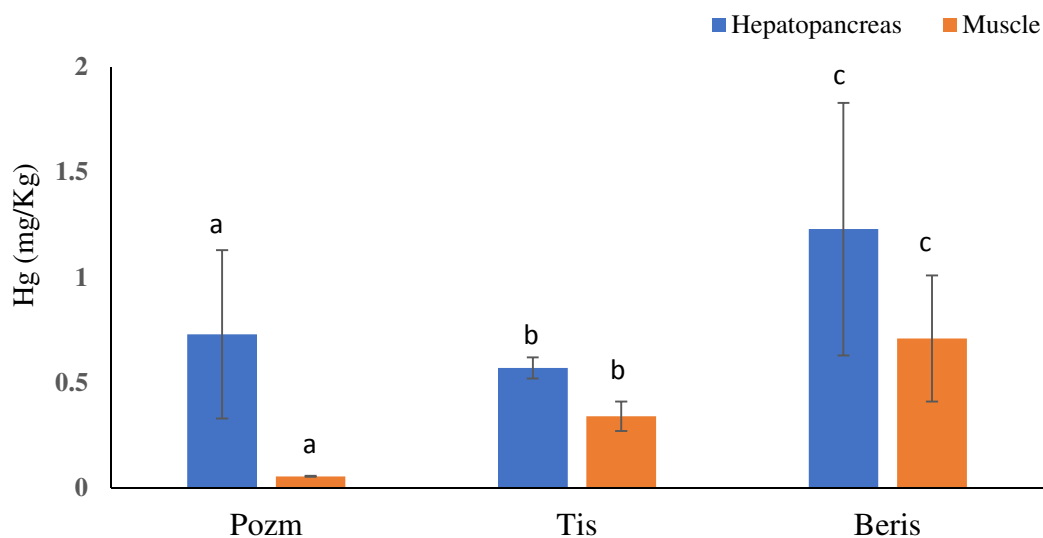
Table 3. Mean $\pm$ standard deviation of Nikel concentration (mg/kg) in the analyzed tissues

	Beris	Pozm	Tis	Total Mean
Muscle	23.81 $\pm$ 2.92 ^a	37.23 $\pm$ 9.95 ^a	37.98 $\pm$ 4.78 ^a	33.01 $\pm$ 9.12
Hepatopancreas	55.76 $\pm$ 13.75 ^b	64.58 $\pm$ 21.98 ^b	87.38 $\pm$ 49.26 ^b	69.24 $\pm$ 33.58

جدول ۵- مقایسه همبستگی بین غلظت فلزات در بافت‌ها و رسوب

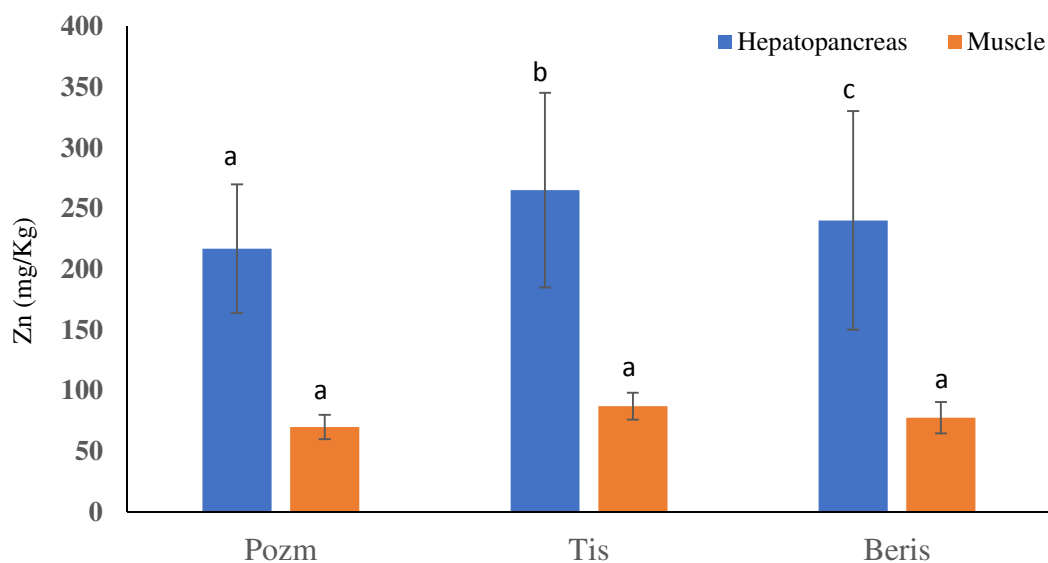
Table 5. Correlation comparison between metal concentrations in tissues and sediment

		Hg Hepatopancreas	Zinc Hepatopancreas	Nickel Hepatopancreas	Hg Muscle	Zinc Muscle	Nickel Muscle	Hg Sediment	Zinc Sediment
Mercury Hepatopancreas	Correlation								
	Significance								
Zinc Hepatopancreas	Correlation	0.223							
	Significance	0.375							
Nickel Hepatopancreas	Correlation	0.226	0.602						
	Significance	0.368	0.008						
Mercury Muscle	Correlation	0.286	0.247	0.025					
	Significance	0.250	0.324	0.920					
Zinc Muscle	Correlation	0.107	0.258	0.264	0.268				
	Significance	0.672	0.302	0.290	0.282				
Nickel Muscle	Correlation	-0.049	0.100	0.392	-0.438	0.406			
	Significance	0.846	0.694	0.107	0.069	0.095			
Mercury Sediment	Correlation	0.095	-0.022	-0.140	0.000	-0.235	-0.092		
	Significance	0.807	0.955	0.720	1.000	0.543	0.814		
Zinc Sediment	Correlation	-0.106	0.077	-0.064	0.182	-0.075	-0.674	-0.246	
	Significance	0.785	0.845	0.870	0.639	0.847	0.046	0.523	
Nickel Sediment	Correlation	-0.131	0.503	0.631	0.201	0.308	-0.220	-0.484	0.655
	Significance	0.736	0.168	0.069	0.604	0.421	0.570	0.187	0.045



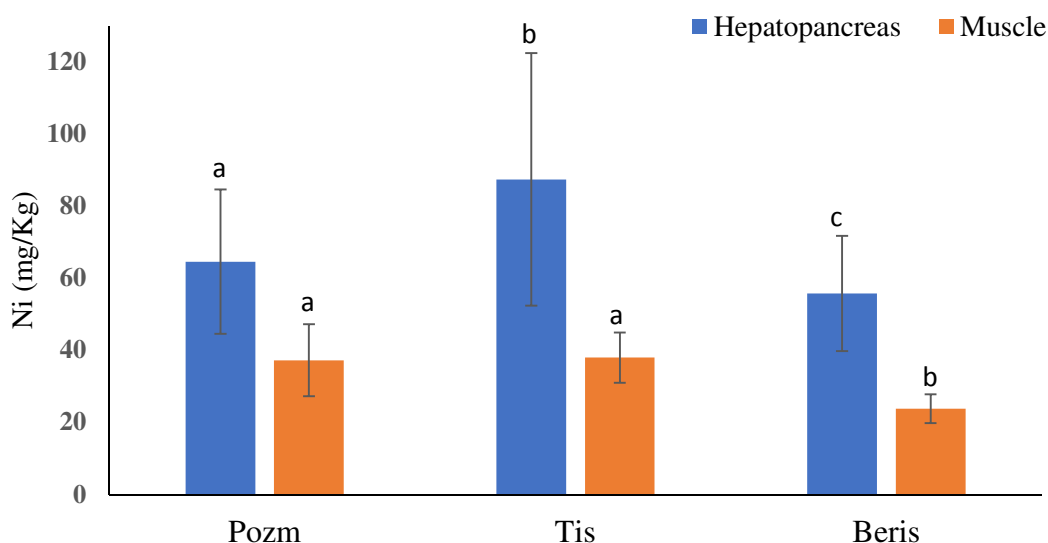
شکل ۱- مقایسه میانگین غلظت جیوه در بافت عضله و هپاتوپانکراس بین ایستگاه‌های نمونه‌برداری. حروف ناهمنام نشان‌دهنده معنی‌دار بودن و حروف همسان نشان‌دهنده عدم معنی‌داری اختلاف آماری است.

Fig. 1. Comparison of mean mercury concentration in muscle and hepatopancreas tissues across sampling stations. Different letters indicate statistically significant differences, while identical letters indicate no significant difference.



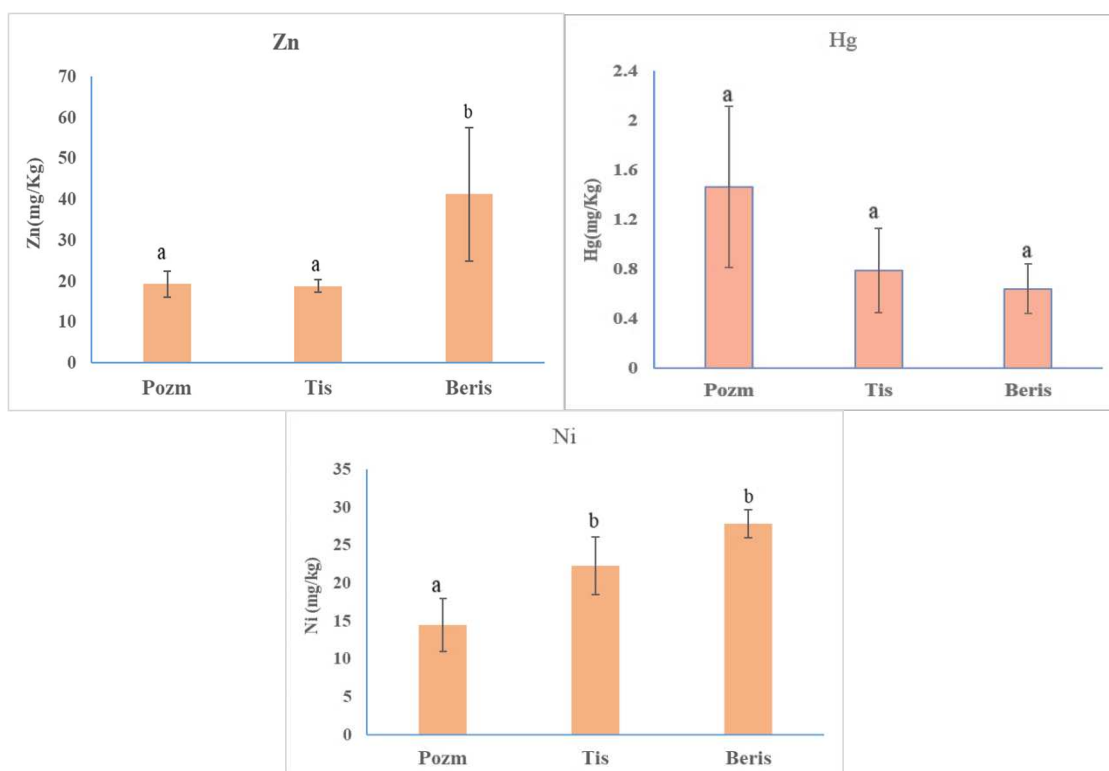
شکل ۲- مقایسه غلظت روی در بافت عضله و هپاتوپانکراس بین ایستگاه‌های نمونه‌برداری. حروف ناهمنام نشان‌دهنده معنی‌دار بودن و حروف همسان نشان‌دهنده عدم معنی‌داری اختلاف آماری است.

Fig. 2. Comparison of zinc concentration in muscle and hepatopancreas tissues across sampling stations. Different letters indicate statistically significant differences, while identical letters indicate no significant difference.



شکل ۳- مقایسه غلظت نیکل در بافت عضله و هپاتوپانکراس بین ایستگاه‌های نمونه‌برداری. حروف ناهمنام نشان‌دهنده معنی‌دار بودن و حروف همسان نشان‌دهنده عدم معنی‌داری اختلاف آماری است.

Fig. 3. Comparison of nickel concentration in muscle and hepatopancreas tissues across sampling stations. Different letters indicate statistically significant differences, while identical letters indicate no significant difference.



شکل ۴- مقایسه میانگین غلظت فلزات سنگین نیکل، روی و جیوه در رسوبات ایستگاه‌های نمونه‌برداری. حروف ناهمنام نشان‌دهنده معنی‌دار بودن و حروف همسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌داری است.

Fig. 4. Comparison of mean concentrations of the heavy metals nickel, zinc, and mercury in sediments from the sampling stations. Different letters denote statistically significant differences, while identical letters denote no significant differences.

بحث

در اکوسیستم آبی، ماهی و دیگر گونه‌های آبی خوراکی به دلیل محتوای پروتئین غنی خود، به‌خوبی شناخته شده‌اند و به طور گسترده به‌عنوان گزینه غذایی با کیفیت شناخته می‌شوند. در میان گونه‌های آبی خوراکی، سخت‌پوستانی مانند میگو، خرچنگ، لابستر و کریل مورد توجه هستند. در بازار داخلی و بین‌المللی، بی‌مهرگان دارای بدن بندبند از نظر تجاری اهمیت و قیمت بالا هستند (۷). در این میان، آلودگی غذا به فلزات، به دلیل تجمع زیستی و آثار آن بر چرخه‌های بیو ژئوشیمیایی یکی از مهم‌ترین نگرانی‌ها می‌باشد (۱۱). بر اساس نتایج، غلظت فلزات سنگین در بافت و ایستگاه‌های مختلف خرچنگ شناگر آبی با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشته است. به‌طوری‌که، غلظت تمامی فلزات جیوه، روی و نیکل در هر سه ایستگاه، در هپاتوپانکراس بیشتر از عضله بوده است. به‌علاوه، الگوی تجمع فلزات سنگین در خرچنگ شناگر آبی در هر سه ایستگاه مورد بررسی به‌صورت جیوه > نیکل > روی بود. در مقایسه با سایر فلزات، غلظت روی در بافت هپاتوپانکراس بیشتر بود که به نظر می‌رسد به دلیل غلظت بالای این فلز در محیط و به‌خصوص، رسوب بوده است. از سوی دیگر، می‌توان استدلال کرد که فراهمی زیستی بیشتر روی نسبت به سایر فلزات به دلایلی مانند فعالیت باکتریایی یا حجم بالاتر ورودی به محیط است. به‌علاوه، فلز روی به‌عنوان یک کوفاکتور در تعداد زیادی از آنزیم‌ها و پروتئین‌های احیاکننده مانند DNA و RNA پلی استراز، کربنیک انیدراز یا آلکالین فسفاتاز عمل می‌کند (۱۲). بررسی غلظت فلزات سنگین در رسوبات هر ایستگاه نشان داد که فلز روی در ایستگاه بریس دارای بیشترین غلظت بوده است. فلز روی و نیکل بین تمامی ایستگاه‌ها دارای اختلاف معنی‌دار و فلز جیوه بین تمامی ایستگاه‌ها فاقد اختلاف معنی‌دار بود. به

علاوه، بافت هپاتوپانکراس نسبت به عضله، در هر سه ایستگاه دارای جیوه بیشتری بود. غلظت جیوه در هپاتوپانکراس خرچنگ *P. segnis* خلیج فارس در مطالعه Ghaeni و همکاران (۲۰۱۵) نیز، بیش از مطالعه حاضر بود (۱۳). Kazemzadeh Khoei و Abdi Bastami (۲۰۱۳)، به بررسی غلظت جیوه در بافت‌های خرچنگ شناگر آبی (*P. pelagicus*) جزیره خارک پرداختند و غلظت فلز جیوه در هپاتوپانکراس و عضله بیشتر از مطالعه حاضر بود (۱۴). آن‌ها عنوان کردند که تجمع جیوه در موجودات آبی ممکن است به عواملی مانند فراهمی زیستی فلز، ویژگی‌های هیدرودینامیک محیط، موقعیت ایستگاه‌های جمع‌آوری، دما، شوری و منابع آلودگی بستگی داشته باشد. با افزایش تماس با جیوه، تجمع در رسوب و بافت‌های مختلف افزایش می‌یابد؛ بنابراین، جیوه از طریق زنجیره غذایی به بدن انسان منتقل می‌شود (۱۴). سطوح بالای جیوه در هپاتوپانکراس ممکن است به دلیل فراوانی پروتئین متالوتئین در این بافت در مقایسه با دیگر اندام‌ها باشد. براین‌اساس، هپاتوپانکراس خرچنگ به‌عنوان اندام هدف تجمع جیوه گزارش شده است (۵). مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعه خرچنگ شناگر آبی (*P. pelagicus*) توسط Al-Mohanna و همکارش (۲۰۰۱)، نشان داد که غلظت روی در بافت عضله بیشتر و در بافت هپاتوپانکراس کمتر بود (۱۵). غلظت روی در بررسی Firat و همکاران (۲۰۰۸) راجع به خرچنگ *Charybdis longicollis* در خلیج اسکندرون ترکیه، در عضله کمتر و در هپاتوپانکراس بسیار بیشتر از مطالعه حاضر بود (۱۶). در مقابل، در بررسی Genc و Yilmaz (۲۰۱۵)، غلظت فلزات جیوه، روی و نیکل در خرچنگ آبی تالاب کویچگیز ترکیه بسیار کمتر از مطالعه حاضر بود (۱۷). در بررسی Celik و

در مقایسه با مطالعه حاضر بسیار بیشتر بود (۲۲). در تحقیق Delshab و همکاران (۲۰۱۷)، بر روی توزیع ژئوشیمیایی آلودگی فلزات سنگین در رسوبات دریایی بندر عسلویه خلیج فارس، مقدار فلزات سنگین روی و نیکل کمتر از مطالعه حاضر بود (۲۳). در نتایج بررسی Dehghan Madiseh و همکاران (۲۰۰۸)، بر روی سطوح آلودگی در سواحل خوزستان، غلظت نیکل و روی بیشتر و جیوه کمتر از مطالعه حاضر بود (۲۴). بر اساس تحقیقات انجام شده توسط Hamzeh و همکاران (۲۰۱۳)، بر روی اثر شناورهای صیادی بر روی تجمع فلزات نادر در رسوبات سه بندر در طول سواحل ایرانی دریای عمان، مقادیر فلزات نیکل و روی بسیار بیشتر از مطالعه حاضر بود (۲۵). طبق نتایج Song و همکاران (۲۰۱۴)، از بررسی غلظت فلزات سنگین در رسوبات سواحل کره جنوبی، غلظت نیکل و روی بسیار کمتر از مطالعه حاضر بود (۲۶). غلظت روی در مطالعه Zhou و همکاران (۲۰۰۸)، مبنی بر شناسایی منابع فلزات سنگین در رسوبات و آب‌های سواحل دریای شرق چین در شهر یانگ ژانگ، بسیار بیشتر از مطالعه حاضر بود (۲۷). آگاه (۲۰۲۱)، در ارزیابی فلزات سنگین در رسوبات، ماهی و موی انسان در چابهار، نشان داد که غلظت فلزات روی و نیکل در مقایسه با مطالعه حاضر بیشتر بوده است (۲۸). نتایج بررسی عبدالله‌پور و همکاران (۲۰۱۳)، بر روی تجمع فلزات سنگین در رسوبات و ماهیان گونه‌های کفزی، بنتوپلاژیک و پلاژیک خور موسی نیز نشان داد که مقدار فلز نیکل بیشتر از مطالعه حاضر بوده است (۲۹). در مطالعه Pandiyan و همکاران (۲۰۲۰)، که بر روی سطوح آلودگی فلزات سنگین در آب، رسوب و آبزیان انجام شد، نشان داد که غلظت جیوه بسیار بیشتر و روی و نیکل در مقایسه با مطالعه حاضر بسیار کمتر بوده است (۳۰). طبق تحقیقات Sadeghi و همکاران

همکاران، (۲۰۰۶) بر روی بافت‌های عضله و هپاتوپانکراس خرچنگ آبی (*Callinectes sapidus*) تالاب شمال شرقی دریای مدیترانه، غلظت روی و جیوه بسیار کمتر از مطالعه حاضر بود (۱۸). مطالعه Coğun و همکاران (۲۰۱۷)، بر روی فلزات سنگین خرچنگ آبی (*C. sapidus*) نشان داد که غلظت فلز روی در بافت‌های عضله و هپاتوپانکراس کمتر از مطالعه حاضر بوده است (۶). اختلاف غلظت فلزات در نمونه‌های جمع‌آوری شده از ایستگاه‌های مختلف، به شرایط زیستگاه آن‌ها بستگی دارد. زیرا، واکنش‌های شیمیایی، فراهمی زیستی فلزات و منابع آلودگی که به طور بالقوه می‌توانند بر روی تجمع فلزات اثر بگذارند، در هر یک از ایستگاه‌ها متفاوت است (۱۹). مقایسه غلظت فلزات در بافت عضله خرچنگ مطالعه حاضر با استانداردهای جهانی FAO، UK MAFF، UK MAFF: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (United Kingdom)، FDA (States Food and Drug Administration)، WHO و NHMRC نشان داد (۲۰، ۲۱) که غلظت فلز جیوه پایین‌تر از حد مجاز اعلام شده توسط NHMRC و نزدیک به سایر استانداردها؛ غلظت روی از استانداردهای UK (MAFF) و FAO بالاتر و از استانداردهای WHO و NHMRC پایین‌تر؛ و غلظت نیکل کمتر از حد مجاز اعلام شده توسط FDA بوده است؛ بنابراین، باتوجه به غلظت جیوه و روی، مصرف گوشت خرچنگ شناگر آبی (*P. segnis*) ممکن است برای سلامتی خطرآفرین باشد. در بررسی انجام شده توسط Barath Kumar و همکاران (۲۰۱۹)، بر روی توزیع عناصر و آلودگی فلزی در رسوبات سطحی سواحل جنوب شرقی هند، غلظت نیکل کمتر از مطالعه حاضر بود (۵). در تحقیقی که توسط بلوچ و همکاران (۲۰۱۸)، بر روی آلودگی مس و روی در رسوبات خلیج پزم داشتند، مقدار فلز روی

نتیجه‌گیری

بنابر نتایج، مصرف گوشت خرچنگ مورد مطالعه از نظر جیوه و به ویژه، روی ممکن است برای سلامتی مضر باشد. مقایسه میانگین غلظت فلزات سنگین در رسوبات نمونه‌برداری شده از ایستگاه‌ها با استانداردهای کیفیت رسوب، نشان از پایین بودن غلظت روی و نیکل و جیوه داشت.

منابع

1. Agah H, Saleh A, Darvish Bastami K, Sheijooni Fumani N. Ecological risk, source and preliminary assessment of metals in the surface sediments of Chabahar Bay, Oman Sea. Mar Pollut Bull. 2016;107(1):383-388.
2. Viswanathan C, Azhaguraj R, Selvanayagam M, Raffi SM. Heavy metal levels in different tissues of the Blue Swimming crab (*Portunus pelagicus*, Portunidae) collected from Ennore Estuary. Int J Res Fish Aquac. 2013;3(1):1-6.
3. Satheeswaran T, Yuvaraj P, Damotharan P, Karthikeyan V, Jha DK, Dharani G, Balasubramanian T, Kirubakaran R. Assessment of trace metal contamination in the marine sediment, seawater, and bivalves of Parangipettai, southeast coast of India. Mar Pollut Bull. 2019;149:110499.
4. Olgunoglu MP, Olgunoglu İA. Heavy metal contents in blue swimming crab from the Northeastern Mediterranean Sea, Mersin Bay, Turkey. Pol J Environ Stud. 2016;25(5):2233-2237.
5. Barath Kumar S, Padhi RK, Mohanty AK, Satpathy KK. Elemental distribution and trace metal contamination in the surface sediment of south east coast of India. Mar Pollut Bull. 2016;114(2):1164-1170.
6. Çoğun HY, Firat Ö, Aytekin T, Firidin G, Firat Ö, Varkal H, Temiz Ö, Kargin F. Heavy metals in the blue crab (*Callinectes*

(۲۰۱۹)، بر روی تجمع عناصر نادر و ارزیابی خطر سلامتی و اکولوژیکی در رسوبات و ماهی شوریده (*Otolithes ruber*) در دریای عمان، غلظت نیکل بسیار بیشتر از مطالعه حاضر بوده است (۳۱). نیکل در مقادیر کم برای تولید گلبول قرمز خون مورد نیاز است. اما، در مقادیر زیاد به طور خفیف سمی می‌شود. مواجهه مزمن با آن می‌تواند باعث کاهش وزن، آسیب قلبی، کبدی و تحریک پوست شود. نیکل در جانوران آبی تجمع می‌یابد. اما، باعث بزرگ‌نمایی زیستی از طریق زنجیره غذایی نمی‌شود (۳۲). صخره‌های خلیج چابهار در سواحل مَکُران، صخره‌های افیولیتی پوسته‌ای اقیانوسی هستند که با عناصری مانند کروم و نیکل غنی شده و از این رو، می‌تواند منشأ اصلی این عناصر در منطقه نمونه‌برداری باشد (۲۸). همچنین، از آنجایی که نیکل نشانگر آلودگی نفتی است، افزایش میزان نیکل می‌تواند نشان‌دهنده افزایش آلودگی نفتی (ترکیبات نفتی در سوخت و صنایع وابسته) در منطقه مورد مطالعه باشد (۳۱). عملیات مختلف نظیر کشتی‌رانی، تعمیر کشتی، سوخت‌رسانی، گریس‌کاری و رنگ‌آمیزی دلیل تجمع بالای فلزات کمیاب در بنادر عنوان شده است. رنگ ضد رسوب، علاوه بر فاضلاب کشتی‌های ماهیگیری، یکی دیگر از منابع آلودگی فلزات سنگین در بنادر است (۲۵). نتایج حاصل از مطالعه حاضر و مقایسه غلظت فلزات سنگین در رسوبات خلیج چابهار نشانگر بیشترین غلظت فلز جیوه در ایستگاه پزم بود. به نظر می‌رسد که علت بالا بودن آلودگی در این ناحیه، ناشی از تخلیه فاضلاب روستایی و تردد شناورهای صیادی می‌باشد (۳۳). مقایسه میانگین غلظت فلزات در رسوبات ایستگاه‌های بریس، پزم و تیس با استانداردهای کیفیت رسوب مؤید پایین بودن غلظت جیوه روی و نیکل نسبت به این استانداردها می‌باشد.

- biphenyl (PCB), polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), mercury, methyl mercury, and arsenic in blue crab *Portunus segnis* from Persian Gulf. *Environ Monit Assess.* 2015;187(5):253-261.
14. Kazemzadeh Khoei J, Abdi Bastami A. Mercury concentrations in tissues of blue swimming crab *Portunus pelagicus* and sediments from Khark Island. *World Appl Sci J.* 2013;21(9):1391-1397.
 15. Al-Mohanna SY, Subrahmanyam M NV. Flux of heavy metal accumulation in various organs of the intertidal marine blue crab, *Portunus pelagicus* (L.) from the Kuwait coast after the Gulf War. *Environ Int.* 2001;27(4):321-326.
 16. Fırat Ö, Gök G, Çoğun HY, Yüzereroğlu TA, Kargin F. Concentrations of Cr, Cd, Cu, Zn, and Fe in crab *Charybdis longicollis* and shrimp *Penaeus semisulcatus* from the Iskenderun Bay, Turkey. *Environ Monit Assess.* 2008;147(1-3):117-123.
 17. Genc TO, Yilmaz F. Bioaccumulation [indices] of metals in blue crab inhabiting specially protected area Koycegiz Lagoon (Turkey). *Indian J Anim Sci.* 2015;85(1):94-99.
 18. Celik M, Küçükgülmez A, Yanar Y, Çıkrıkçı M. Concentrations of some heavy metals in tissues of the blue crab, *Callinectes sapidus*, from the lagoon of the North Eastern Mediterranean Sea. *Fresenius Environ Bull.* 2006;15(5):351-355.
 19. Hosseini M, Pazooki J, Safaei M. Size at maturity, sex ratio and variant morphometrics of blue swimming crab *Portunus segnis* (Forsk., 1775) from Boushehr Coast (Persian Gulf). *J Mar Sci: Res Dev.* 2014;4(2):149-153.
 20. Food and Drug Administration – FDA. Guidance document for nickel in shellfish. Washington, D.C.: DHHS/PHS /FDA/CFSAN/Office of Seafood. 1993.
 21. WHO. Health criteria and other supporting information. In: Guidelines for *sapidus*) in Mersin Bay, Turkey. *Bull Environ Contamination Toxicol.* 2017;98(6):824-829.
 7. Nanda PK, Da AK, Dandapat P, Dhar P, Bandyopadhyay S, Dib AL, Lorenzo JM, Gagaoua M. Nutritional aspects, flavour profile and health benefits of crab meat based novel food products and valorisation of processing waste to wealth: A review. *Trends Food Sci Technol.* 2021;112:252-267.
 8. Fatemi F, Khoramnezhadian S, Shamsaei Mehrenjan M. 2015. Bioaccumulation of arsenic in blue swimmer crab (*Portunus pelagicus*) along the Persian Gulf coasts, Asalouyeh region-3. *J Mar Biol.* 7(1):43-52
 9. Soltani Z, Loghmani M, Toutouni MM, Sinaei M. Study of changes in metallothionein concentration of ghost crab (*Ocypode saratan*) in Gwater and Chabahar mangrove forests in two periods of pre-monsoon and post-monsoon. *J Food Sci Technol.* 2020;9(4):257-270.
 10. Taleshpour S, Taghavi L, Nasrollahzadeh Saravi H. Prioritizing the amount of metal pollution using pollution load indices and biological hazard potential in surface sediments of rivers on the southeastern coast of the Caspian Sea. *Environ Sci Technol.* 2020;22(6):17-30.
 11. Abkenar AM, Yahyavi M, Esmaili M, Rombenso A. High bioaccumulation factors and ecological risk index of Cd and Hg in Indian white shrimp, hooded oyster, brown algae, and Sediment in northern coasts of the Gulf of Oman before and after a monsoon. *Reg Stud Mar Sci.* 2020;41:101552.
 12. Talebi Matin M, Mashinchian A, Sinaei M, Jamili S. Metallothionein as a biomarker of heavy metal (Cd, Cu, Zn, Pb, Hg, Ni, Cr) pollution in hermit crab (*Clibanarius signatus*). *Environ Asia.* 2019;12(2):164-171.
 13. Ghaeni M, Adami Pou N, Hosseini M. Bioaccumulation of polychlorinated

- Yangzhong, China. Environ Geol. 2008;54(2):373-380.
28. Agah H. Ecological risk assessment of heavy metals in sediment, fish, and human hair from Chabahar Bay, Makoran, Iran. Mar Pollut Bull. 2021;169(5):112345.
29. Abdolahpour Monikh F, Safahieh A, Savari A, Doraghi A. Heavy metal concentration in sediment, benthic, benthopelagic, and pelagic fish species from Musa Estuary (Persian Gulf). Environ Monitor Assess. 2013;185(1):215-222.
30. Pandiyan J, Mahboob S, Govindarajan M, Al-Ghanim KA, Ahmed Z, Al-Mulhm N, Jagadheesan R, Krishnappa K. An assessment of level of heavy metals pollution in the water, sediment and aquatic organisms: A perspective of tackling environmental threats for food security. Saudi J Biol Sci. 2020;28(2):1218-1225.
31. Sadeghi P, Loghmani M, Afsa E. Trace element concentrations, ecological and health risk assessment in sediment and marine fish *Otolithes ruber* in Oman Sea, Iran. Mar Pollut Bull. 2019;140(1):248-254.
32. Govind P, Madhuri S. Heavy metals causing toxicity in animals and fishes. Res J Anim Vet Fish Sci. 2014;2(2):17-23.
33. Mirza R, Moeinoddini M. Contamination and ecological assessment of heavy metals (Hg, Cd, Pb, Ni, V, Cu) in surface sediments of Chabahar Bay. J Oceanogr. 2017;8(31):1-9.
- Drinking Water Quality, 2nd ed., Geneva. 1996;2:31-388.
22. Balooch A, Sadeghi P, Attaran Fariman G. Evaluation of copper and zinc contamination in *Otolithes ruber* and sediments of the Pozm Bay (north of Oman Sea): Histopathology and chemical analysis. J Persian Gulf, 2018;9(31):21-31.
23. Delshab H, Farshchi P, Keshavarzi B. Geochemical distribution, fractionation and contamination assessment of heavy metals in marine sediments of the Asaluyeh port, Persian Gulf. Mar Pollut Bull., 2017;115(1-2):401-411.
24. Dehghan Madiseh S, Savari A, Parham H, Marammazy JG, Papahn F, Sabzalizadeh S. Heavy metals contaminant evaluation in sediments of Khou-e-Musa creeks, northwest of Persian Gulf. Iranian J Fish Sci. 2008;7(2):137-156.
25. Hamzeh MA, Shah-Hosseini M, Naderi Beni A. Effect of fishing vessels on trace metal contamination in sediments of three harbors along Iranian Oman Sea coast[s]. Environ Monit Assess. 2013;185(2):1791-1807.
26. Song Y, Choi MS, Lee JY, Jang DJ. Regional background concentrations of heavy metals (Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Pb) in coastal sediments of the South Sea of Korea. Sci Total Environ. 2014;482-483:80-91.
27. Zhou J, Ma D, Pan J, Nie W, Wu K. Application of multivariate statistical approach to identify heavy metal sources in sediment and waters: a case study in

Research Article

Comparison of the Effects of Barberry and Saffron Extracts Combined with a Period of Endurance Physical Activity on POMC and MC4R Genes in Female Wistar Rats Addicted to Methamphetamine

Daniyal Hakak¹, Rambod Khajaei¹, Sayyed Javad Ziaolhagh^{2*}, Akbar Safipour-Afshar³

1- Department of Sports Sciences, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

2- Department of Sports Science, Shahroud Branch, Islamic Azad University, Shahroud, Iran

3- Department of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

*Corresponding author: javadzia@gmail.com

Received: 16 February 2025

Accepted: 20 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1199681

Abstract

Methamphetamine is a potent central nervous system stimulant that directly affects brain function, causing significant changes in feeding patterns and appetite regulation. Given the extensive side effects of this substance, the use of alternative interventions such as herbal remedies and exercise has been considered as harm reduction strategies. In this study, 30 female Wistar rats were divided into seven groups of six: healthy control, methamphetamine, methamphetamine + aerobic exercise, methamphetamine + berberine (barberry extract), methamphetamine + exercise + berberine, methamphetamine + crocin (saffron extract), and methamphetamine + exercise + crocin. Methamphetamine was injected intraperitoneally at an initial dose of 10 and then 40 mg/kg six days a week. Berberine hydrochloride (100 mg/kg) was administered via drinking water, and crocin was administered in a similar manner. Aerobic exercise consisted of treadmill running at a speed of 25 m/min for 30 minutes, six days a week, for four weeks. After the intervention, the expression of pro-opiomelanocortin (POMC) and melanocortin 4 receptor (MC4R) genes in hypothalamic tissue was examined using the relative fold change method. The results showed that methamphetamine use increased the expression of POMC (166%) and MC4R (42%). Berberine caused a greater decrease in the expression of both POMC (47% vs. 14%) and MC4R (47% vs. 29%) genes than crocin. Aerobic exercise also had a similar effect. The combination of berberine + exercise showed the greatest reduction in POMC (50%) and the combination of crocin + exercise showed the greatest reduction in MC4R (76%). These results show the effective role of herbal and exercise interventions in inhibiting the neurochemical consequences of methamphetamine.

Keywords: Methamphetamine, Berberine Hydrochloride, Crocin, Aerobic Exercise, Pro-opiomelanocortin, Melanocortin-4 Receptor.

مقاله پژوهشی

مقایسه تاثیر عصاره زرشک و زعفران همراه با یک دوره فعالیت بدنی استقامتی بر ژن‌های POMC و MC4R در رت‌های ویستار ماده معتاد به مت‌آمفتامین

دانیال حکاک^۱، رامبد خواجه‌ای^۱، سید جواد ضیاءالحق^{۲*}، اکبر صفی‌پور افشار^۳

۱- گروه علوم ورزشی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

۲- گروه علوم ورزشی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران

۳- گروه زیست‌شناسی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

*مسئول مکاتبات: javadzia@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۸

DOI: 10.60833/ascij.2025.1199681

چکیده

مت‌آمفتامین (شیشه) یک محرک قوی سیستم عصبی مرکزی است که با تأثیر مستقیم بر عملکرد مغز، تغییرات قابل توجهی در الگوهای تغذیه‌ای و تنظیم اشتها ایجاد می‌کند. با توجه به عوارض گسترده این ماده، استفاده از مداخلات جایگزین مانند درمان‌های گیاهی و فعالیت ورزشی به عنوان راهکارهای کاهش آسیب مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش، ۳۰ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار به هفت گروه شش‌تایی شامل: کنترل سالم، مت‌آمفتامین، مت‌آمفتامین + تمرین هوازی، مت‌آمفتامین + بربرین (عصاره زرشک)، مت‌آمفتامین + تمرین + بربرین، مت‌آمفتامین + کروسین (عصاره زعفران)، و مت‌آمفتامین + تمرین + کروسین تقسیم شدند. مت‌آمفتامین به صورت تزریق داخل صفاقی با دوز اولیه ۱۰ و سپس ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم شش روز در هفته تزریق شد. بربرین هیدروکلراید (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) از طریق آب آشامیدنی و کروسین نیز با روش مشابه تجویز شد. تمرین هوازی شامل دویدن روی تردمیل با سرعت ۲۵ متر در دقیقه، به مدت ۳۰ دقیقه، شش روز در هفته و به مدت چهار هفته انجام گرفت. پس از اتمام مداخلات، بیان ژن‌های پرواپیوملانوکورتین (POMC) و گیرنده ملانوکورتین ۴ (MC4R) در بافت هیپوتالاموس با روش فولدچنج نسبی بررسی شد. نتایج نشان داد مصرف مت‌آمفتامین باعث افزایش بیان ژن‌های POMC (۱۶۶ درصد) و MC4R (۴۲ درصد) می‌شود. بربرین نسبت به کروسین کاهش بیشتری در بیان هر دو ژن POMC (۴۷ درصد در برابر ۱۴ درصد) و MC4R (۴۷ درصد در برابر ۲۹ درصد) تمرین هوازی نیز اثری مشابه داشت. ترکیب بربرین + تمرین بیشترین کاهش را در POMC (۵۰٪) و ترکیب کروسین + تمرین بیشترین کاهش را در MC4R (۷۶ درصد) نشان داد. این نتایج نقش مؤثر مداخلات گیاهی و ورزشی را در مهار پیامدهای نوروشیمیایی مت‌آمفتامین نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: مت‌آمفتامین، بربرین هیدروکلراید، کروسین، فعالیت بدنی هوازی، پرواپیوملانوکورتین، گیرنده ملانوکورتین ۴.

مقدمه

هیپوتالاموس نقش مهمی در تنظیم سیری و اشتها از طریق مسیرهای مختلف ژن ایفا می‌کند. دو مسیر کلیدی درگیر در این فرآیند، مسیر ملانوکورتین و مسیر لپتین هستند. در مسیر ملانوکورتین نورون‌های پرواپیوملانوکورتین (POMC) در هسته کمانی هیپوتالاموس، هورمون محرک ملانوسیت آلفا (α -

MSH) تولید می‌کنند که به گیرنده ملانوکورتین-۴ (MC4R) در پارا بطنی متصل می‌شود (۱). نورون‌های MC4R در PVN با کاهش مصرف غذا و افزایش مصرف انرژی به α -MSH پاسخ می‌دهند. این مسیر در حالت تغذیه فعال می‌شود، زمانی که هورمون‌های در گردش مانند لپتین و انسولین به فراوانی مواد مغذی سیگنال می‌دهند (۲). در مسیر لپتین که توسط بافت چربی تولید می‌شود، به گیرنده خود (LEPR) روی نورون‌های POMC متصل می‌شود. این اتصال، پردازش POMC به α -MSH را ارتقا می‌دهد که سپس نورون‌های MC4R را فعال می‌کند و در حالت گرسنگی، نورون‌های پپتید مرتبط با آگوتی (AgRP) و نوروپپتید Y (NPY) فعال می‌شوند و با مهار نورون‌های MC4R، مصرف غذا را تقویت می‌کنند (۳). نورون‌های بیان‌کننده گیرنده اکسی‌توسین در هسته کمانی با درگیر کردن نورون‌های MC4R در PVN از طریق انتقال سریع گلو تاماترژیک تقویت شده توسط α -MSH به سرعت باعث سیری می‌شوند. از طرفی، نورون‌های موجود در هسته دسته منزوی (NTS) که کوله سیستوکینین (CCK) را بیان می‌کنند مستقیماً نورون‌های MC4R را در PVN تحریک می‌کنند تا سیگنال سیری را نشان دهند. این مسیرها و نورون‌ها برای تنظیم اشتها و سیری، تضمین هموستاز انرژی و جلوگیری از چاقی با هم کار می‌کنند. رابطه بین مت‌آفتامین، POMC و MC4R پیچیده است و شامل مکانیسم‌های متعددی است که بر مصرف غذا و سیری تأثیر می‌گذارد. در حالی که مت‌آفتامین می‌تواند با مهار بیان NPY، مصرف غذا را سرکوب کند، همچنین می‌تواند مسیر MC4R را برای القای سیری فعال کند. مت‌آفتامین می‌تواند بر پردازش POMC که پیش‌ساز پپتید بی‌اشتهایی، هورمون محرک ملانوسیت آلفا است، تأثیر بگذارد (۴). α -MSH به MC4R متصل می‌شود و سرکوب اشتها را تحریک

می‌کند. مت‌آفتامین می‌تواند بیان پپتیدهای مشتق شده از POMC را تغییر دهد که ممکن است به اثرات بی‌اشتهایی آن کمک کند. مت‌آفتامین می‌تواند با مسیر MC4R که نقش مهمی در تنظیم اشتها و وزن بدن دارد، تعامل داشته باشد (۵). از طرفی، مت‌آفتامین می‌تواند بر بیان MC4R و مسیرهای سیگنال‌دهی پایین دست آن تأثیر بگذارد و بر مصرف غذا و سیری تأثیر بگذارد. همچنین مت‌آفتامین می‌تواند با مهار بیان نوروپپتید Y (یک پپتید انرژی‌زا)، مصرف غذا را سرکوب کند. این اثر در موش‌هایی با دسترسی محدود به غذا آشکارتر است، که نشان می‌دهد اثرات بی‌اشتهایی دارو در موقعیت‌های محرومیت از غذا بارزتر است. مت‌آفتامین می‌تواند با فعال کردن مسیر MC4R، سیری را افزایش دهد که منجر به سرکوب اشتها می‌شود. این اثر در بیماران مبتلا به واریانت‌های ژنتیکی نادر در مسیر POMC/MC4R مشاهده می‌شود، جایی که نشان داده آگونیست انتخابی MC4R، باعث سیری و کاهش وزن بدن می‌شود. مصرف مت‌آفتامین به دلیل اثرات سرکوب‌کننده اشتها می‌تواند منجر به سوء تغذیه و کاهش شدید وزن شود. مصرف مزمن همچنین می‌تواند باعث ایجاد طیف وسیعی از مشکلات سلامت جسمی و روانی از جمله مشکلات قلبی عروقی، مشکلات تنفسی و اختلالات روانی شود (۶). ورزش هوازی با POMC و MC4R به روش‌های مختلف تعامل دارد و بر اشتها و هموستاز انرژی تأثیر می‌گذارد. نشان داده شده است که ورزش هوازی باعث افزایش فعالیت نورون‌های POMC در هسته کمانی (ARC) هیپوتالاموس می‌شود که در تنظیم اشتها و تعادل انرژی نقش دارد. این افزایش در فعالیت POMC می‌تواند منجر به سرکوب اشتها و افزایش مصرف انرژی شود (۷). ورزش هوازی همچنین می‌تواند فعالیت MC4R را تعدیل کند، گیرنده‌ای که نقش مهمی در تنظیم اشتها و

وزن بدن دارد (۳). ورزش بیان MC4R را در هیپوتالاموس افزایش می‌دهد، که می‌تواند به اثرات بی‌اشتهایی آن کمک کند (۸). اثرات ورزش بر روی POMC و MC4R می‌تواند بسته به وضعیت انرژی فرد متفاوت باشد. به عنوان مثال، روزه گرفتن قبل از ورزش باعث افزایش فعالیت نورون‌های POMC و بیان MC4R می‌شود که منجر به افزایش سرکوب اشتها و مصرف انرژی می‌شود. شدت ورزش می‌تواند بر اثرات ورزش بر POMC و MC4R نیز تأثیر بگذارد. ورزش با شدت بالا در مقایسه با ورزش با شدت کم، اثرات بارزتری بر روی POMC و MC4R دارد (۷). ورزش هوازی از چاقی و سندرم متابولیک در موش‌های مبتلا به ناک اوت ژن MC4R جلوگیری می‌کند، که نشان می‌دهد ورزش می‌تواند به کاهش اثرات کمبود MC4R بر هموستاز انرژی کمک کند (۹). به طور کلی، ورزش هوازی به روش‌های پیچیده‌ای با POMC و MC4R تعامل دارد و بر اشتها و هموستاز انرژی تأثیر می‌گذارد. اثرات ورزش بر روی این مسیرها بسته به عواملی مانند وضعیت انرژی و شدت ورزش می‌تواند متفاوت باشد (۱۰). ازطرفی، بربرین هیدروکلراید، یک ترکیب طبیعی مشتق شده از گیاه زرشک کوهی، برای اثرات بالقوه آن بر اشتها مورد مطالعه قرار گرفته است. بربرین هیدروکلراید ممکن است بر اشتها و مدیریت وزن تأثیر بگذارد (۱۱). بربرین هیدروکلراید با افزایش تولید هورمون‌های خاصی که گرسنگی و سیری را تنظیم می‌کنند، اشتها را کاهش می‌دهد. بربرین هیدروکلراید با کاهش وزن مرتبط است که ممکن است تا حدی به دلیل اثرات سرکوب‌کننده اشتها باشد. مکمل بربرین هیدروکلراید منجر به کاهش وزن قابل توجهی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و چاقی می‌شود (۱۲). اثرات سرکوب‌کننده اشتها بربرین هیدروکلراید با مکانیسم‌های مختلفی انجام می‌شود، از جمله: بربرین

هیدروکلراید تولید پپتید-۱ شبه گلوکاگون (GLP-1) را افزایش می‌دهد، هورمونی که به تنظیم اشتها و متابولیسم گلوکز کمک می‌کند. نشان داده شده است که بربرین هیدروکلراید سطح گرلین را کاهش می‌دهد، هورمونی که اشتها را تحریک می‌کند بربرین هیدروکلراید تولید پپتید YY (PYY) را افزایش می‌دهد، هورمونی که به تنظیم اشتها و سیری کمک می‌کند. دوز و مدت بهینه مکمل بربرین هیدروکلراید برای سرکوب اشتها و کاهش وزن به خوبی مشخص نشده است (۱۳). با این حال، بیشتر مطالعات از دوزهای مختلف از ۵۰۰ میلی‌گرم تا ۱۵۰۰ میلی‌گرم در روز برای دوره‌های ۴-۱۲ هفته استفاده کرده‌اند. مکمل هیدروکلراید بربرین بیان ژن POMC را در مغز افزایش می‌دهد که در تنظیم اشتها و تعادل انرژی نقش دارد (۱۴). کروسین که ماده موثر کلالة زعفران است دارای اثرات سرکوب‌کننده اشتها است و ممکن است با تأثیر بر بیان ژن‌های POMC و MC4R به کاهش وزن کمک کند. کروسین بیان ژن POMC را که در تنظیم اشتها و تعادل انرژی نقش دارد، تنظیم می‌کند. مکمل کروسین بیان ژن POMC را در مغز افزایش می‌دهد که در تنظیم اشتها و تعادل انرژی نقش دارد (۱۵). کروسین همچنین بر بیان ژن MC4R که یک تنظیم‌کننده کلیدی اشتها و تعادل انرژی است، تأثیر می‌گذارد. مکمل کروسین بیان ژن MC4R را در هیپوتالاموس افزایش می‌دهد که در تنظیم اشتها و تعادل انرژی نقش دارد. اثرات کروسین بر روی ژن‌های POMC و MC4R با مکانیسم‌های مختلفی انجام می‌شود، از جمله افزایش فعالیت AMPK که کروسین پروتئین‌کیناز فعال‌شده با AMP (AMPK) را فعال می‌کند که در تنظیم تعادل انرژی و اشتها نقش دارد. فعال‌سازی AMPK با افزایش بیان ژن‌های POMC و MC4R مرتبط است (۱۶). کروسین تولید پپتید-۱ شبه گلوکاگون (GLP-1) را افزایش می‌دهد،

هورمونی که به تنظیم اشتها و متابولیسم گلوکز کمک می‌کند GLP-1 با افزایش بیان ژن‌های POMC و MC4R مرتبط است (۱۷). دوز و مدت زمان: دوز و مدت بهینه مکمل کروسین برای سرکوب اشتها و کاهش وزن به خوبی مشخص نشده است. با این حال، بیشتر مطالعات از دوزهای مختلف از ۵۰۰ تا ۱۵۰۰ میلی‌گرم در روز برای دوره‌های ۴-۱۲ هفته استفاده کرده‌اند. با توجه به موارد ذکر شده و اثرگذار بودن فعالیت بدنی هوازی و سیلوسایین بر ژن‌های پروپوملانوکورتین (POMC) و گیرنده ملانوکورتین ۴ (MC4R) در قوس هیپوتالاموس و البته عدم وجود منابع کافی جهت بررسی این متغیرها در کنار یکدیگر، پژوهش حاضر درصدد کشف این روابط در موش‌های صحرانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

طرح تحقیق حاضر از نوع تجربی است که با نظارت کمیته اخلاق در پزشکی و کمیته حمایت از حقوق حیوانات با کد IR.IAU.NEYSHABUR.REC.1403.002 به تصویب رسید. در مطالعه حاضر ۴۲ سر موش ویستار از جنس ماده در محدوده وزنی ۲۰۰-۱۴۰ گرم تشکیل می‌دادند. موش‌ها از مرکز حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شاهرود تهیه شدند. برای موش‌ها پس از انتقال به محیط آزمایشگاه، یک هفته زمان جهت کاهش استرس و آشنایی با محیط جدید و یک هفته زمان برای آشنایی با تردمیل در نظر گرفته شد. در ادامه با توجه به وزن، حیوانات در ۷ گروه ۶ تایی کنترل سالم، دریافت مت‌آمفتامین، مت‌آمفتامین + فعالیت هوازی، مت‌آمفتامین + بربرین‌هیدروکلراید، مت‌آمفتامین + کروسین، مت‌آمفتامین + فعالیت هوازی + بربرین‌هیدروکلراید و مت‌آمفتامین + فعالیت هوازی + کروسین تقسیم‌بندی شدند. برای ثبت تغییرات وزنی حیوانات، وزن‌کشی قبل از شروع، در

طول اجرای پروتکل‌ها و پس از آن هر هفته انجام و ثبت گردید. مت‌آمفتامین از شرکت سیگما آلدریج خریداری و در نرمال سالین ۰/۹ درصد محلول شد جهت القای مت‌آمفتامین، موش‌ها میزان ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم/روز تزریق درون صفاقی مت-آمفتامین (به دلیل ایجاد استرس مزمن) را با استفاده از سرنگ انسولین به مدت ۵ روز دریافت کردند (۱۸). کروسین مشتق شده از عصاره گل زعفران تحت مجوز کروسینا، ایران برای استفاده در این مطالعه تهیه شد. کروسین ابتدا در محلول نرمال سالین حل شد و شش روز در هفته با دوز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به حیوانات بصورت درون صفاقی تزریق شد (۱۹). بربرین هیدروکلراید که ماده موثره زرشک کوهی می‌باشد از شرکت گلوکبر (ایران) تهیه شد و به حیوانات با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در روز با حل کردن آن در آب آشامیدنی اضافه شد (۲۰). پروتکل تمرین هوازی که به صورت تمرین استقامتی روی تردمیل جوندگان با پنج لاین مجزا انجام شد. در انتهای هر لاین، یک بخش الکتریکی قرار داشت که وقتی موش‌ها در نزدیکی بخش انتهایی لاین خود وارد می‌شدند، شوک الکتریکی سبکی را دریافت می‌کردند. قبل از شروع پروتکل تمرینی، حیوانات یک دوره آشناسازی کبا تردمیل را انجام دادند. برنامه تمرینی به مدت ۴ هفته تمرین هوازی روی تردمیل بود. ورزش مزمن (تمرین) شامل ۴ هفته برنامه دویدن با سرعت ۲۵ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه و ۶ روز در هفته (در مجموع ۲۴ جلسه) و بین ساعت ۹ تا ۱۲ صبح انجام می‌شد (۲۱) (جدول ۱). جهت بررسی های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت قشر مخ با استفاده از تیزاول، انجام گرفت، سپس با استفاده از خاصیت جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر و با کمک رابطه زیر غلظت و درجه خلوص نمونه RNA به صورت کمی بدست آمد: $C (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \epsilon \times$

به نمونه‌ی دیگر تغییر کرده است. مراحل محاسبه فولدچنج به طور کلی به شرح زیر است:
استخراج RNA و سنتز cDNA: ابتدا RNA از نمونه‌ها استخراج می‌شود و سپس به cDNA تبدیل می‌شود.

اندازه‌گیری سطح بیان ژن با استفاده از qPCR: بیان ژن مورد نظر و ژن مرجع (ژن‌هایی که سطح بیان آنها ثابت است، مانند GAPDH) در هر دو نمونه اندازه‌گیری می‌شود. این کار با استفاده از روش qPCR انجام می‌شود.

محاسبه میانگین Ct: مقدار Ct (چرخه‌ی آستانه) برای هر نمونه و هر ژن به دست می‌آید. بهتر است میانگین Ct چندین تکرار محاسبه شود تا دقت افزایش یابد.

محاسبه ΔCt (Delta Ct): با کم کردن مقدار Ct ژن مرجع از مقدار Ct ژن مورد نظر به دست می‌آید.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}}$$

محاسبه $\Delta\Delta Ct$ (Delta Delta Ct): با کم کردن ΔCt کنترل از ΔCt نمونه به دست می‌آید.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{control}}$$

محاسبه فولدچنج: فولدچنج با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه می‌شود: $\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

در این معادله، اگر $\Delta\Delta Ct$ منفی باشد، فولدچنج بزرگتر از ۱ خواهد بود که نشان‌دهنده افزایش بیان ژن در نمونه مورد نظر است. اگر $\Delta\Delta Ct$ مثبت باشد، فولدچنج کمتر از ۱ خواهد بود که نشان‌دهنده کاهش بیان ژن در نمونه مورد نظر است (۲۲).

d/1000. پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بسیار بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا پرایمرهای طراحی شده، مربوط به ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفت، و سپس بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش کمی q-RT PCR انجام پذیرفت. توالی آغازگرها در جدول ۲ نشان داده شده است. برای کنترل داخلی از mRNA β -actin استفاده شد. پروتکل چرخه حرارتی مورد استفاده Real time-PCR شامل: ۹۵° به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵° به مدت ۱۰ ثانیه، و به دنبال آن ۴۵ سیکل ۱۰° ثانیه‌ای در حرارت ۶۰ درجه بود. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold Cycle: CT) مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این پژوهش از برای بررسی تفاوت میان بیان ژن گروه‌های مختلف از روش‌های نوین بیوانفورماتیک استفاده شده است. بدین منظور جهت تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده در گروه‌ها، از روش فولدچنج و محاسبه اختلاف داده‌ها با ژن مرجع تجزیه و تحلیل انجام شده است.

محاسبه Fold Change: برای بیان ژن یک روش رایج برای مقایسه سطح بیان ژن در شرایط مختلف (مانند قبل و بعد از یک درمان) است. فولدچنج نشان می‌دهد که سطح بیان ژن در یک نمونه چگونه نسبت

جدول ۱- پروتکل تمرین هوازی

Table 1: Aerobic exercise protocol

Week	Speed (m/min)	Duration (min)
1	20	20
2	20	25
3	25	25
4	25	30

جدول ۲- الگوی پرایمر ژن‌ها

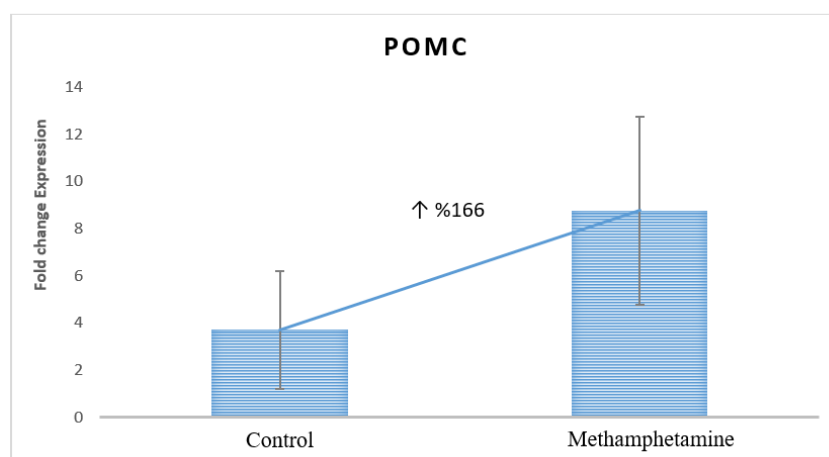
Table 2. Primer pattern of genes

Gene Name	Primer Sequence (5'→3')	Product Size (bp)
POMC	F: CCATAGATGTGTGGAGCTGGTG R: CATCTCCGTTGCCAGGAAACAC	200
MC4R	F: CCTGAGGTGTTTGTGACTCTGG R: AACGCTCACCAGCATATCAGCC	380
GAPDH (Housekeeping)	F: AAAGTTGTCATGGATGACC R: CATGGAGAAGGCTGGGG	195

نتایج

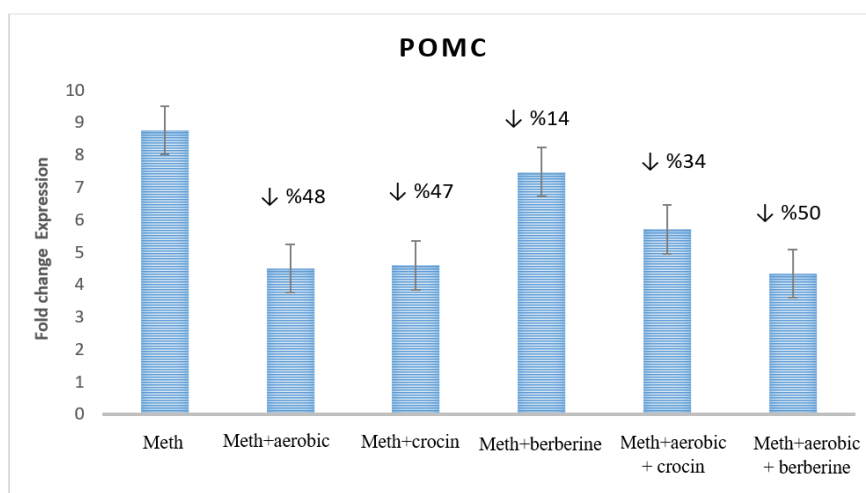
موجب افزایش ۴۲ درصدی این ژن نسبت به گروه کنترل سالم شده است (نمودار ۳). همچنین نتایج نشان داد بربرین هیدروکلراید نسبت به کروسین کاهش بیشتری در بیان ژن MC4R داشتند (به ترتیب ۴۷ درصد در برابر ۲۹ درصد کاهش). میزان کاهش این ژن در گروه تمرین هوازی نیز تقریباً به اندازه گروه کروسین بود (۲۸ درصد کاهش). در گروه‌های ترکیبی عصاره‌های گیاهی و تمرین، نتایج بطور شگفت‌آوری عکس ژن POMC بود و کاهش بیشتر در گروه ترکیب کروسین و تمرین هوازی نسبت به بربرین هیدروکلراید و تمرین هوازی نشان داده شد (به ترتیب ۷۶ درصد در برابر ۳۲ درصد کاهش) (نمودار ۴).

بررسی بیان ژن پروپیوملانوکورتین نشان داد القاء مت‌آمفتامین (شیشه) موجب افزایش ۱۶۶ درصدی این ژن نسبت به گروه کنترل سالم شده است (نمودار ۱). نتایج نشان داد کروسین زعفران نسبت به بربرین هیدروکلراید زرشک کوهی کاهش بیشتری در بیان ژن POMC داشتند (به ترتیب ۱۴ درصد در برابر ۴۷ درصد کاهش) تقریباً به اندازه گروه تمرین هوازی (۴۸٪ کاهش). در گروه‌های ترکیبی عصاره‌های گیاهی و تمرین، نتایج بطور شگفت‌آوری از کاهش بیشتر در گروه ترکیب زرشک کوهی و تمرین هوازی نسبت به کروسین و تمرین هوازی بود (به ترتیب ۵۰ درصد در برابر ۳۴ درصد کاهش) (نمودار ۲). در رابطه با بیان ژن MC4R، نتایج پژوهش حاضر الگویی مشابه ژن POMC نشان داد بطوریکه القاء مت‌آمفتامین (شیشه)



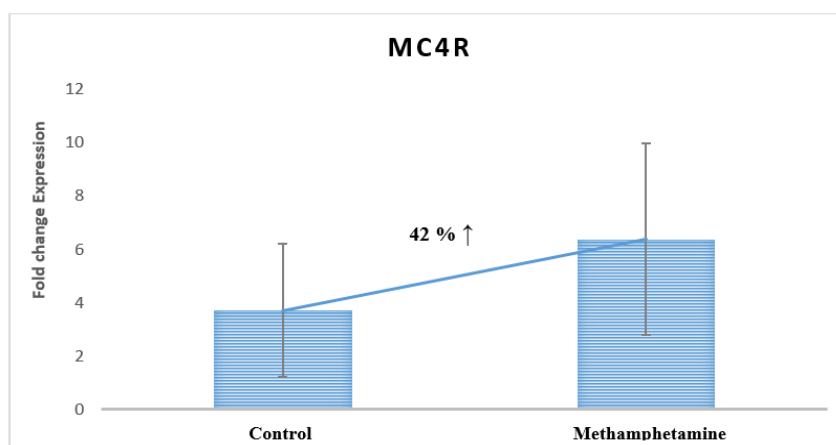
نمودار ۱- مقادیر بیان ژن POMC در گروه کنترل سالم و القاء شیشه

Fig. 1. POMC gene expression values in the healthy control and glass-induced groups



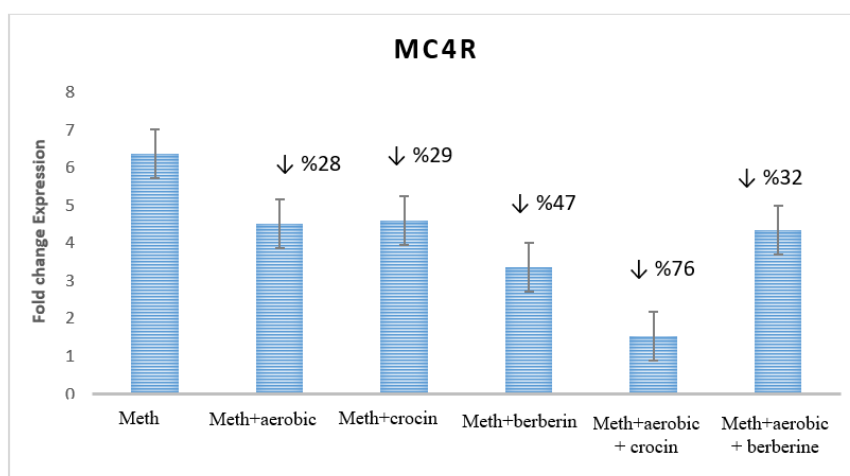
نمودار ۲- مقادیر بیان ژن POMC در گروه‌های مختلف

Fig. 2. POMC gene expression values in different groups



نمودار ۳- مقادیر بیان ژن MC4R در گروه کنترل سالم و القاء شیشه

Fig. 3. MC4R gene expression values in the healthy control and glass-induced groups



نمودار ۴- مقادیر بیان ژن MC4R در گروه‌های تمرین و سیلوسایبین

Fig. 4. MC4R gene expression values in the exercise and psilocybin groups

بحث

پژوهش حاضر نشان داد القاء مت‌آفتامین موجب افزایش بیان ژن پروپیوملانوکورتین و گیرنده ملانوکورتین ۴ در موش‌های صحرایی ماده شده و زرشک کوهی و کلالة زعفران موجب کاهش بیان این ژن‌ها در هیپوتالاموس می‌شوند. همچنین بنظر می‌رسد ترکیب هردو مداخله موجب هم‌افزایی و بهبود بیشتر این ژن‌ها شده است. نتایج پژوهش حاضر در رابطه با افزایش هورمون‌های سیری ناشی باز مت‌آفتامین، با بسیاری از مطالعات همسو می‌باشد. درین راستا، بیان شده است مت‌آفتامین به عنوان یک داروی محرک قوی می‌تواند بر سطح و عملکرد هورمون‌های مرتبط با اشتها مانند لپتین و گرلین تأثیر بگذارد. لپتین و گرلین هورمون‌هایی هستند که نقش کلیدی در تنظیم احساس گرسنگی و سیری ایفا می‌کنند. مت‌آفتامین می‌تواند باعث کاهش اشتها شود که ممکن است منجر به کاهش وزن و در نتیجه کاهش سلول‌های چربی بدن شود. کاهش سلول‌های چربی ممکن است سطح لپتین را کاهش دهد، هرچند تأثیر مستقیم مت‌آفتامین بر ترشح لپتین به صورت کامل مشخص نیست. بعلاوه، مطالعات نشان داده‌اند که مت‌آفتامین می‌تواند سطح گرلین را تحت تأثیر قرار دهد (۲۳). مت‌آفتامین ممکن است باعث کاهش سطح گرلین شود، که منجر به کاهش احساس گرسنگی می‌شود. کاهش گرلین می‌تواند یکی از دلایلی باشد که مت‌آفتامین باعث کاهش اشتها و کاهش وزن می‌شود. اثرات سرکوب‌کننده اشتها آفتامین در درجه اول با اثر آن بر هیپوتالاموس، ناحیه‌ای در مغز که مسئول تنظیم اشتها و سیری است، انجام می‌شود. به‌طور خاص، آفتامین بیان پروپیوملانوکورتین را افزایش می‌دهد و بیان نوروپپتید Y (NPY) را کاهش می‌دهد، که هر دو نوروپپتیدهای مهمی هستند که در تنظیم اشتها نقش دارند. آفتامین همچنین فعالیت

گیرنده‌های دوپامین را مهار می‌کند که به نوبه خود باعث افزایش بیان POMC و کاهش بیان NPY می‌شود (۲۴). اثرات سرکوب‌کننده اشتها آفتامین وابسته به دوز است و می‌تواند به طور قابل توجهی بین افراد متفاوت باشد. در دوزهای پایین، آفتامین می‌تواند اشتها را افزایش دهد، در حالی که در دوزهای بالاتر می‌تواند اشتها را سرکوب کند (۲۵). تصور می‌شود که این اثر دوگانه به دلیل توانایی دارو در تحریک آزادسازی پپتیدهای بی‌اشتها و پپتیدهای بی‌اشتهایی در مغز باشد (۲۶). یک مطالعه نشان داد که آفتامین بیان POMC را افزایش داده و بیان NPY را در هیپوتالاموس کاهش می‌دهد که منجر به سرکوب اشتها می‌شود. مطالعه دیگری نشان داد که آفتامین باعث کاهش وزن بدن و بهبود اشتها در بیماران مبتلا به بیماری التهابی روده می‌شود. در نتیجه، رابطه آفتامین با اشتها پیچیده و چندوجهی است. اثرات سرکوب‌کننده اشتها این دارو در درجه اول با اثر آن بر هیپوتالاموس انجام می‌شود، جایی که بیان پپتیدهای بی‌اشتها را افزایش می‌دهد و بیان پپتیدهای اشتها را کاهش می‌دهد (۲۷). بربرین هیدروکلراید ترکیبی مشتق شده از گیاه زرشک کوهی است که به دلیل اثرات بالقوه آن بر اشتها و مدیریت وزن مورد مطالعه قرار گرفته است. برخی تحقیقات نشان می‌دهد که بربرین هیدروکلراید ممکن است به تنظیم اشتها و کاهش وزن کمک کند، اگرچه شواهد متفاوت است. بربرین هیدروکلراید ممکن است به کاهش مصرف غذا و وزن بدن در افراد دارای اضافه وزن و چاق کمک کند. مکانیسم‌های پیشنهادی شامل بهبود حساسیت به انسولین، کاهش التهاب و تعدیل هورمون‌های روده است که بر اشتها تأثیر می‌گذارد (۲۰). مسیر گیرنده ملانوکورتین-۴ در مغز، که تحت تأثیر نورون‌های پرو-آپیوملانوکورتین قرار دارد، نقش

مهمی در تنظیم اشتها و وزن بدن دارد (۳). مسیر POMC-MC4R نقش مهمی در تنظیم اشتها و وزن بدن دارد. نورون‌های POMC در هیپوتالاموس POMC را به هورمون هورمون محرک ملانوسیت آلفا پردازش می‌کنند، که سپس روی نورون‌های بیان‌کننده MC4R برای کاهش مصرف غذا عمل می‌کند. اختلال عملکرد ژن‌ها در این مسیر، مانند کمبود POMC، می‌تواند منجر به چاقی ژنتیکی نادری شود که با هیپرفازی (گرسنگی سیری‌ناپذیر) و چاقی مشخص می‌شود. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که بربرین هیدروکلراید ممکن است به کاهش مصرف غذا و وزن بدن در افراد دارای اضافه وزن و چاق کمک کند. مکانیسم‌های پیشنهادی شامل بهبود حساسیت به انسولین، کاهش التهاب و تعدیل هورمون‌های روده است که بر اشتها تأثیر می‌گذارد (۲۸). اگرچه بربرین نمی‌تواند به راحتی از سد خونی مغزی عبور کند، مطالعات نشان داده‌اند که تجویز حاد بربرین به صورت داخل صفاقی یا خوراکی منجر به افزایش سطح سروتونین در مغز می‌شود. سروتونین مغز مصرف غذا را مهار می‌کند، درحالی‌که کاهش سروتونین مغز باعث پرخوری و افزایش وزن می‌شود (۲۸). بعلاوه، شواهد در مورد اثرات زعفران بر اشتها متفاوت است. در حالی که طب سنتی نشان می‌دهد که زعفران ممکن است دارای خواص کاهش اشتها باشد، تحقیقات محدود مدرن به طور مداوم این ادعا را تایید نمی‌کند. کروسین، یک ترکیب کاروتنوئید طبیعی مشتق شده از زعفران، دارای مزایای بالقوه برای سلامت قلب و عروق است و اثرات آنتی-اکسیدانی بر قلب دارد. کروسین می‌تواند عملکرد قلب را با کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو و همچنین بهبود تغییرات هیستوپاتولوژیک از جمله نکروز سلولی میوکارد، خون‌ریزی، هیپرتروفی و انفیلتراسیون سلولی التهابی بهبود بخشد (۱۹). با این حال، یک

مطالعه بر روی اثرات هیستوپاتولوژیک عصاره گل زعفران در موش نشان داد که این عصاره باعث تغییرات رفتاری از جمله کمبود اشتها برای آب و غذا می‌شود (۲۹). مطالعه دیگری در مورد تأثیر مکمل زعفران بر سطح لپتین سرم در بیماران مبتلا به سندرم متابولیک، هیچ تأثیر قابل توجهی بر لپتین، هورمونی که اشتها و وزن بدن را تنظیم می‌کند، نشان نداد (۳۰). مطالعات بالینی بیشتری برای درک بهتر تأثیر بالقوه زعفران بر تنظیم اشتها مورد نیاز است. در رابطه با نتایج پژوهش حاضر در کاهش بیان ژن‌های POMC و MC4R ناشی از فعالیت بدنی هوازی که به عنوان ورزش قلبی عروقی نیز شناخته می‌شود، سازوکارهای متعددی را محققان مختلف گزارش می‌کنند که با نتایج پژوهش حاضر همسو هستند (۳۱، ۳۲). فعالیت بدنی هوازی کالری می‌سوزاند و بسته به شدت و مدت ورزش می‌تواند منجر به کسری انرژی قابل توجهی شوند. بدن ممکن است با افزایش اشتها برای جبران انرژی مصرف شده به این کمبود پاسخ دهد. بعلاوه در حین و بعد از فعالیت بدنی هوازی، نوسانات هورمونی رخ می‌دهد. به عنوان مثال، سطوح گرلین، هورمونی که گرسنگی را تحریک می‌کند، ممکن است بعد از ورزش افزایش یابد. به طور همزمان، سطح لپتین، هورمونی که سیگنال سیری را نشان می‌دهد، ممکن است به طور موقت کاهش یابد. این تغییرات هورمونی می‌تواند باعث احساس گرسنگی و میل به خوردن شود (۳۳). همچنین فعالیت بدنی هوازی شدید می‌تواند سطح گلوکز خون را کاهش دهد، به خصوص در افرادی که عادت به فعالیت بدنی منظم ندارند یا در حالت ناشتا ورزش می‌کنند. این افت قند خون می‌تواند گرسنگی را تحریک کند زیرا بدن به دنبال بازایی سطح گلوکز خود است و کاهش انسولین موجب افزایش گرلین و کاهش لپتین می‌شود (۳۴). از طرفی، بسیاری از

مطالعات نشان می‌دهند که فعالیت بدنی هوازی می‌تواند بلافاصله پس از جلسه تمرین به طور موقت اشتها را سرکوب کند. این سرکوب اغلب به تغییرات هورمونی مانند افزایش سطح پپتید YY و پپتید شبه گلوکاگون ۱ (GLP-1) نسبت داده می‌شود که با کاهش گرسنگی مرتبط است. تمرینات هوازی با شدت بیشتر ممکن است منجر به سرکوب بیشتر اشتها در مقایسه با تمرینات با شدت کمتر شود (۳۵). با این حال، شدت و مدت زمان دقیق مورد نیاز برای سرکوب اشتها می‌تواند بین افراد متفاوت باشد. فعالیت بدنی هوازی منظم با مدیریت وزن مرتبط است و ممکن است در طولانی مدت به تنظیم اشتها کمک کند. این می‌تواند به تعادل انرژی منفی کمک کند (کالری سوزانده شده بیشتر از مصرف شده)، که برای کاهش وزن یا حفظ وزن بسیار مهم است. فعالیت بدنی هوازی می‌تواند حساسیت به انسولین را بهبود بخشد و توانایی بدن را برای استفاده از چربی به عنوان منبع انرژی افزایش دهد. این سازگاری‌های متابولیک می‌توانند با تثبیت سطح قند خون و کاهش هوس روی تنظیم اشتها تأثیر بگذارند. تحقیقات نشان می‌دهد که اثرات ورزش هوازی بر اشتها ممکن است بین مردان و زنان متفاوت باشد. در برخی از مطالعات، زنان پس از ورزش نسبت به مردان کاهش اشتها بارزتری را تجربه می‌کنند. افراد با سطوح آمادگی جسمانی بالاتر یا ترکیبات بدنی متفاوت (مثلاً لاغر در مقابل اضافه وزن) ممکن است از نظر تنظیم اشتها به تمرینات هوازی واکنش متفاوتی نشان دهند. فعالیت بدنی هوازی به طور مثبت بر خلق و خو تأثیر می‌گذارد و استرس را کاهش می‌دهد، که می‌تواند به طور غیرمستقیم بر تنظیم اشتها تأثیر بگذارد. بهبود خلق و خو و کاهش سطح استرس ممکن است منجر به کنترل بهتر اشتها و کاهش خوردن احساسی شود. برخی از مطالعات نشان می‌دهد که افراد ممکن است

کالری سوزانده شده در طول ورزش را با مصرف بیشتر مواد غذایی پس از آن جبران کنند، که می‌تواند کمبود کالری مورد نظر برای کاهش وزن را خنثی کند. زمان‌بندی و ترکیب وعده‌های غذایی بعد از ورزش می‌تواند بر نحوه تأثیر ورزش بر اشتها تأثیر بگذارد. در نتیجه، در حالی که ورزش هوازی به طور کلی بلافاصله پس از ورزش به دلیل تغییرات هورمونی و اثرات متابولیک، اشتها را سرکوب می‌کند، پاسخ‌های فردی می‌تواند متفاوت باشد. برای مدیریت وزن و فواید کلی سلامت، ترکیب ورزش هوازی منظم با عادات غذایی آگاهانه توصیه می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که فعالیت بدنی هوازی می‌تواند تولید POMC را افزایش دهد. این تولید افزایشی می‌تواند به کنترل اشتها و تنظیم وزن بدن کمک کند به خصوص افزایش در سطح بتا-اندورفین که باعث کاهش اشتها و افزایش حس رضایت می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند که وجود نسخه‌های متفاوت MC4R و همچنین تأثیرات مختلف توالی‌های ژنی آن می‌تواند تأثیرات متفاوتی بر روی پاسخ به فعالیت بدنی و تنظیمات متابولیکی داشته باشد (۳۶).

نتیجه‌گیری

متمم‌های موجب افزایش بیان ژن‌های POMC و MC4R در موش‌های صحرایی ماده شده و زرشک کوهی و کلاله زعفران موجب کاهش بیان این ژن‌ها در هیپوتالاموس می‌شوند. همچنین به نظر می‌رسد ترکیب هردو مداخله موجب هم افزایی و بهبود بیشتر این ژن‌ها شده است.

تقدیر و تشکر

تیم حاضر نهایت تشکر و قدردانی خود را از آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود ابراز می‌کند.

knockout mouse. FASEB J. 2009;23(2):642.

10. Ribeiro FM, Silva MA, Lyssa V, Marques G, Lima HK, Franco OL, Petriz B. The molecular signaling of exercise and obesity in the microbiota-gut-brain axis. Front Endocrinol. 2022;13:927170.

11. Yang LJ, He JB, Jiang Y, Li J, Zhou ZW, Zhang C, et al. Berberine hydrochloride inhibits migration ability via increasing inducible NO synthase and peroxynitrite in HTR-8/SVneo cells. J Ethnopharmacol. 2023;305:116087.

12. Och A, Podgórski R, Nowak R. Biological activity of berberine—a summary update. Toxins. 2020;12(11):713.

13. Han M, Liu Y, Zhang T, Li D, Jiang Q, Zuraini Z. Effect of berberine hydrochloride treatment on transcriptomic response in gill tissue of *Charybdis japonica* infected with *Aeromonas hydrophila*. Front Mar Sci. 2021;8:754588.

14. Lee YS, Kim WS, Kim KH, Yoon MJ, Cho HJ, Shen Y, et al. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. Diabetes. 2006;55(8):2256-64.

15. Luo Y, Yu P, Zhao J, Guo Q, Fan B, Diao Y, et al. Inhibitory effect of crocin against gastric carcinoma via regulating TPM4 gene. Onco Targets Ther. 2021:111-22.

16. Algandaby MM. Crocin prevents metabolic syndrome in rats via enhancing PPAR-gamma and AMPK. Saudi J Biol Sci. 2020;27(5):1310-6.

17. El Tabaa MM, El Tabaa MM, Anis A, Elgharabawy RM, El-Borai NB. GLP-1 mediates the neuroprotective action of crocin against cigarette smoking-induced cognitive disorders via suppressing HMGB1-RAGE/TLR4-NF-κB pathway. Int Immunopharmacol. 2022;110:108995.

18. Tokunaga I, Kubo S-i, Ishigami A, Gotohda T, Kitamura O. Changes in renal

منابع

1. Baldini G, Phelan KD. The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications. J Endocrinol. 2019;241(1):R1-R33.

2. Huvenne H, Dubern B, Clément K, Poitou C. Rare genetic forms of obesity: clinical approach and current treatments in 2016. Obes Facts. 2016;9(3):158-173.

3. Mohammadi F, Younesian A, Zia-ul-Haq SJ. The effect of 8 weeks of endurance training with stevia supplementation on the expression of genes (POMC and MC4R) involved in hypothalamic axis metabolism in obese male wistar rats. Middle East J Disabil Stud. 2023;13(0):8.

4. Zuloaga DG, Jacobskind JS, Raber J. Methamphetamine and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Front Neurosci. 2015; 9:178.

5. Dunigan AI, Roseberry AG. Actions of feeding-related peptides on the mesolimbic dopamine system in regulation of natural and drug rewards. Addict Neurosci. 2022; 2:100011.

6. Chen Y. Regulation of food intake and the development of anti-obesity drugs. Drug Discov Ther. 2016;10(2):62-73.

7. Landry T, Shookster D, Chaves A, Free K, Nguyen T, Huang H. Energy status differentially modifies feeding behavior and POMCARC neuron activity after acute treadmill exercise in untrained mice. Front Endocrinol. 2021;12:705267.

8. Fatima MT, Ahmed I, Fakhro KA, Akil ASAS. Melanocortin-4 receptor complexity in energy homeostasis, obesity and drug development strategies. Diabetes Obes Metab. 2022;24(4):583-98.

9. Haskell-Luevano C, Schaub JW, Andreasen A, Haskell KR, Moore MC, Koerper LM, et al. Voluntary exercise prevents the obese and diabetic metabolic syndrome of the melanocortin-4 receptor

- has the bidirectional effects on appetite in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Fish Physiol Biochem*. 2018;44:411-422.
27. Kobeissy FH, Jeung JA, Warren MW, Geier JE, Gold MS. Preclinical Study: Changes in leptin, ghrelin, growth hormone and Neuropeptide-Y after an acute model of MDMA and methamphetamine exposure in rats. *Addict Biol*. 2008;13(1):15-25.
 28. Uwaifo F, John-Ohimai F. Body weight, organ weight, and appetite evaluation of adult albino Wistar rats treated with berberine. *Int J Health Allied Sci*. 2020; 9(4):329.
 29. Abd AA, Salah BAAM, Al-Azow NS. Histopathological Effects Of Ethanolic Extract of Saffron Flowers *Crocus sativus* L. On Stomach And Small Intestine of White Mice Females *Mus musculus*. *Tikrit J Pure Sci*. 2018;23(4):10-16.
 30. Zilae M, Soukhtanloo M, Kermani T, Ghayour MM, Alidade M, Shemshian M, et al. Oral: effect of saffronon serum leptin levels in paitients with metabolic syndrome, a double-binded, randomized and plecebe controlled trial study. *J Aerosp Mech*. 2014; 1(1):48.
 31. Rodrigues KCDC, Pereira RM, Campos TDd, Moura RFd, Silva ASd, Cintra DE, et al. The role of physical exercise to improve the browning of white adipose tissue via POMC neurons. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:88.
 32. Benite-Ribeiro SA, Putt DA, Santos JM. The effect of physical exercise on orexigenic and anorexigenic peptides and its role on long-term feeding control. *Med Hypotheses*. 2016;93:30-33.
 33. Smith JK .Exercise, obesity and CNS control of metabolic homeostasis: a review. *Front Physiol*. 2018;9:339961.
 34. Shojaei M. A systematic review of the relationship between sex hormones and leptin and insulin resistance in men. *Eurasian J Chem Med Pet Res*. 2024; 3(2):443-453.
 - function and oxidative damage in methamphetamine-treated rat. *Leg med*. 2006;8(1):16-21.
 19. Norallahpour S, Abbassi dalooi A , Ziaolhagh Sj, Barari A. The Protective Effects of Endurance Training and Crocin on Tissue Changes of the Cerebral Cortex in an Animal Model of Methamphetamine Addiction. *Res Addict*. 2023;17(68):181-200.
 20. Mortezaei Z, Rajabi S, Ziaolhagh SJ . The Effect of Aerobic Training and Berberine Supplementation on the Expression of Dopamine 4 Receptor and CREB Gene in Heart Tissue of Female Rats During Withdrawal from Methamphetamine. *J Arak Univ Med Sci*. 2023;26(3):18-24.
 21. Sajadi A, Amiri I, Gharebaghi A, Komaki A, Asadbeigi M, Shahidi S, et al. Treadmill exercise alters ecstasy-induced long-term potentiation disruption in the hippocampus of male rats. *Metabol Brain Disease*. 2017;32:1603-1607.
 22. Adler M, Alon U. Fold-change detection in biological systems. *Curr Opin Syst Biol*. 2018;8:81-89.
 23. Shevchouk OT, Tufvesson-Alm M, Jerlhag E. An overview of appetite-regulatory peptides in addiction processes; from bench to bed side. *Front Neurosci*. 2021;15:774050.
 24. Hsieh YS, Chen PN, Yu CH, Kuo DY. Central dopamine action modulates neuropeptide-controlled appetite via the hypothalamic PI3K/NF-κB-dependent mechanism. *Genes Brain Behav*. 2014; 13(8):784-793.
 25. Sustkova-Fiserova M, Charalambous C, Khryakova A, Certilina A, Lapka M, Šlamberová R. The role of ghrelin/GHS-R1A signaling in nonalcohol drug addictions. *Int J Mol Sci*. 2022;23(2):761.
 26. Zhang X, Gao Y, Tang N, Qi J, Wu Y, Hao J, et al. One evidence of cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART)

36. Halliday TM, White MH, Hild AK, Conroy MB, Melanson EL, Cornier MA. Appetite and energy intake regulation in response to acute exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2021;53(10):2173.

35. Beaulieu K, Blundell JE, van Baak MA, Battista F, Busetto L, Carraça EV, et al. Effect of exercise training interventions on energy intake and appetite control in adults with overweight or obesity: A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2021; 22:e13251.

Research Article

The Effect of High-Intensity Interval Training and High-Protein Diet on Plasma Levels of Apolipoprotein A1 and B and Lipid Profile in obese Male Rats

Marziyeh Saghebjo¹, Mahdi Aliakbari^{2*}, Haniyeh Habibi Sangani¹

1- Department of Sport Sciences, Faculty of Sport Sciences, University of Birjand, Birjand, Iran

2- Department of Physical Education and Sport Sciences, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author: mahdi.aliakbari@iau.ac.ir

Received: 25 November 2024

Accepted: 13 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1191534

Abstract

Obesity is associated with lipid disorders and a significant increase in cardiovascular diseases. This study aimed to investigate the effect of 10 weeks of high-intensity interval training (HIIT) and high-protein diet (HPD) on the plasma levels of apolipoprotein A1 and B and lipid profile in obese male rats. 40 obese male Wistar rats in five groups ($n = 8$): HIIT, HPD, HPD+HIIT, obese control-A (OC-A), and obese control-B (OC-B) and eight rats were also studied as normal control group (NC). Training groups, ran five days a week for 10 weeks with at the about intensity of 90% of maximum oxygen uptake on the treadmill. After the end of the intervention, blood sampling was done and the levels of apolipoproteins ApoA1, ApoB, and lipid profile were measured in plasma. The data were analyzed using one-way analysis of variance and Tukey's post-hoc tests at a significance level of $p < 0.05$. The plasma level of HDL-C was significantly higher in the NC group than in the OC-A group ($p < 0.05$), but no significant difference was observed between the other groups ($p > 0.05$). The TC/HDL-C and LDL-C/HDL-C ratios in the NC and HIIT+HPD groups were significantly lower compared with the OC-A group ($p < 0.05$), while no significant difference was observed between the other groups ($p > 0.05$). Also, triglyceride-glucose index (TyG) was significantly lower in the NC, OC-B, HIIT, HPD, and HIIT+HPD groups than in the OC-A group ($p < 0.05$). No significant difference were observed in the plasma levels of ApoA1, ApoB, ApoB/ApoA1, Triglyceride (TG), Total cholesterol (TC), Low-density lipoprotein (LDL-C), and Very low density lipoprotein (vLDL-C) among the groups ($p > 0.05$). It seems that doing HIIT along with HPD can prevent possible metabolic complications caused by obesity and high-fat diets by improving the lipid profile.

Keywords: Exercise training, Diet, Insulin resistance, Lipid profile, Obesity.

مقاله پژوهشی

اثر تمرین تناوبی شدید و رژیم غذایی پرپروتئین بر سطوح پلاسمایی آپولیپوپروتئین A1 و B و پروفایل لیپیدی در موش‌های صحرایی نر چاق

مرضیه ثاقب‌جو^۱، مهدی علی‌اکبری^{۲*}، هانیه حبیبی سنگانی^۱

۱- گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

۲- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد تهران جنوب، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

* مسئول مکاتبات: mahdi.aliakbari@iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۵

DOI: 10.60833/ascij.2025.1191534

چکیده

چاقی با اختلالات لیپیدی و افزایش قابل توجه بیماری‌های قلبی-عروقی همراه است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر ۱۰ هفته تمرین تناوبی شدید (HIIT) و رژیم غذایی پرپروتئین (HPD) بر سطوح پلاسمایی آپولیپوپروتئین A1 و B و پروفایل لیپیدی در موش‌های صحرایی نر چاق بود. ۴۰ سر موش صحرایی نر ویستار چاق در پنج گروه هشت‌تایی: HPD، HIIT، HIIT+HPD، کنترل چاق A (OC-A) و کنترل چاق B (OC-B) و هشت سر موش به‌عنوان گروه کنترل نرمال (NC) مورد مطالعه قرار گرفتند. گروه‌های تمرین، پنج روز در هفته به مدت ۱۰ هفته با شدت حدود ۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی روی نوارگردان دویند. پس از پایان مداخله، نمونه‌گیری خون انجام و سطوح آپولیپوپروتئین‌های ApoB، ApoA1 و پروفایل لیپیدی در پلاسمای حاصل اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی آنالیز شدند. سطح پلاسمایی HDL-C به‌طور معنی‌داری در گروه NC بالاتر از گروه OC-A بود ($p < 0/05$)، اما بین سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). نسبت‌های TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C در گروه‌های NC و HIIT+HPD در مقایسه با گروه OC-A به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود ($p < 0/05$)، در حالی‌که بین سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). همچنین تری‌گلیسرید-گلوکز (TyG) نیز به‌طور معنی‌داری در گروه‌های NC، OC-B، HIIT، HPD و HIIT+HPD پایین‌تر از گروه OC-A بود ($p < 0/05$). در سطوح پلاسمایی ApoB، ApoA1، ApoB/ApoA1، تری‌گلیسرید، کلسترول تام، لیپوپروتئین با چگالی پایین و لیپوپروتئین با چگالی بسیار پایین بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). به نظر می‌رسد انجام HIIT همراه با HPD به‌واسطه بهبود پروفایل لیپیدی می‌تواند از عوارض متابولیک احتمالی ناشی از چاقی و رژیم‌های غذایی پرچرب جلوگیری کنند.

کلمات کلیدی: تمرین ورزشی، رژیم غذایی، مقاومت به انسولین، پروفایل لیپیدی، چاقی.

مقدمه

شود (۱) و نقش چشمگیری در بروز بسیاری از اختلالات فیزیولوژیکی، عوارض کاردیومتابولیکی و بیماری‌های قلبی-عروقی (CVD) دارد (۲، ۳). در

چاقی یک اختلال متابولیکی مزمن و چندعاملی پیچیده‌ای است که با تجمع غیرطبیعی چربی در بدن به دلیل عدم تعادل در متابولیسم انرژی مشخص می‌

میان CVD، آترواسکلروزیس عامل عمده مرگ و میر است (۴) و عواملی مثل سن بالا، چاقی، کم تحرکی، اختلال تحمل گلوکز و دیس لیپیدمی در بروز آن نقش اساسی دارند (۵). دیس لیپیدمی با کاهش لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL-C) و افزایش کلسترول تام (TC)، تری‌گلیسرید (TG)، لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL-C) و لیپوپروتئین با چگالی بسیار پایین (vLDL-C)، عامل مهم زمینه‌ساز خطر برای آترواسکلروزیس و CVD است (۶). لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) با تأثیرات ضد التهابی، ضد آتروژنیک و ضد ترومبوزی خود، می‌تواند عامل محافظتی مهم برای قلب باشد (۷). چربی‌های پلاسما و در بین آن‌ها LDL-C با توجه به داشتن اثر آتروژنیک، نقش پررنگ‌تری در تنگی عروق داشته باشد، لذا نسبت LDL-C به HDL-C (LDL-C/HDL-C) پیشگوکننده خوبی برای خطر ابتلا به بیماری کرونری قلب می‌باشد (۸). vLDL-C به‌عنوان عاملی خطر ساز در حوادث قلبی-عروقی مطرح است (۹) که افزایش آن می‌تواند باعث افزایش ضخامت و سفتی عروق شود (۱۰). کلسترول نیز معروف‌ترین استروئید و یک لیپید آمفی‌پاتیک است که با CVD ارتباط دارد. با وجود نقش مهم HDL-C در برابر CVD، ولی نسبت TC/HDL-C می‌تواند در محافظت در برابر عوارض و شدت CVD شاخص حساس‌تری باشد (۱۱). افزایش سطح TG در خون با ترشح انسولین همبستگی منفی دارد و منجر به رسوب چربی در بدن و افزایش سطح TG در سلول‌های عضلانی و در نتیجه مقاومت به انسولین می‌شود. کنترل پروفایل لیپیدی یکی از اجزای ضروری اصلاح شاخص‌های خطر ساز CVD است. امروزه متغیرهای دیگری به‌نام آپولیپوپروتئین (Apo) به‌عنوان ایجادکننده CVD مطرح شده‌اند. آپوها، پروتئین‌های کلیدی در سنتز انواع ذرات لیپیدی هستند و نقش کوآنزیمی بازی

می‌کنند، ممکن است بر مصرف انرژی تأثیر بگذارند (۱۲) و از طریق متابولیسم لیپوپروتئین یا مسیرهای سیگنال‌دهی انسولین، اثرات ضد التهابی داشته باشند (۱۳). بر اساس تنوع و عملکردهای بیولوژیکی متفاوتی که Apoها دارند به پنج دسته A، B، C، D و E طبقه‌بندی می‌شوند که هر کدام دارای زیرمجموعه‌هایی مانند AI، AII، AIV و AV در طبقه A، B48 و B100 در طبقه B، CI، CII و CIII در طبقه C، E2، E3 و E4 در طبقه E هستند (۱۴). در این بین ApoA و ApoB به‌شدت با خطر ابتلا به بیماری آترواسکلروزیس مرتبط هستند (۱۵). آپوA1 حدود ۷۰ درصد HDL-C پلاسما را تشکیل می‌دهد (۱۶) و سطح بیان آن توسط غلظت HDL-C تعیین می‌شود (۱۷). ApoA1 با فعال کردن لستین کلسترول آسیل ترانسفراز (LCAT) در انتقال معکوس TC و تبدیل آن به HDL-C نقش داشته و با کاهش مسیر سیگنالینگ فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده زنجیره سبک کاپا از لنفوسیت‌های B فعال‌شده (NF-kB)، التهاب را در بافت چربی بهبود می‌بخشد (۱۸). همچنین ApoA1 دارای اثرات ضد چاقی است و منجر به کاهش وزن و توده چربی از طریق افزایش مصرف انرژی به‌واسطه افزایش بیان ژن پروتئین جفت نشده ۱ (UCP1) می‌شود (۱۳). به‌علاوه ApoA1 نسبت به HDL-C برای پیش‌بینی بیماری‌های قلبی از جمله آترواسکلروزیس از حساسیت و دقت بیشتری برخوردار است (۱۸). ApoA1 می‌تواند مسئول ایجاد سازوکارهای محافظتی در برابر آترواسکلروزیس باشد. ApoB بخش اصلی LDL-C و vLDL-C است، اما بیشتر از ۹۰ درصد آن در LDL-C یافت می‌شود که با خطر بروز CVD رابطه مستقیم دارد (۱۹). به‌دلیل این‌که سطح ApoB قبل از LDL-C افزایش می‌یابد، خطر بیماری عروق کرونری را می‌تواند بهتر از آن پیش‌بینی کند. ApoB آتروژن را تحریک کند زیرا

با قرار گرفتن در دیواره شریانی، اکسیده و گلیکوزیله شده و می‌تواند در فرآیند تشکیل پلاک نقش داشته باشد و عاملی خطر ساز برای بیماری‌های انسداد عروق کرونری باشد و امکان پدید آمدن آترواسکلروزیس را افزایش دهد. بنابراین نسبت ApoB به ApoA1 (ApoB/ApoA1) که ممکن است تعادل TC بین ذرات لیپوپروتئین آتروژنیک (LDL-C) و آنتی‌آتروژنیک (HDL-C) را منعکس کند، می‌تواند پیش‌بینی‌کننده قوی و مهمی برای خطر CVD و شاخص حساس‌تری نسبت به LDL-C و TC باشد (۲۰). بنابراین ApoB/ApoA1 می‌تواند یک شاخص مهم و قابل اعتماد در ارزیابی خطر بروز CVD باشد. فعالیت‌های ورزشی به‌عنوان راهکاری عملی و کاربردی، می‌تواند به پیشگیری و درمان چاقی و اختلالات قلبی- متابولیکی مربوط به آن کمک کند و باعث کاهش نشانگرهای خطر زای CVD شود (۲۱). تمرین تناوبی شدید (HIIT) نسبت به شیوه‌های دیگر تمرینی، تأثیرات و مزایای بیشتری در ارتباط با سلامت قلبی- عروقی و کاهش چربی دارا بوده است (۲۲). این تمرین با افزایش بیورنز میتوکندری و محتوی آن باعث افزایش آنزیم‌ها و هورمون‌های موثر در اکسایش چربی شده و تجزیه چربی را تسهیل و در نتیجه به کاهش وزن موثر منجر می‌شود (۲۳). این روش تمرینی می‌تواند با افزایش سطح HDL-C و کاهش سطوح TG، TC، LDL-C، و نسبت LDL-C/HDL-C و کاهش سطح vLDL-C باعث بهبود پروفایل لیپیدی در شرایط چاقی و اضافه وزنی شود (۲۴). HIIT می‌تواند باعث افزایش معنی‌دار ApoA1 و کاهش معنی‌دار ApoB و ApoB/ApoA1 در موش-های صحرایی نر مبتلا به دیابت شود. یک دوره HIIT باعث افزایش ApoA1 و کاهش معنی‌دار ApoB و ApoB/ApoA1 در موش‌های صحرایی نر سالمند شد (۲۵). هشت هفته تمرین عملکردی شدید نیز سطوح

سرمی TG، LDL-C، HDL-C، ApoB، ApoA1 و ApoB/ApoA1 مردان و زنان سالمند را به‌طور معنی‌داری بهبود بخشید (۲۶). استفاده از رژیم‌های غذایی با پروتئین بالا (HPD) می‌تواند از طریق کاهش انرژی دریافتی، افزایش مصرف انرژی و ایجاد سیری در کاهش وزن، بهبود پارامترهای قلبی- متابولیکی و مقاومت به انسولین تأثیرگذار باشند (۲۷). با این وجود، تأثیر HPD بر عوامل خطر ساز CVD هنوز به وضوح مشخص نشده و به موضوعی بحث برانگیز تبدیل شده است. از یک سو HPD، ممکن است خطر بروز CVD و دیابت نوع ۲ را افزایش دهد و باعث تقویت آتروژنز در مدل‌های حیوانی شود و با افزایش قابل توجه غلظت اسیدهای آمینه خون، مونوسیت‌ها و ماکروفاژهای بافتی دخیل در تشکیل پلاک آترواسکلروتیک و همچنین افزایش فعالیت مسیر سیگنالینگ هدف راپامایسین در پستانداران (mTOR)، باعث پیشرفت پلاک شود (۲۸). HPD می‌تواند در کاهش LDL-C، TC و TG به‌عنوان عوامل خطر اصلی برای CVD، نقش موثری ایفا کند (۲۹). بعد از ۲۴ هفته HPD در افراد دیابتی، افزایش معنی‌دار HDL-C، کاهش معنی‌دار TC/HDL-C و بهبود غیرمعنی‌دار سطوح LDL-C و TG مشاهده شد (۱۱). HPD می‌تواند به‌عنوان یک راهبرد مهم برای کاهش وزن، بهبود پروفایل لیپیدی، تحمل گلوکز و بیماری‌های وابسته به چاقی به کار گرفته شود. مطالعه حاضر به بررسی اثر HIIT و HPD به‌تنهایی و در ترکیب با یکدیگر بر سطوح پلاسمایی ApoA1 و ApoB و پروفایل لیپیدی موش‌های صحرایی نر چاق پرداخته است.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر، تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر ویستار چاق (سن: ۱۲ هفته، میانگین وزنی ۳۱/۷۹

$\pm 386/46$ گرم) و هشت سر موش صحرایی نور و استار با وزن نرمال (سن: ۱۲ هفته، میانگین وزنی: $22/26 \pm 283/10$ گرم)، از مرکز پرورش حیوانات موسسه پاستور (کرج، ایران) خریداری شدند و پس از انتقال حیوانات به آزمایشگاه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند، با دسترسی آزاد به غذا و آب در تمامی مراحل مطالعه، داخل قفس‌های شفاف پلی‌کربنات با چهار موش در هر قفس، با رطوبت نسبی 40 ± 5 درصد، دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت (هفت صبح، هفت شب) نگهداری شدند. در پایان دوره یک هفته-ای آشنایی با محیط آزمایشگاه، موش‌های چاق (که از سن چهار تا ۲۳ هفتگی، دریافت‌کننده رژیم غذایی پرچرب بودند) به صورت تصادفی به پنج گروه هشت تایی شامل: HIIT (تمرین ورزشی همراه با ادامه دریافت رژیم غذایی پرچرب تا پایان مطالعه)، HPD (قطع رژیم غذایی پرچرب در شروع مطالعه و جایگزینی رژیم غذایی پروتئین تا پایان مطالعه)، HIIT+HPD (تمرین ورزشی همراه با قطع رژیم غذایی پرچرب در شروع مطالعه و جایگزینی رژیم غذایی پروتئین تا پایان مطالعه)، OC-A (کنترل چاق A: ادامه رژیم غذایی پرچرب در طول مطالعه) و OC-B (کنترل چاق B: قطع رژیم غذایی پرچرب در شروع مطالعه و شروع رژیم غذایی نرمال) و هشت سر موش نیز در گروه NC (وزن نرمال دارای رژیم غذایی نرمال) تقسیم شدند.

اندازه‌گیری شاخص‌های آنروپومتریکی: در شروع مطالعه و بعد از ۱۰ هفته مداخله تمرین و رژیم غذایی، وزن، قد و شاخص لی موش‌ها اندازه‌گیری شد. از ترازوی دیجیتال (حساسیت ۰/۱ گرم، ساخت شرکت Kern کشور آلمان، مدل N47-440) جهت وزن‌کشی، از کولیس دیجیتال (حساسیت ۰/۰۱ میلی-متر، ساخت شرکت Insizze کشور چین، مدل 1108-

300) برای اندازه‌گیری قد موش‌ها و از شاخص لی ($1000 \times \sqrt[3]{\frac{\text{وزن (گرم)}}{\text{قد (سانتی‌متر)}}}$) برای تعیین چاقی موش‌ها استفاده شد. بر اساس این شاخص، موش‌هایی که شاخص لی آن‌ها بیشتر از ۳۱۰ بود، چاق محسوب شدند (۳۰).

رژیم‌های غذایی پرچربی، پروتئین و نرمال: موش‌های گروه HIIT و گروه OC-A به مدت ۱۰ هفته با رژیم غذایی پرچرب حاوی ۶۰ درصد کالری از چربی، ۲۰ درصد از کربوهیدرات و ۲۰ درصد از پروتئین (۳۰)، موش‌های گروه HPD و گروه HIIT+HPD با یک رژیم غذایی پروتئین حاوی ۱۵ درصد کالری از چربی، ۲۷/۵ درصد از کربوهیدرات و ۵۷/۵ درصد از پروتئین و موش‌های گروه‌های OC-B و NC با رژیم غذایی نرمال مخصوص جوانندگان آزمایشگاهی حاوی ۱۳/۵ درصد چربی، ۵۹/۵ درصد کربوهیدرات و ۲۷ درصد پروتئین تغذیه شدند (۳۱). غذاهای مورد استفاده در این مطالعه از پژوهشکده زیست فناوری رویان (اصفهان، ایران) به صورت پلت تهیه شد.

پروتکل HIIT: در ابتدای مطالعه، موش‌های گروه HIIT، به مدت پنج روز، ۱۰ دقیقه در روز با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه با دویدن روی نوارگردان مخصوص جوانندگان سازگار شدند. سپس با شروع برنامه HIIT، موش‌ها پنج روز در هفته به مدت ۱۰ هفته، با شدت ۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی، روی نوارگردان با شیب صفر درجه دویدند. هفته اول هر جلسه تمرین با پنج تناوب ۳۰ ثانیه‌ای با سرعت ۲۹ متر بر دقیقه همراه با یک دقیقه استراحت فعال بین دو تناوب (با سرعت ۱۳ متر بر دقیقه، معادل ۴۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) انجام شد. هر هفته یک متر بر دقیقه به سرعت نوارگردان و یک تناوب نیز به تعداد تناوب‌ها افزوده شد؛ به‌طوری‌که در پایان هفته هشتم، تعداد تناوب‌ها به ۱۲ و سرعت دویدن به ۳۶ متر بر

دقیقه (معادل ۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) رسید. در مطالعه حاضر به مدت ۱۰ هفته طراحی شد و برنامه هفته هشتم تا هفته دهم ثابت ماند. هر جلسه HIIT دارای پنج دقیقه گرم کردن و پنج دقیقه سرد کردن (هر دو با سرعت ۱۳ متر در دقیقه) همراه بود. تحریک دویدن موش‌ها روی نوارگردان، با همزمانی اعمال شوک الکتریکی خفیف و محرک صوتی (ضربه به دیوار نوارگردان) در جلسات اول و در ادامه، استفاده از محرک صوتی به تنهایی، انجام شد.

نمونه‌گیری خون و سنجش‌های بیوشیمیایی: پس از سپری شدن ۴۸ ساعت از آخرین جلسه مداخله و شرایط ناشتایی ۱۲ ساعته، با تزریق درون صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) موش‌ها بیهوش شدند. در ناحیه شکم و قفسه سینه موش‌ها برش ایجاد و از بطن چپ قلب ۱۰ میلی‌لیتر خون گرفته و در لوله‌های حاوی محلول اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ریخته شد. نمونه‌های خون جهت جداسازی پلاسما، ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و پس از انتقال به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری، تا زمان سنجش متغیرها در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت تعیین سطوح پلاسمایی ApoA1 و ApoB از روش ایمونوتوربیدیمتریک (با استفاده از کیت آزمایشگاهی شرکت پارس آزمون، کرج، ایران) به ترتیب با حساسیت ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در دسی‌لیتر استفاده شد. همچنین جهت اندازه‌گیری سطوح پلاسمایی TC، TG و HDL-C از روش رنگ‌سنجی آنزیمی (با استفاده از کیت‌های تحقیقاتی شرکت پارس آزمون، کرج، ایران) به ترتیب با حساسیت پنج، پنج و یک میلی‌گرم در دسی‌لیتر استفاده گردید. سطوح پلاسمایی LDL-C و vLDL-C به ترتیب با استفاده از فرمول‌های فریدوالد ($LDL-C = [TC -$

$TG/5 - HDL-C]$) و TG/5 محاسبه گردید و شاخص TyG نیز با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد:

TyG: $Ln [fasting triglycerides (mg/dL) \times fasting glucose (mg (dL)/2] plasma$
روش‌های آماری: در ابتدا از آزمون شاپیرو-ویلک به منظور بررسی نرمال بودن توزیع داده‌های خام و از آزمون لون جهت بررسی فرض برابری واریانس‌ها استفاده شد. با توجه به برقراری پیش‌فرض‌ها، جهت آنالیز آماری داده‌ها و مقایسه بین گروه‌ها، در محیط نرم‌افزار SPSS 22، آزمون‌های آنالیز واریانس یک-طرفه و تعقیبی توکی استفاده گردید. سطح معنی‌داری آزمون‌های آماری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

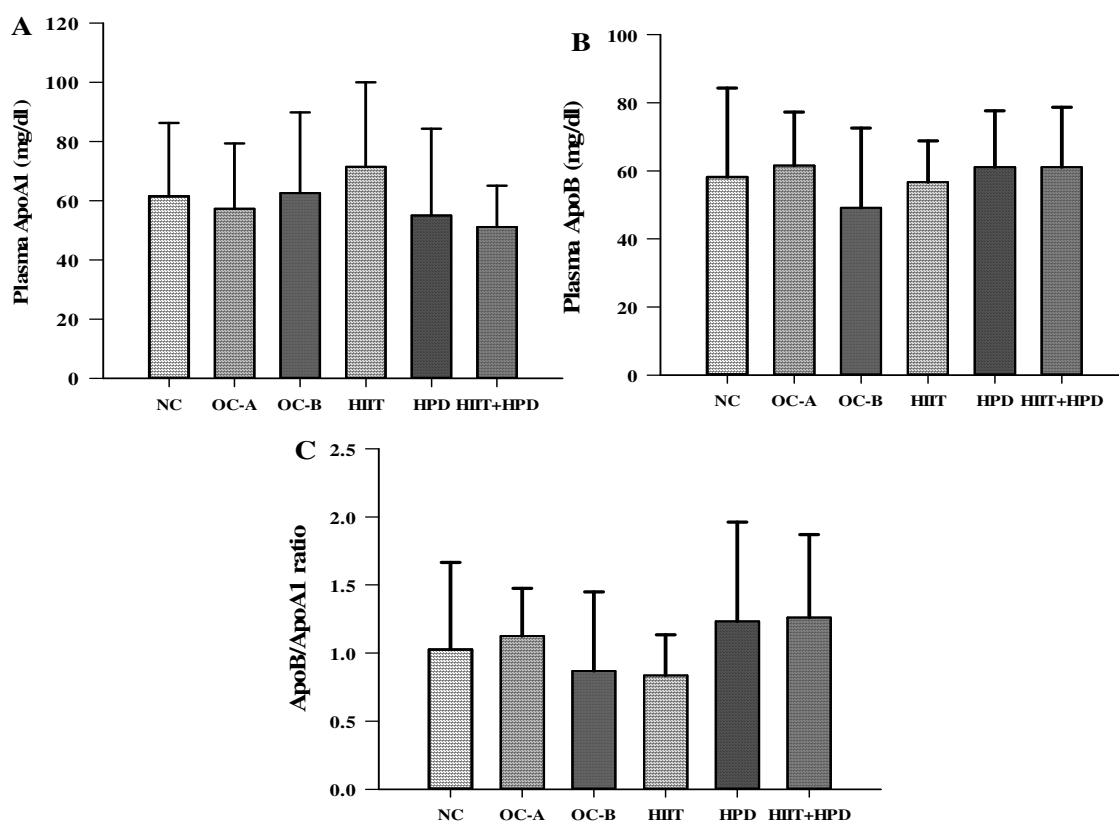
مقادیر میانگین و انحراف استاندارد وزن و شاخص لی موش‌ها قبل و بعد از ۱۰ هفته مداخله در گروه‌های تحقیق در جدول ۱ ارائه شده است (جدول ۱).

آپولیپوپروتئین: تفاوت معنی‌داری در سطوح ApoA1 و ApoB پلاسما و نسبت ApoB/ApoA1 بین گروه‌های مطالعه وجود ندارد (مقادیر P به ترتیب ۰/۳۱، ۰/۳۴ و ۰/۱۵) (شکل ۱).

پروفایل لیپیدی: تفاوت معنی‌دار سطح HDL-C پلاسما بین گروه‌های مورد مطالعه مشاهده شد ($p = 0.02$) ($F_{0.05, 2} = 2.88$). سطح HDL-C پلاسما در گروه NC به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل چاق-A بود ($p = 0.03$). از طرفی بین سایر گروه‌ها در سطح HDL-C پلاسما تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$) (شکل ۳. A). همچنین، نتایج حاصل عدم تغییر معنی‌دار سطوح LDL-C، vLDL-C و TC و TG پلاسما را بین گروه‌های مورد مطالعه نشان داد (مقادیر P به ترتیب ۰/۱۲، ۰/۱۳، ۰/۲۴، ۰/۱۳) (شکل ۳. B، C، D و E). نتایج تحقیق، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها در نسبت سطوح TC/HDL-C ($p = 0.004$)

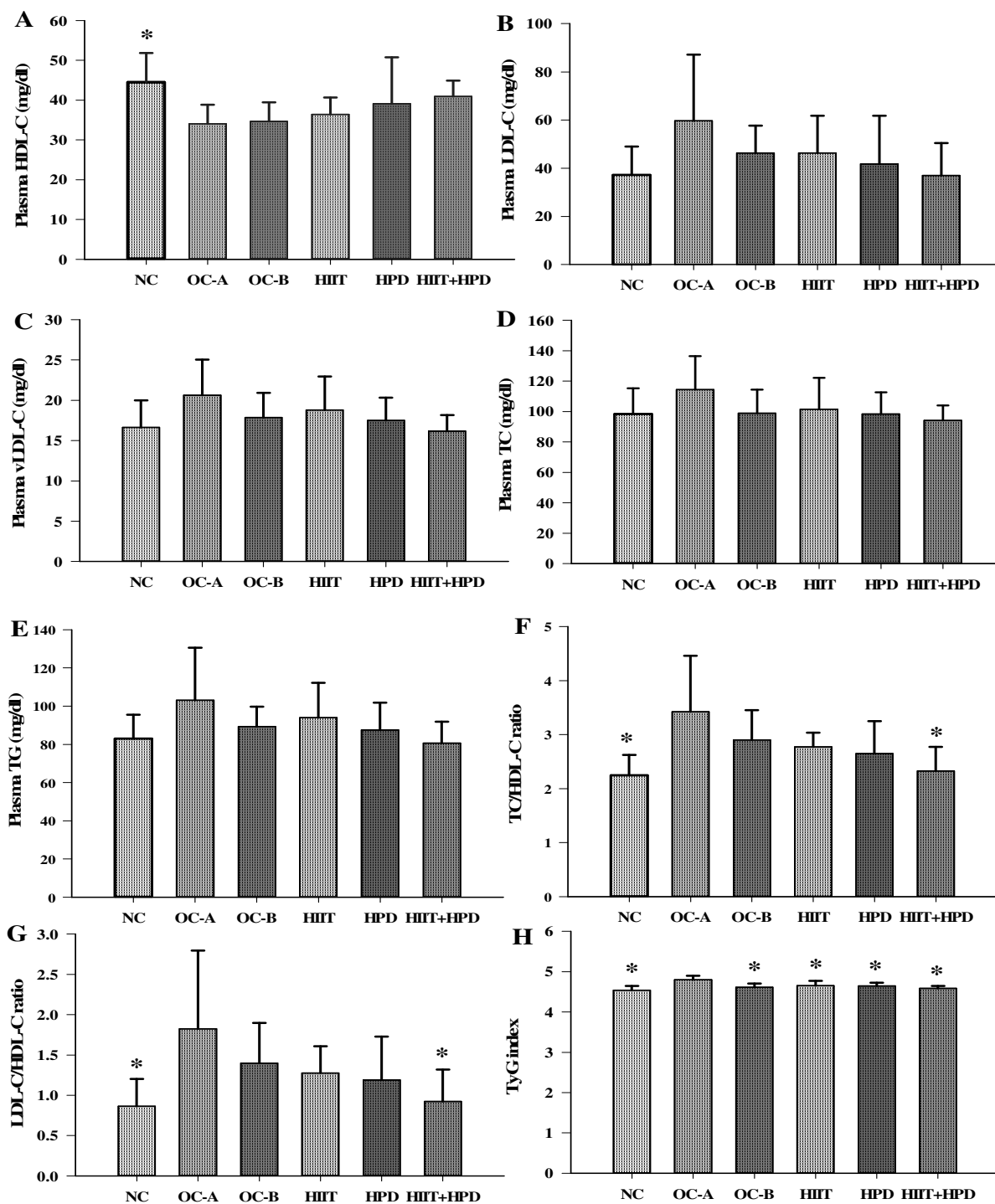
شاخص تری‌گلیسرید-گلوکز (TyG): در شاخص TyG تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده گردید ($F_{0.05}=6.87$, $p < 0.001$). بر اساس نتایج آزمون تعقیبی توکی، شاخص TyG در گروه‌های HIIT HPD، ($p = 0.001$) HIIT+HPD، ($p = 0.05$) NC و ($p = 0.02$) کنترل چاق-B ($p = 0.005$) و ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه کنترل چاق-A به طور معنی‌داری پایین‌تر بود. بین سایر گروه‌ها در شاخص TyG تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$) (شکل ۲. H).

، ($F_{0.05}=4.10$) و LDL-C/HDL-C ($p = 0.01$) نشان داد. نسبت سطوح TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C در گروه‌های NC (مقادیر p به‌ترتیب ۰/۰۰۴ و ۰/۰۱) و HIIT+HPD (مقادیر p به‌ترتیب ۰/۰۰۸ و ۰/۰۲) در مقایسه با گروه کنترل چاق-A به طور معنی‌داری پایین‌تر است. بین سایر گروه‌ها در نسبت سطوح TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$) (شکل ۳، F و G).



شکل ۱- سطوح پلاسمایی (A) ApoA1: آپولیپوپروتئین A1، (B) ApoB: آپولیپوپروتئین B و (C) نسبت ApoB/ApoA1 در گروه‌های مورد مطالعه. NC: گروه کنترل نرمال (رژیم غذایی نرمال)، OC-A: کنترل چاق-A (رژیم غذایی پر چرب)، OC-B: کنترل چاق-B (قطع رژیم غذایی پر چرب و مصرف رژیم غذایی نرمال)، HIIT: تمرین تناوبی شدید، HPD: رژیم غذایی پرپروتئین.

Fig. 1. Plasma levels of (A) ApoA1: apolipoprotein A1, (B) ApoB: apolipoprotein B and (C) ApoB/ApoA1 ratio in the study groups. NC: normal control group (normal diet), OC-A, obese control-A (high-fat diet), OC-B: obese control-B (high-fat diet discontinued and normal diet consumed), HIIT: high-intensity interval training, HPD: high-protein diet.



شکل ۲- سطوح پلاسمایی (A) HDL-C: لیپوپروتئین با چگالی بالا، (B) LDL-C: لیپوپروتئین با چگالی پایین، (C) vLDL-C: لیپوپروتئین با چگالی پایین، (D) TC: کلسترول تام، (E) TG: تری‌گلیسرید، (F) نسبت TC/HDL-C، (G) نسبت LDL-C/HDL-C-ratio و (H) TyG: شاخص تری‌گلیسرید - گلوکز در گروه‌های مورد مطالعه. * تفاوت معنی‌دار با گروه OC-A (کنترل چاق-آ) ($p < 0.05$).

Fig. 2. Plasma levels of (A) HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol, (B) LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol, (C) vLDL-C: very low-density lipoprotein cholesterol, (D) TC: total cholesterol, (E) TG: triglyceride, (F) TC/HDL-C ratio, (G) LDL-C/HDL-C ratio and (H) TyG: triglyceride-glucose index in the study groups. * Significant difference with the OC-A group (obese control-A) ($p < 0.05$).

جدول ۱- مقادیر وزن و شاخص لی موش‌ها قبل و بعد از ۱۰ هفته رژیم غذایی و تمرین تناوبی شدید (میانگین $\pm$ انحراف استاندارد)

Table 1. Weight and Lee index values of rats before and after 10 weeks of diet and (Mean $\pm$ SD)

Groups	Normal control	Obese control-A	Obese control-B	HIIT	HPD	HIIT + HPD
Body weight (g) before	283.10 $\pm$ 42.26	395.78 $\pm$ 38.82	388.18 $\pm$ 34.67	390.37 $\pm$ 38.82	370.53 $\pm$ 19.81	387.47 $\pm$ 26.83
Lee index before	301.19 $\pm$ 4.96	331.78 $\pm$ 9.43	327.61 $\pm$ 7.09	338.52 $\pm$ 16.66	323.73 $\pm$ 8.29	334.55 $\pm$ 15.29
Body weight (g) after	419.06 $\pm$ 49.26	524.70 $\pm$ 48.87	505.38 $\pm$ 49.80	442/93 $\pm$ 29.86	374.50 $\pm$ 26.57	381.23 $\pm$ 21.53
Lee index after	318.81 $\pm$ 2.53	338.45 $\pm$ 8.38	327.29 $\pm$ 3.85	315.86 $\pm$ 4.57	304.13 $\pm$ 3.11	306.85 $\pm$ 2.56

Normal control: Normal weight control with normal diet, Obese control-A: Obese control with high-fat diet, Obese control-B: Obese control with normal diet, HIIT: High-intensity interval training with high-fat diet, HPD: High-protein diet.

بحث

را تحریک کند؛ زیرا با قرار گرفتن در دیواره شریانی، اکسیده و گلیکوزیله شده و می‌تواند در فرآیند تشکیل پلاک نقش ایفا کند (۲۵). در پژوهش حاضر سطوح پلاسمایی ApoB، ApoA و نسبت ApoB/ApoA1 تمایل به بهبود نشان داد. در بررسی عوامل مؤثر بر نتایج مطالعات، متغیرهای زیادی مانند سن، جنسیت، رژیم غذایی، نوع نمونه (انسان یا حیوان و حتی نوع حیوان مورد مطالعه)، میانگین سنی آزمودنی‌ها، سابقه بیماری‌هایی مانند دیابت، چاقی و اضافه وزن و همچنین نوع، شدت، حجم و مدت دوره تمرین ذکر شده است (۳۳). بنابراین جهت درک بهتر تاثیر HIIT و HPD بر ApoB و ApoA1 و عوامل خطر قلبی-عروقی نیاز به مطالعات بیشتری است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد سطح HDL-C پلاسما در گروه NC نسبت به گروه کنترل چاق-A به‌طور معنی‌داری بالاتر بود و نسبت‌های TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C نیز در گروه‌های NC و HIIT+HPD در مقایسه با گروه کنترل چاق-A به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود. علاوه بر تمرین ورزشی، تغذیه درمانی بخشی ضروری از درمان افراد مبتلا به چاقی است. استفاده از روش‌های مختلف تمرینی همراه با مداخلات تغذیه‌ای یک راهبرد اقتصادی برای کاهش مرگ و میر زود هنگام در مبتلایان به چاقی است (۳۴). در این راستا، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مصرف HPD و کاهش چربی رژیم غذایی و انجام HIIT به مدت ۱۰ هفته

هدف کلی تحقیق حاضر بررسی اثر ۱۰ هفته HIIT و HPD بر سطوح پلاسمایی ApoA1 و ApoB و پروفایل لیپیدی در موش‌های صحرایی نر چاق بود. نتایج تحقیق حاضر عدم تفاوت سطوح ApoA1 و ApoB پلاسما و نسبت ApoB/ApoA1 بین گروه‌های مطالعه را نشان داد. همسو با نتایج مطالعه حاضر نصیری و همکاران (۲۰۲۳) در پژوهشی که به بررسی اثر هشت هفته HIIT (هشت تناوب دو دقیقه‌ای با شدت ۸۰ تا ۱۰۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی و هر هفته پنج جلسه) در موش‌های صحرایی نر سالمند پرداختند، تغییر معنی‌داری در سطوح ApoA1، ApoB و نسبت ApoB/ApoA1 مشاهده نکردند (۲۵). همچنین عدم تغییر معنی‌دار نسبت ApoB/ApoA1 در اثر شش هفته HIIT (شامل ۱۲ تناوب ۶۰ ثانیه‌ای با شدت ۷۵ تا ۹۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی و شش روز در هفته) در موش‌های صحرایی نر دیابتی گزارش شده است (۲۰). عدم تغییر معنی‌دار ApoA1 سرم زنان دارای اضافه وزن در اثر ۱۰ هفته HIIT و هفته‌ای سه جلسه نشان داد شده و مشخص شد که در مقایسه با HIIT، تمرین تداومی با شدت متوسط در بهبود چاقی شکمی، پروفایل لیپیدی و عوامل خطر قلبی-عروقی موثرتر است (۳۲). آپوA1 با فعال کردن آنزیم LCAT در انتقال معکوس TC و تبدیل آن به HDL-C نقش دارد و التهاب را در بافت چربی بهبود می‌بخشد (۱۸). دیگر، به‌نظر می‌رسد ApoB آتروژن

باعث تمایل به کاهش سطوح TC، TG، LDL-C و vLDL-C پلاسما و تمایل به افزایش سطح HDL-C پلاسما شد. در زمینه تاثیر ترکیب تمرین ورزشی و HPD بر پروفایل لیپیدی و عوامل خطر قلبی-عروقی، مطالعات خیلی محدود هستند. هم‌راستا با یافته‌های تحقیق حاضر، در یک مطالعه پس از شش هفته HIIT (۱۰ تناوب یک دقیقه‌ای با شدت ۸۰-۹۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی، سه جلسه در هفته) روی موش‌های صحرایی نر چاق، تغییر معنی‌داری در سطوح HDL-C و LDL-C گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد که با تحقیق حاضر همسو می‌باشد؛ هر چند در مطالعه مذکور سطوح TC و TG در گروه HIIT نسبت به گروه کنترل پایین‌تر بود (۳۴). همچنین در مطالعه‌ای که موش‌های صحرایی نر تحت مداخله شش هفته HIIT (۱۰ تناوب یک دقیقه‌ای با شدت ۸۰ تا ۹۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی و سه جلسه در هفته) و HFD قرار گرفتند؛ عدم تغییر در سطوح HDL-C و TC، کاهش سطح LDL-C، افزایش سطح TG و کاهش نسبت LDL-C/HDL-C نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (۳۵). مطالعات سازوکارهای مختلفی را گزارش کرده‌اند که HIIT و HPD ممکن است پروفایل لیپیدی و عوامل خطر قلبی-عروقی را تحت تاثیر قرار دهد. اکسیداسیون لیپید، سطح آنزیم‌ها و برخی هورمون‌های مرتبط با لیپولیز مانند کاتکولامین‌ها و هورمون رشد (GH) در اثر HIIT افزایش و اشتها و وزن به دنبال HIIT کاهش می‌یابد (۳۴). تمرین ورزشی باعث افزایش لیپوپروتئین لیپاز (LPL) و کاهش لیپاز کبدی (HL) و افزایش آنزیم LCAT می‌شود و این آنزیم‌ها نقش عمده‌ای در افزایش HDL-C دارد. بنابراین، سطح LDL-C با تمرین ورزشی کاهش و HDL-C افزایش می‌یابد که می‌تواند باعث بهبود نسبت‌های TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C شود (۱). کوستوگریس و

همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند مصرف هشت هفته HPD (۵۲/۴ درصد پروتئین) در موش‌های صحرایی نر، باعث کاهش سطح TG بدون تغییرات معنی‌دار در سطوح TC، HDL-C، LDL-C و TC/HDL-C سرمی گردید (۱۹). همچنین در مطالعه دیگری روی موش‌های چاق، افزایش وزن کمتر، کاهش مصرف غذا و کاهش انباشت چربی در کبد و عضله دوقلو (Gastrocnemius) متعاقب ۱۲ هفته HPD (۴۰ درصد پروتئین) مشاهده گردید (۳۶). سازوکاری که توسط آن مصرف پروتئین با تولید HDL-C مرتبط است به روشنی مشخص نیست، اما احتمالاً از آن‌جایی که HDL-C در کبد و روده سنتز می‌شود، ممکن است به مسیر گیرنده‌های روبنده کلاس B نوع ۱ (SR-B1)، وابسته باشد. پس از جذب HDL-C توسط مسیر SR-B1 به کبد، ذرات کوچک‌تر HDL-C دوباره به گردش خون آزاد می‌شوند، بنابراین غلظت HDL-C افزایش می‌یابد که این می‌تواند باعث بهبود نسبت‌های TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C شود (۳۷). در مطالعه حاضر، نسبت‌های TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C در اثر HIIT یا HPD به تنهایی تاثیر معنی‌داری بر پروفایل لیپیدی و عوامل خطر قلبی-عروقی نداشت، اما ترکیب HIIT و HPD با هم‌افزایی اثرات، بر بهبود نسبت‌های TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C موثر بود. با وجود عدم تغییر پروفایل لیپیدی در دوره‌های کوتاه مدت HIIT یا دریافت HPD به‌تنهایی، انجام همزمان HIIT و دریافت HPD با بهبود نسبت‌های TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C می‌تواند اثرات مفیدی بر سلامت قلب و عروق و کاهش عوارض ناشی از چاقی داشته باشد؛ هر چند برای درک بهتر این موضوع باید بررسی‌های بیشتری انجام شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد شاخص TyG در گروه‌های HIIT، HIIT+HPD، HPD، کنترل چاق دریافت‌کننده رژیم غذایی نرمال و کنترل دارای

وزن نرمال دریافت‌کننده رژیم غذایی نرمال در مقایسه با گروه چاق دریافت‌کننده رژیم غذایی پرچرب به‌طور معنی‌داری پایین‌تر است. ریاحی و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که انجام ۱۲ هفته HIIT (چهار تناوب دو دقیقه‌ای با شدت ۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی در هر جلسه، پنج جلسه در هفته) در موش‌های صحرایی نر چاق دیابتی، باعث کاهش سطح گلوکز سرم شد (۳۱). همچنین در موش‌های صحرایی نر دیابتی، هشت هفته HIIT (۱۰ تناوب یک دقیقه‌ای با شدت ۸۰ تا ۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی و پنج جلسه در هفته)، باعث کاهش گلوکز و مقاومت به انسولین شد (۳). احتمالاً HIIT از طریق افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب و کاهش تجمع TG درون سلولی، باعث افزایش پیام‌رسانی و فعالیت انسولینی می‌شود. از طرفی سازوکار تاثیر HIIT بر عمل انسولین و هومئوستاز گلوکز، تا حد زیادی به عملکرد عضلات اسکلتی مرتبط می‌باشد. از آنجایی که عضلات اسکلتی بیشترین مصرف گلوکز را در حین فعالیت می‌توانند داشته باشند، انقباض در عضله اسکلتی به‌ویژه فعالیت‌های شدید، نقش شبه انسولینی دارد و موجب مصرف مقدار زیاد گلوکز می‌شود؛ به‌طوری که در HIIT ذخایر گلوکز تمامی تارهای عضلانی تخلیه و این موجب افزایش فعالیت پروتئین انتقال‌دهنده گلوکز نوع ۴ (GLUT4) می‌شود. همچنین HIIT منجر به افزایش محتوای میتوکندری عضلات اسکلتی و باعث افزایش ظرفیت اکسایشی و اکسیداسیون چربی می‌شود که می‌تواند مقاومت به انسولین را کاهش دهد (۳۸). شاخص TyG، اندازه‌گیری ساده‌ای است که مقاومت به انسولین را منعکس می‌کند و این شاخص با شیوع بالاتر CVD ارتباط مثبت دارد (۳۹). در تحقیق حاضر، HIIT و HPD و کاهش چربی غذای مصرفی، باعث بهبود شاخص TyG شد که نشان‌دهنده تاثیر مفید آن بر

مقاومت انسولینی و بهبود عوارض ناشی از چاقی است؛ هر چند برای تایید و درک این تاثیرات نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد. مطالعه حاضر دارای محدودیت‌هایی از جمله عدم بررسی اثرات HIIT و مصرف HPD در بازه‌های زمانی مختلف بر متغیرهای وابسته مورد بررسی بود. همچنین، پروفایل لیپیدی، ApoA1 و ApoB پلاسما اندازه‌گیری شده است و شاخص‌های دیگر مربوط به متابولیسم لیپید مانند آنزیم‌های LCAT، HL، LPL و SR-B1 و هورمون‌های کاتکولامین‌ها و GH در پلاسما و بافت کبد سنجش نگردید.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد، مصرف HFD می‌تواند باعث چاقی و برخی اختلالات لیپیدی شود. از طرفی HIIT و جایگزینی HPD در موش‌های دریافت‌کننده رژیم غذایی پرچرب، باعث بهبود اختلالات لیپیدی گردید. به‌نظر می‌رسد HIIT و مصرف HPD با اثر هم‌افزایی به‌واسطه بهبود عوامل خطر قلبی-عروقی (نسبت‌های TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C) و شاخص TyG می‌تواند از برخی عوارض مرتبط با چاقی جلوگیری نماید.

تشکر و قدردانی

از کارشناسان محترم مرکز تحقیقات سلولی مولکولی غدد درون‌ریز پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، لاله حقوقی‌راد و هدی قدکساز، جهت کارهای آزمایشگاهی قدردانی می‌شود.

منابع

1. Gonzalez-Gil AM, Elizondo-Montemayor L. The role of exercise in the interplay between myokines, hepatokines, osteokines, adipokines, and modulation of inflammation for energy substrate redistribution and fat mass loss: a review. *Nutrients*. 2020;12(6):1899.

cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2020;75(17): 2122-35.

11. Bhoite R, Chandrasekaran A, Pratti VL, Satyavrat V, Aacharya S, Mane A, et al. Effect of a high-protein high-fibre nutritional supplement on lipid profile in overweight/obese adults with type 2 diabetes mellitus: a 24-week randomized controlled trial. *J Nutr Metabol*. 2021; 2021:6634225.

12. Kawanishi N, Takagi K, Lee HC, Nakano D, Okuno T, Yokomizo T, et al. Endurance exercise training and high-fat diet differentially affect composition of diacylglycerol molecular species in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2018;314(6):R892-R901.

13. Huang M, Zheng J, Chen L, You S, Huang H. Role of apolipoproteins in the pathogenesis of obesity. *Clinica Chimica Acta*. 2023;545:117359.

14. Gianazza E, Zoanni B, Mallia A, Brioschi M, Colombo GI, Banfi C. Proteomic studies on apoB-containing lipoprotein in cardiovascular research: a comprehensive review. *Mass Spectrom Rev*. 2023;42(4):1397-423.

15. Du Y., Zhu B., Liu Y., Du Z., Zhang J., Yang W., et al., Association between apolipoprotein B/A1 ratio and quantities of tissue prolapse on optical coherence tomography examination in patients with atherosclerotic cardiovascular disease. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2024;40(3):545-55.

16. Dominiczak MH, Caslake MJ. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Annal Clin Biochem*. 2011;48(6):498-515.

17. Andraski AB, Singh SA, Lee LH, Higashi H, Smith N, Zhang B, et al. Effects of replacing dietary monounsaturated fat with carbohydrate on HDL (high-density lipoprotein) protein metabolism and proteome composition in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019; 39(11):2411-2430.

2. Albarrati AM, Alghamdi MSM, Nazer RI, Alkorashy MM, Alshowier N, Gale N, Effectiveness of low to moderate physical exercise training on the level of low-density lipoproteins: a systematic review. *Biomed Res Int*. 2018; 2018:5982980.

3. Alizadeh M, Asad MR, Faramarzi M, Afroundeh R. Effect of eight-week high intensity interval training on omentin-1 gene expression and insulin-resistance in diabetic male rats. *Annal Appl Sport Sci*. 2017; 5(2):29-36.

4. Garneau P, Glazer S, Jackson T, Sampath S, Reed K, Christou N, et al. Guidelines for canadian bariatric surgical and medical centres: a statement from the canadian association of bariatric physicians and surgeons. *Can J Surg*. 2022;65(2):E170.

5. Kim DY, Jung SY. Effect of aerobic exercise on risk factors of cardiovascular disease and the apolipoprotein B/apolipoprotein a-1 ratio in obese woman. *J Physic Ther Sci*. 2014;26(11):1825-1829.

6. Berberich AJ, Hegele RA. A modern approach to dyslipidemia. *Endocr Rev*. 2022;43(4):611-53.

7. Bailey A, Mohiuddin SS. Biochemistry, High Density Lipoprotein. 2022 Sep 26. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025; PMID: 31747209.

8. Fernandez ML, Webb D. The LDL to HDL cholesterol ratio as a valuable tool to evaluate coronary heart disease risk. *J Am Coll Nutr*. 2008; 27(1):1-5.

9. Heidemann BE, Koopal C, Bots ML, Asselbergs FW, Westerink J, Visseren FL. The relation between VLDL-cholesterol and risk of cardiovascular events in patients with manifest cardiovascular disease. *Int J Cardiol*. 2021;322: 251-7.

10. Duran EK, Aday AW, Cook NR, Buring JE, Ridker PM, Pradhan AD. Triglyceride-rich lipoprotein cholesterol, small dense LDL cholesterol, and incident

- predictors of cardiovascular diseases and arteriosclerosis in elderly rats. *J Police Med*. 2023;12(1):0-16. [In Persian]
26. Kouhgardzadeh S, Valipour-Dehnou V, Molanouri-Shamsi M. Effect of high intensity functional training on serum levels of ApoA-I, ApoB and lipid profile in elderly men and women. *Feyz Med Sci J*. 2022; 26(2):138-146. [In Persian]
27. Kalantar-Zadeh K, Kramer HM, Fouque D. High-protein diet is bad for kidney health: unleashing the taboo. Oxford University Press, 2020; pp:1-4.
28. Zhang X, Sergin I, Evans TD, Jeong SJ, Rodriguez-Velez A, Kapoor D, et al. High-protein diets increase cardiovascular risk by activating macrophage mTOR to suppress mitophagy. *Nat Metabol*. 2020; 2(1):110-25.
29. Boren J, Chapman MJ, Krauss RM, Packard CJ, Bentzon JF, Binder CJ, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the european atherosclerosis society consensus panel. *Eur Heart J*. 2020;41(24): 2313-30.
30. Lee JJ, Kim HA, Lee J. The effects of Brassica juncea L. leaf extract on obesity and lipid profiles of rats fed a high-fat/high-cholesterol diet. *Nutr Res Pract*. 2018; 12(4):298-306.
31. Riyahi V, Morovvati H, KHosravi A. The effect of a period of resistance, endurance and HIIT training on serum glucose index in obese diabetic Wistar rats. *J Physiol Mov Health*. 2023;3(2):1-12. [In Persian]
32. Chen S, Zhang PZ. Effects of high intensity interval training and crossover point training on blood lipid metabolism in overweight female university students. *Chin J Sch Health*. 2022;43(10):1495-1499.
33. Rahmati-Ahmadabad S, Broom DR, Ghanbari-Niaki A, Shirvani H. Effects of exercise on reverse cholesterol transport: a
18. Cooke AL, Morris J, Melchior JT, Street SE, Jerome WG, Huang R, et al. A thumbwheel mechanism for APOA1 activation of LCAT activity in HDL [S]. *J Lipid Res*. 2018;59(7):1244-1255.
19. Kostogrys RB, Franczyk-Zarow M, Maslak E, Topolska K. Effect of low carbohydrate high protein (LCHP) diet on lipid metabolism, liver and kidney function in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2015;39(2):713-719.
20. Soleimani N, Gallehdari M, Sheikh R. Effect of six weeks of interval training and curcumin consumption on apolipoprotein A and B in diabetic male rats. *J Exerc Organ Cross Talk*. 2023;3(2):73-80.
21. Hatami M, Roshdi Bonab R, Atashak S. Comparison of the effect of twelve week of concurrent (resistance-aerobic) and high-intensity interval training on the atherogenic, insulin resistance and monocyte chemoattractant protein-1 indices in obese menopausal women. *Sport Physiol Manag Invest*. 2022;14(1):177-93. [In Persian]
22. Rajar HA, Hashmi MA, Akhtar S, Amin U, John A. The effect of high intensity interval training in reducing the risk of cardiovascular diseases in obese type-I individuals. *Allied Med Res J*. 2023;1(2): 86-95.
23. Cassidy S, Thoma C, Houghton D, Trenell MI. High-intensity interval training: a review of its impact on glucose control and cardiometabolic health. *Diabetologia*. 2017; 60(1):7-23.
24. Dolataabadi P, Amirsasan R, Vakili J. The effect of high-intensity interval training on serum asprosin and lipid profile of overweight and obese Women. *J Pract Stud Biosci Sport*. 2023;11(27):22-33. [In Persian]
25. Nasiri R, Mirzaei B, Faramarzi M, Shirazian F. Comparison of the effect of two moderate and high-intensity endurance and resistance training methods on

obese Zucker rats. *Nutrients*.2017;9(6):587.

37. Muzaffar H, Faisal MN, Anwar H, Hussain A, Khan JA, Muhammad F, et al., Fish protein intake is a novel dietary approach for managing diabetes-associated complications in diabetic wistar rat model. *Food Sci Nutr*. 2021;9(2):1017-24.

38. Pashaei Z, Jafari A, Alivand M. The effect of high intensity interval training on lipid profile and glucose homeostasis in overweight/obese middle-aged women. *J Appl Health Stud Sport Physiol*. 2020; 6(2):56-64. [In Persian]

39. Da Silva A, Caldas APS, Hermsdorff HHM, Bersch-Ferreira AC, Torreglosa CR, Weber B, et al. Triglyceride-glucose index is associated with symptomatic coronary artery disease in patients in secondary care. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18:1-8.

systemized narrative review of animal studies. *Life Sci*. 2019;224:139-48.

34. Ghadery B, Ghazalian F, Hosseini SA, Natanzy HA, Shamsoddini A. Effect of high-intensity interval training with eryngium campestre on lipid profile and glycemic indices in high-fat diet-induced obese rats. *Hormozgan Med J*. 2020; 24(2):e98982.

35. Abbasi B, Samadi A, Bazgir B. The combined effect of high-intensity interval training and intermittent fasting on lipid profile and peroxidation in wistar rats under high-fat diet. *Sport Sci Health*. 2020;16:645-652.

36. French WW, Dridi S, Shouse SA, Wu H, Hawley A, Lee SO, et al. A high-protein diet reduces weight gain, decreases food intake, decreases liver fat deposition, and improves markers of muscle metabolism in



فرم تعهد متقابل فصلنامه علمی - پژوهشی زیست شناسی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان و نویسندگان
مقاله ها

عنوان مقاله:

نویسنده اصلی (Corresponding Author):

نویسنده (گان) همکار:

نشانی محل کار و منزل نویسنده اصلی:

شماره تلفن:

شماره فکس:

نشانی پست الکترونیکی:

اینجانب.....نویسنده اصلی مقاله بالا ، متعهد می شوم این مقاله تاکنون در مجله یا سمینار داخلی و خارجی دیگری ارائه نشده است و تا زمان تأیید نتیجه در هیات تحریریه فصلنامه علمی - پژوهشی زیست شناسی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، آن را به مجله دیگری ارائه نخواهم داد.

مسئولیت در مقاله

تاریخ

امضا

اینجانب ، سردبیر فصلنامه علمی - پژوهشی زیست شناسی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان متعهد می شوم حداکثر ظرف مدت ۲ ماه از زمان دریافت مقاله نسبت به اعلام نتیجه اقدام نمایم. بدیهی است پس از گذشت این زمان ، تعهد دو طرف منتهی است. چنانچه نویسنده محترم در مدت تعیین شده ، مقاله را به نشریه یا سمینار دیگری ارائه دهد ، مقاله ایشان از روند کاری فصلنامه خارج خواهد شد.

تاریخ

امضای سردبیر

راهنمای تهیه و تدوین مقالات

نویسندگان محترم تقاضا می‌شود در هنگام ارسال مقالات به نکات زیر توجه فرمایند:

- ۱- مقاله در مجله دیگری به چاپ نرسیده یا به طور همزمان برای سایر مجلات ارسال نشده باشد.
- ۲- مقاله پژوهشی حاصل تحقیق نویسندگان باشد. مقالات مروری نیز از اشخاص مجرب، با بصیرت و با ارجاع به تعداد قابل قبولی از مقالات منتشر شده توسط نویسندگان پذیرفته می‌شود.
- ۳- مقاله ارسالی حداقل ۷ صفحه و حداکثر ۱۴ صفحه و مشتمل بر عنوان فارسی و انگلیسی، چکیده فارسی و انگلیسی، کلمات کلیدی فارسی و انگلیسی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج، بحث و منابع باشد. چکیده بیش از ۳۰۰ کلمه نبوده و کلمات کلیدی نیز بین ۴ تا ۷ واژه باشد.
- ۴- به همراه هر مقاله، یک صفحه مجزا شامل عنوان مقاله (فارسی و انگلیسی)، نام و نام خانوادگی نویسندگان (فارسی و E-mail انگلیسی)، مرتبه علمی و محل اشتغال آنها و همچنین نشانی، شماره تلفن و فکس محل کار) یا منزل (تلفن همراه و مسئول مکاتبات جهت تسریع در مکاتبات بعدی ذکر شود. ترتیب درج اسامی نویسندگان را باید مشخص نموده و مسئول مکاتبات نیز با علامت ستاره مشخص شود.
- ۵-مقاله با نرم افزار Word (doc, docx) ، قلم B Lotus و Times New Roman تایپ شده باشد و ۳ سانتی متر حاشیه از چهار طرف داشته 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 باشد. تیترهای داخل متن ۱۲ Bold، منابع و اصطلاحات انگلیسی با فونت ۱۱ تنظیم گردد. اسامی علمی لاتین و عنوان مجلات خارجی در منابع باید به صورت ایتالیک تایپ شوند.
- ۷ - عنوان جداول با قلم ۱۱ در بالای آنها ذکر شده و در صورت نیاز به توضیحات بیشتر، مطالب با قلم ۱۰ در زیر جدول ارائه گردد. به علاوه هر ستون جدول باید دارای عنوان و واحد مربوط به خود باشد. توضیحات مربوط به منحنی‌ها، تصاویر و نمودارها در زیر آنها با قلم ۱۱ نوشته شود. عکس‌های ارسالی باید اصل، دارای مقیاس، واضح و دقیق باشند.
- ۸- در انتهای مقاله منابع همه به انگلیسی (فارسی‌ها نیز به انگلیسی برگردانده شوند) و بر اساس حروف الفبای نام خانوادگی نویسنده‌ی اول شماره گذاری شده و در متن مقاله با شماره و در داخل پرانتز ارجاع داده شود. در نگارش منابع موارد زیر رعایت گردد:
الف - اگر منبع کتاب است:
نام خانوادگی و حرف اول نام نویسندگان، تاریخ انتشار، عنوان کامل کتاب، شماره چاپ، ناشر، شهر، صفحات. مثال:
ب- اگر منابع مورد نظر مجله است:
نام خانوادگی و مخفف نام تمامی نویسندگان، تاریخ انتشار، عنوان مقاله، نام مجله، دوره، شماره، صفحات. مثال:
Gerendai I., Shaha C., Gunsalus G.L., Bardin C.W., 1986. The effects of opioid receptor antagonists suggest that testicular opiates regulate Sertoli and Leydig cell function in the neonatal rat. *Endocrinology*, 118(5): 2039-2044.
- ۹ - مسئولیت صحت و سقم مطالب به عهده نویسندگان است. ضروری است همراه با مقاله، فتوکپی فرم تعهد متقابل که در داخل مجله آورده شده است، تکمیل و ارسال گردد.

۱۰- در انتهای منابع فارسی استفاده شده که به لاتین ترجمه شده است عبارت In Persian داخل کروشه قید گردد.

۱۱- مقالات از طریق ثبت نام نویسنده در سایت مجله (www.ascij.damghaniau.ac.ir) و سابمیت مقاله ارسال گردند.

پست الکترونیک: faslnameh.zist@gmail.com

تلفکس: ۰۲۳-۳۵۲۲۵۰۵۸

آدرس پستی: دامغان، کیلومتر یک جاده چشمه‌علی، بعد از میدان سعدی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، حوزه معاونت پژوهش و فن آوری، دفتر فصلنامه زیست‌شناسی جانوری



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

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/>

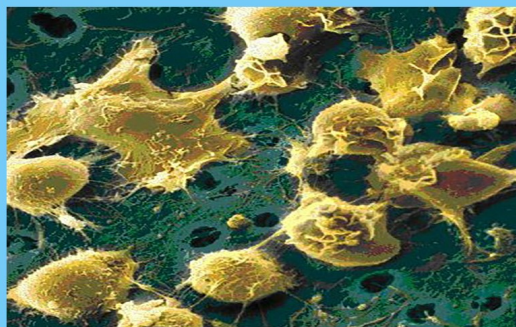
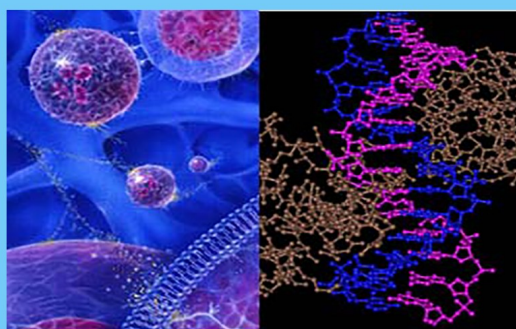
Journal of Animal Biology



Damghan Branch

Vol. 17, Spring 2025, Available online

ISSN:1735-9724



sanad.iau.ir/journal/ascij



فصلنامه زیست شناسی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

علمی - پژوهشی، سال هفدهم، بهار 1404

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

مدیرمسئول: دکتر هومن شجعی

سر دبیر: دکتر غلامحسن واعظی

مدیر داخلی: دکتر ویدا حجتی

هیأت تحریریه:

دکتر مریم شمس لاهیجانی (استاد)، دکتر نصرالله رستگارپویانی (استاد)، دکتر محمدجعفر گلعلی پور (استاد)، دکتر غلامحسن 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)

ویراستار: دکتر ویدا حجتی

تنظیم و صفحه آرایی: سمانه مروی زاده

طبق نامه شماره 87/286044 مورخ 84/12/20 سازمان مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی، فصلنامه زیست شناسی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی

واحد دامغان دارای مجوز انتشار می باشد.

طبق مجوز شماره 93/07/14/3/18/125395 مورخ 93/07/14 وزارت علوم، تحقیقات و فناوری حوزه تخصصی مقالات این نشریه **تکوین و فیزیولوژی** می باشد.

طبق مجوز شماره 98/01/11/3/18/865 مورخ 98/01/11 وزارت علوم، تحقیقات و فناوری این مجله دارای رتبه علمی-پژوهشی می باشد.

ISSN: 1735-9724

فصلنامه علمی پژوهشی زیست شناسی جانوری در Academia، Magiran، SID، ISC 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: 023-35225058

پست الکترونیک: Fasnameh.zist@gmail.com

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

۱	فرمولاسیون و ارزیابی عصاره میخک بارگذاری شده در هیدروژل کیتوسان بر روی رده سلولی فیبروبلاست موشی سئودا شمشاد، فرشته شریفی
۱۳	بررسی انگل‌های کرمی دستگاه گوارش ماهی کفشک زبان گاوی (<i>Cynogossus bilineatus</i>) صید شده از سواحل بندر عباس عبدالاحسین دلیمی، کرانه پری‌زاده
۲۵	بررسی تاثیر سیلیمارین موجود در گیاه خارمریم بر پروفایل چربی، آنزیم‌های کبدی و همچنین سیتوکین‌های التهابی در خون رت‌های نر نژاد ویستار هدی جهانگیری، پریچهره یغمایی، آزاده ابراهیم حبیبی، شهربانو عریان
۳۹	ارزیابی کیفیت و سلامت جنین‌های حاصل از بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) تحت تاثیر سکرتوم سلول‌های بنیادی هیلدا رستگاری، نسیم حیاتی رودباری، سمیه کاظم‌نژاد، سهیلا انصاری‌پور
۵۱	اثر محافظتی نانواکسید منیزیم در آسیب ایسکمی/رپرفیوژن کلیه بر عملکرد کلیه و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در موش صحرایی نر مرضیه مینایی، اکرم عیدی، پژمان مرتضوی، احمد اصغری
۶۵	شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی همولنف میگوی ببری سبز (<i>Penaeus semisulcatus</i>) در سیستم آبی‌پروری بیوفلوک: تحت تاثیر سطوح مختلف غذایی محمدحسین خانجانی
۷۷	مطالعه میگوی پا سفید غربی (<i>Litopenaeus vannamei</i>) در مجتمع پرورش میگوی گمیشان استان گلستان از نظر آلودگی به فلزات سنگین و ارزیابی خطر برای مصرف‌کنندگان رضا خلیلی، رضا سلیقه‌زاده، مرجان مسافر
۸۷	تأثیر هیدروکسی سلنومیتوئین بر عملکرد، صفات کیفی تخم‌مرغ و فراسنجه‌های خون مرغ‌های مادر گوشتی مسن احمد منافی، یحیی ابراهیم‌نژاد، حبیب اقدم شهریار، عبدالاحد شاددل تلی، ابوالفضل قربانی، ناصر ماهری سیس
۹۹	بررسی اثرات فرم آلی و معدنی عناصر روی، مس و منگنز بر صفات کیفی پوسته تخم‌مرغ‌های مادر گوشتی سیده عطیه مجاوریان، شهاب‌الدین قره‌ویسی، محسن حاجی‌پور
۱۰۹	الگوی تجمع زیستی فلزات سنگین جیوه، روی و نیکل در بافت‌های نرم خرچنگ شناگر آبی (<i>Portunus segnis</i>) در سواحل مکران سمانه ابراهیمی، محمد منصور توتونی، مهران لقمانی
۱۲۳	الگوی تجمع زیستی فلزات سنگین جیوه، روی و نیکل در بافت‌های نرم خرچنگ شناگر آبی (<i>Portunus segnis</i>) در سواحل

۱۳۷ اثر تمرین تناوبی شدید و رژیم غذایی پرپروتئین بر سطوح پلاسمایی آپولیپوپروتئین A1 و B و پروفایل لیپیدی در موش‌های صحرایی نر چاق

مرضیه ثاقب‌جو، مهدی علی‌اکبری، هانیه حبیبی سنگانی

Research Article**Formulation and Evaluation of Clove Extract-Loaded Chitosan Hydrogel on the Mouse Fibroblast Cell Line****Sevda Shemshad¹, Fereshteh Sharifi^{1,2*}**

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

2- Soft Tissue Engineering Research Center, Tissue Engineering and Regenerative Medicine Institute, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author: Fer.sharifi.368@iau.ac.ir

Received: 24 September 2024

Accepted: 27 January 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1184989

Abstract

Severe skin damage or defects can cause various problems in living animals, which could affect a patient's life. Developing wound dressings with acceptable antibacterial activity, besides biocompatibility and biodegradability, is essential in developing wound healing applications for decreasing or limiting synthetic antibiotic abuse. The present study aimed to design, prepare, and develop a functional hydrogel structure based on chitosan (CS) containing clove extract (CEO) with enhanced antibacterial activity, non-toxicity, and wound-healing potential. The hydrogel structure was studied using a scanning electron microscope (SEM) and Fourier transform infrared (FTIR). In addition, the cytotoxicity of the designed hydrogel was assayed by the MTT test. Based on the SEM, adding clove extract increased the pore size of the CS hydrogel. FTIR analysis confirmed the presence and mixture of clove extract with CS in the hydrogel structure. Our investigations displayed that the clove extract-loaded CS hydrogel did not have cytotoxic effects on the mouse fibroblast (L929) cells. In addition, the designed hydrogel showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. According to the results, CS/CEO hydrogel is a great potential candidate for antibiotic-free wound healing applications.

Keywords: Clove extract, Hydrogel, Chitosan, Wound dressing, Antibacterial.



فرمولاسیون و ارزیابی عصاره میخک بارگذاری شده در هیدروژل کیتوسان بر روی رده سلولی فیبروبلاست موشی

سئودا شمشاد^۱، فرشته شریفی^{۱،*}

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

۲- مرکز تحقیقات مهندسی بافت نرم، پژوهشکده مهندسی بافت و طب بازساختی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: Fer.sharifi.368@iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۳

DOI: 10.60833/ascij.2025.1184989

چکیده

آسیب‌ها یا نواقص شدید پوستی می‌تواند عامل بسیاری از مشکلات موجود زنده باشد، که می‌تواند زندگی فرد را تحت تاثیر قرار دهد. وجود فعالیت قابل قبول ضدباکتریایی همراه با زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر بودن نیاز اساس در توسعه‌ی کاربردی زخم‌پوش جهت کاهش یا محدود نمودن سوء مصرف آنتی‌بیوتیک سنتزی است. هدف از مطالعه حاضر طراحی، تهیه و توسعه ساختار هیدروژلی کارآمد بر پایه کیتوسان (CS) حاوی عصاره میخک (CEO) با فعالیت تشدید شده ضدباکتریایی، غیرسمی، و ظرفیت التیام زخم بوده است. ساختار هیدروژل با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و آنالیز طیف جذبی (FTIR) مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین، سمیت هیدروژل طراحی شده با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس تصاویر SEM افزوده شدن عصاره میخک موجب افزایش اندازه منافذ هیدروژل CS شده است. نتیجه آزمون FTIR تأیید کننده حضور و تلفیق عصاره میخک با CS در ساختار هیدروژل بود. تحقیقات ما نشان‌دهنده‌ی عدم اثر سمی عصاره میخک بارگذاری شده در هیدروژل CS بر روی سلول‌های فیبروبلاست موشی (L929) بود. بعلاوه، هیدروژل طراحی شده فعالیت ضد باکتریایی علیه *استافیلوکوکوس ارئوس* و *اشریشیا کلی* بوده است. براساس نتایج بدست آمده، هیدروژل CS/CEO دارای ظرفیت بزرگ کاندید شدن برای کاربرد زخم‌پوش بدون آنتی‌بیوتیک است.

کلمات کلیدی: عصاره میخک، هیدروژل، کیتوسان، زخم‌پوش، ضدباکتریایی.

مقدمه

این هزینه به بیش از ۱۵۰۰۰ دلار می‌رسد. از سوی دیگر با توجه به محدودیت‌های عملکردی فرد بیمار هزینه‌های روانی، خانوادگی و اجتماعی بسیاری بر جامعه تحمیل می‌کند. از این رو، طراحی و تهیه زخم-پوش‌هایی که توانایی تسریع بهبود زخم را داشته باشند یکی از اولولیت‌های درمانی کشور می‌باشد.

یکی از چالش‌های مهم حوزه درمان و پزشکی مدیریت صحیح و به موقع زخم‌های پوستی می‌باشد (۱). بر اساس آمارهای ارائه شده توسط دانشگاه علوم پزشکی تهران هزینه درمان زخم به‌طور متوسط بیش از ۲۰۰۰ دلار در مراحل اولیه درمان می‌باشد، که در صورت عدم رسیدگی به موقع و انجام درمان کارآمد

روش‌های متنوعی برای درمان زخم مطرح بوده، که از این جمله می‌توان به پیوندهایی همانند آلوگرفت، اتوگرفت و زئوگرفت، استفاده از پانسمان‌های زخم که موجود در شبکه داروخانه‌ای و پانسمان‌های مدرن تحت عنوان زخم‌پوش اشاره نمود (۲). زخم‌پوش‌ها یا جانشین‌های مهندسی زیستی شده پوست همانند هیدروژل، اسپانچ و پدهای الکترورسی شده عموماً از پلیمرها تهیه می‌شوند (۳). زخم‌پوش‌ها باید ویژگی‌های منحصر به فردی از جمله حفظ رطوبت محل زخم و جلوگیری از خشک شدن محل زخم، محافظت از زخم در برابر عفونت، محافظت فیزیکی از زخم و تسریع روند بهبودی را ارائه دهند. برای تامین مشخصات مطرح شده برای زخم‌پوش دو جنبه مهم که شامل نوع پلیمر سازنده و دیگری روش تهیه زخم‌پوش می‌باشد، موردتوجه است (۴، ۵). پلیمرهای مورد استفاده در ساخت زخم‌پوش از دو منبع طبیعی (کلاژن، الزینات، ژلاتین، هیالورونیک اسید، کیتوسان و ...) و سنتزی (پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌لاکتیک اسید، پلی‌وینیل الکل و...) قابل تهیه می‌باشد (۶). یکی از پلیمرهای طبیعی که به‌طور وسیعی در تهیه زخم‌پوش‌ها مورد استفاده می‌باشد، کیتوسان است (۷، ۸). کیتوسان طی فرآیند داستیلایسیون از پلیمر طبیعی کیتین بدست می‌آید. کیتوسان ویژگی‌های متمایزکننده‌ای نظیر زیست‌سازگاری، غیرسمی بودن، زیست‌تخریب‌پذیر بودن، ضدالتهاب، تسریع روند انعقاد خون و ضد میکروبی می‌باشد (۹-۱۱). ساختارهای متنوعی از زخم‌پوش‌ها در سال‌های اخیر مورد توجه بوده است، که از این جمله می‌توان به پدهای الکترورسی شده، اسپانچ‌ها، ساختارهای پاششی بصورت اسپری، هیدروژل‌ها و غیره می‌توان اشاره نمود (۱۵-۱۲). مشخصه‌هایی همانند قابلیت جذب آب، متورم شدن، قابلیت بارگذاری ترکیبات زیست‌فعال، وجود ماهیت ساختاری مشابه ماتریکس

خارج سلولی طبیعی، روش‌های متنوع در تهیه، قابلیت استفاده از طیف وسیعی از پلیمرها و ترکیبات طبیعی در ساخت موجب مقبولیت و توجه گسترده به هیدروژل‌ها در سال‌های اخیر شده است (۱۲، ۱۶، ۱۷). یکی از معضلات مهم در درمان زخم، جلوگیری از بروز عفونت باکتریایی می‌باشد. به‌طور رایج، آنتی-بیوتیک‌های سنتزی یکی از گزینه‌های مورد توجه برای پیشگیری و در صورت نیاز کنترل عفونت باکتریایی است. اما نکته قابل تامل که در سال‌های اخیر بسیار مدنظر پژوهشگران بوده است، احتمال بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی و یا سوء مصرف آنتی-بیوتیک در بیماران دریافت‌کننده دارو می‌باشد (۱۸، ۱۹). از این رو، استفاده از ترکیباتی که قابلیت ارائه خاصیت ضد میکروبی بویژه ضد باکتریایی را داشته باشند جز اولویت‌های کاربردی در تهیه زخم‌پوش‌ها قرار گرفت. براساس مطالعات انجام شده، استفاده از عصاره میخک موجب ایجاد خاصیت ضد میکروبی و باکتریایی به همراه مشخصه ضدالتهابی که به‌طور موثر در تسریع روند بهبود زخم نقش ایفا میکند (۲۰، ۲۱). تحقیقات بیانگر اثر ضدباکتریایی عصاره میخک بر روی باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس ائورئوس*) و گرم منفی (*شریشیا کلی*) می‌باشد (۲۰). از این رو، استفاده از عصاره میخک نه تنها می‌تواند راه حلی برای کاهش سوء مصرف آنتی‌بیوتیک باشد، بلکه تامین‌کننده خاصیت ضدالتهابی به‌همراه جلوگیری از رشد باکتری‌های شاخص عفونت زخم پوستی می‌باشد خواهد بود. تهیه هیدروژل به روشی که قابلیت حمل و انتقال ماده زیست‌فعال در ترمیم زخم را داشته باشد، یکی از نکات قابل توجه می‌باشد. بر این اساس، ماهیت ساختاری مورد استفاده در این مطالعه هیدروژل تنظیم شده با استفاده از تغییر pH بر پایه پلیمر کیتوسان که عصاره میخک درون محلول پلیمری بارگذاری شده است، انتخاب شد.

مواد و روش‌ها

کیتوسان با میزان ۷۹ درصد داستیلاسیون از Bio Basic (کانادا) خریداری شد. ۳-(۴،۵-دی میتیل تیاژول-۲) ۵، ۲ دی‌پنیل تترازولیوم بروماید (MTT)، دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) از شرکت سیگا-آلدريج (آلمان) تهیه شد. استیک‌اسید، هیدروکسید سدیم (NaOH)، پارافرمالدئید، و اتانول از شرکت مرک (آلمان) خریداری گردید. سلول فیروبلست موشی (L929) و نمونه‌های باکتری *E. coli* و *S. aureus* از مرکز ملی ذخایر ژنتیک (ایران) تهیه شد. محیط کشت سلول (DMEM)، سرم جنین گاوی (FBS)، تریپسین/EDTA از شرکت گیبکو (کانادا) خریداری شد. عصاره میخک بصورت هدیه دریافت شد.

تهیه هیدروژل: برای آماده‌سازی هیدروژل کیتوسان ۱/۵ درصد (w/v) (CS) از پودر توزین شده و در حلال اسید استیک (۱٪) در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت تحت استیرر قرار گرفت. همزمان با هم خوردن محلول تهیه شده، با استفاده از محلول NaOH (۱۰N) میزان pH تا محدوده خنثی افزایش داده می‌شود. برای تهیه هیدروژل کیتوسان حاوی عصاره میخک (CS/CEO) ابتدا محلول کیتوسان ۱/۵ درصد در حلال اسید استیک تهیه می‌شود. سپس عصاره میخک به میزان ۰/۰۶۲۵ درصد به محلول افزوده می‌شده و در نهایت با استفاده از محلول NaOH (۱۰N) میزان pH تا محدوده خنثی تنظیم می‌شود.

بررسی ساختار هیدروژل با میکروسکوپ الکترونی (SEM): ارزیابی ساختار و منافذ هیدروژل‌های تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM (MIRA-III، چک) تحت ولتاژ ۵KV انجام شد. برای این منظور نمونه هیدروژل‌های CS و CS/CEO در محلول ترکیبی گلو تار آلدئید و پارافرمالدئید (۲ درصد) به مدت یک ساعت فرو برده شد. سپس با PBS

شستشو داده و در فریزر ۸۰- درجه به مدت ۴ ساعت قرار گرفت. نمونه فریز شده هیدروژل‌ها با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی (FD-5010-BT، ایران) خشک و با استفاده از پوشش‌دهی لایه طلا برای مشاهده توسط میکروسکوپ الکترونی آماده شد.

آزمون طیف‌سنجی Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy: برای آزمون گروه‌های عاملی و پیوندهای شیمیایی ساختارهای هیدروژل CS به‌طور پایه و تلفیق شده با عصاره میخک CS/CEO از طیف‌سنجی FTIR استفاده شد. طیف‌سنجی FTIR با دستگاه اسپکتوفتومتر Burker (Equinox 55، آلمان) با وضوح 4 cm^{-1} و محدوده $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ انجام شد.

ویژگی‌های ضد میکروبی هیدروژل‌های CS/CEO: جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی هیدروژل‌های تهیه شده از دو سویه باکتری استفاده گردید. مشخصه‌های باکتری‌ها در جدول شماره ۱ ارائه شده است. برای انجام تست ضد میکروبی ابتدا باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* بر روی محیط کشت نوترون آگار با استفاده از سوآپ استریل بصورت یک‌دست کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. سپس، در مرکز پلیت‌ها میزان $300\text{ }\mu\text{l}$ از نمونه‌های عصاره میخک (CEO extract)، هیدروژل کیتوسان (CS) و هیدروژل کیتوسان حاوی عصاره میخک (CS/CEO) افزوده شد. با گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون نمونه‌های تیمار شده در انکوباتور، قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری و بصورت نمودار گزارش شد.

ارزیابی زیست‌سازگاری هیدروژل CS/CEO: به منظور ارزیابی زیست‌سازگاری هیدروژل CS/CEO از کشت سلول فیروبلست موشی (L929) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا سلول‌های L929 به تعداد 10^4 درون چاهک‌های پلیت کشت سلول ۲۴ خانه به مدت

۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس، نمونه هیدروژل CS/CEO در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به محیط اضافه و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفتن. با گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها با هیدروژل CS/CEO مورفولوژی سلول‌ها در مجاورت هیدروژل با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس (Bell, INV-100FL) مشاهده شد. از کشت سلول در پلیت کشت سلول بعنوان نمونه کنترل استفاده شد.

ارزیابی زنده‌مانی سلول L929 در مجاورت هیدروژل CS/CEO: نمونه هیدروژل CS/CEO با pH حدود ۶/۸ به حجم ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به تعداد ۱۰^۴ سلول L929 با آن مخلوط گردید. سپس با استفاده از محلول NaOH میزان pH به حدود خنثی (۷/۲ تا ۷/۴) تنظیم شد. نمونه‌های سلول-هیدروژل با استفاده از PBS و محیط کشت شست و شو داده

شدند. در ادامه، نمونه‌های سلول-هیدروژل آماده سازی شده به پلیت کشت سلول ۹۶ خانه منتقل می‌شود. نمونه‌ها با استفاده از محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد برای بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت درون انکوباتور CO₂ ۵ درصد با رطوبت ۹۵ درصد قرار داده شد. برای هر بازه زمانی تعداد ۳ بار تکرار از نمونه (n = ۳) و کشت در پلیت کشت سلول بعنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد. پس از گذشت بازه‌های زمانی تعریف شده، محلول MTT (۱۰ درصد) از حجم کل محیط کشت تهیه و به هر چاهک افزوده و به مدت ۳ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. بلورهای فرومازون تشکیل شده بعد از ۳ ساعت انکوباسیون، با استفاده از DMSO حل و با استفاده از دستگاه خوانش میکروپلیت (Bio-Tek) در محدوده طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

جدول ۱- مشخصه‌ی باکتری‌های مورد استفاده در تست ضد میکروبی

Table 1. Characteristics of the bacteria used in antibacterial testing

Bacterium name	Standard Number	Gram Reaction
<i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>)	ATTC 25923	Positive
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	ATTC 1330	Negative

نتایج

ساختار هیدروژل با میکروسکوپ الکترونی (SEM): بر اساس تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی (SEM)، ساختار هیدروژل CS دارای منافذ با ابعاد کوچک‌تر و سازمان‌یافته‌تری هستند، درحالی‌که با افزوده شدن عصاره میخک (CS/CEO) اندازه منافذ بزرگتر شده است. همچنین در تصاویر ۱a، هیدروژل CS/CEO دارای سطوح غیر یکدست و خشن می‌باشد. اما نمونه هیدروژل CS دارای سطوحی یکدست و صاف است.

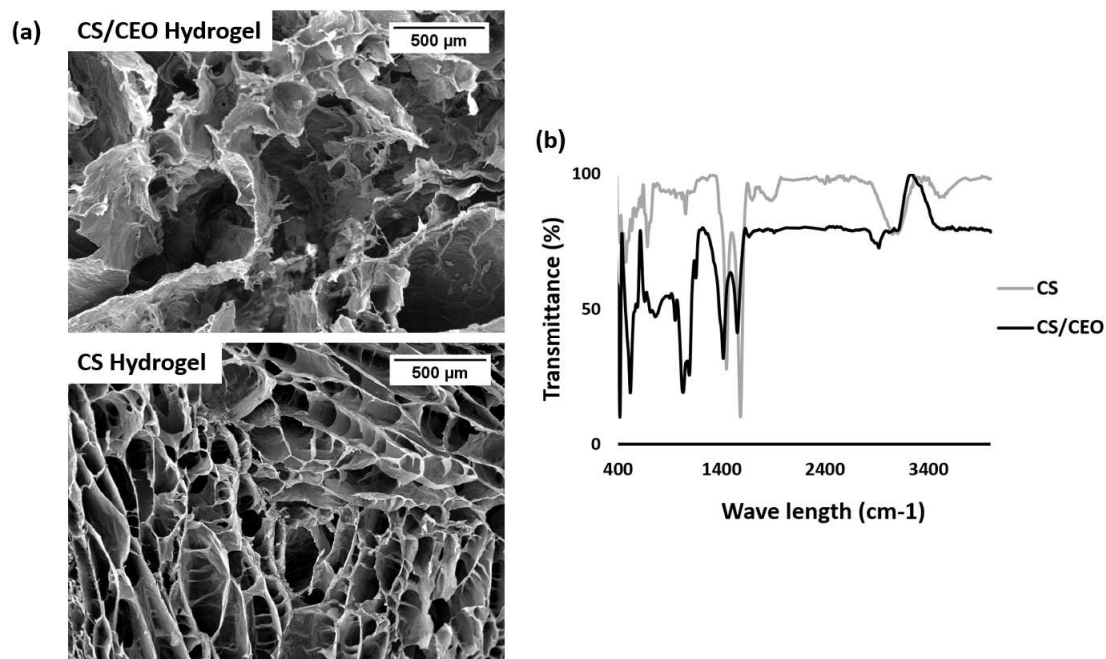
طیف‌سنجی Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy: در تصویر ۱b، طیف جذب

بدست آمده در دو نمونه هیدروژل CS و CS/CEO ارائه شده است. در نمودار پیک جذبی ناحیه cm⁻¹ ۳۴۴۴ مربوط به کشش ارتعاشی پیوندهای N-H و O-H برای گروه‌های آمین و هیدروکسیل می‌باشد (۲۲، ۲۳). پیک‌های ناحیه cm⁻¹ ۱۲۴۵ و ۱۱۶۳ به ترتیب مربوط به کشش ارتعاشی گروه‌های آمین پیوندهای C-N و کشش ارتعاشی نامتقارن پل‌های استری پیوندهای C-O قابل مشاهده است (۲۴). در محدوده cm⁻¹ ۳۵۹۱ و ۱۶۰۹ مربوط به گروه اتوزنول در عصاره میخک می‌باشد (۲۵). براساس پیک‌های قابل مشاهده در نمودار شکل ۱b، وجود پلیمر کیتوسان همراه با عصاره میخک (CS/CEO) قابل تأیید است.

سلول‌های L929 بوده یا به عبارتی زیست‌سازگار می‌باشد. در مقایسه نمونه تیمار شده با هیدروژل CS/CEO با نمونه کنترل تفاوتی در روند رشد و مورفولوژی سلول‌ها دیده نمی‌شود. میزان زنده‌مانی سلول‌های L929 با استفاده از تست MTT در مقایسه هیدروژل CS/CEO با نمونه کنترل در شکل ۳b ارائه شده است. هر دو نمونه مورد مطالعه روند رشد و تکثیر سلول‌های L929 در بازه زمانی ۷۲ ساعت دارای نرخ فزاینده است. سلول‌های L929 تیمار شده با هیدروژل CS/CEO روند رشد افزایشی را در ۳ بازه زمانی نشان می‌دهند، به‌طوری‌که در مقایسه ۲۴ با ۷۲ ساعت دارای سطح معنی‌داری $p < 0/001$ می‌باشد. این درحالی است که رشد سلولی نمونه‌های کنترل در مقایسه با تیمار شده با هیدروژل CS/CEO بیشتر است. این نکته می‌تواند بدلیل حضور عصاره میخک در نمونه هیدروژل CS باشد.

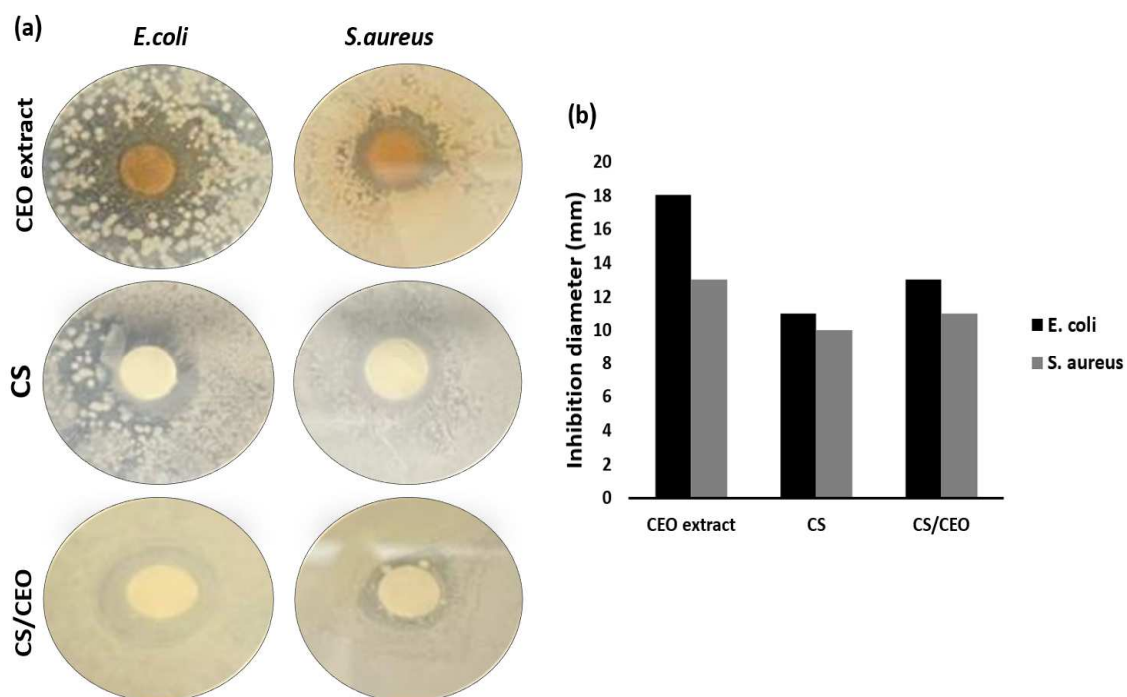
ارزیابی فعالیت ضد میکروبی هیدروژل‌های CS/CEO: به‌منظور ارزیابی و مقایسه فعالیت ضد میکروبی هیدروژل تهیه شده CS/CEO، دو نمونه هیدروژل کیتوسان (CS) و عصاره میخک (CEO extract) نیز مورد مطالعه قرار گرفت. براساس تصاویر و نمودار ارائه شده در شکل ۲a و b، بیشترین فعالیت ضد میکروبی علیه دو باکتری *E. coli* و *S. aureus* مربوط به عصاره استخراج شده از گیاه میخک می‌باشد. نکته قابل توجه وجود فعالیت ضدباکتریایی هیدروژل CS فاقد بارگذاری عصاره میخک است، که تأییدکننده خاصیت ضدباکتریایی کیتوسان می‌باشد. فعالیت ضدباکتریایی هیدروژل‌ها (CS و CS/CEO) و عصاره میخک علیه باکتری *E. coli* بیشتر از باکتری *S. aureus* است.

بررسی زیست‌سازگاری و زنده‌مانی سلول L929 در مجاورت هیدروژل: همانطور که تصاویر ۳a قابل مشاهده است، هیدروژل CS/CEO فاقد سمیت برای



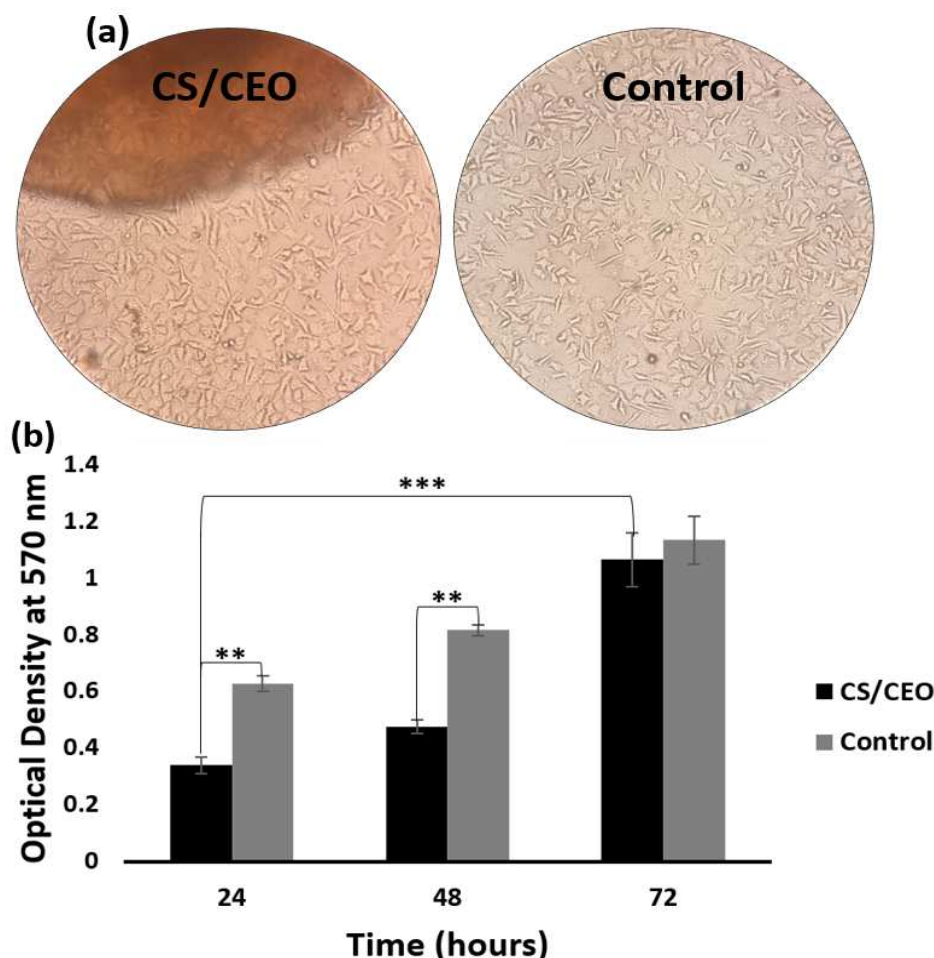
شکل ۱- مشخصه‌یابی هیدروژل‌های سنتز شده. (a) تصاویر SEM از هیدروژل‌های CS و CS/CEO، بزرگنمایی تصاویر: ۵۰۰ میکرون. (b) طیف FTIR هیدروژل‌های CS و CS/CEO.

Fig. 1. The synthesized hydrogels characterization. (a) SEM images of CS and CS/CEO hydrogels Magnification: 500 μm. (b) FTIR spectra of CS and CS/CEO hydrogels.



شکل ۲- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی هیدروژل‌های سنتز شده. (a) تصاویر فعالیت ضد میکروبی هیدروژل‌های CS و CS/CEO در مقابل سویه‌های باکتری *E. coli* and *S. aureus*. (b) نمودار میانگین ناحیه بازدارنده بر روی محیط آگار برای *E. coli* and *S. aureus* بعد از انکوباسیون با هیدروژل‌های CS و CS/CEO.

Fig. 2. The antimicrobial activity assay of synthesized hydrogels. (a) Antimicrobial activity of images of CS and CS/CEO hydrogels against *E. coli* and *S. aureus*. strains (b) Average diameter of inhibition zone area on agar for *E. coli* and *S. aureus* after incubation of CS and CS/CEO hydrogels.



شکل ۳- ارزیابی‌های برون‌تنی. (a) تصاویر میکروسکوپ نوری سلول‌های L929 بر روی هیدروژل CS/CEO بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون. کشت در پلیت کشت سلول بدون هیدروژل بعنوان کنترل در نظر گرفته شد. بزرگنمایی تصاویر ۱۰۰x می‌باشد. (b) زنده‌مانی سلول فیروبلستی موشی (L929) کشت شده بر روی هیدروژل CS/CEO و کنترل در بازه زمانی ۲۴-۷۲ ساعت بعد از انکوباسیون.

Fig. 3. In-vitro assay. (a) Inverted microscopy images of L929 cells on CS/CEO hydrogel after 24h incubation. A plate well without hydrogel was used as a control. The magnification of images is 100x. (b) The cell viability of mouse fibroblast cells (L929) was seeded on CS/CEO hydrogel and controlled after 24-72h incubation.

بحث

باشند. از این رو، مدیریت به موقع و صحیح زخم‌های پوستی یکی از چالش‌های مهم حوزه بهداشت و درمان است. بر این اساس، طراحی و تهیه پانسمان‌های مدرن زخم یا زخم‌پوش جزو حوزه‌های مطالعاتی و تحقیقاتی قابل توجه در زیست‌پزشکی می‌باشد (۸، ۲۶). زخم‌پوش باید قابلیت محافظت از محل آسیب‌دیده به همراه تامین شرایطی از جمله

پوست بعنوان بزرگترین بافت بدن دارای عملکردهای زیستی متنوعی در بدن جانداران از جمله محافظت فیزیکی، ساخت ویتامین D، امکان تعریق و تنظیم دمای بدن می‌باشد. بروز آسیب یا نقصی در ساختار پوست تحت عنوان زخم تعریف می‌شود. زخم‌های پوستی درمان نشده موجب محدودیت عملکرد فرد شده و حتی می‌تواند تهدید کننده حیات موجود زنده

حفظ رطوبت محیط، قابلیت تبادل هوا، امکان تعویض بدون آسیب مجدد به بافت در حال ترمیم، تسریع روند بهبود، التیام بخش و... را داشته باشد (۲۷، ۲۸). جهت تامین مشخصه‌های ذکر شده توجه به دو نکته نوع ماده سازنده و روش ساخت زخم‌پوش حائز اهمیت است. تنوع گسترده‌ای از مواد طبیعی و سنتزی در ساخت زخم‌پوش مورد استفاده قرار می‌گیرند. از جمله مواد طبیعی که در سال‌های اخیر مورد توجه محققین این حوزه قرار گرفته است، پلیمر کیتوسان می‌باشد. کیتوسان محصول داستیلاسیون کیتین منشأ گرفته از سخت‌پوستان است. این بیوپلیمر زیست-سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر بوده که ویژگی‌های اولیه مورد نیاز یک زخم‌پوش می‌باشد. همچنین، خاصیت ضد میکروبی بویژه ضد باکتریایی و ضد قارچی، تسریع روند انعقاد خون، خاصیت آنتی‌اکسیدان، ضد توموری و ماهیت کاتیونیک موجب تمایز غیر قابل اغماض این پلیمر شده است (۱۵، ۲۹، ۳۰). تهیه ساختاری با ماهیت کارآمد بر پایه کیتوسان به عنوان زخم‌پوش یکی از نکات کلیدی می‌باشد. با توجه به ویژگی‌هایی ذکر شده برای زخم‌پوش، هیدروژل‌های تنظیم شونده بواسطه‌ی pH یکی از گزینه‌های مورد توجه محققین می‌باشد (۳۱، ۳۲). هیدروژل ساختاری زیست‌سازگار، منعطف، جاذب رطوبت می‌باشند (۳۱). در میان ساختارهای هیدروژل مطرح شده، هیدروژل‌های تنظیم‌شونده به pH قابلیت بارگذاری ترکیبات زیست‌فعال را دارا می‌باشند (۳۲). یکی از ترکیبات زیست‌فعال مورد توجه در تهیه زخم‌پوش عصاره بدست آمده از گیاه میخک (CEO) است. ساختار هیدروژل CS تهیه شده با استفاده از تنظیم pH و تلفیق شده با CEO بواسطه‌ی تصویر SEM (شکل ۱a) مورد مطالعه قرار گرفت. براساس تصویر شکل ۱a، افزوده شدن CEO موجب افزایش اندازه منافذ نسبت به نمونه فاقد CEO شده است. همچنین بر

اساس نمودار طیف جذبی FTIR و وجود تغییر در پیک‌های جذبی در نمونه حاوی CEO در طول موج-های 1609 cm^{-1} و 3591 که مربوط به گروه عاملی ائوژنول است، نسبت به هیدروژل CS تأیید کننده تلفیق و حضور CEO در هیدروژل تهیه شده است (۲۰) (شکل ۱b). وجود عفونت‌های مقاوم به درمان آنتی‌بیوتیکی در مراکز درمانی نیاز به وجود خاصیت ضد باکتریایی قوی در زخم‌پوش بدون بکارگیری آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی برای درمان بیماران با آسیات پوستی مورد توجه است (۲۰). استفاده از ماده‌ای بجز داروهای آنتی‌بیوتیک رایج جز اولویت‌های تحقیقاتی می‌باشد. ترکیبات موثر بدست آمده از CEO علاوه بر تامین خاصیت ضد میکروبی چشم‌گیر تامین‌کننده ویژگی ضد التهابی نیز می‌باشند. دو مشخصه ضد میکروبی و ضد التهابی در CEO موجب استفاده گسترده از این ترکیب در حوزه‌های مختلف زیست پزشکی شده است (۲۶، ۳۳، ۳۴). در مطالعه در سال ۲۰۱۹، از نانوفیبرهای الکتروریسی شده‌ی پلی-کاپرولاکتون/ژلاتین حاوی روغن میخک به عنوان زخم‌پوش استفاده شد. در این مطالعه روغن میخک جهت ایجاد ویژگی ضد باکتریایی استفاده شد. در این مطالعه افزایش غلظت روغن میخک موجب افزایش مهار رشد باکتری *E. coli* با افزایش زمان تیمار شده است. این در حالی است که در مورد باکتری *S. aureus* تا ۶ ساعت نخست روند کاهش رشد باکتری را مشاهده می‌کنیم ولی پس ۲۴ ساعت از گذشت تیمار میزان مهار رشد نسبت به ۶ ساعت کمتر شده است (۳۳). در مطالعه حاضر استفاده هم‌زمان دو ترکیب با پتانسیل ضد میکروبی پلیمر کیتوسان (CS) و عصاره میخک (CEO) موجب اثر هم‌افزایی در تامین ویژگی ضد باکتریایی می‌گردد. در نتایج تست ضد باکتریایی نیز (شکل ۲)، اثر مهار رشد و تکثیر باکتری در هر یک از ترکیبات به تنهایی و هیدروژل

شده فاقد سمیت برای سلول L929 بوده و به‌طور فعال از رشد باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* جلوگیری کرده است. براساس نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر هیدروژل CS/CEO حساس به pH علاوه بر زیست‌سازگاری دارای ظرفیت آنتی‌باکتریایی می‌باشد. وجود مشخصه ضدباکتریایی با بهره‌گیری از ترکیبات طبیعی می‌تواند راه‌حلی امیدبخش برای کاهش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی در حوزه زیست پزشکی باشد. ساختار هیدروژل CS/CEO دارای قابلیت استفاده بعنوان زخم‌پوش در مطالعات تکمیلی در محیط درون‌تنی (in vivo) می‌باشد.

منابع

1. Anjum S, Arora A, Alam MS, Gupta B. Development of antimicrobial and scar preventive chitosan hydrogel wound dressings. *Int J Pharm.* 2016;508(1-2):92-101.
2. Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, Han C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials.* 2003; 24(26):4833-4841.
3. Akbari A, Rabbani S, Irani S, Zandi M, Sharifi F, Ameli F, Mohamadali M. In vitro and in vivo study of carboxymethyl chitosan/polyvinyl alcohol for wound dressing application. *J Appl Polym Sci.* 2022; 139(10):51764.
4. Khorasani MT, Joorabloo A, Adeli H, Milan PB, Amoupour M. Enhanced antimicrobial and full-thickness wound healing efficiency of hydrogels loaded with heparinized ZnO nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *Int J Biol Macromol.* 2021;166:200-212..
5. Adeli H, Khorasani MT, Parvazinia M. Wound dressing based on electrospun PVA/chitosan/starch nanofibrous mats: Fabrication, antibacterial and cytocompatibility evaluation and in vitro

تلفیقی (CS/CEO) به‌وضوح قابل‌مشاهده است. تمامی ساختارهای تهیه شده در زمینه زخم‌پوش نیاز به تأیید زیست‌سازگاری در شرایط برون تنی (in vitro) دارند. در این مطالعه از رده سلول فیروبیلاست موشی (L929) استفاده گردید. بر اساس تصاویر میکروسکوپی بدست آمده از تیمار سلول‌های L929 با هیدروژل CS/CEO هیچگونه سمیت سلولی مشاهده نشد (شکل ۳a). در ادامه بررسی از آزمون MTT برای تعیین میزان زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده با هیدروژل CS/CEO در بازه زمانی ۲۴ تا ۷۲ ساعت در برابر نمونه سلول L929 کشت شده در کف پلیت مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نمودار ارائه شده در تصویر ۳b، سلول‌های تیمار شده با هیدروژل CS/CEO دارای روند رشد فزاینده بوده است. به‌طوریکه در بازه زمانی ۲۴ تا ۷۲ ساعت دارای سطح معنی‌داری ($p > 0/001$) می‌باشد. در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۲۱، سلول فیروبیلاستی بر روی نانوالیاف کیتوسان/پلی‌اتیلن‌اکساید حاوی عصاره میخک برای مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. در نمونه حاوی عصاره میخک فاقد تفاوت معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل است (۳۴). در مطالعه حاضر سه بازه زمانی بویژه ۲۴ ساعت نخست برای بررسی دقیق ویژگی‌های هیدروژل تهیه شده در برابر سلول‌های فیروبیلاست بعنوان مطالعات پایه جهت تعمیم به مطالعات درون تنی (in vivo) در نظر گرفته شد (شکل ۳b).

نتیجه‌گیری

عصاره میخک (CEO) بارگذاری شده درون هیدروژل بمنظور ارتقا ویژگی‌های هیدروژل تهیه شده از پلیمر کیتوسان با موفقیت انجام شد. ویژگی‌های ساختاری و شیمیایی هیدروژل CS/CEO بواسطه‌ی آزمون‌های SEM و FTIR بررسی شد. ساختار هیدروژل تهیه

- Hassan MA. Development of Polyvinyl Alcohol/Kaolin Sponges Stimulated by Marjoram as Hemostatic, Antibacterial, and Antioxidant Dressings for Wound Healing Promotion. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23): 13050.
15. Moeini A, Pedram P, Makvandi P, Malinconico M, Gomez d'Ayala G. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. *Carbohydr Polym.* 2020; 233:115839..
16. Sharifi F, Hasani M, Atyabi SM, Yu B, Ghalandari B, Li D, et al. Mesenchymal stem cells encapsulation in chitosan and carboxymethyl chitosan hydrogels to enhance osteo-differentiation. *Mol Biol Rep.* 2022; 49(12):12063-12075..
17. Zhang M, Yang M, Woo MW, Li Y, Han W, Dang X. High-mechanical strength carboxymethyl chitosan-based hydrogel film for antibacterial wound dressing. *Carbohydr Polym.* 2021;256:117590.
18. Caldwell MD. Bacteria and Antibiotics in Wound Healing. *Surg Clin North Am.* 2020; 100(4):757-776.
19. Zhang J, Ge J, Xu Y, Chen J, Zhou A, Sun L, Gao Y, Zhang Y, Gu T, Ning X. Bioactive multi-engineered hydrogel offers simultaneous promise against antibiotic resistance and wound damage. *Int J Biol Macromol.* 2020; 164:4466-4474..
20. Banerjee K, Madhyastha H, Sandur VR, Manikandanath NT, Thiagarajan N, Padma T. Anti-inflammatory and wound healing potential of a clove oil emulsion. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2020; 193:111102.
21. Ali R, Khamis T, Enan G, El-Didamony G, Sitohy B, Abdel-Fattah G. The healing capability of clove flower extract (CFE) in streptozotocin-induced (STZ-induced) diabetic rat wounds infected with multidrug resistant bacteria. *Molecules.* 2022;27(7): 2270.
22. Mohammadnezhad J, Khodabakhshi-Soreshjani F, Bakhshi H. Preparation and healing assay. *Int J Biol Macromol.* 2019; 122:238-254.
6. Kabirkoochian A, Bakhshi H, Irani S, Sharifi F. Chemical Immobilization of Carboxymethyl Chitosan on Polycaprolactone Nanofibers as Osteochondral Scaffolds. *Appl Biochem Biotechnol.* 2023;195(6):3888-3899.
7. El-Samad LM, Hassan MA, Basha AA, El-Ashram S, Radwan EH, Abdul Aziz KK, Tamer TM, Augustyniak M, El Wakil A. Carboxymethyl cellulose/sericin-based hydrogels with intrinsic antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory properties promote re-epithelization of diabetic wounds in rats. *Int J Pharm.* 2022; 629:122328.
8. Feng W, Wang Z. Biomedical applications of chitosan-graphene oxide nanocomposites. *iScience.* 2021; 25(1):103629.
9. Mourya VK, Inamdar NN, Tiwari A. Carboxymethyl chitosan and its applications. *Advanced Materials Letters, Review Article Adv. Mat. Lett.* 2010; 1(1):11-33.
10. Fei Liu X, Lin Guan Y, Yang DZ, Li, Z. Yao KD. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J Appl Polym Sci.* 2001;79(7):1324-1335.
11. Li B, Cui J, Xu T, Xu Y, Long M, Li J, Liu M, Yang T, Du Y, Xu Q. Advances in the preparation, characterization, and biological functions of chitosan oligosaccharide derivatives: A review. *Carbohydr Polym.* 2024;332:121914.
12. Dreiss CA. Hydrogel design strategies for drug delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2020;48:1-17.
13. Zhou Y, Yang H, Liu X, Mao J, Gu S, Xu W. Electrospinning of carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol)/silk fibroin nanoparticles for wound dressings. *Int J Biol Macromol.* 2013;53:88-92.
14. Tamer TM, Alsehli MH, Omer AM, Afifi TH, Sabet MM, Mohy-Eldin MS,

- Hydrogels for Skin-Wound Dressings. *Gels*. 2024;10(3):175.
29. Sivanesan I, Hasan N, Muthu M, Blessing G, Gopal J, Chun S, Shin J, Oh JW. Exploring the impact of chitosan composites as artificial organs. *Polymers*. 2022;14(8):1587.
 30. Shah A, Ashames AA, Buabeid M A, Murtaza G. Synthesis, in vitro characterization and antibacterial efficacy of moxifloxacin-loaded chitosan-pullulan-silver-nanocomposite films. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2020;55:101366.
 31. Omid M, Yadegari A, Tayebi L. Wound dressing application of pH-sensitive carbon dots/chitosan hydrogel. *RSC Adv*. 2017;7(18):10638-49.
 32. Arafa AA, Nada AA, Ibrahim AY, Sajkiewicz P, Zahran MK, Hakeim OA. Preparation and characterization of smart therapeutic pH-sensitive wound dressing from red cabbage extract and chitosan hydrogel. *Int J Biol Macromol*. 2021;182:1820-1831.
 33. Unalan I, Endlein SJ, Slavik B, Buettner A, Goldmann WH, Detsch R, Boccaccini AR. Evaluation of electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofiber mats containing clove essential oil for antibacterial wound dressing. *Pharmaceutics*. 2019;11(11):570.
 34. Hameed M, Rasul A, Waqas MK, Saadullah M, Aslam N, Abbas G, et al. Formulation and evaluation of a clove oil-encapsulated nanofiber formulation for effective wound-healing. *Molecules*, 2021; 26(9):2491.
 - evaluation of chitosan-coated eggshell particles as copper (II) biosorbent. *Desalin. Water Treat*. 2016; 57(4):1693-1704.
 23. Ray M, Pal K, Anis A, Banthia AK. Development and characterization of chitosan based polymeric hydrogel membranes. *Des. Monomers Polym*. 2010; 13(3):193-206.
 24. Sharifi F, Atyabi SM, Norouzzian D, Zandi M, Irani S, Bakhshi H. Polycaprolactone/carboxymethyl chitosan nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering application. *Int J Biol Macromol*. 2018;115:243-248.
 25. González-Rivera J, Duce C., Falconieri D, Ferrari C, Ghezzi L, Piras A, et al. Coaxial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove buds): Chemical composition and thermal analysis. *Innovative Innov Food Sci Emerg Technol*, 2016;33:308-318.
 26. Parham S, Zargar Kharazi A. Cellulosic textile/clove nanocomposite as an antimicrobial wound dressing: In vitro and in vivo study. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2022;217:112659.
 27. Liang H, Mirinejad MS, Asefnejad A, Baharifar H, Li X, Saber-Samandari S, et al. Fabrication of tragacanthin gum-carboxymethyl chitosan bio-nanocomposite wound dressing with silver-titanium nanoparticles using freeze-drying method. *Mater Chem Phys*. 2022;279(10):125770
 28. Guo W, Ding X, Zhang H, Liu Z, Han Y, Wei Q, Okoro OV, Shavandi A, Nie L. Recent Advances of Chitosan-Based

Research Article**A Survey on Gastrointestinal Helminths of *Cynogossus bilineatus* Caught from the Coasts of Bandar Abbas****Abdolhossein Dalimi^{1*}, Karaneh Parizadeh²**

1- Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University,
P.O.Box:14115-331, Tehran, Iran

2- Payame Noor University, Qeshm International Branch, Qeshm, Iran

*Corresponding author: dalimi_a@modares.ac.ir

Received: 26 February 2025

Accepted: 20 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1200536

Abstract

Studying helminth parasites of the digestive tract of fish can complete our information about parasite distribution, host characteristics, and food safety, especially regarding edible fish in the Persian Gulf. The aim of this study was to investigate helminth parasites in the digestive tract of *Cynogossus bilineatus* caught off the coast of Bandar Abbas. For this purpose, the digestive tract of 50 *C. bilineatus* was examined during the summer of 2017 in Bandar Abbas. After procuring the fishes, they were transferred to the laboratory and different parts of their bodies were measured for morphometric study. Then whole digestive tract of the fishes was removed, opened with a small scissor into a dish and the content digestive tract and body cavity searched for the presence of helminth. Finally, the parasites were then stained and identified with the help of reliable sources. The helminthic parasites that were recovered from the digestive tract of the fishes were identified as follows: The trematodes *Lepocreadioides zebrini* and acanthocephalan *Hemiradinorhynchus leuciscus* were recovered from *C. bilineatus* with 10% and 2% infection rate respectively. In addition, cestodes *Scolex pleuronectis*, *Trypanorhyncha* larvae, as well as *Anisakis* sp each with a 2% infection rate were isolated from *C. bilineatus*. All these parasites are reported for the first time from *C. bilineatus* caught from the coasts of the Persian Gulf. The finding of *Scolex pleuronectis*, *Trypanorhyncha* larvae, and *Anisakis* sp. as new records for *C. bilineatus* highlights the importance of continued parasitological surveys to better understand the biodiversity and ecological relationships within this marine environment.

Keywords: *Cynogossus bilineatus*, Helminth parasites, *Anisakis*, Bandar Abbas.



بررسی انگل‌های کرمی دستگاه گوارش ماهی کفشک زبان گاوی (*Cynoglossus bilineatus*)

صید شده از سواحل بندر عباس

عبدالحسین دلیمی^{۱*}، کرانه پری‌زاده^۲

۱- گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشگاه پیام نور، واحد بین‌الملل قشم، قشم، ایران

*مسئول مکاتبات: dalimi_a@modares.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۰۸

DOI: 10.60833/ascij.2025.1200536

چکیده

بررسی انگل‌های کرمی دستگاه گوارش ماهیان می‌تواند اطلاعات ما را در مورد انتشار انگل، ویژگی میزبان و سلامت مواد غذایی به ویژه در مورد ماهیان خوراکی خلیج فارس کامل نماید. هدف از انجام این مطالعه، بررسی انگل‌های کرمی دستگاه گوارش ماهی کفشک زبان گاوی صید شده در سواحل بندرعباس بوده است. بدین منظور دستگاه گوارش ۵۰ قطعه ماهی کفشک زبان گاوی در طول فصل تابستان سال ۹۶ در بندرعباس مورد بررسی قرار گرفت. ماهیان پس از تهیه به آزمایشگاه منتقل شدند و قسمت‌های مختلف بدن آن‌ها برای بررسی مورفومتریک اندازه‌گیری شد. سپس کل دستگاه گوارش ماهی‌ها از بدن خارج و با قیچی کوچک در ظرف باز شد و محتویات دستگاه گوارش و حفره بدن برای وجود کرم جستجو شد. سپس انگل‌ها رنگ‌آمیزی و با کمک منابع معتبر شناسایی شدند. انگل‌های کرمی که از دستگاه گوارش کفشک زبان گاوی جداسازی و شناسایی شدند شامل ترماتودهای *Lepocreadioides zebrini* و آکانتوسفال *Hemiradinorhynchus leuciscus* به ترتیب با میزان آلودگی ۱۰ و ۲ درصد بوده‌اند. علاوه بر این، سستود *Scolex pleuronectis*، لارو *Trypanorhyncha* و همچنین *Anisakis sp* هر کدام با میزان آلودگی ۲ درصد از کفشک زبان گاوی تشخیص داده شدند. همه این انگل‌ها برای اولین بار از کفشک زبان گاوی صید شده از سواحل خلیج فارس گزارش می‌شوند. گزارش این انگل برای اولین بار از کفشک زبان گاوی، بر اهمیت ادامه بررسی‌های انگلی برای درک بهتر تنوع زیستی و روابط اکولوژیکی در این محیط دریایی تاکید دارد.

کلمات کلیدی: ماهی کفشک زبان گاوی، انگل‌های کرمی، آنیز/کیس، بندرعباس.

مقدمه

بسیار کوچک با فاصله کم هستند. دارای دهان ناتقارن، کوچک و فک پایینی غیربرجسته است. دندان‌ها در هر دو فک ریز و معمولاً فقط در طرف بدون چشم رشد یافته است. باله دمی پیوسته به باله مخرجی و پشتی باله شکمی سمت راست، اغلب توسعه نیافته، فاقد باله سینه‌ای، شروع باله پشتی

ماهی زبان یا کفشک زبان گاوی از خانواده زبان‌ماهیان به راسته پهن‌ماهی‌شکلان (Pleuronectiforms) تعلق دارد. نام علمی آن *Cynoglossus bilineatus* می‌باشد. خانواده زبان‌ماهیان معمولاً در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری پراکنده هستند. از لحاظ خصوصیات ظاهری، هر دو چشم در سمت چپ سر، چشم‌ها

جلوتر یا همسطح چشم پایینی است. تعداد مهره‌ها ۳۳ تا ۶۶ عدد است. طول آن‌ها به ۴۸ سانتی‌متر می‌رسد اما اغلب زیر ۳۰ سانتی‌متر هستند. رنگ آن‌ها قرمز مایل به قهوه‌ای، یک خال سیاه رنگ تیره بر روی پوشش آبششی آن‌ها وجود دارد. ماهی‌های زبانی در آب‌های گرم همه اقیانوس‌ها (بین عرض جغرافیایی ۴۰ درجه) یافت می‌شوند. بیشتر گونه‌ها در آب‌های کم عمق یا خورها زندگی می‌کنند. بسیاری از گونه‌ها از نظر تجاری اهمیت دارند. اغلب گونه‌ای این خانواده در رودخانه‌ها حضور دارند. تغذیه آن‌ها از بی‌مهرگان کفزی می‌باشد. حرکت آن‌ها بسیار کند است. صید آن‌ها از طریق ترال کفروب و رشته قلاب طویل انجام می‌شود (۱). تا کنون شش گونه از خانواده زبان ماهیان از آب‌های خلیج فارس و دریای عمان گزارش شده است که شامل زبان گاوی درشت پولک یا *Cynoglossus arel*، زبان گاوی چهارخط یا *C. bilineatus*؛ زبان گاوی خالدار یا *C. puncticeps*، زبان گاوی فلابدار *C. carpenter*، زبان گاوی سر کوچک *C. kopsii* و زبان گاوی دو خطه *Paraplagusia bilineata* است (۲). ماهیان همواره در معرض انواع آلودگی انگلی قرار دارند. برخی از این انگل‌ها اختصاصاً در ماهی یافت می‌شوند و سلامت آن را در معرض خطر قرار می‌دهند و برخی دیگر ماهی را بعنوان میزبان واسط برمی‌گزینند و به انسان و حیوانات منتقل می‌شوند. گرچه تحقیقات فراوانی در زمینه تشخیص انگل‌های آبزیان در جهان صورت گرفته است ولی در ایران گرچه تحقیقات در این زمینه از قدمت زیادی برخوردار نیست. ولی مطالعات خوبی در خصوص جداسازی و شناسایی انگل‌ها از ماهیان منابع آب‌های داخلی و دریایی کشور صورت گرفته است. در مورد کفشک زبان گاوی چهار خط یا *C. bilineatus* نیز تحقیقات بسیار کم صورت گرفته است. تنها مطالعه انجام شده در این

خصوص مربوط به بررسی عضدی و همکاران در سال ۲۰۱۷ است. در این بررسی، ۸۲ درصد از ماهیان کفشک زبان گاوی خریداری شده از بازار اهواز دارای آلودگی کرمی بوده‌اند. در این مطالعه دو گونه ترماتود و سه گونه نماتود گزارش شده است (۳). اصولاً درک جامع از انگل‌های کفشک زبان گاوی و دیگر گونه‌های ماهی در خلیج فارس برای مدیریت مؤثر شیلات و تلاش‌های حفاظتی حیاتی است. مطالعه فون انگل گونه‌های ماهی خلیج فارس، به‌ویژه ماهیان خوراکی، می‌تواند اطلاعات ما را در زمینه انتشار انگل، ویژگی میزبانان انگل و سلامت و بهداشت مواد غذایی ناشی از مصرف ماهیان را کامل نماید. هدف از این مطالعه، بررسی انگل‌های کرمی دستگاه گوارش ماهی کفشک زبان گاوی صید شده در سواحل بندرعباس بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: در این پژوهش نمونه‌برداری از ماهیان در فصل تابستان (تیر و مرداد ۱۳۹۶) صورت گرفت. تعداد ۵۰ نمونه ماهی کفشک زبان گاوی از صیادان بندرعباس بصورت تصادفی خریداری شد.

زیست‌سنجی ماهیان: بعضی از خصوصیات قابل اندازه‌گیری ماهیان با خط‌کش و ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. این خصوصیات شامل طول استاندارد، طول کل، وزن کل، طول باله پشتی، طول باله شکمی، طول باله دم، طول باله مخرجی، طول باله سینه‌ای، فاصله بین دو چشم، قطر چشم، قاعده باله پشتی، قاعده باله شکمی، قاعده باله دم، قاعده باله مخرجی، قاعده باله سینه‌ای، فاصله پوزه تا چشم، فاصله بین خط جانبی می‌باشد. در هنگام استفاده از تخته اندازه‌گیری و ترازوی دیجیتال، تمام سطوح فلزی آن‌ها که در تماس با ماهی بودند توسط ورقه پلاستیکی پوشانده شده بود و این عمل برای هر ماهی

تکرار گردید.

شناسایی انگل: پس از شکافتن شکم ماهی، نسبت به جداسازی روده اقدام شد روده ها بوسیله قیچی باز شد سپس محتویات روده را در یک پلیت ریخته و به کمک استریومیکروسکوپ انگل‌های کرمی جستجو گردید. در صورت مشاهده انگل آن را بوسیله سوزن و یا پی پت پاستور جدا می‌شد. جهت فیکس نمودن انگل‌ها از فرمالین ۵ درصد و یا الکل اتانول ۷۰ درجه استفاده شد. برای شناسایی انگل جداشده، آن را روی یک لام تمیز داده، یک قطره رنگ آزوکارمن به آن اضافه کرده و روی آن لامل قرار می‌دهیم و با توجه به خصوصیات مرفولوژیک، انگل با استفاده از منابع معتبر بین المللی شناسایی گردید (۴، ۵، ۶، ۷). پس از شناسایی، از انگل عکس گرفته و مشخصات مرفولوژیک آن یادداشت و با دستگاه کامالوسیدا ترسیم گردید. در نهایت انگل با استفاده از الکل، آگیری و با گزیلول، شفاف و با کانادا بالزام، مونت گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل از زیست-سنجی ماهیان و میزان آلودگی با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون T-Test و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ مورد مقایسه قرار گرفتند. همچنین جهت رسم نمودارها و جداول از نرم‌افزار اکسل استفاده شد. نمونه‌های مختلف از نظر نوع آلودگی از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون T-Test مقایسه گردیدند. برای تعیین وجود ارتباط خطی و میزان آن بین آلودگی ماهیان و مشخصات زیست سنجی از آزمون رگرسیون خطی و همبستگی پیرسون و آزمون-های کندال و اسپیرمن استفاده شد.

نتایج

خصوصیات مورفومتریک کفشک زبان‌گاو صید شده در سواحل بندر عباس: در این بررسی طول کل

در گونه‌ی *Cynogossus bilineatus*، $29/36 \pm$ ۲۸/۱۹ میلی‌متر، طول استاندارد $29/24 \pm$ ۲۱۲/۶۷ میلی‌متر، طول باله پشتی $2/02 \pm$ ۱۰/۲۹۹۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. محدوده‌ی اندازه‌گیری برای سایر ویژگی‌های مورفومتریک به طور کامل در جدول ۱ ارائه شده است.

خصوصیات انگل‌های شناسایی شده

Lepocreadioides zebrini Yamaguti, 1936
بیشترین جنس شناسایی شده از کفشک زبان گاوی بوده است این انگل دارای خصوصیات زیر می‌باشد: بدن پهن و بیضوی، تگومنت نازک و بدون خار. طول بدن: ۹۸۰ میکرون، عرض بدن: ۵۸۸ میکرون؛ اندازه تخم: $51/66$ در 50 میکرون، قطر بادکش دهانی: $98/4$ میکرون. قطر بادکش شکمی: ۱۹۰ میکرون، نسبت قطر بادکش شکمی به بادکش دهانی $1:1/93$ ، بیضه بیضی‌شکل، درکنارهم، قطر بیضه‌ها: ۱۵۵ در $196/8$ میکرون، کیسه سیربلند و در کنار بادکش دهانی باز می‌شود. طول آن: $196/8$ میکرون قطر فارنکس: $66/4$ در $41/8$ میکرون، غدد ویتلین از بالای بادکش شکمی و از محل انشعاب سکوم شروع و تا انتهای بدن ادامه دارد (شکل ۱).

Scolex pleuronectis Müller, 1788
میزان آلودگی ۲ درصد بوده که خصوصیات زیر را دارا می‌باشد. طول بدن: ۴۸۹ میکرون، عرض بدن: ۳۱۵ میکرون، اندازه تخم: $29/52$ در $17/12$ ، اندازه بادکش‌ها: ۱۴۴ میکرون (شکل ۲).

Trypanorhyncha: لارو سستود با میزان آلودگی ۲ درصد بوده که در شکل ۳ نشان داده شده است.

Anisakis Dujardin, 1845
این نماتود با میزان آلودگی ۲ درصد بوده که خصوصیات زیر را دارا می‌باشد. بدن باریک و کشیده، دارای غلاف و سه لب، طول بدن: ۲،۴۵ میلی‌متر، عرض بدن: $127/4$ میکرون (شکل ۴).

همبستگی بین شاخص‌های مختلف بدن ماهی زبان و آلودگی انگلی: با توجه به آزمون همبستگی نتایج نشان داد که بین شاخص‌های مختلف بدن ماهی زبان (وزن، طول بدن و نسبت وزن به ابعاد بدن) و آلودگی انگلی، هیچ گونه همبستگی وجود ندارد (جدول ۳). بر طبق این جدول رابطه معنی‌دار با $p \leq 0.05$ فقط در موارد فاصله پوزه تا منفذ آبششی و فاصله پوزه تا باله پشتی وجود دارد.

Hemirhadinorhynchus leuciscus Krotov & Petrochenko, 1956. این آکانتاسفال با میزان آلودگی ۲ درصد بوده که خصوصیات زیر را دارا می‌باشد. بدن کشیده، پوشش خارجی ضخیم و خاردار، خارها تا انتهای نیمه قدامی بدن ادامه دارد. طول بدن: ۲/۷۸ میلی‌متر، عرض: ۱۶۶ میکرون، طول خرطوم خارج شده: ۱۴۷/۶ میکرون، عرض خرطوم خارج شده: ۶۱/۵ میکرون، خارها در ۱۱ ردیف شش‌تایی، اندازه خار: ۲۰/۳ در ۴۰/۶ میکرون (شکل ۵).

جدول ۱- مشخصات مورفومتریک ماهی‌های زبان صید شده در سواحل بندر عباس

Table 1 Morphometric indicators of tongue soles caught off the coast of in Bandar Abbas coast

Indicators	Size (mm)	
	Average	SE
Total weight (g)	47.63	19.51
Total length (mm)	228.19	29.36
Standard length (mm)	212.67	29.24
Dorsal fin length (mm)	10.99	2.02
Ventral fin length (mm)	11.04	2.21
Distance between eyes (mm)	2.77	2.40
Dorsal fin base (mm)	218.46	27.28
Ventral fin base (mm)	182.02	31.19
Distance from snout to eye (mm)	18.41	3.61

جدول ۲- کرم‌های یافت شده در ۵۰ عدد ماهی زبان *Cynoglossus linnaeus* صید شده در سواحل بندر عباس

Table 2. Helminths found in 50 tongue soles (*Cynoglossus Linnaeus*) caught on the coast of Bandar Abbas

Parsites	Class	No.	Infection %
<i>Lepocreadioides zebrini</i>	Trematode	5	10
<i>Scolex pleuronectis</i>	Cestode	1	2
<i>Trypanorhyncha</i>	Cestode	1	2
<i>Anisakis sp.</i>	Nematode	1	2
<i>Hemirhadinorhynchus leuciscus</i>	Acanthocephala	1	2

جدول ۳- مشخصات مورفومتریک ماهی‌های زبان آلوده و غیرآلوده به انگل کرمی صید شده در سواحل بندرعباس

Table 3. Morphometric characteristics of tounge sole infected and not infected with helminth parasites caught on the coast of Bandar Abbas

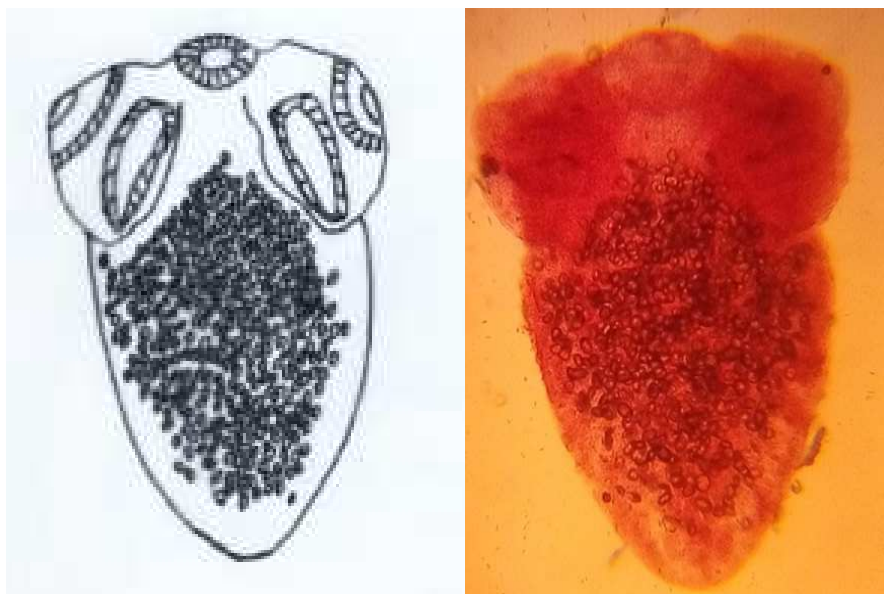
Indecies	Non-infected		Infected		F	p	Correlation
	Mean	SE	Mean	SE			
Total weight (g)	48.14	19.98	44.93	17.74	0.10	0.74	Absent
Total length (mm)	228.19	29.41	228.18	31.15	0.09	0.76	Absent
Standard length (mm)	212.61	29.42	212.93	30.27	0.06	0.79	Absent
Maximum body thickness (mm)	9.04	1.65	8.72	1.67	0.09	0.76	Absent
Dorsal fin base length (mm)	217.28	26.97	224.62	29.98	0.002	0.96	Absent
Ventral fin base length (mm)	183.00	32.11	176.87	27.11	0.59	0.44	Absent
Dorsal fin height (mm)	10.88	1.98	11.59	2.28	0.45	0.50	Absent
Ventral fin height (mm)	11.01	2.21	11.25	2.32	.018	0.89	Absent
Distance from snout to dorsal fin (mm)	14.03	5.46	19.18	3.68	4.64	0.03	Present
Distance from snout to eye (mm)	18.14	3.69	19.82	2.92	0.05	0.81	absent
Distance between two eyes (mm)	2.81	2.61	2.56	.67	0.52	0.47	absent
Left eye diameter (mm)	3.38	.79	3.66	1.04	1.01	0.31	absent
Right eye diameter (mm)	3.09	1.00	3.00	1.41	0.81	0.37	absent

Lateral line to ventral fin distance	24.49	4.54	27.75	6.87	1.78	0.18	Absence
Distance from lateral line to dorsal fin	24.25	4.59	25.09	6.76	0.73	0.39	Absence
Distance from snout to gill opening	36.22	14.02	46.81	7.86	4.31	0.04	Present



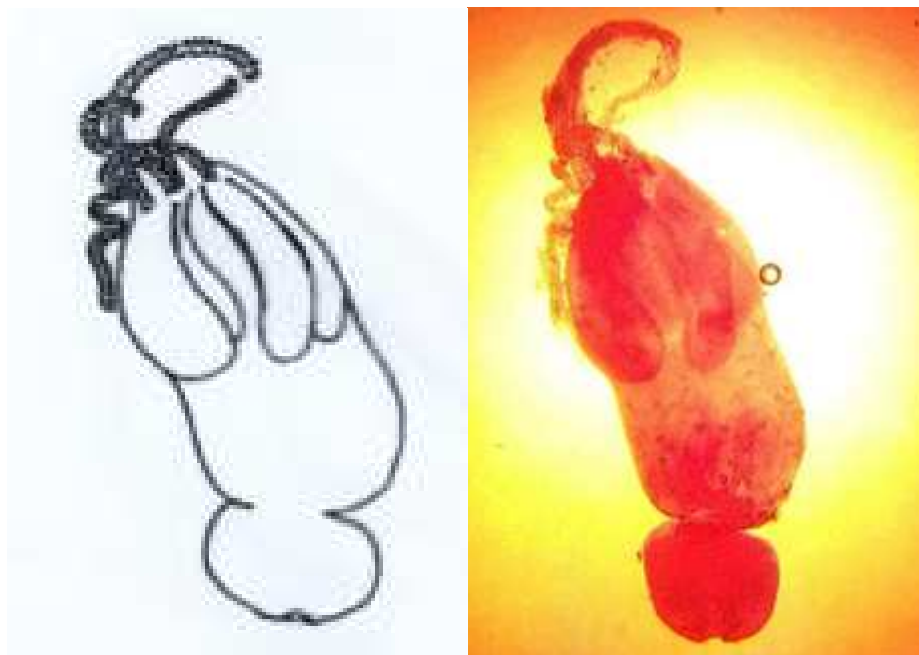
شکل ۱- انگل *Lepocreadioides zebrini*

Fig. 1. *Lepocreadioides zebrine*



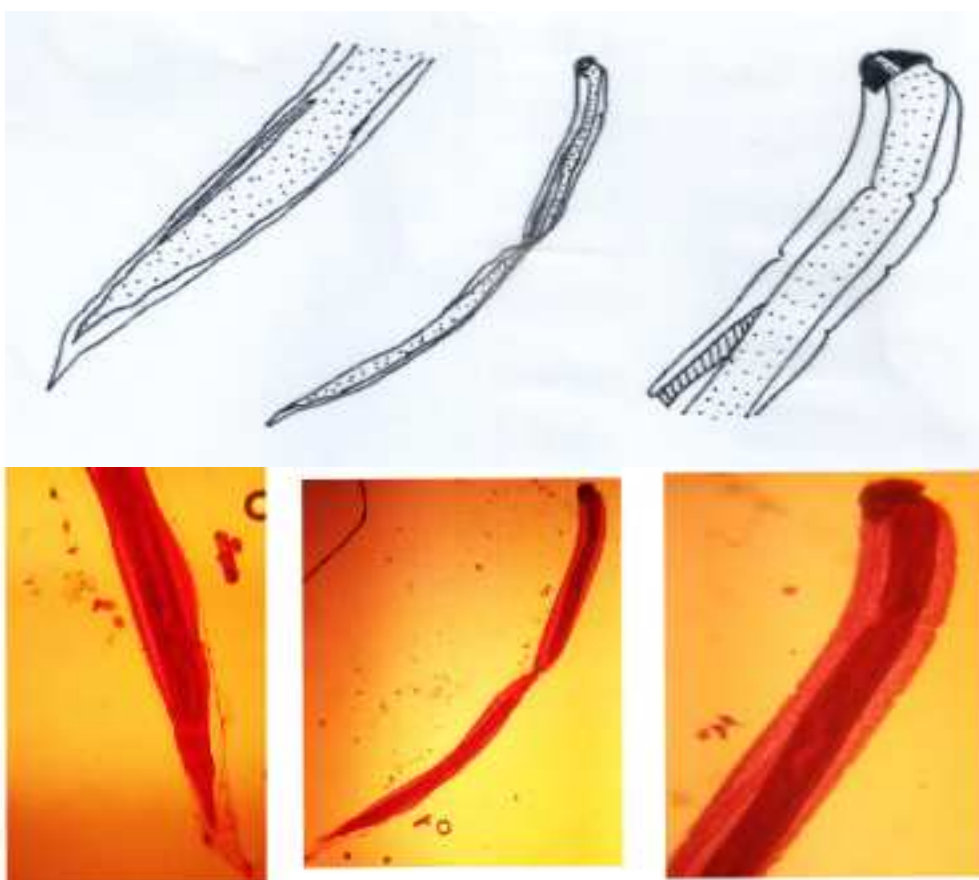
شکل ۲- انگل *Scolex pleuronectis*

Fig. 2. *Scolex pleuronectis* parasite



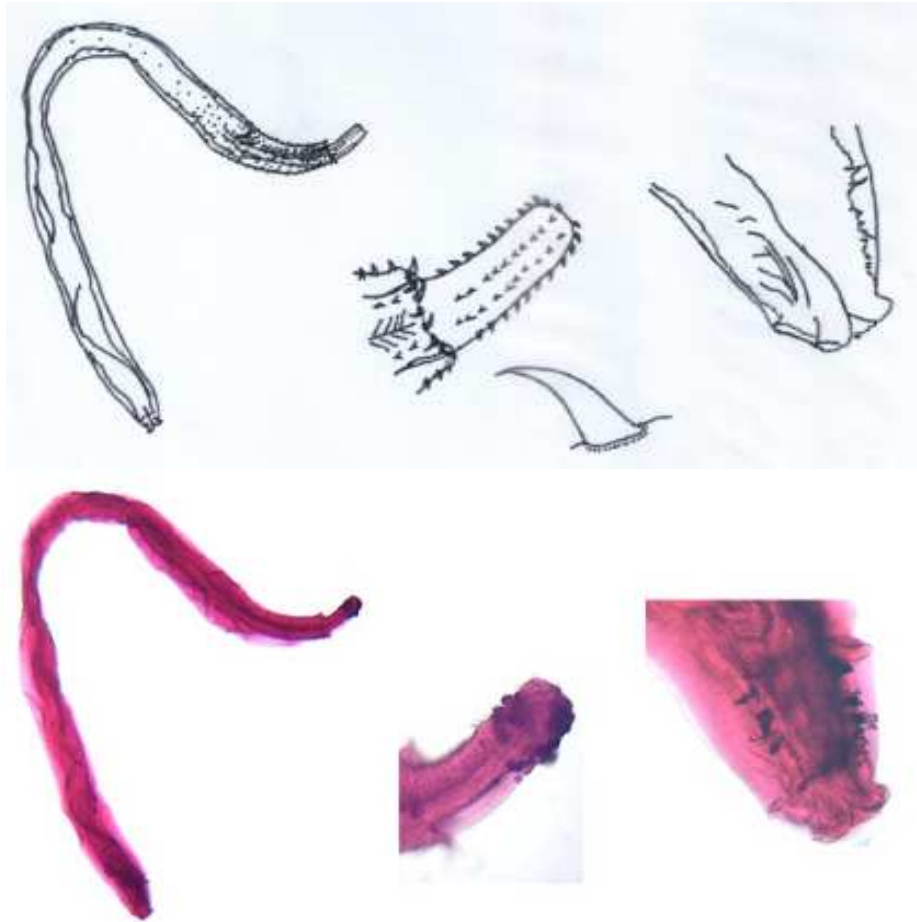
شکل ۳- انگل *Trypanorhyncha*

Fig. 3. *Trypanorhyncha*



شکل ۴- انگل *Anisakis* sp.

Fig. 4. *Anisakis* sp.



شکل ۵- انگل *Hemiradinorhynchus leuciscus*
Fig. 5. Parasite *Hemiradinorhynchus leuciscus*

بحث

آلودگی و سستود *Scolex pleuronectis* با میزان ۲ درصد آلودگی و لارو سستود *Trypanorhyncha* با میزان ۲ درصد آلودگی و نماتود *Anisakis sp.* با آلودگی ۲ درصد یافت شد. که بیشترین آلودگی مربوط به انگل ترماتود *Lepocreadioides zebrini* می‌باشد. این در حالی است که در بررسی عضدی و همکاران در سال ۲۰۱۷، دو نوع ترماتود *Treptodemoides fukenensis* و *Aphanuroides lethrini* و چهار گونه از نماتدهای *Capillaria*، *Procaecum* و *Raphidascaroides nipponensis* از دستگاه

طبق بررسی به عمل آمده مطالعات انگلی و مورفومتریک بسیار کمی بر روی کفشک زبان گاوی صورت گرفته است و این تحقیق جز معدود تحقیقات بروی این گونه از ماهیان است. با توجه به اهمیت کفشک زبان گاوی از لحاظ پرطرفدار بودن و اهمیت اقتصادی بالای آن در حاشیه خلیج فارس (۸). مطالعه حاضر برای تعیین آلودگی انگلی این ماهی صورت گرفت. طی این مطالعه انواع مختلفی از انگل‌های کرمی، شامل ترماتود *Lepocreadioides zebrini* با میزان آلودگی ۱۰ درصد و آکانتوسفال *Hemiradinorhynchus leuciscus* با میزان ۲ درصد

گوارش، کبد و حفره شکمی کفشک زبان گاوی خریداری شده از بازار اهواز گزارش شده است. نتایج این دو گزارش کاملاً متفاوت است. با توجه به اینکه عمده ماهی‌های بازار اهواز از سواحل جنوب خوزستان تامین می‌شود وجود این تفاوت چندان دور از ذهن نیست. نماتود آنیزاکیس شناسایی شده در مطالعه حاضر، تنها انگل قابل سرایت به انسان از طریق مصرف ماهی نیمه خام یا خام است که بیماری آنیزاکیزیس را ایجاد می‌کند. آنیزاکیس بیشتر معده انسان را درگیر می‌کند. معمولاً ۴۸ ساعت پس از مصرف ماهی خام و یا کامل پخته نشده آلوده به انگل، علائم بیماری ظاهر می‌شوند. ولی الگوی بیماری، بسیار متنوع می‌باشد. علائم بیماری بصورت درد شکمی شدید، تهوع، استفراغ و گاهی شبیه آپاندیسیت است. بیماری می‌تواند مزمن شود و گاهی برای ماه‌ها به طول می‌انجامد. این علائم با توده‌های معدی حاوی انگل توأم هستند و گاهی با تومور معدی و آنتریت قابل اشتباه است. لارو آنیزاکیس در غذاهای دریایی گاهی موجب تولید تظاهرات آلرژیک حاد مانند کهیر، آنژیوادم و آنافیلاکسی با و بدون علائم دستگاه گوارشی، در کسانی که ماهی خام مصرف کرده‌اند، می‌شود. بیش از ۹۵ درصد از موارد بالینی این بیماری در ژاپن گزارش می‌شود و کشورهای اروپایی و آمریکایی مقام بعدی را دارند. این انگل از انواع ماهیان جهان و ایران گزارش شده است (۹، ۱۰، ۱۱). در ایران، انگل مذکور از شانک ماهیان زردباله (۹، ۱۲)، ماهی سرخو (۱۳)، و هامور چرب (۱۲، ۱۴) خلیج فارس و اردک ماهیان (۱۵)، ماهیان خاویاری (۱۶) و ماهی سفید دریای خزر (۱۷) و شیربت کرخه (۱۸) گزارش شده است. تا کنون آلودگی انسانی به این انگل در ایران گزارش نشده است ولی بدلیل شیوع آن در طیف وسیعی از ماهیان آب‌های داخلی و دریایی ایران (۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۶) خطر بالقوه ابتلا

خاصه در مناطقی که مصرف‌کننده‌ی عمده ماهی هستند وجود دارد از طرفی علایم الودگی به این انگل مشابه بسیاری از بیماری‌های گوارشی است. لذا لازم است پزشکان این مناطق توجه خاصی به آن بنمایند. *Scolex pleuronectis* گونه‌ای سستود از راسته‌ی Tetraphyllidea می‌باشد. پلروسرکوئیدها و بالغ‌ها دارای اسکولکس حاوی انواع مختلف بوترییدیای قلاب‌دار و مکنده راسی برای اتصال به میزبان هستند. لاروها این انگل می‌توانند در برخی از ماهی‌ها به عنوان متاستودها مستقر شوند و شناسایی گونه آن‌ها در این مرحله از آلودگی دشوار است (۱۹)، (۲۰). گونه‌های مختلف طول ۸/۸ - ۰/۱ میلی‌متر و عرض ۰/۱ - ۰/۴ میلی‌متر دارند (۱۹، ۲۱). معمولاً سخت‌پوستان دریایی میزبان واسط مشترک گونه‌های مختلف این انگل هستند. این انگل‌ها در انواع ماهیان دیادروم، دریایی و آب شور از جمله خانواده‌های Cottidae، Salmonidae و Clupeidae شایع هستند. در ماهی‌ها انگل معمولاً بصورت تک بند و دارای یک مجموعه از اندام‌های تولیدمثل نر و ماده است (۱۹، ۲۲). این انگل تاکنون در ماهیان اقیانوس اطلس، اقیانوس آرام، مدیترانه، دریای سیاه، خلیج سنت لورنس و رودخانه‌هایی در سواحل شرقی آمریکای شمالی و حداقل در ۶۰ گونه ماهی از اقیانوس اطلس گزارش شده است. علاوه بر این، در پیستانداران دریایی و بی‌مهرگان مختلف نیز دیده شده است (۱۹، ۲۲، ۲۳). ترماتود *zebrini* *Lepocreadioides* تاکنون از ماهیان ژاپن توسط Yamaguti (۱۹۶۳) و چین توسط Shen و Qiu (۱۹۹۵) گزارش شده بود (۲۴، ۲۵). گرچه این انگل قبلاً توسط Bagherpour و همکاران (۲۰۱۱) و Hosseini و همکاران (۲۰۱۳) از کفشک راست‌گرد (*Brachirus orientalis*) خلیج فارس گزارش شده بود (۲۶، ۲۷) ولی بررسی‌ها نشان می‌دهد که

مراحل لاروی مانند لارو تریپانورینکا، که شناسایی آن‌ها صرفاً بر اساس مورفولوژی می‌تواند چالش برانگیز باشد. داده‌های مولکولی همچنین برای روشن کردن روابط فیلوژنتیکی انگل‌ها و میزبان‌های آن‌ها، ارائه بینش‌های بیشتر در مورد تاریخچه تکاملی و جغرافیای زیستی آن‌ها در خلیج فارس ارزشمند است.

نتیجه‌گیری

بطور کلی، در ماهی کفشک زبان گاوی فقط یک گونه ترماتود *Lepocreadioides zebrini* و دو لارو گونه سستود *Scolex pleuronectis* و *Trypanorhyncha*، یک نماتود *Anisakis sp* و یک گونه آکانتوسفال *Hemirhadinorhynchus leuciscus* شناسایی شدند. با توجه به سوابق پژوهش‌های انجام شده در مورد این ماهی، همه فوق‌الذکر برای اولین بار از کفشک زبان گاوی سواحل خلیج فارس گزارش می‌شود. این یافته‌ها تأکیدی بر اهمیت ادامه بررسی‌های انگلی برای درک بهتر تنوع زیستی و روابط اکولوژیکی در این محیط دریایی است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از اعضای هیات علمی و کارکنان محترم گروه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور قشم و گروه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تشکر نمایند.

منابع

1. Menon AGK. A systematic monograph of the tongue soles of the genus *Cynoglossus* Hamilton-Buchanan (Pisces: Cynoglossidae). Smithsonian Contributions to Zoology. 1977;238:1-129. doi.org/10.5479/si.00810282.238.
2. Iranian fishes data resource. The Persian Gulf and the Sea of Oman, Family of Cynoglossidae http://fishbase.ir/persiangulf_gulf_of_oman/Cynoglossidae.html.

ترماتودهای شناسایی شده در کفشک زبان گاوی این مطالعه تاکنون در ایران گزارش نشده‌اند. نتایج حاصل نشان داد که رابطه‌ی معنی بین میزان آلودگی انگلی و مشخصات مورفومتریک کفشک زبان گاوی فقط در فاصله بین پوزه تا باله پشتی با آلودگی انگلی معنی دار است ($p \leq 0.05$). شیوع انگل‌های کرمی در کفشک زبان گاوی نشان دهنده یک شبکه تغذیه‌ای پیچیده در اکوسیستم خلیج فارس است. حضور دو ترماتود بالغ و آکانتوسفال، همراه با لارو سستودی، تریپانورینکا و نماتود آنیزاکیس، نشان می‌دهد که کفشک زبان گاوی احتمالاً به عنوان میزبان واسط و قطعی برای گونه‌های مختلف انگل عمل می‌کند. علاوه بر این، مطالعه فون انگل سایر گونه‌های ماهی در منطقه می‌تواند الگوهای گسترده‌تری از پراکنش انگل و ویژگی میزبان را در خلیج فارس نشان دهد. میزان آلودگی نسبتاً پایین مشاهده شده برای اکثر انگل‌ها، به استثنای *Lepocreadioides zebrini* ممکن است منعکس‌کننده عادات تغذیه‌ای کفشک زبان گاوی، محدودیت در معرض قرار گرفتن با مراحل آلودگی، یا پاسخ‌های ایمنی میزبان باشد. همچنین لازم است تأثیر بالقوه عوامل محیطی، مانند آلودگی و تخریب زیستگاه، بر پویایی انتقال انگل در نظر گرفته شود. این عوامل استرس‌زا می‌توانند در آلودگی کفشک زبان گاوی تأثیر بگذارند و یا دسترسی ماهی به میزبان‌های واسط را تغییر دهند. شناسایی آنیزاکیس در این بررسی، به دلیل پتانسیل انتقال به انسان، نگرانی‌هایی را در مورد خطرات بالقوه برای سلامت انسان مرتبط با مصرف غذاهای دریایی خام یا نیم‌پز از خلیج فارس ایجاد می‌کند. اگرچه میزان آلودگی در کفشک زبان گاوی کم بود، ولی پخت و انجماد صحیح ماهی برای از بین بردن خطر آلودگی انسان ضروری است. مطالعات آتی باید بر روی استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای شناسایی دقیق‌تر انگل‌ها تمرکز یابند، به‌ویژه برای

Pathobiol. 11(4):1437-1446. [In Persian]

13. Mokhayr B. Observation of false tongue in redfish (*Lutjanus johnii*) and some other fish of the Persian Gulf, Vet Fac Lett. 1974;30(4):61-75. [In Persian]

14. Payghan R, Haghoghi-Rad N, Yousef Dezfouli A. Investigation of the infection of Silver pomfret (*Pampus argenteus*) and fat grouper (*Epinephelus tauvina*) in the Persian Gulf with helminth parasites. Pazhohesh va Sazandegi. 2004;62:49-55. [In Persian]

15. Eslami A, Mokhayer B. Nematode larvae of medical important found in market fish in Iran. Pahlavi Med J. 1977;8(3):345-348.

16. Mokhayr B. List of parasites of Iranian sturgeon, Vet Fac Bull. 1973;29(1):1-11.

17. Eslami A, Kokneshahri M. Study on the helminthiasis of *Rutilus frisii kutum* from south Caspian Sea. Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia, 1978;70:153-155.

18. Mesbah M., Razi Jalali M.H., Alishahi M., Akbarzadeh A. Investigation of infection of Karkheh *Barbus grypus* with nematodes common to humans. Iran Vet J. 2010;6(3):20-27. [In Persian]

19. Anantaraman S. Larval cestodes in marine invertebrates and fishes with a discussion of the life cycles of the Tetraphyllidea and the Trypanorhyncha. Zeitschrift für Parasitenkunde. 1963; 23:309-314.

20. Fernandez M, Javier Aznar F, Montero FE, Georgiev BB, Raga JA. Gastrointestinal helminths of Cuvier's beaked whales, *Ziphius cavirostris*, from the western Mediterranean. J Parasitol. 2004;90(2):418-420.

21. Chambers C.B., Cribb T.H., Jones M.K. Tetraphyllidean metacestodes of teleosts of the Great Barrier Reef, and the use of in vitro cultivation to identify them. Folia Parasitologica. 2000;47:285-292.

3. Azodi M, Peyghan R, Razi Jalali MH, Ghorbanpour M. Investigation on worm infestation of digestive tract in Persian gulf *Cynoglossus bilineatus*. Vet Res Biol Prod. 2017;30(4):114-124.

4. Schmidt GD. How to know the tapeworms. Wm C. Brown Company Publishers, USA. 1970.

5. Yamaguti S. The digenetic trematodes of vertebrates Part I and II, in Systema helminthum Volume I, (New York) 1958; Pp:1141-1143.

6. Yamaguti S. The nematodes of vertebrates, in Systema Helminthum Volume III (John Wiley and Sons, New York), 1961.

7. Yamaguti S. Acanthocephala in Systema Helminthum, Volume V, (Interscience Publication, New York), 1971.

8. Parvaneh M, Khaivar N, Nikpour Y, Nabavi SM. Heavy metals (Hg, Cd, Pb, Ni, Cu) concentrations in *Euryglossa orientalis* and sediments from Khur-e-Musa Creek in Khuzestan Province. Iran Sci Fish J. 2011; 20(2):17-26.

9. Payghan R, Nabavi L, Kiani F. Infection of yellowfin tuna (*Acanthopagrus latus*) and two-banded tuna in the Persian Gulf with helminth parasites. J Sci Shahid Chamran Univ. 2008;19:111-123. [In Persian]

10. Sharples AD, Evans CW. Taxonomy of the metazoan parasites of the snapper *pagrus auratus* in New Zealand Ectoparasites. New Zealand J Zool. 1995; 2:143-161.

11. Yamaguti S. Studies on the helminthes fauna of Japan. Pt 9. Nematodes of fishes. Japanese Society of Zoo and Wildlife Medicine, 1934;6:334-386.

12. Rasouli S. 2014. Investigation of parasitic nematodes of the Anizakidae family in the yellowfin tuna (*Acanthopagrus latus*) from the northern coast of the Persian Gulf, Iran. Comp

25. Yamaguti S. Studies on the helminth fauna of Japan. Part 16. Trematodes of fishes, III. Published by the author, Kyoto. 1936; pp:1-6.
26. Bagherpour A, Afsharnasab M, Mobedi I, Jalali B, Mesbah M. Prevalence and intensity of internal parasitic helminthes infected black sole fish, *Brachirus orientalis* (Bloch and Schneider, 1801) in the Persian Gulf. Iran J Fish Sci. 2011;10(4):570-584.
27. Hosseini SH, Alinezhad S, Mobedi I, Halajian A, Karimi E, Ahoo MB, Yasemi M. Study on the parasites of *Pseudorhombus elevatus*, *Psettodes erumei* and *Brachirus orientalis* from the Persian Gulf, Iran. Iran J Fish Sci. 2013;12(4): 827-835.
22. Pronin NM, Fleischer GW, Baldanova DR, Pronina SV. Parasites of the recently established round goby (*Neogobius melanostomus*) and tubenose goby (*Proterorhinus marmoratus*) (Gobiidae) from the St. Clair River and Lake St. Clair, Michigan, USA. Folia Parasitologica (Ceske Budejovice), 1997;44(1):1-6.
23. Tavares LER, Bicudo AJA, Luque JL. Metazoan parasites of needlefish *Tylosurus acus* (Lacepede, 1803) (Osteichthyes: Belonidae) from the coastal zone of the State of Rio de Janeiro, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria 2004;13(1):36-40.
24. Shen, J.W., Qiu, Z.Z. Studies on the trematodes of fishes from the Yellow Sea and the Bo Hai Sea. Beijing: Science Press. 1995; pp. 207 [In Chinese].

Research Article

The Effect of Silymarin in Milk Thistle on Lipid Profile, Liver Enzymes and Inflammatory Cytokines in the Blood of Male Wistar Rats

Hoda Jahangiri¹, Parichehreh Yaghmaei¹, Azadeh Ebrahim Habibi², Shahrbanoo Oryan^{3*}

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

2- Endocrinology and Metabolism Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, 1411713137, Tehran, Iran

3- Department of Biology, Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran, Iran

*Corresponding author: sh_oryan@yahoo.com

Received: 31 December 2024

Accepted: 12 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1195164

Abstract

Milk thistle (*Silybum marianum*) is a medicinal plant with anti-inflammatory and antioxidant properties and in the treatment of chronic liver and inflammatory diseases that grows in the Mediterranean region. This study aimed to investigate the effect of silymarin in milk thistle on lipid profile, liver enzymes, and inflammatory cytokines in the blood of male Wistar rats. First, 16 adult rats with an average weight of 180-200 grams were selected and treated with silymarin and accumulated alpha-amylase. Then, by comparing with the control sample, the profile of triglycerides, cholesterol, low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), liver enzymes alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and also, inflammatory cytokines interleukin 6 (IL-6), interleukin 1-beta (IL-1 β), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), nuclear factor kappa B (NF κ B) and C-reactive protein (CRP) with kits specificity and ELISA method were assessed. Data analyzed using ANOVA and Tukey's post hoc tests by the SPSS software. Based on the results, the group treated with silymarin dissolved in 1% dimethyl sulfoxide and agglomerated alpha-amylase showed a significant reduction effect on the level of inflammatory cytokines, liver enzymes, LDL, triglycerides, and cholesterol and also a significant increase in HDL in the blood, compared to other groups. It is concluded that silymarin can potentially protect the liver by modulating the level of liver enzymes. By reducing the lipid profile and inflammatory factors in the blood, it plays an important role in reducing diseases related to the liver, cardiovascular, and immune system, further research should determines the optimal doses and areas and the individual characteristics of the patient and underlying diseases.

Keywords: Milk thistle, Alpha-amylase, Cytokine, Liver enzymes, Lipid profile, *Silybum marianum*.

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر سیلیمارین موجود در گیاه خارمریم بر پروفایل چربی، آنزیم‌های کبدی و همچنین سیتوکین‌های التهابی در خون رت‌های نر نژاد ویستار

هدی جهانگیری^۱، پریچهره یغمایی^۱، آزاده ابراهیم حبیبی^۲، شهربانو عریان^{۳*}

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

۲- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، موسسه علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: sh_oryan@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۱

DOI: 10.60833/ascij.2025.1195164

چکیده

خارمریم (*Silybum marianum*) گیاهی دارویی با خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی است که به‌طور گسترده در منطقه مدیترانه می‌روید. این گیاه در درمان بیماری‌های مزمن کبدی و التهابی مورد توجه قرار گرفته است. مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر سیلیمارین، ترکیب فعال خارمریم، بر پروفایل چربی، آنزیم‌های کبدی و سیتوکین‌های التهابی در خون رت‌های نر نژاد ویستار انجام شد. در این پژوهش، ۱۶ سر رت بالغ با وزن متوسط ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم انتخاب و تحت تیمار با سیلیمارین و همچنین آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته قرار گرفتند. پس از پایان دوره تیمار، مقادیر تری‌گلیسیرید، کلسترول، لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL) و لیپوپروتئین با چگالی زیاد (HDL) در کنار آنزیم‌های کبدی شامل آلانین‌آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) ارزیابی شد. علاوه بر این، سطوح سیتوکین‌های التهابی از جمله اینترلوکین ۶ (IL-6)، اینترلوکین ۱-بتا (IL-1 β)، فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α)، فاکتور هسته‌ای کاپا B (NF- κ B) و پروتئین واکنشی C (CRP) با استفاده از کیت‌های مخصوص و روش الایزا اندازه‌گیری گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون ANOVA و تعقیبی توکی با نرم‌افزار SPSS تحلیل شد. نتایج نشان داد که تیمار با سیلیمارین محلول در دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد به همراه آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته، در مقایسه با سایر گروه‌های تیمار شده، کاهش معنی‌داری در سطح سیتوکین‌های التهابی، آنزیم‌های کبدی، LDL، تری‌گلیسیرید و کلسترول ایجاد کرد، درحالی‌که HDL به‌طور معناداری افزایش یافت. سیلیمارین با تعدیل سطح آنزیم‌های کبدی، نشان‌دهنده پتانسیل محافظتی برای کبد است. همچنین، کاهش پروفایل لیپیدی و فاکتورهای التهابی در خون، نقش مهمی در کاهش خطر بیماری‌های مرتبط با کبد، قلب و عروق، و سیستم ایمنی ایفا می‌کند. انجام تحقیقات بیشتر برای تعیین دوز بهینه و بررسی اثرات آن در شرایط مختلف بالینی، با در نظر گرفتن ویژگی‌های فردی بیماران و بیماری‌های زمینه‌ای، ضروری است.

کلمات کلیدی: خار مریم، آلفا-آمیلاز، سیتوکین، آنزیم‌های کبدی، پروفایل چربی، *Silybum marianum*

مقدمه

محصولات گیاهی، به‌ویژه در بین افراد مبتلا به بیماری‌های مزمن، محبوبیت فزاینده‌ای یافته‌اند. خارمریم (*Silybum marianum*)، گیاهی یک‌ساله یا دوساله از منطقه مدیترانه، قرن‌ها برای تقویت ایمنی

بدن و درمان طیف وسیعی از بیماری‌های کبدی، از جمله کبد چرب، هپاتیت و سیروز، همچنین محافظت از کبد در برابر سموم محیطی مورد استفاده قرار گرفته است (۱). میلیون‌ها نفر برای حفظ عملکرد سالم کبد از این گیاه بهره می‌برند. تحقیقات عمدتاً بر روی سیلیمارین، ترکیبی از فلاونولیگنان‌های استخراج‌شده از خارمریم، و فعال‌ترین جزء آن، سیلیبین، متمرکز شده است. این ترکیبات به پرکاربردترین عناصر طبیعی گیاهی تبدیل شده‌اند و اغلب به‌طور مشترک به کار می‌روند، هرچند که اهداف بالینی متمایزی دارند و هنوز شواهد قطعی در مورد اثربخشی بالینی آن‌ها ارائه نشده است (۲). خارمریم خواص محافظتی خود را از طریق سه مکانیسم اصلی اعمال می‌کند: آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدفیبروتیک (۳). ویژگی ضدالتهابی آن به توانایی در تنظیم سیتوکین‌های التهاب‌زا نسبت داده می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که این گیاه بیان *COX-2*، که واسطه‌ای کلیدی در مسیرهای التهابی است، را تنظیم و مهار می‌کند (۴). همچنین، سیلیمارین مسیر سیگنالینگ *NF-κB* را مهار کرده و بیان ژن‌های پیش‌التهابی را که در تنظیم سیتوکین‌های مؤثر بر فرآیندهای التهابی نقش دارند، تعدیل می‌کند. افزون بر این، بقای سلول‌های T التهابی را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵). تحقیقات انجام‌شده بر روی موش‌ها نشان داده‌اند که سیلیمارین سطح سیتوکین‌های پیش‌التهابی را در کبد و پلاسما کاهش داده و در مقابل، *IL-10* را که در مهار پاسخ‌های التهابی نقش دارد، افزایش می‌دهد (۶-۸). کبد اندامی حیاتی در سم‌زدایی از بیگانه بیوتیک‌های واردشده از محیط، داروها، الکل و غذاها است (۹). آنزیم‌های آمینوترانسفراز از مهم‌ترین شاخص‌های تشخیصی بیماری‌های کبدی محسوب می‌شوند و شامل آلانین-آمینوترانسفراز (*ALT*) و آسپارتات-آمینوترانسفراز (*AST*) هستند که توسط سلول‌های پارانشیمی کبد

ترشح شده و افزایش سطح سرمی آن‌ها به‌عنوان نشانگر استاندارد برای ارزیابی سمیت کبدی در نظر گرفته می‌شود (۱۰). شواهد نشان می‌دهد که مصرف خارمریم می‌تواند پارامترهای متابولیک، شیمیایی و التهابی کبد را تعدیل کند و در بهبود سطح سرمی آنزیم‌های کبدی مؤثر باشد (۱۱). آمیلازها گروهی از آنزیم‌های گلیکوزیل‌هیدرولاز هستند که در تجزیه کربوهیدرات‌ها نقش دارند. مطالعات پیشین ارتباط بین تجمع آلفا-آمیلاز و برخی بیماری‌های متابولیکی را در مدل‌های حیوانی نشان داده‌اند (۱۲). تجمع پروتئینی زمانی رخ می‌دهد که یک پروتئین ساختار طبیعی خود را از دست داده و در قالب غیرطبیعی تجمع یابد. از آنجا که احتمال دارد ترکیبات فلاونوئیدی در حذف آمیلوئیدهای پروتئینی نقش داشته باشند، این پژوهش به بررسی اثر مهار احتمالی سیلیمارین در خارمریم بر این فرایند پرداخته است. همچنین، تأثیر سیلیمارین بر پارامترهای بیوشیمیایی، آنزیم‌های کبدی و سیتوکین‌های التهابی در خون رت‌های نر نژاد ویستار مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

گروه‌بندی رت‌ها: در این مطالعه از ۱۰ رت نر نژاد ویستار (۲۵۰-۲۰۰ گرم) که از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند، استفاده شد. تمامی پروتکل‌های مربوط به نگهداری و تیمار حیوانات مورد بازبینی و تأیید کمیته اخلاقی استفاده از حیوانات در گروه علوم زیستی واحد علوم و تحقیقات قرار گرفت. رت‌ها در دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد با چرخه‌ی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تحت رژیم غذایی استاندارد نگهداری شدند. حیوانات به چهار گروه تیماری تقسیم شدند: گروه اول: دریافت ۳ میلی‌گرم آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته در سالی‌ن بافر فسفات، بدون

شد. در نهایت، به منظور اندازه‌گیری فعالیت سه آنزیم در سرم خون از فرمول زیر استفاده شد.

$$\frac{\text{abs Sample } (\Delta\text{abs/min})}{\text{abs Calibrator } (\Delta\text{abs/min})} \times \text{Calibrator activity (IU/L)} = \text{Sample activity (IU/L)}$$

به‌منظور بررسی سیتوکین‌های التهابی (IL-6, IL-1 β), CRP, NF- κ B و TNF- α ، نمونه‌های سرم در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سنجش با استفاده از کیت تجاری (BioScience GmbH, Germany) و قرائت OD در ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه (BI Biotech, Co., India) ELISA Reader انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و روش‌های آماری ANOVA یک‌طرفه و آزمون t زوجی ($p < 0/05$) تجزیه و تحلیل شدند. در صورت مشاهده تفاوت معنادار، آزمون تعقیبی Tukey's post hoc برای تعیین منشأ تفاوت به کار رفت.

نتایج

ارزیابی پارامترهای بیوشیمیایی خون: نتایج آنالیز آماری (شکل ۱) نشان داد که سطح AST در سرم خون رت‌های تیمار شده با آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته (انکوبه شده به مدت ۸ روز) نسبت به گروه دریافت‌کننده آلفا-آمیلاز نرمال (بدون انکوباسیون) افزایش معنی‌داری داشت. علاوه بر این، گروهی که با آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته همراه با سیلیمارین و دی‌متیل سولفوکسید ۱٪ تیمار شدند، کاهش معنی‌داری در سطح AST در مقایسه با گروه‌های آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته انکوبه‌شده و آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته همراه با دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد نشان دادند. به‌طور کلی نتایج نشان داد که داروی سیلیمارین محلول در دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد اثر معنی‌داری بر روی میزان AST خون رت‌های نر نژاد ویستار داشت و باعث کاهش معنی‌داری آن نسبت به گروه تیمار شده با آمیلاز تجمع‌یافته شد ($p < 0/001$). نتایج مشابهی

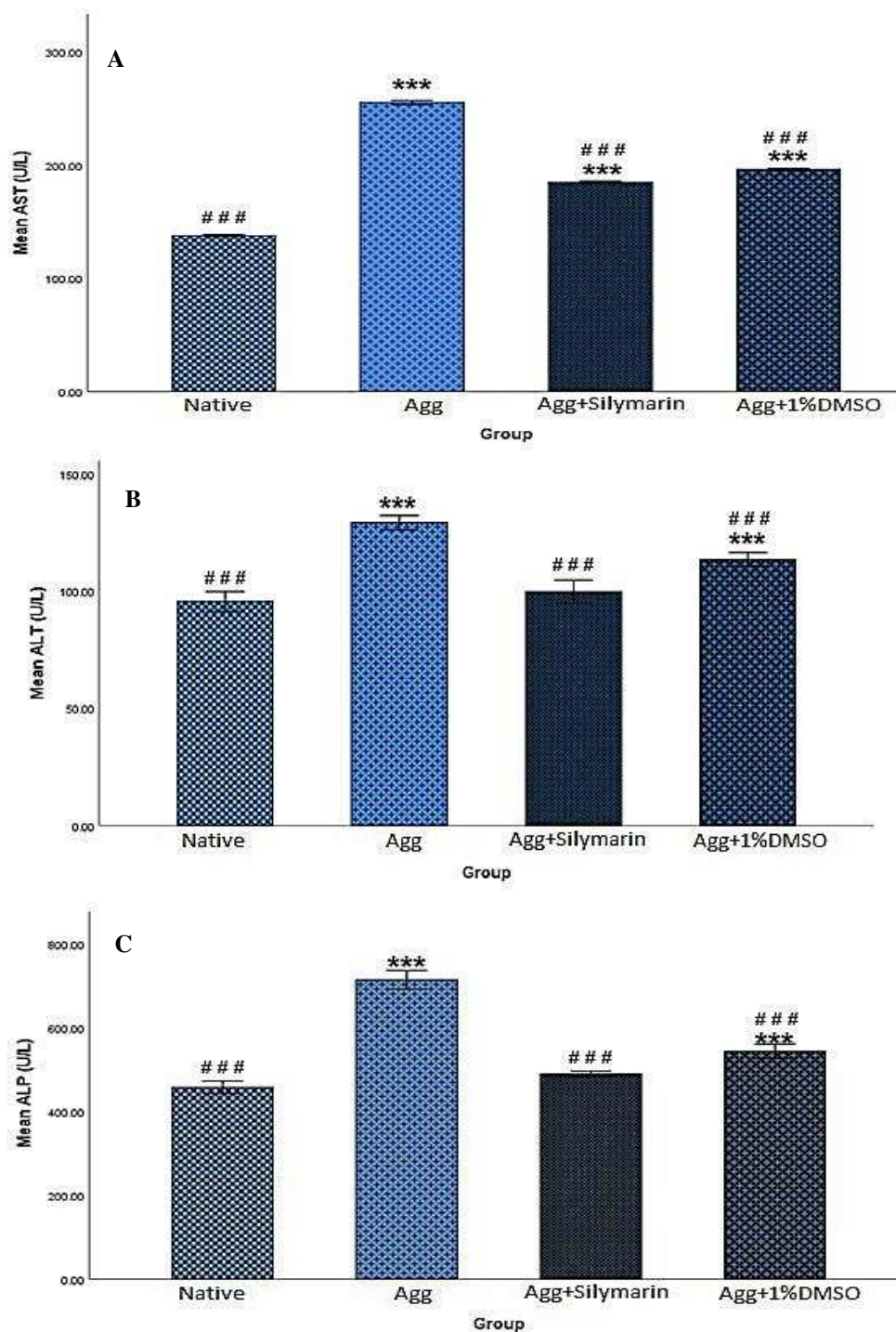
انکوباسیون. گروه دوم: دریافت ۳ میلی‌گرم آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته و نگهداری در شرایط انکوباسیون به مدت ۸ روز. گروه سوم: دریافت ۳ میلی‌گرم آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته به همراه سیلیمارین ۲ میلی‌مولار (محلول در ۱ درصد دی‌متیل سولفوکسید) و انکوباسیون به مدت ۸ روز. گروه چهارم: دریافت ۳ میلی‌گرم آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته همراه با ۱ درصد دی‌متیل سولفوکسید و انکوباسیون به مدت ۸ روز. در پایان دوره تیمار، رت‌ها با کلروفرم بیهوش شده، از قلب آن‌ها خون‌گیری انجام شد و پارامترهای بیوشیمیایی سرم مورد بررسی قرار گرفتند.

اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی و التهابی سرم: فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP با استفاده از کیت اختصاصی (Dialab Co., Austria) مطابق پروتکل سازنده اندازه‌گیری شد. ترکیبات کیت در سه لوله آزمایش برای هر آنزیم تهیه، مخلوط و به مدت ۶۰ ثانیه انکوبه شدند. جذب نوری (OD) در زمان صفر (A1) ثبت شد و تغییرات آن در دقیقه اول (A2)، دوم (A3) و سوم (A4) تعیین گردید. برای کنترل کیفیت داخلی از استانداردهای MAN NORM (ELITROL I, REF: 613046) و MAN PATH (ELITROL II) تهیه‌شده توسط Man Company, Iran استفاده شد. همچنین، کالیبراسیون آزمون‌ها با استاندارد ELICAL2 (REF: 613048) انجام گرفت. اندازه‌گیری مقادیر LDL و HDL سرم طی دو مرحله، شامل حذف سایر لیپوپروتئین‌ها از طریق واکنش آنزیمی و حضور معرف، و در مرحله بعد ترکیب آن‌ها با یک دترجنت به منظور انحلال‌پذیری، از طریق قرائت ODs صورت پذیرفت. همچنین اندازه‌گیری غلظت‌های کلسترول و تری‌گلیسرید به روش آنزیمی رنگ‌سنجی (Point End, Enzymatic, Colorimetric) پس از ۴ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ODs نمونه و استاندارد در مقابل بلانک اندازه‌گیری

برای ALT و ALP مشاهده شد؛ با این تفاوت که در گروه تیمار شده با آلفا-آمیلاز تجمع یافته همراه با سیلیمارین، تغییرات معنی‌دار نبود ($p = ۰/۴۴۶$) و ($p = ۰/۰۶۹$). همچنین، گروه‌های تیماری با آلفا-آمیلاز تجمع یافته همراه با سیلیمارین و آلفا-آمیلاز تجمع یافته همراه با دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد افزایش کمتری را نسبت به گروه آلفا-آمیلاز تجمع یافته انکوبه شده تنها تجربه کردند ($p < ۰/۰۰۱$). شکل ۲ مقادیر LDL در گروه‌های تیماری مختلف را نشان می‌دهد. میزان LDL خون در گروه تیمار شده با آلفا-آمیلاز تجمع یافته در مقایسه با گروه دریافت کننده آلفا-آمیلاز طبیعی (بدون انکوباسیون) افزایش معنی‌داری داشت. بر این اساس، سیلیمارین همراه با آلفا-آمیلاز تجمع یافته در دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد به‌طور معنی‌داری باعث کاهش سطح LDL خون در رت‌ها شد. این کاهش در مقایسه با گروه‌های آلفا-آمیلاز تجمع یافته همراه با دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد و آلفا-آمیلاز تجمع یافته انکوبه شده معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۰۱$). نتایج مشابهی برای تری‌گلیسرید (TG) مشاهده شد، درحالی‌که اثر سیلیمارین بر HDL معکوس بود. به‌طوری‌که سیلیمارین همراه با آلفا-آمیلاز تجمع یافته در دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد باعث افزایش معنی‌دار سطح HDL شد. همچنین، سطح HDL در گروه تیمار شده با آلفا-آمیلاز تجمع یافته انکوبه شده نسبت به گروه دریافت کننده

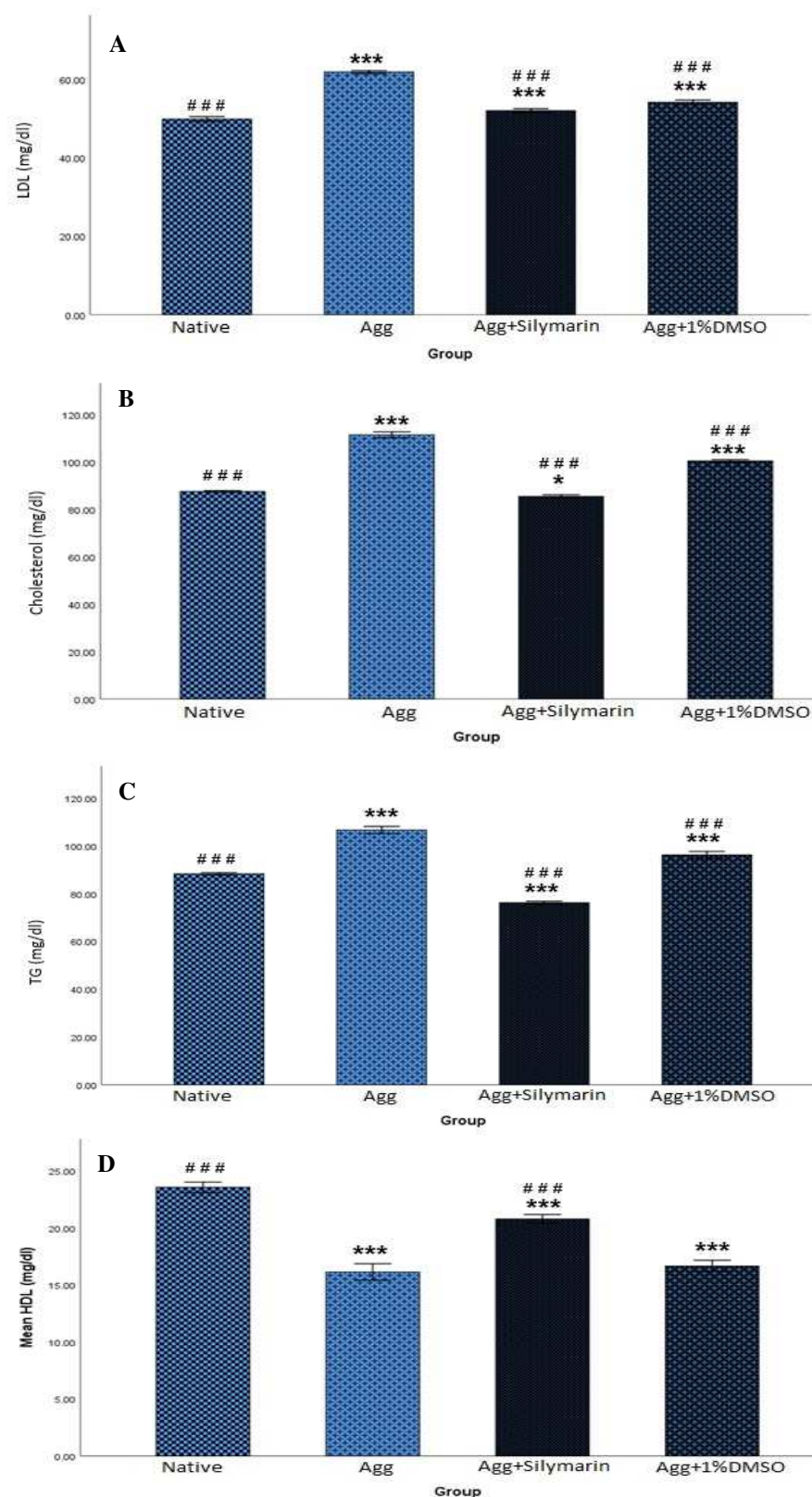
آلفا-آمیلاز طبیعی کاهش معنی‌داری نشان ($p < ۰/۰۰۱$).

ارزیابی سیتوکین‌های التهابی خون: شکل ۳ نتایج آنالیز سطوح پنج سیتوکین التهابی شامل IL-6، IL-1 β ، TNF- α ، NFKB و CRP را در شرایط تیماری مختلف نشان می‌دهد. نتایج آماری نشان داد که سطح این سیتوکین‌ها در گروه تیمار شده با آلفا-آمیلاز تجمع یافته (انکوبه شده) نسبت به گروه دریافت کننده آلفا-آمیلاز طبیعی افزایش معنی‌داری داشت ($p < ۰/۰۰۱$) برای همه موارد). علاوه بر این، در تمام سیتوکین‌ها، گروه‌هایی که با آلفا-آمیلاز تجمع یافته همراه با سیلیمارین و دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد تیمار شده بودند، کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه تیمار شده با آلفا-آمیلاز تجمع یافته همراه با دی‌متیل سولفوکسید ۱ درصد نشان دادند ($p = ۰/۰۰۳$ ، $p = ۰/۰۰۴$ ، $p = ۰/۰۰۱$ ، $p < ۰/۰۰۵$ ، $p = ۰/۰۰۱$ به ترتیب برای IL-6، IL-1 β ، TNF- α ، NFKB و CRP). همچنین، این گروه کاهش معنی‌داری نسبت به گروه دریافت کننده آلفا-آمیلاز تجمع یافته انکوبه شده داشت ($p = ۰/۰۳۷$ ، $p = ۰/۰۰۱$ ، $p < ۰/۰۰۵$ ، $p = ۰/۰۰۱$ ، $p = ۰/۰۰۱$ برای IL-6، IL-1 β ، TNF- α ، NFKB و CRP). نتایج نشان داد که ترکیب سیلیمارین با آلفا-آمیلاز تجمع یافته باعث کاهش سطوح سیتوکین‌های التهابی در مقایسه با آلفا-آمیلاز تجمع یافته تنها شد و اثر ضدالتهابی قابل توجهی داشت.



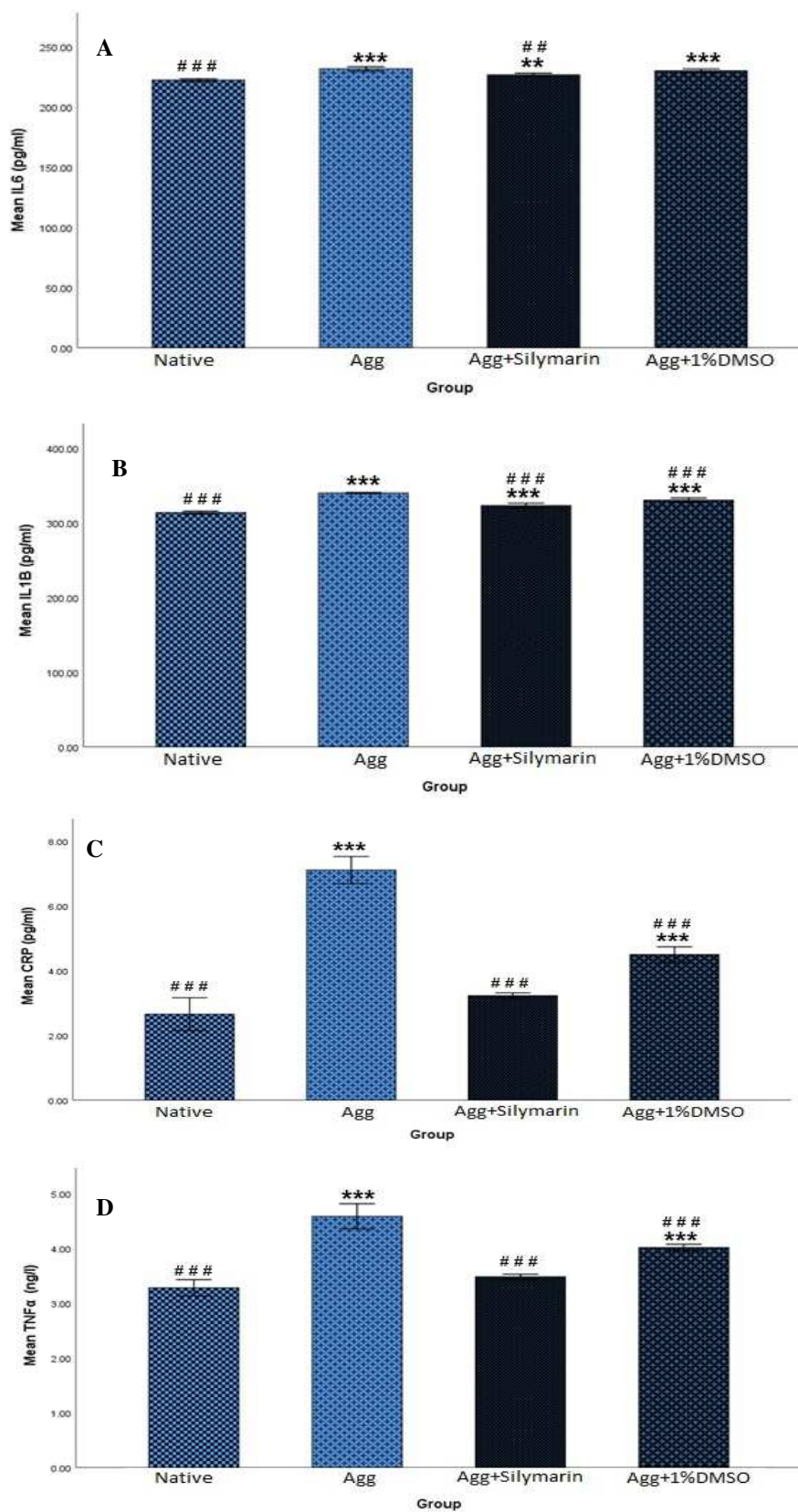
شکل ۱- تأثیر گروه‌های درمانی مورد مطالعه بر سطح (A) AST، (B) ALT و (C) ALP در خون رت‌های نر نژاد ویستار.
(###: $p < 0.001$, ***: $p < 0.001$)

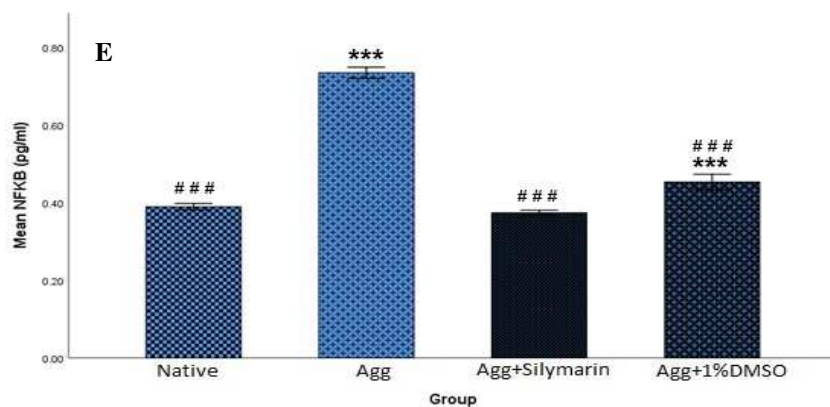
Fig. 1. Effect of the studied treatment groups on the levels of (A) AST, (B) ALT and (C) ALP in the blood of male Wistar rats. ($p < 0.001$:***), ($p < 0.001$:###).



شکل ۲- تأثیر گروه‌های تیماری مورد مطالعه بر سطح (A) LDL، (B) کلسترول، (C) تری گلیسیرید و (D) HDL در خون رت‌های نر نژاد ویستار ($###: p < 0.001$, $***: p < 0.001$).

Fig. 2. Effect of the studied treatment groups on the levels of (A) LDL, (B) cholesterol, (C) triglycerides and (D) HDL in the blood of male Wistar rats ($p < 0.001$: ***), ($p < 0.001$: ###).





شکل ۳- تأثیر گروه‌های تیماری مورد مطالعه بر سطح (A) IL6، (B) IL1B، (C) CRP، (D) TNF- α و (E) NFkB در خون رت‌های نر نژاد ویستار ($p < 0.001$:***, $p < 0.001$:###).

Fig. 3. Effect of the studied treatment groups on the levels of (A) IL6, (B) IL1B, (C) CRP, (D) TNF- α and (E) NFkB in the blood of male Wistar rats. ($p < 0.001$:***, $p < 0.001$:###).

بحث

میرزایی و همکاران (۱۴) ۶۷/۷ و ۶۳/۱٪، احمد و همکاران (۱۶) ۷۴/۴ و ۶۵/۵ درصد و جمالیان و همکاران (۱۷)، ۶۲/۳ و ۶۱/۵ درصد کاهش را به ترتیب در ALT و AST را گزارش کرده‌اند. مارتینز و همکاران (۱۸) نیز یک افزایش در سطوح آنزیمی پس از تیمار با سیلیمارین در کبد گزارش کردند، که این موضوع ممکن است به دوز مصرفی و اثربخشی ثابت‌نشده آن مرتبط باشد. هونگ و همکاران (۱۹) این نتایج را با اثرات محافظتی سیلیمارین در کبد مرتبط دانستند. طبق این تحقیقات، سیلیمارین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد مضر و کنترل آنزیم‌هایی که در ایجاد آسیب سلولی کبد نقش دارند، عمل می‌کند. به‌علاوه، افزایش توانایی بازسازی سلول‌های کبد از طریق افزایش سنتز DNA و RNA به دلیل ساختار استروئیدی سیلیمارین (۲۰)، تغییر ساختار غشای خارجی هپاتوسیت برای جلوگیری از ورود بیگانه‌بیوتیک‌ها به داخل سلول، از بین بردن رادیکال‌های آزاد و افزایش محتوای سلولی گلوکاتایون منجر به مهار پراکسیداسیون لیپیدی (۲۱) می‌شود و در نهایت باعث اصلاح ناقل‌ها و

آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP از متداول‌ترین آزمایش‌های بالینی برای ارزیابی سلامت کبد محسوب می‌شوند. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که افزایش سطح این آنزیم‌ها نه تنها با اختلالات کبدی مرتبط است، بلکه می‌تواند با بیماری‌های قلبی-عروقی، افزایش خطر مرگ‌ومیر ناشی از آن‌ها و همچنین ابتلا به دیابت نوع ۲ در ارتباط باشد (۱۳). نتایج این مطالعه نشان داد که آلفا-آمیلاز تجمع‌یافته همراه با سیلیمارین تأثیر معنی‌داری بر کاهش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی (ALT، AST و ALP) در رت‌ها داشت. کاهش این آنزیم‌ها در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد که سیلیمارین می‌تواند در پیشگیری از آسیب‌های کبدی مؤثر باشد و احتمالاً اثر محافظتی بر عملکرد کبد دارد. در یک بررسی سیستماتیک مشابه توسط مارتینز و همکاران (۱۴)، مشخص شد که سطح آنزیم‌های کبدی پس از تجویز سیلیمارین کاهش می‌یابد، که این موضوع نشان‌دهنده تأثیر مثبت بالقوه بر بهبود علائم مرتبط با کبد و بهزیستی کلی است. تایید مطالعات دیگر نیز این یافته‌ها را تأیید می‌کنند؛ ال کمری و همکاران (۱۵) ۸۸/۲ و ۸۸٪،

گیرنده‌های غشای سلولی (۲۲) می‌گردد. این‌ها احتمالاً از مهمترین مکانیسم‌های عملکردی سیلیمارین در کاهش سطح آنزیم‌های کبدی به‌شمار می‌آیند. با توجه به اینکه افزایش پروفایل چربی یکی از عوامل خطر اصلی برای ایجاد بیماری‌های قلبی است، مطالعات متعددی در حال انجام هستند تا ارتباطات بهتری میان اختلالات در متابولیسم کلسترول، تری گلیسیرید و آتروژنز و همچنین ارزیابی درمان‌های احتمالی ایجاد شود. در این زمینه، گوبالاکریشن و همکاران (۲۳) گزارش دادند که موش‌های تغذیه‌شده با رژیم غذایی با کلسترول بالا افزایش معنی‌داری در کلسترول تام سرم، تری‌گلیسیرید، LDL و لیپوپروتئین‌های با چگالی بسیار پایین (VLDL) نشان دادند. تیمار با سیلیمین باعث کاهش معنی‌دار کلسترول تام سرم (۲۴ درصد) تری‌گلیسیرید (۲۱ درصد) و LDL-C (۲۴ درصد) به صورت وابسته به دوز شد. موش‌های تیمار شده با سیلیمین (۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) افزایش معنی‌داری در HDL-C کبدی و کاهش سایر پروفایل‌های لیپیدی نشان دادند که این نتایج با مطالعه حاضر و مطالعات پیشین نیز هماهنگ است (۲۶-۲۴). در شرایط معمول، ۹۵ درصد از اسیدهای صفراوی دوباره جذب می‌شوند. دفع افزایش‌یافته اسیدهای صفراوی مدفوع توسط سیلیمارین باعث تخلیه اسیدهای صفراوی می‌شود که در نتیجه منجر به افزایش سنتز اسیدهای صفراوی کبدی می‌گردد. به دنبال آن، کلسترول کبدی کاهش می‌یابد و تولید گیرنده‌های LDL کبدی تحریک می‌شود که این فرآیند موجب افزایش پاکسازی LDL، لیپوپروتئین‌های با چگالی متوسط (IDL) و به‌طور غیرمستقیم VLDL می‌شود. این می‌تواند یکی از مکانیسم‌های احتمالی اثر هیپولیپیدمیک سیلیمارین باشد. این مکانیسم مشابه با سازوکارهای جداکننده اسیدهای صفراوی است (۲۴). در این مطالعه، تیمار با

سیلیمارین همراه با آلفا-آمیلاز تجمع یافته سبب کاهش معنی‌دار سطح سیتوکین‌های IL-6 و IL-1 β و CRP، NF-KB و TNF- α در خون نسبت به گروه کنترل شد. سیلیمارین با مسدود کردن فعال‌سازی NF-kB، به‌طور موثری با التهاب ناشی از TNF- α مقابله می‌کند. این امر با مهار فسفوریلاسیون و تخریب kBa، یک بازدارنده NF-kB حاصل می‌شود (۲۷). در مطالعه قو و همکاران (۲۸)، مشخص گردید که سیلیمارین با مهار فعال‌سازی NF-kB از آسیب کبدی در موش‌ها جلوگیری می‌کند که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. سیلیمارین ممکن است بر روی پروتئین‌های تنظیم‌کننده NF-kB مانند p65 و p50 تأثیر بگذارد. به‌عنوان مثال، سیلیمارین می‌تواند با کاهش بیان این پروتئین‌ها، از فعال‌سازی NF-kB جلوگیری کند (۲۹). همچنین سیلیمارین می‌تواند بر روی چندین مسیر سیگنالی که به فعال‌سازی NF-kB منجر می‌شوند، تأثیر بگذارد. به‌عنوان مثال، این ترکیب می‌تواند مسیر پروتئین کیناز فعال شده با میتوز و مسیر PI3K/Akt را مهار کند که هر دو در فعال‌سازی NF-kB نقش دارند (۵). در این رابطه فرزندگان و همکاران (۳۰) بیان کردند که سیلیمارین به‌طور قابل توجهی باعث کاهش سطوح سیتوکین TNF- α شده که همسو با بررسی کنونی و مطالعه فوردهام و همکاران (۵۸) است که تأثیر سیلیمارین را در مهار NF-KB و IL-6 نشان دادند. به‌طور مشابه، سه مطالعه دیگر بر روی سلول‌های القا شده با لیپوپلی ساکارید برای ارزیابی اثرات سیلیمارین توسط کانگ و همکاران (۳۱)، کیم و همکاران (۳۲) و بلوچی و همکاران (۳۳) انجام گردیدند که به ترتیب نشان دهنده کاهش قابل توجه در سطوح TNF- α و NF-KB و در نهایت CRP، TGF β ، IL-10، IL-17 و IL-23 بود. الهی و همکاران (۳۴) و گرگانی و همکاران (۳۵) بیان کردند که مکمل‌سازی با سیلیمارین می‌تواند به کاهش

مارکرهای التهابی از جمله CRP به ترتیب در بیماران روماتوئید و دیابت نوع ۲ کمک کند که تایید کننده نتایج این بررسی است. سیلیمارین می‌تواند به بهبود حساسیت به انسولین و تنظیم سطح قند خون کمک کند. افزایش سطح قند خون و مقاومت به انسولین می‌تواند منجر به التهاب و افزایش CRP شود. بنابراین، بهبود این عوامل با کمک سیلیمارین می‌تواند به کاهش CRP منجر شود (۳۶). علاوه بر این، سیلیمارین به بهبود متابولیسم لیپیدها و کاهش چربی‌های کبدی کمک می‌کند. کاهش چربی‌های کبدی می‌تواند به کاهش التهاب و در نتیجه کاهش تولید CRP منجر شود (۳۷). در نهایت، برخی از تحقیقات نشان داده‌اند که سیلیمارین می‌تواند بر میکروبیوم روده تأثیر بگذارد. تغییر در ترکیب میکروبیوم روده می‌تواند به کاهش التهاب مزمن و در نتیجه کاهش سطح CRP کمک کند (۳۸). با این وجود برخی مطالعات نتایج معکوسی به دست آوردند که هم راستا با نتایج بررسی حاضر نیست. شاوندی و همکاران (۳۶) بیان کردند که افزودن سیلیمارین به رژیم درمانی بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید پایدار اثر قابل توجهی بر سطوح سرمی $TNF-\alpha$ و $IL-1\beta$ ندارد. در مطالعه چن و همکاران (۳۹) گزارش شد که سیلیمارین می‌تواند سطوح $IL-6$ و $IL-1\beta$ را در موش‌های آزمایشگاهی که به‌وسیله لیپوپلی‌ساکارید تحریک شده بودند، کاهش دهد که در توافق با مطالعه حاضر و همچنین تحقیق ژانگ و همکاران (۲۹) است که گزارش کردند سیلیمارین با کاهش سطوح $IL-6$ و $IL-1\beta$ می‌تواند از آسیب‌های حاد ریه محافظت کند. شریف و همکاران (۴۰) نیز نتایج مشابه مطالعات مذکور را کسب کردند. سیلیمارین می‌تواند از طریق چندین مکانیسم مولکولی بر کاهش سطوح اینترلوکین‌ها، به‌ویژه $IL-6$ و $IL-1\beta$ تأثیر بگذارد. سیلیمارین می‌تواند با مهار مسیر $NF-\kappa B$ که یک

تنظیم‌کننده کلیدی در تولید سیتوکین‌های التهابی است، از ترشح $IL-6$ و $IL-1\beta$ جلوگیری کند (۴۱). این مسیر معمولاً در پاسخ به استرس‌های التهابی فعال می‌شود و باعث تولید سیتوکین‌ها می‌شود. همچنین سیلیمارین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی عمل می‌کند و می‌تواند سطح رادیکال‌های آزاد را کاهش دهد. این امر به نوبه خود می‌تواند از فعال شدن مسیرهای التهابی جلوگیری کند و در نتیجه تولید $IL-6$ و $IL-1\beta$ را کاهش دهد (۴۲). به علاوه، سیلیمارین می‌تواند بر روی عملکرد سلول‌های ایمنی مانند ماکروفاژها تأثیر بگذارد. با کاهش فعالیت ماکروفاژها و تولید سیتوکین‌های التهابی، سطوح $IL-6$ و $IL-1\beta$ کاهش می‌یابد (۴۳). در نهایت، سیلیمارین می‌تواند بیان ژن‌های مرتبط با التهاب را تنظیم کند. به عنوان مثال، می‌تواند از افزایش بیان ژن‌های تولیدکننده $IL-6$ و $IL-1\beta$ جلوگیری کند. این ترکیب می‌تواند فعالیت آنزیم‌هایی مانند سیکلو‌اکسیژناز و لیپوکسیژناز که در تولید سیتوکین‌های التهابی نقش دارند را مهار کند (۴۴).

نتیجه‌گیری

تیمار با سیلیمارین به‌طور قابل توجهی باعث کاهش پروفایل لیپیدی و سیتوکین‌های التهابی و در نهایت تعدیل آنزیم‌های کبدی از راه‌های مختلفی می‌شود که استفاده از آن را به عنوان یک گزینه درمانی مناسب در اختلالات کبدی مطرح می‌کند.

منابع

1. Nawaz A, Zaib S, Khan I, Ahmed A, Shahzadi K, Riaz H. Silybum marianum: An overview of its phytochemistry and pharmacological activities with emphasis on potential anticancer properties. *Anticancer Agents Med Chem*. 2023;23(13):1519-1534.
2. Dwyer JT, Coates PM, Smith MJ. Dietary supplements: regulatory challenges

- milk thistle, green tea, and cinnamon beverages on liver enzymes of operating room Anesthesia personnel. *J Adv Immunopharmacol*. 2023;3(1):e136000.
12. Rahmati F, Hosseini SS, Mahuti Safai S, Asgari Lajayer B, Hatami M. New insights into the role of nanotechnology in microbial food safety. *3 Biotech*. 2020;10(10):425.
 13. Rahmati F. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* in Eudragit S100 and alginate chitosan under gastrointestinal and normal conditions. *Appl Nanosci*. 2020;10(2):391-399.
 14. Mirzaei E, Sabetian G, Masjedi M, Heidari R, Mirjalili M, Dehghanian A, et al. The effect of silymarin on liver enzymes and antioxidant status in trauma patients in the intensive care unit: a randomized double blinded placebo-controlled clinical trial. *Clin Exp Hepatol*. 2021;7(2):149-155.
 15. El-Kamary SS, Shardell MD, Abdel-Hamid M, Ismail S, El-Ateek M, Metwally M, et al. A randomized controlled trial to assess the safety and efficacy of silymarin on symptoms, signs and biomarkers of acute hepatitis. *Phytomedicine*. 2009;16(5):391-400.
 16. Ahmed S, Ullah N, Parveen S, Javed I, Jalil NAC, Murtey MD, et al. Effect of silymarin as an adjunct therapy in combination with sofosbuvir and ribavirin in hepatitis C patients: a miniature clinical trial. *Oxid Med Cell Longev*. 2022; 2022(1):9199190.
 17. Jamalain M, Mahmodiyeh B, Saveiee S, Solhi H. Investigating the impact of silymarin on liver oxidative injury. *J Famil Med Prim Care*. 2020;9(3):1707-1711.
 18. Martinez EC, Herrera D, Mogan S, Hameed Z, Jangda AA, Khan TJ, et al. Impact of silymarin supplements on liver enzyme levels: a systematic review. *Cureus*. 2023;15(10):e47608.
 - and research resources. *Nutrients*. 2018; 10(1):41.
 3. Fanoudi S, Alavi MS, Karimi G, Hosseinzadeh H. Milk thistle (*Silybum Marianum*) as an antidote or a protective agent against natural or chemical toxicities: a review. *Drug Chem Toxicol*. 2020; 43(3):240-254.
 4. Achufusi TGO, Pellegrini MV, Patel RK. Milk Thistle. [Updated 2024 Feb 28]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541075/>.
 5. Surai PF, Surai A. Silymarin and NF- κ B. Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands. 2023:151-177.
 6. Ali SO, Darwish HA, Ismail NA. Curcumin, Silybin Phytosome® and α -R-Lipoic Acid Mitigate Chronic Hepatitis in Rat by Inhibiting Oxidative Stress and Inflammatory Cytokines Production. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2016;118(5):369-380.
 7. García-Muñoz AM, Victoria-Montesinos D, Ballester P, Cerdá B, Zafrilla P. A Descriptive Review of the Antioxidant Effects and Mechanisms of Action of Berberine and Silymarin. *Molecules*. 2024; 29(19):4576.
 8. MI H. Therapeutic roles of silymarin or/and Taurine on nonalcoholic fatty liver disease associated with metabolic syndrome in rats. *J Sci Res Sci*. 2015;32(2):283-310.
 9. Dutta S, Mishra SP, Sahu AK, Mishra K, Kashyap P, Sahu B. Hepatocytes and their role in metabolism. *Drug Metab*. 2021; <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.99083>
 10. Giashuddin S, Alawad M. Histopathological diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Methods Mol Biol*. 2022;2455:1-18.
 11. Kheirandish V, Mard-Soltani M, Mojab F, Shakerian N, Nanaie F. The effect of

- lung diseases. *Chem-Biol Interact.* 2022;354:109842.
28. Ou Q, Weng Y, Wang S, Zhao Y, Zhang F, Zhou J, et al. Silybin alleviates hepatic steatosis and fibrosis in NASH mice by inhibiting oxidative stress and involvement with the Nf- κ B pathway. *Dig Dis Sci.* 2018; 63:3398-3408.
29. Zhang B, Wang B, Cao S, Wang Y, Wu D. Silybin attenuates LPS-induced lung injury in mice by inhibiting NF- κ B signaling and NLRP3 activation. *Int J Mol Med.* 2017; 39(5):1111-1118.
30. Farzanegan A, Shokuhian M, Jafari S, Shirazi FS, Shahidi M. Anti-histaminic effects of resveratrol and silymarin on human gingival fibroblasts. *Inflammation.* 2019;42:1622-1629.
31. Kang JS, Park S-K, Yang K-H, Kim HM. Silymarin inhibits TNF- α -induced expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Lett.* 2003;550(1-3):89-93.
32. Kim EJ, Lee MY, Jeon YJ. Silymarin inhibits morphological changes in LPS-stimulated macrophages by blocking NF- κ B pathway. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2015;19(3):211-218.
33. Balouchi S, Gharagozloo M, Esmaeil N, Mirmoghtadaei M, Moayedi B. Serum levels of TGF β , IL-10, IL-17, and IL-23 cytokines in β -thalassemia major patients: the impact of silymarin therapy. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2014;36(4):271-274.
34. Elahi ME, Elieh-Ali-Komi D, Goudarzi F, Mohammadi-Noori E, Assar S, Shavandi M, et al. Effects of silymarin as adjuvant drug on serum levels of CTRP3, anti-cyclic citrullinated peptide (CCP), and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) in rheumatoid arthritis patients. *Mol Biol Res Commun.* 2024;13(3):137-145.
35. Gargari BP, Mobasser M, Valizadeh H, Asghari-Jafarabadi M. Effects of *Silybum marianum* (L.) Gaertn.(silymarin) extract
19. Hong M, Li S, Tan HY, Wang N, Tsao SW, Feng Y. Current status of herbal medicines in chronic liver disease therapy: the biological effects, molecular targets and future prospects. *Int J Mol Sci.* 2015;16(12): 28705-28745.
20. Singh D, Cho WC, Upadhyay G. Drug-induced liver toxicity and prevention by herbal antioxidants: an overview. *Front Physiol.* 2016;6:363.
21. Karimi G, Vahabzadeh M, Lari P, Rashedinia M, Moshiri M. "Silymarin", a promising pharmacological agent for treatment of diseases. *Iran J Basic Med Sci.* 2011;14(4):308.
22. Rahmati F. Characterization of *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Saccharomyces* isolated from Iranian traditional dairy products for potential sources of starter cultures. *AIMS Microbio.* 2017;3(4):815.
23. Gobalakrishnan S, Asirvatham SS, Janarthanam V. Effect of silybin on lipid profile in hypercholesterolaemic rats. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(4):FF01.
24. Mohammadi H, Hadi A, Arab A, Moradi S, Rouhani MH. Effects of silymarin supplementation on blood lipids: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Phytother Res.* 2019; 33(4):871-880.
25. Mohebbati R, Momeni-Moghaddam MA, Asghari R, Abbasnezhad A, Bideskan AEZ, Salarbashi D, et al. The comparison of the effects of nano-silymarin and silymarin on high-fat diet-induced fatty liver of adult male rats. *Avicenna J Phytomed.* 2024;14(3):365.
26. Metwally M, El-Gellal A, El-Sawaisi S. Effects of silymarin on lipid metabolism in rats. *World Appl Sci J.* 2009;6(12):1634-1637.
27. Alharbi KS, Afzal O, Kazmi I, Shaikh MAJ, Thangavelu L, Gulati M, et al. Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) inhibition as a therapeutic target for plant nutraceuticals in mitigating inflammatory

40. Sherif IO, Al-Gayyar M. Antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of silymarin on hepatic dysfunction induced by sodium nitrite. *Eur Cytokine Netw.* 2013;24(3):114-121.
41. Toklu HZ, Akbay TT, Velioglu-Ogunc A, Ercan F, Gedik N, Keyer-Uysal M, et al. Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, prevents sepsis-induced acute lung and brain injury. *J Surg Res.* 2008;145(2):214-222.
42. Celep NA, Erbaş E, Kara H, Kara A. Silymarin Reduces Paclitaxel-induced Lung Damage Via Down-regulating P2X7R Expression and Inhibiting Inflammation and Apoptosis in the Rats. *Pak Vet J.* 2024; 44(1):169-175.
43. Jin Y, Zhao X, Zhang H, Li Q, Lu G, Zhao X. Modulatory effect of silymarin on pulmonary vascular dysfunction through HIF-1 α -iNOS following rat lung ischemia-reperfusion injury. *Exp Therap Med.* 2016;12(2):1135-1140.
44. Li D, Hu J, Wang T, Zhang X, Liu L, Wang H, et al. Silymarin attenuates cigarette smoke extract-induced inflammation via simultaneous inhibition of autophagy and ERK/p38 MAPK pathway in human bronchial epithelial cells. *Sci Rep.* 2016; 6(1):37751.
- supplementation on antioxidant status and hs-CRP in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytomedicine.* 2015;22(2):290-296.
36. Shavandi M, Yazdani Y, Asar S, Mohammadi A, Mohammadi-Noori E, Kiani A. The Effect of Oral Administration of Silymarin on Serum Levels of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Iran J Immunol.* 2022;19(4):427-435.
37. Jaffar HM, Bader ul Ain H, Tufail T, Hanif A, Malik T. Impact of silymarin-supplemented cookies on liver enzyme and inflammatory markers in non-alcoholic fatty liver disease patients. *Food Sci Nutr.* 2024; 12(10):7273-7286.
38. Xiao F, Gao F, Zhou S, Wang L. The therapeutic effects of silymarin for patients with glucose/lipid metabolic dysfunction: A meta-analysis. *Medicine.* 2020;99(40): e22249.
39. Chen J, Li D-L, Xie L-N, Ma Y-r, Wu P-P, Li C, et al. Synergistic anti-inflammatory effects of silibinin and thymol combination on LPS-induced RAW264. 7 cells by inhibition of NF- κ B and MAPK activation. *Phytomedicine.* 2020;78:153309.

*Research Article***Evaluation of the Quality and Health of Embryos Resulting from In Vitro Maturation (IVM) under the Influence of Stem Cell Secretome****Hilda Rastegari¹, Nasim Hayati Roudbari^{1*}, Somayeh Kazemnezhad², Soheila Ansaripour²**

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

2- Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran

*Corresponding author: hayati@iau.ac.ir

Received: 18 March 2025

Accepted: 13 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1202355

Abstract

The role of mesenchymal stem cells (MSCs) is mainly dependent on their paracrine components, namely their secretome. The use of stem cells has been recognized as a novel approach in the treatment of infertility and in vitro oocyte maturation (IVM) and has shown promising results, especially in women with polycystic ovary syndrome (PCOS). However, the health of the resulting embryos remains a major challenge. In this study, menstrual blood stem cell secretome was used for in vitro oocyte maturation in 100 patients with PCOS, and the health of the embryos was assessed by preimplantation genetic screening for aneuploidy (PGT-A). The resulting embryos were cultured to the blastocyst stage and their chromosomal status was assessed by next-generation sequencing (NGS). The results showed that the total number of embryos produced did not differ significantly between the two groups. In the age group under 30 years, the difference in the total number of embryos between the control and experimental groups was not statistically significant, and although the percentage of high-quality embryos in the secretome group increased compared to the control group, this difference was not statistically significant ($p = 0.207$). In the age group over 30 years, the number of embryos between the two groups was not significantly different, but the percentage of high-quality embryos in the secretome group was significantly higher than the control group. Also, in people over 30 years, the quality of the embryos improved and there was no significant difference in terms of aneuploidy, euploidy, and mosaicism. IVM had no significant effect on the health of the embryos in terms of aneuploidy and mosaicism. These findings indicate the safety and efficacy of the in vitro maturation method of oocytes using stem cell secretome in the treatment of infertility.

Keywords: Stem cells, In Vitro Maturations, Polycystic Ovary, Preimplantation Genetic Screening, Aneuploidy.



ارزیابی کیفیت و سلامت جنین‌های حاصل از بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) تحت تأثیر سکرتوم سلول‌های بنیادی

هیلدا رستگاری^۱، نسیم حیاتی رودباری^{۱*}، سمیه کاظم‌نژاد^۲، سهیلا انصاری‌پور^۲

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

۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی، ابن سینا، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: hayati@iaui.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۸

DOI: 10.60833/ascij.2025.1202355

چکیده

نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) عمدتاً به اجزای پاراکرین آن‌ها، یعنی سکرتوم آن‌ها بستگی دارد. استفاده از سلول‌های بنیادی به‌عنوان روشی نوین در درمان ناباروری و بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) شناخته شده و نتایج امیدوارکننده‌ای به‌ویژه در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) نشان داده است. با این حال، سلامت جنین‌های حاصل یکی از چالش‌های مهم است. در این مطالعه، سکرتوم سلول‌های بنیادی خون قاعدگی برای بلوغ آزمایشگاهی تخمک در ۱۰۰ بیمار مبتلا به PCOS استفاده شد و سلامت جنین‌ها با روش غربالگری ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی برای آنوپلوئیدی (PGT-A) بررسی گردید. جنین‌های حاصل تا مرحله بلاستوسیست کشت داده شدند و وضعیت کروموزومی آن‌ها با تکنیک توالی‌یابی نسل جدید (NGS) بررسی شد. نتایج نشان داد که تعداد کل جنین‌های حاصل بین دو گروه اختلاف معنی‌داری نشان نداد. در گروه سنی زیر ۳۰ سال، اختلاف در تعداد کل جنین‌ها بین گروه کنترل و آزمایش از نظر آماری معنی‌دار نبود و با اینکه درصد جنین‌های با کیفیت عالی در گروه سکرتوم نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد، اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p = 0/207$). در گروه سنی بالای ۳۰ سال، تعداد جنین‌ها بین دو گروه دارای اختلاف معنی‌دار نبود اما درصد جنین‌های با کیفیت عالی در گروه سکرتوم نسبت به گروه کنترل بطور قابل توجهی بیشتر بود. همچنین در افراد بالای ۳۰ سال، کیفیت جنین‌ها بهبود یافت و تفاوت معنی‌داری از نظر آنوپلوئیدی، یوپلوئیدی و موزایسم وجود نداشت. IVM تأثیر معنی‌داری بر سلامت جنین‌ها از نظر آنوپلوئیدی و موزایسم نداشت. این یافته‌ها حاکی از ایمنی و کارایی روش بلوغ آزمایشگاهی تخمک با استفاده از سکرتوم سلول‌های بنیادی در درمان ناباروری است.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی، بلوغ آزمایشگاهی تخمک، تخمدان پلی‌کیستیک، غربالگری ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی، آنوپلوئیدی.

مقدمه

فاکتورهای پاراکرینی ترشح شده یا سکرتوم سلول-های بنیادی به‌طور رو به افزایشی به‌عنوان عاملی برای بازسازی بافت مورد قبول قرار گرفته‌اند. این فاکتورها شامل طیفی از پروتئین‌ها، لیپیدها، میکروRNAها و وزیکول‌های خارج‌سلولی مانند اگزوزوم‌ها و میکروذره‌ها هستند. بلوغ آزمایشگاهی تخمک یا (In Vitro Maturation) IVM یک انتخاب مناسب برای زنانی که پاسخ ضعیفی به درمان

گنادوتروپین می‌دهند، دارای ذخیره تخمدان پایین و نارسایی زودرس تخمدان هستند و به ویژه بیماران با سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS: Polycystic Ovary Syndrome) می‌باشد (۱). حدود ۱۵ درصد از تخمک‌های حاصل از سیکل‌های روش‌های کمکی درمان ناباروری (ART: Assisted Reproductive Technologies) نابالغ هستند (۲). با این حال، کیفیت تخمک‌های بالغ شده در محیط آزمایشگاه اغلب پایین‌تر از تخمک‌های بالغ شده در بدن است، که این امر می‌تواند منجر به کاهش نرخ لقاح و کیفیت جنین شود. به همین دلیل، بهبود محیط کشت IVM به عنوان یک چالش مهم در تحقیقات تولیدمثل مطرح شده است. استفاده از سلول‌های بنیادی در فرآیند IVM به عنوان یک روش نویدبخش در درمان ناباروری مطرح شده است (۳). سلول‌های بنیادی با توانایی تمایز به انواع سلول‌ها و ترشح فاکتورهای رشد، می‌توانند محیطی مناسب برای بلوغ تخمک‌ها فراهم کنند. استفاده از سکرئوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC-CM) به عنوان یک افزودنی به محیط کشت IVM، به دلیل توانایی آن در تأمین فاکتورهای رشد و سایر مولکول‌های ضروری، می‌تواند راهکاری امیدوارکننده برای بهبود بلوغ تخمک و کیفیت جنین باشد که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۴، ۵). در شرایط سنتی، محیط‌های کشت IVM به دلیل کمبود برخی فاکتورهای زیستی، اغلب قادر به فراهم‌آوری شرایط ایده‌آل برای بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک نیستند. مطالعات جدید نشان داده‌اند که افزودن سکرئوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند این نواقص را جبران نموده و باعث افزایش نرخ بلوغ تخمک، بهبود کیفیت جنین و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با تکثیر و تمایز سلولی شود. برای مثال، پژوهش‌های انجام‌شده بر روی مدل‌های حیوانی و

انسانی نشان داده است که افزودن سکرئوم MSCs به محیط کشت IVM منجر به افزایش بلوغ تخمک و بهبود پارامترهای جنینی مانند تعداد سلول‌های جداره بلاستوسیست و کاهش آپوتوز می‌شود (۶، ۷). علاوه بر این برخی از تحقیقات تأیید کرده‌اند که محیط‌های غنی‌شده با کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) میزان تولید جنین‌های با کیفیت بالاتر را افزایش داده است (۸، ۹). یکی از منابع سلولی که اخیراً بواسطه دسترسی آسان و غیرتهاجمی و توانایی تمایز به انواع سلول‌ها، به‌عنوان منبعی ارزشمند در پزشکی بازساختی و درمان بیماری‌های زنان مورد توجه قرار گرفته سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی (MenSCs) است. سکرئوم این سلول‌ها که حاوی فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و آگروم‌ها است، به‌عنوان یک ماده غنی‌ساز برای بهبود بلوغ تخمک و کیفیت جنین مورد بررسی قرار گرفته که نتایج امیدبخشی داشته است (۴). از سوی دیگر، پتانسیل لانه‌گزینی جنین‌های انسانی همچنان پایین است. یکی از دلایل این است که جنین‌های انسانی تولید شده در محیط آزمایشگاه ممکن است از نظر کروموزومی غیرطبیعی باشند، در حالی که انتخاب جنین‌ها بر اساس معیارهای مورفولوژیکی همیشه روشی قطعی برای تشخیص قابلیت باروری و رشد تخمک و جنین نیست. در مطالعه‌ای بر روی بیش از ۶۰۰۰ جنین نشان داده شد که ناهنجاری‌های کروموزومی فارغ از سن مادر و مورفولوژی جنین به طور گسترده‌ای وجود دارند. متأسفانه، ارزیابی سیتوژنتیک با آزمایش اجسام قطبی و بلاستومرها اطلاعات کمی در مورد فرآیندهای ژنتیکی که در تخمک رخ می‌دهند، ارائه می‌دهد. همچنین، ارتباط بین مورفولوژی جنین و آنوپلوئیدی همچنان نامشخص است (۱۰). آنوپلوئیدی شایع‌ترین نوع ناهنجاری کروموزومی و عامل شکست لانه‌گزینی و

بلوغ آزمایشگاهی با استفاده از سکرئوم سلول‌های بنیادی حاصل از خون قاعدگی بود (۵، ۶، ۱۲).

مواد و روش‌ها

شرکت‌کننده‌ها: این مطالعه به بررسی تأثیر محیط کشت غنی‌شده با سکرئوم سلول‌های بنیادی بر کیفیت و سلامت جنین‌های حاصل از بلوغ آزمایشگاهی تخمک در بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک پرداخته است. در این پژوهش، ۱۰۰ بیمار با بازه سنی ۲۰ تا ۴۰ سال که بر اساس معیارهای تعیین‌شده توسط انجمن تولیدمثل انسان و جنین‌شناسی اروپا (روتردام) و انجمن پزشکی تولیدمثل آمریکا (۲۰۰۳) تشخیص PCOS دریافت کرده بودند، در مرکز ابن‌سینا تحت درمان IVF قرار گرفتند. جنین‌های حاصل از تخمک‌های بالغ شده به روش بلوغ آزمایشگاهی در دو گروه کنترل و گروه کشت غنی‌شده با سکرئوم سلول‌های بنیادی از نظر کیفیت و سلامت مورد ارزیابی قرار گرفتند. پیش از آغاز مطالعه، به تمام شرکت‌کنندگان اطلاعات کامل درباره شرایط پژوهش ارائه شد و رضایت آگاهانه کتبی از آنان اخذ گردید.

بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM): بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نابالغ حاصل از سیکل IVF با استفاده از سکرئوم حاصل از سلول‌های بنیادی خون قاعدگی تهیه شده از بانک سلول پژوهشگاه ابن‌سینا انجام شد. سکرئوم سلولی طبق پروتکل استفاده شده توسط فتحی‌کازرونی و همکاران تهیه شد (۶). پس از ذوب سلول‌های بنیادی در محیط کشت DMEM-F12 حاوی Dulbecco's platelet lysate کشت داده شدند تا به تراکم ۷۰ درصد رسیدند. پس از دور ریختن محیط اضافی، سلول‌ها در محیط DMEM-F12 بدون فنول قرار داده شدند و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۵ درصد

سقط جنین است. تشخیص ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی یا PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis) و غربال‌گری ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی یا PGS (Preimplantation Genetic Screening) می‌توانند منجر به افزایش نرخ بارداری در IVF و تولد نوزادان سالم بیشتر شوند. با این حال اطلاعات کمی در مورد فراوانی آنوپلوئیدی در جنین‌های تولید شده از طریق IVM وجود دارد و همواره نگرانی‌هایی در مورد تأثیرات احتمالی این روش بر سلامت جنین وجود دارد. مطالعات نشان داده‌اند که جنین‌های حاصل از تخمک‌های بلوغ‌یافته در محیط آزمایشگاهی ممکن است با افزایش خطر ناهنجاری‌های ژنتیکی، اختلالات میتواسیون DNA و مشکلات تکوینی مواجه شوند (۱۱) که می‌توانند ناشی از تغییرات اپی‌ژنتیکی یا استرس‌های محیطی در طول فرآیند IVM باشند. علاوه بر این، تخمک‌های نابالغ به دست آمده در سیکل ICSI دور انداخته می‌شوند در حالی که شواهد قابل استنادی مبنی بر نرخ بالاتر آنوپلوئیدی بر اساس وضعیت بلوغ تخمک‌ها در روز تخمک‌گیری وجود ندارد. برخی مطالعات روی جنین‌های انسانی تولید شده با ART، نرخ بالای آنوپلوئیدی را با استفاده از PGS نشان داده‌اند. همچنین، PGS اغلب برای بررسی میزان آنوپلوئیدی در جنین‌های IVM، در افرادی که به دلیل سابقه سقط مکرر کاندیدای غربالگری ژنتیکی بودند، استفاده می‌شد. امروزه روش‌های پیشرفته‌ای مانند توالی‌یابی نسل جدید یا NGS (Next Generation Sequencing) مورد استفاده قرار می‌گیرند. تاکنون مطالعه موردی-شاهدی در مورد سلامت جنین‌های حاصل از تخمک‌های بالغ شده در آزمایشگاه با استفاده از سکرئوم سلول‌های بنیادی، منتشر نشده است. بنابراین، هدف این مطالعه بررسی کیفیت جنین و نرخ آنوپلوئیدی در جنین‌های بلاستوسیست تکوین یافته از تخمک‌های حاصل از

دی‌اکسید کربن انکوبه شدند. سپس، مایع رویی از فیلتر سرنگ ۰/۲ میکرومتری عبور داده شد و در نهایت، بخش محلول جمع‌آوری شده و در میکروتیوب‌های ۵ میلی‌لیتری بسته‌بندی و ذخیره گردید. تخمک‌های نابالغ در مرحله ژرمینال وزیکل (GV) تازه به‌دست‌آمده از عمل تخمک‌گیری از زنان مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک که کیفیت قابل قبولی داشتند در دو گروه سکرئوم حاوی ۴۰ درصد سکرئوم + ۶۰ درصد محیط کلیو و گروه کنترل (محیط کلیو که محیط روتین و پایه آزمایشگاه برای کشت و بلوغ تخمک می‌باشد) با غلظت مشابه مطالعات انجام شده (۱۳، ۱۴) در شرایط ۶ درصد CO₂ و ۲۰ درصد اکسیژن کشت داده شدند.

لقاح و کشت جنین: تخمک‌های بالغ شده حاصل از لقاح آزمایشگاهی بعد از تزریق توسط اسپرم به روش داخل سیتوپلاسمی یا ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) در دو گروه کنترل و سکرئوم در انکوباتور دمای ۳ درجه و میزان CO₂ ۶ درصد در محیط Cleav کشت داده شدند و جنین‌های حاصل بعد از ۷۲ ساعت در روز سوم در مرحله کلیواژ و با تعویض محیط کشت به Blast بعد از ۱۲۰ ساعت در روز پنجم کشت در مرحله بلاستوسیست از نظر تکوین جنین و کیفیت با استفاده از استریو میکروسکوپ (Nikon, SMZ800N, Japan) مورد ارزیابی قرار گرفته و بین دو گروه مقایسه شدند.

بررسی ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی برای آنیوپلوئیدی یا PGT-A به کمک NGS: همه جنین‌های تشکیل شده در محیط Blast شرکت Origio تا روز پنجم و رسیدن به مرحله بلاستوسیست کشت داده شدند و جنین‌هایی که در هر دو گروه به این مرحله رسیدند با استفاده از روش هیچینگ کمکی (Assisted Hatching) به کمک لیزر هچ شدند و بر اساس سیستم درجه‌بندی گاردنر (۱۵) از نظر میزان انبساط،

کیفیت توده سلولی داخلی و تروفکتودرم (TE) مورد ارزیابی قرار گرفتند. بیوپسی TE روی بلاستوسیست‌های روز ۵ با درجه بهتر از ۳ BB انجام شد. ۵ تا ۱۰ سلول برای آزمایش ژنتیکی جمع‌آوری شد. از سلول‌های جمع‌آوری شده DNA استخراج شد. پس از آن، روش تکثیر کل ژنوم روی تمام نمونه‌های فردی و همچنین کنترل خالی انجام شد. مقدار غلظت واجد شرایط برای نمونه‌های فردی باید بین ۲۰ تا ۸۰ نانوگرم بر میکرولیتر باشد. برای بررسی آنیوپلوئیدی از روش توالی‌یابی کل ژنوم یا WGS (Whole Genome Sequencing) آماده‌سازی کتابخانه با استفاده از نمونه‌های DNA که به صورت تصادفی به اندازه ۲۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز قطعه‌قطعه شده بودند و از بلاستوسیست‌های بیوپسی‌شده در روز ۵ به دست آمده بودند (کیت توالی‌یابی Ion SingleSeq، شرکت Thermo Fisher Scientific) انجام شد. به انتهای قطعات DNA، آداپتورهای اختصاصی متصل شدند تا امکان توالی‌یابی در پلتفرم‌های توالی‌یابی نسل جدید (NGS) مانند Ion Torrent فراهم شود. آماده‌سازی نمونه و ایجاد قالب (Templating) روی دستگاه خودکار Ion Chef شرکت Thermo Fisher Scientific امریکا انجام شد. تراشه‌های قالب‌بندی‌شده با استفاده از سیستم Ion S5 توالی‌یابی شدند. تحلیل داده‌های حاصل از توالی‌یابی با نرم‌افزار Ion Reporter انجام شد. نتایج با ژنوم مرجع انسانی با استفاده از سایت <https://www.pgxccloud.com> هم‌تراز شدند. قابل توجه است که وضعیت پلوئیدی به عنوان یوپلوئید (با درصد آنوپلوئیدی کمتر از ۲۰ درصد)، آنوپلوئید (با درصد آنوپلوئیدی بیش از ۸۰ درصد) یا موزائیسیم (با درصد آنوپلوئیدی بین ۲۰ تا ۸۰ درصد) گزارش شد.

تجزیه و تحلیل آماری: با استفاده از SPSS نسخه ۱۸ و رسم نمودارها بوسیله نرم‌افزار Graphpad PRISM

9.4.1 انجام شد. برای مقایسه تعداد و کیفیت جنین‌ها بین دو گروه از نرم‌افزار SPSS و با توجه به کوچک بودن حجم نمونه از تست‌های Fisher's Exact Test و Mann-Whitney U Test استفاده شد. برای بررسی نتایج حاصل از PGT-A و تفاوت معنی‌داری بین درصد توزیع یوپلوئیدی، آنوپلوئیدی و موزایسم در گروه کنترل و آزمایش، از آزمون آماری Chi-Square (کای-دو) استفاده شد.

نتایج

کیفیت جنین‌های مرحله کلیواژ در گروه سنی زیر ۳۰ و بالای ۳۰ سال: تأثیر استفاده از سکرئوم سلول‌های بنیادی بر افزایش تعداد و کیفیت جنین‌ها در دو گروه سنی (زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال) بررسی شد. جنین‌های حاصل از زنان با تخمدان پلی-کیستیک و میانگین سنی 37.5 ± 3.2 و هورمون آنتی‌مولرین بالاتر از 4.14 ± 3.63 (نانوگرم/میلی‌لیتر) از نظر کیفیت ارزیابی شده و در دو گروه سنی زیر و بالای ۳۰ سال دسته‌بندی شدند. مقایسه تعداد کل جنین‌های حاصل بین دو گروه اختلاف معنی‌داری نشان نداد. در گروه سنی زیر ۳۰ سال، اختلاف در تعداد کل جنین‌ها بین گروه کنترل و آزمایش از نظر

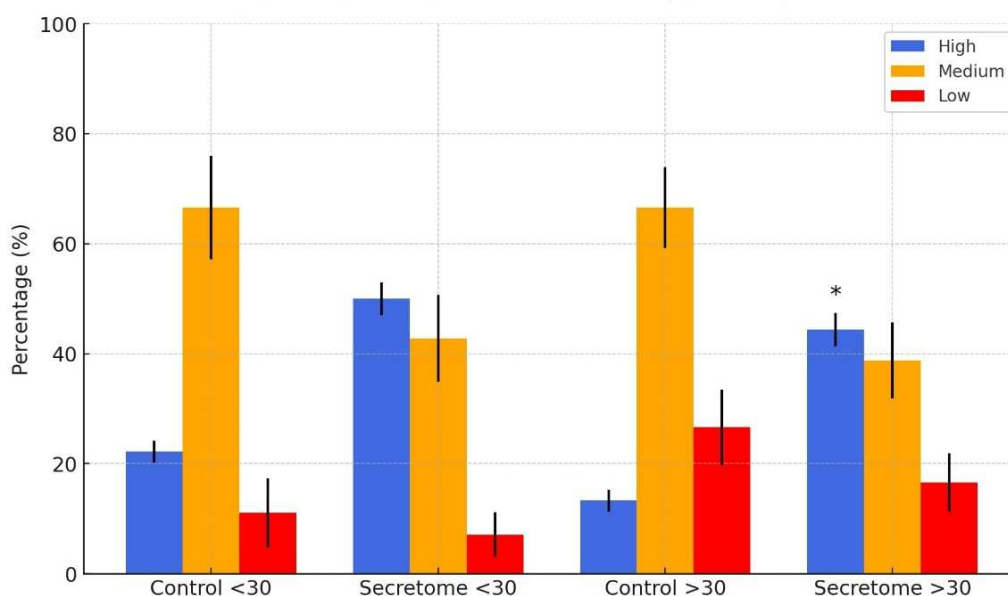
آماري معنی‌دار نبود ($p = 0.082$). همچنین درصد جنین‌های با کیفیت عالی در گروه آزمایش (۵۰ درصد) نسبت به گروه کنترل (۲۲/۲ درصد) افزایش نشان داد، اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p = 0.207$). در گروه سنی بالای ۳۰ سال از نظر تعداد بین دو گروه اختلاف معنی‌دار نبود ($p = 0.317$) اما درصد جنین‌های با کیفیت عالی در گروه سکرئوم نسبت به گروه کنترل به طور قابل‌توجهی بیشتر بود ($p = 0.049$). در حالیکه در هر دو گروه سنی (زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال)، تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و سکرئوم در جنین‌های با کیفیت متوسط و بد مشاهده نشد ($p > 0.05$) (جدول ۱، شکل ۱).

سلامت جنین‌ها: تفاوت کلی بین گروه کنترل و آزمایش از نظر توزیع یوپلوئیدی ($p = 0.76$)، آنوپلوئیدی ($p = 0.65$) و موزایسم ($p = 0.90$) معنی‌دار نیست و IVM باعث افزایش معنی‌دار آنوپلوئیدی یا کاهش معنی‌دار یوپلوئیدی نشده است ($p = 0.85$). این نتایج نشان می‌دهد که تأثیر معنی‌داری بر سلامت جنین‌ها از نظر آنوپلوئیدی و موزایسم ندارد (جدول ۱، شکل ۲).

جدول ۱- مقایسه ویژگی‌های جنین‌های حاصل در گروه‌های مداخله و گروه کنترل در گروه سنی زیر و بالای ۳۰ سال

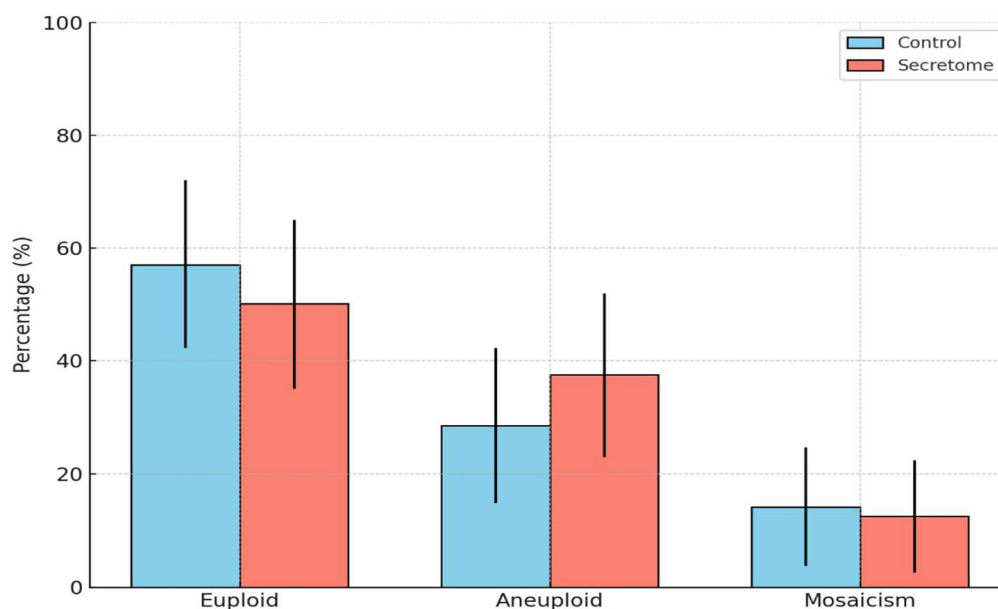
Table 1. Comparison of characteristics of embryos obtained in the intervention and control groups in the age group under and over 30 years

	Control < 30	Control > 30	Secretome < 30	Secretome > 30
Number of oocytes	100	100	100	100
Grade A embryos	2.9 (22.2%)	2.15 (13.3%)	7.14 (50%)	8.18 (44.4%)
Grade B embryos	6.9 (66.6%)	10.15 (66.6 %)	6.14 (42.8 %)	7.18 (38.8%)
Grade B and C embryos	1.9 (11.1%)	4.15 (26.6%)	1.14 (7.1%)	3.18 (18.8%)
Aneuploid Blastocysts	(28.5 %) (ns)		(37.5 %) (ns)	
Euploid Blastocysts	(57.1 %) (ns)		(50 %) (ns)	
Mosaicism Blastocysts	(14.2 %) (ns)		(12.5 %) (ns)	



شکل ۱- نمودار مقایسه کیفیت جنین‌های تکوین یافته در روز سوم کشت (مرحله کلیواژ) در گروه سکرتوم و کنترل بین زنان زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال. * نشان‌دهنده اختلاف $p \leq 0.05$ نسبت به گروه کنترل می‌باشد. تعداد جنین‌ها به تعداد کل جنین‌ها در هر گروه بصورت درصد محاسبه شده است.

Fig 1. Graph comparing the quality of embryos developed on the third day of culture (cleavage stage) in the secretome and control groups between women under 30 years and over 30 years of age. * indicates a difference of $p \leq 0.05$ compared to the control group. The number of embryos was calculated as a percentage of the total number of embryos in each group.



شکل ۲- نمودار مقایسه سلامت جنین‌های تکوین یافته در روز پنجم کشت (مرحله بلاستوسیت) در گروه سکرتوم و کنترل. تعداد جنین‌ها به تعداد کل جنین‌ها در هر گروه بصورت درصد محاسبه شده است و اختلاف بین گروه‌ها معنی‌دار نبود ($p > 0.05$).

Fig 2. Graph comparing the health of embryos developed on the fifth day of culture (blastocyst stage) in the secretome and control groups. The number of embryos was calculated as a percentage of the total number of embryos in each group, and the difference between the groups was not significant ($p > 0.05$).

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از سکرئوم سلول‌های بنیادی ممکن است به بهبود کیفیت جنین‌ها، به ویژه در بیماران بالای ۳۰ سال، کمک کند. این یافته با مطالعات قبلی همسو است که نشان داده‌اند سکرئوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC-CM) حاوی فاکتورهای رشد، سایتوکاین‌ها و miRNAهایی است که می‌توانند محیط تخمدان و رحم را برای بهبود کیفیت اووسیت‌ها و جنین‌ها بهینه کنند. تاثیر مثبت کاندیشن مدیوم حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در انواعی از بیماری‌ها و نیز بلوغ تخمک در مطالعات مختلف اثبات شده است که می‌تواند به مکانیسم‌های گسترده‌ای مربوط باشد (۱۶). همچنین در مطالعات جدید وجود وزیکل‌های خارج سلولی مترشح‌ه از این سلول‌ها بویژه سلول‌های مشتق از خون قاعدگی مورد بحث می‌باشد که مکانیسم اثر آنها به این صورت است که می‌توانند بعنوان حامل-هایی برای مولکول‌های زیستی باشند که اثرات ذکر شده را القا کنند همچنین انواعی از لیپیدها و پروتئین‌ها و RNA micro ها را در خود حمل می‌کنند (۱۷). به عنوان مثال، مکانیسم‌های مولکولی از طریق مسیرهای سیگنالینگ، مانند مسیر PI3K/AKT و MAPK/ERK، فاکتورهای رشد مانند IGF-1، VEGF و $TGF-\beta$ موجود در سکرئوم می‌توانند باعث افزایش بلوغ اووسیت‌ها، بهبود تکثیر سلول‌های گرانولوزا و کاهش استرس اکسیداتیو شوند (۱۸). این مکانیسم‌ها ممکن است توضیح‌دهنده بهبود کیفیت جنین‌ها در گروه آزمایش باشد. در این راستا نتایج یک مطالعه حیوانی توسط امینی و همکاران نشان داد استفاده از مواد مغذی سلول‌های بنیادی خون قاعدگی در تشکیل جنین‌های بلاستوسیست با کیفیت تاثیر گذار می‌باشد (۸). به این ترتیب، عدم معنی‌داری اختلاف در تعداد کل جنین‌ها ممکن است نشان‌دهنده این باشد که

سکرئوم سلول‌های بنیادی بیشتر بر کیفیت جنین‌ها تاثیر می‌گذارد تا بر تعداد آنها که این امر می‌تواند ناشی از عدم بلوغ سیتوپلاسمی تخمک‌ها باشد که منجر به کاهش نرخ بلوغ و در نتیجه تشکیل جنین خواهد شد (۱۴). همچنین، تفاوت نتایج بین دو گروه سنی ممکن است به دلیل کاهش ذخیره تخمدانی و افزایش استرس اکسیداتیو در بیماران بالای ۳۰ سال باشد، که باعث می‌شود این گروه بیشتر از تأثیرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی سکرئوم سلول‌های بنیادی مثل IL-10 و SOD بهره‌مند شوند. همچنین در مطالعه دیگر با استفاده از کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی بهبود تشکیل جنین در مدل موشی گزارش شد و این امر می‌تواند به احتمال وجود اختلاف در ترکیبات کاندیشن مدیو و سکرئوم نیز نسبت داده شود. از سوی دیگر یکی از دلایل احتمالی عدم بهبود قابل‌توجه در تعداد و نیز کیفیت جنین در گروه سنی زیر ۳۰ سال می‌تواند حذف سلول‌های کومولوس در طی فرآیند بلوغ آزمایشگاهی باشد. سلول‌های کومولوس نقش حیاتی در بلوغ و کیفیت تخمک‌ها ایفا می‌کنند. این سلول‌ها از طریق اتصالات شکاف‌دار با تخمک‌ها در ارتباط بوده و تبادل مولکول‌های سیگنالینگ و مواد مغذی بین آنها صورت می‌گیرد. حذف یا آسیب به این سلول‌ها می‌تواند منجر به کاهش کیفیت تخمک و در نتیجه کاهش کیفیت جنین شود (۱۹). اما چنانچه میدانیم مکانیسم‌های بین سلولی و ارتباط و تبادل بین سلول‌های گرانولوزا و تخمک تاثیر زیادی بر بلوغ تخمک و مسیرهای منجر به آن دارد اما در آزمایشگاه-های درمان ناباروری برای تشخیص مرحله بلوغ تخمک حذف این کمپلکس‌های سلولی از اطراف تخمک گریزناپذیر است. در همین راستا مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که بیان ژن‌های خاص در

سلول‌های کومولوس با کیفیت تخمک و جنین مرتبط است. به عنوان مثال، افزایش بیان ژن‌های *GDF9* و *BMP15* در سلول‌های کومولوس با بهبود بلوغ تخمک، لقاح و کیفیت جنین همراه بوده است (۲۰). بنابراین، در حالی که سکرئوم *MSC* ممکن است فاکتورهای ضروری برای بلوغ تخمک را فراهم کند، حذف سلول‌های کومولوس می‌تواند تأثیرات منفی بر کیفیت جنین داشته باشد. در نتیجه غنی‌سازی محیط *IVM* با استفاده از سکرئوم می‌تواند برای بلوغ هسته‌های مفید باشد اما از نظر مکانیسم‌های دخیل این امر کافی نیست تا دیسمتیلیسیون ناشی از کشت *IVM* را جبران کند یا قابلیت رشد و پیشرفت جنین را پس از آن بهبود بخشد (۱۴). کیفیت جنین همیشه معیار کاملاً دقیقی مبنی برای سلامت جنین نیست و مطالعات نشان می‌دهند که تنها معیار ظاهری نمی‌تواند تضمین‌کننده انتقال مثبت باشد. انتخاب یک جنین مناسب برای انتقال که منجر به یک لانه‌گزینی و بارداری موفق می‌شود در کلینیک‌های درمان ناباروری اهمیت بسزایی دارد اما جنین‌های یوپلوئید که دارای مجموعه کروموزومی طبیعی انسان شامل ۴۶ کروموزوم هستند، به‌طور ترجیحی برای انتقال انتخاب می‌شوند تا جنین‌های آنوپلوئید (مجموعه کروموزومی غیرطبیعی)، زیرا با نتایج بالینی بهتری همراه هستند. یکی از مباحث مورد توجه سلامت جنین‌های حاصل در آزمایشگاه است و بویژه با توجه به استفاده از تخمک‌های نابالغ و تأثیرات منفی احتمالی زمان کشت و محیط کشت‌های مورد استفاده برای بلوغ آزمایشگاهی تخمک بررسی سلامت جنین‌های حاصل از این روش‌ها برای استفاده کلینیکی و درمان ناباروری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که مطالعات بسیار محدودی در این زمینه منتشر شده است. همچنین برخی بیماران به دلیل ناباروری با علت نامشخص و سقط برای بررسی آنیوپلوئیدی که

یکی از دلایل مهم در شکست لانه‌گزینی است معرفی می‌شوند. اما نتایج این مطالعه نشان داد که از نظر میزان آنیوپلوئیدی و یوپلوئیدی و همچنین جنین‌های موزاییک در گروه تیمار شده با سکرئوم سلول‌های بنیادی خون قاعدگی تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل وجود ندارد. به این معنی که ترکیبات موجود در محیط کشت بلوغ آزمایشگاهی تخمک نسبت به محیط تجاری روتین آزمایشگاه منجر به ایجاد ناهنجاری در جنین نمی‌شوند. علاوه بر این، اووسیت‌های نابالغ که در طول چرخه‌های *IVF* تحریک‌شده با گنادوتروپین بازیابی می‌شوند، معمولاً در کلینیک‌ها دور انداخته می‌شوند؛ در حالی که هیچ شواهد جامع و قابل استنادی مبنی بر نرخ بالاتر آنوپلوئیدی بر اساس وضعیت بلوغ اووسیت‌ها در روز بازیابی وجود ندارد (۲۱). همچنین در مطالعه دیگری همراه با نتایج ما نشان داده شد که بلوغ آزمایشگاهی تخمک میزان تشکیل جنین‌های آنیوپلوئیدی را افزایش نداد (۹). و مطالعه ما نیز نشان داد تغییرات اپی‌ژنتیکی یا استرس‌های محیطی احتمالی در طول فرآیند *IVM* منجر به تشکیل جنین‌هایی با نرخ آنیوپلوئیدی بالاتر نشد که این امر می‌تواند ناشی از تأثیر آنتی‌اکسیدانی سکرئوم سلول‌های بنیادی خون قاعدگی باشد (۱۸، ۲۲). اما ارتباط بین مورفولوژی جنین و آنوپلوئیدی همچنان نامشخص است و برخی مطالعات نشان می‌دهند که صرفاً انتخاب یک جنین بر اساس ویژگی‌های ظاهری با گرید خوب نمی‌تواند دلیلی بر سلامت جنین و لانه‌گزینی موفق شود و با توجه به کوچک بودن حجم نمونه مطالعه ما از نظر تعداد جنین‌های حاصل امکان بررسی ارتباط بین سن و سلامت و مورفولوژی جنین‌ها در این تحقیق وجود نداشت. در هر صورت باید در نظر گرفت که تخمک زنان *PCO* با وجود کاندید بودن برای مطالعات از نظر کیفیت در مقایسه با

نتایج نشان داد که استفاده از محیط کشت غنی شده با این ترکیب مغذی در گروه سنی بالای سی سال در بهبود کیفیت جنین موثر بود اما میزان ناهنجاری‌های کروموزومی (آنوپلوئیدی) را در جنین‌ها بواسطه تأثیرات کشت بیش از آنچه در سایر چرخه‌های درمان ناباروری گزارش شده است، افزایش نداد و نتایج این مطالعه همراه با سایر تحقیقات بود. در نتیجه ترکیب IVM یا PGT-A می‌تواند دقت انتخاب جنین‌های سالم را افزایش داده و نتایج درمان را بهبود بخشد. استفاده از روش‌های غربالگری در کلینیک‌های درمان ناباروری با در نظر گرفتن شرایط بیمار برای افزایش نرخ لانه‌گزینی و همچنین مطالعات بیشتر در زمینه ارتباط بین مورفولوژی و سلامت جنین پیشنهاد می‌شود.

منابع

1. Walls M, Hunter T, Ryan JP, Keelan JA, Nathan E, Hart RJ. In vitro maturation as an alternative to standard in vitro fertilization for patients diagnosed with polycystic ovaries: a comparative analysis of fresh, frozen and cumulative cycle outcomes. *Hum Reprod*. 2015;30(1):88-96.
2. Halvaei I, Ali Khalili M, Razi MH, Nottola SA. The effect of immature oocytes quantity on the rates of oocytes maturity and morphology, fertilization, and embryo development in ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29:803-810.
3. Chen L, Qu J, Cheng T, Chen X, Xiang C. Menstrual blood-derived stem cells: toward therapeutic mechanisms, novel strategies, and future perspectives in the treatment of diseases. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):406.
4. Rastegari H, Kazemnejad S, Hayati Roodbari N, Ansari-pour S. Role of menstrual blood stem cell-derived secretome, follicular fluid, and melatonin in oocyte maturation and embryo development in polycystic ovary syndrome. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2025;20(3):291-301.

افراد غیر پلی‌کیستیک در درجه پایینتری هستند و بر طبق نتایج برخی مطالعات بر نتایج بلوغ آزمایشگاهی تخمک و نرخ تشکیل جنین و کیفیت جنین‌های حاصل موثر خواهد بود اما طبق بررسی‌های انجام شده همسو با تحقیق ما، نمی‌تواند عامل قطعی موثر بر عدم سلامت جنین‌های حاصل باشد (۲۱). در نتیجه روش بلوغ آزمایشگاهی تخمک با استفاده از سلول‌های بنیادی برای درمان ناباروری همچنان می‌تواند در زنان دارای تخمدان پلی‌کیستیک به عنوان یک گزینه امید بخش در نظر گرفته شود (۲۳) و گرچه نتایج متناقضی در مورد ارزشمند بودن روش‌های بیوپسی یک جنین برای بررسی وضعیت کروموزومی و وضعیت کشت جنین ارایه می‌شود اما در نهایت با اینکه ممکن است PGT-A یک تست مرسوم برای کمک به بیماران در سیکل IVF نباشد هر کلینیک باید اثربخشی استفاده از آن را بر اساس مهارت و محدودیت‌ها و بیمارانش ارزیابی کند (۲۴). اغلب مطالعات انجام شده گذشته‌نگر یا با سبب نمونه کوچک هستند در نتیجه برای حصول نتیجه‌ای قابل استنادتر مطالعات وسیع‌تر با جامعه آماری بزرگتر و یا استفاده از روش‌های غیرتهاجمی و بررسی سلامت بر اساس مورفولوژی به‌ویژه با استفاده از پلتفرم‌های هوش مصنوعی پیشنهاد می‌گردد که در طرح‌های آتی گروه ما مورد بررسی قرار خواهد گرفت. با توجه به شیوع نرخ انوپلوئیدی در جنین‌های آزمایشگاهی استفاده از روش‌های غربالگری با توجه به شرایط بیماران در کلینیک‌های درمان ناباروری در حصول نتایج بهتر توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر تأثیر استفاده از سکرئوم سلول‌های بنیادی خون قاعدگی بر جنین‌های حاصل از بلوغ آزمایشگاهی تخمک مورد بررسی قرار گرفت که

- frozen embryo transfer: a cohort study of 337,148 in vitro fertilisation cycles. *BMC Med.* 2019;17(1):202.
12. Li J, Chen J, Sun T, Zhang S, Jiao T, Chian RC, Li Y, Xu Y. Chromosome aneuploidy analysis in embryos derived from in vivo and in vitro matured human oocytes. *J Transl Med.* 2021;19(1):416.
13. Jafarzadeh H, Nazarian H, Ghaffari Novin M, Shams Mofarahe Z, Eini F, Piryaee A., Improvement of oocyte in vitro maturation from mice with polycystic ovary syndrome by human mesenchymal stromal cell-conditioned media. *J Cell Biochem.* 2018;119(12):10365-10375.
14. Madkour A, Bouamoud N, Kaarouch I, Louanjli N, Saadani B, Assou S, Aboulmaouahib S, Sefrioui O, Amzazi S, Copin H, Benkhalifa M. Follicular fluid and supernatant from cultured cumulus-granulosa cells improve in vitro maturation in patients with polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril.* 2018;110(4):710-719.
15. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* 2000;73(6):1155-1158.
16. Chen L, Qu J, Xiang C. The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):1-10.
17. He Y, Chen D, Yang L, Hou Q, Ma H, Xu X. The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in premature ovarian failure. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):263.
18. Chen L, Qu J, Mei Q, Chen X, Fang Y, Chen L, Li Y, Xiang C. Small extracellular vesicles from menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MenSCs) as a novel therapeutic impetus in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):433-20.
5. Zafardoust S, Kazemnejad S, Darzi M, Fathi-Kazerooni M, Rastegari H, Mohammadzadeh A. Improvement of pregnancy rate and live birth rate in poor ovarian responders by intraovarian administration of autologous menstrual blood derived-mesenchymal stromal cells: phase I/II clinical trial. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2020;16(4):755-763.
6. Fathi-Kazerooni M, Fattah-Ghazi S, Darzi M, Makarem J, Nasiri R, Salahshour F, Dehghan-Manshadi SA, Kazemnejad S. Safety and efficacy study of allogeneic human menstrual blood stromal cells secretome to treat severe COVID-19 patients: clinical trial phase I & II. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):96.
7. Fesahat F, Kalantar SM, Sheikhha MH, Saeedi H, Montazeri F, Firouzabadi RD, Khalili MA. Developmental and cytogenetic assessments of preimplantation embryos derived from in-vivo or in-vitro matured human oocytes. *Eur J Med Genet.* 2018;61(4):235-241.
8. Amini MS, Naderi MM, Shirazi A, Aminafshar M, Boroujeni SB, Pournourali M, Malekpour A. Bioactive materials derived from menstrual blood stem cells enhance the quality of in vitro bovine embryos. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2022;14(4):287.
9. Lee SH. Effects of human endothelial progenitor cell and its conditioned medium on oocyte development and subsequent embryo development. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):7983.
10. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine, the Society of Reproductive Biologists and Technologists, and the Society for Assisted Reproductive Technology. Electronic address: jgoldstein@asrm.org. In vitro maturation: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2021;115(2):298-304.
11. Smith AD, Tilling K, Lawlor DA, Nelson SM. Live birth rates and perinatal outcomes when all embryos are frozen compared with conventional fresh and

- ovarian senescence by relieving oxidative stress-induced inflammation. *Reprod Sci.* 2025; 32(5):1566-1579.
23. Morales C. Current applications and controversies in preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) in In vitro fertilization. *Reprod Sci.* 2024;31(1):66-80.
24. Siristatidis C, Sergeantanis TN, Vogiatzi P., Kanavidis P, Chrelias C, Papantoniou N, Psaltopoulou T. In vitro maturation in women with vs. without polycystic ovarian syndrome: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134696.
25. Fesahat F, Montazeri F, Hoseini SM. Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2020;49(5):101723.
19. Nikoloff N. The key role of cumulus cells in oocytes in vitro maturation protocols. *Fertil Steril.* 2021;116(6):1663.
20. Massoud G, Spann M, Vaught KC, Das S, Dow M, Cochran R, et al. Biomarkers assessing the role of cumulus cells on IVF outcomes: a systematic review. *J Assist Reprod Genet.* 2024;41(2):253-275.
21. Montazeri F, Kalantar M, Hoseini SM, Agha-Miri A, Abdoli M, Nikuei P. Comparing aneuploidy rate in arrested human embryos derived from in-vivo and in-vitro matured oocytes, 19 September 2023, PREPRINT (Version 1) available at Research Square, 2023; <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3309756/v1>
22. Song H, Zhang R, Liu Y, Wu J, Fan W, Wu J, Liu Y, Lin J. Menstrual blood-derived endometrial stem cells ameliorate

Research Article

Protective Effect of Nano Magnesium Oxide on Renal Ischemia/Reperfusion Injury on Renal Function and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Male Wistar Rats

Marzieh Minaei¹, Akram Eidi^{1*}, Pejman Mortazavi², Ahmad Asghari³

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

2- Department of Veterinary Pathobiology, 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: 15 January 2025

Accepted: 2 January 2024

DOI: 10.60833/ascij.2025.1196659

Abstract

Ischemia/reperfusion (I/R) injury is characterized by the restriction of blood supply to the organ followed by the return of blood flow and reoxygenation. The aim of this study was to measure Protective effect of nano magnesium oxide (MgO) on I/R on renal function and vascular endothelial growth factor (VEGF) in male Wistar rats. In this study, 54 adults male Wistar rats were randomly divided into 9 groups of 6 rats, including healthy control, control, I/R control, three healthy experimental groups, and three I/R experimental groups. I/R injury was induced by ligation of the left renal pedicle for 20 minutes. Animals were tested using MgO (doses of 1.25, 2.5 and 5 mg/kg) for 30 days via gavage and finally serum samples were collected to assess renal function. In addition, after sacrificing the animals, kidney tissue was obtained for immunohistochemical examination of VEGF expression and the resulting data were statistically analyzed ($p < 0.05$). The results showed that I/R mice that were intervened with MgO significantly reduced serum urea and creatinine levels at concentrations of 2.5 and 5 mg/kg. Renal function and VEGF expression also showed significant improvement. MgO, as a potent vasodilator, were able to improve serum urea and creatinine levels as indicators of renal cell damage in I/R groups. Also, by reducing the expression level of VEGF in MgO-treated groups, MgO may effectively mediate the protection against hypoxia induced by I/R injury.

Keywords: Nano magnesium oxide, Ischemia/reperfusion, Kidney, VEGF.



مقاله پژوهشی

اثر محافظتی نانو اکسید منیزیم در آسیب ایسکمی/پرپیوژن کلیه بر عملکرد کلیه و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در موش صحرایی نر

مرضیه مینایی^۱، اکرم عیدی^{۱*}، پژمان مرتضوی^۲، احمد اصغری^۳

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

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

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

*مسئول مکاتبات: akeidi@iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۲۶

DOI: 10.60833/ascij.2025.1196659

چکیده

آسیب ایسکمی/پرپیوژن مجدد (I/R) با محدود شدن خون‌رسانی به اندام و به دنبال آن بازگشت جریان خون و اکسیژن‌رسانی مجدد مشخص می‌شود. هدف از این مطالعه، سنجش اثر محافظتی نانو اکسید منیزیم (MgO) در آسیب ایسکمی/پرپیوژن کلیه بر عملکرد کلیوی و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در موش صحرایی نر می‌باشد. در این مطالعه ۵۴ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به طور تصادفی به ۹ گروه ۶ تایی شامل گروه‌های کنترل سالم، شاهد، کنترل I/R، سه گروه تجربی سالم و سه گروه تجربی I/R تقسیم شدند. القای آسیب I/R از طریق بستن پدیکل کلیوی چپ به مدت ۲۰ دقیقه ایجاد شد. حیوانات با استفاده از MgO (دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) به مدت ۳۰ روز از طریق گاوژ مورد آزمایش قرار گرفتند و در نهایت نمونه‌های سرم برای بررسی عملکرد کلیه جمع‌آوری شد. به علاوه با قربانی شدن حیوانات، بافت کلیه برای بررسی ایمونوهیستوشیمی میزان بیان VEGF اخذ شد و داده‌های حاصل مورد آنالیز آماری قرار گرفت ($p < 0/05$). نتایج نشان داد که موش‌های I/R که با نانو اکسید منیزیم مداخله شدند، در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم سطوح اوره و کراتینین سرم را به طور معنی‌داری کاهش دادند. همچنین عملکرد کلیوی و بیان VEGF، بهبود معنی‌داری نشان داد. MgO توانسته به عنوان یک وازودیلاتور قوی، سطوح اوره و کراتینین سرم را به عنوان شاخص‌های آسیب سلول‌های کلیوی، در گروه‌های I/R، بهبود بخشد. همچنین با کاهش سطح بیان VEGF در گروه‌های تحت درمان MgO، ممکن است نانو اکسید منیزیم برای محافظت از هیپوکسی ناشی از آسیب I/R به طور مؤثری واسطه شود.

کلمات کلیدی: نانو اکسید منیزیم، ایسکمی/پرپیوژن، کلیه، VEGF.

مقدمه

NPs برای کاربردهای بیولوژیکی باید به گونه‌ای ساخته شوند که وقتی روی سلول‌ها، بافت‌ها یا سرم اعمال می‌شوند، ویژگی‌های مطلوبی داشته باشند (۲). از آنجایی که NPs نسبت سطح به حجم بیشتری

حوزه نانوپزشکی به سرعت در حال پیشرفت و گسترش است. ذرات بسیار ریزی که دارای اندازه بیشتر از ۱ نانومتر و کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر باشد، نانوذرات (Nanoparticles, NPs) نامیده می‌شوند (۱).

نسبت به ذرات بزرگتر دارند، تأثیر بیشتری بر محیط دارند و با مواد دیگر به شدت تعامل می‌کنند (۳). NPs قابلیت مصرف بهتر، پایداری کلئیدی در محیط‌های بیولوژیکی، راندمان درونی سازی بالا و سمیت کمتری نسبت به میکروذرات نشان می‌دهند. نفوذپذیری سلولی بالاتر و اثرات کوانتومی بیشتر به عنوان تابعی از اندازه نانوذرات، دلیل منحصر به فرد بودن آنهاست (۴). مهم‌ترین ویژگی این داروها، اندازه ذرات، وزن مولکولی، pH، قدرت یونی، غلظت مونومر و بار سطحی می‌باشد (۵). منیزیم (Mg) کاتیون و ماده معدنی مهم درون سلولی در سلول‌های بدن انسان است (۶) همچنین یک عنصر مهم برای حفظ عملکرد طبیعی تقریباً سیصد آنزیم سلولی بدن می‌باشد (۷). در میان نانومواد اکسید فلزی، نانو اکسید منیزیم (MgO) به عنوان ماده‌ای کم‌هزینه و سازگار با محیط زیست در نظر گرفته شده است. سمیت MgO کمتر از سایر نانوذرات اکسیدی فلزی می‌باشد (۶). نانوذرات MgO اثرات مفیدی در سلول‌ها نشان می‌دهند (۸، ۹). نمک‌های منیزیم حاوی MgO به عنوان مکمل منیزیم درمانی می‌تواند باعث افزایش غلظت منیزیم کبدی، افزایش بیان mRNA کاتالاز و در نتیجه افزایش فعالیت کاتالاز گردد (۱۰). اکسید منیزیم فراهمی‌زیستی نسبتاً ضعیفی دارد (۱۱) و دست‌کاری مشخصه‌های فیزیکوشیمیایی ذرات MgO به فرم نانو می‌تواند فراهمی‌زیستی آن را افزایش دهد (۱۲). در ارزیابی اثر ضد تشنج در موش گزارش شده است که نانوذرات اکسید منیزیم مؤثرتر از شکل معمول آن بوده است که مربوط به خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانو MgO می‌باشد (۱۳). مکانیسم اصلی عملکرد نانوذرات، هنوز شناخته نشده است. با این وجود، با توجه به ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی نانومواد، پیش‌بینی می‌شود که این مواد با اجزای زیستی برهم‌کنش داشته باشند و اثرات زیادی بر رفتار

و خصوصیات ماکرومولکول، سلول و بدن موجود زنده به جای بگذارند (۱۴). علاوه بر این، گزارش شده است که آن‌ها شاخص‌های استرس اکسیداتیو نظیر گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر را کاهش داده و باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدها نیز می‌شوند (۱۵). آن‌ها سمیت ژنی قابل‌توجهی نشان ندادند که کاربردهای بالقوه آن‌ها را در داروهای نانو به عنوان یک ابزار تشخیصی و درمانی نشان می‌دهد (۹). آسیب ایسکمی رپرفیوژن Ischemia-Reperfusion Injury/ IRI) کلیوی، کاهش جریان خون قشری است که باعث هیپوپرفیوژن بافتی شده و می‌تواند در اثر بیماری‌هایی مانند سپسیس، افت فشار خون، تنگی شریان کلیوی پس از نفرکتومی جزئی و یا در حین پیوند کلیه ایجاد شود. پس از ایسکمی کلیوی، جریان خون کلیه به حالت عادی باز می‌گردد، اما تغییرات ناحیه ای رخ می‌دهد. ناحیه مدولاری بیرونی در شرایط عادی به‌طور حاشیه‌ای اکسیژنه می‌شود و به ویژه شاخه ضخیم صعودی توبول کلیوی، نیازهای انرژی بالایی دارد (۱۶، ۱۷). جریان خون در این ناحیه پس از خون‌رسانی مجدد به حدود ۱۰ درصد طبیعی می‌رسد که منجر به ادم، جریان خون ضعیف، محرومیت از مواد مغذی و از دست دادن ATP می‌شود (۱۸). محصولات تخریب ATP مانند هیپوگزانتین می‌توانند از سلول‌ها نشت کنند و توسط گزانتین اکسیداز به اسید اوریک تبدیل می‌شود. در این فرآیند گونه‌های اکسیژن فعال تشکیل شده که منجر به آسیب ایسکمیک گردیده و تداوم بیشتر ایسکمی و آسیب سلولی توبولی را منجر می‌شود. تورم سلول‌های توبولی در فضای محدود مدولای خارجی به‌طور مکانیکی به انسداد مویرگی می‌افزاید و باعث کاهش جریان خون مدولاری و تداوم بیشتر ایسکمی و آسیب سلولی توبولار می‌شود (۲). بیماری حاد کلیوی مرتبط با I/R، یک مشکل بالینی شایع با مرگ

نشان‌دهنده‌ی میزان فیلتراسیون گلوبرولی است (۳۲)، از این رو اندازه‌گیری آن‌ها به عنوان مارکرهای بیوشیمیایی برای ارزیابی عملکرد کلیه (۳۳)، می‌تواند معیار مهمی در بررسی‌های I/R کلیه به حساب آید.

مواد و روش‌ها

نانوذره اکسید منیزیم کروی با درجه خلوص ۹۹ درصد و اندازه ۶۰-۲۰ نانومتر از شرکت پیشگامان خریداری گردید و از آب مقطر برای حل شدن نانوذرات MgO استفاده شد. کیت اندازه‌گیری اوره و کراتینین سرم از شرکت پارس آزمون (ایران) و کیت ایمونوهیستوشیمی (IHC) VEGF از شرکت Dako، United States and Canada، تهیه گردید.

حیوانات آزمایشگاهی: این مطالعه بر روی ۵۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم انجام شد. حیوانات از انستیتو پاستور تهران تهیه شدند و تحت شرایط استاندارد در قفس‌های پلی‌کربنات در دمای محیط 22 ± 2 سانتی‌گراد با چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. تمامی آزمایشات بر روی حیوانات بر اساس دستورالعمل‌های کمیته اخلاق حمایت از حقوق حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات با شناسه کد اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1398.136 انجام گردید.

روش جراحی: به منظور ایجاد ایسکمی رپرفیوژن، حیوانات توسط کتامین هیدروکلراید (۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) با تزریق داخل صفاقی بیهوش شدند (۷، ۳۴). جهت ایجاد ایسکمی رپرفیوژن، خط میانی شکم برش داده شد و عروق کلیوی توسط پنس غیر ضربه‌ای (Non-traumatic) بسته شده و بعد از ۲۰ دقیقه آزاد گردیدند. جهت مرطوب نگاه داشتن ناحیه، از تامپون

و میر و عوارض بالاست (۱۹، ۲۰). علاوه بر این، پاتورنز I/R کلیه ممکن است در ارتباط با مکانیسم‌هایی از جمله اختلال عملکرد اندوتلیال، پاسخ‌های التهابی سیستمیک و موضعی، استرس اکسیداتیو، آپوپتوز و نکروز باشد (۲۱، ۲۲). با این‌حال، علت و مکانیسم دقیق I/R کلیه هنوز نامشخص است. فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) میتوزن اختصاصی سلول اندوتلیال و یک پروتئین دایمری مخفی است که به روش‌های مختلف می‌تواند رگ‌زایی را القا کند (۲۳، ۲۴). رگ‌زایی در بسیاری از شرایط پاتولوژیک همچون رشد تومور، متاستاز، نفروپاتی دیابتی، دژنراسیون ماکولا، آرتریت روماتوئید و پسوریازیس نقش کلیدی ایفا می‌کند (۲۵، ۲۶). همچنین با تومور کلیه و بیماری کلیه پلی‌کیستیک نیز مرتبط است (۵). از بین تمام مولکول‌های شناخته شده رگ‌زایی، VEGF احتمالاً فاکتور رشد رگ‌زایی اولیه و بهترین تعدیل‌کننده در الگوسازی عروق است که مسئول تمایز آنژیوبلاست و تشکیل لوله است و فعالیت بیولوژیک خود را از طریق اتصال به دو گیرنده تیروزین‌کینازی به نام گیرنده‌های Flt-1 (VEGFR₁) و KDR (VEGFR₂) اعمال می‌کند (۲۷، ۲۸). علاوه بر این، نقش VEGF در رگ‌زایی برای ایجاد ایسکمی خون‌رسانی مجدد بافت و همچنین برای تشکیل تومور بسیار مهم است (۲۹، ۳۰، ۳۱). هیپوکسی یک تنظیم‌کننده کلیدی بیان ژن VEGF است. علاوه بر هیپوکسی، بسیاری از سیتوکین‌ها، هورمون‌ها و فاکتورهای رشد می‌توانند بیان mRNA VEGF را در انواع مختلف سلول تنظیم کنند (۵). در این مطالعه، از یک مدل I/R کلیوی برای بررسی اثر MgO در بیان سیتوکین‌های محافظ از جمله VEGF در کلیه ایسکمیک موش صحرایی استفاده شده است. با توجه به این‌که مقدار سرمی کراتینین و اوره

خیس شده با نرمال سالین گرم استفاده شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه، آن‌ها را برداشته و خط میانی شکم طبق روش‌های متداول (عضلات با نخ ویکریل ۰۳ و پوست با نخ نایلون ۰۳) بخیه گردید (۷، ۳۵).

گروه‌های مورد مطالعه: مطالعات در تمام گروه‌ها طی زمان‌های یکسان به‌عمل آمد. موش‌ها به صورت تصادفی به ۹ گروه ۶ تایی تقسیم شدند: گروه ۱ (کنترل سالم): حیوانات دست نخورده، همراه با گاوآز آب مقطر، گروه ۲ (شاهد): حیوانات تحت جراحی sham، همراه با گاوآز آب مقطر، گروه‌های ۳-۵ (تجربی سالم): حیوانات سالم با تیمار نانواکسیدمینیزیم ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم بصورت گاوآز روزانه (۳۶، ۳۷)، گروه ۶ (کنترل I/R): حیوانات تحت جراحی ایسکمی/رپرفیوژن همراه با گاوآز آب مقطر و گروه‌های ۷-۹ (تجربی I/R): حیوانات تحت جراحی ایسکمی/رپرفیوژن با تیمار نانواکسیدمینیزیم ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم بصورت گاوآز روزانه.

آزمایشات سرولوژیک: ۳۰ روز پس از گاوآز نانواکسیدمینیزیم با ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم (۱۲، ۳۶)، خون از قلب حیوانات جمع‌آوری شد. سرم تهیه شده و سطوح نیتروژن اوره سرم (BUN) و کراتینین سرم (Scr) با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون (ایران) اندازه‌گیری شد (۳۸).

ارزیابی ایمونوهیستوشیمی: پس از شکافتن حفره شکمی بافت کلیه به دقت جدا و برای فیکساسیون کلیه‌ها در فرمالین بافر شده با فسفات (۱۰ درصد) نگهداری شدند. سپس مراحل پاساژ بافتی، تهیه بلوک‌های پارافینی، تهیه برش‌های ۳ میکرونی و مرحله رنگ‌آمیزی به روش ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry, IHC) دقیقاً مطابق روش انجام آزمایش که در بروشور کیت توصیه شده بود، رفتار شد و به ترتیب زیر انجام شد. نمونه‌ها را درون

اتوکلاو ۱۰۰ درجه، سپس درون بافر سیترات ۰/۰۲ مولار با $\text{pH} = 6$ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده سپس خارج کرده و درون بافر P.B.S با $\text{pH} = 7.4$ به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم و سپس اطراف نمونه را کاملاً خشک کرده، در مرحله‌ی بعد پروتئین بلاک را به مدت ۵ دقیقه بر روی لام‌ها ریخته و مجدداً در دو ظرف P.B.S آن‌را شستشو داده، بعد از این مرحله ابتدا لام‌ها را از داخل P.B.S برداشته کاملاً خشک می‌کنیم و آنتی‌بادی رقیق شده یک دوم را به مدت یک ساعت اضافه کردیم، سپس لام‌ها را مجدداً در P.B.S قرار می‌دهیم، خشک می‌کنیم و لام‌ها را در P.B.S قرار داده، خشک می‌کنیم و محلول Novolink.polymer به مدت ۳۰ دقیقه اضافه کرده، مجدداً در P.B.S قرار می‌دهیم و لام‌ها را تمیز نموده و بعد DAB را به مدت ۱۰ دقیقه روی سطح نمونه می‌ریزیم. سپس به مدت ۸ دقیقه مستقیماً وارد هماتوکسیلین کردیم و به ترتیب وارد آب جاری، اسید الکل ضعیف، آب جاری، کربنات لیتیم ۱ درصد و آب جاری کردیم. مرحله‌ی آبگیری با الکل‌های صعودی ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ هرکدام به مدت ۲ دقیقه و با گزیل ۱ و ۲ لام‌ها را شفاف نموده و بعد با چسب مونته می‌کنیم.

بررسی میزان واکنش‌پذیری VEGF در نمونه‌ها: اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده و نتایج از طریق میکروسکوپ نوری (Olympus، آلمان) تفسیر شد. بر این اساس، در هر لام به طور تصادفی در زیر میکروسکوپ، ده میدان انتخاب و ۱۰۰ سلول اپیتلیال توبول با بزرگنمایی $\times 400$ محاسبه شد و نسبت هسته‌ای ایمونوراکتیو به‌دست آمد و در انتها درصد هسته‌های رنگ‌گرفته در بین ۱۰۰۰ سلول اپیتلیال مشخص شد. ایمونوراکتیویته زیر ۵ درصد منفی و بالای ۵ درصد مثبت قلمداد گردید. کنترل منفی، رنگ‌آمیزی اسلایدها بدون آنتی‌بادی ثانویه بود. میزان

ایمونو واکنش پذیری هسته‌ای به صورت درصد تعریف شد. به‌طوری‌که، بین ۵ تا ۳۰ درصد = ۱، ۳۰ تا ۶۵ درصد = ۲ و بالای ۶۵ درصد = ۳ ارزیابی شد (۳۹، ۴۰).

تجزیه و تحلیل آماری: از نرم‌افزار SPSS ۲۱، آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و تست تعقیبی Tukey استفاده شد. اختلاف در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سطح کراتینین و اوره سرم افزایش معنی‌داری ($p < 0.001$) در موش‌های کنترل I/R در مقایسه با کنترل سالم نشان داد. تیمار نانو اکسید منیزیم در دوزهای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم باعث کاهش معنی‌دار ($p < 0.001$) در غلظت‌های کراتینین و اوره در موش‌های I/R نسبت به موش‌های کنترل I/R شد. تیمار نانو اکسید منیزیم (۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) تغییری در غلظت کراتینین و اوره سرم در موش‌های سالم ایجاد نکرد (جدول ۱). نتایج حاصل از تکنیک ایمونوهیستوشیمی در مورد تغییرات بیان ژن VEGF در بافت کلیه نشان داد که در گروه کنترل سالم، گروه شاهد جراحی،

گروه‌های سالم تجربی دریافت‌کننده نانو MgO با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، ساختار کلیوی طبیعی همراه با گلومرول‌های طبیعی است و بیان خفیف VEGF در گلومرول‌ها و لوله‌های کلیوی مشاهده گردید. در صورتی‌که موش‌های صحرایی گروه کنترل ایسکمی/ریپرفیوژن با بیان شدید VEGF در لوله‌های کلیوی مشاهده شدند، همچنین گروه‌های تجربی I/R دریافت‌کننده نانو MgO با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، بیان متوسط تا خفیف VEGF را در لوله‌های کلیوی نشان دادند (شکل ۱). در بررسی میزان ایمونو واکنش پذیری هسته‌ای به صورت درصد نیز شدت بروز نشانگر VEGF در گروه‌های کنترل سالم و سالم تجربی دریافت‌کننده نانو MgO با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم VEGF امتیاز ۱ درصد (بیان خفیف) را دریافت کردند. در صورتی‌که گروه کنترل I/R امتیاز ۳ درصدی (بیان شدید VEGF) و گروه‌های تجربی I/R دریافت‌کننده نانو MgO با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم امتیاز ۲ درصدی (بیان متوسط تا خفیف VEGF) را نشان دادند (جدول ۲).

جدول ۱- اثر نانو اکسید منیزیم بر سطوح اوره و کراتینین سرمی در موش‌های سالم و I/R

Table 1. Effect of nano-MgO on levels of Serum Urea and Creatinine in normal and I/R rats

Group	Urea (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Normal Control	14.83 ± 0.48	0.67 ± 0.17
Sham-operated	14.48 ± 0.52	0.68 ± 0.02
Normal Experimental + Nano-MgO (mg/kg)		
1.25	14.50 ± 0.43	0.68 ± 0.01
2.5	14.50 ± 0.56	0.69 ± 0.01
5	15.33 ± 0.42	0.70 ± 0.01
I/R Control	70.83 ± 2.33 ***	2.91 ± 0.05 ***
I/R Experimental + Nano-MgO (mg/kg)		
1.25	68.01 ± 1.29 ***	2.68 ± 0.91 ***
2.5	62.33 ± 1.54 ***+++	2.52 ± 0.91 ***+++
5	46.50 ± 1.18 ***+++	1.83 ± 0.63 ***+++

مقادیر بعنوان میانگین ± انحراف معیار برای شش موش بیان می‌شوند. *** $p < 0.001$ اختلاف معنی‌دار از گروه کنترل سالم و +++ $p < 0.001$

$p < 0.001$ اختلاف معنی‌دار از گروه کنترل I/R

Values are expressed as mean ± SEM for six rats. *** $p < 0.001$ significantly different from the normal control group and +++ $P < 0.001$ significantly different from the I/R control group.

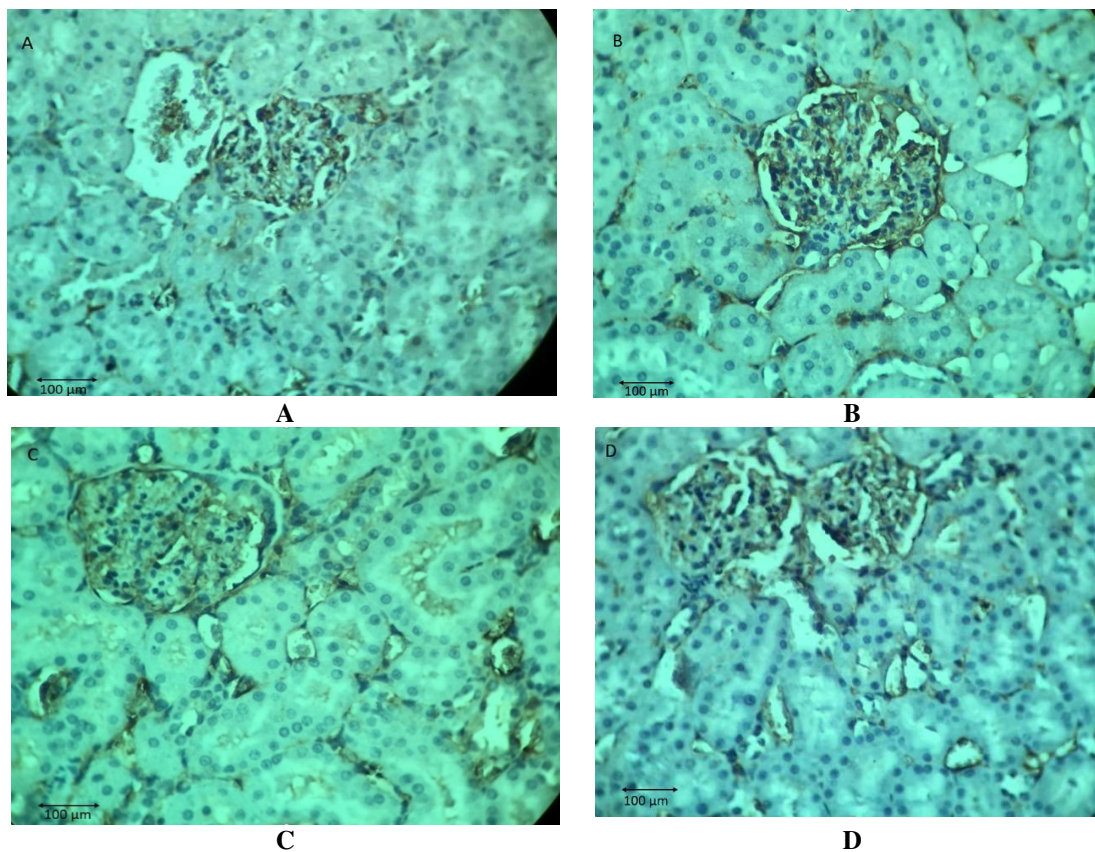
جدول ۲- اثر نانو MgO بر میزان ایمونواکنش‌پذیری هسته‌ای VEGF در بافت کلیه موش‌های صحرایی سالم و I/R

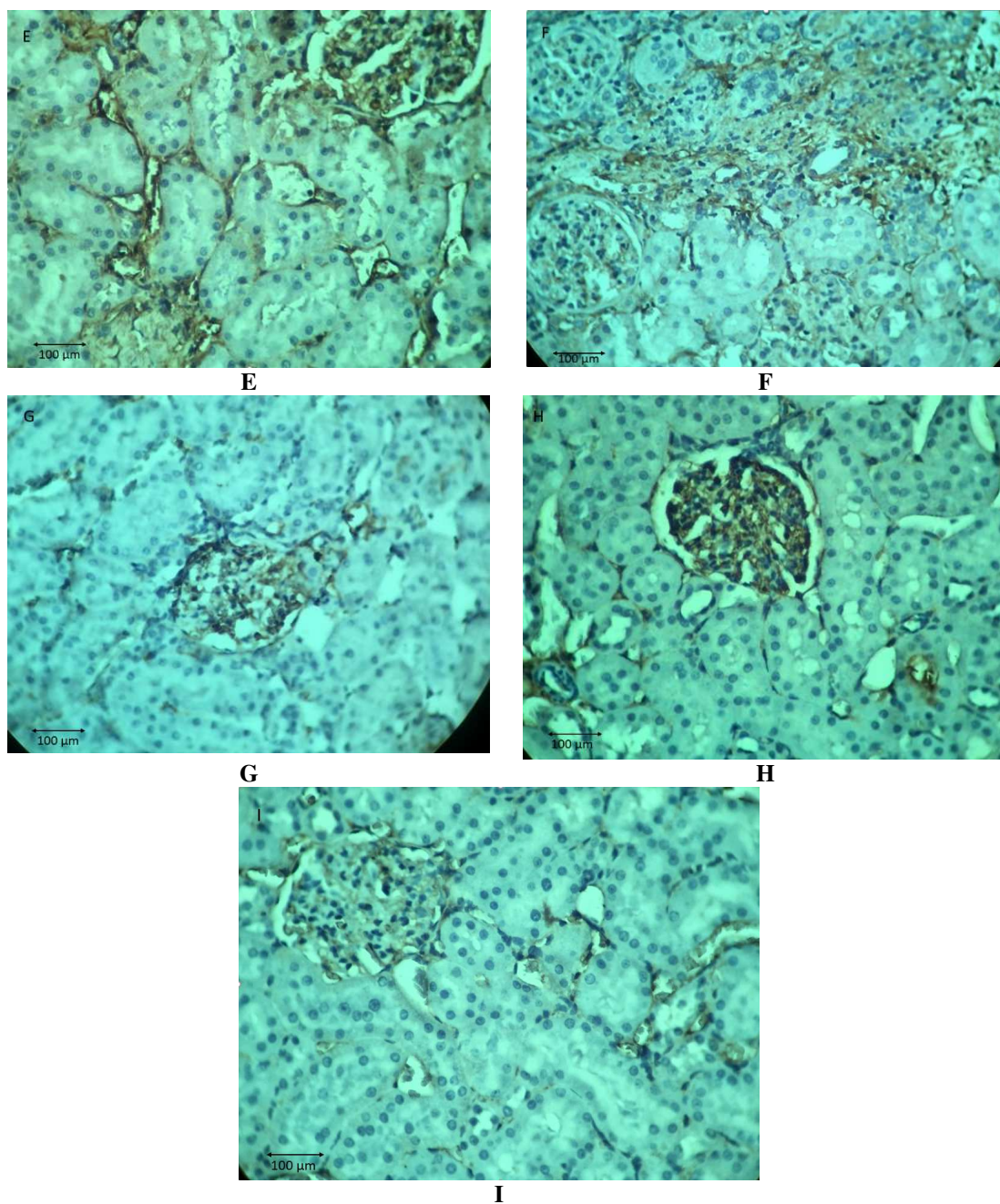
Table 2. Effect of nano-MgO on VEGF expression levels in normal and I/R rats

Group	VEGF Expression rate
Normal Control	1.0 ± 0.00
Sham-operated	1.0 ± 0.00
Normal Experimental + Nano-MgO (mg/kg)	
1.25	1 ± 0
2.5	1 ± 0
5	1 ± 0
I/R Control	3 ± 0.2 ***
I/R Experimental + Nano-MgO (mg/kg)	
1.25	2.6 ± 0.2 ***
2.5	1.8 ± 0.4 **+++
5	1.4 ± 0.3 +++

مقادیر به عنوان میانگین $\pm$ انحراف معیار برای شش موش بیان می‌شوند. $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.001$ +++ اختلاف معنی‌دار از گروه کنترل نرمال و ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ اختلاف معنی‌دار از گروه کنترل I/R.

Values are expressed as mean $\pm$ SEM for six rats. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significantly different from the normal control group and ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ significantly different from the I/R control group.





شکل ۱. بیان VEGF در بافت کلیه در تمام گروه‌های مختلف مطالعه. A: گروه کنترل سالم، B: گروه شاهد جراحی، C-E: گروه‌های سالم تجربی دریافت‌کننده نانو MgO (۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) با ساختار کلیوی طبیعی با گلومرول‌های طبیعی و بیان خفیف VEGF در گلومرول‌ها و لوله‌های کلیوی؛ F: موش‌های صحرایی کنترل ایسکمی/ریپرفیوژن (I/R) با بیان شدید VEGF لوله‌های کلیوی، G-I: گروه‌های تجربی I/R دریافت‌کننده نانو MgO (۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) با بیان متوسط تا خفیف VEGF در لوله‌های کلیوی (IHC) با بزرگنمایی ۴۰۰×

Fig. 1. VEGF expression in renal tissue in all experimental groups. A, normal control group; B sham-operated group; C-E experimental normal groups receiving nano-MgO (1.25, 2.5, and 5 mg/kg) with normal renal structure with normal glomeruli and mild expression of VEGF in glomeruli and renal tubules; F, ischemia/reperfusion (I/R) control rats with a severe expression of VEGF in renal tubules; G-I experimental I/R groups receiving nano-MgO (1.25, 2.5, and 5 mg/kg) with moderate to a mild expression of VEGF in renal tubules (IHC).400x

بحث

آسیب ایسکمیک رپرفیوژن کلیه یک فرآیند پاتوفیزیولوژیک پیچیده است (۴۱، ۴۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ۲۰ دقیقه ایسکمی و به دنبال آن، بازخونسازی موجب اختلال در عملکرد کلیوی می‌شود. تیمار خوراکی نانوآکسیدمنیزیم موش‌های صحرایی به مدت ۳۰ روز می‌تواند فعالیت کلیوی را بهبود بخشد. میزان کراتینین و اوره در سرم گروه کنترل ایسکمیک رپرفیوژن به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل سالم بود که نشان‌دهنده نوعی آسیب به کلیه و تغییر عملکرد کلیه است. از طرف دیگر تیمار نانوآکسیدمنیزیم توانست کاهش معنی‌داری ($p < 0/001$) در میزان اوره و کراتینین سرم ایجاد کند. اوره آخرین محصول ایجاد شده از متابولیسم اسیدهای آمینه و کاهش پروتئین‌ها است و افزایش مقدار کراتینین در پلاسما گویای کاهش تصفیه گلومرولی و اختلال در عملکرد کلیه است (۴۳) و شاخص‌های شناخته شده‌ای برای نظارت بر عملکرد کلیه (۴۴) و عملکرد صحیح مویرگ‌های گلومرولی و آسیب‌های کپسول بومن هستند (۴۵). نانوآکسیدمنیزیم به‌صورت معنی‌داری سطح کراتینین و اوره را در موش‌های I/R نسبت به موش‌های کنترل I/R کاهش می‌دهد که احتمالاً به دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی و تعدیل سیستم‌ایمنی است (۴۶). در پژوهش پاندير و همکاران (۲۰۱۳) نیز سطوح اوره و کراتینین سرم در موش‌های صحرایی با مدل ایسکمیک ۴۰ دقیقه‌ای، افزایش معنی‌داری ($p < 0/005$) ایجاد کرده است (۴۷). همان‌گونه که در مطالعه‌ی شی و همکاران (۲۰۱۰) نیز I/R در کلیه منجر به بالا رفتن غلظت‌های پلاسمایی کراتینین و اوره نسبت به گروه شاهد گردیده بود (۴۸). مکانیسم‌های نهفته در I/R کلیه‌ها احتمالاً چند فاکتوری و وابسته به یکدیگرند و شامل هیپوکسی، آسیب استرس‌اکسیداتیو و پاسخ‌های التهابی

می‌باشند (۴۹). در پژوهش حاضر در گروه‌های I/R نیز با القاء آپوپتوز و آسیب به بافت کلیه، افزایش فاکتورهای بیوشیمیایی کلیه مانند کراتینین و اوره سرم مشاهده شد. استرس‌اکسیداتیو سبب آسیب گلومرولی شده و افزایش اوره و کراتینین به دنبال القای I/R نشان‌دهنده ایجاد آسیب گلومرولی است (۵۰). ایسکمیک رپرفیوژن باعث افزایش سطح اوره خون می‌شود که به دلیل افزایش کاتابولیسم پروتئین و خروج گروه آمین از اسیدهای آمینه ایجاد می‌شود. تجزیه پورین‌ها یا ناتوانی کلیه در از بین بردن آن‌ها هر دو به افزایش اسید اوریک کمک می‌کنند. فیلتراسیون غیرطبیعی ذرات توسط کلیه با افزایش کراتینین در سرم خون مرتبط است (۵۱) و MgO توانسته به‌صورت موفق در کاهش میزان اوره و کراتینین سرم در گروه‌های تجربی ایسکمیک دریافت‌کننده دوزهای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت معنی‌دار ($p < 0/001$) عمل کند. این نتایج با آنچه توسط نات در سال ۲۰۰۰ گزارش شده بود مطابقت داشت که نشان داد پیش‌درمانی با استفاده از منیزیم منجر به کاهش قابل‌توجهی در عملکرد کلیوی حیوانات آزمایشگاهی می‌شود و باعث ایجاد برخی تغییرات در کراتینین و کلیرانس کراتینین سرم می‌شود (۵۲). همچنین با آنچه توسط ژائو و همکارانش (۲۰۱۷) یافت شد، که تأیید کرد منیزیم با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور قابل‌توجهی I/R را مهار می‌کند. سطوح BUN و Cr ناشی از القای I/R را در موش I/R مجدداً بهبود می‌بخشد، مطابقت دارد. (۵۳). به دلیل نقش کلیدی رگ‌زایی در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک، کنترل این پدیده در روش‌های درمانی بسیار حائز اهمیت است. رگ‌زایی پاتولوژیک در رشد تومور، متاستاز، بیماری‌های ایسکمیک، رتیئوپاتی دیابتی، دژنراسیون ماکولا، آرتریت روماتوئید و

پسوریازیس رخ می‌دهد (۲۶، ۵۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که گروه‌های کنترل سالم، شاهد جراحی و سالم تجربی دریافت‌کننده نانو MgO با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، بیان خفیف VEGF در گلو مریول‌ها و لوله‌های کلیوی را نشان دادند در حالی که گروه‌های تجربی ایسکمی دریافت‌کننده نانو MgO به ترتیب در دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، بیان متوسط تا خفیف VEGF در لوله‌های کلیوی را نشان دادند و باعث بهبود عملکرد کلیوی گردید ولی در گروه کنترل ایسکمی، بیان شدید VEGF در بافت کلیه مشاهده گردید. فاکتورهای رشد متعددی در القاء پدیده رگ‌زایی نقش ایفا می‌کنند که مهمترین و کلیدی‌ترین آن‌ها VEGF است (۳۰). بیان این پروتئین همودایمر در تمامی شرایط پاتولوژیک نام‌برده به شدت افزایش می‌یابد (۵۴). با توجه به نقش اساسی VEGF به عنوان حیاتی‌ترین فاکتور دخیل در پدیده رگ‌زایی، این مولکول در زمره اهداف درمانی کلیدی قرار گرفته و مطالعات بسیاری در زمینه مهار آن انجام شده است. برخی مطالعات نشان دادند که VEGF در افراد I/R در مقایسه با افراد سالم بالاتر بود و I/R با افزایش سطوح VEGF بدون توجه به عوامل مخدوش‌کننده، مرتبط بود که به دلیل هیپوکسی رخ داده در ایسکمی، توجیه‌پذیر است (۵۵، ۵۶). سطح بیان بالای VEGF را می‌توان با هیپوکسی از طریق فاکتور القا کننده هیپوکسی توجیه کرد (۵۷). بنابراین، VEGF ممکن است نقش مهمی در تشدید I/R حاد کلیه، ارتقاء تکثیر سلولی و ژئوژنز داشته باشد و این مکانیسم‌ها را می‌توان به ورود به سلول‌های آسیب دیده و اثرات پاراکرین VEGF نسبت داد (۵۸، ۵۹، ۶۰، ۶۱). VEGF به عنوان یک میتوژن مهم رگ‌زایی، می‌تواند رگ‌زایی را تحریک کرده و تراکم مویرگی بافت را بهبود بخشد (۶۲). هیپوکسی عمده بیان VEGF را

تنظیم می‌کند. Rajnoch و همکاران (۲۰۰۵) یک واگرایی در بیان mRNA VEGF و پروتئین VEGF پس از ایسکمی نشان دادند (۶۳). نتایج مطالعه‌ی Zhou و همکاران در سال ۲۰۲۴ نشان داد که KIT-PR1P/VEGF می‌تواند به طور خاص کلیه ایسکمیک را هدف قرار دهد و VEGF بیشتری را در بافت کلیه پس از I/R ذخیره کند. علاوه بر این، رگ‌زایی را بشدت افزایش داد (۶۴). نتایج این مطالعه نشان داد که گروه کنترل ایسکمی، VEGF بسیار بیشتری را در بافت کلیه پس از I/R بیان می‌کند. بنابراین VEGF ممکن است نقش مهمی در تشدید I/R حاد کلیه در گروه کنترل ایسکمی داشته باشد، که احتمالاً به دلیل هیپوکسی ایجاد شده در ایسکمی رخ داده است. سپس اثر حفاظتی نانواکسید منیزیم بر کلیه ایسکمیک به روش ایمونوهیستوشیمی بررسی گردید و گروه‌های تجربی ایسکمی دریافت‌کننده نانو MgO به ترتیب در دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، بیان متوسط تا خفیف VEGF در لوله‌های کلیوی را نشان دادند و باعث بهبود عملکرد کلیوی گردید که احتمالاً نانواکسید منیزیم توانسته است به طور مؤثر عمل کند.

نتیجه‌گیری

نانواکسید منیزیم به صورت معنی‌داری اختلال عملکرد کلیه را از طریق کاهش سطوح اوره و کراتینین سرم و میزان بیان VEGF در گروه‌های درمان شده ایسکمی پرفیوژن مجدد کلیه چپ، بهبود می‌بخشد. بنابراین، نانو MgO به عنوان یک عامل محافظ قوی در پاسخ به آسیب‌های I/R کلیوی در موش‌ها احتمالاً عمل می‌کند و می‌تواند عملکرد کلیه را در برابر I/R محافظت نماید.

منابع

1. Neuwelt EA, Hamilton BE, Varallyay CG, Rooney WR, Edelman RD, Jacobs PM,

- Physiol. Renal Physiol. 2017;313(2):339-350.
9. Kumaran RS, Choi YK, Singh V, Song HJ, Song KG, Kim KJ, Kim HJ. In vitro cytotoxic evaluation of MgO nanoparticles and their effect on the expression of ROS genes. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(4):7551-7564.
10. Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *J. Inorg. Biochem.* 2009;130(1):41-50.
11. Jahangiri L, Kesmati M, Najafzadeh H. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory effect of nanoparticles of magnesium oxide in mice with and without ketamine. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2013;17(20):2706-2710.
12. Kellum JA, Unruh M.L, Murugan R. Acute kidney injury. *BMJ clinical evidence*, Published online 2011 Mar 28.
13. Jin T, He Y. Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens. *J. Nanopart. Res.* 2011;13(12):6877-6885.
14. Revell PA. The biological effects of nanoparticles. *Nanotechnol. Percept.* 2006; 2(1):283-298.
15. Sinha MK. Role of 'Ischemia-modified albumin', a new biochemical marker of myocardial ischemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg. Med.* 2004; 21(1):29-34.
16. Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney int.* 1993;43(5): 1160-1178.
17. Padanilam BJ. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003;284(4):608-627.
18. Vetterlein F, Bludau J, Petho-Schramm A, Schmidt G. Reconstruction of blood flow distribution in the rat kidney during postischemic renal failure. *Nephron.* 1994;66(2):208-214.
- Watnick SG. Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF)?. *Kidney Int.* 2009;75(5): 465-474.
2. Brede CH, Labhasetwar V. Applications of Nanoparticles in the Detection and Treatment of Kidney Diseases. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2013;20(6):454-465.
3. Badawy MM, Sayed-Ahmed MZ, Almoshari Y, Alqahtani SS, Alshahrani S, Mabrouk HAA, Abd-Elsalam MM, Alkashif K, Ahmad S, El-Sebaey AM, Hamama MG, Moustafa Ahmed DA. Magnesium Supplementation Alleviates the Toxic Effects of Silica Nanoparticles on the Kidneys, Liver, and Adrenal Glands in Rats. *Toxics.* 2023;11(4):381.
4. Vask A, Titma T, Visnapuu M, Vija H, Kakinen A, Sihtmae M, Pokhrel S, Madler L, Heinlaan M, Kisand V, Shimmo R, Kahru A. Toxicity of 11 Metal Oxide Nanoparticles to Three Mammalian Cell Types In Vitro. *Curr. Top. Med. Chem.* 2015;15(18):1914-1929.
5. Kim BS, Goligorsky MS. Role of VEGF in kidney development, microvascular maintenance and pathophysiology of renal disease. *Korean J Intern Med.* 2003;18(2): 65-75.
6. Vidic J, Stankic S, Haque F, Ciric D, Goffic RL, Vidy A, Jupille J, Delmas B. Selective antibacterial effects of mixed ZnMgO nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* 2013;15(5): 1595–1604.
7. Hajimiresmaiel J, Davoodi H, Namazi N, Javedan GH, Pazoki-Toroudi H, Ajami M. Effect of omega 3 fatty acids on oxidative stress in acute renal failure induced by ischemia reperfusion. *Iran J Nutr Sci Food Technol.* 2014;8(4): 155-162. [In Persian]
8. Kumar G, Solanki MH, Xue X, Mintz R, Madankumar S, Chatterjee PK, Metz CN. Magnesium improves cisplatin-mediated tumor killing while protecting against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Am. J.*

- clinical studies. *Cell Tissue Res.* 2009;335(1):261-269.
28. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *The oncologist.* 2004;9(1):2-10.
29. Costache MI, Ioana M, Iordache S, Ene D, Costache CA, Săftoiu A. VEGF expression in pancreatic cancer and other malignancies: a review of the literature. *Rom. J. Intern. Med.* 2015;53(3):199-208.
30. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer.* 2002;2(10):795-803.
31. Ivy SP, Wick JY, Kaufman BM. An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2009;6(10):569-579.
32. Liu Y, Guo Y, Wang Z, Nie W. Effects of source and level of magnesium on catalase activity and its gene expression in livers of broiler chickens. *Arch. Anim. Nutr.* 2007;61(4):292-300.
33. Wei CC, Wu K, Gao Y, Zhang LH, Li DD, Luo Z. Magnesium Reduces Hepatic Lipid Accumulation in Yellow Catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) and Modulates Lipogenesis and Lipolysis via PPARA, JAK-STAT, and AMPK Pathways in Hepatocytes. *J. Nutr.* 2017;47(6):1070-1078.
34. Asghari A, Jamshidi N, Neshat M.. Serologic evaluation of the effect of administration of magnesium sulfate on the subsequent renal function Induction of reperfusion ischemia in rats. *Comparative Pathobiology. Sci. Res. J.* 2016;13(1):1805-1812.
35. Chien CH, Lee P, Chen CH, Ma M, Lai M, Hsu S. De Novo Demonstration and Co-localization of Free-Radical Production and Apoptosis Formation in Rat Kidney Subjected to Ischemia/Reperfusion. *ASN and JASN.* 2001;12(5):973-982.
36. Kesmati M, Konani M, Torabi M, Khajepour L. Magnesium oxide nanoparticles reduce anxiety induced by
19. Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D, Ince C. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Mol. Med.* 2008;14(7-8):502-516.
20. Onorati F, Rubino AS, Nucera S, Foti D, Sica V, Santini F, Gulletta E, Renzulli A. Off-pump coronary artery bypass surgery versus standard linear or pulsatile cardiopulmonary bypass: endothelial activation and inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010;37(4):897-904.
21. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and prevention of ischemiareperfusion injury. *Anesthesiol. J.* 2001;94(6):1133-1138.
22. Tsutsui H, Sugiura T, Hayashi K, Ohkita M, Takaoka M, Yukimura T, Matsumura Y. Moxonidine prevents ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2009;603(1-3):73-78.
23. Dzietko M, Derugin N, Wendland MF, Vexler ZS, Ferriero D.M. Delayed VEGF treatment enhances angiogenesis and recovery after neonatal focal rodent stroke. *Transl. Stroke Res.* 2013;4(2):189-200.
24. Holzer LA, Cör A, Pfandlsteiner G, Holzer G. Expression of VEGF, its receptors, and HIF-1alpha in Dupuytren's disease. *Acta Orthop.* 2013;84(4):420-425.
25. Ghavamipour F, Shahangian SH, Sajedi R., Arab SH, Mansouri K, Aghamaali MR. Development of a highly-potent anti-angiogenic VEGF8-109 heterodimer by directed blocking of its VEGFR-2 binding site. *FEBS J.* 2014;281(19):4479-4494.
26. Sousa Moreira IP, Alexandrino Fernandes, and M. Joao Ramos, Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition-a critical review. *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.* 2007;7(2):223-245.
27. Crawford Y, Ferrara N. VEGF inhibition: insights from preclinical and

46. Moeini-Nodeh S, Rahimifard M, Baeri M, Abdollahi M. Functional Improvement in Rats' Pancreatic Islets Using Magnesium Oxide Nanoparticles Through Antiapoptotic and Antioxidant Pathways. *Biol Trace Elem Res.* 2017;175(1):146-155.
47. Pundir M, Arora S, Kaur T, Singh Pal R, Singh A. Effect of modulating the allosteric sites of N-methyl-D-aspartate receptors in ischemia-reperfusion induced acute kidney injury. *J Surg Res.* 2013;183(2):668-677.
48. Shi LE, Xing L, Hou B, Ge H, Guo X, Tang ZH. Inorganic nano metal oxides used as antimicroorganism agents for pathogen control, current research. *Technol Edu Topics.* 2010; 2010:361-368.
49. Paller MS. The cell biology of reperfusion injury in the kidney. *J. INVEST MED.* 1994;42(4):632-639.
50. Choi EK, Jung H, Kwak KH, Yi SJ, Lim JA, Park SH, Park JM, Kim S, Jee D, Lim DG. Inhibition of Oxidative Stress in Renal Ischemia- Reperfusion Injury. *Anesth Analg.* 2017;124(1):204-213.
51. Horibata K, Tanoue A, Ito M, Takemura Y. Relationship between renal function and serum magnesium concentration in elderly outpatients treated with magnesium oxide. *Geriatr Gerontol Int.* 2016;16(5):600-605
52. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am. J. Med.* 2000;109(8):65-78.
53. Zhao ZH, Tang ZH, Zhang W, Liu J, Li B. Magnesium isoglycyrrhizinate protects against renal-ischemia-reperfusion injury in a rat model via anti-inflammation, anti-oxidation and anti-apoptosis. *Mol. Med. Rep.* 2017;16(3):3627-3633.
54. Sousa Moreira I, Fernandes PA, Ramos MJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition-a critical review. *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.* 2007; 7(2):223-245.
- morphine withdrawal in adult male mice. *Physiol. Pharmacol.* 2016;20(3):197-205.
37. Mangalampalli B, Dumala N, Perumalla Venkata R, Grove P. Genotoxicity, biochemical, and biodistribution studies of magnesium oxide nano and microparticles in albino wistar rats after 28-day repeated oral exposure. *Environ. Toxicol.* 2018;33(4):396-410.
38. Taheri YA, Neshat M, Garjani A, Doustar NY. Study the effects of metformin on renal function and structure after unilateral ischemia-reperfusion in rat. *Res Pharm Sci.* 2012;7(5):77.
39. Asgari M, Hafezi Ahmadi MR. Value of Immunohistochemistry in Comparison to Immunofluorescence for Detecting Immune Deposits in renal Biopsy. *Iran. J. Med. Sci.* 2007;14(55):141-148. [In Persian]
40. Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry, 5th Edition, Elsevier. 2019.
41. Almond PS, Matas AJ, Gillingham K, Dunn DL, Payne WD, Gores P, Gruessner R, Najarian JS. Predictors of chronic rejection in renal transplant recipients. *Transplant. Proc.* 1993;25(1-2):936.
42. Baker GL, Corry RJ, Autor AP. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. Protective effect of superoxide dismutase. *Ann. Surg.* 1985;202(5):628-641.
43. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests. 3 th ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1995; pp:22-23.
44. Lajer H, Daugaard G. Cisplatin and hypomagnesemia. *Cancer Treat. Rev.* 1999;25(1):47-58.
45. Lippi G, Montagnana M, Guidi GC. Albumin cobalt binding and ischemia modified albumin generation: an endogenous response to ischemia?. *Int. J. Cardiol.* 2006;108(3):410- 411.

- KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circ.* 2003; 107(8):1164-1169.
61. Yu Y, Gao Y, Qin J, Kuang CY, Song MB, Yu SY, Cui B, Chen JF, Huang L. Promotes the differentiation of endothelial progenitor cells and reendothelialization in the early phase after vascular injury. *Basic Res Cardiol.* 2010;105(6):713-724.
62. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989; 246(4935):1306-1309.
63. Rajnoch A, Lodererova A, Szabo, E, Honsova A, Vannay S, Bloudickova I, Viklicky OM. Regulators of angiogenesis in renal Ischemia/Reperfusion Injury in Normotensive and Hypertensive Rats: Effect of Tacrolimus. *Transplant Proc.* 2005;37(1):352-354.
64. Zhou R, Liu H, Hou X, Liu Q, Sun SH, Li W, Cao W, Nie W, Shi CH, Chen W. Bi-functional KIT-PR1P peptides combine with VEGF to protect ischemic kidney in rats by targeting to Kim-1. *Regen. Ther.* 2024;25(1):162-173.
55. Gozal D, Lipton AJ, Jones KL. Circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep.* 2002; 25(1):59-65.
56. Schulz R, Hummel C, Heinemann S, Seeger W, Grimminger F. Serum levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea and severe nighttime hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(1):67-70.
57. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992;359(6398):843-845.
58. Chen L, Wu F, Xia WH, Zhang YY, Xu SY, Cheng F, Liu X, Zhang XY, Wang SM, Tao J. Gene transfer contributes to in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells. *Cardiovasc. Res.* 2010; 88(3):462-470.
59. Kwon O, Miller S, Li N, Khan A, Kadry Z, Uemura T. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells and endothelial cells may contribute to endothelial repair in the kidney immediately after ischemia-reperfusion. *J Histochem Cytochem.* 2010; 58(8):687-694.
60. Rehman J, Li J, Orschell CM, March

Research Article

Hemolymph Biochemical and Immune Indices of Green Tiger Shrimp (*Penaeus semisulcatus*) in a Biofloc Aquaculture System: Influenced By Different Feeding Levels

Mohammad Hossein Khanjani*

Department of Fisheries Sciences and Engineering, Faculty of Natural Resources, University of Jiroft, Jiroft, Kerman, Iran

*Corresponding author: M.h.khanjani@ujiroft.ac.ir

Received: 28 February 2025

Accepted: 20 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1200709

Abstract

The effect of different feeding levels on the biochemical indicators and immunity of green tiger shrimp in a biofloc aquaculture system was investigated. The experiment was conducted for 45 days with shrimps with an average weight of 2.85 g. Rearing tanks was filled with 150 liters of filtered water with a sand filter, and then 53 individual shrimps were stored in each tank. 7 experimental groups were considered for this research, which included three control groups with different feeding levels in terms of body weight, 6% (CW6), 4% (CW4) and 2% of body weight (CW2), and four biofloc treatments of 6% (BFT6), 4% (BFT4), 2% (BFT2) and 0% (BFT0). The results showed that the highest levels of triglyceride (175.0 mg/dl) and cholesterol (142 mg/dl) were observed in the CW2 treatment. The highest amount of glucose (47 mg/dl) was obtained in BFT0 treatment and the lowest amount was 35.66 and 36.35 in BFT6 and BFT4 treatments, which showed a significant difference with other treatments ($p < 0.05$). The highest value of lysozyme activity was obtained in BFT6 and BFT4 treatments (24.6 and 24.3 u/ml/min), respectively, and the lowest value was obtained in BFT0 treatment (15 u/ml/min), which showed a significant difference with other treatments ($p > 0.05$). The highest amount of phenol oxidase activity was the highest in BFT6 (0.74 u/ml) and BFT4 (0.75 u/ml) treatments, and the lowest value was obtained in BFT0 treatment (0.37 u/ml). In general, the results showed that different feed levels affect the biochemical activities and immunity of green tiger shrimp hemolymph. Feeding with food levels of 6 and 4% in biofloc system leads to improvement of lysozyme, total immunoglobulin and phenol oxidase activities in green tiger shrimp.

Keywords: Green tiger shrimp, Biofloc, Immunity, Hemolymph.

مقاله پژوهشی

شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی همولنف میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) در

سیستم آبی‌پروری بیوفلوک: تحت تاثیر سطوح مختلف غذایی

محمدحسین خانجانی*

گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، کرمان، ایران

*مسئول مکاتبات: m.h.khanjani@ujiroft.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۱۰

DOI: 10.60833/ascij.2025.1200709

چکیده

تأثیر سطوح مختلف غذایی بر شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی میگوی ببری سبز در سیستم آبی‌پروری بیوفلوک مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به مدت ۴۵ روز با میگوهای با میانگین وزن ۲/۸۵ گرم انجام شد. مخازن پرورش با ۱۵۰ لیتر آب تصفیه شده با فیلتر شنی پر شدند و سپس تعداد ۵۳ قطعه میگو در هر مخزن ذخیره‌سازی شد. ۷ گروه آزمایشی برای تحقیق حاضر در نظر گرفته شد که شامل سه گروه کنترل با سطوح مختلف غذایی بر حسب درصد وزن بدن، ۶ درصد (CW6)، ۴ درصد (CW4) و ۲ درصد (CW2) و چهار تیمار بیوفلوک ۶ درصد (BFT6)، ۴ درصد (BFT4)، ۲ درصد (BFT2) و ۰ درصد (BFT0) بود. نتایج نشان داد، بالاترین میزان تری‌گلیسرید (۱۷۵/۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) و کلسترول (۱۴۲ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) در تیمار CW2 بدست آمد. بالاترین میزان گلوکز (۴۷ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) در تیمار BFT0 و کمترین مقدار آن ۳۵/۶۶ و ۳۶/۳۵ به ترتیب در تیمارهای BFT6 و BFT4 مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد ($p < 0.05$). بالاترین مقدار فعالیت لیزوزیم در تیمارهای BFT6 و BFT4 به ترتیب ۲۴/۶ و ۲۴/۳ واحد/میلی‌لیتر/دقیقه و کمترین مقدار آن در تیمار BFT0 (۱۵ واحد/میلی‌لیتر/دقیقه) بدست آمد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد ($p < 0.05$). بالاترین میزان فعالیت فنول اکسیداز در تیمارهای BFT6 (۰/۷۴ واحد/میلی‌لیتر) و BFT4 (۰/۷۵ واحد/میلی‌لیتر) بالاترین بود و کمترین مقدار آن در تیمار BFT0 (۰/۳۷ u/ml واحد/میلی‌لیتر) بدست آمد. نتایج نشان داد، سطوح مختلف غذایی بر فعالیت‌های بیوشیمیایی و ایمنی همولنف میگوی ببری سبز تأثیر می‌گذارد. تغذیه با سطوح غذایی ۶ و ۴ درصد در سیستم بیوفلوک منجر به بهبود فعالیت‌های لیزوزیم، ایمونوگلوبولین کل و فنول اکسیداز در میگوی ببری سبز می‌شود.

کلمات کلیدی: میگوی ببری سبز، بیوفلوک، ایمنی، همولنف.

مقدمه

عملکرد رشد مورد استفاده قرار گرفته است، با این حال گسترش پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک گزارش شده است (۱). شیوع بیماری‌ها، کیفیت پست لارو، مدیریت محیط زیست مزرعه پرورش، کیفیت غذا و مدیریت غذادهی از فاکتورهای مهم در تولید

پرورش میگو به صورت متراکم و فوق متراکم در دنیا در حال گسترش است. با توسعه آبی‌پروری میگو، چالش‌های نظیر کاهش کیفیت آب، گسترش عوامل بیماری‌زا و پاتوژن‌ها رخ می‌دهد. در دهه‌های اخیر انواع آنتی‌بیوتیک‌ها جهت مدیریت بیماری‌ها و بهبود

میگو می‌باشد. از فاکتورهای محدود کننده تولید میگو، بیماری‌های باکتریایی و ویروسی، ترکیبات سمی در آب، شرایط آب و هوایی نامساعد، کمبود خوراک مناسب، تجمع مواد آلی و یوتریفیکاسیون می‌باشد (۲، ۳). تکنولوژی بایوفلاک، تکنولوژی جدیدی است که چالش‌های آبی‌پروری سنتی را ندارد. تولید بالاتر، بازیافت پروتئین خوراک، بهبود کیفیت آب و کنترل عوامل بیماری‌زا از ویژگی‌های برجسته این تکنولوژی می‌باشد (۴). همچنین در این سیستم با تنظیم نسبت کربن به نیتروژن، باکتری‌های هتروتروف موجود در آب فعال شده و ترکیبات زائد نیتروژن دار را مصرف کرده و منجر به بهبود کیفیت آب می‌شود. در سال‌های اخیر تکنولوژی بایوفلاک در آبی‌پروری میگو شامل *Peneaus vannamei* (۵)، *Peneaus monodon* (۶)، *Penaeus Fenneropenaeus merguensis* (۷)، *semisulcatus* (۸) به طور گسترده استفاده شده است. میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) از خانواده پنائیده و یکی از گونه‌های مهم و تجاری خلیج فارس و دریای عمان می‌باشد (۹). این گونه تقاضای بازار بالایی در مناطق پراکنش طبیعی دارد و صیادان با صید و خرید و فروش این گونه به کسب درآمد می‌پردازند (۸). در محیط طبیعی رفتار تغذیه‌ای میگوی ببری سبز مطالعه شده و نشان می‌دهد این گونه بیشتر از کرم‌ها، خرچنگ‌ها، نرم‌تنان، روزنه‌داران، کرم‌های پرتار، دیاتومه‌ها، دینوفلاژله‌ها و سخت‌پوستان تغذیه می‌کنند (۹). یک استراتژی خوب تغذیه‌ای در پرورش میگو با کارایی بالای خوراک و تاثیر کمتر بر کیفیت آب منجر به بهبود عملکرد تولید می‌شود (۸). در آبی‌پروری مهم است که اپتیمم سطح غذادهی را بر حسب وزن بدن برای بهبود تولید و سوددهی بهتر محاسبه کنیم. سطوح مختلف غذادهی بر کیفیت آب، عملکرد رشد، فعالیت‌های ایمنی و آنتی‌اکسیدانی آبی‌پرورش یافته تاثیر می‌

گذارد (۱۰). در تولید تجاری میگو، پرورش دهنده سطح غذادهی را بر اساس وزن هفتگی، شرایط محیطی پرورش، آلودگی آب و ضریب تبدیل غذایی خوراک تعیین می‌کند (۱۱). میگوها فاقد سیستم ایمنی خاص و سازگار هستند و با استفاده از مکانیسم‌های ایمنی ذاتی مانند سلولی (فاگوسیتوز) و پاسخ هومورال (پپتید ضد میکروبی و لیزوزیم) به عوامل بیماری‌زا مانند ویروس‌ها و باکتری‌ها پاسخ می‌دهند (۱۲). در آبی‌پروری میگو، کاهش ایمنی و عملکرد آنتی‌اکسیدانی می‌تواند منجر به بدتر شدن مقاومت در برابر بیماری شود که می‌تواند منجر به زیان اقتصادی گسترده به دلیل مرگ‌ومیر انبوه و شیوع بیماری شود (۱۳). بیوفلوک‌ها باکتری‌های مفیدی هستند که با تشکیل جامعه میکروبی روده، ایمنی میگو را تقویت می‌کنند و سیستم ایمنی غیر اختصاصی میگو را تحریک می‌کنند، زیرا سرشار از مواد فعال زیستی از جمله بروموفنول‌ها، فیتواستروها، ویتامین‌ها، گلوکاتایون، قندهای آمینه، کاروتنوئیدها و ترکیبات ضد باکتری هستند (۱۴). سیستم بایوفلاک علاوه بر بهبود کیفیت آب، خوراک مکمل برای آبی‌پرورش یافته در ۲۴ ساعت شبانه روز فراهم می‌کند (۱۵). در مطالعه حاضر تاثیر سطوح مختلف غذادهی بر پارامترهای بیوشیمیایی و ایمنی همولنف میگوی ببری سبز در سیستم بیوفلوک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش، شرایط و جیره‌ها: پست لاروهای میگوی ببری سبز از مرکز تکثیر میگو در جاسک، هرمزگان تهیه و به مدت ۴۵ روز در مرکز تکثیر بندر کلاهی، میناب، هرمزگان در استخرهای ۱۵۰ مترمربعی نگهداری شدند تا به وزن مناسب برای آزمایش رسیدند. آزمایش به مدت ۴۵ روز با میگوهای ببری سبز با میانگین وزن ۲/۸۵ گرم انجام شد. ۲۱ تانک

مدور پلی اتیلن برای این آزمایش در نظر گرفته شد. هر یک از مخازن با ۱۵۰ لیتر آب تصفیه شده با فیلتر شنی پر شدند و سپس تعداد ۵۳ قطعه میگو (تقریباً ۱ گرم در لیتر) در هر تانک ذخیره سازی شد. ۷ گروه آزمایشی برای تحقیق حاضر در نظر گرفته شد که شامل سه گروه کنترل با سطوح مختلف غذایی بر حسب درصد وزن بدن، ۶ درصد (CW6)، ۴ درصد (CW4) و ۲ درصد وزن بدن (CW2) که روزانه ۳۵ تا ۵۰ درصد آب داخل مخزن پرورش با آب تازه با شوری یکسان قبل از غذادهی تعویض می شد. چهار تیمار بایوفلاک ۶ درصد (BFT6)، ۴ درصد (BFT4)، ۲ درصد (BFT2) و درصد ۰ (BFT0) که روزانه ۰/۵ تا ۱ درصد آب داخل مخزن پرورش تعویض می شد (جدول ۱). غذادهی بر حسب درصد وزن بدن به ترتیب ۶، ۴ و ۲ در ابتدای دوره آزمایش در نظر گرفته شد و کاهش میزان غذادهی در هر تیمار در طول دوره پرورش متناسب با افزایش رشد به نسبت یکسان انجام شد (جدول ۱). در تیمارهای بدون تعویض آب، قبل از ذخیره سازی میگو، نیم میلی لیتر فلاک به ازای هر لیتر به عنوان استوک اولیه به مخازن اضافه شد. غذادهی ۳ مرتبه در روز (۸ صبح، ۱۴ عصر، ۲۰ شب) با نسبت های مختلف با جیره حاوی ۳۸ درصد پروتئین انجام شد در تانک های ۲۰۰۰ لیتری ۲۰ روز قبل از شروع آمایش تولید بایوفلاک برای استفاده در تانک های پرورش شروع شد. از ماده کربن دار ملاس (۵۵/۱۸ درصد ماده خشک، ۴۶/۲۵ درصد کربوهیدرات) جهت تنظیم نسبت کربن (۱۵) به نیتروژن (۱) استفاده شد (۱۶).

آنالیز بیوشیمیایی همولنف: در انتهای آزمایش، از همولنف میگوهای پرورش یافته در تیمارهای مختلف نمونه برداری صورت گرفت. در ابتدا بعد از قطع غذادهی به مدت زمان ۲۴ ساعت، از هر تانک بطور تصادفی ۱۰ میگو انتخاب و به مدت ۱۵ دقیقه در

داخل تشت حاوی یخ با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (به منظور جلوگیری از بروز استرس و کاهش تحرک میگوها) قرار داده شد. از یک سرنگ انسولین استریل یک میلی لیتری دارای سر سوزن شماره G26 که درون سرنگ جهت جلوگیری از انعقاد با ۰/۴ میلی لیتر محلول ضد انعقاد آلزور (سدیم سیترات ۲۷ میلی مول، کلرید سدیم ۳۳۶ میلی مول، EDTA ۹ میلی مول، گلوکز ۱۱۵ میلی مول با PH ۷) ریخته شده بود (۱۷) برای تهیه همولنف استفاده شد. همولنف از ناحیه سینوس شکمی (پاهای اول و دوم شنا در کنار طناب عصبی شکمی) جمع آوری شد (۱۲). نوک سوزن سرنگ با زاویه مورب ۴۵ درجه در زیر لایه قشری پوسته به آرامی فرو گردید و از هر میگو (حدود ۰/۳ میلی لیتر) گرفته شد و پس از آن سرنگ های نمونه گیری، تکان داده شد تا همولنف میگو با محلول ضدانعقاد مخلوط گردد. نمونه های همولنف گرفته شده تا مرحله آنالیز نمونه ها، در میکروتیوب های جداگانه و در فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. میکروتیوب های حاوی نمونه پس از انتقال از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد به محل آزمایشگاه با دمای اتاق (۲۷ درجه سانتی‌گراد) عمل یخ‌زدایی صورت گرفت و سپس با کمک دستگاه ورتکس در مدت زمان ۳۰ ثانیه نمونه ها همگن و برای انجام آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت (۱۸و۱۹). برای اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی همولنف، نمونه ها جهت جداسازی پلاسما در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ (در دقیقه) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس مایع بالایی جدا و برای آنالیز پارامترها مورد استفاده قرار گرفت. گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسرید با استفاده از اسپکتوفتومتر به روش رنگ‌سنجی با استفاده از کیت‌های تشخیص تجاری (پارس آزمون، ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ آنالیز گردید. به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) استفاده شد. سپس برای مقایسه میانگین بین تیمارها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) با استفاده از آزمون چنددامنه-ای دانکن (Duncan's multiple range) در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده گردید. از نرم‌افزارهای میکروسافت آفیس (ورد و اکسل، نسخه ۲۰۱۳) برای رسم نمودن نمودارها استفاده شد.

سنجش قرار گرفتند. میزان فعالیت لیزوزیم با روش کدورت‌سنجی و با استفاده از باکتری *Micrococcus lysodeikticus* به عنوان سوبسترا و لیزوزیم سفیده تخم مرغ به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (۲۰). میزان فعالیت فنول اکسیداز با استفاده از روش کدورت‌سنجی، پس از اکسیداسیون سوبسترا L-DOPA (Sigma) تعیین شد (۲۲). میزان ایمنوگلوبولین کل با استفاده از پلی اتیلن گلیکول ۱۲٪ جهت تفریق و ته‌نشست ایمنوگلوبولین از پروتئین کل تعیین شد (۲۳).

جدول ۱- سطوح مختلف غذایی و تیمارهای آزمایش

Table 1. Different feeding levels and experimental treatments

DTD	1-10	11-20	21-30	31-45	WE (daily)	AN
	6				35-50%	CW6
	6				0.5-1%	BFT6
	4				35-50%	CW4
	4				0.5-1%	BFT4
	2				35-50%	CW2
	2				0.5-1%	BFT2
	0 (Biofloc only, 5 to 10 ml/l)				0.5-1%	BFT0

Abbreviation: DTD: different test days, WE: Water exchange, AN: Abbreviated number

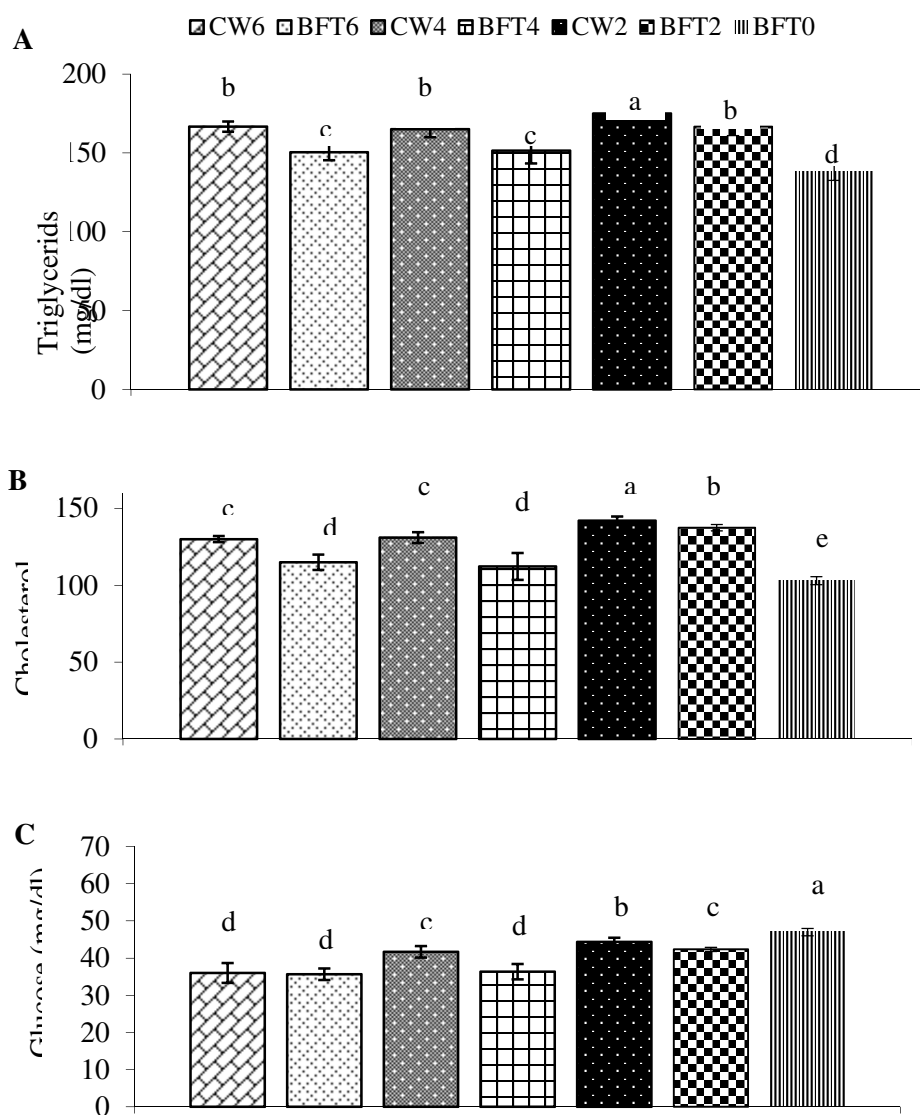
نتایج

تیمارهای BFT4 و BFT6 بدست آمد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد ($p < 0.05$) (شکل ۱، C). بطور کلی نتایج بیوشیمیایی همولنف میگوی ببری سبز نشان داد که در سیستم بیوفلوک مقادیر تری‌گلیسرید و کلسترول نسبت به گروه‌های کنترل کاهش می‌یابد. تغذیه بدون جیره تجاری در سیستم بیوفلوک منجر به افزایش مقادیر گلوکز در میگوی ببری سبز می‌شود. نتایج بدست آمده از فعالیت‌های ایمنی، همولنف میگوی ببری سبز در شکل ۲ ارائه شده است. طبق نتایج بالاترین مقدار فعالیت لیزوزیم در تیمارهای BFT4 و BFT6 به ترتیب ۲۴/۶ و ۲۴/۳ واحد/میلی‌لیتر/دقیقه و کمترین مقدار آن در تیمار BFT0 (۱۵ واحد/میلی‌لیتر/دقیقه) بدست آمد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها

نتایج حاصل از مقادیر پارامترهای مختلف بیوشیمیایی همولنف میگوی ببری سبز در شکل ۱ ارائه شده است. طبق نتایج بالاترین میزان تری‌گلیسرید (۱۷۵/۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) در تیمار CW2 (گروه کنترل، تغذیه با ۲ درصد وزن بدن) مشاهده شد و کمترین مقادیر آن (۱۳۸/۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) در تیمار BFT0 (تغذیه بدون جیره تجاری، در سیستم بیوفلوک) بدست آمد، که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد ($p < 0.05$) (شکل ۱، A). بالاترین میزان کلسترول (۱۴۲ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) در تیمار CW2 و کمترین مقدار آن (۱۰۳ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) در تیمار BFT0 مشاهده شد (شکل ۱، B). بالاترین میزان گلوکز (۴۷ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) در تیمار BFT0 و کمترین مقدار آن ۳۵/۶۶ و ۳۶/۳۵ به ترتیب در

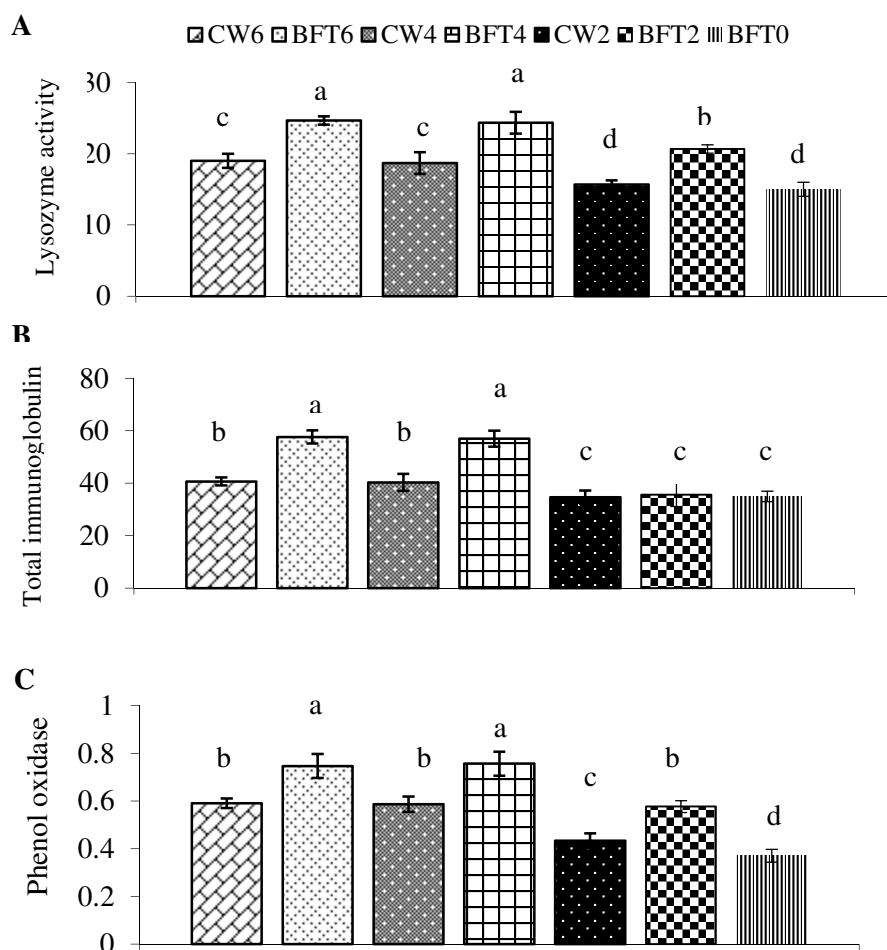
(شکل ۲، C). بطور کلی نتایج فعالیت‌های ایمنی همولنف نشان داد که تغذیه با سطوح غذایی ۶ و ۴ درصد در سیستم بیوفلوک منجر به بهبود فعالیت‌های لیروزیم، ایمنوگلوبولین کل و فنول اکسیداز در میگوی ببری سبز می‌شود که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها دارد.

نشان داد ($p < 0.05$) (شکل ۲، A). بالاترین میزان ایمنوگلوبولین کل در تیمارهای BFT6 و BFT4 به ترتیب ۵۷/۶ و ۵۷ میلی‌گرم/میلی‌لیتر مشاهده شد (شکل ۲، B)، همچنین فعالیت فنول اکسیداز در در تیمارهای BFT6 (۰/۷۴ واحد/میلی‌لیتر) و BFT4 (۰/۷۵ واحد/میلی‌لیتر) بالاترین بود و کمترین مقدار آن در تیمار BFT0 (۰/۳۷ واحد/میلی‌لیتر) بدست آمد



شکل ۱- تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی همولنف میگوی ببری سبز تحت تاثیر تیمارهای مختلف در سیستم آبی‌پروری بیوفلوک

Fig. 1. Changes in hemolymph biochemical indices of green tiger shrimp under the influence of different treatments in a biofloc aquaculture system



شکل ۲- تغییرات شاخص‌های ایمنی همولنف میگوی ببری سبز تحت تاثیر تیمارهای مختلف در سیستم آبی‌پروری بیوفلوک

Fig. 2. Changes in hemolymph immunity indices of green tiger shrimp under the influence of different treatments in a biofloc aquaculture system

بحث

محیطی با کمبود خوراک، استرس زیادی به میگو وارد می‌کند و باعث کاهش میزان تری‌گلیسرید همولنف می‌گردد. کلسترول موجود در میگو جزئی از غشای سلولی و ساختارهای درون سلولی است و به عنوان پیش‌ساز هورمون‌های استروئیدی و هورمون‌های پوست‌اندازی مانند اکدیسون (Ecdysone) عمل می‌کند. غلظت کلسترول شاخصی برای ارزیابی سطح متابولیسم لیپید (کاتابولیسم و اکسیداسیون) در میگو است، زیرا لیپیدها توسط همولنف منتقل می‌شوند (۲۶). در مطالعه Martinez-Porchas و همکاران (۲۰۲۰) کاهش قابل توجهی در کلسترول همولنف

در مطالعه حاضر کمترین میزان تری‌گلیسرید همولنف در تیمار BFT0 (بدون تغذیه با جیره غذایی) مشاهده گردید (شکل ۱، A). در مطالعه Guemez-Sorhouet و همکاران (۲۰۱۹) مقدار تری‌گلیسرید همولنف در تیمارهای بیوفلوک با گروه‌های کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد، در تیمارهای بیوفلوک مقدار تری‌گلیسرید ۳۶/۱، ۳۶/۶ و ۳۲/۸ میلی‌گرم/دسی‌لیتر به ترتیب در تراکم‌های ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ پست لارو بر متر مکعب مشاهده شد (۲۴). با افزایش میزان استرس، سطح تری‌گلیسرید همولنف میگوی سفید غربی کاهش می‌یابد (۲۵). میگوی ببری سبز در

همکاران (۲۰۱۷) مشخص شد، منابع مختلف کربن و سطوح مختلف پروتئین در سیستم بیوفلوک بر مقادیر گلوکز در همولنف میگوی سفید غربی تاثیر می‌گذارد، حضور بیوفلوک منجر به افزایش سطح گلوکز در سرم میگوی سفید غربی نسبت به گروه‌های کنترل می‌شود (۶). در مطالعه حاضر تغذیه بدون جیره تجاری منجر به افزایش سطح گلوکز همولنف میگوی ببری سبز شد (شکل ۱، C)، که احتمالاً نشان‌دهنده این است که میگو تحت استرس غذایی قرار گرفته است. سیستم ایمنی در عملکردهای فیزیولوژیکی برای حفظ سلامت و دستیابی به رشد بالا در آبی‌پروری میگو در برابر تنش‌های مختلف مانند تغییرات محیطی/آلودگی و عوامل بیماری‌زا ضروری است (۳۲). مهره داران از فعالیت لیزوزیم به عنوان یک مکانیسم دفاعی استفاده می‌کنند. لیزوزیم نقش مهمی در ایمنی ذاتی ایفا می‌کند و فاگوسیتوز را تحریک می‌کند. لیزوزیم به دلیل توانایی آن در برهم زدن دیواره سلولی پاتوژن، یک آنتاگونیست طبیعی برای انگل‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها است (۴). در مطالعه حاضر بالاترین میزان فعالیت لیزوزیم در تیمارهای BFT4 و BFT6 بدست آمد (شکل ۲، A) که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد. در مطالعه Long و همکاران (۲۰۲۳)، در سیستم بیوفلوک در شوری‌های ۵-۱۵ درصد مقدار لیزوزیم همولنف میگوی سفید غربی ۰/۹۵ - ۰/۷۵ واحد/میلی‌لیتر گزارش شد (۳۳). سیستم‌های آبی‌پروری مبتنی بر بیوفلوک می‌توانند فعالیت لیزوزیم را در گونه‌های آبی‌پرورش‌یافته افزایش دهند (۳۳، ۳۴، ۳۵، ۳۶). در مطالعه حاضر بالاترین مقدار ایمونوگلوبولین کل در تیمارهای BFT6 (۵۷/۶) و BFT4 (۵۷/۰) میلی‌گرم/میلی‌لیتر مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد (شکل ۲، B). در مطالعه Lee و همکاران (۲۰۱۷)، ایمونوگلوبولین کل در همولنف میگوی سفید غربی

میگوی سفید غربی با بیوفلوک گزارش شد (۲۷)، درحالی‌که Hussain و همکاران (۲۰۲۱) افزایش قابل توجهی در همولنف میگوی سفید غربی با بیوفلوک گزارش کردند (۲۸). در مطالعه حاضر، کمترین میزان کلسترول در تیمار بدون تغذیه با جیره تجاری مشاهده شد (شکل ۱، B)، که نشان دهنده این است تغذیه فقط با بیوفلوک منجر به افزایش کلسترول همولنف نمی‌شود. میگو و باکتری نمی‌توانند کلسترول جدید را سنتز کنند، در حالی که برخی از جلبک‌ها می‌توانند مقداری استرول (دموسترول) تولید کنند، درحالی‌که باکتری‌ها هوپانوئیدها (hopanoids) را به عنوان آنالوگ‌های عملکردی کلسترول سنتز می‌کنند (۲۹). در مطالعه حاضر میزان کلسترول در تیمارهای بیوفلوک کمتر از گروه‌های کنترل مشاهده شد (شکل ۱) که با نتایج محققین دیگر مطابقت دارد (۲۷). در مطالعه Martinez-Porchas و همکاران (۲۰۲۰) مقدار کلسترول در همولنف میگوی سفید غربی در گروه کنترل (۱۱۹/۷) بیشتر از تیمارهای بیوفلوک هتروترفیک (۴۸/۶) و فتواتوتروفیک (۲۹/۳) میلی-گرم/دسی‌لیتر) بدست آمد (۲۷). میگو تحت شرایط تنش‌زا جهت تامین انرژی از کلسترول و تری‌گلیسرید استفاده می‌کند (۳۰)، بنابراین علت کاهش سطح کلسترول و تری‌گلیسرید همولنف در تیمار BFT0 (بدون تغذیه با جیره غذایی) قابل توجیه می‌باشد. گلوکز از طریق فرآیند گلیکولیز به پلازما می‌رسد، که عمدتاً در هپاتوپانکراس، ماهیچه‌ها و سلول‌های خونی اتفاق می‌افتد، تغییرات گلوکز در همولنف میگو زمانی مشاهده می‌شود که میگو تحت استرس قرار می‌گیرند (۳۱). در بسیاری از مطالعات، محیط بیوفلوک تحت شرایط مختلف هیچ تغییر قابل توجهی در گلوکز میگو نشان نداد، اما در برخی شرایط افزایش یا کاهش قابل توجهی نیز مشاهده شد (۶، ۲۴، ۲۷). در مطالعه Kumar و

۳۱/۲، ۴۴/۹، ۳۰/۶، ۳۸/۱، ۳۹/۶، ۴۳/۶ و ۳۷/۴ میلی- گرم/میلی‌لیتر به ترتیب در گروه کنترل و گروه‌های بیوفلوک جایگزین شده در جیره تجاری (۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۶ و ۸ درصد) گزارش شد، که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (۳۷). در سیستم بیوفلوک فعالیت ایمنوگلوبولین همولنف افزایش می‌یابد. مطالعات نشان داده جوامع میکروبی حاوی ترکیبات زیست‌فعال (از قبیل پلی‌ساکاریدها و کاروتنوئیدها) در بیوفلوک وجود دارند، زمانی که میگو بطور پیوسته از آنها تغذیه می‌کند منجر به تحریک ایمنی میگو می‌گردد (۳۸). فنول‌اکسیداز و لیزوزیم از جمله مهم‌ترین شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی سخت‌پوستان محسوب می‌گردد که تاثیر قابل توجهی بر از بین بردن باکتری‌ها ایفا می‌کند و میزان فعالیت این آنزیم‌ها نشانه‌ای از عملکرد مناسب ایمنی و سلامت این آبزیان به شمار می‌آید (۳۹). افزایش سطوح فعالیت این آنزیم‌ها بیانگر نقش موثر بیوفلوک بر روی قابلیت ایمنی غیراختصاصی میگوی ببری سبز می‌باشد. سیستم بیوفلوک قادر است ایمنی غیراختصاصی میگو را تقویت کند (۱۲، ۴۰). فنول‌اکسیداز یک آنزیم اصلی مکانیسم دفاعی در ایمنی میگو است و از انتشار مواد خارجی در سراسر بدن با ملانیزاسیون و غیرفعال شدن سلول‌های خارجی جلوگیری می‌کند، که عموماً توسط اجزای دیواره سلولی میکروبی (مانند لیپوپلی- ساکاریدها و بتا ۱،۳ گلوکان) به عنوان یک محرک برای سیستم پروفنولاکسیداز فعال می‌شود (۴۱). فنول‌اکسیداز به عنوان یک فرآیند گام‌به‌گام تحت فعال شدن یک پاتوژن مهاجم تحریک می‌شود که منجر به محصور شدن پاتوژن توسط ملانوزن می‌گردد (۴۲). فنول‌اکسیداز در کنترل بار باکتریایی همولنف (۴۳)، شناسایی عوامل غیرخودی و حفاظت در برابر باکتری‌های بیماری‌زا (۴۴) نقش محوری دارد. فعالیت فنول‌اکسیداز می‌تواند به عنوان شاخص

سلامت مطرح باشد، زیرا تغییرات این فاکتور به طور مستقیم به وضعیت بیماری و تغییرات محیطی وابسته می‌باشد. در مطالعه حاضر مقادیر بالاتر فنول‌اکسیداز در تیمارهای تغذیه شده با ۴ و ۶ درصد وزن بدن در سیستم بیوفلوک مشاهده شد (شکل ۲، C)، که با نتایج سایر محققین مشابهت دارد (۴۵، ۴۶). افزایش فعالیت فنول‌اکسیداز در جهت اثر تحریکی بیوفلوک مصرف شده است (۴۵). میگوها در سیستم‌های بیوفلوک در مخازن پرورش بیوفلوک را در ۲۴ ساعت شبانه روز مصرف می‌کنند (۱۵). مطالعه حاضر در رابطه با بهبود ایمنی ناشی از بیوفلوک با مطالعات قبلی مطابقت دارد (۴۵، ۴۶، ۴۷). سیستم ایمنی میگو عمدتاً توسط مواد دیواره سلولی میکروبی متشکل از پپتیدوگلیکان، لیپوپلی‌ساکاریدها و بتا ۱ و ۳ گلوکان‌ها فعال می‌شود (۴۸، ۴۹). محیط‌های پرورش با بیوفلوک حاوی محرک‌های ایمنی مثل پپتیدوگلیکان‌ها، بتاگلوکان‌ها و لیپوپلی‌ساکاریدها هستند که می‌توانند به عنوان پروبیوتیک در سیستم عمل کنند. ترکیب پلی-بتا‌هیدروکسی‌بوتیرات با بیوفلوک می‌تواند اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه با خواص و کارایی پروبیوتیک تولید کند و پاسخ ایمنی ماهیان پرورشی را بیشتر تقویت کند (۵۰، ۵۱).

نتیجه‌گیری

در پرورش میگوی ببری سبز، سطوح مختلف غذایی در سیستم بیوفلوک منجر به تغییرات معناداری در سطوح ترکیبات بیوشیمیایی (تری‌گلیسرید، کلسترول و گلوکز) و فعالیت‌های ایمنی همولنف (فنل‌اکسیداز، لیزوزیم و ایمنوگلوبولین کل) می‌شود. در سیستم بیوفلوک مقادیر تری‌گلیسرید و کلسترول نسبت به گروه‌های کنترل کاهش می‌یابد. تغذیه با سطوح مختلف غذایی ۶ و ۴ درصد وزن بدن در سیستم بیوفلوک منجر به بهبود فعالیت‌های لیزوزیم،

rates and stocking densities. *Aquaculture*. 2020;528:735526.

9. Mohammad Moradi S, Safaei M, Saraji F. Feeding habits of green tiger prawn, *Penaeus semisulcatus* (De Hann, 1848) in the coastal waters of the Persian Gulf (Hormozgan Province). *Iran Fish Sci J*. 2023;32(1):73-83. (In Persian)

10. Sarsangi Aliabad H, Naji A, Mortezaei SRS, Sourinejad I, Akbarzadeh A. Effects of restricted feeding levels and stocking densities on water quality, growth performance, body composition and mucosal innate immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry in a biofloc system. *Aquaculture*. 2022;546:737320.

11. Ullman C, Rhodes MA, Allen Davis D. Feed management and the use of automatic feeders in the pond production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 2019;498:44-49.

12. Xu WJ, Pan LQ. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. *Aquaculture*. 2013;412:117-124.

13. Liu G, Zhu S, Liu D, Guo X, Ye Z. Effects of stocking density of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) on immunities, antioxidant status, and resistance against *Vibrio harveyi* in a biofloc system. *Fish Shellfish Immunol*. 2017;67:19-26.

14. Chen J, Ren Y, Wang G, Xia B, Li Y. Dietary supplementation of biofloc influences growth performance, physiological stress, antioxidant status and immune response of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Fish Shellfish Immunol*. 2018;72:143-152.

15. Khanjani MH, Sharifinia M, Emerenciano MGC. Biofloc technology (BFT) in aquaculture: what goes right, what goes wrong? a scientific-based snapshot. *Aquac Nutr*. 2024; 2024:7496572.

16. Avnimelech Y. Biofloc Technology-A Practical Guide Book, 2nd ed.; The World Aquaculture Society: Baton Rouge, LA, USA, 2015; 268p.

17. Jones CM, Ng WK, King M. Alsever's solution: a review of its history, chemistry,

ایمنوگلوبولین کل و فنول اکسیداز می‌شود که نشان-

دهنده این است که با استفاده از سیستم بیوفلوک

می‌توان ایمنی و سلامت کلی میگوی ببری سبز را

بهبود بخشید.

منابع

1. Yuan X, Lv Z, Zhang Z, Han Y, Liu Z, Zhang H. A review of antibiotics, antibiotic resistant bacteria, and resistance genes in aquaculture: occurrence, contamination, and transmission. *Toxics*. 2023;11(5):420.

2. Lee D, Yu YB, Choi JH, Jo AH, Hong SM, Kang JC, Kim JH. Viral shrimp diseases listed by the OIE: A review. *Viruses*. 2022;14(3):585.

3. Yu YB, Choi JH, Kang JC, Kim HJ, Kim JH. Shrimp bacterial and parasitic disease listed in the OIE: A review. *Microb Pathog*. 2022;166:105545.

4. Khanjani MH, Sharifinia M, Emerenciano MGC. A detailed look at the impacts of biofloc on immunological and hematological parameters and improving resistance to diseases. *Fish Shellfish Immunol*. 2023;137:108796.

5. Khanjani MH, Eslami J, Emerenciano MGC. Wheat flour as carbon source on water quality, growth performance, hemolymph biochemical and immune parameters of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) juveniles in biofloc technology (BFT). *Aquac Rep*. 2025;40:102623.

6. Kumar S, Anand PS, De D, Deo AD, Ghoshal TK, Sundaray JK, et al. Effects of biofloc under different carbon sources and protein levels on water quality, growth performance and immune responses in black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1978). *Aquac Res*. 2017;48:1168-1182.

7. Khanjani MH, Sharifinia M. Biofloc as a food source for Banana shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*) postlarvae. *North Am J Aquac*. 2022;45(4):469-479.

8. Kaya D, Genc E, Genc MA, Aktas M, Eroldogan OT, Guroy D. Biofloc technology in recirculating aquaculture system as a culture model for green tiger shrimp, *Penaeus semisulcatus*: Effects of different feeding

- Litopenaeus vannamei*, with different ammonia-N tolerances. *Comp Biochem Physiol C*. 2019; 221:73-81.
27. Martinez-Porchas M, Ezquerro-Brauer M, Mendoza-Cano F, Higuera JEC, Vargas-Albores F, Martinez-Cordova LR. Effect of supplementing heterotrophic and photoautotrophic biofloc, on the production response, physiological condition and post-harvest quality of the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Rep*. 2020;16:100257.
28. Hussain AS, Mohammad DA, Sallam WS, Shoukry NM, Davis DA. Effects of culturing the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* in biofloc vs synbiotic systems on the growth and immune system. *Aquaculture*, 2021;542:736905.
29. Kannenberg EL, Poralla K. Hopanoid biosynthesis and function in bacteria. *Naturwissenschaften*. 1999;86(4):168-176
30. Annies J, Rosamma P. Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immune competence to white spot syndrome virus infection. *Aquaculture*. 2007;272: 87-97.
31. Yong ASK, Mok WY, Tamrin MLM, Shapawi R, Kim YS. Effects of dietary nucleotides on growth, survival and metabolic response in whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* against ammonia stress condition. *Aquac Res*. 2020;51:2252-2260.
32. Xu WJ, Pan LQ. Evaluation of dietary protein level on selected parameters of immune and antioxidant systems, and growth performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks. *Aquaculture*. 2014;426:181-188.
33. Long L, Liu H, Lu S. Effects of Low Salinity on Growth, Digestive Enzyme Activity, Antioxidant and Immune Status, and the Microbial Community of *Litopenaeus vannamei* in biofloc technology aquaculture systems. *J Mai Sci Eng*. 2023;11:2076.
34. Outama P, Xuan CL, Wannavijit S, Lumsangkul C, Linh NV, Montha N, et al. Modulation of growth, immune response, and immune antioxidant related gene expression of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared and production. *Transfus Med Rev*. 2010;24:259-267.
18. Liu T, Zhang G, Feng Y, Kong C, Ayisi CL, Huang X, Hua X. Dietary soybean antigen impairs growth and health through stress-induced non-specific immune responses in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*. 2019;84:124-129
19. Xu Z, Guan W, Xie D, Lu W, Ren X, Yuan J, Mao L. Evaluation of immunological response in shrimp *Penaeus vannamei* submitted to low temperature and air exposure. *Dev Comp Immunol*. 2019;100:103413.
20. Ellis AE. Lysozyme Assays. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. and Van Muiswinkel, W.B., Eds., *Techniques in Fish Immunology*, SOS Publications, Fair Haven, 1990;101-103.
21. Nayak B, Kumar S, Collins PL, Samal SK. Molecular characterization and complete genome sequence of avian paramyxovirus type 4 prototype strain duck/Hong Kong/D3/75. *Virology*. 2008;5:24.
22. Söderhäll K, Hall L. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *BBA-Bioenergetics*, 1984;797:99-104.
23. Cuesta A, Meseguer J, Esteban MA. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.), *Veterinary Immunol Immunopathol*. 2004;101(3-4):203-210.
24. Gomez-Sorhouet E, Villarreal H, Racotta IS, Naranjo J, Mercier L. Zootechnical and physiological responses of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae reared in bioflocs and subjected to stress conditions during nursery phase. *Aquac Res*. 2019;50:1198-1211.
25. Mercier L, Palacios E, Campa-Córdova A, Tovar-Ramírez D, Hernández-Herrera R, Racotta I. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture*. 2006;258:633-640.
26. Shan H, Geng Z, Ma S, Wang T. Comparative study of the key enzymes and biochemical substances involved in the energy metabolism of Pacific white shrimp,

- absence of prophenoloxidase. FEBS J. 2009; 276:5298-5306.
44. Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A. Two prophenol oxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. Dev Comp Immunol. 2009; 33:247-256.
45. Panigrahi A, Sundaram M, Saranya C., Satish Kumar R, Syama Dayal J, Saraswathy R, et al. Influence of differential protein levels of feed on production performance and immune response of pacific white leg shrimp in a biofloc-based system. Aquaculture. 2019; 503:118-127.
46. Panigrahi A, Sundaram M, Saranya C, Swain S, Dash RR, Syama Dayal J. Carbohydrate sources differentially influence growth performances, microbial dynamics and immunomodulation in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under biofloc system. Fish Shellfish Immunol. 2019;86:1207-1216.
47. Ekasari J, Azhar MH, Surawidjaja EH, Nuryati S, De Schryver P, Bossier P. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources, Fish Shellfish Immunol. 2014;41(2):332-339.
48. Rao XJ, Ling E, Yu XQ. The role of lysozyme in the prophenoloxidase activation system of *Manduca sexta*: an in vitro approach, Dev Comp Immunol. 2010; 34(3):264-271.
49. Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens, Fish Shellfish Immunol. 2013;34(4):990-1001.
50. Qiao G, Chen P, Sun Q, Zhang M, Zhang J, Li Z, Li Q. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) in bioflocs alters intestinal microbial community structure, immunerelated gene expression and early Cyprinid herpesvirus 2 replication in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), Fish Shellfish Immunol. 2020; 97:72-82.
51. Crab R., Chielens B., Wille M., Bossier P., Verstraete W. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for (*Macrobrachium rosenbergii*) postlarvae. Aquac Res. 2010; 41:559-567.
- under biofloc system using mango peel powder, Fish Shellfish Immunol. 2022;131:1136-1143.
35. Haridas H, Verma AK, Rathore G, Prakash C, Sawant PB, Babitha Rani AM. Enhanced growth and immuno-physiological response of genetically improved farmed tilapia in indoor biofloc units at different stocking densities, Aquac Res. 2017;48:4346-4355,
36. Liu G, Ye Z, Liu D, Zhao J, Sivaramasamy E, Deng Y, Zhu S. Influence of stocking density on growth, digestive enzyme activities, immune responses, antioxidant of *Oreochromis niloticus* fingerlings in biofloc systems, Fish Shellfish Immunol. 2018;81:416-422.
37. Lee C, Kim S, Lim SJ, Lee KJ. Supplemental effects of biofloc powder on growth performance, innate immunity, and disease resistance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish Aquat Sci. 2017;20:15.
38. Ju ZY, Forster IP, Conquest L, Dominy W. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc or floc fractions to a formulated diet. Aquac Nutr. 2008;14:533-43
39. Zhang J, Duan Y, Zhang Z, Dong H, Li Z. Research progress of intestinal microbial flora in shrimp. South China Fish Sci. 2015;11(6):114-119.
40. Kim SK, Pang Z, Seo HC, Cho YR, Samocha T, Jang I.K. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Aquac Res. 2014;45(2):362-371.
41. Promthale P, Pongtippatee P, Withyachumnarnkul B, Wongprasert K. Bioflocs substituted fishmeal feed stimulates immune response and protects shrimp from *Vibrio parahaemolyticus* infection. Fish Shellfish Immunol. 2019;93: 1067-1075.
42. Fan T, Jing Z, Fan X, Yu M, Jiang G. Purification and characterization of phenoloxidase from brine shrimp *Artemia sinica*. Acta Biochim Biophys Sin. 2011; 43:722-728.
43. Fagutao FF, Koyama T, Kaizu A, Saito-Taki T, Kondo H, Aoki T, Hirono I. Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the

Research Article

Study of White Leg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) of Shrimp Farming Complexes in Gomishan, Golestan Province, with the Perspective of Contamination by Heavy Metals and Risk Evaluation for Consumer

Reza Khalili¹, Reza Salighehzadeh^{1*}, Marjan Mosafer²

1- Department of Veterinary, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran

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

*Corresponding author: rezasalighehzadeh@yahoo.com

Received: 15 August 2024

Accepted: 27 January 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1129216

Abstract

Heavy metal pollution directly affects marine aquaculture such as shrimp farming. Heavy metals in the shrimp can be transferred to humans through the food chain. In this research, the concentration of heavy metals in the muscle tissue of western white-legged shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was determined and the risk for consumers was assessed in the Gamishan shrimp breeding station of Golestan province. For this purpose, 30 samples were analyzed by atomic absorption after drying and chemical digestion. The data were analyzed using SPSS software. The different heavy metals were identified in shrimp samples, including arsenic (As), cadmium (Cd), mercury (Hg), lead (Pb), iron (Fe), copper (Cu), cobalt (Co), chromium (Cr), manganese (Mn), molybdenum (Mo), nickel (Ni), tin (Sn) and zinc (Zn). The average amount of As, Cd, Hg and Pb was 0.11-0.08, 0.01, 0.01 and 0.38-0.14 mg/kg, respectively. Sn and Ni had a lower average than other metals. Fe and Cu were the highest level, followed Zn and Mn. Co, Cr and Mo were the lowest level. A significant difference was reported between different sites in regarding Zn ($p < 0.05$). The concentration of all heavy metals was according to the standard limit (FAO/WHO). Continuous and daily consumption of this product for different age groups is not safe in terms of As and there is a risk, but it is safe for other metals. The results of this study suggest that the measurements to prevent the pollution of breeding ponds in Golestan province should be taken by the responsible authorities. It is possible to reduce the dangerous effects of heavy metals by monitoring, regularly examining and evaluating these mineral pollutants.

Keywords: White Leg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*), Golestan Province, Heavy Metals, Risk Assessment.



مطالعه میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مجتمع پرورش میگوی گمیشان استان گلستان از نظر آلودگی به فلزات سنگین و ارزیابی خطر برای مصرف‌کنندگان

رضا خلیلی^۱، رضا سلیقه‌زاده^{۱*}، مرجان مسافر^۲

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

۲- گروه بیولوژی دریا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: rezasalighehzadeh@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۵

DOI: 10.60833/ascij.2025.1129216

چکیده

امروزه تاثیر مستقیم آلودگی با فلزات سنگین بر سلامت آبزیانی مانند میگو بر کسی پوشیده نیست. فلزات سنگین انباشته شده در بدن میگو می‌تواند از طریق زنجیره غذایی به انسان منتقل و سبب بروز بیماری و مشکلات عدیده‌ای گردند. از این‌رو بررسی سطح سلامت بافت عضله این جانداران از لحاظ فلزات سنگین حائز اهمیت می‌باشد. در این تحقیق غلظت فلزات سنگین بافت عضله میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مجتمع پرورش میگوی گمیشان استان گلستان تعیین و ارزیابی خطر برای مصرف‌کنندگان انجام شد. برای این منظور، تعداد ۳۰ نمونه میگوی پا سفید غربی پس از خشک شدن، پودر شدن و هضم شیمیایی برای تعیین میزان غلظت فلزات سنگین توسط دستگاه جذب اتمی مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد. فلزات سنگین متنوعی در میگوی پاسفید غربی شناسایی شد که شامل آرسنیک، کادمیوم، جیوه، سرب، آهن، مس، کبالت، کروم، منگنز، مولیبدن، نیکل، قلع و روی بودند. فلزات آرسنیک و آهن بیشترین میزان را به ترتیب میان فلزات غیر ضروری و ضروری به خود اختصاص دادند. از نظر میزان باقیمانده فلز روی بین سایت‌های مختلف اختلاف معنی‌دار گزارش شد ($p < 0/05$). غلظت تمامی عناصر مورد در محدوده مجاز تعیین شده توسط استانداردهای جهانی (FAO/WHO) بود. مصرف مداوم و روزانه این محصول برای گروه‌های سنی مختلف از نظر آرسنیک ایمن نبوده و مخاطره‌ای برای آنها وجود دارد. ولی از نظر سایر فلزات ایمن بود. نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که اقدامات لازم جهت پیشگیری از آلودگی آب‌های استخرهای پرورشی استان گلستان توسط مقامات مسئول صورت پذیرد. کاهش اثرات خطرناک فلزات سنگین با پایش، بررسی منظم و ارزیابی آلاینده‌های معدنی امکان پذیر می‌باشد.

کلمات کلیدی: میگوی پاسفید غربی، فلزات سنگین، ارزیابی خطر، استان گلستان.

مقدمه

تولید جهانی آبزیان برای مصرف انسانی طی پنج دهه اخیر از رشد جمعیت جهانی پیشی گرفته است. بر اساس آمار رسمی FAO تولیدات جهانی آبزیان ۲۱۲ میلیون تن بوده که ۵/۱۱۴ میلیون تن آن معادل ۵۴ درصد مربوط به آبزی‌پروری و ۵/۹۷ میلیون تن آن برداشت از منابع طبیعی (صید و صیادی) معادل ۴۶ درصد بوده است. کشور ایران نیز از این قاعده مستثنی نبوده و بر اساس آخرین آمار اعلام شده تا پایان سال

۱۳۹۸ میزان تولیدات آبی‌پروری ۵۲۶ هزار تن معادل ۴۱ درصد و ۷۵۹ هزار تن معادل ۵۹ درصد از طریق صید و صیادی از مجموع کل ۱ میلیون و ۲۸۵ هزار تن انواع ماهی، میگو و سایر آبزیان در کل کشور به ویژه در آب‌های استان‌های ساحلی بوده است. پرورش میگو به عنوان یکی از فعالیت‌های مهم آبی‌پروری در جهان و همسو با آن در ایران در حال گسترش و توسعه می‌باشد. در میان آبزیان، میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) از جمله گونه‌های مرغوبی است که می‌توان به صورت گسترده تکثیر و پرورش نمود. یکی از موضوعاتی که با جست و جویی کوتاه در زمینه بررسی آبزیان توجه همگان را به خود جلب می‌نماید، بررسی میزان فلزات سنگین و ارزیابی خطر ریسک با ارزش می‌باشد (۱). محققان زیادی روی فلزات سنگین در آبزیان تحقیق کرده‌اند (۲، ۳، ۴، ۵، ۶). طی سال‌های اخیر همسو با صنعتی شدن جوامع، آلاینده‌های مختلفی به محیط وارد می‌گردد (۷). منابع متعددی از جمله معدن کاری فلزات، صنایع کشاورزی، صنایع متالورژیکی، صنایع الکترونیک، باتری سازی و پساب‌های صنعتی به طور عمده سبب ورود فلزات سنگین به محیط می‌گردند (۸، ۹، ۱۰). فلزات سنگین با ورود به زیست بوم آبی و به دنبال آن ورود به بدن جانداران آبی، از طریق چرخه غذایی به بدن انسان وارد می‌شوند. این عناصر در مقادیر کم به طور طبیعی برای بدن انسان لازم و ضروری می‌باشند اما در غلظت‌های بالاتر خطرات زیست‌محیطی فراوانی را به بار می‌آورند. از مهمترین اختلالات و عوارض که تجمع فلزات سنگین به دنبال دارد می‌توان به سرطان‌زایی، اثر بر سیستم اعصاب مرکزی و محیطی، اثر بر روی پوست، اثر بر روی سیستم خون‌ساز، اثر بر سیستم قلبی و عروقی، آسیب به کلیه‌ها و تجمع در بافت‌ها اشاره نمود (۱۱، ۱۲). با در نظر گرفتن گستردگی آسیب‌های ناشی از وجود

فلزات سنگین در بافت موجودات آبی از جمله گونه مورد مطالعه، و رشد روز افزون استان گلستان در زمینه آبی‌پروری به ویژه پرورش میگو تا کنون مطالعه‌ای در خصوص بررسی میگوی پا سفید غربی از نظر آلودگی به فلزات سنگین و ارزیابی خطر برای مصرف‌کنندگان در این استان انجام نشده است. از این رو انجام مطالعه‌ای با هدف بررسی سطح غلظت فلزات سنگین ضروری در بافت عضله میگوی پا سفید غربی در سایت پرورش میگوی گمیشان و مقایسه آن با استانداردهای جهانی و بین‌المللی امری ضروری بوده و نتایج آن می‌تواند سطح سلامت بافت عضله میگوی پا سفید غربی از لحاظ غلظت فلزات سنگین را نشان دهد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۳۰ نمونه میگوی پا سفید غربی از سایت پرورش میگوی گمیشان استان گلستان جمع آوری شد. در پایان دوره پرورش تهیه شد. ابتدا نمونه‌ها با قرار گرفتن در آب یخ بی حرکت و بی‌هوش شده سپس با رعایت ملاحظات اخلاق زیستی، بافت عضله جدا شده و به عنوان نمونه برداشت شد. به منظور تعیین غلظت به ازای وزن خشک نمونه، نمونه‌ها در آون با دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس خشک شد، سپس در هاون چینی تبدیل به پودر تبدیل شد. آماده‌سازی نمونه به روش توصیف شده توسط غلامحسینی و همکاران (۲۰۲۱) از طریق هضم شیمیایی نمونه‌ها با ترکیب اسید نیتریک و اسید پرکلریک (نسبت ۱:۷) انجام شد (۱۳). سنجش غلظت فلزات سنگین باقیمانده در عضله میگوها، از طریق دستگاه طیف بینی جذب اتمی اندازه‌گیری شد و با استفاده از منحنی کالیبراسیون مقادیر جذب به غلظت تبدیل و مقدار نهایی گزارش گردید. به منظور دستیابی به غلظت مورد نظر فلز از استاندارد مرجع

(SRM 2977 Muscle Tissue) استفاده شد. به منظور ترسیم منحنی کالیبراسیون عناصر، طیفی از رقت‌های مختلف به دستگاه تزریق گردید. خطای نسبی، راندمان و حد تشخیص دستگاه به ترتیب برابر با ۵/۴، ۹۴/۶ درصد و ۰/۰۰۲ قسمت در میلیون از طریق معادلات ذیل محاسبه شد.

$$RE\% = \frac{MEASURED\ VALUE * NOMINAL\ VALUE}{MEASURED\ VALUE} * 100$$

$$LOD = \frac{SD_{intercept}}{x-variable} * 3.3 \quad R\% = (100 - RE\%)$$

در این مطالعه Sd انحراف معیار، intercept عرض از مبدا (b) و x-variable شیب خط (a) هستند. به منظور ارزیابی خطر بهداشتی مصرف این محصولات دریایی، شاخصی با عنوان دریافت روزانه (DI) بکار گرفته شد. $DI = \frac{(CM \times IR)}{BW}$ که CM غلظت اندازه‌گیری شده در بافت خوراکی (عضله) میگو بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر است. از آنجایی که میگوها به شکل تازه (بدون فرایند خشک کردن) توسط مصرف‌کنندگان مورد تغذیه قرار می‌گیرند، غلظت‌های سنجیده شده بر حسب وزن خشک نمونه از طریق رابطه زیر به وزن تر تبدیل شد.

Con. in WW = ((100-70% of water)/100)* Con in (DW) که BW وزن بدن که در این تحقیق به تفکیک بزرگسالان و کودکان (زیر ۱۸ سال) به ترتیب معادل ۷۰ و ۴۰ کیلوگرم و IR میزان مصرف روزانه میگو در جامعه مصرف‌کنندگان برابر با ۱۱/۲۳ گرم در روز در نظر گرفته می‌شود. با توجه به اینکه تقریباً ۹۰ درصد میگوی پرورشی کشور به آسیا و اروپا صادر می‌شود و طبق آخرین گزارش رسمی فائو، میانگین سرانه مصرف آبزیان در دنیا معادل ۲۰/۵ کیلوگرم در سال می‌باشد، که ۲۰ درصد این مقدار را میگو تشکیل می‌دهد (۸).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: ابتدا نرمال بودن آنها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. سپس مقایسه

داده‌های فلزات سنگین مزارع با یکدیگر برای گروه‌هایی دارای پراکنش نرمال از آنالیز واریانس یک-طرفه استفاده شد و در صورت وجود اختلاف معنی-دار، برای جداسازی گروه‌ها از آزمون توکی در سطح اطمینان ۵ درصد استفاده گردید. همچنین، از آزمون تی تک نمونه‌ای برای مقایسه غلظت عناصر سنگین با مقادیر مندرج در استانداردهای بهداشتی معتبر بین-المللی استفاده شد. کلیه عملیات آماری در محیط نرم-افزار SPSS انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد در میان فلزات غیر ضروری مقدار آرسنیک بیشترین میزان غلظت را دارا بود. در میان فلزات ضروری، آهن بیشترین میزان را به خود اختصاص دادند و مس، روی، منگنز، کروم، نیکل به ترتیب در رتبه‌های بعد قرار گرفتند. از نظر میزان باقیمانده فلز روی بین سایت‌های مختلف اختلاف معنی‌دار گزارش شد ($p < 0/05$) (جدول ۱). نتایج آنالیز واریانس باقیمانده فلزات سنگین در گوشت میگوی پرورشی نشان داد از نظر میزان باقیمانده فلز روی بین سایت‌های مختلف اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($p < 0/05$) (جدول ۲). چنانچه در جدول ۳ نمایان می‌دهد مقدار میانگین آرسنیک، کادمیوم، جیوه و سرب طبق استانداردهای بین‌المللی ۰/۵، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۴ ppm بود. همچنین نتایج نشان داد که غلظت تمامی عناصر مورد بررسی کمتر از حد مجاز بود. میزان دریافت روزانه و حداکثر مصرف روزانه قابل تحمل (MTDI) فلزات سنگین نشان داد که آهن، مس، قلع و رویدارای حد مجاز بالاتری از سایر فلزات بودند. حداکثر مصرف روزانه قابل تحمل برای آرسنیک و کادمیوم کمتر از سایر فلزات می‌باشد (جدول ۴).

جدول ۱- میانگین $\pm$ انحراف معیار میزان فلزات سنگین در میگوی پرورشی استان گلستان (میلی‌گرم/کیلوگرم وزن خشک)

Table 1. Mean $\pm$ SD of heavy metal levels in farmed shrimp in Golestan Province (mg/kg dry weight)

Heavy metals	Site 1	Site 2	Site 3
As	0.44 $\pm$ 0.11	0.43 $\pm$ 0.08	0.40 $\pm$ 0.11
Cd	0.03 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01
Co	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01
Cr	0.56 $\pm$ 0.19	0.65 $\pm$ 0.18	0.54 $\pm$ 0.26
Cu	21.77 $\pm$ 4.50	19.04 $\pm$ 2.49	15.66 $\pm$ 3.27
Fe	40.40 $\pm$ 4.65	38.07 $\pm$ 2.97	21.95 $\pm$ 6.84
Hg	0.16 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01
Mn	1.17 $\pm$ 0.87	1.03 $\pm$ 0.54	0.78 $\pm$ 0.22
Mo	0.03 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01
Ni	0.14 $\pm$ 0.0*	0.22 $\pm$ 0.11	0.20 $\pm$ 0.10
Pb	0.43 $\pm$ 0.38	0.22 $\pm$ 0.14	0.28 $\pm$ 0.23
Sn	0.31 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.01
Zn	34.85 $\pm$ 1.90b	33.68 $\pm$ 1.25b	27.51 $\pm$ 5.21a

*حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است ($p < 0.05$)

*Different letters indicate significant differences between experimental groups ($p < 0.05$)

جدول ۲- نتایج تحلیل واریانس (ANOVA) فلزات سنگین باقیمانده در گوشت میگوی پرورشی استان گلستان

Table 2. Results of analysis of variance of residual heavy metals in farmed shrimp meat in Golestan Province

Heavy metals		Sum of squares	df	Mean squares	Calculated surface (Fe)	<i>p</i>
As	betweengroups	0.004	2	0.002	0.164	0.852
	Within-Group	0.099	9	0.011		
	Total	0.102	11			
Cd	betweengroups	0	2	0	0.201	0.821
	Within-Group	0.002	9	0		
	Total	0.002	11			
Co	betweengroups	0	2	0	2.07	0.182
	Within-Group	0.001	9	0		
	Total	0.001	11			
Cr	betweengroups	0.031	2	0.015	0.322	0.733
	Within-Group	0.429	9	0.048		
	Total	0.46	11			
Cu	betweengroups	74.993	2	37.496	3.023	0.099
	Within-Group	111.635	9	12.404		
	Total	186.628	11			
Fe	betweengroups	808.074	2	404.037	0.391	0.687
	Within-Group	9294.394	9	1032.71		
	Total	10102.468	11			
Hg	betweengroups	0	2	0	0	1
	Within-Group	0	9	0		
	Total	0	11			
Mn	betweengroups	0.301	2	0.151	0.405	0.679
	Within-Group	0.347	9	0.372		
	Total	3.648	11			
Mo	betweengroups	0	2	0	0	1
	Within-Group	0	9	0		
	Total	0	11			
Ni	betweengroups	0.014	2	0.007	0.836	0.464
	Within-Group	0.076	9	0.008		
	Total	0.09	11			
Pb	betweengroups	0.111	2	0.055	0.664	0.538
	Within-Group	0.75	9	0.083		

	Total	0.861	11			
Sn	betweengroups	0	2	0	1.059	0.386
	Within-Group	0	9	0		
	Total	0	11			
Zn	betweengroups	124.324	2	62.162	5.76	0.025
	Within-Group	97.133	9	10793		
	Total	221.456	11			

جدول ۳- مقایسه میزان فلزات سنگین میگوی پرورشی استان گلستان با استانداردهای جهانی (FAO/WHO)

Table 3. Comparison of heavy metal levels in farmed shrimp in Golestan Province with international standards (FAO/WHO)

Heavy metals	Standard value (ppm)	Standardized mean difference	t	df	p
As	0.5	-0.07183	-2.579	11	0.026
Cd	0.2	-0.16856	-43.934	11	0.000
Co	50	-49.97966	-1.515	11	0.000
Cr	30	-29.41064	-498.450	11	0.000
Cu	100	-81.16996	-68.264	11	0.000
Fe	100	-66.52135	-7.604	11	0.000
Hg	0.2	-0.03550	-1.236	11	0.000
Mn	50	-49.00097	-294.755	11	0.000
Mo	150	-149.96590	-2.088	11	0.000
Ni	0.5	-0.31169	-11.955	11	0.000
Pb	0.4	-0.10293	-1.274	11	0.229
Sn	250	-249.69152	-2.175	11	0.000
Zn	150	-117.98085	-91.087	11	0.000

جدول ۴- ارزیابی ریسک سلامت میگوی پرورشی استان گلستان نسبت به فلزات سنگین

Table 4. Health risk assessment of farmed shrimp in Golestan province with respect to heavy metals

Heavy metals	Daily intake (mg/g body weight per day)		MTDI (mg.g-1 BW/day)
	Children	Adults	
As	1.98×10^{-1}	1.13×10^{-1}	5×10^{-2}
Cd	1.45×10^{-2}	8.31×10^{-3}	6×10^{-2}
Co	9.4×10^{-3}	5.37×10^{-1}	-
Cr	2.72×10^{-1}	1.55×10^{-1}	2
Cu	8.71	4.97	3×10^{-1}
Fe	15.48	8.84	5×10^{-2}
Hg	7.6×10^{-2}	4.34×10^{-2}	-
Mn	4.62×10^{-1}	2.64×10^{-1}	-
Mo	1.57×10^{-2}	9.01×10^{-3}	-
Ni	8.71×10^{-2}	4.97×10^{-2}	3×10^{-1}
Pb	1.37×10^{-1}	7.85×10^{-2}	2.1×10^{-1}
Sn	1.42×10^{-1}	8.15×10^{-2}	-
Zn	14.81	8.46	6×10^{-1}

MTDI: Maximum Tolerable Daily Intake

بحث

زیست‌بوم‌ها با سرعت بیشتری انتقال می‌یابد. از اینرو آلودگی‌ها از مزارع مختلف و سایت‌های گوناگون به سرعت به سایر مزارع انتقال می‌یابد. فلز آهن نقش بسزایی در رشد و سوخت و ساز بدن آبزیان ایفا

صنعتی‌شدن و افزایش فعالیت‌های انسانی در دوران اخیر، سبب گسترش بیش از پیش آلودگی‌ها در محیط آبی شده است. گسترش آلودگی در اکوسیستم‌های آبی به دلیل سیالیت آب نسبت به سایر

می‌کند. پژوهش‌ها بیان می‌دارند میگوها قابلیت بالایی در جذب فلز آهن از زیست‌بوم آبی و رسوبات دارند (۱۴). از این‌رو بیشترین بودن میزان غلظت فلز آهن نسبت به سایر فلزات توجیح علمی خواهد داشت. مطالعات بسیاری به بیشتر بودن میزان غلظت فلزات سنگین در میگو نسبت به سایر فلزات اشاره نموده‌اند. لقمانی و شریفیان (۲۰۲۰) در بررسی بافت خوراکی میگوی سفید هندی در مناطق صیادی سواحل دریای مکران (۱۵)، Ezemonye و همکاران در بررسی غلظت فلزات سنگین در میگوی *Macrobrachium macrobrachion* و ماهی *Brycinus longipinnis* از رودخانه Benin (۱۶)، Askari Sarmowr و همکاران در بررسی میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مجتمع‌های پرورش میگوی استان بوشهر (۱۷)، Modheji و همکاران طی مطالعه ارزیابی فلزات سنگین در ماهی‌های سرخو، شوریده، زبان، کفشک، حلوا سفید و میگو در بازار ماهی‌فروشی خرمشهر (۱۸) بیان نمودند که در میان فلزات مختلف، آهن بیشترین میزان تجمع را به خود اختصاص داده است. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که غلظت عناصر ارزیابی شده در نمونه‌های میگو از حد مجاز FAO/WHO (۱۹) تجاوز نمی‌کند. با این حال با توجه به آنکه برخی از فلزات سنگین بسیار خطرناک برای سلامتی مصرف‌کنندگان (مانند جیوه) نزدیک به حد مجاز اعلام شده هستند، نظارت منظم بر عناصر سمی در جهت جلوگیری از آثار احتمالی مضر مصرف میگو بر سلامت انسان امری ضروری خواهد بود (۲۰). همسو با نتایج حاصل از این مطالعه مطالعات متعددی کمتر بودن غلظت فلزات سنگین در اقصی نقاط دنیا گزارش نموده‌اند (۱۳، ۱۶، ۲۱، ۲۲، ۲۳). این پژوهش نمایان ساخت که با توجه به شاخص میزان دریافت قابل تحمل مصرف گونه مورد مطالعه از لحاظ فلز آرسنیک مخاطره‌آمیز خواهد بود.

فلز آرسنیک از جمله فلزات غیرضروری می‌باشد که سبب بروز طیف وسیعی از بیماری‌ها خواهد شد. آسیب گسترده به کبد و مختل کردن سیستم گوارشی تنها بخشی از آسیب‌های ناشی از تجمع فلز آرسنیک می‌باشد (۲۴). در این مطالعه حداکثر مصرف روزانه قابل تحمل (MTDI) برای آرسنیک و کادمیوم کمتر از سایر فلزات بود. از این رو مصرف مداوم و روزانه این محصول برای گروه‌های سنی مختلف از نظر آرسنیک ایمن نبوده و مخاطره‌ای برای آنها وجود دارد. ولی از نظر سایر فلزات ایمن است. غلامحسینی و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی میگوهای صید شده از بندر جاسک، تنگه هرمز و خلیج چابهار در سواحل شمالی دریای عمان بیان نمودند شاخص THQ کل برای گروه‌های سنی کودکان و بزرگسالان کمتر از ۱ بود (۱۳). Ezemonye و همکاران (۲۰۱۹) در بررسی سلامتی غلظت فلزات سنگین در سطح آب، میگوی *Macrobrachium macrobrachion* و ماهی *Brycinus longipinnis* از رودخانه Benin، نیجریه بیان نمود میزان THQ در میگو کمتر از یک بود (۱۶). Askari Sarmowr و همکاران در سال ۲۰۲۲ در بررسی میگوی پا سفید غربی در مجتمع‌های پرورش میگوی استان بوشهر بیان نمود که با توجه به حداکثر مصرف روزانه قابل تحمل (MTDI) فلزات سنگین، مصرف روزانه و مداوم میگوها توسط مصرف‌کنندگان در گروه‌های سنی مختلف (کودکان، بزرگسالان) کاملاً ایمن بوده و حتی علیرغم مقادیر زیاد عناصر نیکل و مس، خطری جدی متوجه مصرف‌کنندگان نمی‌شود (۱۷). بر اساس مطالعه لقمانی و شریفیان بیشترین کمترین تخمین میزان خطر (THQ) به ترتیب ناشی از فلز آرسنیک و فلز قلع به دست آمد. تخمین میزان خطر برای تمامی فلزات و همچنین مجموع میزان خطر (TTHQ) کمتر از ۱ بود (۲۲). نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که اقدامات لازم جهت پیشگیری از

In summer and winter seasons. J Mar Sci Technol. 2021;20(1):48-60. [In Persian]

2. Biswas A, Kanon KF, Rahman A, Shafiqul Alam M, Ghosh S, Farid F. Assessment of human health hazard associated with heavy metal accumulation in popular freshwater, coastal and marine fishes from south-west region, Bangladesh. Heliyon. 2023;9:e20514.

3. Etefaghdoost M, AlafNovirian H. Measurement of the concentration of heavy elements in the muscle tissue of kamel fish (*Rutilusrutiluscaspius*, Yakovlev, 1870) case study: Darvishan Black River, Gilan Province. Environ Sci Technol. 2019; 22(8):236-223. [In Persian]

4. Velayatzadeh M, Koshafar A. Pollution Assessment some of Heavy Metals in Water and Surface Sediments of Nasserri Wetland (Khorramshahr). J Sch Public Health Inst Public Health Res. 2019;17(2):157-168. [In Persian]

5. Hossain MN, Rahaman A, Jawad Hasan MD, Minhaz Uddin MD, Khatun N, Shamsuddin S. Comparative seasonal assessment of pollution and health risks associated with heavy metals in water, sediment and Fish of Buriganga and Turag River in Dhaka City, Bangladesh. SN Appl Sci. 2021;3(4):1-16.

6. Farahbakhsh Z, Akbarzadeh A, Amiri P, Naji A. The risk assessment potential of heavy metals (Cu, Zn, Ni) for human health caused by consumption of muscle tissue of golden mullet (*Risso, 1810*) *Liza aurata* in Anzali wetland, Caspian Sea. Health Environ. 2018;12(2):193-202. [In Persian]

7. Ali H, Khan E, Ilahi I. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity and bioaccumulation. J Chem. 2019; 6730305:1-14.

8. Qouti N, Mohammadi S, Mohammadi W. Comparison of hardness and alkalinity changes with heavy metal zinc poisoning in common carp (*Cyprinus carpio*). J Wetland. 2011;2(8):21-28 [In Persian]

آلودگی آب‌های استخرهای پرورشی استان گلستان توسط مقامات مسئول صورت پذیرد. کاهش اثرات خطرناک فلزات سنگین بر روی اکوسیستم، صنعت آبی‌پروری و نیز انسان که از آبزیان تغذیه می‌کند، با پایش، بررسی منظم و ارزیابی آلاینده‌های معدنی در آب‌های ساحلی، خورها، خلیج‌ها، رسوبات کف و بافت‌های بدن آبزیان امکان‌پذیر می‌باشد (۲۵).

نتیجه‌گیری

انباشتگی فلزات سنگین که در اثر فاضلاب‌های صنعتی، شهری و کشاورزی به وجود می‌آیند معمولاً در مقابل تصفیه شیمیایی مقاوم می‌باشند. این گونه فلزات به راحتی می‌توانند باعث آلودگی زیست محیطی آبزیان به خصوص میگوها شوند. سنجش فلزات سنگین در آب، رسوب و ماهیان، همیشه معیاری برای سنجش آلودگی محیط و میزان تأثیر آن بر اکوسیستم انسانی بوده است. با توجه به اهمیت بررسی آلودگی‌های مربوط به فلزات سنگین در آبزیان خوراکی بدلیل احتمال تجمع فلزات سنگین و همچنین بعنوان شاخصی از آلودگی آب‌ها، هدف از این مطالعه، تعیین غلظت فلزات سنگین بافت عضله میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) مزارع پرورشی سایت‌های مجتمع پرورش میگوی گمیشان استان گلستان بود. نتایج این پژوهش نشان داد که سطح فلزات سنگین در میگو نسبت به استانداردهای بین‌المللی پایین بود، اما با توجه به خاصیت تجمع زیستی و سمیت فلزات سنگین، پایش دوره‌ای فلزات سنگین نیاز می‌باشد.

منابع

1. Koshafar A, Sawari A, Sakhaei N, Archengi B, Karimi-Organ F. Comparison of bioaccumulation of heavy metals in Bayah fish (*Liza abu*) and yellow fin shank (*Acanthopagrus latus*) of Bahmanshir river.

- A, Gholipour M. Study of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Bushehr province shrimp complexes with the perspective of contamination by heavy metals (As, Cd, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, and Zn) and risk evaluation for consumer. *J Aqua Eco*. 2022;12(2):58-69. [In Persian]
18. Modheji A, NikpourQanawati Y, Larki A, Bouadhar F. Measuring the concentration of heavy metals Pb, Cd, Ni, Fe, Zn and Cu in Sarkho, Shoshak, Tonga, Shorideh, Halva and *Metapenaeus affinis* shrimps. *J Mar Sci Technol*. 2023;22(3):27-39. [In Persian]
19. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), Species Fact Sheets. FAO (Fisheries and Aquaculture Department), 2016; No. 123.
20. Mumtazan M, Asefi M, Zamani A, Mahmoudi R. Comparing the correlation of age, length and weight with mercury concentration in the muscle of two species of fish, Shirbat and Hamri, from Maroon Behbahan river. *Water and Sewage*, 2015;54-60:(2)27. [In Persian]
21. Koosaj N, Jafarian H, Rahmani R, Patimar A, Gholipour H. Investing some heavy metals in the muscle of Sartiz shrimp (*Metapenaeus affinis*) and evaluating its risk for human consumption in Hormozgan province. *Environ Res*. 2019;10(19):245-254. [In Persian]
22. Loqmani M, Sadeghi P, Jadgal N. Investigating the accumulation of heavy metals (cadmium, copper, iron, tin, arsenic, lead and mercury) in the muscle tissue of Indian white shrimp (*Penaeus indicus*) in the ports of Bryce, Goiter and Kanark. *J Iran Fish*. 2018;28(3):153-173. [In Persian]
23. Moradi Z, Selgi I., The study of Sartiz white shrimp (*Metapenaeus affinis*) in Bushehr beaches in term of contamination with heavy metals iron, zinc, copper, manganese and nickel and risk estimation for the consumer. *Animal Research Iranian BIOLOGU*, 2017;31(4):395-405. [In Persian]
9. Riahi A, Ismaili A, Savari A. Determining the amount of heavy metals (Ni, Zn, Cu, Cd, Co, Pb) in water, sediments and aquatic species of Karun River (73-72). *Iran J Nat Resour*. 2008;52(2):46-37. [In Persian]
10. Velayatzadeh M, Tabibzadeh M. The importance and application of aquatic plants in biological monitoring of heavy metals, the first specialized bioremediation conference, Tehran, 2013. [In Persian]
11. Abedi SZ, Khalesi MK, Eskandari Mountain S. Comparison of cadmium heavy metal absorption in common carp (*Cyprinus carpio*) without *Pangasius hypophthalmus* cat scales. *J Anim Biol*. 2012;5(2):46-35. [In Persian]
12. Adeli A. Properties of fish and its nutritional value for humans. *J Fish*. 2015;9(3):61-68. [In Persian]
13. Gholamhosseini A, Shiry N, Soltanian S, Banaee M. Bioaccumulation of metals in marine fish species captured from the northern shores of the Gulf of Oman, Iran. *Reg Stud Mar Sci*. 2021;41:101599. [In Persian]
14. Wu XY, Yang YF. Heavy metal (Pb, Co, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn and Zn) concentration in harvest size white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) tissues from aquaculture and wild source. *J. Food Compos. Anal*. 2011;24(1):62-65.
15. Loqmani M, Sharifian S, Risk assessment of heavy metal risk for consumers of Indian white shrimp (*Penaeus indicus*). *Scientific J Iran Fish*. 2020;29(1):169-174. [In Persian]
16. Ezemoneya LI, Adebayoa PO, Enunekuc AA, Tongoa I, Ogbomidab E. Potential health risk consequences of heavy metal concentrations in surface water, shrimp (*Macrobrachium macrobrachion*) and fish (*Brycinus longipinnis*) from Benin River, Nigeria. *Toxicol Rep*. 2019;6:1-9.
17. Askari Sarmowr F, Hosseininezhad M, Salighehzadeh R, Shiry N, Gholamhossein

Investigating the concentration of heavy metals (copper, zinc and nickel) in the muscle tissue of western white leg shrimp in the breeding farms of Bushehr province. Mar Sci Technol J. 2013;12(3):91-100. [In Persian]

24. Witkowska D, Słowik J, Chilicka K. Heavy metals and human health: Possible exposure pathways and the competition for protein binding sites. Molecules. 2021;26(19):6060.

25. Khoramabadi A, Alizadeh Doghiklai A, Mohammadi M, Ain Elahi F.

Research Article

The Effect of Hydroxyl Selenomethionine on Performance, Egg Quality Traits and Blood Parameters Old Broiler Breeders

Ahmad Manafi, Yahya Ebrahimnezhad*, Habib Aghdam Shahriar, Abdolahad Shaddel Telli, Abolfazl Ghorbani, Naser Maheri-Sis

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

*Corresponding author: ebrahimnezhad@iau.ir

Received: 13 August 2025

Accepted: 13 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1129024

Abstract

Selenium (Se) is an essential rare element that plays a vital role in the health and performance of animals. This study was conducted with the aim of investigating the effect of hydroxyl selenomethionine (OH-SeMet) in the diet of broiler breeder and old broiler breeder roosters on production performance, quality traits of eggs and blood parameters. For this purpose, 260 broiler breeders Ross 308 (45 weeks old) were used in a completely randomized design with four treatments and five repetitions (13 hens and one rooster in each replication). Experimental treatments included: 1) a basal diet without OH-SeMet (control), 2) a broiler breeder diet without OH-SeMet and a rooster diet containing 0.1 mg/kg OH-SeMet, 3) broiler breeder diet containing 0.1 mg/kg OH-SeMet and rooster diet without OH-SeMet and 4) broiler breeder and rooster diet containing 0.1 mg/kg OH-SeMet. Performance and quality traits of eggs were measured weekly at 50, 55 and 60 weeks of age. The results showed that the use of 0.1 mg/kg OH-SeMet in the broiler breeder diet and the broiler breeder and rooster diet improved the laying percentage, egg weight, egg mass and feed conversion ratio compared to the control treatment ($p < 0.05$). Feeding broiler breeder and rooster with diet containing OH-SeMet improved the mentioned parameters compared to feeding broiler breeders alone ($p < 0.05$). Eggshell strength increased in treatments 3 and 4 compared to control and treatment 2 ($p < 0.05$). The concentration of selenium and glutathione peroxidase in the treatments fed with OH-SeMet was significantly higher than the control treatment ($p < 0.05$). The use of 0.1 mg/kg of OH-SeMet may be a practical approach to help production performance and eggshell strength in old broiler breeders.

Keywords: Hydroxy selenomethionine, Broiler breeders, Broiler breeder roosters, Laying, Eggs.



مقاله پژوهشی

تأثیر هیدروکسی سلنومتیونین بر عملکرد، صفات کیفی تخم‌مرغ و فراسنجه‌های خون مرغ‌های مادر گوشتی مسن

احمد منافی، یحیی ابراهیم‌نژاد^{*}، حبیب اقدم شهریار، عبدالاحد شاددل تلی، ابوالفضل قربانی، ناصر ماهری سیس

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

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

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۳

DOI: 10.60833/ascij.2025.1129024

چکیده

سلنیوم (Se) یک عنصر ضروری کمیاب است که نقش حیاتی در سلامت و عملکرد حیوانات دارد. این مطالعه با هدف بررسی اثر هیدروکسی سلنومتیونین در جیره غذایی مرغ‌ها و خروس‌های مادر گوشتی مسن بر عملکرد تولیدی، صفات کیفی تخم‌مرغ و فراسنجه‌های خون انجام شد. از ۲۶۰ مرغ مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ (۴۵ هفته) در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و پنج تکرار (۱۳ قطعه مرغ و یک خروس در هر تکرار) استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) جیره پایه بدون هیدروکسی سلنومتیونین (شاهد)، (۲) جیره مرغ‌های مادر بدون هیدروکسی سلنومتیونین و جیره خروس‌ها حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین، (۳) جیره مرغ‌های مادر حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین و جیره خروس‌ها بدون هیدروکسی سلنومتیونین و (۴) جیره خروس‌ها و مرغ‌های مادر گوشتی حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین بودند. عملکرد به‌صورت هفتگی و صفات کیفی تخم‌مرغ در سنین ۵۰، ۵۵ و ۶۰ هفتگی اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که استفاده از ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین در جیره مرغ‌های مادر گوشتی و جیره مرغ و خروس‌های مادر گوشتی باعث بهبود درصد تخم‌گذاری، وزن تخم‌مرغ، توده تخم‌مرغ و ضریب تبدیل خوراک در مقایسه با تیمار شاهد شد ($p < 0/05$). تغذیه مرغ و خروس با جیره حاوی هیدروکسی سلنومتیونین باعث بهبود فراسنجه‌های ذکر شده در مقایسه با تغذیه مرغ‌های مادر گوشتی به‌تنهایی شد ($p < 0/05$). استحکام پوسته تخم‌مرغ در تیمارهای ۳ و ۴ نسبت به تیمار شاهد و ۲ افزایش یافت ($p < 0/05$). غلظت سلنیوم و گلوکاتایون پراکسیداز خون در تیمارهای تغذیه شده با هیدروکسی سلنومتیونین به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود ($p < 0/05$). استفاده از ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین در جیره مرغ و هم خروس مادر گوشتی ممکن است یک رویکرد عملی برای کمک به عملکرد تولید و استحکام پوسته تخم‌مرغ در مرغ‌های مادر گوشتی مسن باشد.

کلمات کلیدی: هیدروکسی سلنومتیونین، مرغ مادر گوشتی، خروس مادر گوشتی، تخم‌گذاری، تخم‌مرغ.

مقدمه

آنزیم‌های حیاتی سلنوپروتئین‌ها است (۲). سلنیوم نقش مهمی در ساختار گلوکاتایون پراکسیداز دارد و از این طریق، آسیب‌های اکسیداتیو را کاهش داده (۳) و قابلیت جوجه‌درآوری تخم‌مرغ‌های بارور را بهبود

سلنیوم عنصری ضروری در تغذیه طیور است که تأثیر قابل‌توجهی بر عملکرد تولیدی و تولیدمثلی گله‌های مادر دارد (۱). خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدویروسی سلنیوم، ناشی از نقش آن در ساختار

می‌بخشد (۴). سلنیوم به دو شکل آلی و معدنی وجود دارد، با این وجود ویژگی‌های نامطلوب شکل معدنی آن نظیر زیست‌فراهمی و کارایی پایین، سمیت، اثرات متقابل با سایر مواد معدنی و ناتوانی در حفظ ذخایر سلنیوم بدن، تمایل به استفاده از سلنیوم آلی در جیره را افزایش داده است (۵). دو حوزه اصلی باید در رابطه با تغذیه سلنیوم در مرغ مادر در نظر گرفته شود. اولاً، مشخص شده که سلنیوم نقش مهمی در حفظ کیفیت مایع منی ایفا می‌کند و وضعیت بهینه سلنیوم در خروس عامل مهمی برای اطمینان از باروری در نظر گرفته می‌شود (۶). ثانیاً، وضعیت سلنیوم تخم-مرغ‌های مرغ مادر برای حفظ سیستم آنتی‌اکسیدانی جنین در حال رشد، اهمیت زیادی دارد. به‌طور کلی پذیرفته شده است که فرآیند جوجه‌کشی باعث تنش اکسیداتیو می‌شود و بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی جنین، پتانسیل افزایش قابلیت جوجه‌کشی را دارد (۷).

علاوه بر این، زمانی که کمبود سلنیوم در جیره‌ها وجود دارد یا زمانی که نیاز سلنیوم به‌طور کامل پوشش داده نمی‌شود، مرغ‌های مادر و جوجه‌های گوشتی ممکن است کاهش عملکرد کلی را نشان دهند (۸). از آنجایی که بسیاری از مواد تشکیل‌دهنده خوراک دارای سلنیوم کم هستند، جیره غذایی طيور تجاری همیشه با سلنیوم از طریق پیش مخلوط‌ها به مقدار ۰/۲ تا ۰/۳ میلی‌گرم/کیلوگرم بسته به منبع، تکمیل می‌شوند تا از کمبود آن جلوگیری شود. سلنیوم را می‌توان به‌صورت غیر آلی (سدیم سلنیت)، یا آلی مانند مخمرهای سلنیزه شده یا به شکل‌های شیمیایی خالص مانند هیدروکسی سلنومتیونین یا L-سلنومتیونین به جیره طيور اضافه کرد. به تازگی، منبع جدیدی از سلنیوم آلی پایدار که هیدروکسی آنالوگ سلنومتیونین است، به‌وجود آمده و به‌جای سلنومتیونین که در فرم خالص، ناپایدار است و به سادگی اکسید می‌شود، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

زیست‌فراهمی بالاتر ترکیب سلنو آمینواسید در مقایسه با سایر اشکال آلی یا معدنی در گذشته تایید شده است (۹). این امر مقدار مکمل سلنیوم مورد استفاده در جیره را کاهش می‌دهد. چندین گزارش حاکی از بهبود در تولیدی مرغ‌های مادر گوشتی در پایان دوره تخم‌گذاری در اثر سلنیوم آلی است. به‌عنوان مثال، در پایان دوره تولیدمثلی (۵۰ هفته)، در مرغ‌هایی که با جیره‌ی حاوی سلنیوم آلی تغذیه شدند، درصد تولید و تخم‌های قابل جوجه‌کشی به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت (۱۰). بیشتر تحقیقات در مورد سلنیوم در تغذیه مرغ مادر با ۰/۳ میلی‌گرم/کیلوگرم خوراک انجام شده است (۱۱؛ ۱۲). با این حال، اتحادیه اروپا مقدار سلنیوم جیره را به ۰/۲ میلی‌گرم/کیلوگرم خوراک محدود کرده است (۱۳). علاوه بر این، صنعت طيور به‌دنبال منابع مؤثرتری از ترکیبات آلی سلنیوم می‌باشد تا بالاترین زیست‌فراهمی را داشته باشد و نیازهای سلنیوم را در شرایط چالش‌برانگیز برآورده کند. از آن-جایی که هیدروکسی سلنومتیونین بسیار مؤثرتر از منابع دیگر سلنیوم به تخم‌مرغ منتقل می‌شود (۱۴) این فرضیه وجود دارد که جایگزینی منابع مختلف سلنیوم، در سطح تجاری توسط هیدروکسی سلنومتیونین در دز ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم جیره مرغ‌های مادر گوشتی و خروس‌ها می‌تواند وضعیت و عملکرد آن‌ها را به-طور بالقوه بهبود بخشد. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر هیدروکسی سلنومتیونین در جیره مرغ و خروس‌های مادر گوشتی مسن بر عملکرد تولیدی، صفات کیفی تخم‌مرغ و فراسنجه‌های خون انجام شد.

مواد و روش‌ها

پرندگان، تیمارها و مدیریت: این آزمایش با استفاده از ۲۶۰ مرغ مادر گوشتی و ۲۰ خروس مادر گوشتی (۴۵ هفته‌ای) از سویه راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً

تصادفی با پنج تکرار (۱۳ مرغ و یک خروس در هر تکرار) به مدت ۹۰ روز انجام شد. دستورالعمل‌های پرورش مرغ‌های مادر گوشتی شامل کنترل نوردی، دما، تهویه، آب آشامیدنی، واکسیناسیون و غیره برای تمامی تیمارها یکسان و بر اساس شرایط استاندارد سویه اجرا شد (۱۵). تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) جیره پایه بدون هیدروکسی سلنومتیونین (شاهد)، (۲) جیره مرغ‌های مادر بدون هیدروکسی سلنومتیونین و جیره خروس‌ها حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین، (۳) جیره مرغ‌های مادر حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین و جیره خروس‌ها بدون هیدروکسی سلنومتیونین و (۴) جیره مرغ‌ها و خروس‌های مادر گوشتی حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین بودند. قبل از تنظیم جیره‌های آزمایشی، ابتدا مواد خوراکی مصرفی طبق روش (۱۶) از نظر ماده خشک، انرژی خام، پروتئین خام، عصاره اتری و فیبر خام مورد آنالیز قرار گرفتند. جیره‌ها از لحاظ میزان ترکیبات مواد مغذی یکسان بودند. دان مصرفی در گروه‌های آزمایشی، مطابق با استانداردهای شرکت (۱۵) محاسبه و در اختیار پرندگان قرار گرفت (۱۶۲ گرم به ازای هر مرغ و ۱۴۵ گرم به ازای هر خروس از هفته ۴۵ تا ۶۰). جیره‌های آزمایشی به صورت آردی و به روش دستی به پرندگان داده شد. هیدروکسی سلنومتیونین نیز به صورت پودر به جیره‌ها اضافه شد.

عملکرد تولیدی: تخم‌مرغ‌ها دو بار در روز جمع‌آوری شدند و تعداد تخم‌ها و میانگین وزن تخم-مرغ در پایان هر روز ثبت شد. توده تخم‌مرغ و ضریب تبدیل خوراک به صورت هفتگی محاسبه شدند. علاوه بر این، درصد تولید با تقسیم تعداد کل تخم‌مرغ تولید شده در هر تکرار بر روز مرغ ارزیابی شد. توده تخم‌مرغ با ضرب میانگین وزن تخم‌مرغ هر تکرار در درصد تولید آن تکرار محاسبه شد. علاوه بر

این، مصرف خوراک هفتگی برای تخمین ضریب تبدیل خوراک به توده تخم‌مرغ تقسیم شد. **صفات کیفی تخم مرغ:** در سنین ۵۰، ۵۵ و ۶۰ هفتگی از هر تکرار دو عدد تخم‌مرغ جمع‌آوری شد و مهم‌ترین صفات کیفی داخلی تخم‌مرغ شامل وزن آلبومین، وزن زرده، وزن پوسته، ارتفاع آلبومین و واحد هاو اندازه‌گیری شد. ارتفاع آلبومین تخم‌مرغ با استفاده از میکرومتر دستی اندازه‌گیری شد. بدین صورت که پس از شکستن تخم‌مرغ‌ها، سفیده‌ها روی سطح صاف قرار گرفته و سپس مقادیر ارتفاع آلبومین در هر نقطه‌ای که نوک ارتفاع سنج سفیده تخم‌مرغ را لمس می‌کرد (با فاصله یک سانتی‌متر از زرده)، ثبت شد. از معادله زیر برای محاسبه واحد هاو استفاده شد (۱۷):

$$HU = \log (AH - 1.7 \text{ EW}^{0.37 + 7.57})$$

HU: واحد هاو، AH: ارتفاع آلبومین تخم‌مرغ (میلی-متر)، EW: وزن تخم‌مرغ (گرم)، لگاریتم بر اساس ۱۰ **فراسنجه‌های خون:** در پایان آزمایش، خون از ورید بال دو پرند (یک قطعه مرغ و یک قطعه خروس) در هر تکرار جمع‌آوری شد. نمونه‌های خون با دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند تا پلاسما به دست آید. نمونه‌های پلاسما هپارینه شده به دست آمده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان اندازه‌گیری فراسنجه‌های خون ذخیره شدند. اندازه‌گیری فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون (گلوکز، تری-گلیسرید، پروتئین تام، آلبومین، سلیوم، کلسترول، HDL و LDL)، عوامل آنتی‌اکسیدانی (فعالیت سوپراکسید دسموتاز، فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز و فعالیت مالون دی‌آلدهید) و آنزیم‌های کبدی (آسپارات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز) سرم خون با استفاده از کیت‌های آنزیمی تجاری (Pars Azmoon Kits, Pars Azmoon

Table1. Composition of the basal diet of broiler breeders and roosters

Ingredient, g/kg	Broiler breeders	Broiler breeder roosters
Corn grain	625.0	532.7
Soybean meal (44% CP)	165.0	55.0
Wheat grain	40.0	65.0
Barley grain	0.0	50.0
Wheat bran	40.0	234.0
Soybean oil	12.0	8.0
Di-calcium phosphate	16.4	12.8
Bentonite	7.05	9.55
Calcium carbonate	77.2	15.4
Vitamin premix ^a	2.5	2.5
Mineral premix ^b	2.5	2.5
Salt	2.2	2.0
Sodium bicarbonate	2.2	2.35
Potassium bicarbonate	1.5	1.5
DL-methionine	1.8	1.4
L-lysine HCL	0.6	0.8
L-threonine	0.8	0.8
Choline chloride	1.0	1.0
Antioxidants	0.2	0.2
Toxin binder	1.0	1.0
Anti-ammonium extra	1.0	1.0
Phytase	0.05	0.05
Total	1000.0	1000.0
Calculated composition		
Metabolizable energy (kcal/kg)	2800	2825
Crude protein (%)	13.52	11.77
Crude fiber (%)	3.02	4.63
Calcium (%)	3.20	0.90
Available P (%)	0.34	0.30
Lysine (SID) (%)	0.60	0.43
Methionine (SID) (%)	0.38	0.30
Met + Cys (SID) (%)	0.61	0.48
Threonine (SID) (%)	0.55	0.39
DCAB (mEq/kg)	203.00	200.00

^a Vitamin premix provided per kilogram of diet: Vitamin A, 15,000 IU; vitamin D₃, 5,000 IU; vitamin E, 130 IU; vitamin K₃, 9 mg; Vitamin B₁, 6 mg; Vitamin B₂, 20 mg; vitamin B₆, 8 mg; vitamin B₉, 5 mg; vitamin B₁₂, 0.07 mg; biotin, 0.6 mg; niacin, 70 mg; pantothenic acid, 25 mg. ^b Mineral premix provided per kilogram of diet: Fe, 50 mg; Cu, 16 mg; Mn, 120 mg; Zn, 120 mg; I, 3 mg; Se, 0.3 mg.

نتایج

عملکرد: جدول ۲ اثر تیمارهای آزمایشی مختلف را بر عملکرد تولیدی مرغ‌های مادر گوشتی نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که درصد تولید، وزن و توده تخم‌مرغ و ضریب تبدیل خوراک تحت تأثیر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار و زمان قرار گرفتند. استفاده از ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین در جیره مرغ‌های مادر گوشتی و جیره مرغ و خروس‌های مادر گوشتی، باعث بهبود درصد تخم‌گذاری، وزن تخم‌مرغ، توده تخم‌مرغ و ضریب تبدیل خوراک در مقایسه با تیمار شاهد شد ($p < 0.05$).

کیفیت تخم‌مرغ: اثر هیدروکسی سلنومتیونین در جیره بر صفات کیفی تخم‌مرغ مرغ‌های مادر گوشتی در جدول ۳ گزارش شده است. با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که وزن زرده، وزن سفیده، وزن پوسته، ارتفاع آلبومین و واحد هاو تحت تأثیر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار و زمان قرار نگرفتند. اثر تیمار و زمان بر استحکام پوسته تخم‌مرغ تأثیر معنی‌داری داشت. استحکام پوسته تخم‌مرغ در تیمار ۰/۱ میلی-

گرم هیدروکسی سلنومتیونین در جیره مرغ‌های مادر گوشتی و تیمار هیدروکسی سلنومتیونین در جیره مرغ و خروس‌های مادر گوشتی نسبت به تیمار شاهد و ۰/۱ میلی‌گرم هیدروکسی سلنومتیونین در جیره خروس‌های مادر گوشتی افزایش یافت ($p < 0.05$).

فراسنجه‌های خون: نتایج مربوط به اثر هیدروکسی سلنومتیونین در جیره بر فراسنجه‌های خون، آنزیم‌های کبدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مرغ و خروس‌های مادر گوشتی در جدول ۴ و ۵ آورده شده است. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که غلظت گلوکز، تری-گلیسرید، کلسترول، HDL، LDL، پروتئین کل، آلبومین، آلکالین فسفاتاز، آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز، مالون دی‌آلدهید و سوپراکسید دسموتاز تحت تأثیر هیدروکسی سلنومتیونین قرار نگرفتند. غلظت سلیوم و گلوکاتایون پراکسیداز در تیمارهای تغذیه‌شده با هیدروکسی سلنومتیونین به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود ($p < 0.05$).

جدول ۲- اثر تیمارهای آزمایشی بر عملکرد تولیدی مرغ‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ (۶۰-۴۵ هفتگی)

Table 2. Effects of hydroxy-selenomethionine on the production performance of Ross 308 broiler breeders (45-60 weeks old)

Item		Egg production (%)	Egg weight (g)	Egg mass (g)	FCR
Treatments ¹	1	68.86 ^c	66.41 ^c	45.56 ^b	3.50 ^a
	2	69.55 ^c	66.38 ^c	45.97 ^b	3.46 ^a
	3	70.98 ^b	67.90 ^b	48.08 ^a	3.31 ^b
	4	72.99 ^a	68.23 ^a	49.66 ^a	3.20 ^c
SEM		0.18	0.05	0.11	0.01
p	Treat	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	Time	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	Treat × Time	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) جیره پایه بدون هیدروکسی سلنومتیونین (شاهد)، (۲) جیره مرغ‌های مادر بدون هیدروکسی سلنومتیونین و جیره خروس‌ها حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین، (۳) جیره مرغ‌های مادر حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین و جیره خروس‌ها بدون هیدروکسی سلنومتیونین و (۴) جیره مرغ‌های مادر و خروس‌ها حاوی ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین. SEM: میانگین خطای استاندارد، ^{a,b}-حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ است.

¹Experimental treatments include 1) a basal diet without OH-SeMet, 2) a chicken diet without OH-SeMet and a rooster diet containing 0.1 mg/kg OH-SeMet, 3) chicken diet containing 0.1 mg/kg OH-SeMet and rooster diet without OH-SeMet and 4) chicken and rooster diet contained 0.1 mg/kg OH-SeMet. ^{a, b} Means within the same column with different letters differ significantly ($p < 0.05$). SEM, standard error of means.

جدول ۳- اثر تیمارهای آزمایشی بر صفات کیفی تخم‌مرغ مرغ‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ (۶۰-۴۵ هفتگی)

Table 3. Effect of experimental treatments on egg quality traits of Ross 308 broiler breeders (45-60 weeks old)

Item		Yolk weight (%)	Albumen weight (%)	Shell weight (%)	Albumen height (mm)	Haugh unit	Shell strength (kg/m ²)
Treatments	1	28.52	62.14	9.33	6.35	76.43	2.53 ^b
	2	28.68	61.86	9.45	6.56	78.28	2.74 ^b
	3	27.96	62.57	9.46	6.70	78.44	3.26 ^a
	4	27.65	62.98	9.36	6.81	79.90	3.14 ^a
SEM		1.35	2.38	0.86	0.26	2.14	0.36
p	Treat	0.14	0.12	0.91	0.27	0.13	0.006
	Time	0.29	0.87	0.15	0.41	0.06	0.001
	Treat×Time	0.16	0.34	0.88	0.53	0.74	0.16

جدول ۴- اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های خون مرغ و خروس‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ (۶۰-۴۵ هفتگی)

Table 4. Effect of experimental treatments on blood parameters of Ross 308 broiler breeder hens and roosters (45-60 weeks old)

Treatments	Glucose (mg/dL)	Triglycerides (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Total Protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	Selenium (μg/dL)
1	322.40	3282.57	143.43	82.09	34.57	7.51	2.81	133.23 ^b
2	326.10	3016.08	149.71	88.33	33.75	9.05	2.18	146.47 ^{ab}
3	312.60	2894.28	162.78	95.61	40.98	9.59	2.90	155.26 ^a
4	305.60	2463.20	167.94	62.09	35.45	9.73	2.47	152.08 ^a
SEM	18.94	305.98	12.08	9.90	2.67	0.72	0.40	3.40
p	0.86	0.30	0.46	0.11	0.23	0.13	0.58	0.01

جدول ۵- اثر تیمارهای آزمایشی بر آنزیم‌های کبدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مرغ و خروس‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ (۶۰-۴۵ هفتگی)

Table 5. Effect of experimental treatments on liver enzymes and antioxidant capacity of Ross 308 broiler breeder hens and roosters (45-60 weeks old)

Treatments	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	MDA (mmol/mL)	SOD (U/mL)	GPx (U/mL)
1	1823.30	241.30	109.82	3.78	379.14	76.18 ^b
2	1849.40	227.10	109.02	3.16	341.80	83.64 ^a
3	1857.60	219.20	111.15	3.45	333.35	82.62 ^a
4	1810.50	226.20	97.34	3.75	392.74	84.33 ^a
SEM	20.59	10.32	9.49	0.44	23.41	2.88
p	0.33	0.49	0.71	0.73	0.23	0.03

بحث

داد. مطالعات نشان داده است که سلنیوم اثرات مثبتی بر عملکرد مرغ‌های مادر گوشتی دارد (۷). نتایج Li و همکاران (۲۰) نشان دادند که سلنیوم مخمر و سلنومتیونین، درصد تخم‌گذاری را در مقایسه با سلنیت سدیم افزایش می‌دهد، در حالی که سطوح مختلف سلنیوم هیچ تأثیری نداشت. برخی از مطالعات در مورد تأثیر منابع سلنیوم بر عملکرد طیور یافته‌های متناقضی را ارائه کرده‌اند. به گفته Liu و همکاران (۲۱)، جیره‌های غذایی با منابع و غلظت‌های مختلف

در مرغ‌های مادر گوشتی با افزایش سن به تدریج عملکرد و نسبت تولید تخم‌مرغ کاهش می‌یابد (۱۹). پیری تخمدان باعث کاهش شدید تولید تخم‌مرغ پس از ۴۰ تا ۴۸۰ روزگی می‌شود که ارزش تجاری و تولید تخم‌مرغ را کاهش می‌دهد. مطالعه حاضر نشان داد که افزودن ۰/۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین به جیره مرغ‌های مادر گوشتی باعث افزایش تخم‌گذاری، وزن و توده تخم‌مرغ شده و ضریب تبدیل خوراک را نسبت به گروه شاهد کاهش

شود. صفات کیفی تخم‌مرغ به‌جز استحکام پوسته تخم‌مرغ، تحت تأثیر مکمل هیدروکسی سلنومیتونین قرار نگرفتند. صفات کیفی تخم‌مرغ می‌تواند تحت تأثیر عوامل متعددی قرار گیرد که از جمله آنها می‌توان به منشاء ژنتیکی سویه، تغذیه، سلامت، شرایط محیطی و امکانات مورد استفاده اشاره کرد. در مطابقت نتایج تحقیق حاضر با نتایج سایر محققین، محققین نشان دادند که شکل آلی سلنیوم بر کیفیت پوسته تخم‌مرغ تأثیر می‌گذارد (۲۹)، اگرچه Pavlović و همکاران (۳۰) در مخالفت گزارش کردند که نه شکل و نه سطح سلنیوم بر کیفیت پوسته تخم‌مرغ تأثیر نمی‌گذارد. قدرت شکستن پوسته تخم‌مرغ تحت تأثیر سلنیوم جیره غذایی در این مطالعه قرار گرفت و این با یافته‌های Invernizzi و همکاران (۳۱) مطابقت دارد که اهمیت شکل آلی سلنیوم را از نظر زیست-فراهمی و جذب بیشتر به غشای پوسته تخم‌مرغ گزارش کردند که به‌نوبه خود می‌تواند دلیل بالا بودن استحکام پوسته باشد. مکمل‌های معدنی کم‌نیاز، هم-جوشی اولیه را در مراحل اولیه تشکیل پوسته افزایش داده و از این رو استحکام مکانیکی تخم‌مرغ را بدون توجه به ضخامت پوسته بهبود می‌بخشد (۳۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که واحد هاو تحت تأثیر مکمل هیدروکسی سلنومیتونین قرار نگرفت. این نتایج مطابق با یافته‌های Liu و همکاران (۲۱) بود که پس از مقایسه منابع سلنیوم در سطوح بالا و پایین مشاهده کردند، بر خلاف نتایج این تحقیق، Arpášová و همکاران (۳۳) واحد هاو بهتری را در پرندگان تغذیه-شده با مخمر سلنیزه شده گزارش کردند. سایر فراسنجه‌ها مانند وزن سفیده و زرده و ارتفاع آلبومین تحت تأثیر جیره‌های غذایی قرار نگرفتند که با گزارش Skřivan و همکاران (۳۴) مطابقت دارد. در میان تمام عوامل الفاکتنده پیری تخمدان، تنش اکسیداتیو که ناشی از تجمع گونه‌های فعال اکسیژن

سلنیوم به‌طور قابل‌توجهی بر مصرف خوراک روزانه و درصد تولید تخم‌مرغ تأثیر دارد، اما بر میانگین وزن تخم‌مرغ یا ضریب تبدیل خوراک تأثیری نداشت. با این حال، در مطالعات دیگر هیچ‌گونه تغییری در تأثیر منابع سلنیوم بر عملکرد تولید یافت نشد (۲۲). تناقض در نتایج می‌تواند ناشی از عواملی از جمله نوع پرند، جیره غذایی و محیط، مقدار سلنیوم اضافه شده، منبع و طول آزمایش باشد. سلنیوم یک جزء ضروری دیودیناز است که به حفظ سطح هورمون تیروئید از طریق متابولیسم کمک می‌کند (۲۳). Wang و همکاران (۲۴) از ال-سلنومیتونین به‌جای سلنیت سدیم استفاده کردند و افزایش قابل‌توجهی در سطح mRNA دیودیناز-۱ در کبد جوجه‌های یک‌روزه گزارش کردند. این نشان می‌دهد که استفاده از سلنیوم آلی می‌تواند هورمون‌های تیروئید را بهتر فعال کرده، قابلیت هضم پروتئین را بهبود بخشیده و سوخت‌وساز انرژی را در مقایسه با فرم‌های معدنی بهبود بخشد (۲۵). دلیل بالقوه دیگر، زیست‌فراهمی بالای هیدروکسی سلنومیتونین است، زیرا ساختار شیمیایی هیدروکسی سلنومیتونین بسیار شبیه متیونین است و Met-tRNA نمی‌تواند بین متیونین و هیدروکسی سلنومیتونین تمایز قائل شود. این به هیدروکسی سلنومیتونین اجازه می‌دهد تا مستقیماً با پروتئین‌ها در بدن ترکیب شده و به‌عنوان منبع سلنیوم مورد استفاده قرار گیرد (۲۶). پیشنهاد شده است که بیان بیشتر سلنوپروتئین ممکن است وضعیت تغذیه و عملکرد متابولیکی سلنیوم را بهتر نشان دهد (۲۴). سلنوپروتئین برای انتقال سریع کلسیم در سلول‌های ایمنی، تکثیر سلول‌های T و تراگذاری یا دیپدز نوتروفیل‌ها ضروری است (۲۷) و در جابه‌جایی پروتئین‌های کژتابیده در شبکه آندوپلاسمی نقش دارد (۲۸). در نهایت، این مکانیسم‌ها می‌تواند منجر به بهبود عملکرد تولید در مرغ‌های مادر گوشتی مسن

خون، پروتئین کل و فراسنجه‌های لیپیدی خون تأثیری ندارد که با مطالعه Liu و همکاران (۲۱) مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزودن ۰/۱ میلی-گرم/کیلوگرم هیدروکسی سلنومتیونین در جیره مرغ‌های مادر گوشتی مسن، تولید تخم‌مرغ، وزن تخم‌مرغ و ضریب تبدیل خوراک در مقایسه با تیمار شاهد بهبود یافت. بنابراین، استفاده از هیدروکسی-سلنومتیونین ممکن است یک رویکرد عملی برای کمک به عملکرد تولیدی در مرغ‌های مادر گوشتی مسن باشد. همچنین می‌توان اظهار داشت که یک جیره پایه، سلنیوم مورد نیاز مرغ‌های مادر گوشتی و خروس‌ها را به‌طور کامل تامین نمی‌کند. مکمل هیدروکسی سلنومتیونین در جیره تأثیر مثبتی بر استحکام پوسته تخم‌مرغ و غلظت سلنیوم و گلوکاتیون پراکسیداز خون داشت، با این حال پیشنهاد می‌شود غلظت سلنیوم تخم‌مرغ نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

منابع

1. Surai PF, Fisinin VI. Selenium in poultry breeder nutrition: An update. *Anim Feed Sci Technol.* 2014;191:1-15.
2. Sharideh H, Zhandi M, Zaghari M, Akhlaghi A, Hussaini SMH, Yousefi AR. Changes in broiler breeder hen's immunity by zinc oxide and phytase. *Iran J Vet Res.* 2019;20(2):120-131.
3. Surai PF. Antioxidant systems in poultry biology: superoxide dismutase. *J Anim Res Nutr.* 2016;1(1):8-23.
4. Surai PF. Selenium in nutrition and health (Vol. 974). Nottingham: Nottingham university press. 2006.
5. Han F, Chen D, Yu B, Luo W. Effects of different selenium sources and levels on serum biochemical parameters and tissue selenium retention in rats. *Front Agric China.* 2009;3:221-225.

تولید شده در طول فعالیت متابولیک است، یکی از غالب‌ترین عوامل است (۳۵). از آنجایی که سلنیوم در حفظ تعادل ردوکس نقش اساسی دارد، می‌توان از آن به‌عنوان یک استراتژی تغذیه برای کمک به حیوانات برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از پیری استفاده کرد (۶). با این حال، همان‌طور که در این مطالعه مشاهده شد، مکمل هیدروکسی سلنومتیونین می‌تواند در حمایت از عملکرد پرندگان کارآمدتر باشد. طبق نتایج ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نشان داده شده در این مطالعه، فعالیت گلوکاتیون پراکسیداز خون پرندگان تحت تأثیر منبع سلنیوم می‌باشد. نتایج مطالعات قبلی این یافته‌ها را تأیید می‌کند که در آن فعالیت بالاتر گلوکاتیون پراکسیداز هنگام تغذیه هیدروکسی سلنومتیونین در مقایسه با سلنیت سدیم مشاهده شد (۳۶). گلوکاتیون پراکسیداز یک سلنوپروتئین است که نقش مهمی در پاسخ به تنش اکسیداتیو برای حفظ هموستاز ایفا می‌کند (۳۷) و در دفاع آنزیمی در برابر تخریب گونه‌های فعال اکسیژن، که به‌طور طبیعی توسط پرندگان تولید می‌شوند، نقش دارد (۳۸). غلظت بالاتر گلوکاتیون پراکسیداز در پرندگان تغذیه-شده با هیدروکسی سلنومتیونین پتانسیل بیشتری را برای مبارزه با تنش اکسیداتیو نشان می‌دهد و بیان بازده تولید بالاتر در مرغ‌های مادر گوشتی مسن را تضمین می‌کند (۱۴). آلبومین یکی از منابع مهم پروتئینی است که در کبد سنتز می‌شود و وظایف اصلی آن شامل حفظ فشار اسمزی پلاسما، تامین انرژی و ترمیم بافت و به‌عنوان یک حامل درگیر در انتقال مواد مغذی برای حفظ تعادل دینامیکی پروتئین بافت بدن است (۳۹). Yang و همکاران (۴۰) با افزودن ۰/۱۵، ۰/۳۰، ۰/۴۵ و ۰/۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم سلنیت سدیم تفاوت معنی‌داری در پروتئین کل و آلبومین مشاهده نکردند. در مطالعه حاضر مشخص شده که مکمل هیدروکسی سلنومتیونین بر آلبومین

14. Brito ANEF, Kaneko IN, Cavalcante, DT, Cardoso AS, Givisiez PEN, Costa, FG. Hydroxy-selenomethionine enhances the productivity and egg quality of 50-to 70-week-old semi-heavy laying hens under heat stress. *Poult Sci.* 2023;102(2):102320.
15. Aviagen. Ross 308 parent stock: nutrition specifications. Accessed Apr. http://eu.aviagen.com/assets/Tech-Center/Ross_PS/Ross308-PS-NS-2016-EN.pdf. 2018.
16. AOAC. Official methods of analysis (16th Ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists. 1995.
17. Haugh R. The haugh unit for measuring egg quality. *U S Egg Poult Mag.* 1937;43:522-555.
18. SAS. STAT User's Guide, Version 9.2. SAS Inst. Inc., Cary, NC. 2009.
19. Dunn IC. Long Life Layer; genetic and physiological limitations to extend the laying period. In *Proceedings of the 19th European Symposium on Poultry Nutrition*. 2013;19:124-129.
20. Li Y, Mu T, Li R, Miao S, Jian H, Dong X, Zou X. Effects of different selenium sources and levels on the physiological state, selenoprotein expression, and production and preservation of selenium-enriched eggs in laying hens. *Poult Sci.* 2024;103(2):103347.
21. Liu H, Yu Q, Fang C, Chen S, Tang X, Ajuwon KM, Fang R. Effect of selenium source and level on performance, egg quality, egg selenium content, and serum biochemical parameters in laying hens. *Foods.* 2020;9(1):68-79.
22. Woods SL, Sobolewska S, Rose SP, Whiting IM, Blanchard A, Ionescu C, et al. Effect of feeding different sources of selenium on growth performance and antioxidant status of broilers. *Br Poult Sci.* 2020;61(3):274-280.
23. Daniels LA. Selenium metabolism and bioavailability. *Biol Trace Elem Res.* 1996;54:185-199.
6. Surai PF, Surai, PF. Molecular mechanisms of selenium action: selenoproteins. *Selenium in Poultry Nutrition and Health*. Wageningen, Netherlands: Wageningen Academic Publishers. 2018; 67-122.
7. Rajashree K, Muthukumar T, Karthikeyan N. Comparative study of the effects of organic selenium on hen performance and productivity of broiler breeders. *Br Poult Sci.* 2014;55(3):367-374.
8. Zhao R, Li K, Wang J, Wang Y, Wu R, Zhan X. Effects of different forms and levels of selenomethionine on productive performance and antioxidant status of broiler breeders and its offspring. *Biol Trace Elem Res.* 2019;188:478-484.
9. Couloigner F, Jlali M, Briens M, Rouffineau F, Geraert PA, Mercier Y. Selenium deposition kinetics of different selenium sources in muscle and feathers of broilers. *Poult Sci.* 2015;94(11): 2708-2714.
10. Khan MT, Mahmud A, Zahoor I, Javed K. Organic and inorganic selenium in Aseel chicken diets: Effect on hatching traits. *Poult Sci.* 2017; 96(5):1466-1472.
11. Zhang L, Wang YX, Zhou Y, Zheng L, Zhan XA, Pu QH. Different sources of maternal selenium affect selenium retention, antioxidant status, and meat quality of 56-day-old offspring of broiler breeders. *Poult Sci.* 2014; 93(9):2210-2219.
12. Emamverdi M, Zare-Shahneh A, Zhandi M, Zaghari M, Minai-Tehrani D, Khodaei-Motlagh M. An improvement in productive and reproductive performance of aged broiler breeder hens by dietary supplementation of organic selenium. *Theriogenology.* 2019; 126:279-285.
13. EC—European Commission. Commission executive regulations (EU) No 427/2013 of 8 May 2013 concerning the authorisation of selenomethionine produced by *Saccharomyces cerevisiae*. 2013.

32. Mabe I, Rapp C, Bain MM, Nys Y. Supplementation of a corn-soybean meal diet with manganese, copper, and zinc from organic or inorganic sources improves eggshell quality in aged laying hens. *Poult Sci.* 2003;82(12):1903-1913.
33. Arpášová H, Petrovič V, Mellen M, Kačániová M, Čobanová K, Leng L. The effects of supplementing sodium selenite and selenized yeast to the diet for laying hens on the quality and mineral content of eggs. *J Anim Feed Sci.* 2009;18(18):90-100.
34. Skrivan M, Simane J, Dlouhá G, Doucha J. Effect of dietary sodium selenite, Se-enriched yeast and Se-enriched *Chlorella* on egg Se concentration, physical parameters of eggs and laying hen production. *Czech J Anim Sci.* 2006;51(4):163.
35. Liu X, Lin X, Zhang S, Guo C, Li J, Mi Y, et al. Lycopene ameliorates oxidative stress in the aging chicken ovary via activation of Nrf2/HO-1 pathway. *Aging.* 2018;10(8):21162.
36. Sun H, Zhao L, Xu ZJ, De Marco M, Briens M, Yan XH, et al. Hydroxy-selenomethionine improves the selenium status and helps to maintain broiler performances under a high stocking density and heat stress conditions through a better redox and immune response. *Antioxidants.* 2021;10(10):1542.
37. Wang X, Wu Q, Wan D, Liu Q, Chen, D, Liu Z, et al. Fumonisin: oxidative stress-mediated toxicity and metabolism *in vivo* and *in vitro*. *Arch Toxicol.* 2016;90:81-101.
38. Panda AK, Cherian G. Role of vitamin E in counteracting oxidative stress in poultry. *J Poult Sci.* 2014;51(2):109-117.
39. Ahmed AF, Constable PD, Misk NA. Effect of feeding frequency and route of administration on abomasal luminal pH in dairy calves fed milk replacer. *J Dairy Sci.* 2002;85(6):1502-1508.
24. Wang Z, Kong L, Zhu L, Hu X, Su P, Song Z. The mixed application of organic and inorganic selenium shows better effects on incubation and progeny parameters. *Poult Sci.* 2021;100(2):1132-1141.
25. Saleh AA. Effect of dietary mixture of *Aspergillus* probiotic and selenium nanoparticles on growth, nutrient digestibilities, selected blood parameters and muscle fatty acid profile in broiler chickens. *Anim Sci Pap Rep.* 2014;32(1):65-79.
26. Hachemi MA, Cardoso D, De Marco M, Geraert PA, Briens M. Inorganic and organic selenium speciation of seleno-yeasts used as feed additives: new insights from elemental selenium determination. *Biol Trace Elem Res.* 2023;201(12): 5839-5847.
27. Zoidis E, Seremelis I, Kontopoulos N, Danezis GP. Selenium-dependent antioxidant enzymes: Actions and properties of selenoproteins. *Antioxidants.* 2018;7(5):66-82.
28. Curran JE, Jowett JB, Elliott KS, Gao Y, Gluschenko K, Wang J, et al. Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nat Genet.* 2005;37(11):1234-1241.
29. Kieliszek M, Błażej S. Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: a review. *Molecules.* 2016;21(5):609.
30. Pavlović Z, Miletic I, Jokić Ž, Pavlovski Z, Škrbić Z, Šobajić S. The effect of level and source of dietary selenium supplementation on eggshell quality. *Biol Trace Elem Res.* 2010;133:197-202.
31. Invernizzi G, Agazzi A, Ferroni M, Rebucci R, Fanelli A, Baldi A, et al. Effects of inclusion of selenium-enriched yeast in the diet of laying hens on performance, eggshell quality, and selenium tissue deposition. *Ital J Anim Sci.* 2013;12(1):1-13.

tissues of Juvenile Cobia. Chin J Anim Nutr. 2016;28(12):3894-3904.

40. Yang YuanZhi YY, Nie JiaQuan NJ, Tan BeiPing TB, Dong XiaoHui DX, Yang QiHui YQ, Chi ShuYan CS. Effects of selenium source and selenium level on growth performance, liver and serum antioxidant indices and selenium content in

Research Article

Investigating the Effects of Organic and Inorganic Forms of Zinc, Copper and Manganese on the Qualitative Traits of the Broiler Breeder Eggshell

Seyede Atiye Mojaverian, Shahabodin Gharahveysi*, Mohsen Hajipour

Department of Animal Sciences, QaS.C., Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

*Corresponding author: s.gharavysi@qaemiau.ac.ir

Received: 4 May 2024

Accepted: 13 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1118943

Abstract

One of the main concerns in achieving peak production in broiler breeders is eggshell quality traits, which are very important and effective in the profitability of the breeder flock. The present study was conducted to investigate the effects of organic and inorganic forms of copper, zinc, and manganese on egg quality traits of Ross 308 broiler breeder hens. 30 pens were used, and 8 hens and one rooster were placed in each pen. This research was conducted as a factorial experiment in a completely randomized design. The first factor included organic and inorganic forms and the second factor included zinc, copper, and manganese elements. The number of treatments and replications were 6 and 5, respectively. Eggshell quality traits of broiler breeder hens were measured at weeks 33, 37, and 40. The collected data were analyzed using the LSmeans procedure using SAS statistical software. The results showed that organic zinc significantly increased eggshell weight ($p < 0.05$). Organic manganese improved eggshell thickness and strength ($p < 0.05$). The use of organic forms of zinc and manganese in the diet of broiler breeders was effective in improving the quality traits of their eggs, therefore, the use of organic forms of manganese, copper, and especially zinc in the diet of broiler breeders is recommended.

Keywords: Broiler Breeder, Copper, Eggshell, Manganese, Organic Zinc.



بررسی اثرات فرم آلی و معدنی عناصر روی، مس و منگنز بر صفات کیفی پوسته تخم‌مرغ‌های مادر گوشتی

سیده عطیه مجاوریان، شهاب‌الدین قره‌ویسی، محسن حاجی‌پور*

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

*مسئول مکاتبات: s.gharavysi@qaemiau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۱۵

DOI: 10.60833/ascij.2025.1118943

چکیده

یکی از دغدغه‌های اصلی در دستیابی به پیک تولید در مرغ‌های مادر گوشتی، صفات کیفی پوسته تخم است که بسیار مهم بوده و در سودآوری گله مرغ مادر موثر است. مطالعه حاضر برای بررسی اثرات اشکال آلی و معدنی مس، روی و منگنز بر صفات کیفی تخم‌های مرغ مادر گوشتی راس ۳۰۸ در یک فارم مرغ مادر واقع در شهرستان قائم‌شهر انجام شد. ۲۴۰ مرغ مادر گوشتی و ۳۰ خروس گوشتی به طور تصادفی به شش تیمار آزمایشی و پنج تکرار اختصاص یافتند. از ۳۰ پن استفاده شد و در هر پن هشت مرغ و یک خروس قرار گرفت. این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتور اول شامل اشکال آلی و معدنی و فاکتور دوم شامل عناصر روی، مس و منگنز بود. تعداد تیمار و تکرار به ترتیب شش و پنج بود. صفات کیفی پوسته تخم‌مرغان مادر گوشتی در هفته‌های ۳۳، ۳۷ و ۴۰ اندازه‌گیری شد. داده‌های جمع‌آوری شده با رویه LSmeans توسط نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که روی آلی باعث افزایش معنی‌دار وزن پوسته تخم ($p < 0/05$) و منگنز آلی باعث بهبود ضخامت و استحکام پوسته تخم شدند ($p < 0/05$). از آنجا که استفاده از اشکال آلی روی و منگنز در جیره غذایی مرغان مادر گوشتی در بهبود صفات کیفی تخم آن‌ها موثر بوده است، بنابراین استفاده از اشکال آلی منگنز، مس و بخصوص روی در جیره مرغ‌های مادر گوشتی توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: پوسته تخم، روی آلی، مس، مرغ مادر، منگنز.

مقدمه

اندازه تخم، کیفیت پوسته و تولید تخم می‌شوند (۱). عناصر معدنی کم‌نیاز، مس، روی و آهن به دلیل نقش‌های ویژه در واکنش‌های آنزیمی و متابولیکی بدن موجودات زنده از اهمیت بالایی برخوردارند و به همین دلیل، همواره به‌عنوان مکمل در جیره غذایی مورد توجه قرار می‌گیرند (۲) که این عناصر به‌عنوان کوفاکتور کاتالیزورهای زیستی در بسیاری از واکنش‌های متابولیکی بدن مشارکت دارند و برای

مرغ‌های مادر گوشتی یکی از اجزای اصلی در چرخه صنعت طیور هستند که در تولید گوشت، تخم‌مرغ و تأمین نیاز پروتئین انسان‌ها نقش کلیدی دارد. علاوه بر نکات مدیریتی در پرورش مرغ‌های مادر، توجه به برنامه‌های تغذیه‌ای و تهیه جیره‌های مناسب جهت حداکثر تولید تخم و جوجه درآوری، بسیار مهم بوده و سودآوری به‌ازای تعداد جوجه تولیدی بیشتر را در پی خواهد داشت. مواد معدنی کم‌مصرف سبب بهبود

رشد و توسعه اندام‌های بدن و عملکرد تولیدی مناسب، ضروری هستند (۳). تحقیقات نشان دادند که ۱۱ درصد از کل تخم‌مرغ‌های تولیدی را تخم‌هایی با پوسته‌های ضعیف و آسیب‌دیده تشکیل می‌دهد که منجر به زیان‌های بزرگ اقتصادی می‌گردد (۴). یکی از مشکلات اصلی در رسیدن به پیک تولید در مرغ‌های مادر گوشتی، کاهش کیفیت پوسته است که بسیار مهم بوده و سودآوری در ازای تعداد جوجه تولیدی بیشتر را در پی نخواهد داشت. پوسته تخم پرندگان، به‌عنوان یک بسته‌بندی طبیعی از مواد موجود در تخم در برابر آسیب‌های میکروبی و مکانیکی محافظت می‌کند (۵) و کاهش کیفیت پوسته به معنی کاهش شمار تخم‌های قابل جوجه‌کشی و افت میزان تفریخ تخم‌های بارور، به علت خروج بیشتر رطوبت از پوسته‌های نازک‌تر و ورود آلودگی به درون تخم‌مرغ است (۶). مکمل غذایی منگنز بر تشکیل پوسته تخم‌مرغ با افزایش تراکم محل‌های هسته‌زایی تأثیر می‌گذارد (جایی که کریستال‌های کلسیت در ابتدا روی غشای پوسته داخلی رسوب می‌کنند و شروع به رشد پوسته تخم‌مرغ می‌کنند) و در نهایت ضخامت پوسته و استحکام پوسته را افزایش می‌دهد (۷). منگنز همچنین ممکن است مورفولوژی کریستال کلسیت را تغییر دهد که می‌تواند بر ساختار و بافت پوسته تخم‌مرغ تأثیر بگذارد (۸). مس در فعالیت آمین‌اکسیداز شرکت می‌کند که در جیره‌های غذایی با کمبود مس منجر به کاهش فعالیت آنزیمی می‌شود که تولید الاستین را کاهش می‌دهد، که از اتصال عرضی کافی پروتئین‌های غشایی جلوگیری می‌کند و تخم‌هایی با بافت، شکل و اندازه‌های غیرطبیعی یا تخم‌های بدون پوسته تولید می‌کند (۹). روی یک عامل کمکی آنزیم کربنیک‌انهدراز است که یون‌های کربنات را در طول تشکیل پوسته تخم‌مرغ تامین می‌کند. در نتیجه، کمبود روی منجر به کاهش وزن

پوسته تخم‌مرغ می‌شود (۸). این مواد معدنی نه تنها نقش مهمی در عملکرد فیزیولوژیکی و تشکیل تخم دارند، بلکه با سایر مواد معدنی نیز تعامل هستند و برخی ممکن است با دیگری در تضاد هم باشند که در هنگام سمیت حاد مفید است (۱۰)، اما در نهایت ممکن است منجر به کمبود در بدن شوند. مواد معدنی کمپلکس شده با اسیدآمین به نظر تغذیه‌ای در دسترس‌تر می‌باشند بنابراین در حفظ فرایندهای فیزیولوژیکی نسبت به فرم سولفات کارآمدتر هستند (۱۱). گروهی از محققین دریافتند که زینک-آمینواسید از زینک-سولفات زیست‌فراهمی بیشتری دارند (۱۲) همچنین در مرغ‌هایی که با آب آشامیدنی شور به چالش کشیده می‌شوند، افزودن کمپلکس روی-متیونین باعث افزایش وزن پوسته و استحکام پوسته می‌شود (۱۳). تحقیقات اندکی در مورد بررسی اثرات مواد معدنی کمپاب روی، مس و منگنز در مرغ‌های مادر گوشتی انجام شده است و هدف از این مطالعه بررسی اثرات اشکال آلی و معدنی روی، مس و منگنز بر صفات کیفیت پوسته تخم‌های مرغ مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ در پیک تولید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

موقعیت مکانی و زمانی انجام تحقیق: محل انجام این مطالعه در یک فارم مرغ مادر واقع در شهرستان قائم‌شهر و زمان انجام مطالعات مزرعه، مرداد تا شهریور ۱۴۰۲ می‌باشد.

پرنده‌های موردنیاز و شرایط انجام آزمایش: در این تحقیق ۲۷۰ قطعه پرنده استفاده شد. ۲۴۰ مرغ مادر گوشتی و ۳۰ خروس گوشتی سویه راس ۳۰۸ به طور تصادفی به شش تیمار آزمایشی و پنج تکرار اختصاص‌یافته و بین ۳۰ پن (در هر پن هشت قطعه مرغ و یک قطعه خروس) قرار گرفتند که ابعاد هر پن ۱/۵×۲/۵ متر مکعب می‌باشد. مطالعه بر روی مرغ‌های

مادر گوشتی راس ۳۰۸ از سن ۳۳ هفتگی تا ۴۰ هفتگی (پیک تولید) انجام شد. هفته‌های ۲۹ تا ۳۳ به عنوان دوره سازگاری در نظر گرفته شد. پرندگان در معرض ۱۴ ساعت نور و ۱۰ ساعت تاریکی قرار گرفتند. خروس‌ها قبل از تاریکی هوا از واحدهای آزمایشی جمع‌آوری شدند و روز بعد پس از روشن شدن و تغذیه، به هر واحد آزمایشی یک خروس به صورت تصادفی اضافه شد. سایر پارامترهای محیطی شامل دما (۲۲ درجه سانتی‌گراد)، آبخوری (انیپل/۹ پرنده)، فضای تغذیه (۱۵ سانتی‌متر/پرنده)، تراکم پرنده (۳/۵-۵/۵ پرنده در مترمربع)، رطوبت (۶۵-۹۰ درصد)، نور (۶۰ لوکس) و تهویه برای همه تیمارها یکسان بود. به همه گروه‌های جیره آزمایشی، خوراک و آب یکسانی داده شد و پرندگان روزانه تحت پایش قرار گرفتند و هرگونه ناهنجاری و بیماری ثبت و در صورت لزوم تحت درمان قرار گرفتند.

جیره‌های آزمایشی: کلیه جیره‌ها بر اساس دستورالعمل کاتالوگ راس ۳۰۸ (۲۰۲۱) تنظیم شده و جیره پایه بر اساس پیشنهادهای جدول احتیاجات غذایی طیور (NRC) تنظیم شدند (جدول ۱). مقدار و شکل آلی و معدنی روی، مس و منگنز در تیمارهای مختلف متفاوت بود. البته در جیره پایه از اشکال معدنی عناصر مذکور استفاده شد. از سولفات مس ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)، سولفات روی ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) و سولفات منگنز ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) تولید شرکت گیوان شیمی (تهران - ایران) به‌عنوان منابع معدنی و از مس-متیونین ($\text{Zinpro}^\circ \text{Availa}^\circ \text{Cu-10.0\%}$)، روی-متیونین ($\text{Zinpro}^\circ \text{Availa}^\circ \text{Zn-12.0\%}$) و منگنز-متیونین ($\text{Zinpro}^\circ \text{Availa}^\circ \text{Mn-8.0\%}$) تولید شرکت Zinpro° آمریکا برای تأمین منابع آلی مورد مطالعه استفاده شد. مقدار مورد نیاز عناصر به شکل سولفات برای مرغ‌های مادر گوشتی راس طبق دستورالعمل کاتالوگ راس ۳۰۸ (۲۰۲۱) تعیین شد.

این مقادیر برای مس ۱۶ میلی‌گرم/کیلوگرم، روی ۹۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و منگنز ۱۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بود. با توجه به قابلیت زیست‌فراهمی بالای عناصر معدنی با ترکیب آلی، مقدار مورد نظر برای تأمین نیاز بدن پرنده از عناصر با ترکیب معدنی کمتر بود. طبق دستورالعمل کاتالوگ شرکت تولید کننده، قابلیت زیست‌فراهمی مس، روی و منگنز آلی به ترتیب ۱۲۰، ۱۸۵ و ۱۷۶ درصد بود. پس، مقدار توصیه شده عناصر به شکل آلی طبق نظر شرکت سازنده در تحقیق حاضر برای مس ۱۳/۳۳ میلی‌گرم/کیلوگرم، روی ۴۸/۶۵ میلی‌گرم/کیلوگرم و منگنز ۷۳/۸۶ میلی‌گرم/کیلوگرم بود. برای تولید جیره‌های آزمایشی، ابتدا کیلات‌های آلی مس، روی و منگنز خریداری شد. سپس کیلات‌های مذکور به یک کارخانه مکمل سازی واقع در شهرک صنعتی بشل قائم‌شهر منتقل شد و مکمل‌های معدنی با ترکیب آلی که حاوی عناصر مورد بررسی بود، تولید شد. در مرحله تحقیقات فارمی، مکمل‌ها به فارم منتقل شد و تیمارهای (جیره‌های) آزمایشی تولید شده و به مصرف پرندگان تحت آزمایش رسید. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) جیره حاوی مکمل عنصر کم‌نیاز معدنی روی، (۲) جیره حاوی مکمل عنصر کم‌نیاز آلی روی، (۳) جیره حاوی مکمل عنصر کم‌نیاز معدنی مس، (۴) جیره حاوی مکمل عنصر کم‌نیاز آلی مس، (۵) جیره حاوی مکمل عنصر کم‌نیاز معدنی منگنز و (۶) جیره حاوی مکمل عنصر کم‌نیاز آلی منگنز بود.

صفات کمی تخم‌های تولیدی: به‌صورت هفتگی، از تخم‌مرغ‌های تولیدی در آخرین روز هفته، تعداد ۲ تخم به ازاء هر پن به‌طور جداگانه به‌عنوان نمونه برداشت شده و به آزمایشگاه منتقل و صفات کمی پوسته تخم محاسبه گردید.

مقاومت پوسته: مقاومت پوسته با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری مقاومت مدل OSK-13473 اندازه‌گیری

سپس با ترازوی دیجیتالی بادقت ۰/۰۱ گرم وزن پسته اندازه گیری و ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های حاصل از تحقیق با استفاده از آزمایش فاکتوریل (۳×۲) در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) و برنامه نرم‌افزاری SAS مورد آنالیز قرار گرفت و برای مقایسه میانگین تیمارها از رویه LSMeans استفاده شد. مدل آماری مورد استفاده به شرح زیر است: $Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + e_{ijk}$ که e_{ijk} میانگین کل (جامعه)، A_i اثر فاکتور A (در دو سطح اشکال آلی و معدنی)، B_j اثر فاکتور B (در سه سطح اثر عناصر روی، مس و منگنز)، $(AB)_{ij}$ اثر متقابل دو فاکتور (اشکال آلی و معدنی و عناصر)، e_{ijk} اثر عوامل باقیمانده (خطای آزمایشی تصادفی)

می‌شود و طرز قرارگیری تخم‌ها در دستگاه به‌صورت ایستاده می‌باشد، به‌طوری‌که انتهای پهن تخم بر روی سینی قرار داده شده و مقاومت پسته اندازه‌گیری و ثبت گردید.

ضخامت پسته: ضخامت پسته‌ی تخم‌مرغ‌ها با استفاده از میکرومتر دیجیتالی سوزنی ۰/۰۰۱ میلی‌متر داسکوا (مدل DASQUA) ساخت کشور ایتالیا، در وسط پسته تخم و حداقل از سه ناحیه کمری (سه نقطه) اندازه‌گیری شده و میانگین اندازه ۳ نقطه ثبت گردید (۱۴).

وزن پسته: برای تعیین وزن پسته، در ابتدا محتویات درون تخم‌مرغ به‌صورت کامل خالی شده و

جدول ۱- ترکیبات غذایی جیره پایه مرغ‌های مادر گوشتی در هفته ۴۰-۳۳

Table 1. Composition of basal diet supplied to broiler breeder hens from 33 to 40 week of age

Ingredient composition	(%)	Nutrient composition	(%)
Corn	60.00	Metabolizable energy (kcal/kg)	2795.00
Soybean meal (44%)	17.50	Crude protein (%)	14.45
Wheat meal	9.5	Lysine (%)	0.56
Soybean oil	3.00	Methionine (%)	0.35
Dicalcium phosphate	1.25	Methionine + cysteine (%)	0.57
oyster shell powder	4.52	Threonine (%)	0.53
Calcium carbonate	3.00	Calcium (%)	3.20
Sodium bicarbonate	0.25	Available phosphorus (%)	0.34
Salt	0.22	Sodium (%)	0.18
Methionine	0.17	Chlorine (%)	0.18
Threonine	0.04		
Choline chloride	0.05		
Mineral premix ¹	0.25		
Vitamin premix ²	0.25		

۱- در این جیره‌ها از مکمل معدنی بدون مس، روی و منگنز استفاده شده است. ۲- ترکیب مکمل‌های ویتامینی و مکمل‌های معدنی برای هر کیلوگرم جیره شامل: ویتامین A: ۱۰۰۰۰ واحد، ویتامین D3: ۳۲۰۰ واحد، ویتامین E: ۱۳۰ واحد، ویتامین K: ۹ میلی‌گرم، ویتامین B12: ۰/۰۷ میلی‌گرم، ریبوفلاوین: ۲۰ میلی‌گرم، کلسیم پانتوتنات: ۱۵ میلی‌گرم، نیاسین: ۷۰ میلی‌گرم، کولین کلراید: ۱۰۰۰ میلی‌گرم، بیوتین: ۰/۶ میلی‌گرم، تیامین: ۶ میلی‌گرم، پیریدوکسین: ۸ میلی‌گرم، اسید فولیک: ۵ میلی‌گرم، ید: ۲ میلی‌گرم، آهن: ۵۰ میلی‌گرم، سلنیوم: ۲۰۰ میکروگرم، کبالت: ۵۰۰ میکروگرم.

1- A mineral supplement without copper, zinc and manganese has been used in these rations. 2- The composition of vitamin supplements and mineral supplements for each kilogram of ration includes: Vitamin A, 10000 units., Vitamin D3, 3200 units., Vitamin E: 130 units., K: 9 mg., Vitamin B12: 0.07 mg., Riboflavin; 20 mg., Calcium pantothenate: 15 mg., Niacin: 70 mg., choline chloride: 1000 mg., biotin: 0.6 mg., thiamine: 6 mg., pyridoxine: 8 mg. folic acid: 5 mg., iodine: 2 mg., iron: 50 mg., selenium; 200 micrograms., cobalt: 500 micrograms.

نتایج

استحکام پوسته را در طول آزمایش نشان داد (۲/۹۶) ولی از لحاظ عددی در تمامی تیمارها، استحکام پوسته با گذر زمان دچار کاهش شده است به طوری که در پایان دوره بالاترین سطح استحکام پوسته تخم مربوط به تیمار حاوی منگنز آلی (۲/۱۲) بود.

ضخامت پوسته: با بررسی نتایج حاصل از آنالیز کیفی صفات پوسته در پایان دوره آزمایشی (جداول ۲ تا ۴) اثر اشکال معدنی، آلی و اثر متقابل آن‌ها بر یکدیگر بر ضخامت پوسته در تمامی هفته‌های آزمایش معنی‌دار شده است ($p < 0.05$)، در تیمارهای حاوی منگنز بیشترین ضخامت در طول آزمایش دیده شده است؛ ولی در تمامی تیمارها مقدار عددی ضخامت پوسته، با گذر زمان دچار کاهش شده است به طوری که بیشترین ضخامت پوسته مربوط به تیمار حاوی منگنز در هفته ۳۳ آزمایش ۰/۴۲۲ بوده است.

وزن پوسته: اثر جیره‌های آزمایشی بر صفات کیفی تخم‌های تولیدی در مرغ‌های مادر گوشتی در جداول ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است. اثر اشکال آلی و معدنی روی، مس و منگنز و همچنین اثر متقابل آن‌ها بر یکدیگر بر وزن پوسته در تمام هفته‌های آزمایش معنی‌دار شده است ($p < 0.05$)، به طوری که در هفته ابتدایی آزمایش، بیشترین وزن پوسته مربوط به تیمار حاوی روی آلی می‌باشد که با گذشت زمان، میزان عددی وزن پوسته افزایش پیدا کرده و در هفته ۴۰ آزمایش (جدول ۵)، بیشترین وزن پوسته مربوط به تیمار حاوی روی آلی (۷/۲۸) می‌باشد.

استحکام پوسته: اثر اشکال معدنی، آلی و اثر متقابل روی، مس و منگنز بر استحکام پوسته از ابتدای هفته ۳۳ تا پایان هفته ۴۰ آزمایش معنی‌دار شد ($p < 0.05$) در هفته ۳۳ آزمایش، تیمار حاوی منگنز بیشترین

جدول ۲- بررسی اشکال آلی و معدنی عناصر مس، روی و منگنز بر صفات کیفیت پوسته تخم مرغ‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ در هفته ۳۳.

Table 2. The effect of trace elements (Zn, Cu, and Mn), mineral forms (organic and inorganic), and their interaction on Ross 308 broiler breeder' hen Eggshell quality at 33 weeks

Treatment	Egg shell weight (g)	Shell thickness (mm)	Shell strength (kg/cm ²)
Trace elements			
Zinc	6.36 ^a	0.396 ^b	2.57 ^b
Copper	6.07 ^b	0.385 ^b	2.67 ^b
Manganese	6.05 ^b	0.422 ^a	2.84 ^a
SEM	0.38	0.014	0.05
<i>p</i> .value	0.02	0.03	0.02
Mineral forms			
Inorganic Minerals	5.99 ^b	0.396 ^b	2.57 ^b
Organic Minerals	6.42 ^a	0.416 ^a	2.79 ^a
SEM	0.46	0.016	0.08
<i>p</i> .value	0.02	0.02	0.02
Trace elements × Mineral forms			
Inorganic zinc	6.20 ^b	0.393 ^b	2.62 ^b
Organic zinc	6.50 ^a	0.395 ^b	2.66 ^b
Inorganic copper	6.01 ^b	0.390 ^b	2.64 ^b
Organic copper	6.11 ^b	0.395 ^b	2.65 ^b
Inorganic manganese	6.07 ^b	0.394 ^b	2.65 ^b
Organic manganese	6.12 ^b	0.419 ^a	2.81 ^a
SEM	0.30	0.011	0.04
<i>p</i> .value	0.03	0.03	0.02

بالانویس‌های غیرمشترک در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار ($p < 0.05$)، SEM: خطای استاندارد میانگین، *p*.value: مقدار احتمال

Non common superscripts in each column are indicate the significant statistical difference ($p < 0.05$), SEM: Standard error of the mean, *p*.value: Probability value.

جدول ۳- بررسی اشکال آلی و معدنی عناصر مس، روی و منگنز بر صفات کیفیت پوسته تخم مرغ‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ در هفته ۳۷.

Table 3. The effect of trace elements (Zn, Cu, and Mn), mineral forms (organic and inorganic), and their interaction on Ross 308 broiler breeder' hen Eggshell quality at 37 weeks.

Treatment	Egg shell weight (g)	Shell thickness (mm)	Shell strength (kg/cm ²)
Trace elements			
Zinc	6.85 ^a	0.383 ^b	2.09 ^b
Copper	6.51 ^b	0.372 ^b	2.20 ^b
Manganese	6.44 ^b	0.406 ^a	2.38 ^a
SEM	0.40	0.015	0.07
<i>p</i> .value	0.02	0.03	0.02
Mineral forms			
Inorganic Minerals	6.52 ^b	0.380 ^b	2.10 ^b
Organic Minerals	6.82 ^a	0.401 ^a	2.31 ^a
SEM	0.49	0.016	0.06
<i>p</i> .value	0.02	0.02	0.02
Trace elements × Mineral forms			
Inorganic zinc	6.57 ^b	0.378 ^b	2.22 ^b
Organic zinc	6.93 ^a	0.380 ^b	2.23 ^b
Inorganic copper	6.50 ^b	0.376 ^b	2.16 ^b
Organic copper	6.49 ^b	0.378 ^b	2.15 ^b
Inorganic manganese	6.46 ^b	0.379 ^b	2.15 ^b
Organic manganese	6.63 ^b	0.404 ^a	2.40 ^a
SEM	0.33	0.010	0.05
<i>p</i> .value	0.03	0.03	0.02

جدول ۴- بررسی اشکال آلی و معدنی عناصر مس، روی و منگنز بر صفات کیفیت پوسته تخم مرغ‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ در هفته ۴۰.

Table 4. The effect of trace elements (Zn, Cu, and Mn), mineral forms (organic and inorganic), and their interaction on Ross 308 broiler breeder' hen Eggshell quality at 40 weeks.

Treatment	Egg shell weight (g)	Shell thickness (mm)	Shell strength (kg/cm ²)
Trace elements			
Zinc	7.25 ^a	0.370 ^b	1.75 ^b
Copper	6.84 ^b	0.359 ^b	1.79 ^b
Manganese	6.75 ^b	0.394 ^a	2.02 ^a
SEM	0.48	0.018	0.07
<i>p</i> .value	0.02	0.03	0.02
Mineral forms			
Inorganic Minerals	6.83 ^b	0.365 ^b	1.79 ^b
Organic Minerals	6.25 ^a	0.389 ^a	1.99 ^a
SEM	0.56	0.016	0.05
<i>p</i> .value	0.02	0.02	0.02
Trace elements × Mineral forms			
Inorganic zinc	6.90 ^b	0.368 ^b	1.89 ^b
Organic zinc	6.28 ^a	0.370 ^b	2.90 ^b
Inorganic copper	6.83 ^b	0.368 ^b	2.93 ^b
Organic copper	6.79 ^b	0.367 ^b	2.92 ^b
Inorganic manganese	6.80 ^b	0.367 ^b	2.91 ^b
Organic manganese	6.93 ^b	0.395 ^a	2.12 ^a
SEM	0.39	0.013	0.04
<i>p</i> .value	0.03	0.03	0.03

بحث

این زمان توقف، در نژادهای مختلف متفاوت است و عوامل تغذیه‌ای نقش کمتری در زمان ماندگاری دارند.

اصلی‌ترین عامل را در تشکیل پوسته‌ی تخم، زمان توقف تخم را در رحم اعلام کردند و نتیجه گرفتند که

همچنین اعلام کردند که علاوه بر مواد معدنی، نوع و میزان پروتئین جیره غذایی نیز بر درصد صفات پوسته مؤثر است (۸). اکثر مواد معدنی کمیاب نقش‌های متفاوتی در تشکیل پوسته تخم و در نتیجه کیفیت پوسته تخم‌مرغ دارند (۱۵) که از میان مکمل‌های معدنی کم‌نیاز، روی، منگنز و مس نقش عمده‌ای بر کیفیت پوسته تخم به‌عنوان کوفاکتورهای آنزیم‌های دخیل در تشکیل غشای تخم و تشکیل پوسته دارند (۱۶). از آنجایی که مرغ‌ها فقط می‌توانند مقدار محدودی از پوسته را رسوب دهند، با افزایش وزن تخم، کیفیت کلی تخم کاهش می‌یابد (۱۷). روی جزء ضروری آنزیم کربنیک‌انهدراز است و این آنزیم مسئول ترشح یون کربنات و در نتیجه مینراله شدن و افزایش وزن پوسته می‌باشد (۱۸) و همچنین با توجه به جذب بالاتر روی آلی و اثر مثبت بر آنزیم کربنیک‌انهدراز، تشکیل ستون‌های کلسیت را افزایش داده و موجب وزن بالاتر پوسته می‌گردد. در مطالعه‌ای بهبود کیفیت پوسته تخم نیز با استفاده از منابع آلی مواد معدنی کم مصرف در مرغ‌های مادر گوشتی (۱۹) و تخم‌گذار (۲۰) گزارش شده است. منگنز موجب فعالیت بهتر آنزیم کربنیک‌انهدراز می‌شود که از طریق پروتئین‌های پوسته، بر ستون‌های کلسیت و نظم و هماهنگی آن‌ها تأثیر مثبت می‌گذارند که منجر به استحکام پوسته می‌شود و حتی منجر به افزایش ارتفاع ستون‌ها و وزن بالاتر خاکستر می‌گردند (۸). از عوامل مؤثر بر کلسیمی شدن پوسته تخم، پروتئین‌هایی مانند اووترانسفرین و اووآلبومین و پروتئوگلیکان‌هایی مانند کراتان سولفات می‌باشند که منگنز در ساخت آن‌ها نقش دارد و از طریق آن‌ها بر روی وزن پوسته اثر می‌گذارد (۲۱). موافق با نتایج آزمایش انجام‌شده، آزمایشی بر روی منابع آلی و غیر آلی عناصر مورد استفاده در جیره انجام شده است که استفاده از منابع آلی، ضخامت پوسته تخم‌مرغ را بهبود بخشید (۸).

گروهی از دانشمندان بیان نمودند که جایگزینی اکسید روی (۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و منگنز (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) با منبع آلی روی و منگنز، باعث بهبود کیفیت پوسته تخم در فاز آخر سیکل تخم‌گذاری در مرغ‌های تخم‌گذار می‌شود (۲۲). برخلاف یافته‌های پژوهش حاضر، گروهی اعلام کردند که مکمل‌های روی، منگنز و مس آلی به جیره غذایی، تأثیری بر ضخامت پوسته تخم نداشته است (۲۳). فلزات معدنی کم مصرف از طریق نقش آن‌ها در آنزیم‌های کلیدی درگیر در ساخت غشاء و پوسته تخم، در استحکام پوسته نقش دارند تا به طور مستقیم در شکل‌گیری کریستال‌های کلسیت نقش داشته باشند (۸). گروهی از دانشمندان دریافتند که مکمل منگنز در رژیم غذایی به فرم ارگانیک، می‌تواند استحکام و کیفیت پوسته تخم را به‌ویژه در شرایط دمایی بالا بهبود بخشد (۲۴)، همچنین گروهی دیگر گزارش دادند استفاده از مکمل منگنز، استحکام تخم را در مرغ‌های مادر گوشتی افزایش می‌دهد (۲۵). در یک مقایسه کلی از تحقیقات انجام شده، استفاده از کیلات‌های آلی نسبت به عناصر معدنی و مخلوط عناصر آلی و معدنی منجر به افزایش مقاومت پوسته شده است (۲۶). گزارش‌ها نشان دادند که تغذیه ترکیب روی و منگنز در مرغ‌های تخم‌گذار سبب استحکام پوسته تخم می‌شوند (۲۷)، موافق این آزمایش، گزارش شده که استفاده از منگنز باعث استحکام پوسته شد ولی درصد پوسته را نسبت به شاهد کاهش داد که دلیل آن را نقش منگنز در سنتز ماتریکس پروتئینی اعلام کرد (۲۸). بعضی از عناصر معدنی کم‌نیاز می‌توانند شکل بلورهای کلسیمی را تحت تأثیر قرار دهند. برای مثال، منگنز در موازی بودن محور رشد بلورها و طویل شدن آن‌ها دخیل می‌باشد، بنابر این منگنز بر بافت بلوری تخم‌مرغ و خواص مکانیکی آن تأثیرگذار است (۲۹). مخالف نتایج حاصل، گزارش شده که استفاده

antioxidant activity, immune system and egg manganese enrichment in the aged laying hens. *Vet Med Sci*. 2023;9(1):217-225. (In Persian)

5. Aghkhani MH, Baghani M. Engineering properties of Japanese quail eggs in different levels of dietary calcium. *J Agric Machin*. 2020;10(1):93-102. (In Persian).

6. Summers, J.D. and Leeson, S., 1976. *Poultry nutrition handbook*.

7. Zhang YN, Zhang HJ, Wu SG, Wang J, Qi GH. Dietary manganese supplementation modulated mechanical and ultrastructural changes during eggshell formation in laying hens. *Poult Sci*. 2017; 96:2699-2707.

8. Mabe I, Rapp C, Bain MM, Nys Y. Supplementation of a Corn-Soybean Meal Diet with Manganese, Copper, and Zinc from Organic or Inorganic Sources Improves Eggshell Quality in Aged Laying Hens. *Poult Sci*. 2003;82:1903-1913.

9. Chowdhury SD. Shell membrane protein system in relation to lathrogen toxicity and copper deficiency. *World Poult Sci J*. 1990; 46:153-169.

10. Watts DL. The nutritional relationships of manganese. *J. Orthomol Med*. 1990; 5:219-222.

11. Wedekind KJ, Hortin AE, Baker DH. Methodology for assessing zinc bioavailability: Efficacy estimates for zinc-methionine, zinc sulfate, and zinc oxide. *J Anim Sci*. 1992;70:178-187.

12. Star L, van der Klis JD, Rapp C, Ward TL. Bioavailability of organic and inorganic zinc sources in male broilers. *Poult Sci*. 2012;91:3115-3120.

13. Moreng RE, Balnave D, Zhang D. Dietary zinc methionine effect on eggshell quality of hens drinking saline water. *Poult Sci*. 1992;71:1163-1167.

14. Divari N, Kianfar R, Mirghelenj SA, Janmohammadi H. Effects of raw and autoclaved amaranth grain on performance

از ۳۰، ۳۰ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم روی، منگنز و مس به فرم آلی در مرغ‌های تخم‌گذار موجب کاهش استحکام پوسته تخم در ۶۹ تا ۸۲ هفتگی می‌شود (۸).

نتیجه‌گیری

توجه به قابلیت زیست‌فراهمی مس، روی و منگنز در جیره غذایی برای به حداکثر رساندن عملکرد تولیدی و تولیدمثلی مرغ‌های مادر اهمیت دارد. مس، روی و منگنز با ترکیب آلی نسبت به همتایان غیرآلی خود دسترسی زیستی بیشتری دارند؛ بنابراین طیور می‌توانند آن‌ها را به‌طور مؤثری جذب و استفاده کنند. بهبود خصوصیات کیفی پوسته تخم (ضخامت، وزن، استحکام) به طور قابل‌توجهی بر عملکرد تولیدمثلی مرغ‌های مادر گوشتی و کیفیت جوجه‌های تولید شده تأثیر می‌گذارد. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، روی آلی و منگنز آلی موجب بهبود ضخامت، وزن و استحکام تخم‌مرغ شد؛ بنابراین استفاده از اشکال آلی منگنز، مس و به‌خصوص روی در جیره مرغ‌های مادر گوشتی توصیه می‌شود.

منابع

1. Park SY, Birkhold SG, Kubena LF, Nisbet DJ, Ricke SC. Effects of high zinc diets using zinc propionate on molt induction, organs, and postmolt egg production and quality in laying hens. *Poult Sci*. 2004;83:24-33.
2. Richards JD, Zhao J, Harrell RJ, Atwell CA, Dibner JJ. Trace mineral nutrition in poultry and swine. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2010;23(11):1527-1534.
3. Lopes M, Paroul N, Barbosa J, Valduga E, Cansian RL, Toniazzi G, Oliveira D. Effect of partial and total replacement of inorganic by organic microminerals sources on the quality of broiler carcasses. *Braz Arch Biol Technol*. 2017;60:e17160082.
4. Khoshbin MR, Vakili R, Tahmasbi AM. Manganese-methionine chelate improves

- laying hens on eggshell and bones quality. *Vet Med-Czech*. 2008;53(10):555-563.
23. Maciel MP, Saraiva EP, Aguiar EF, Ribeiro PAP, Passos DP, Silva JB. Effect of using organic microminerals on performance and external quality of eggs of commercial laying hens at the end of laying. *Rev Bras Zootec*. 2010;39:344-348.
24. Zhu YW, Xie JJ, Li WX, Lu L, Zhang LY, Ji C, et al. Effects of environmental temperature and dietary manganese on egg production performance, egg quality, and some plasma biochemical traits of broiler breeders. *J Anim Sci*. 2015;93(7):3431-40.
25. Xie J, Tian C, Zhu Y, Zhang L, Lu L, Luo X. Effects of inorganic and organic manganese supplementation on gonadotropin-releasing hormone-I and follicle-stimulating hormone expression and reproductive performance of broiler breeder hens. *Poult Sci*. 2014;93(4):959-969.
26. Fakler T, Ward TL, Kuhl HJ. Zinc amino acid complexes improve layer production and egg quality. *Poult Sci*. 2002;81:120.
27. Swiatkiewicz S, Koreleski J, Arczewska A. Laying performance and eggshell quality in laying hens fed diets supplemented with prebiotics and organic acids. *Czech J Anim Sci*. 2010;7:294-304.
28. NRC. Nutrient requirements of poultry. 9th revised edition, National Academy Press, Washington, D.C., 1994.
29. Xiao JF, Wu SG, Zhang HJ, Yue HY, Wang J, Ji F, et al. Bioefficacy comparison of organic manganese with inorganic manganese for eggshell quality in Hy-Line Brown laying hens. *Poult Sci*. 2015; 94(8):1871-1878.
- and egg quality of layer hens. *Res Anim Prod*. 2020;11(28):32-40. (In Persian).
15. Mayer AN, Vieira SL, Berwanger E, Angel CR, Kindlein L, França I, Noetzold TL. Zinc requirements of broiler breeder hens. *Poult Sci*. 2019;98(3):1288-1301.
16. Noetzold TL, Vieira SL, Favero A, Horn RM, Silva CM, Martins GB. Manganese requirements of broiler breeder hens. *Poult Sci*. 2020;99(11):5814-5826.
17. Tůmová E, Gous RM. Interaction of hen production type, age, and temperature on laying pattern and egg quality. *Poult Sci*. 2012;91(5):1269-1275.
18. Gheisari AA, Sanei A, Samie A, Gheisari MM, Toghyani M. Effect of diets supplemented with different levels of manganese, zinc, and copper from their organic or inorganic sources on egg production and quality characteristics in laying hens. *Biol Trace Elem Res*. 2011;3:557-571. (In Persian)
19. Araújo CSS, Hermes RG, Bittencourt LC, Silva CC, Araújo LF, Granghelli CA, et al. Different dietary trace mineral sources for broiler breeders and their progenies. *Poult Sci*. 2019;98(10):4716-4721
20. Qiu JL, Zhou Q, Zhu JM, Lu XT, Liu B, Yu DY, et al. Organic trace minerals improve eggshell quality by improving the eggshell ultrastructure of laying hens during the late laying period. *Poult Sci*. 2020; 99(3):1483-1490.
21. Zhang YN, Wang J, Zhang HJ, Wu SG, Qi GH. Effect of dietary supplementation of organic or inorganic manganese on eggshell quality, ultrastructure, and components in laying hens. *Poult Sci*. 2017;96(7):2184-2193.
22. Swiatkiewicz S, Koreleski J. The effect of zinc and manganese source in the diet for

Research Article**The Pattern of Bioaccumulation of Heavy Metals Mercury, Zinc and Nickel in the Soft Tissues of the Blue Swimming Crab (*Portunus segnis*) in Makoran Coasts****Samaneh Ebrahimi, Mohammad Mansour Tootooni, Mehran Loghmani***

Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

*Corresponding author: loghmani.mehran@gmail.com

Received: 19 November 2024

Accepted: 14 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1190962

Abstract

The aim of the present study, considering the increasing level of heavy metal pollution and their impact on the environment, was to evaluate the bioaccumulation of heavy metals mercury, zinc and nickel in soft tissues (muscle and hepatopancreas) of the blue swimming crab (*Portunus segnis*) on the coasts of Makoran (Bris, Pesem and Tis). 18 crab samples and 9 surface sediment samples were collected in the winter of 2019 and the concentrations of mercury, zinc and nickel in the hepatopancreas and muscle tissues of the crab and sediments of the sampling areas were measured by atomic absorption spectrometry. In all three stations, the concentration of zinc in the hepatopancreas was higher than in the muscle and there was a statistically significant difference between all stations ($p < 0.05$). The overall average accumulation of mercury, zinc and nickel metals in mg/kg in hepatopancreas was 0.85 ± 0.7 , 240.81 ± 101.41 and 69.24 ± 33.58 in muscle 0.37 ± 0.04 , 78.45 ± 14.02 and 33.01 ± 9.12 and in sediment 0.96 ± 0.6 , 26.4 ± 14.45 and 21.49 ± 6.21 . The pattern of heavy metal accumulation in tissue and sediment was obtained as mercury < nickel < zinc. Comparison of metal concentrations in the muscle of the blue-swimming crab of the study area with international standards (UK MAFF, FDA, NHMRC, WHO and FAO) showed that the mercury concentration was lower than the NHMRC standard and close to other standards, the zinc concentration was higher than the permissible limit compared to only some standards, and the nickel concentration was lower than the permissible limit announced by the FDA. Therefore, the consumption of the studied crab meat in terms of mercury and especially zinc may be harmful to health. Comparison of the average concentration of heavy metals in sediments sampled from the stations with sediment quality standards showed low concentrations of zinc, nickel and mercury.

Keywords: Heavy metals, Blue-swimming crab, Makoran coasts, Hepatopancreas.

مقاله پژوهشی

الگوی تجمع زیستی فلزات سنگین جیوه، روی و نیکل در بافت‌های نرم خرچنگ شناگر آبی
(*Portunus segnis*) در سواحل مکران

سمانه ابراهیمی، محمد منصور توتونی، مهران لقمانی*

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

*مسئول مکاتبات: loghmani.mehran@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۹

DOI: 10.60833/ascij.2025.1190962

چکیده

با توجه به افزایش میزان آلودگی فلزات سنگین و تأثیر آن‌ها بر محیط زیست، هدف مطالعه حاضر ارزیابی تجمع زیستی فلزات سنگین جیوه، روی و نیکل در بافت‌های نرم (عضله و هپاتوپانکراس) خرچنگ شناگر آبی (*Portunus segnis*) در سواحل مکران (بریس، پزم و تیس) بود. هجده نمونه خرچنگ و ۹ نمونه رسوب سطحی در زمستان ۱۳۹۹ جمع‌آوری و غلظت فلزات جیوه، روی و نیکل در بافت‌های هپاتوپانکراس و عضله خرچنگ و رسوبات مناطق نمونه‌برداری توسط دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد. در هر سه ایستگاه، غلظت فلز روی در هپاتوپانکراس بیش از عضله بود و اختلاف آماری معنی‌داری بین تمام ایستگاه‌ها وجود داشت ($p < 0/05$). میانگین کلی تجمع فلزات جیوه، روی و نیکل بر حسب میلی‌گرم/کیلوگرم در هپاتوپانکراس به ترتیب، $0/7 \pm 0/85$ ، $101/41 \pm 240/81$ و $33/58 \pm 69/24$ ؛ در عضله $0/04 \pm 0/37$ ، $14/02 \pm 78/45$ و $9/12 \pm 33/01$ و در رسوب $0/6 \pm 0/96$ ، $14/45 \pm 26/4$ و $6/21 \pm 21/49$ بود. الگوی تجمع فلزات سنگین در بافت و رسوب به صورت جیوه > نیکل > روی به دست آمد. مقایسه غلظت فلزات در عضله خرچنگ شناگر آبی منطقه مورد مطالعه با استانداردهای بین‌المللی (FAO و WHO، NHMRC، FDA، UK MAFF) نشان داد که غلظت جیوه، پایین‌تر از استاندارد NHMRC و نزدیک به سایر استانداردها، غلظت روی در مقایسه با فقط بعضی از استانداردها بالاتر از حد مجاز بوده و غلظت نیکل نیز کمتر از حد مجاز اعلام شده توسط FDA بود. بنابراین، مصرف گوشت خرچنگ مورد مطالعه از نظر جیوه و به ویژه، روی ممکن است برای سلامتی مضر باشد. مقایسه میانگین غلظت فلزات سنگین در رسوبات نمونه‌برداری شده از ایستگاه‌ها با استانداردهای کیفیت رسوب، نشان از پایین بودن غلظت روی و نیکل و جیوه داشت.

کلمات کلیدی: فلزات سنگین، خرچنگ شناگر آبی، سواحل مکران، هپاتوپانکراس.

مقدمه

می‌باشد. باتوجه به افزایش فعالیت‌های تجاری و صنعتی در دهه اخیر، انتظار می‌رود که این فعالیت‌ها بر تجمع آلودگی انسانی در رسوبات ساحلی و دریایی تأثیر بگذارد (۱). آلاینده‌های ره‌اشده از صنایع به‌صورت محلول در آب بوده و روی بستر ته‌نشین و

دریای عمان مسیر حمل‌ونقل محموله‌های نفتی است و در خط ساحلی مکران، در استان سیستان و بلوچستان و در جنوب شرقی ایران خلیج و بندر آزاد چابهار واقع شده‌اند. اهمیت ویژه خلیج چابهار به دلیل شکل امگایی و گردش محدود آب در آن

سپس، توسط موجودات زنده جذب می‌شوند (۲). آلودگی به فلزات نادر یک مشکل جهانی برای اکوسیستم آبی است و به دلیل سمیت، عدم تجزیه و بزرگ‌نمایی زیستی در زنجیره غذایی، نوعی تهدید زیست‌محیطی جدی نیز برای موجودات آبی محسوب می‌شود. مناطق ساحلی به‌عنوان پرورشگاه دوره نوزادی برای بسیاری از موجودات زنده عمل می‌کند و به‌این‌ترتیب، این آلودگی می‌تواند اکوسیستم و تولیدات شیلات را تحت‌تأثیر قرار دهد (۳). موجودات کف‌زی جزء جدایی‌ناپذیر جوامع و عناصر حیاتی زنجیره غذایی‌اند که نسبت به تغییرات زیست‌بوم بسیار حساس هستند. رسوبات، سطوح بالایی از فلزات سنگین را در خود انباشته می‌کنند و موجودات کف‌زی تمایل به تجمع فلزات در بافت‌های بدن خود دارند؛ بنابراین، کف‌زیان بیش از موجودات شناور در معرض فلزات سنگین هستند. خرچنگ‌ها پتانسیل بالایی در جمع‌آوری فلزات از محیط دارند؛ بنابراین، می‌توان آن‌ها را به‌عنوان شاخصی برای پایش غلظت این عناصر و تأثیر بر محیط آبی، به کار برد (۴). در این تحقیق، اندام‌هایی مثل هیپاتوپانکراس و عضله خرچنگ برای آنالیز فلزات سنگین به دلیل نقش مهم آن‌ها در پردازش انواع فرایندهای سازگاری زیستی، انتخاب شدند (۵). هیپاتوپانکراس سطوح بالایی از متالوتیونین را سنتز می‌کند که با نقش آن به‌عنوان یک بافت مهم مرتبط با سم‌زدایی فلزات سنگین سازگار است. مطالعات متعدد نشان داده است که هیپاتوپانکراس در تجمع فلزات مختلف در ده‌پایان نقش دارد (۶). از سوی دیگر، بافت منحصربه‌فرد ماهیچه‌ای، به دلیل کیفیت مطلوب و طعم و مزه خاص، یک ماده باارزش غذایی بوده و در بیشتر مناطق دنیا گوشت خرچنگ جایگاه ویژه‌ای در بین غذاهای دریایی رستوران‌ها دارد (۷). *Portunus segnis* یا خرچنگ شناگری، یکی از

گونه‌های مهم تجاری است که در گستره وسیعی از مناطق ساحلی و فلات قاره از جمله شنی، گلی، زیستگاه‌های علف دریایی از منطقه جزرومدی تا عمق ۵۰ متر حضور دارد. این گونه، اغلب گوشت‌خوار و کف‌زی است و به طور عمده، از نرم‌تنان چسبنده و دیگر بی‌مهرگان تغذیه می‌کند. در سال ۲۰۱۳ میزان صید جهانی این خرچنگ ۲۰۰،۰۰۰ تن بوده است. به دلیل ارزش غذایی و اقتصادی آن، سنجش غلظت فلزات سنگین در بافت عضلانی خرچنگ شناگر آبی بسیار مهم است (۴). هدف از این مطالعه بررسی غلظت فلزات سنگین جیوه، روی و نیکل در بافت‌های نرم خرچنگ *P. segnis* از سواحل مکران (بریس، پزم و تیس) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور مطالعه و بررسی غلظت فلزات سنگین در خرچنگ شناگر آبی (*Portunus segnis*) نمونه‌برداری از سواحل بریس، پزم و تیس در امتداد سواحل شمالی مکران (سال ۱۳۹۹) انجام شد. موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌ها با استفاده از دستگاه GPS مدل GPSMAP 64S ثبت گردید (شکل ۱). سپس، تمام نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به تفکیک ایستگاه درون جعبه‌های حاوی پودر یخ به مجتمع آزمایشگاهی منتقل شدند. رسوبات سطحی نیز با استفاده از ظروف لوله‌ای فالکون در سه تکرار از هر ایستگاه جمع‌آوری و درون پلاستیک‌های پلی‌اتیلنی در جعبه‌های حاوی پودر یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در آزمایشگاه قبل از شروع کار، ابتدا تمام وسایل و ظروف مورد نیاز شیشه‌ای و پلاستیکی به‌دقت با آب گرم و اسید نیتریک ۱۰ درصد یا اسیدکلریدریک و در نهایت، با آب دیونیزه شستشو شدند و به مدت ۲۴ ساعت در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردیدند. سپس، خرچنگ‌های هر ایستگاه نیز به طور جداگانه با آب

نمونه‌های حاصل از هضم شیمیایی توسط دستگاه طیف‌سنج جذب اتمی مدل Spect Varian AA220 استفاده شد.

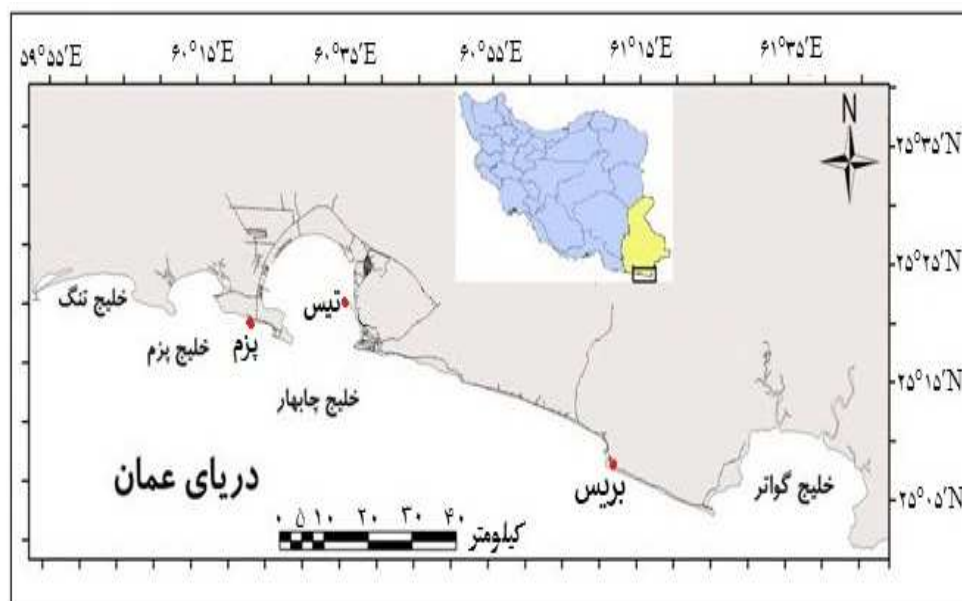
سنجش فلزات سنگین در رسوب: جهت تعیین غلظت فلزات جیوه، روی و نیکل، نمونه‌های رسوب در دمای محیط خشک گردید و با الک ۶۳ میکرون الک شد. سپس، ۱ گرم از رسوب الک شده را وزن کرده و به داخل ظرف پلی‌اتیلن ریخته و مخلوطی از سه اسید شامل اسید نیتریک، اسیدفلوریدریک و اسیدکلریدریک به مقدار ۸، ۲ و ۴ میلی‌لیتر به آن اضافه و روی هیتز به مدت یک ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و ۳ ساعت در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا عمل هضم انجام شود. سپس، نمونه‌های هضم شده از فیلتر واتمن شماره ۴۲ عبور داده و در نهایت، با آب یون‌زدایی شده به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. برای اندازه‌گیری غلظت فلزات سنگین از دستگاه اسپکتروفتومتری جذب اتمی با روش طیف‌سنجی جذب اتمی بدون غنی‌سازی استفاده و غلظت فلزات سنگین بر حسب میکروگرم/گرم وزن خشک محاسبه شد (۱۰).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد و بعد از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون کولموگروف - اسمیرنوف، برای بررسی اختلاف آماری معنی‌دار تجمع فلزات سنگین بین دو بافت از آزمون t-test و جهت بررسی اختلاف آماری هر کدام از فلزات سنگین بین سه ایستگاه، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و در صورت وجود اختلاف آماری معنی‌دار، جهت بررسی دقیق‌تر معنی‌داری بین ایستگاه‌ها، از پس‌آزمون توکی استفاده شد. جهت بررسی همبستگی بین غلظت فلزات سنگین در بافت و رسوب، آزمون همبستگی پیرسون و در رسم نمودارها، نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ (Excel, 2013) مورد استفاده قرار گرفت.

دیونیزه و به طور کامل شستشو شدند (۸). پس از گذشت زمان کافی برای خروج آب اضافه، تمامی نمونه‌ها کدگذاری و سپس، بیومتری آن‌ها انجام شد. طول و عرض کاراپاس نمونه‌ها توسط کولیس با دقت ۰/۰۱ میلیمتر و وزن کل آن‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال AMD، EK-610i با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری (۹) و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به مرحله آنالیز و هضم شیمیایی نگهداری شدند. به‌منظور هضم شیمیایی نمونه‌ها، ابتدا بافت نرم (عضله و هپاتوپانکراس) را جدا کرده (۸) و تا زمان انجام آزمایش، جهت اندازه‌گیری غلظت فلزات سنگین در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (۹).

سنجش فلزات سنگین: جهت هضم شیمیایی نمونه‌ها ابتدا بافت نرم (عضله و هپاتوپانکراس) خردچنگ جهت خشک‌کردن درون شیشه‌های ساعت در داخل آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. سپس، نمونه‌های خشک شده درون هاون چینی جهت هموژن کردن پودر گردیدند تا برای هضم شیمیایی آماده شوند جهت انجام هضم شیمیایی نمونه‌ها، به یک گرم نمونه پودر شده ۶ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ (۶۵ درصد) اضافه شد. پس از صرف زمان حداقل ۳ ساعت، جهت انجام عمل هضم مقدماتی در دمای اتاق، برای هضم کامل نمونه‌ها از پلیت داغ در دمای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت استفاده شد.

پس از اتمام عمل هضم، نمونه‌ها در معرض گرما قرار گرفت و قبل از این‌که به طور کامل خشک شوند از روی پلیت داغ برداشته شدند. نمونه‌ها با اسید نیتریک ۰/۰۴ رقیق شدند، سپس توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲ میکرون صاف گردیده و پس از انتقال به بالن‌های حجم‌سنجی ۲۵ میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم رسانده شدند (۹). جهت اندازه‌گیری فلزات در



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های نمونه‌برداری خرچنگ شناگر آبی
Fig. 1. Geographical location of blue swimming crab sampling stations

نتایج

داد که این فلز بین سه ایستگاه دارای اختلاف آماری معنی‌دار بوده است. پس‌آزمون توکی برای فلز جیوه نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین هر سه ایستگاه بود و در بافت هیپاتوپانکراس نیز بین ایستگاه‌های نمونه‌برداری اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشته است ($p < 0/05$).

تجمع زیستی روی در بافت عضله و هیپاتوپانکراس خرچنگ: نتایج بررسی نشان داد که فلز روی در هر سه ایستگاه، در بافت هیپاتوپانکراس دارای بیشترین و در بافت عضله دارای کمترین غلظت است. نتایج میانگین کل غلظت روی در بافت عضله و هیپاتوپانکراس بین سه ایستگاه به‌ترتیب، $14/02 \pm$ و $78/45$ و $101/41 \pm$ میلی‌گرم/کیلوگرم به دست آمد (جدول ۳). آزمون آماری بین دو بافت عضله و هیپاتوپانکراس در هر ایستگاه دارای اختلاف معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$)، همچنین طبق نتایج برای غلظت روی در بافت عضله عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار را بین ایستگاه‌های مورد مطالعه نشان

زیست‌سنجی خرچنگ شناگر آبی: نتایج حاصل از زیست‌سنجی طول و عرض کاراپاس و وزن نمونه‌های خرچنگ در ایستگاه‌های مختلف به تفکیک جنسیت در جدول ۱ ارائه شده است. اختلاف معنی‌داری میان ایستگاه‌های در مقایسه پارامترهای مورد سنجش مشاهده نگردید ($p > 0/05$).

تجمع زیستی جیوه در بافت عضله و هیپاتوپانکراس: طبق نتایج (جدول ۲ و شکل ۱) هر سه ایستگاه در بافت هیپاتوپانکراس غلظت جیوه نسبت به بافت عضله بالاتر بوده است و میانگین کل غلظت جیوه بین سه ایستگاه در عضله، $0/37 \pm 0/04$ میلی‌گرم/کیلوگرم و در هیپاتوپانکراس، $0/85 \pm 0/07$ میلی‌گرم/کیلوگرم بدست آمد. نتایج آزمون نشان داد که فلز جیوه بین بافت عضله و هیپاتوپانکراس در دو ایستگاه تیس و بریس فاقد اختلاف آماری معنی‌دار بود ($p > 0/05$). اما، در ایستگاه بزم بین دو بافت اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده شد ($p < 0/05$). نتایج آزمون ANOVA برای فلز جیوه در بافت عضله نشان

داد ($p > 0/05$). نتایج آزمون برای غلظت روی در بافت هیپاتوپانکراس نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بوده است (شکل ۲).

تجمع زیستی نیکل در بافت عضله و هیپاتوپانکراس:
بر اساس نتایج بیشترین و کمترین غلظت نیکل در هر یک از ایستگاه‌ها به ترتیب، در بافت هیپاتوپانکراس و عضله مشاهده شد. میانگین کل غلظت فلز نیکل بین سه ایستگاه در بافت عضله و هیپاتوپانکراس به ترتیب $9/12 \pm 33/01$ و $69/24 \pm 33/58$ میلی‌گرم/کیلوگرم مشاهده شد (جدول ۴). نتایج آزمون t-test نشان داد که دارای اختلاف آماری معنی‌دار در هر سه ایستگاه بین دو بافت می‌باشد ($p < 0/05$). آزمون آنالیز واریانس برای غلظت نیکل در بافت عضله نشان دهنده وجود اختلاف آماری بین ایستگاه‌های تیس و پزم معنی‌دار بود به علاوه، در بافت هیپاتوپانکراس بین ایستگاه‌های نمونه‌برداری نیز اختلاف آماری معنی‌دار بدست آمد (شکل ۳).

غلظت فلزات سنگین در رسوبات مناطق مورد مطالعه: نتایج میانگین غلظت فلزات سنگین نشان داد که برای فلز جیوه بیشترین غلظت در ایستگاه پزم $1/46 \pm 0/88$ میلی‌گرم/کیلوگرم و کمترین در ایستگاه

بریس $0/25 \pm 0/63$ میلی‌گرم/کیلوگرم است و بیشترین غلظت فلز روی در رسوبات برای ایستگاه بریس $18/31 \pm 41/25$ میلی‌گرم/کیلوگرم و کمترین غلظت برای ایستگاه تیس $1/52 \pm 18/74$ میلی‌گرم/کیلوگرم ثبت شد همچنین تجمع زیستی فلز نیکل در ایستگاه بریس $1/87 \pm 27/81$ میلی‌گرم/کیلوگرم دارای بیشترین و در ایستگاه پزم کمترین غلظت $3/85 \pm 14/45$ میلی‌گرم/کیلوگرم را داشته است (شکل ۴). آزمون آنها نشان داد که غلظت جیوه بین سه ایستگاه فاقد اختلاف آماری معنی‌دار است ($p > 0/05$) ولی برای فلز نیکل فقط بین ایستگاه پزم با ایستگاه تیس و بریس و برای فلز روی بین ایستگاه بریس با دو ایستگاه تیس و پزم عدم اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید.

همبستگی بین غلظت فلزات در بافت‌ها و رسوب:
به‌طورکلی بر اساس آزمون همبستگی پیرسون بین غلظت فلزات در رسوبات و میزان تجمع آنها در دو بافت عضله و هیپاتوپانکراس خرچنگ شناگر آبی همبستگی معنی‌داری را نشان نداد؛ ولی در برخی همبستگی بین دو فلز در رسوب معنی‌دار به دست آمد که به تفکیک در جدول ۵ نشان داده شده است.

جدول ۱- میانگین $\pm$ انحراف معیار فاکتورهای زیست‌سنجی خرچنگ در ایستگاه‌های نمونه‌برداری

Table 1. Mean $\pm$ standard deviation of biometric factors of the crab at the sampling stations

	Beris	Pozm	Tis
Carapace Length (mm)	66.32 $\pm$ 12.36	65.32 $\pm$ 12.67	67.17 $\pm$ 9.87
Carapace Width (mm)	105.45 $\pm$ 23.22	116.33 $\pm$ 23.17	113.21 $\pm$ 18.13
Weight (g)	Male	213.41 $\pm$ 65.11	185.59 $\pm$ 55.87
	Female	119.13 $\pm$ 17.14	182.65 $\pm$ 77.83

جدول ۲- مقایسه میانگین $\pm$ انحراف معیار غلظت جیوه (میلی‌گرم/کیلوگرم) در بافت‌های مورد بررسی

Table 3. Mean $\pm$ standard deviation of mercury concentration (mg/kg) in the analyzed tissues

	Beris	Pozm	Tis	Total Mean
Muscle	0.71 $\pm$ 0.45 ^a	0.055 $\pm$ 0 ^a	0.34 $\pm$ 0.08 ^a	0.37 $\pm$ 0.04
Hepatopancreas	1.24 $\pm$ 0.73 ^a	0.73 $\pm$ 0.66 ^b	0.57 $\pm$ 0.05 ^a	0.85 $\pm$ 0.7

جدول ۳- میانگین $\pm$ انحراف معیار غلظت روی (میلی‌گرم/کیلوگرم) در بافت‌های مورد بررسی

Table 3. Mean $\pm$ standard deviation of zinc concentration (mg/kg) in the analyzed tissues

	Beris	Pozm	Tis	Total Mean
Muscle	77.83 $\pm$ 10.09 ^b	70.27 $\pm$ 16.58 ^b	87.25 $\pm$ 7.93 ^b	78.45 $\pm$ 14.02
Hepatopancreas	240.21 $\pm$ 125.13 ^b	217.07 $\pm$ 74.07 ^a	265.15 $\pm$ 106.48 ^b	240.81 $\pm$ 101.41

جدول ۴- میانگین $\pm$ انحراف معیار غلظت نیکل (میلی‌گرم/کیلوگرم) در بافت‌های مورد بررسی

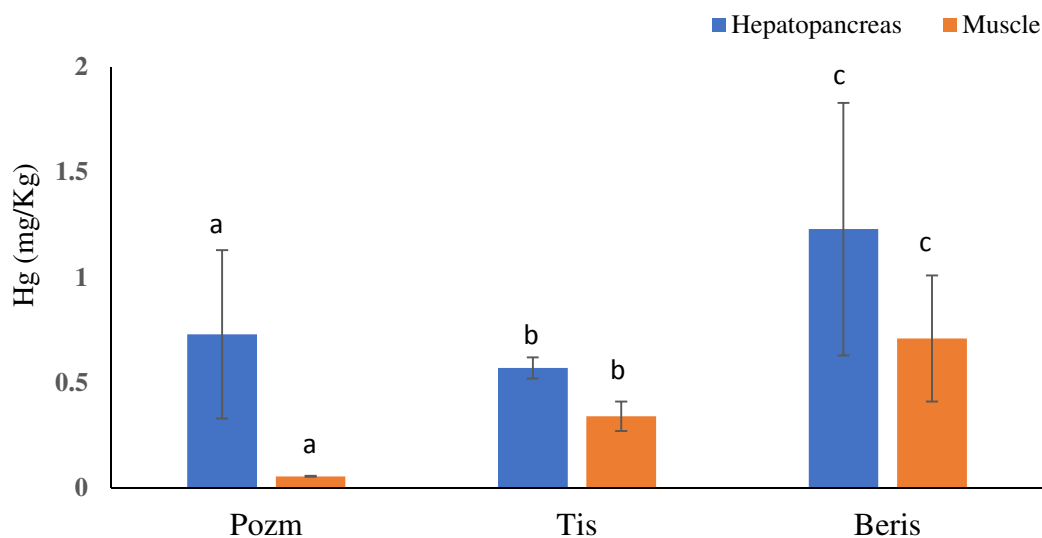
Table 3. Mean $\pm$ standard deviation of Nikel concentration (mg/kg) in the analyzed tissues

	Beris	Pozm	Tis	Total Mean
Muscle	23.81 $\pm$ 2.92 ^a	37.23 $\pm$ 9.95 ^a	37.98 $\pm$ 4.78 ^a	33.01 $\pm$ 9.12
Hepatopancreas	55.76 $\pm$ 13.75 ^b	64.58 $\pm$ 21.98 ^b	87.38 $\pm$ 49.26 ^b	69.24 $\pm$ 33.58

جدول ۵- مقایسه همبستگی بین غلظت فلزات در بافت‌ها و رسوب

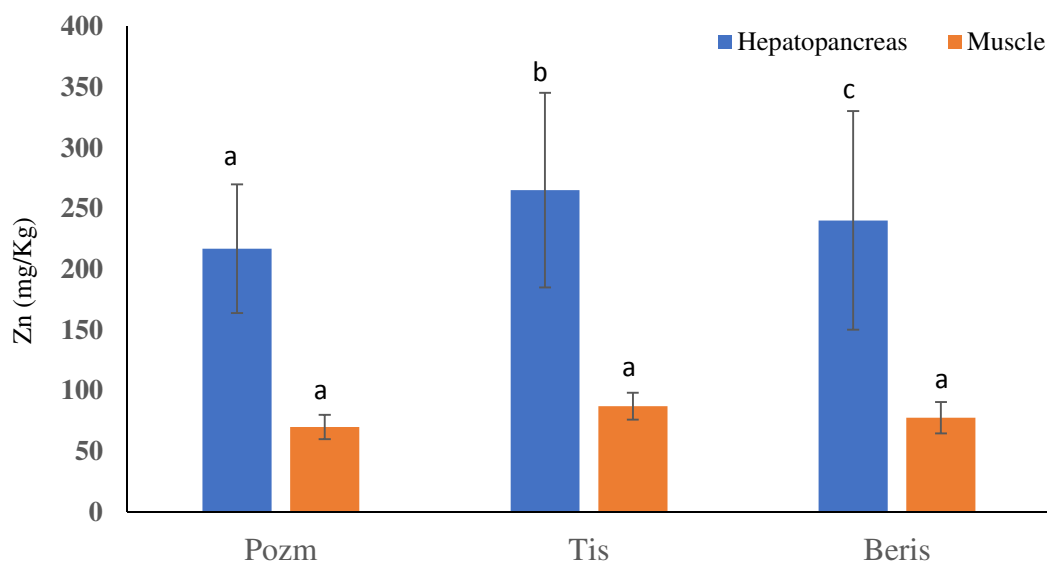
Table 5. Correlation comparison between metal concentrations in tissues and sediment

		Hg Hepatopancreas	Zinc Hepatopancreas	Nickel Hepatopancreas	Hg Muscle	Zinc Muscle	Nickel Muscle	Hg Sediment	Zinc Sediment
Mercury Hepatopancreas	Correlation								
	Significance								
Zinc Hepatopancreas	Correlation	0.223							
	Significance	0.375							
Nickel Hepatopancreas	Correlation	0.226	0.602						
	Significance	0.368	0.008						
Mercury Muscle	Correlation	0.286	0.247	0.025					
	Significance	0.250	0.324	0.920					
Zinc Muscle	Correlation	0.107	0.258	0.264	0.268				
	Significance	0.672	0.302	0.290	0.282				
Nickel Muscle	Correlation	-0.049	0.100	0.392	-0.438	0.406			
	Significance	0.846	0.694	0.107	0.069	0.095			
Mercury Sediment	Correlation	0.095	-0.022	-0.140	0.000	-0.235	-0.092		
	Significance	0.807	0.955	0.720	1.000	0.543	0.814		
Zinc Sediment	Correlation	-0.106	0.077	-0.064	0.182	-0.075	-0.674	-0.246	
	Significance	0.785	0.845	0.870	0.639	0.847	0.046	0.523	
Nickel Sediment	Correlation	-0.131	0.503	0.631	0.201	0.308	-0.220	-0.484	0.655
	Significance	0.736	0.168	0.069	0.604	0.421	0.570	0.187	0.045



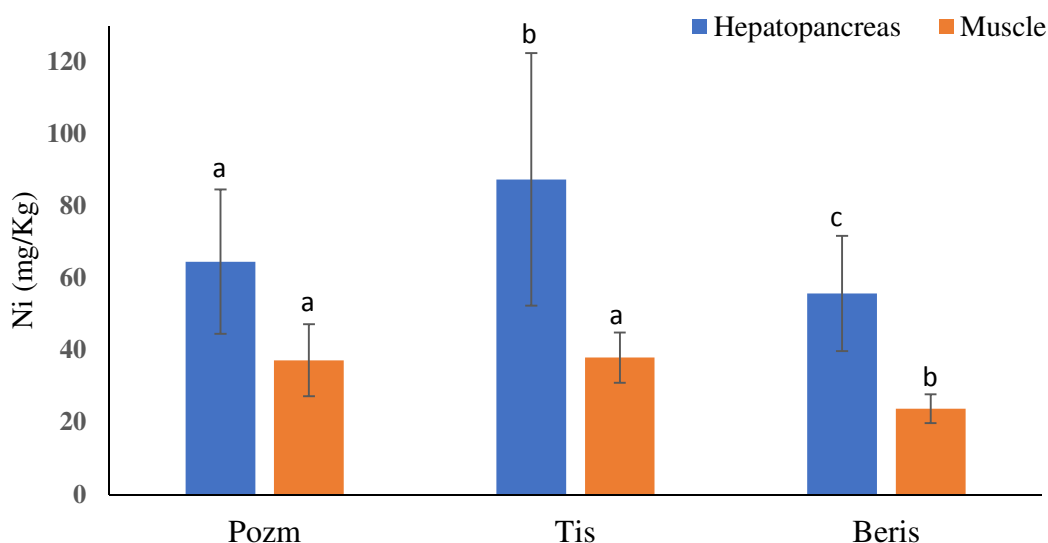
شکل ۱- مقایسه میانگین غلظت جیوه در بافت عضله و هپاتوپانکراس بین ایستگاه‌های نمونه‌برداری. حروف ناهمنام نشان‌دهنده معنی‌دار بودن و حروف همسان نشان‌دهنده عدم معنی‌داری اختلاف آماری است.

Fig. 1. Comparison of mean mercury concentration in muscle and hepatopancreas tissues across sampling stations. Different letters indicate statistically significant differences, while identical letters indicate no significant difference.



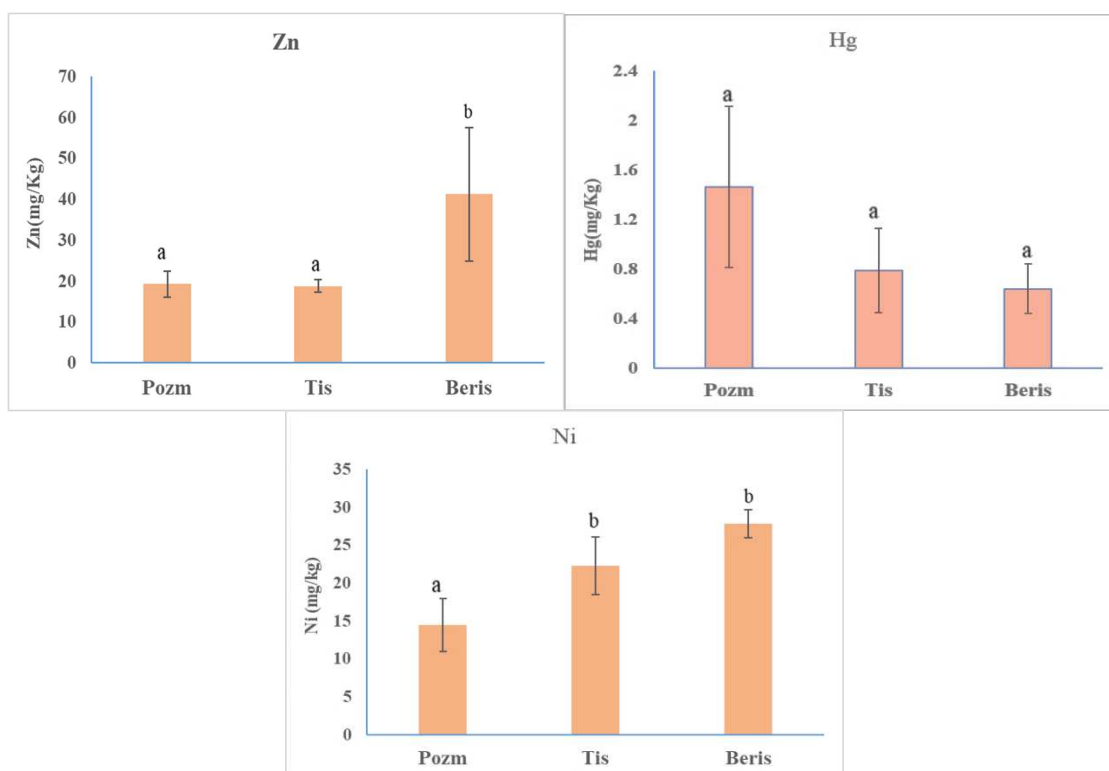
شکل ۲- مقایسه غلظت روی در بافت عضله و هپاتوپانکراس بین ایستگاه‌های نمونه‌برداری. حروف ناهمنام نشان‌دهنده معنی‌دار بودن و حروف همسان نشان‌دهنده عدم معنی‌داری اختلاف آماری است.

Fig. 2. Comparison of zinc concentration in muscle and hepatopancreas tissues across sampling stations. Different letters indicate statistically significant differences, while identical letters indicate no significant difference.



شکل ۳- مقایسه غلظت نیکل در بافت عضله و هپاتوپانکراس بین ایستگاه‌های نمونه‌برداری. حروف ناهمنام نشان‌دهنده معنی‌دار بودن و حروف همسان نشان‌دهنده عدم معنی‌داری اختلاف آماری است.

Fig. 3. Comparison of nickel concentration in muscle and hepatopancreas tissues across sampling stations. Different letters indicate statistically significant differences, while identical letters indicate no significant difference.



شکل ۴- مقایسه میانگین غلظت فلزات سنگین نیکل، روی و جیوه در رسوبات ایستگاه‌های نمونه‌برداری. حروف ناهمنام نشان‌دهنده معنی‌دار بودن و حروف همسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌داری است.

Fig. 4. Comparison of mean concentrations of the heavy metals nickel, zinc, and mercury in sediments from the sampling stations. Different letters denote statistically significant differences, while identical letters denote no significant differences.

بحث

در اکوسیستم آبی، ماهی و دیگر گونه‌های آبی خوراکی به دلیل محتوای پروتئین غنی خود، به‌خوبی شناخته شده‌اند و به طور گسترده به‌عنوان گزینه غذایی با کیفیت شناخته می‌شوند. در میان گونه‌های آبی خوراکی، سخت‌پوستانی مانند میگو، خرچنگ، لابستر و کریل مورد توجه هستند. در بازار داخلی و بین‌المللی، بی‌مهرگان دارای بدن بندبند از نظر تجاری اهمیت و قیمت بالا هستند (۷). در این میان، آلودگی غذا به فلزات، به دلیل تجمع زیستی و آثار آن بر چرخه‌های بیو ژئوشیمیایی یکی از مهم‌ترین نگرانی‌ها می‌باشد (۱۱). بر اساس نتایج، غلظت فلزات سنگین در بافت و ایستگاه‌های مختلف خرچنگ شناگر آبی با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشته است. به‌طوری‌که، غلظت تمامی فلزات جیوه، روی و نیکل در هر سه ایستگاه، در هپاتوپانکراس بیشتر از عضله بوده است. به‌علاوه، الگوی تجمع فلزات سنگین در خرچنگ شناگر آبی در هر سه ایستگاه مورد بررسی به‌صورت جیوه > نیکل > روی بود. در مقایسه با سایر فلزات، غلظت روی در بافت هپاتوپانکراس بیشتر بود که به نظر می‌رسد به دلیل غلظت بالای این فلز در محیط و به‌خصوص، رسوب بوده است. از سوی دیگر، می‌توان استدلال کرد که فراهمی زیستی بیشتر روی نسبت به سایر فلزات به دلایلی مانند فعالیت باکتریایی یا حجم بالاتر ورودی به محیط است. به‌علاوه، فلز روی به‌عنوان یک کوفاکتور در تعداد زیادی از آنزیم‌ها و پروتئین‌های احیاکننده مانند DNA و RNA پلی استراز، کربنیک انیدراز یا آلکالین فسفاتاز عمل می‌کند (۱۲). بررسی غلظت فلزات سنگین در رسوبات هر ایستگاه نشان داد که فلز روی در ایستگاه بریس دارای بیشترین غلظت بوده است. فلز روی و نیکل بین تمامی ایستگاه‌ها دارای اختلاف معنی‌دار و فلز جیوه بین تمامی ایستگاه‌ها فاقد اختلاف معنی‌دار بود. به

علاوه، بافت هپاتوپانکراس نسبت به عضله، در هر سه ایستگاه دارای جیوه بیشتری بود. غلظت جیوه در هپاتوپانکراس خرچنگ *P. segnis* خلیج فارس در مطالعه Ghaeni و همکاران (۲۰۱۵) نیز، بیش از مطالعه حاضر بود (۱۳). Kazemzadeh Khoei و Abdi Bastami (۲۰۱۳)، به بررسی غلظت جیوه در بافت‌های خرچنگ شناگر آبی (*P. pelagicus*) جزیره خارک پرداختند و غلظت فلز جیوه در هپاتوپانکراس و عضله بیشتر از مطالعه حاضر بود (۱۴). آن‌ها عنوان کردند که تجمع جیوه در موجودات آبی ممکن است به عواملی مانند فراهمی زیستی فلز، ویژگی‌های هیدرودینامیک محیط، موقعیت ایستگاه‌های جمع‌آوری، دما، شوری و منابع آلودگی بستگی داشته باشد. با افزایش تماس با جیوه، تجمع در رسوب و بافت‌های مختلف افزایش می‌یابد؛ بنابراین، جیوه از طریق زنجیره غذایی به بدن انسان منتقل می‌شود (۱۴). سطوح بالای جیوه در هپاتوپانکراس ممکن است به دلیل فراوانی پروتئین متالوتئین در این بافت در مقایسه با دیگر اندام‌ها باشد. براین‌اساس، هپاتوپانکراس خرچنگ به‌عنوان اندام هدف تجمع جیوه گزارش شده است (۵). مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعه خرچنگ شناگر آبی (*P. pelagicus*) توسط Al-Mohanna و همکارش (۲۰۰۱)، نشان داد که غلظت روی در بافت عضله بیشتر و در بافت هپاتوپانکراس کمتر بود (۱۵). غلظت روی در بررسی Firat و همکاران (۲۰۰۸) راجع به خرچنگ *Charybdis longicollis* در خلیج اسکندرون ترکیه، در عضله کمتر و در هپاتوپانکراس بسیار بیشتر از مطالعه حاضر بود (۱۶). در مقابل، در بررسی Genc و Yilmaz (۲۰۱۵)، غلظت فلزات جیوه، روی و نیکل در خرچنگ آبی تالاب کویچگیز ترکیه بسیار کمتر از مطالعه حاضر بود (۱۷). در بررسی Celik و

در مقایسه با مطالعه حاضر بسیار بیشتر بود (۲۲). در تحقیق Delshab و همکاران (۲۰۱۷)، بر روی توزیع ژئوشیمیایی آلودگی فلزات سنگین در رسوبات دریایی بندر عسلویه خلیج فارس، مقدار فلزات سنگین روی و نیکل کمتر از مطالعه حاضر بود (۲۳). در نتایج بررسی Dehghan Madiseh و همکاران (۲۰۰۸)، بر روی سطوح آلودگی در سواحل خوزستان، غلظت نیکل و روی بیشتر و جیوه کمتر از مطالعه حاضر بود (۲۴). بر اساس تحقیقات انجام شده توسط Hamzeh و همکاران (۲۰۱۳)، بر روی اثر شناورهای صیادی بر روی تجمع فلزات نادر در رسوبات سه بندر در طول سواحل ایرانی دریای عمان، مقادیر فلزات نیکل و روی بسیار بیشتر از مطالعه حاضر بود (۲۵). طبق نتایج Song و همکاران (۲۰۱۴)، از بررسی غلظت فلزات سنگین در رسوبات سواحل کره جنوبی، غلظت نیکل و روی بسیار کمتر از مطالعه حاضر بود (۲۶). غلظت روی در مطالعه Zhou و همکاران (۲۰۰۸)، مبنی بر شناسایی منابع فلزات سنگین در رسوبات و آب‌های سواحل دریای شرق چین در شهر یانگ ژانگ، بسیار بیشتر از مطالعه حاضر بود (۲۷). آگاه (۲۰۲۱)، در ارزیابی فلزات سنگین در رسوبات، ماهی و موی انسان در چابهار، نشان داد که غلظت فلزات روی و نیکل در مقایسه با مطالعه حاضر بیشتر بوده است (۲۸). نتایج بررسی عبدالله‌پور و همکاران (۲۰۱۳)، بر روی تجمع فلزات سنگین در رسوبات و ماهیان گونه‌های کفزی، بنتوپلاژیک و پلاژیک خور موسی نیز نشان داد که مقدار فلز نیکل بیشتر از مطالعه حاضر بوده است (۲۹). در مطالعه Pandiyan و همکاران (۲۰۲۰)، که بر روی سطوح آلودگی فلزات سنگین در آب، رسوب و آبزیان انجام شد، نشان داد که غلظت جیوه بسیار بیشتر و روی و نیکل در مقایسه با مطالعه حاضر بسیار کمتر بوده است (۳۰). طبق تحقیقات Sadeghi و همکاران

همکاران، (۲۰۰۶) بر روی بافت‌های عضله و هپاتوپانکراس خرچنگ آبی (*Callinectes sapidus*) تالاب شمال شرقی دریای مدیترانه، غلظت روی و جیوه بسیار کمتر از مطالعه حاضر بود (۱۸). مطالعه Coğun و همکاران (۲۰۱۷)، بر روی فلزات سنگین خرچنگ آبی (*C. sapidus*) نشان داد که غلظت فلز روی در بافت‌های عضله و هپاتوپانکراس کمتر از مطالعه حاضر بوده است (۶). اختلاف غلظت فلزات در نمونه‌های جمع‌آوری شده از ایستگاه‌های مختلف، به شرایط زیستگاه آن‌ها بستگی دارد. زیرا، واکنش‌های شیمیایی، فراهمی زیستی فلزات و منابع آلودگی که به طور بالقوه می‌توانند بر روی تجمع فلزات اثر بگذارند، در هر یک از ایستگاه‌ها متفاوت است (۱۹). مقایسه غلظت فلزات در بافت عضله خرچنگ مطالعه حاضر با استانداردهای جهانی FAO، UK MAFF، UK MAFF: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (United Kingdom)، FDA (States Food and Drug Administration)، WHO و NHMRC نشان داد (۲۰، ۲۱) که غلظت فلز جیوه پایین‌تر از حد مجاز اعلام شده توسط NHMRC و نزدیک به سایر استانداردها؛ غلظت روی از استانداردهای UK (MAFF) و FAO بالاتر و از استانداردهای WHO و NHMRC پایین‌تر؛ و غلظت نیکل کمتر از حد مجاز اعلام شده توسط FDA بوده است؛ بنابراین، باتوجه به غلظت جیوه و روی، مصرف گوشت خرچنگ شناگر آبی (*P. segnis*) ممکن است برای سلامتی خطرآفرین باشد. در بررسی انجام شده توسط Barath Kumar و همکاران (۲۰۱۹)، بر روی توزیع عناصر و آلودگی فلزی در رسوبات سطحی سواحل جنوب شرقی هند، غلظت نیکل کمتر از مطالعه حاضر بود (۵). در تحقیقی که توسط بلوچ و همکاران (۲۰۱۸)، بر روی آلودگی مس و روی در رسوبات خلیج پزم داشتند، مقدار فلز روی

نتیجه‌گیری

بنابر نتایج، مصرف گوشت خرچنگ مورد مطالعه از نظر جیوه و به ویژه، روی ممکن است برای سلامتی مضر باشد. مقایسه میانگین غلظت فلزات سنگین در رسوبات نمونه‌برداری شده از ایستگاه‌ها با استانداردهای کیفیت رسوب، نشان از پایین بودن غلظت روی و نیکل و جیوه داشت.

منابع

1. Agah H, Saleh A, Darvish Bastami K, Sheijooni Fumani N. Ecological risk, source and preliminary assessment of metals in the surface sediments of Chabahar Bay, Oman Sea. Mar Pollut Bull. 2016;107(1):383-388.
2. Viswanathan C, Azhaguraj R, Selvanayagam M, Raffi SM. Heavy metal levels in different tissues of the Blue Swimming crab (*Portunus pelagicus*, Portunidae) collected from Ennore Estuary. Int J Res Fish Aquac. 2013;3(1):1-6.
3. Satheeswaran T, Yuvaraj P, Damotharan P, Karthikeyan V, Jha DK, Dharani G, Balasubramanian T, Kirubakaran R. Assessment of trace metal contamination in the marine sediment, seawater, and bivalves of Parangipettai, southeast coast of India. Mar Pollut Bull. 2019;149:110499.
4. Olgunoglu MP, Olgunoglu İA. Heavy metal contents in blue swimming crab from the Northeastern Mediterranean Sea, Mersin Bay, Turkey. Pol J Environ Stud. 2016;25(5):2233-2237.
5. Barath Kumar S, Padhi RK, Mohanty AK, Satpathy KK. Elemental distribution and trace metal contamination in the surface sediment of south east coast of India. Mar Pollut Bull. 2016;114(2):1164-1170.
6. Çoğun HY, Firat Ö, Aytekin T, Firidin G, Firat Ö, Varkal H, Temiz Ö, Kargin F. Heavy metals in the blue crab (*Callinectes*

(۲۰۱۹)، بر روی تجمع عناصر نادر و ارزیابی خطر سلامتی و اکولوژیکی در رسوبات و ماهی شوریده (*Otolithes ruber*) در دریای عمان، غلظت نیکل بسیار بیشتر از مطالعه حاضر بوده است (۳۱). نیکل در مقادیر کم برای تولید گلبول قرمز خون مورد نیاز است. اما، در مقادیر زیاد به طور خفیف سمی می‌شود. مواجهه مزمن با آن می‌تواند باعث کاهش وزن، آسیب قلبی، کبدی و تحریک پوست شود. نیکل در جانوران آبی تجمع می‌یابد. اما، باعث بزرگ‌نمایی زیستی از طریق زنجیره غذایی نمی‌شود (۳۲). صخره‌های خلیج چابهار در سواحل مَکُران، صخره‌های افیولیتی پوسته‌ای اقیانوسی هستند که با عناصری مانند کروم و نیکل غنی شده و از این رو، می‌تواند منشأ اصلی این عناصر در منطقه نمونه‌برداری باشد (۲۸). همچنین، از آنجایی که نیکل نشانگر آلودگی نفتی است، افزایش میزان نیکل می‌تواند نشان‌دهنده افزایش آلودگی نفتی (ترکیبات نفتی در سوخت و صنایع وابسته) در منطقه مورد مطالعه باشد (۳۱). عملیات مختلف نظیر کشتی‌رانی، تعمیر کشتی، سوخت‌رسانی، گریس‌کاری و رنگ‌آمیزی دلیل تجمع بالای فلزات کمیاب در بنادر عنوان شده است. رنگ ضد رسوب، علاوه بر فاضلاب کشتی‌های ماهیگیری، یکی دیگر از منابع آلودگی فلزات سنگین در بنادر است (۲۵). نتایج حاصل از مطالعه حاضر و مقایسه غلظت فلزات سنگین در رسوبات خلیج چابهار نشانگر بیشترین غلظت فلز جیوه در ایستگاه پزم بود. به نظر می‌رسد که علت بالا بودن آلودگی در این ناحیه، ناشی از تخلیه فاضلاب روستایی و تردد شناورهای صیادی می‌باشد (۳۳). مقایسه میانگین غلظت فلزات در رسوبات ایستگاه‌های بریس، پزم و تیس با استانداردهای کیفیت رسوب مؤید پایین بودن غلظت جیوه روی و نیکل نسبت به این استانداردها می‌باشد.

- biphenyl (PCB), polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), mercury, methyl mercury, and arsenic in blue crab *Portunus segnis* from Persian Gulf. *Environ Monit Assess.* 2015;187(5):253-261.
14. Kazemzadeh Khoei J, Abdi Bastami A. Mercury concentrations in tissues of blue swimming crab *Portunus pelagicus* and sediments from Khark Island. *World Appl Sci J.* 2013;21(9):1391-1397.
 15. Al-Mohanna SY, Subrahmanyam M NV. Flux of heavy metal accumulation in various organs of the intertidal marine blue crab, *Portunus pelagicus* (L.) from the Kuwait coast after the Gulf War. *Environ Int.* 2001;27(4):321-326.
 16. Fırat Ö, Gök G, Çoğun HY, Yüzereroğlu TA, Kargin F. Concentrations of Cr, Cd, Cu, Zn, and Fe in crab *Charybdis longicollis* and shrimp *Penaeus semisulcatus* from the Iskenderun Bay, Turkey. *Environ Monit Assess.* 2008;147(1-3):117-123.
 17. Genc TO, Yılmaz F. Bioaccumulation [indices] of metals in blue crab inhabiting specially protected area Koycegiz Lagoon (Turkey). *Indian J Anim Sci.* 2015;85(1):94-99.
 18. Celik M, Küçükgülmez A, Yanar Y, Çıkrıkçı M. Concentrations of some heavy metals in tissues of the blue crab, *Callinectes sapidus*, from the lagoon of the North Eastern Mediterranean Sea. *Fresenius Environ Bull.* 2006;15(5):351-355.
 19. Hosseini M, Pazooki J, Safaei M. Size at maturity, sex ratio and variant morphometrics of blue swimming crab *Portunus segnis* (Forsk., 1775) from Boushehr Coast (Persian Gulf). *J Mar Sci: Res Dev.* 2014;4(2):149-153.
 20. Food and Drug Administration – FDA. Guidance document for nickel in shellfish. Washington, D.C.: DHHS/PHS /FDA/CFSAN/Office of Seafood. 1993.
 21. WHO. Health criteria and other supporting information. In: Guidelines for *sapidus*) in Mersin Bay, Turkey. *Bull Environ Contamination Toxicol.* 2017;98(6):824-829.
 7. Nanda PK, Da AK, Dandapat P, Dhar P, Bandyopadhyay S, Dib AL, Lorenzo JM, Gagaoua M. Nutritional aspects, flavour profile and health benefits of crab meat based novel food products and valorisation of processing waste to wealth: A review. *Trends Food Sci Technol.* 2021;112:252-267.
 8. Fatemi F, Khoramnezhadian S, Shamsaei Mehrenjan M. 2015. Bioaccumulation of arsenic in blue swimmer crab (*Portunus pelagicus*) along the Persian Gulf coasts, Asalouyeh region-3. *J Mar Biol.* 7(1):43-52
 9. Soltani Z, Loghmani M, Toutouni MM, Sinaei M. Study of changes in metallothionein concentration of ghost crab (*Ocypode saratan*) in Gwater and Chabahar mangrove forests in two periods of pre-monsoon and post-monsoon. *J Food Sci Technol.* 2020;9(4):257-270.
 10. Taleshpour S, Taghavi L, Nasrollahzadeh Saravi H. Prioritizing the amount of metal pollution using pollution load indices and biological hazard potential in surface sediments of rivers on the southeastern coast of the Caspian Sea. *Environ Sci Technol.* 2020;22(6):17-30.
 11. Abkenar AM, Yahyavi M, Esmaili M, Rombenso A. High bioaccumulation factors and ecological risk index of Cd and Hg in Indian white shrimp, hooded oyster, brown algae, and Sediment in northern coasts of the Gulf of Oman before and after a monsoon. *Reg Stud Mar Sci.* 2020;41:101552.
 12. Talebi Matin M, Mashinchian A, Sinaei M, Jamili S. Metallothionein as a biomarker of heavy metal (Cd, Cu, Zn, Pb, Hg, Ni, Cr) pollution in hermit crab (*Clibanarius signatus*). *Environ Asia.* 2019;12(2):164-171.
 13. Ghaeni M, Adami Pou N, Hosseini M. Bioaccumulation of polychlorinated

- Yangzhong, China. Environ Geol. 2008;54(2):373-380.
28. Agah H. Ecological risk assessment of heavy metals in sediment, fish, and human hair from Chabahar Bay, Makoran, Iran. Mar Pollut Bull. 2021;169(5):112345.
29. Abdolahpour Monikh F, Safahieh A, Savari A, Doraghi A. Heavy metal concentration in sediment, benthic, benthopelagic, and pelagic fish species from Musa Estuary (Persian Gulf). Environ Monitor Assess. 2013;185(1):215-222.
30. Pandiyan J, Mahboob S, Govindarajan M, Al-Ghanim KA, Ahmed Z, Al-Mulhm N, Jagadheesan R, Krishnappa K. An assessment of level of heavy metals pollution in the water, sediment and aquatic organisms: A perspective of tackling environmental threats for food security. Saudi J Biol Sci. 2020;28(2):1218-1225.
31. Sadeghi P, Loghmani M, Afsa E. Trace element concentrations, ecological and health risk assessment in sediment and marine fish *Otolithes ruber* in Oman Sea, Iran. Mar Pollut Bull. 2019;140(1):248-254.
32. Govind P, Madhuri S. Heavy metals causing toxicity in animals and fishes. Res J Anim Vet Fish Sci. 2014;2(2):17-23.
33. Mirza R, Moeinoddini M. Contamination and ecological assessment of heavy metals (Hg, Cd, Pb, Ni, V, Cu) in surface sediments of Chabahar Bay. J Oceanogr. 2017;8(31):1-9.
- Drinking Water Quality, 2nd ed., Geneva. 1996;2:31-388.
22. Balooch A, Sadeghi P, Attaran Fariman G. Evaluation of copper and zinc contamination in *Otolithes ruber* and sediments of the Pozm Bay (north of Oman Sea): Histopathology and chemical analysis. J Persian Gulf, 2018;9(31):21-31.
23. Delshab H, Farshchi P, Keshavarzi B. Geochemical distribution, fractionation and contamination assessment of heavy metals in marine sediments of the Asaluyeh port, Persian Gulf. Mar Pollut Bull., 2017;115(1-2):401-411.
24. Dehghan Madiseh S, Savari A, Parham H, Marammazy JG, Papahn F, Sabzalizadeh S. Heavy metals contaminant evaluation in sediments of Khou-e-Musa creeks, northwest of Persian Gulf. Iranian J Fish Sci. 2008;7(2):137-156.
25. Hamzeh MA, Shah-Hosseini M, Naderi Beni A. Effect of fishing vessels on trace metal contamination in sediments of three harbors along Iranian Oman Sea coast[s]. Environ Monit Assess. 2013;185(2):1791-1807.
26. Song Y, Choi MS, Lee JY, Jang DJ. Regional background concentrations of heavy metals (Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Pb) in coastal sediments of the South Sea of Korea. Sci Total Environ. 2014;482-483:80-91.
27. Zhou J, Ma D, Pan J, Nie W, Wu K. Application of multivariate statistical approach to identify heavy metal sources in sediment and waters: a case study in

Research Article

Comparison of the Effects of Barberry and Saffron Extracts Combined with a Period of Endurance Physical Activity on POMC and MC4R Genes in Female Wistar Rats Addicted to Methamphetamine

Daniyal Hakak¹, Rambod Khajaei¹, Sayyed Javad Ziaolhagh^{2*}, Akbar Safipour-Afshar³

1- Department of Sports Sciences, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

2- Department of Sports Science, Shahroud Branch, Islamic Azad University, Shahroud, Iran

3- Department of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

*Corresponding author: javadzia@gmail.com

Received: 16 February 2025

Accepted: 20 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1199681

Abstract

Methamphetamine is a potent central nervous system stimulant that directly affects brain function, causing significant changes in feeding patterns and appetite regulation. Given the extensive side effects of this substance, the use of alternative interventions such as herbal remedies and exercise has been considered as harm reduction strategies. In this study, 30 female Wistar rats were divided into seven groups of six: healthy control, methamphetamine, methamphetamine + aerobic exercise, methamphetamine + berberine (barberry extract), methamphetamine + exercise + berberine, methamphetamine + crocin (saffron extract), and methamphetamine + exercise + crocin. Methamphetamine was injected intraperitoneally at an initial dose of 10 and then 40 mg/kg six days a week. Berberine hydrochloride (100 mg/kg) was administered via drinking water, and crocin was administered in a similar manner. Aerobic exercise consisted of treadmill running at a speed of 25 m/min for 30 minutes, six days a week, for four weeks. After the intervention, the expression of pro-opiomelanocortin (POMC) and melanocortin 4 receptor (MC4R) genes in hypothalamic tissue was examined using the relative fold change method. The results showed that methamphetamine use increased the expression of POMC (166%) and MC4R (42%). Berberine caused a greater decrease in the expression of both POMC (47% vs. 14%) and MC4R (47% vs. 29%) genes than crocin. Aerobic exercise also had a similar effect. The combination of berberine + exercise showed the greatest reduction in POMC (50%) and the combination of crocin + exercise showed the greatest reduction in MC4R (76%). These results show the effective role of herbal and exercise interventions in inhibiting the neurochemical consequences of methamphetamine.

Keywords: Methamphetamine, Berberine Hydrochloride, Crocin, Aerobic Exercise, Pro-opiomelanocortin, Melanocortin-4 Receptor.

مقاله پژوهشی

مقایسه تاثیر عصاره زرشک و زعفران همراه با یک دوره فعالیت بدنی استقامتی بر ژن‌های POMC و MC4R در رت‌های ویستار ماده معتاد به مت‌آمفتامین

دانیال حکاک^۱، رامبد خواجه‌ای^۱، سید جواد ضیاءالحق^{۲*}، اکبر صفی‌پور افشار^۳

۱- گروه علوم ورزشی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

۲- گروه علوم ورزشی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران

۳- گروه زیست‌شناسی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

*مسئول مکاتبات: javadzia@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۸

DOI: 10.60833/ascij.2025.1199681

چکیده

مت‌آمفتامین (شیشه) یک محرک قوی سیستم عصبی مرکزی است که با تأثیر مستقیم بر عملکرد مغز، تغییرات قابل توجهی در الگوهای تغذیه‌ای و تنظیم اشتها ایجاد می‌کند. با توجه به عوارض گسترده این ماده، استفاده از مداخلات جایگزین مانند درمان‌های گیاهی و فعالیت ورزشی به عنوان راهکارهای کاهش آسیب مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش، ۳۰ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار به هفت گروه شش‌تایی شامل: کنترل سالم، مت‌آمفتامین، مت‌آمفتامین + تمرین هوازی، مت‌آمفتامین + بربرین (عصاره زرشک)، مت‌آمفتامین + تمرین + بربرین، مت‌آمفتامین + کروسین (عصاره زعفران)، و مت‌آمفتامین + تمرین + کروسین تقسیم شدند. مت‌آمفتامین به صورت تزریق داخل صفاقی با دوز اولیه ۱۰ و سپس ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم شش روز در هفته تزریق شد. بربرین هیدروکلراید (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) از طریق آب آشامیدنی و کروسین نیز با روش مشابه تجویز شد. تمرین هوازی شامل دویدن روی تردمیل با سرعت ۲۵ متر در دقیقه، به مدت ۳۰ دقیقه، شش روز در هفته و به مدت چهار هفته انجام گرفت. پس از اتمام مداخلات، بیان ژن‌های پرواپیوملانوکورتین (POMC) و گیرنده ملانوکورتین ۴ (MC4R) در بافت هیپوتالاموس با روش فولدچنج نسبی بررسی شد. نتایج نشان داد مصرف مت‌آمفتامین باعث افزایش بیان ژن‌های POMC (۱۶۶ درصد) و MC4R (۴۲ درصد) می‌شود. بربرین نسبت به کروسین کاهش بیشتری در بیان هر دو ژن POMC (۴۷ درصد در برابر ۱۴ درصد) و MC4R (۴۷ درصد در برابر ۲۹ درصد) تمرین هوازی نیز اثری مشابه داشت. ترکیب بربرین + تمرین بیشترین کاهش را در POMC (۵۰٪) و ترکیب کروسین + تمرین بیشترین کاهش را در MC4R (۷۶ درصد) نشان داد. این نتایج نقش مؤثر مداخلات گیاهی و ورزشی را در مهار پیامدهای نوروشیمیایی مت‌آمفتامین نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: مت‌آمفتامین، بربرین هیدروکلراید، کروسین، فعالیت بدنی هوازی، پرواپیوملانوکورتین، گیرنده ملانوکورتین ۴.

مقدمه

هیپوتالاموس نقش مهمی در تنظیم سیری و اشتها از طریق مسیرهای مختلف ژن ایفا می‌کند. دو مسیر کلیدی درگیر در این فرآیند، مسیر ملانوکورتین و مسیر لپتین هستند. در مسیر ملانوکورتین نورون‌های پرواپیوملانوکورتین (POMC) در هسته کمانی هیپوتالاموس، هورمون محرک ملانوسیت آلفا (α -

MSH) تولید می‌کنند که به گیرنده ملانوکورتین-۴ (MC4R) در پارا بطنی متصل می‌شود (۱). نورون‌های MC4R در PVN با کاهش مصرف غذا و افزایش مصرف انرژی به α -MSH پاسخ می‌دهند. این مسیر در حالت تغذیه فعال می‌شود، زمانی که هورمون‌های در گردش مانند لپتین و انسولین به فراوانی مواد مغذی سیگنال می‌دهند (۲). در مسیر لپتین که توسط بافت چربی تولید می‌شود، به گیرنده خود (LEPR) روی نورون‌های POMC متصل می‌شود. این اتصال، پردازش POMC به α -MSH را ارتقا می‌دهد که سپس نورون‌های MC4R را فعال می‌کند و در حالت گرسنگی، نورون‌های پپتید مرتبط با آگوتی (AgRP) و نوروپپتید Y (NPY) فعال می‌شوند و با مهار نورون‌های MC4R، مصرف غذا را تقویت می‌کنند (۳). نورون‌های بیان‌کننده گیرنده اکسی‌توسین در هسته کمانی با درگیر کردن نورون‌های MC4R در PVN از طریق انتقال سریع گلو تاماترژیک تقویت شده توسط α -MSH به سرعت باعث سیری می‌شوند. از طرفی، نورون‌های موجود در هسته دسته منزوی (NTS) که کوله سیستوکینین (CCK) را بیان می‌کنند مستقیماً نورون‌های MC4R را در PVN تحریک می‌کنند تا سیگنال سیری را نشان دهند. این مسیرها و نورون‌ها برای تنظیم اشتها و سیری، تضمین هموستاز انرژی و جلوگیری از چاقی با هم کار می‌کنند. رابطه بین مت‌آفتمین، POMC و MC4R پیچیده است و شامل مکانیسم‌های متعددی است که بر مصرف غذا و سیری تأثیر می‌گذارد. در حالی که مت‌آفتمین می‌تواند با مهار بیان NPY، مصرف غذا را سرکوب کند، همچنین می‌تواند مسیر MC4R را برای القای سیری فعال کند. مت‌آفتمین می‌تواند بر پردازش POMC که پیش‌ساز پپتید بی‌اشتهایی، هورمون محرک ملانوسیت آلفا است، تأثیر بگذارد (۴). α -MSH به MC4R متصل می‌شود و سرکوب اشتها را تحریک

می‌کند. مت‌آفتمین می‌تواند بیان پپتیدهای مشتق شده از POMC را تغییر دهد که ممکن است به اثرات بی‌اشتهایی آن کمک کند. مت‌آفتمین می‌تواند با مسیر MC4R که نقش مهمی در تنظیم اشتها و وزن بدن دارد، تعامل داشته باشد (۵). از طرفی، مت‌آفتمین می‌تواند بر بیان MC4R و مسیرهای سیگنال‌دهی پایین دست آن تأثیر بگذارد و بر مصرف غذا و سیری تأثیر بگذارد. همچنین مت‌آفتمین می‌تواند با مهار بیان نوروپپتید Y (یک پپتید انرژی‌زا)، مصرف غذا را سرکوب کند. این اثر در موش‌هایی با دسترسی محدود به غذا آشکارتر است، که نشان می‌دهد اثرات بی‌اشتهایی دارو در موقعیت‌های محرومیت از غذا بارزتر است. مت‌آفتمین می‌تواند با فعال کردن مسیر MC4R، سیری را افزایش دهد که منجر به سرکوب اشتها می‌شود. این اثر در بیماران مبتلا به واریانت‌های ژنتیکی نادر در مسیر POMC/MC4R مشاهده می‌شود، جایی که نشان داده آگونیست انتخابی MC4R، باعث سیری و کاهش وزن بدن می‌شود. مصرف مت‌آفتمین به دلیل اثرات سرکوب‌کننده اشتها می‌تواند منجر به سوء تغذیه و کاهش شدید وزن شود. مصرف مزمن همچنین می‌تواند باعث ایجاد طیف وسیعی از مشکلات سلامت جسمی و روانی از جمله مشکلات قلبی عروقی، مشکلات تنفسی و اختلالات روانی شود (۶). ورزش هوازی با POMC و MC4R به روش‌های مختلف تعامل دارد و بر اشتها و هموستاز انرژی تأثیر می‌گذارد. نشان داده شده است که ورزش هوازی باعث افزایش فعالیت نورون‌های POMC در هسته کمانی (ARC) هیپوتالاموس می‌شود که در تنظیم اشتها و تعادل انرژی نقش دارد. این افزایش در فعالیت POMC می‌تواند منجر به سرکوب اشتها و افزایش مصرف انرژی شود (۷). ورزش هوازی همچنین می‌تواند فعالیت MC4R را تعدیل کند، گیرنده‌ای که نقش مهمی در تنظیم اشتها و

وزن بدن دارد (۳). ورزش بیان MC4R را در هیپوتالاموس افزایش می‌دهد، که می‌تواند به اثرات بی‌اشتهایی آن کمک کند (۸). اثرات ورزش بر روی POMC و MC4R می‌تواند بسته به وضعیت انرژی فرد متفاوت باشد. به عنوان مثال، روزه گرفتن قبل از ورزش باعث افزایش فعالیت نورون‌های POMC و بیان MC4R می‌شود که منجر به افزایش سرکوب اشتها و مصرف انرژی می‌شود. شدت ورزش می‌تواند بر اثرات ورزش بر POMC و MC4R نیز تأثیر بگذارد. ورزش با شدت بالا در مقایسه با ورزش با شدت کم، اثرات بارزتری بر روی POMC و MC4R دارد (۷). ورزش هوازی از چاقی و سندرم متابولیک در موش‌های مبتلا به ناک اوت ژن MC4R جلوگیری می‌کند، که نشان می‌دهد ورزش می‌تواند به کاهش اثرات کمبود MC4R بر هموستاز انرژی کمک کند (۹). به طور کلی، ورزش هوازی به روش‌های پیچیده‌ای با POMC و MC4R تعامل دارد و بر اشتها و هموستاز انرژی تأثیر می‌گذارد. اثرات ورزش بر روی این مسیرها بسته به عواملی مانند وضعیت انرژی و شدت ورزش می‌تواند متفاوت باشد (۱۰). ازطرفی، بربرین هیدروکلراید، یک ترکیب طبیعی مشتق شده از گیاه زرشک کوهی، برای اثرات بالقوه آن بر اشتها مورد مطالعه قرار گرفته است. بربرین هیدروکلراید ممکن است بر اشتها و مدیریت وزن تأثیر بگذارد (۱۱). بربرین هیدروکلراید با افزایش تولید هورمون‌های خاصی که گرسنگی و سیری را تنظیم می‌کنند، اشتها را کاهش می‌دهد. بربرین هیدروکلراید با کاهش وزن مرتبط است که ممکن است تا حدی به دلیل اثرات سرکوب‌کننده اشتها باشد. مکمل بربرین هیدروکلراید منجر به کاهش وزن قابل توجهی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و چاقی می‌شود (۱۲). اثرات سرکوب‌کننده اشتها بربرین هیدروکلراید با مکانیسم‌های مختلفی انجام می‌شود، از جمله: بربرین

هیدروکلراید تولید پپتید-۱ شبه گلوکاگون (GLP-1) را افزایش می‌دهد، هورمونی که به تنظیم اشتها و متابولیسم گلوکز کمک می‌کند. نشان داده شده است که بربرین هیدروکلراید سطح گرلین را کاهش می‌دهد، هورمونی که اشتها را تحریک می‌کند بربرین هیدروکلراید تولید پپتید YY (PYY) را افزایش می‌دهد، هورمونی که به تنظیم اشتها و سیری کمک می‌کند. دوز و مدت بهینه مکمل بربرین هیدروکلراید برای سرکوب اشتها و کاهش وزن به خوبی مشخص نشده است (۱۳). با این حال، بیشتر مطالعات از دوزهای مختلف از ۵۰۰ میلی‌گرم تا ۱۵۰۰ میلی‌گرم در روز برای دوره‌های ۴-۱۲ هفته استفاده کرده‌اند. مکمل هیدروکلراید بربرین بیان ژن POMC را در مغز افزایش می‌دهد که در تنظیم اشتها و تعادل انرژی نقش دارد (۱۴). کروسین که ماده موثر کلالة زعفران است دارای اثرات سرکوب‌کننده اشتها است و ممکن است با تأثیر بر بیان ژن‌های POMC و MC4R به کاهش وزن کمک کند. کروسین بیان ژن POMC را که در تنظیم اشتها و تعادل انرژی نقش دارد، تنظیم می‌کند. مکمل کروسین بیان ژن POMC را در مغز افزایش می‌دهد که در تنظیم اشتها و تعادل انرژی نقش دارد (۱۵). کروسین همچنین بر بیان ژن MC4R که یک تنظیم‌کننده کلیدی اشتها و تعادل انرژی است، تأثیر می‌گذارد. مکمل کروسین بیان ژن MC4R را در هیپوتالاموس افزایش می‌دهد که در تنظیم اشتها و تعادل انرژی نقش دارد. اثرات کروسین بر روی ژن‌های POMC و MC4R با مکانیسم‌های مختلفی انجام می‌شود، از جمله افزایش فعالیت AMPK که کروسین پروتئین‌کیناز فعال‌شده با AMP (AMPK) را فعال می‌کند که در تنظیم تعادل انرژی و اشتها نقش دارد. فعال‌سازی AMPK با افزایش بیان ژن‌های POMC و MC4R مرتبط است (۱۶). کروسین تولید پپتید-۱ شبه گلوکاگون (GLP-1) را افزایش می‌دهد،

هورمونی که به تنظیم اشتها و متابولیسم گلوکز کمک می‌کند GLP-1 با افزایش بیان ژن‌های POMC و MC4R مرتبط است (۱۷). دوز و مدت زمان: دوز و مدت بهینه مکمل کروسین برای سرکوب اشتها و کاهش وزن به خوبی مشخص نشده است. با این حال، بیشتر مطالعات از دوزهای مختلف از ۵۰۰ تا ۱۵۰۰ میلی‌گرم در روز برای دوره‌های ۴-۱۲ هفته استفاده کرده‌اند. با توجه به موارد ذکر شده و اثرگذار بودن فعالیت بدنی هوازی و سیلوسایین بر ژن‌های پروپوملانوکورتین (POMC) و گیرنده ملانوکورتین ۴ (MC4R) در قوس هیپوتالاموس و البته عدم وجود منابع کافی جهت بررسی این متغیرها در کنار یکدیگر، پژوهش حاضر درصدد کشف این روابط در موش‌های صحرانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

طرح تحقیق حاضر از نوع تجربی است که با نظارت کمیته اخلاق در پزشکی و کمیته حمایت از حقوق حیوانات با کد IR.IAU.NEYSHABUR.REC.1403.002 به تصویب رسید. در مطالعه حاضر ۴۲ سر موش ویستار از جنس ماده در محدوده وزنی ۲۰۰-۱۴۰ گرم تشکیل می‌دادند. موش‌ها از مرکز حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شاهرود تهیه شدند. برای موش‌ها پس از انتقال به محیط آزمایشگاه، یک هفته زمان جهت کاهش استرس و آشنایی با محیط جدید و یک هفته زمان برای آشنایی با تردمیل در نظر گرفته شد. در ادامه با توجه به وزن، حیوانات در ۷ گروه ۶ تایی کنترل سالم، دریافت مت‌آمفتامین، مت‌آمفتامین + فعالیت هوازی، مت‌آمفتامین + بربرین‌هیدروکلراید، مت‌آمفتامین + کروسین، مت‌آمفتامین + فعالیت هوازی + بربرین‌هیدروکلراید و مت‌آمفتامین + فعالیت هوازی + کروسین تقسیم‌بندی شدند. برای ثبت تغییرات وزنی حیوانات، وزن‌کشی قبل از شروع، در

طول اجرای پروتکل‌ها و پس از آن هر هفته انجام و ثبت گردید. مت‌آمفتامین از شرکت سیگما آلد ریچ خریداری و در نرمال سالین ۰/۹ درصد محلول شد جهت القای مت‌آمفتامین، موش‌ها میزان ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم/روز تزریق درون صفاقی مت-آمفتامین (به دلیل ایجاد استرس مزمن) را با استفاده از سرنگ انسولین به مدت ۵ روز دریافت کردند (۱۸). کروسین مشتق شده از عصاره گل زعفران تحت مجوز کروسینا، ایران برای استفاده در این مطالعه تهیه شد. کروسین ابتدا در محلول نرمال سالین حل شد و شش روز در هفته با دوز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به حیوانات بصورت درون صفاقی تزریق شد (۱۹). بربرین هیدروکلراید که ماده موثره زرشک کوهی می‌باشد از شرکت گلوکبر (ایران) تهیه شد و به حیوانات با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در روز با حل کردن آن در آب آشامیدنی اضافه شد (۲۰). پروتکل تمرین هوازی که به صورت تمرین استقامتی روی تردمیل جوندگان با پنج لاین مجزا انجام شد. در انتهای هر لاین، یک بخش الکتریکی قرار داشت که وقتی موش‌ها در نزدیکی بخش انتهایی لاین خود وارد می‌شدند، شوک الکتریکی سبکی را دریافت می‌کردند. قبل از شروع پروتکل تمرینی، حیوانات یک دوره آشناسازی کبا تردمیل را انجام دادند. برنامه تمرینی به مدت ۴ هفته تمرین هوازی روی تردمیل بود. ورزش مزمن (تمرین) شامل ۴ هفته برنامه دویدن با سرعت ۲۵ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه و ۶ روز در هفته (در مجموع ۲۴ جلسه) و بین ساعت ۹ تا ۱۲ صبح انجام می‌شد (۲۱) (جدول ۱). جهت بررسی های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت قشر مخ با استفاده از تیزاول، انجام گرفت، سپس با استفاده از خاصیت جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر و با کمک رابطه زیر غلظت و درجه خلوص نمونه RNA به صورت کمی بدست آمد: $C (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \epsilon \times$

به نمونه‌ی دیگر تغییر کرده است. مراحل محاسبه فولدچنج به طور کلی به شرح زیر است:
استخراج RNA و سنتز cDNA: ابتدا RNA از نمونه‌ها استخراج می‌شود و سپس به cDNA تبدیل می‌شود.

اندازه‌گیری سطح بیان ژن با استفاده از qPCR: بیان ژن مورد نظر و ژن مرجع (ژن‌هایی که سطح بیان آنها ثابت است، مانند GAPDH) در هر دو نمونه اندازه‌گیری می‌شود. این کار با استفاده از روش qPCR انجام می‌شود.

محاسبه میانگین Ct: مقدار Ct (چرخه‌ی آستانه) برای هر نمونه و هر ژن به دست می‌آید. بهتر است میانگین Ct چندین تکرار محاسبه شود تا دقت افزایش یابد.

محاسبه ΔCt (Delta Ct): با کم کردن مقدار Ct ژن مرجع از مقدار Ct ژن مورد نظر به دست می‌آید.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}}$$

محاسبه $\Delta\Delta Ct$ (Delta Delta Ct): با کم کردن ΔCt کنترل از ΔCt نمونه به دست می‌آید.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{control}}$$

محاسبه فولدچنج: فولدچنج با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه می‌شود: $\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

در این معادله، اگر $\Delta\Delta Ct$ منفی باشد، فولدچنج بزرگتر از ۱ خواهد بود که نشان‌دهنده افزایش بیان ژن در نمونه مورد نظر است. اگر $\Delta\Delta Ct$ مثبت باشد، فولدچنج کمتر از ۱ خواهد بود که نشان‌دهنده کاهش بیان ژن در نمونه مورد نظر است (۲۲).

d/1000. پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بسیار بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا پرایمرهای طراحی شده، مربوط به ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفت، و سپس بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش کمی q-RT PCR انجام پذیرفت. توالی آغازگرها در جدول ۲ نشان داده شده است. برای کنترل داخلی از mRNA β -actin استفاده شد. پروتکل چرخه حرارتی مورد استفاده Real time-PCR شامل: ۹۵° به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵° به مدت ۱۰ ثانیه، و به دنبال آن ۴۵ سیکل ۱۰° ثانیه‌ای در حرارت ۶۰ درجه بود. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold Cycle: CT) مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این پژوهش از برای بررسی تفاوت میان بیان ژن گروه‌های مختلف از روش‌های نوین بیوانفورماتیک استفاده شده است. بدین منظور جهت تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده در گروه‌ها، از روش فولدچنج و محاسبه اختلاف داده‌ها با ژن مرجع تجزیه و تحلیل انجام شده است.

محاسبه Fold Change: برای بیان ژن یک روش رایج برای مقایسه سطح بیان ژن در شرایط مختلف (مانند قبل و بعد از یک درمان) است. فولدچنج نشان می‌دهد که سطح بیان ژن در یک نمونه چگونه نسبت

جدول ۱- پروتکل تمرین هوازی

Table 1: Aerobic exercise protocol

Week	Speed (m/min)	Duration (min)
1	20	20
2	20	25
3	25	25
4	25	30

جدول ۲- الگوی پرایمر ژن‌ها

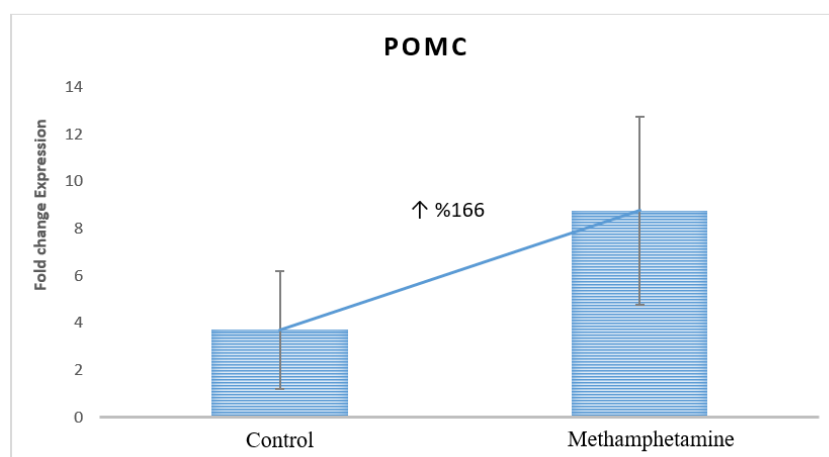
Table 2. Primer pattern of genes

Gene Name	Primer Sequence (5'→3')	Product Size (bp)
POMC	F: CCATAGATGTGTGGAGCTGGTG R: CATCTCCGTTGCCAGGAAACAC	200
MC4R	F: CCTGAGGTGTTTGTGACTCTGG R: AACGCTCACCAGCATATCAGCC	380
GAPDH (Housekeeping)	F: AAAGTTGTCATGGATGACC R: CATGGAGAAGGCTGGGG	195

نتایج

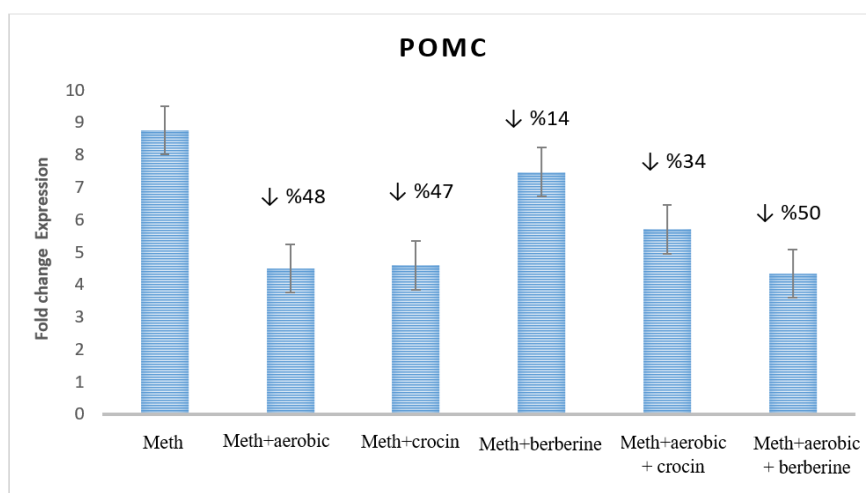
موجب افزایش ۴۲ درصدی این ژن نسبت به گروه کنترل سالم شده است (نمودار ۳). همچنین نتایج نشان داد بربرین هیدروکلراید نسبت به کروسین کاهش بیشتری در بیان ژن MC4R داشتند (به ترتیب ۴۷ درصد در برابر ۲۹ درصد کاهش). میزان کاهش این ژن در گروه تمرین هوازی نیز تقریباً به اندازه گروه کروسین بود (۲۸ درصد کاهش). در گروه‌های ترکیبی عصاره‌های گیاهی و تمرین، نتایج بطور شگفت‌آوری عکس ژن POMC بود و کاهش بیشتر در گروه ترکیب کروسین و تمرین هوازی نسبت به بربرین هیدروکلراید و تمرین هوازی نشان داده شد (به ترتیب ۷۶ درصد در برابر ۳۲ درصد کاهش) (نمودار ۴).

بررسی بیان ژن پروپیوملانوکورتین نشان داد القاء مت‌آمفتامین (شیشه) موجب افزایش ۱۶۶ درصدی این ژن نسبت به گروه کنترل سالم شده است (نمودار ۱). نتایج نشان داد کروسین زعفران نسبت به بربرین هیدروکلراید زرشک کوهی کاهش بیشتری در بیان ژن POMC داشتند (به ترتیب ۱۴ درصد در برابر ۴۷ درصد کاهش) تقریباً به اندازه گروه تمرین هوازی (۴۸٪ کاهش). در گروه‌های ترکیبی عصاره‌های گیاهی و تمرین، نتایج بطور شگفت‌آوری از کاهش بیشتر در گروه ترکیب زرشک کوهی و تمرین هوازی نسبت به کروسین و تمرین هوازی بود (به ترتیب ۵۰ درصد در برابر ۳۴ درصد کاهش) (نمودار ۲). در رابطه با بیان ژن MC4R، نتایج پژوهش حاضر الگویی مشابه ژن POMC نشان داد بطوریکه القاء مت‌آمفتامین (شیشه)



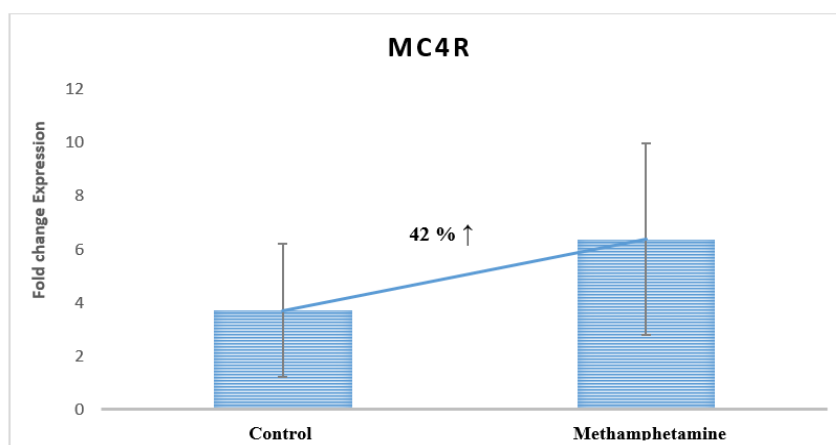
نمودار ۱- مقادیر بیان ژن POMC در گروه کنترل سالم و القاء شیشه

Fig. 1. POMC gene expression values in the healthy control and glass-induced groups



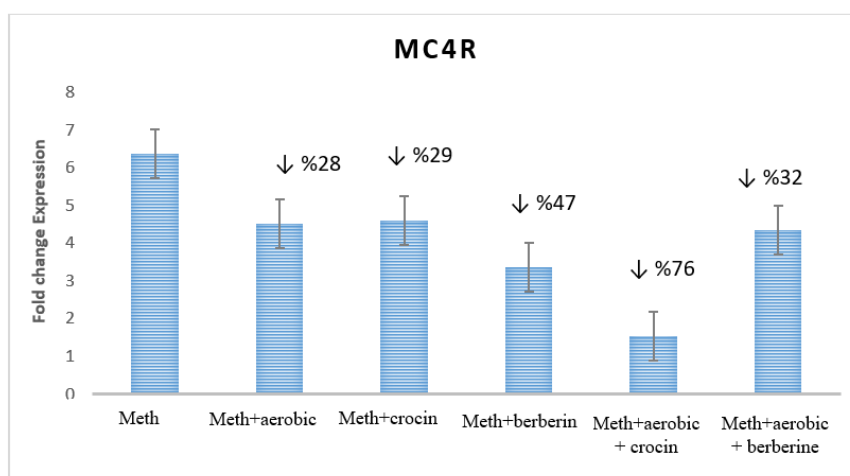
نمودار ۲- مقادیر بیان ژن POMC در گروه‌های مختلف

Fig. 2. POMC gene expression values in different groups



نمودار ۳- مقادیر بیان ژن MC4R در گروه کنترل سالم و القاء شیشه

Fig. 3. MC4R gene expression values in the healthy control and glass-induced groups



نمودار ۴- مقادیر بیان ژن MC4R در گروه‌های تمرین و سیلوسایبین

Fig. 4. MC4R gene expression values in the exercise and psilocybin groups

بحث

پژوهش حاضر نشان داد القاء مت‌آفتامین موجب افزایش بیان ژن پروپیوملانوکورتین و گیرنده ملانوکورتین ۴ در موش‌های صحرایی ماده شده و زرشک کوهی و کلالة زعفران موجب کاهش بیان این ژن‌ها در هیپوتالاموس می‌شوند. همچنین بنظر می‌رسد ترکیب هردو مداخله موجب هم‌افزایی و بهبود بیشتر این ژن‌ها شده است. نتایج پژوهش حاضر در رابطه با افزایش هورمون‌های سیری ناشی باز مت‌آفتامین، با بسیاری از مطالعات همسو می‌باشد. درین راستا، بیان شده است مت‌آفتامین به عنوان یک داروی محرک قوی می‌تواند بر سطح و عملکرد هورمون‌های مرتبط با اشتها مانند لپتین و گرلین تأثیر بگذارد. لپتین و گرلین هورمون‌هایی هستند که نقش کلیدی در تنظیم احساس گرسنگی و سیری ایفا می‌کنند. مت‌آفتامین می‌تواند باعث کاهش اشتها شود که ممکن است منجر به کاهش وزن و در نتیجه کاهش سلول‌های چربی بدن شود. کاهش سلول‌های چربی ممکن است سطح لپتین را کاهش دهد، هرچند تأثیر مستقیم مت‌آفتامین بر ترشح لپتین به صورت کامل مشخص نیست. بعلاوه، مطالعات نشان داده‌اند که مت‌آفتامین می‌تواند سطح گرلین را تحت تأثیر قرار دهد (۲۳). مت‌آفتامین ممکن است باعث کاهش سطح گرلین شود، که منجر به کاهش احساس گرسنگی می‌شود. کاهش گرلین می‌تواند یکی از دلایلی باشد که مت‌آفتامین باعث کاهش اشتها و کاهش وزن می‌شود. اثرات سرکوب‌کننده اشتها آفتامین در درجه اول با اثر آن بر هیپوتالاموس، ناحیه‌ای در مغز که مسئول تنظیم اشتها و سیری است، انجام می‌شود. به‌طور خاص، آفتامین بیان پروپیوملانوکورتین را افزایش می‌دهد و بیان نوروپپتید Y (NPY) را کاهش می‌دهد، که هر دو نوروپپتیدهای مهمی هستند که در تنظیم اشتها نقش دارند. آفتامین همچنین فعالیت

گیرنده‌های دوپامین را مهار می‌کند که به نوبه خود باعث افزایش بیان POMC و کاهش بیان NPY می‌شود (۲۴). اثرات سرکوب‌کننده اشتها آفتامین وابسته به دوز است و می‌تواند به طور قابل توجهی بین افراد متفاوت باشد. در دوزهای پایین، آفتامین می‌تواند اشتها را افزایش دهد، در حالی که در دوزهای بالاتر می‌تواند اشتها را سرکوب کند (۲۵). تصور می‌شود که این اثر دوگانه به دلیل توانایی دارو در تحریک آزادسازی پپتیدهای بی‌اشتها و پپتیدهای بی‌اشتهایی در مغز باشد (۲۶). یک مطالعه نشان داد که آفتامین بیان POMC را افزایش داده و بیان NPY را در هیپوتالاموس کاهش می‌دهد که منجر به سرکوب اشتها می‌شود. مطالعه دیگری نشان داد که آفتامین باعث کاهش وزن بدن و بهبود اشتها در بیماران مبتلا به بیماری التهابی روده می‌شود. در نتیجه، رابطه آفتامین با اشتها پیچیده و چندوجهی است. اثرات سرکوب‌کننده اشتها این دارو در درجه اول با اثر آن بر هیپوتالاموس انجام می‌شود، جایی که بیان پپتیدهای بی‌اشتها را افزایش می‌دهد و بیان پپتیدهای اشتها را کاهش می‌دهد (۲۷). بربرین هیدروکلراید ترکیبی مشتق شده از گیاه زرشک کوهی است که به دلیل اثرات بالقوه آن بر اشتها و مدیریت وزن مورد مطالعه قرار گرفته است. برخی تحقیقات نشان می‌دهد که بربرین هیدروکلراید ممکن است به تنظیم اشتها و کاهش وزن کمک کند، اگرچه شواهد متفاوت است. بربرین هیدروکلراید ممکن است به کاهش مصرف غذا و وزن بدن در افراد دارای اضافه وزن و چاق کمک کند. مکانیسم‌های پیشنهادی شامل بهبود حساسیت به انسولین، کاهش التهاب و تعدیل هورمون‌های روده است که بر اشتها تأثیر می‌گذارد (۲۰). مسیر گیرنده ملانوکورتین-۴ در مغز، که تحت تأثیر نورون‌های پرو-اپیوملانوکورتین قرار دارد، نقش

مهمی در تنظیم اشتها و وزن بدن دارد (۳). مسیر POMC-MC4R نقش مهمی در تنظیم اشتها و وزن بدن دارد. نورون‌های POMC در هیپوتالاموس POMC را به هورمون هورمون محرک ملانوسیت آلفا پردازش می‌کنند، که سپس روی نورون‌های بیان‌کننده MC4R برای کاهش مصرف غذا عمل می‌کند. اختلال عملکرد ژن‌ها در این مسیر، مانند کمبود POMC، می‌تواند منجر به چاقی ژنتیکی نادری شود که با هیپرفازی (گرسنگی سیری‌ناپذیر) و چاقی مشخص می‌شود. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که بربرین هیدروکلراید ممکن است به کاهش مصرف غذا و وزن بدن در افراد دارای اضافه وزن و چاق کمک کند. مکانیسم‌های پیشنهادی شامل بهبود حساسیت به انسولین، کاهش التهاب و تعدیل هورمون‌های روده است که بر اشتها تأثیر می‌گذارد (۲۸). اگرچه بربرین نمی‌تواند به راحتی از سد خونی مغزی عبور کند، مطالعات نشان داده‌اند که تجویز حاد بربرین به صورت داخل صفاقی یا خوراکی منجر به افزایش سطح سروتونین در مغز می‌شود. سروتونین مغز مصرف غذا را مهار می‌کند، درحالی‌که کاهش سروتونین مغز باعث پرخوری و افزایش وزن می‌شود (۲۸). بعلاوه، شواهد در مورد اثرات زعفران بر اشتها متفاوت است. در حالی که طب سنتی نشان می‌دهد که زعفران ممکن است دارای خواص کاهش اشتها باشد، تحقیقات محدود مدرن به طور مداوم این ادعا را تایید نمی‌کند. کروسین، یک ترکیب کاروتنوئید طبیعی مشتق شده از زعفران، دارای مزایای بالقوه برای سلامت قلب و عروق است و اثرات آنتی-اکسیدانی بر قلب دارد. کروسین می‌تواند عملکرد قلب را با کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو و همچنین بهبود تغییرات هیستوپاتولوژیک از جمله نکروز سلولی میوکارد، خون‌ریزی، هیپرتروفی و انفیلتراسیون سلولی التهابی بهبود بخشد (۱۹). با این حال، یک

مطالعه بر روی اثرات هیستوپاتولوژیک عصاره گل زعفران در موش نشان داد که این عصاره باعث تغییرات رفتاری از جمله کمبود اشتها برای آب و غذا می‌شود (۲۹). مطالعه دیگری در مورد تأثیر مکمل زعفران بر سطح لپتین سرم در بیماران مبتلا به سندرم متابولیک، هیچ تأثیر قابل توجهی بر لپتین، هورمونی که اشتها و وزن بدن را تنظیم می‌کند، نشان نداد (۳۰). مطالعات بالینی بیشتری برای درک بهتر تأثیر بالقوه زعفران بر تنظیم اشتها مورد نیاز است. در رابطه با نتایج پژوهش حاضر در کاهش بیان ژن‌های POMC و MC4R ناشی از فعالیت بدنی هوازی که به عنوان ورزش قلبی عروقی نیز شناخته می‌شود، سازوکارهای متعددی را محققان مختلف گزارش می‌کنند که با نتایج پژوهش حاضر همسو هستند (۳۱، ۳۲). فعالیت بدنی هوازی کالری می‌سوزاند و بسته به شدت و مدت ورزش می‌تواند منجر به کسری انرژی قابل توجهی شوند. بدن ممکن است با افزایش اشتها برای جبران انرژی مصرف شده به این کمبود پاسخ دهد. بعلاوه در حین و بعد از فعالیت بدنی هوازی، نوسانات هورمونی رخ می‌دهد. به عنوان مثال، سطوح گرلین، هورمونی که گرسنگی را تحریک می‌کند، ممکن است بعد از ورزش افزایش یابد. به طور همزمان، سطح لپتین، هورمونی که سیگنال سیری را نشان می‌دهد، ممکن است به طور موقت کاهش یابد. این تغییرات هورمونی می‌تواند باعث احساس گرسنگی و میل به خوردن شود (۳۳). همچنین فعالیت بدنی هوازی شدید می‌تواند سطح گلوکز خون را کاهش دهد، به خصوص در افرادی که عادت به فعالیت بدنی منظم ندارند یا در حالت ناشتا ورزش می‌کنند. این افت قند خون می‌تواند گرسنگی را تحریک کند زیرا بدن به دنبال بازیابی سطح گلوکز خود است و کاهش انسولین موجب افزایش گرلین و کاهش لپتین می‌شود (۳۴). از طرفی، بسیاری از

مطالعات نشان می‌دهند که فعالیت بدنی هوازی می‌تواند بلافاصله پس از جلسه تمرین به طور موقت اشتها را سرکوب کند. این سرکوب اغلب به تغییرات هورمونی مانند افزایش سطح پپتید YY و پپتید شبه گلوکاگون ۱ (GLP-1) نسبت داده می‌شود که با کاهش گرسنگی مرتبط است. تمرینات هوازی با شدت بیشتر ممکن است منجر به سرکوب بیشتر اشتها در مقایسه با تمرینات با شدت کمتر شود (۳۵). با این حال، شدت و مدت زمان دقیق مورد نیاز برای سرکوب اشتها می‌تواند بین افراد متفاوت باشد. فعالیت بدنی هوازی منظم با مدیریت وزن مرتبط است و ممکن است در طولانی مدت به تنظیم اشتها کمک کند. این می‌تواند به تعادل انرژی منفی کمک کند (کالری سوزانده شده بیشتر از مصرف شده)، که برای کاهش وزن یا حفظ وزن بسیار مهم است. فعالیت بدنی هوازی می‌تواند حساسیت به انسولین را بهبود بخشد و توانایی بدن را برای استفاده از چربی به عنوان منبع انرژی افزایش دهد. این سازگاری‌های متابولیک می‌توانند با تثبیت سطح قند خون و کاهش هوس روی تنظیم اشتها تأثیر بگذارند. تحقیقات نشان می‌دهد که اثرات ورزش هوازی بر اشتها ممکن است بین مردان و زنان متفاوت باشد. در برخی از مطالعات، زنان پس از ورزش نسبت به مردان کاهش اشتها بارزتری را تجربه می‌کنند. افراد با سطوح آمادگی جسمانی بالاتر یا ترکیبات بدنی متفاوت (مثلاً لاغر در مقابل اضافه وزن) ممکن است از نظر تنظیم اشتها به تمرینات هوازی واکنش متفاوتی نشان دهند. فعالیت بدنی هوازی به طور مثبت بر خلق و خو تأثیر می‌گذارد و استرس را کاهش می‌دهد، که می‌تواند به طور غیرمستقیم بر تنظیم اشتها تأثیر بگذارد. بهبود خلق و خو و کاهش سطح استرس ممکن است منجر به کنترل بهتر اشتها و کاهش خوردن احساسی شود. برخی از مطالعات نشان می‌دهد که افراد ممکن است

کالری سوزانده شده در طول ورزش را با مصرف بیشتر مواد غذایی پس از آن جبران کنند، که می‌تواند کمبود کالری مورد نظر برای کاهش وزن را خنثی کند. زمان‌بندی و ترکیب وعده‌های غذایی بعد از ورزش می‌تواند بر نحوه تأثیر ورزش بر اشتها تأثیر بگذارد. در نتیجه، در حالی که ورزش هوازی به طور کلی بلافاصله پس از ورزش به دلیل تغییرات هورمونی و اثرات متابولیک، اشتها را سرکوب می‌کند، پاسخ‌های فردی می‌تواند متفاوت باشد. برای مدیریت وزن و فواید کلی سلامت، ترکیب ورزش هوازی منظم با عادات غذایی آگاهانه توصیه می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که فعالیت بدنی هوازی می‌تواند تولید POMC را افزایش دهد. این تولید افزایشی می‌تواند به کنترل اشتها و تنظیم وزن بدن کمک کند به خصوص افزایش در سطح بتا-اندورفین که باعث کاهش اشتها و افزایش حس رضایت می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند که وجود نسخه‌های متفاوت MC4R و همچنین تأثیرات مختلف توالی‌های ژنی آن می‌تواند تأثیرات متفاوتی بر روی پاسخ به فعالیت بدنی و تنظیمات متابولیکی داشته باشد (۳۶).

نتیجه‌گیری

متمم‌های موجب افزایش بیان ژن‌های POMC و MC4R در موش‌های صحرایی ماده شده و زرشک کوهی و کالاه زعفران موجب کاهش بیان این ژن‌ها در هیپوتالاموس می‌شوند. همچنین به نظر می‌رسد ترکیب هردو مداخله موجب هم افزایی و بهبود بیشتر این ژن‌ها شده است.

تقدیر و تشکر

تیم حاضر نهایت تشکر و قدردانی خود را از آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود ابراز می‌کند.

knockout mouse. FASEB J. 2009;23(2):642.

10. Ribeiro FM, Silva MA, Lyssa V, Marques G, Lima HK, Franco OL, Petriz B. The molecular signaling of exercise and obesity in the microbiota-gut-brain axis. Front Endocrinol. 2022;13:927170.

11. Yang LJ, He JB, Jiang Y, Li J, Zhou ZW, Zhang C, et al. Berberine hydrochloride inhibits migration ability via increasing inducible NO synthase and peroxynitrite in HTR-8/SVneo cells. J Ethnopharmacol. 2023;305:116087.

12. Och A, Podgórski R, Nowak R. Biological activity of berberine—a summary update. Toxins. 2020;12(11):713.

13. Han M, Liu Y, Zhang T, Li D, Jiang Q, Zuraini Z. Effect of berberine hydrochloride treatment on transcriptomic response in gill tissue of *Charybdis japonica* infected with *Aeromonas hydrophila*. Front Mar Sci. 2021;8:754588.

14. Lee YS, Kim WS, Kim KH, Yoon MJ, Cho HJ, Shen Y, et al. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. Diabetes. 2006;55(8):2256-64.

15. Luo Y, Yu P, Zhao J, Guo Q, Fan B, Diao Y, et al. Inhibitory effect of crocin against gastric carcinoma via regulating TPM4 gene. Onco Targets Ther. 2021:111-22.

16. Algandaby MM. Crocin prevents metabolic syndrome in rats via enhancing PPAR-gamma and AMPK. Saudi J Biol Sci. 2020;27(5):1310-6.

17. El Tabaa MM, El Tabaa MM, Anis A, Elgharabawy RM, El-Borai NB. GLP-1 mediates the neuroprotective action of crocin against cigarette smoking-induced cognitive disorders via suppressing HMGB1-RAGE/TLR4-NF-κB pathway. Int Immunopharmacol. 2022;110:108995.

18. Tokunaga I, Kubo S-i, Ishigami A, Gotohda T, Kitamura O. Changes in renal

منابع

1. Baldini G, Phelan KD. The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications. J Endocrinol. 2019;241(1):R1-R33.

2. Huvenne H, Dubern B, Clément K, Poitou C. Rare genetic forms of obesity: clinical approach and current treatments in 2016. Obes Facts. 2016;9(3):158-173.

3. Mohammadi F, Younesian A, Zia-ul-Haq SJ. The effect of 8 weeks of endurance training with stevia supplementation on the expression of genes (POMC and MC4R) involved in hypothalamic axis metabolism in obese male wistar rats. Middle East J Disabil Stud. 2023;13(0):8.

4. Zuloaga DG, Jacobskind JS, Raber J. Methamphetamine and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Front Neurosci. 2015; 9:178.

5. Dunigan AI, Roseberry AG. Actions of feeding-related peptides on the mesolimbic dopamine system in regulation of natural and drug rewards. Addict Neurosci. 2022; 2:100011.

6. Chen Y. Regulation of food intake and the development of anti-obesity drugs. Drug Discov Ther. 2016;10(2):62-73.

7. Landry T, Shookster D, Chaves A, Free K, Nguyen T, Huang H. Energy status differentially modifies feeding behavior and POMCARC neuron activity after acute treadmill exercise in untrained mice. Front Endocrinol. 2021;12:705267.

8. Fatima MT, Ahmed I, Fakhro KA, Akil ASAS. Melanocortin-4 receptor complexity in energy homeostasis, obesity and drug development strategies. Diabetes Obes Metab. 2022;24(4):583-98.

9. Haskell-Luevano C, Schaub JW, Andreasen A, Haskell KR, Moore MC, Koerper LM, et al. Voluntary exercise prevents the obese and diabetic metabolic syndrome of the melanocortin-4 receptor

- has the bidirectional effects on appetite in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Fish Physiol Biochem*. 2018;44:411-422.
27. Kobeissy FH, Jeung JA, Warren MW, Geier JE, Gold MS. Preclinical Study: Changes in leptin, ghrelin, growth hormone and Neuropeptide-Y after an acute model of MDMA and methamphetamine exposure in rats. *Addict Biol*. 2008;13(1):15-25.
 28. Uwaifo F, John-Ohimai F. Body weight, organ weight, and appetite evaluation of adult albino Wistar rats treated with berberine. *Int J Health Allied Sci*. 2020; 9(4):329.
 29. Abd AA, Salah BAAM, Al-Azow NS. Histopathological Effects Of Ethanolic Extract of Saffron Flowers *Crocus sativus* L. On Stomach And Small Intestine of White Mice Females *Mus musculus*. *Tikrit J Pure Sci*. 2018;23(4):10-16.
 30. Zilae M, Soukhtanloo M, Kermani T, Ghayour MM, Alidade M, Shemshian M, et al. Oral: effect of saffronon serum leptin levels in paitients with metabolic syndrome, a double-binded, randomized and plecebe controlled trial study. *J Aerosp Mech*. 2014; 1(1):48.
 31. Rodrigues KCDC, Pereira RM, Campos TDd, Moura RFd, Silva ASd, Cintra DE, et al. The role of physical exercise to improve the browning of white adipose tissue via POMC neurons. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:88.
 32. Benite-Ribeiro SA, Putt DA, Santos JM. The effect of physical exercise on orexigenic and anorexigenic peptides and its role on long-term feeding control. *Med Hypotheses*. 2016;93:30-33.
 33. Smith JK .Exercise, obesity and CNS control of metabolic homeostasis: a review. *Front Physiol*. 2018;9:339961.
 34. Shojaei M. A systematic review of the relationship between sex hormones and leptin and insulin resistance in men. *Eurasian J Chem Med Pet Res*. 2024; 3(2):443-453.
 - function and oxidative damage in methamphetamine-treated rat. *Leg med*. 2006;8(1):16-21.
 19. Norallahpour S, Abbassi dalooi A , Ziaolhagh Sj, Barari A. The Protective Effects of Endurance Training and Crocin on Tissue Changes of the Cerebral Cortex in an Animal Model of Methamphetamine Addiction. *Res Addict*. 2023;17(68):181-200.
 20. Mortezaei Z, Rajabi S, Ziaolhagh SJ . The Effect of Aerobic Training and Berberine Supplementation on the Expression of Dopamine 4 Receptor and CREB Gene in Heart Tissue of Female Rats During Withdrawal from Methamphetamine. *J Arak Univ Med Sci*. 2023;26(3):18-24.
 21. Sajadi A, Amiri I, Gharebaghi A, Komaki A, Asadbeigi M, Shahidi S, et al. Treadmill exercise alters ecstasy-induced long-term potentiation disruption in the hippocampus of male rats. *Metabol Brain Disease*. 2017;32:1603-1607.
 22. Adler M, Alon U. Fold-change detection in biological systems. *Curr Opin Syst Biol*. 2018;8:81-89.
 23. Shevchouk OT, Tufvesson-Alm M, Jerlhag E. An overview of appetite-regulatory peptides in addiction processes; from bench to bed side. *Front Neurosci*. 2021;15:774050.
 24. Hsieh YS, Chen PN, Yu CH, Kuo DY. Central dopamine action modulates neuropeptide-controlled appetite via the hypothalamic PI3K/NF-κB-dependent mechanism. *Genes Brain Behav*. 2014; 13(8):784-793.
 25. Sustkova-Fiserova M, Charalambous C, Khryakova A, Certilina A, Lapka M, Šlamberová R. The role of ghrelin/GHS-R1A signaling in nonalcohol drug addictions. *Int J Mol Sci*. 2022;23(2):761.
 26. Zhang X, Gao Y, Tang N, Qi J, Wu Y, Hao J, et al. One evidence of cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART)

36. Halliday TM, White MH, Hild AK, Conroy MB, Melanson EL, Cornier MA. Appetite and energy intake regulation in response to acute exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2021;53(10):2173.

35. Beaulieu K, Blundell JE, van Baak MA, Battista F, Busetto L, Carraça EV, et al. Effect of exercise training interventions on energy intake and appetite control in adults with overweight or obesity: A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2021; 22:e13251.

Research Article

The Effect of High-Intensity Interval Training and High-Protein Diet on Plasma Levels of Apolipoprotein A1 and B and Lipid Profile in obese Male Rats

Marziyeh Saghebjo¹, Mahdi Aliakbari^{2*}, Haniyeh Habibi Sangani¹

1- Department of Sport Sciences, Faculty of Sport Sciences, University of Birjand, Birjand, Iran

2- Department of Physical Education and Sport Sciences, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author: mahdi.aliakbari@iau.ac.ir

Received: 25 November 2024

Accepted: 13 April 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1191534

Abstract

Obesity is associated with lipid disorders and a significant increase in cardiovascular diseases. This study aimed to investigate the effect of 10 weeks of high-intensity interval training (HIIT) and high-protein diet (HPD) on the plasma levels of apolipoprotein A1 and B and lipid profile in obese male rats. 40 obese male Wistar rats in five groups ($n = 8$): HIIT, HPD, HPD+HIIT, obese control-A (OC-A), and obese control-B (OC-B) and eight rats were also studied as normal control group (NC). Training groups, ran five days a week for 10 weeks with at the about intensity of 90% of maximum oxygen uptake on the treadmill. After the end of the intervention, blood sampling was done and the levels of apolipoproteins ApoA1, ApoB, and lipid profile were measured in plasma. The data were analyzed using one-way analysis of variance and Tukey's post-hoc tests at a significance level of $p < 0.05$. The plasma level of HDL-C was significantly higher in the NC group than in the OC-A group ($p < 0.05$), but no significant difference was observed between the other groups ($p > 0.05$). The TC/HDL-C and LDL-C/HDL-C ratios in the NC and HIIT+HPD groups were significantly lower compared with the OC-A group ($p < 0.05$), while no significant difference was observed between the other groups ($p > 0.05$). Also, triglyceride-glucose index (TyG) was significantly lower in the NC, OC-B, HIIT, HPD, and HIIT+HPD groups than in the OC-A group ($p < 0.05$). No significant difference were observed in the plasma levels of ApoA1, ApoB, ApoB/ApoA1, Triglyceride (TG), Total cholesterol (TC), Low-density lipoprotein (LDL-C), and Very low density lipoprotein (vLDL-C) among the groups ($p > 0.05$). It seems that doing HIIT along with HPD can prevent possible metabolic complications caused by obesity and high-fat diets by improving the lipid profile.

Keywords: Exercise training, Diet, Insulin resistance, Lipid profile, Obesity.

مقاله پژوهشی

اثر تمرین تناوبی شدید و رژیم غذایی پرپروتئین بر سطوح پلاسمایی آپولیپوپروتئین A1 و B و پروفایل لیپیدی در موش‌های صحرایی نر چاق

مرضیه ثاقب‌جو^۱، مهدی علی‌اکبری^{۲*}، هانیه حبیبی سنگانی^۱

۱- گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

۲- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد تهران جنوب، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

* مسئول مکاتبات: mahdi.aliakbari@iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۵

DOI: 10.60833/ascij.2025.1191534

چکیده

چاقی با اختلالات لیپیدی و افزایش قابل توجه بیماری‌های قلبی-عروقی همراه است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر ۱۰ هفته تمرین تناوبی شدید (HIIT) و رژیم غذایی پرپروتئین (HPD) بر سطوح پلاسمایی آپولیپوپروتئین A1 و B و پروفایل لیپیدی در موش‌های صحرایی نر چاق بود. ۴۰ سر موش صحرایی نر ویستار چاق در پنج گروه هشت‌تایی: HPD، HIIT، HIIT+HPD، کنترل چاق A (OC-A) و کنترل چاق B (OC-B) و هشت سر موش به‌عنوان گروه کنترل نرمال (NC) مورد مطالعه قرار گرفتند. گروه‌های تمرین، پنج روز در هفته به مدت ۱۰ هفته با شدت حدود ۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی روی نوارگردان دویند. پس از پایان مداخله، نمونه‌گیری خون انجام و سطوح آپولیپوپروتئین‌های ApoB، ApoA1 و پروفایل لیپیدی در پلاسمای حاصل اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی آنالیز شدند. سطح پلاسمایی HDL-C به‌طور معنی‌داری در گروه NC بالاتر از گروه OC-A بود ($p < 0/05$)، اما بین سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). نسبت‌های TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C در گروه‌های NC و HIIT+HPD در مقایسه با گروه OC-A به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود ($p < 0/05$)، در حالی‌که بین سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). همچنین تری‌گلیسرید-گلوکز (TyG) نیز به‌طور معنی‌داری در گروه‌های NC، OC-B، HIIT، HPD و HIIT+HPD پایین‌تر از گروه OC-A بود ($p < 0/05$). در سطوح پلاسمایی ApoB، ApoA1، ApoB/ApoA1، تری‌گلیسرید، کلسترول تام، لیپوپروتئین با چگالی پایین و لیپوپروتئین با چگالی بسیار پایین بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). به نظر می‌رسد انجام HIIT همراه با HPD به‌واسطه بهبود پروفایل لیپیدی می‌تواند از عوارض متابولیک احتمالی ناشی از چاقی و رژیم‌های غذایی پرچرب جلوگیری کنند.

کلمات کلیدی: تمرین ورزشی، رژیم غذایی، مقاومت به انسولین، پروفایل لیپیدی، چاقی.

مقدمه

شود (۱) و نقش چشمگیری در بروز بسیاری از اختلالات فیزیولوژیکی، عوارض کاردیومتابولیکی و بیماری‌های قلبی-عروقی (CVD) دارد (۲، ۳). در

چاقی یک اختلال متابولیکی مزمن و چندعاملی پیچیده‌ای است که با تجمع غیرطبیعی چربی در بدن به دلیل عدم تعادل در متابولیسم انرژی مشخص می‌

میان CVD، آترواسکلروزیس عامل عمده مرگ و میر است (۴) و عواملی مثل سن بالا، چاقی، کم تحرکی، اختلال تحمل گلوکز و دیس لیپیدمی در بروز آن نقش اساسی دارند (۵). دیس لیپیدمی با کاهش لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL-C) و افزایش کلسترول تام (TC)، تری‌گلیسرید (TG)، لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL-C) و لیپوپروتئین با چگالی بسیار پایین (vLDL-C)، عامل مهم زمینه‌ساز خطر برای آترواسکلروزیس و CVD است (۶). لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) با تأثیرات ضد التهابی، ضد آتروژنیک و ضد ترومبوزی خود، می‌تواند عامل محافظتی مهم برای قلب باشد (۷). چربی‌های پلاسما و در بین آن‌ها LDL-C با توجه به داشتن اثر آتروژنیک، نقش پررنگ‌تری در تنگی عروق داشته باشد، لذا نسبت LDL-C به HDL-C (LDL-C/HDL-C) پیشگوکننده خوبی برای خطر ابتلا به بیماری کرونری قلب می‌باشد (۸). vLDL-C به‌عنوان عاملی خطر ساز در حوادث قلبی-عروقی مطرح است (۹) که افزایش آن می‌تواند باعث افزایش ضخامت و سفتی عروق شود (۱۰). کلسترول نیز معروف‌ترین استروئید و یک لیپید آمفی‌پاتیک است که با CVD ارتباط دارد. با وجود نقش مهم HDL-C در برابر CVD، ولی نسبت TC/HDL-C می‌تواند در محافظت در برابر عوارض و شدت CVD شاخص حساس‌تری باشد (۱۱). افزایش سطح TG در خون با ترشح انسولین همبستگی منفی دارد و منجر به رسوب چربی در بدن و افزایش سطح TG در سلول‌های عضلانی و در نتیجه مقاومت به انسولین می‌شود. کنترل پروفایل لیپیدی یکی از اجزای ضروری اصلاح شاخص‌های خطر ساز CVD است. امروزه متغیرهای دیگری به‌نام آپولیپوپروتئین (Apo) به‌عنوان ایجادکننده CVD مطرح شده‌اند. آپوها، پروتئین‌های کلیدی در سنتز انواع ذرات لیپیدی هستند و نقش کوآنزیمی بازی

می‌کنند، ممکن است بر مصرف انرژی تأثیر بگذارند (۱۲) و از طریق متابولیسم لیپوپروتئین یا مسیرهای سیگنال‌دهی انسولین، اثرات ضد التهابی داشته باشند (۱۳). بر اساس تنوع و عملکردهای بیولوژیکی متفاوتی که Apoها دارند به پنج دسته A، B، C، D و E طبقه‌بندی می‌شوند که هر کدام دارای زیرمجموعه‌هایی مانند AI، AII، AIV و AV در طبقه A، B48 و B100 در طبقه B، CI، CII و CIII در طبقه C، E2، E3 و E4 در طبقه E هستند (۱۴). در این بین ApoA و ApoB به‌شدت با خطر ابتلا به بیماری آترواسکلروزیس مرتبط هستند (۱۵). آپوA1 حدود ۷۰ درصد HDL-C پلاسما را تشکیل می‌دهد (۱۶) و سطح بیان آن توسط غلظت HDL-C تعیین می‌شود (۱۷). ApoA1 با فعال کردن لستین کلسترول آسیل ترانسفراز (LCAT) در انتقال معکوس TC و تبدیل آن به HDL-C نقش داشته و با کاهش مسیر سیگنالینگ فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده زنجیره سبک کاپا از لنفوسیت‌های B فعال‌شده (NF-kB)، التهاب را در بافت چربی بهبود می‌بخشد (۱۸). همچنین ApoA1 دارای اثرات ضد چاقی است و منجر به کاهش وزن و توده چربی از طریق افزایش مصرف انرژی به‌واسطه افزایش بیان ژن پروتئین جفت نشده ۱ (UCP1) می‌شود (۱۳). به‌علاوه ApoA1 نسبت به HDL-C برای پیش‌بینی بیماری‌های قلبی از جمله آترواسکلروزیس از حساسیت و دقت بیشتری برخوردار است (۱۸). ApoA1 می‌تواند مسئول ایجاد سازوکارهای محافظتی در برابر آترواسکلروزیس باشد. ApoB بخش اصلی LDL-C و vLDL-C است، اما بیشتر از ۹۰ درصد آن در LDL-C یافت می‌شود که با خطر بروز CVD رابطه مستقیم دارد (۱۹). به‌دلیل این‌که سطح ApoB قبل از LDL-C افزایش می‌یابد، خطر بیماری عروق کرونری را می‌تواند بهتر از آن پیش‌بینی کند. ApoB آتروژن را تحریک کند زیرا

با قرار گرفتن در دیواره شریانی، اکسیده و گلیکوزیله شده و می‌تواند در فرآیند تشکیل پلاک نقش داشته باشد و عاملی خطر ساز برای بیماری‌های انسداد عروق کرونری باشد و امکان پدید آمدن آترواسکلروزیس را افزایش دهد. بنابراین نسبت ApoB به ApoA1 (ApoB/ApoA1) که ممکن است تعادل TC بین ذرات لیپوپروتئین آتروژنیک (LDL-C) و آنتی‌آتروژنیک (HDL-C) را منعکس کند، می‌تواند پیش‌بینی‌کننده قوی و مهمی برای خطر CVD و شاخص حساس‌تری نسبت به LDL-C و TC باشد (۲۰). بنابراین ApoB/ApoA1 می‌تواند یک شاخص مهم و قابل اعتماد در ارزیابی خطر بروز CVD باشد. فعالیت‌های ورزشی به‌عنوان راهکاری عملی و کاربردی، می‌تواند به پیشگیری و درمان چاقی و اختلالات قلبی-متابولیکی مربوط به آن کمک کند و باعث کاهش نشانگرهای خطر زای CVD شود (۲۱). تمرین تناوبی شدید (HIIT) نسبت به شیوه‌های دیگر تمرینی، تأثیرات و مزایای بیشتری در ارتباط با سلامت قلبی-عروقی و کاهش چربی دارا بوده است (۲۲). این تمرین با افزایش بیورنز میتوکندری و محتوی آن باعث افزایش آنزیم‌ها و هورمون‌های موثر در اکسایش چربی شده و تجزیه چربی را تسهیل و در نتیجه به کاهش وزن موثر منجر می‌شود (۲۳). این روش تمرینی می‌تواند با افزایش سطح HDL-C و کاهش سطوح TG، TC، LDL-C، و نسبت LDL-C/HDL-C و کاهش سطح vLDL-C باعث بهبود پروفایل لیپیدی در شرایط چاقی و اضافه وزنی شود (۲۴). HIIT می‌تواند باعث افزایش معنی‌دار ApoA1 و کاهش معنی‌دار ApoB و ApoB/ApoA1 در موش-های صحرایی نر مبتلا به دیابت شود. یک دوره HIIT باعث افزایش ApoA1 و کاهش معنی‌دار ApoB و ApoB/ApoA1 در موش‌های صحرایی نر سالمند شد (۲۵). هشت هفته تمرین عملکردی شدید نیز سطوح

سرمی TG، LDL-C، HDL-C، ApoB، ApoA1 و ApoB/ApoA1 مردان و زنان سالمند را به‌طور معنی‌داری بهبود بخشید (۲۶). استفاده از رژیم‌های غذایی با پروتئین بالا (HPD) می‌تواند از طریق کاهش انرژی دریافتی، افزایش مصرف انرژی و ایجاد سیری در کاهش وزن، بهبود پارامترهای قلبی-متابولیکی و مقاومت به انسولین تأثیرگذار باشند (۲۷). با این وجود، تأثیر HPD بر عوامل خطر ساز CVD هنوز به وضوح مشخص نشده و به موضوعی بحث برانگیز تبدیل شده است. از یک سو HPD، ممکن است خطر بروز CVD و دیابت نوع ۲ را افزایش دهد و باعث تقویت آتروژنز در مدل‌های حیوانی شود و با افزایش قابل توجه غلظت اسیدهای آمینه خون، مونوسیت‌ها و ماکروفاژهای بافتی دخیل در تشکیل پلاک آترواسکلروتیک و همچنین افزایش فعالیت مسیر سیگنالینگ هدف راپاماسین در پستانداران (mTOR)، باعث پیشرفت پلاک شود (۲۸). HPD می‌تواند در کاهش LDL-C، TC و TG به‌عنوان عوامل خطر اصلی برای CVD، نقش موثری ایفا کند (۲۹). بعد از ۲۴ هفته HPD در افراد دیابتی، افزایش معنی‌دار HDL-C، کاهش معنی‌دار TC/HDL-C و بهبود غیرمعنی‌دار سطوح LDL-C و TG مشاهده شد (۱۱). HPD می‌تواند به‌عنوان یک راهبرد مهم برای کاهش وزن، بهبود پروفایل لیپیدی، تحمل گلوکز و بیماری‌های وابسته به چاقی به کار گرفته شود. مطالعه حاضر به بررسی اثر HIIT و HPD به‌تنهایی و در ترکیب با یکدیگر بر سطوح پلاسمایی ApoA1 و ApoB و پروفایل لیپیدی موش‌های صحرایی نر چاق پرداخته است.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر، تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر ویستار چاق (سن: ۱۲ هفته، میانگین وزنی ۳۱/۷۹

$\pm 386/46$ گرم) و هشت سر موش صحرایی نور و استار با وزن نرمال (سن: ۱۲ هفته، میانگین وزنی: $22/26 \pm 283/10$ گرم)، از مرکز پرورش حیوانات موسسه پاستور (کرج، ایران) خریداری شدند و پس از انتقال حیوانات به آزمایشگاه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند، با دسترسی آزاد به غذا و آب در تمامی مراحل مطالعه، داخل قفس‌های شفاف پلی‌کربنات با چهار موش در هر قفس، با رطوبت نسبی 40 ± 5 درصد، دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت (هفت صبح، هفت شب) نگهداری شدند. در پایان دوره یک هفته-ای آشنایی با محیط آزمایشگاه، موش‌های چاق (که از سن چهار تا ۲۳ هفتگی، دریافت‌کننده رژیم غذایی پرچرب بودند) به صورت تصادفی به پنج گروه هشت تایی شامل: HIIT (تمرین ورزشی همراه با ادامه دریافت رژیم غذایی پرچرب تا پایان مطالعه)، HPD (قطع رژیم غذایی پرچرب در شروع مطالعه و جایگزینی رژیم غذایی پروتئین تا پایان مطالعه)، HIIT+HPD (تمرین ورزشی همراه با قطع رژیم غذایی پرچرب در شروع مطالعه و جایگزینی رژیم غذایی پروتئین تا پایان مطالعه)، OC-A (کنترل چاق A: ادامه رژیم غذایی پرچرب در طول مطالعه) و OC-B (کنترل چاق B: قطع رژیم غذایی پرچرب در شروع مطالعه و شروع رژیم غذایی نرمال) و هشت سر موش نیز در گروه NC (وزن نرمال دارای رژیم غذایی نرمال) تقسیم شدند.

اندازه‌گیری شاخص‌های آنروپومتریکی: در شروع مطالعه و بعد از ۱۰ هفته مداخله تمرین و رژیم غذایی، وزن، قد و شاخص لی موش‌ها اندازه‌گیری شد. از ترازوی دیجیتال (حساسیت ۰/۱ گرم، ساخت شرکت Kern کشور آلمان، مدل N47-440) جهت وزن‌کشی، از کولیس دیجیتال (حساسیت ۰/۰۱ میلی-متر، ساخت شرکت Insizze کشور چین، مدل 1108-

300) برای اندازه‌گیری قد موش‌ها و از شاخص لی ($1000 \times \sqrt[3]{\frac{\text{وزن (گرم)}}{\text{قد (سانتی‌متر)}}}$) برای تعیین چاقی موش‌ها استفاده شد. بر اساس این شاخص، موش‌هایی که شاخص لی آن‌ها بیشتر از ۳۱۰ بود، چاق محسوب شدند (۳۰).

رژیم‌های غذایی پرچربی، پروتئین و نرمال: موش‌های گروه HIIT و گروه OC-A به مدت ۱۰ هفته با رژیم غذایی پرچرب حاوی ۶۰ درصد کالری از چربی، ۲۰ درصد از کربوهیدرات و ۲۰ درصد از پروتئین (۳۰)، موش‌های گروه HPD و گروه HIIT+HPD با یک رژیم غذایی پروتئین حاوی ۱۵ درصد کالری از چربی، ۲۷/۵ درصد از کربوهیدرات و ۵۷/۵ درصد از پروتئین و موش‌های گروه‌های OC-B و NC با رژیم غذایی نرمال مخصوص جوانندگان آزمایشگاهی حاوی ۱۳/۵ درصد چربی، ۵۹/۵ درصد کربوهیدرات و ۲۷ درصد پروتئین تغذیه شدند (۳۱). غذاهای مورد استفاده در این مطالعه از پژوهشکده زیست فناوری رویان (اصفهان، ایران) به صورت پلت تهیه شد.

پروتکل HIIT: در ابتدای مطالعه، موش‌های گروه HIIT، به مدت پنج روز، ۱۰ دقیقه در روز با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه با دویدن روی نوارگردان مخصوص جوانندگان سازگار شدند. سپس با شروع برنامه HIIT، موش‌ها پنج روز در هفته به مدت ۱۰ هفته، با شدت ۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی، روی نوارگردان با شیب صفر درجه دویدند. هفته اول هر جلسه تمرین با پنج تناوب ۳۰ ثانیه‌ای با سرعت ۲۹ متر بر دقیقه همراه با یک دقیقه استراحت فعال بین دو تناوب (با سرعت ۱۳ متر بر دقیقه، معادل ۴۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) انجام شد. هر هفته یک متر بر دقیقه به سرعت نوارگردان و یک تناوب نیز به تعداد تناوب‌ها افزوده شد؛ به‌طوری‌که در پایان هفته هشتم، تعداد تناوب‌ها به ۱۲ و سرعت دویدن به ۳۶ متر بر

دقیقه (معادل ۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) رسید. در مطالعه حاضر به مدت ۱۰ هفته طراحی شد و برنامه هفته هشتم تا هفته دهم ثابت ماند. هر جلسه HIIT دارای پنج دقیقه گرم کردن و پنج دقیقه سرد کردن (هر دو با سرعت ۱۳ متر در دقیقه) همراه بود. تحریک دویدن موش‌ها روی نوارگردان، با همزمانی اعمال شوک الکتریکی خفیف و محرک صوتی (ضربه به دیوار نوارگردان) در جلسات اول و در ادامه، استفاده از محرک صوتی به تنهایی، انجام شد.

نمونه‌گیری خون و سنجش‌های بیوشیمیایی: پس از سپری شدن ۴۸ ساعت از آخرین جلسه مداخله و شرایط ناشتایی ۱۲ ساعته، با تزریق درون صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) موش‌ها بیهوش شدند. در ناحیه شکم و قفسه سینه موش‌ها برش ایجاد و از بطن چپ قلب ۱۰ میلی‌لیتر خون گرفته و در لوله‌های حاوی محلول اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ریخته شد. نمونه‌های خون جهت جداسازی پلاسما، ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و پس از انتقال به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری، تا زمان سنجش متغیرها در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت تعیین سطوح پلاسمایی ApoA1 و ApoB از روش ایمونوتوربیدیمتریک (با استفاده از کیت آزمایشگاهی شرکت پارس آزمون، کرج، ایران) به ترتیب با حساسیت ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در دسی‌لیتر استفاده شد. همچنین جهت اندازه‌گیری سطوح پلاسمایی TC، TG و HDL-C از روش رنگ‌سنجی آنزیمی (با استفاده از کیت‌های تحقیقاتی شرکت پارس آزمون، کرج، ایران) به ترتیب با حساسیت پنج، پنج و یک میلی‌گرم در دسی‌لیتر استفاده گردید. سطوح پلاسمایی LDL-C و vLDL-C به ترتیب با استفاده از فرمول‌های فریدوالد ($LDL-C = [TC -$

$TG/5 - HDL-C]$) و TG/5 محاسبه گردید و شاخص TyG نیز با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد:

TyG: $Ln [fasting triglycerides (mg/dL) \times fasting glucose (mg (dL)/2] plasma$
روش‌های آماری: در ابتدا از آزمون شاپیرو-ویلک به منظور بررسی نرمال بودن توزیع داده‌های خام و از آزمون لون جهت بررسی فرض برابری واریانس‌ها استفاده شد. با توجه به برقراری پیش‌فرض‌ها، جهت آنالیز آماری داده‌ها و مقایسه بین گروه‌ها، در محیط نرم‌افزار SPSS 22، آزمون‌های آنالیز واریانس یک-طرفه و تعقیبی توکی استفاده گردید. سطح معنی‌داری آزمون‌های آماری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

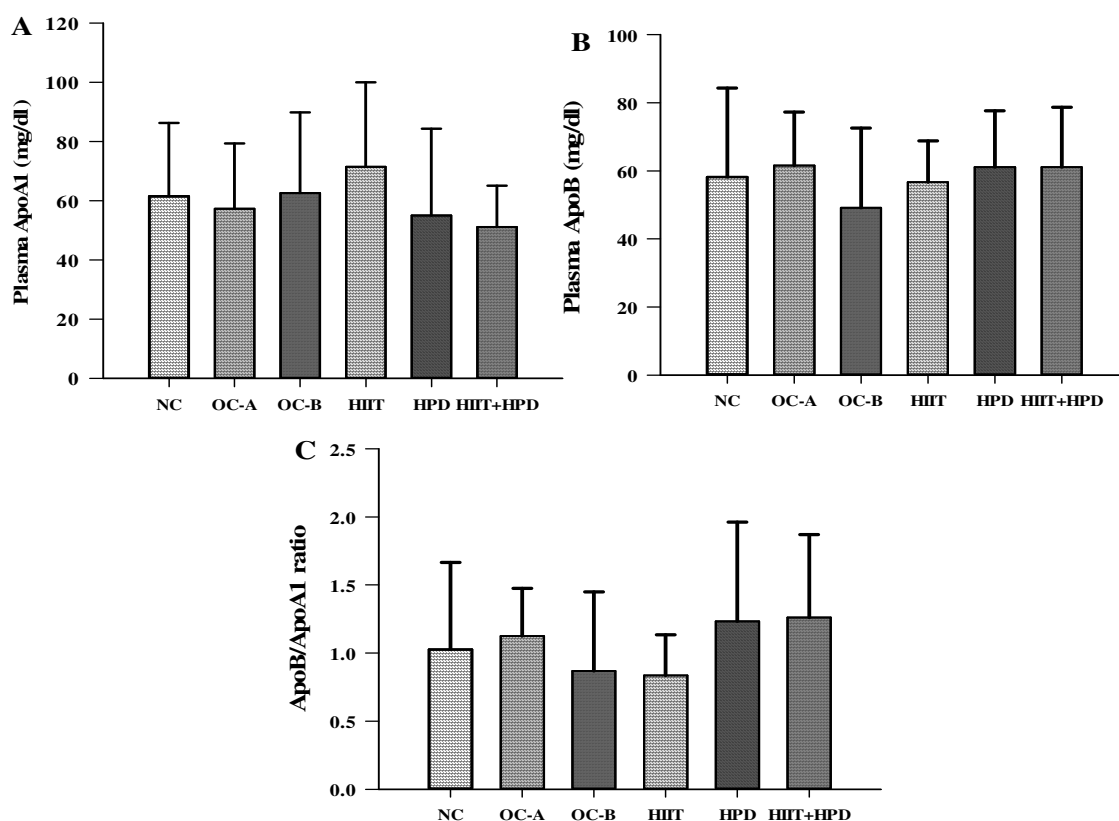
مقادیر میانگین و انحراف استاندارد وزن و شاخص لی موش‌ها قبل و بعد از ۱۰ هفته مداخله در گروه‌های تحقیق در جدول ۱ ارائه شده است (جدول ۱).

آپولیپوپروتئین: تفاوت معنی‌داری در سطوح ApoA1 و ApoB پلاسما و نسبت ApoB/ApoA1 بین گروه‌های مطالعه وجود ندارد (مقادیر P به ترتیب ۰/۳۱، ۰/۳۴ و ۰/۱۵) (شکل ۱).

پروفایل لیپیدی: تفاوت معنی‌دار سطح HDL-C پلاسما بین گروه‌های مورد مطالعه مشاهده شد ($p = 0.02$) ($F_{0.05, 2} = 2.88$). سطح HDL-C پلاسما در گروه NC به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل چاق-A بود ($p = 0.03$). از طرفی بین سایر گروه‌ها در سطح HDL-C پلاسما تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$) (شکل ۳. A). همچنین، نتایج حاصل عدم تغییر معنی‌دار سطوح LDL-C، vLDL-C و TC و TG پلاسما را بین گروه‌های مورد مطالعه نشان داد (مقادیر p به ترتیب ۰/۱۲، ۰/۱۳، ۰/۲۴، ۰/۱۳) (شکل ۳. B، C، D و E). نتایج تحقیق، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها در نسبت سطوح TC/HDL-C ($p = 0.004$)

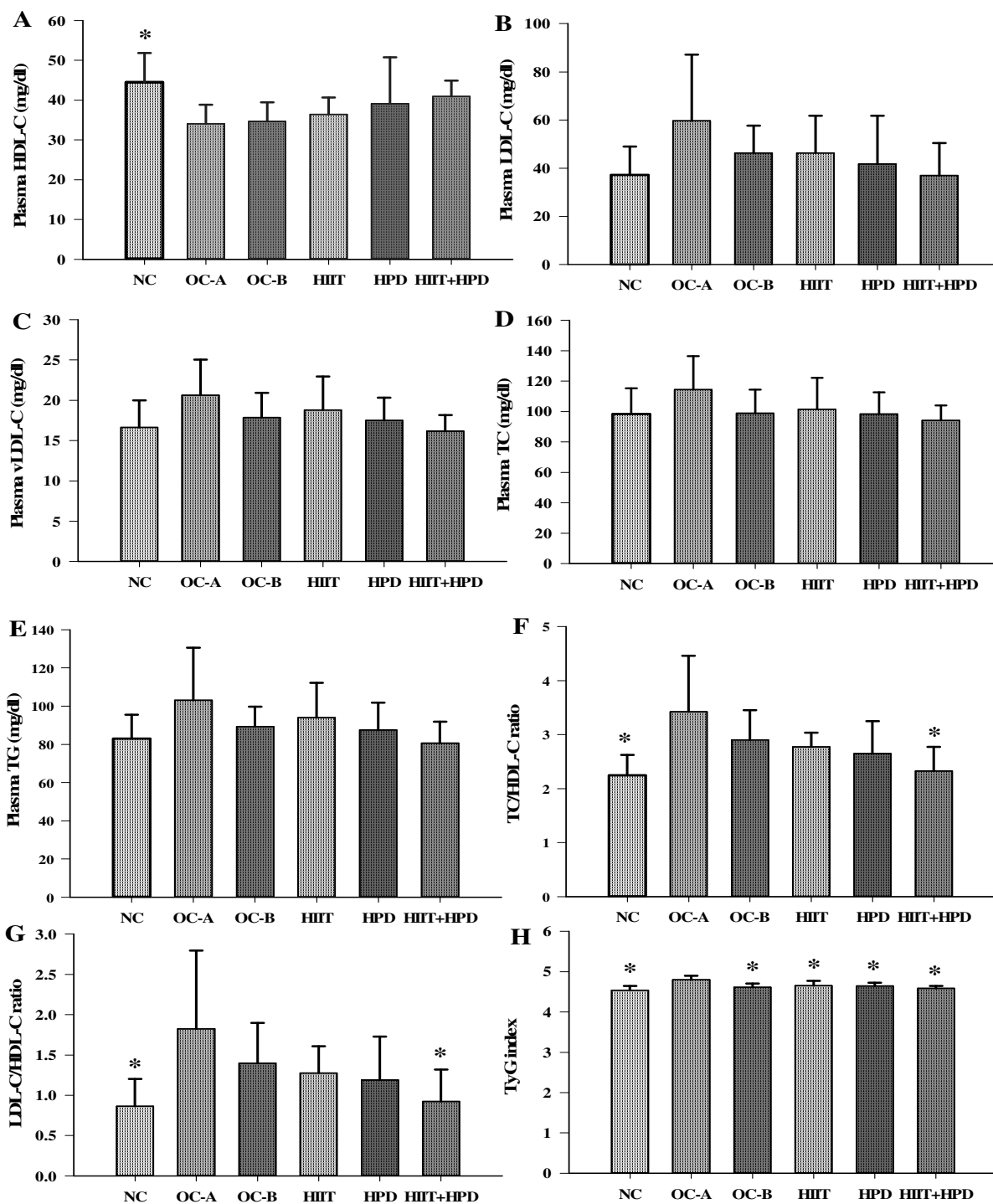
شاخص تری‌گلیسرید-گلوکز (TyG): در شاخص TyG تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده گردید ($F_{0.05}=6.87$, $p < 0.001$). بر اساس نتایج آزمون تعقیبی توکی، شاخص TyG در گروه‌های HIIT HPD، ($p = 0.001$) HIIT+HPD، ($p = 0.05$) NC و ($p = 0.02$) کنترل چاق-B ($p = 0.005$) و ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه کنترل چاق-A به طور معنی‌داری پایین‌تر بود. بین سایر گروه‌ها در شاخص TyG تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$) (شکل ۲. H).

، ($F_{0.05}=4.10$) و LDL-C/HDL-C ($p = 0.01$) نشان داد. نسبت سطوح TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C در گروه‌های NC (مقادیر p به‌ترتیب ۰/۰۰۴ و ۰/۰۱) و HIIT+HPD (مقادیر p به‌ترتیب ۰/۰۰۸ و ۰/۰۲) در مقایسه با گروه کنترل چاق-A به طور معنی‌داری پایین‌تر است. بین سایر گروه‌ها در نسبت سطوح TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$) (شکل ۳، F و G).



شکل ۱- سطوح پلاسمایی (A) ApoA1: آپولیپوپروتئین A1، (B) ApoB: آپولیپوپروتئین B و (C) نسبت ApoB/ApoA1 در گروه‌های مورد مطالعه. NC: گروه کنترل نرمال (رژیم غذایی نرمال)، OC-A: کنترل چاق-A (رژیم غذایی پر چرب)، OC-B: کنترل چاق-B (قطع رژیم غذایی پر چرب و مصرف رژیم غذایی نرمال)، HIIT: تمرین تناوبی شدید، HPD: رژیم غذایی پرپروتئین.

Fig. 1. Plasma levels of (A) ApoA1: apolipoprotein A1, (B) ApoB: apolipoprotein B and (C) ApoB/ApoA1 ratio in the study groups. NC: normal control group (normal diet), OC-A, obese control-A (high-fat diet), OC-B: obese control-B (high-fat diet discontinued and normal diet consumed), HIIT: high-intensity interval training, HPD: high-protein diet.



شکل ۲- سطوح پلاسمایی (A) HDL-C: لیپوپروتئین با چگالی بالا، (B) LDL-C: لیپوپروتئین با چگالی پایین، (C) vLDL-C: لیپوپروتئین با چگالی پایین، (D) TC: کلسترول تام، (E) TG: تری‌گلیسرید، (F) TC/HDL-C نسبت، (G) LDL-C/HDL-C نسبت، (H) TyG: شاخص تری‌گلیسرید - گلوکز در گروه‌های مورد مطالعه. * تفاوت معنی‌دار با گروه OC-A (کنترل چاق-آ) ($p < 0.05$).

Fig. 2. Plasma levels of (A) HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol, (B) LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol, (C) vLDL-C: very low-density lipoprotein cholesterol, (D) TC: total cholesterol, (E) TG: triglyceride, (F) TC/HDL-C ratio, (G) LDL-C/HDL-C ratio and (H) TyG: triglyceride-glucose index in the study groups. * Significant difference with the OC-A group (obese control-A) ($p < 0.05$).

جدول ۱- مقادیر وزن و شاخص لی موش‌ها قبل و بعد از ۱۰ هفته رژیم غذایی و تمرین تناوبی شدید (میانگین $\pm$ انحراف استاندارد)

Table 1. Weight and Lee index values of rats before and after 10 weeks of diet and (Mean $\pm$ SD)

Groups	Normal control	Obese control-A	Obese control-B	HIIT	HPD	HIIT + HPD
Body weight (g) before	283.10 $\pm$ 42.26	395.78 $\pm$ 38.82	388.18 $\pm$ 34.67	390.37 $\pm$ 38.82	370.53 $\pm$ 19.81	387.47 $\pm$ 26.83
Lee index before	301.19 $\pm$ 4.96	331.78 $\pm$ 9.43	327.61 $\pm$ 7.09	338.52 $\pm$ 16.66	323.73 $\pm$ 8.29	334.55 $\pm$ 15.29
Body weight (g) after	419.06 $\pm$ 49.26	524.70 $\pm$ 48.87	505.38 $\pm$ 49.80	442/93 $\pm$ 29.86	374.50 $\pm$ 26.57	381.23 $\pm$ 21.53
Lee index after	318.81 $\pm$ 2.53	338.45 $\pm$ 8.38	327.29 $\pm$ 3.85	315.86 $\pm$ 4.57	304.13 $\pm$ 3.11	306.85 $\pm$ 2.56

Normal control: Normal weight control with normal diet, Obese control-A: Obese control with high-fat diet, Obese control-B: Obese control with normal diet, HIIT: High-intensity interval training with high-fat diet, HPD: High-protein diet.

بحث

را تحریک کند؛ زیرا با قرار گرفتن در دیواره شریانی، اکسیده و گلیکوزیله شده و می‌تواند در فرآیند تشکیل پلاک نقش ایفا کند (۲۵). در پژوهش حاضر سطوح پلاسمایی ApoB، ApoA و نسبت ApoB/ApoA تمایل به بهبود نشان داد. در بررسی عوامل مؤثر بر نتایج مطالعات، متغیرهای زیادی مانند سن، جنسیت، رژیم غذایی، نوع نمونه (انسان یا حیوان و حتی نوع حیوان مورد مطالعه)، میانگین سنی آزمودنی‌ها، سابقه بیماری‌هایی مانند دیابت، چاقی و اضافه وزن و همچنین نوع، شدت، حجم و مدت دوره تمرین ذکر شده است (۳۳). بنابراین جهت درک بهتر تاثیر HIIT و HPD بر ApoB و ApoA1 و عوامل خطر قلبی-عروقی نیاز به مطالعات بیشتری است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد سطح HDL-C پلاسما در گروه NC نسبت به گروه کنترل چاق-A به‌طور معنی‌داری بالاتر بود و نسبت‌های TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C نیز در گروه‌های NC و HIIT+HPD در مقایسه با گروه کنترل چاق-A به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود. علاوه بر تمرین ورزشی، تغذیه درمانی بخشی ضروری از درمان افراد مبتلا به چاقی است. استفاده از روش‌های مختلف تمرینی همراه با مداخلات تغذیه‌ای یک راهبرد اقتصادی برای کاهش مرگ و میر زود هنگام در مبتلایان به چاقی است (۳۴). در این راستا، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مصرف HPD و کاهش چربی رژیم غذایی و انجام HIIT به مدت ۱۰ هفته

هدف کلی تحقیق حاضر بررسی اثر ۱۰ هفته HIIT و HPD بر سطوح پلاسمایی ApoA1 و ApoB و پروفایل لیپیدی در موش‌های صحرایی نر چاق بود. نتایج تحقیق حاضر عدم تفاوت سطوح ApoA1 و ApoB پلاسما و نسبت ApoB/ApoA1 بین گروه‌های مطالعه را نشان داد. همسو با نتایج مطالعه حاضر نصیری و همکاران (۲۰۲۳) در پژوهشی که به بررسی اثر هشت هفته HIIT (هشت تناوب دو دقیقه‌ای با شدت ۸۰ تا ۱۰۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی و هر هفته پنج جلسه) در موش‌های صحرایی نر سالمند پرداختند، تغییر معنی‌داری در سطوح ApoA1، ApoB و نسبت ApoB/ApoA1 مشاهده نکردند (۲۵). همچنین عدم تغییر معنی‌دار نسبت ApoB/ApoA1 در اثر شش هفته HIIT (شامل ۱۲ تناوب ۶۰ ثانیه‌ای با شدت ۷۵ تا ۹۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی و شش روز در هفته) در موش‌های صحرایی نر دیابتی گزارش شده است (۲۰). عدم تغییر معنی‌دار ApoA1 سرم زنان دارای اضافه وزن در اثر ۱۰ هفته HIIT و هفته‌ای سه جلسه نشان داد شده و مشخص شد که در مقایسه با HIIT، تمرین تداومی با شدت متوسط در بهبود چاقی شکمی، پروفایل لیپیدی و عوامل خطر قلبی-عروقی موثرتر است (۳۲). آپوA1 با فعال کردن آنزیم LCAT در انتقال معکوس TC و تبدیل آن به HDL-C نقش دارد و التهاب را در بافت چربی بهبود می‌بخشد (۱۸). دیگر، به‌نظر می‌رسد ApoB آتروژن

باعث تمایل به کاهش سطوح TC، TG، LDL-C و vLDL-C پلاسما و تمایل به افزایش سطح HDL-C پلاسما شد. در زمینه تاثیر ترکیب تمرین ورزشی و HPD بر پروفایل لیپیدی و عوامل خطر قلبی-عروقی، مطالعات خیلی محدود هستند. هم‌راستا با یافته‌های تحقیق حاضر، در یک مطالعه پس از شش هفته HIIT (۱۰ تناوب یک دقیقه‌ای با شدت ۸۵-۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی، سه جلسه در هفته) روی موش‌های صحرایی نر چاق، تغییر معنی‌داری در سطوح HDL-C و LDL-C گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد که با تحقیق حاضر همسو می‌باشد؛ هر چند در مطالعه مذکور سطوح TC و TG در گروه HIIT نسبت به گروه کنترل پایین‌تر بود (۳۴). همچنین در مطالعه‌ای که موش‌های صحرایی نر تحت مداخله شش هفته HIIT (۱۰ تناوب یک دقیقه‌ای با شدت ۸۰ تا ۹۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی و سه جلسه در هفته) و HFD قرار گرفتند؛ عدم تغییر در سطوح HDL-C و TC، کاهش سطح LDL-C، افزایش سطح TG و کاهش نسبت LDL-C/HDL-C نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (۳۵). مطالعات سازوکارهای مختلفی را گزارش کرده‌اند که HIIT و HPD ممکن است پروفایل لیپیدی و عوامل خطر قلبی-عروقی را تحت تاثیر قرار دهد. اکسیداسیون لیپید، سطح آنزیم‌ها و برخی هورمون‌های مرتبط با لیپولیز مانند کاتکولامین‌ها و هورمون رشد (GH) در اثر HIIT افزایش و اشتها و وزن به دنبال HIIT کاهش می‌یابد (۳۴). تمرین ورزشی باعث افزایش لیپوپروتئین لیپاز (LPL) و کاهش لیپاز کبدی (HL) و افزایش آنزیم LCAT می‌شود و این آنزیم‌ها نقش عمده‌ای در افزایش HDL-C دارد. بنابراین، سطح LDL-C با تمرین ورزشی کاهش و HDL-C افزایش می‌یابد که می‌تواند باعث بهبود نسبت‌های TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C شود (۱). کوستوگریس و

همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند مصرف هشت هفته HPD (۵۲/۴ درصد پروتئین) در موش‌های صحرایی نر، باعث کاهش سطح TG بدون تغییرات معنی‌دار در سطوح TC، HDL-C، LDL-C و TC/HDL-C سرمی گردید (۱۹). همچنین در مطالعه دیگری روی موش‌های چاق، افزایش وزن کمتر، کاهش مصرف غذا و کاهش انباشت چربی در کبد و عضله دوقلو (Gastrocnemius) متعاقب ۱۲ هفته HPD (۴۰ درصد پروتئین) مشاهده گردید (۳۶). سازوکاری که توسط آن مصرف پروتئین با تولید HDL-C مرتبط است به روشنی مشخص نیست، اما احتمالاً از آنجایی که HDL-C در کبد و روده سنتز می‌شود، ممکن است به مسیر گیرنده‌های روبنده کلاس B نوع ۱ (SR-B1)، وابسته باشد. پس از جذب HDL-C توسط مسیر SR-B1 به کبد، ذرات کوچک‌تر HDL-C دوباره به گردش خون آزاد می‌شوند، بنابراین غلظت HDL-C افزایش می‌یابد که این می‌تواند باعث بهبود نسبت‌های TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C شود (۳۷). در مطالعه حاضر، نسبت‌های TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C در اثر HIIT یا HPD به تنهایی تاثیر معنی‌داری بر پروفایل لیپیدی و عوامل خطر قلبی-عروقی نداشت، اما ترکیب HIIT و HPD با هم‌افزایی اثرات، بر بهبود نسبت‌های TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C موثر بود. با وجود عدم تغییر پروفایل لیپیدی در دوره‌های کوتاه مدت HIIT یا دریافت HPD به‌تنهایی، انجام همزمان HIIT و دریافت HPD با بهبود نسبت‌های TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C می‌تواند اثرات مفیدی بر سلامت قلب و عروق و کاهش عوارض ناشی از چاقی داشته باشد؛ هر چند برای درک بهتر این موضوع باید بررسی‌های بیشتری انجام شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد شاخص TyG در گروه‌های HIIT، HIIT+HPD، HPD، کنترل چاق دریافت‌کننده رژیم غذایی نرمال و کنترل دارای

وزن نرمال دریافت‌کننده رژیم غذایی نرمال در مقایسه با گروه چاق دریافت‌کننده رژیم غذایی پرچرب به‌طور معنی‌داری پایین‌تر است. ریاحی و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که انجام ۱۲ هفته HIIT (چهار تناوب دو دقیقه‌ای با شدت ۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی در هر جلسه، پنج جلسه در هفته) در موش‌های صحرایی نر چاق دیابتی، باعث کاهش سطح گلوکز سرم شد (۳۱). همچنین در موش‌های صحرایی نر دیابتی، هشت هفته HIIT (۱۰ تناوب یک دقیقه‌ای با شدت ۸۰ تا ۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی و پنج جلسه در هفته)، باعث کاهش گلوکز و مقاومت به انسولین شد (۳). احتمالاً HIIT از طریق افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب و کاهش تجمع TG درون سلولی، باعث افزایش پیام‌رسانی و فعالیت انسولینی می‌شود. از طرفی سازوکار تاثیر HIIT بر عمل انسولین و هومئوستاز گلوکز، تا حد زیادی به عملکرد عضلات اسکلتی مرتبط می‌باشد. از آنجایی که عضلات اسکلتی بیشترین مصرف گلوکز را در حین فعالیت می‌توانند داشته باشند، انقباض در عضله اسکلتی به‌ویژه فعالیت‌های شدید، نقش شبه انسولینی دارد و موجب مصرف مقدار زیاد گلوکز می‌شود؛ به‌طوری که در HIIT ذخایر گلوکز تمامی تارهای عضلانی تخلیه و این موجب افزایش فعالیت پروتئین انتقال‌دهنده گلوکز نوع ۴ (GLUT4) می‌شود. همچنین HIIT منجر به افزایش محتوای میتوکندری عضلات اسکلتی و باعث افزایش ظرفیت اکسایشی و اکسیداسیون چربی می‌شود که می‌تواند مقاومت به انسولین را کاهش دهد (۳۸). شاخص TyG، اندازه‌گیری ساده‌ای است که مقاومت به انسولین را منعکس می‌کند و این شاخص با شیوع بالاتر CVD ارتباط مثبت دارد (۳۹). در تحقیق حاضر، HIIT و HPD و کاهش چربی غذای مصرفی، باعث بهبود شاخص TyG شد که نشان‌دهنده تاثیر مفید آن بر

مقاومت انسولینی و بهبود عوارض ناشی از چاقی است؛ هر چند برای تایید و درک این تاثیرات نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد. مطالعه حاضر دارای محدودیت‌هایی از جمله عدم بررسی اثرات HIIT و مصرف HPD در بازه‌های زمانی مختلف بر متغیرهای وابسته مورد بررسی بود. همچنین، پروفایل لیپیدی، ApoA1 و ApoB پلاسما اندازه‌گیری شده است و شاخص‌های دیگر مربوط به متابولیسم لیپید مانند آنزیم‌های HL، LCAT، LPL و SR-B1 و هورمون‌های کاتکولامین‌ها و GH در پلاسما و بافت کبد سنجش نگردید.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد، مصرف HFD می‌تواند باعث چاقی و برخی اختلالات لیپیدی شود. از طرفی HIIT و جایگزینی HPD در موش‌های دریافت‌کننده رژیم غذایی پرچرب، باعث بهبود اختلالات لیپیدی گردید. به‌نظر می‌رسد HIIT و مصرف HPD با اثر هم‌افزایی به‌واسطه بهبود عوامل خطر قلبی-عروقی (نسبت‌های TC/HDL-C و LDL-C/HDL-C) و شاخص TyG می‌تواند از برخی عوارض مرتبط با چاقی جلوگیری نماید.

تشکر و قدردانی

از کارشناسان محترم مرکز تحقیقات سلولی مولکولی غدد درون‌ریز پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، لاله حقوقی‌راد و هدی قدکساز، جهت کارهای آزمایشگاهی قدردانی می‌شود.

منابع

1. Gonzalez-Gil AM, Elizondo-Montemayor L. The role of exercise in the interplay between myokines, hepatokines, osteokines, adipokines, and modulation of inflammation for energy substrate redistribution and fat mass loss: a review. *Nutrients*. 2020;12(6):1899.

cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2020;75(17): 2122-35.

11. Bhoite R, Chandrasekaran A, Pratti VL, Satyavrat V, Aacharya S, Mane A, et al. Effect of a high-protein high-fibre nutritional supplement on lipid profile in overweight/obese adults with type 2 diabetes mellitus: a 24-week randomized controlled trial. *J Nutr Metabol*. 2021; 2021:6634225.

12. Kawanishi N, Takagi K, Lee HC, Nakano D, Okuno T, Yokomizo T, et al. Endurance exercise training and high-fat diet differentially affect composition of diacylglycerol molecular species in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2018;314(6):R892-R901.

13. Huang M, Zheng J, Chen L, You S, Huang H. Role of apolipoproteins in the pathogenesis of obesity. *Clinica Chimica Acta*. 2023;545:117359.

14. Gianazza E, Zoanni B, Mallia A, Brioschi M, Colombo GI, Banfi C. Proteomic studies on apoB-containing lipoprotein in cardiovascular research: a comprehensive review. *Mass Spectrom Rev*. 2023;42(4):1397-423.

15. Du Y., Zhu B., Liu Y., Du Z., Zhang J., Yang W., et al., Association between apolipoprotein B/A1 ratio and quantities of tissue prolapse on optical coherence tomography examination in patients with atherosclerotic cardiovascular disease. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2024;40(3):545-55.

16. Dominiczak MH, Caslake MJ. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Annal Clin Biochem*. 2011;48(6):498-515.

17. Andraski AB, Singh SA, Lee LH, Higashi H, Smith N, Zhang B, et al. Effects of replacing dietary monounsaturated fat with carbohydrate on HDL (high-density lipoprotein) protein metabolism and proteome composition in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019; 39(11):2411-2430.

2. Albarrati AM, Alghamdi MSM, Nazer RI, Alkorashy MM, Alshowier N, Gale N, Effectiveness of low to moderate physical exercise training on the level of low-density lipoproteins: a systematic review. *Biomed Res Int*. 2018; 2018:5982980.

3. Alizadeh M, Asad MR, Faramarzi M, Afroundeh R. Effect of eight-week high intensity interval training on omentin-1 gene expression and insulin-resistance in diabetic male rats. *Annal Appl Sport Sci*. 2017; 5(2):29-36.

4. Garneau P, Glazer S, Jackson T, Sampath S, Reed K, Christou N, et al. Guidelines for canadian bariatric surgical and medical centres: a statement from the canadian association of bariatric physicians and surgeons. *Can J Surg*. 2022;65(2):E170.

5. Kim DY, Jung SY. Effect of aerobic exercise on risk factors of cardiovascular disease and the apolipoprotein B/apolipoprotein a-1 ratio in obese woman. *J Physic Ther Sci*. 2014;26(11):1825-1829.

6. Berberich AJ, Hegele RA. A modern approach to dyslipidemia. *Endocr Rev*. 2022;43(4):611-53.

7. Bailey A, Mohiuddin SS. Biochemistry, High Density Lipoprotein. 2022 Sep 26. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025; PMID: 31747209.

8. Fernandez ML, Webb D. The LDL to HDL cholesterol ratio as a valuable tool to evaluate coronary heart disease risk. *J Am Coll Nutr*. 2008; 27(1):1-5.

9. Heidemann BE, Koopal C, Bots ML, Asselbergs FW, Westerink J, Visseren FL. The relation between VLDL-cholesterol and risk of cardiovascular events in patients with manifest cardiovascular disease. *Int J Cardiol*. 2021;322: 251-7.

10. Duran EK, Aday AW, Cook NR, Buring JE, Ridker PM, Pradhan AD. Triglyceride-rich lipoprotein cholesterol, small dense LDL cholesterol, and incident

- predictors of cardiovascular diseases and arteriosclerosis in elderly rats. *J Police Med*. 2023;12(1):0-16. [In Persian]
26. Kouhgardzadeh S, Valipour-Dehnou V, Molanouri-Shamsi M. Effect of high intensity functional training on serum levels of ApoA-I, ApoB and lipid profile in elderly men and women. *Feyz Med Sci J*. 2022; 26(2):138-146. [In Persian]
27. Kalantar-Zadeh K, Kramer HM, Fouque D. High-protein diet is bad for kidney health: unleashing the taboo. Oxford University Press, 2020; pp:1-4.
28. Zhang X, Sergin I, Evans TD, Jeong SJ, Rodriguez-Velez A, Kapoor D, et al. High-protein diets increase cardiovascular risk by activating macrophage mTOR to suppress mitophagy. *Nat Metabol*. 2020; 2(1):110-25.
29. Boren J, Chapman MJ, Krauss RM, Packard CJ, Bentzon JF, Binder CJ, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the european atherosclerosis society consensus panel. *Eur Heart J*. 2020;41(24): 2313-30.
30. Lee JJ, Kim HA, Lee J. The effects of Brassica juncea L. leaf extract on obesity and lipid profiles of rats fed a high-fat/high-cholesterol diet. *Nutr Res Pract*. 2018; 12(4):298-306.
31. Riyahi V, Morovvati H, KHosravi A. The effect of a period of resistance, endurance and HIIT training on serum glucose index in obese diabetic Wistar rats. *J Physiol Mov Health*. 2023;3(2):1-12. [In Persian]
32. Chen S, Zhang PZ. Effects of high intensity interval training and crossover point training on blood lipid metabolism in overweight female university students. *Chin J Sch Health*. 2022;43(10):1495-1499.
33. Rahmati-Ahmadabad S, Broom DR, Ghanbari-Niaki A, Shirvani H. Effects of exercise on reverse cholesterol transport: a
18. Cooke AL, Morris J, Melchior JT, Street SE, Jerome WG, Huang R, et al. A thumbwheel mechanism for APOA1 activation of LCAT activity in HDL [S]. *J Lipid Res*. 2018;59(7):1244-1255.
19. Kostogrys RB, Franczyk-Zarow M, Maslak E, Topolska K. Effect of low carbohydrate high protein (LCHP) diet on lipid metabolism, liver and kidney function in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2015;39(2):713-719.
20. Soleimani N, Gallehdari M, Sheikh R. Effect of six weeks of interval training and curcumin consumption on apolipoprotein A and B in diabetic male rats. *J Exerc Organ Cross Talk*. 2023;3(2):73-80.
21. Hatami M, Roshdi Bonab R, Atashak S. Comparison of the effect of twelve week of concurrent (resistance-aerobic) and high-intensity interval training on the atherogenic, insulin resistance and monocyte chemoattractant protein-1 indices in obese menopausal women. *Sport Physiol Manag Invest*. 2022;14(1):177-93. [In Persian]
22. Rajar HA, Hashmi MA, Akhtar S, Amin U, John A. The effect of high intensity interval training in reducing the risk of cardiovascular diseases in obese type-I individuals. *Allied Med Res J*. 2023;1(2): 86-95.
23. Cassidy S, Thoma C, Houghton D, Trenell MI. High-intensity interval training: a review of its impact on glucose control and cardiometabolic health. *Diabetologia*. 2017; 60(1):7-23.
24. Dolataabadi P, Amirsasan R, Vakili J. The effect of high-intensity interval training on serum asprosin and lipid profile of overweight and obese Women. *J Pract Stud Biosci Sport*. 2023;11(27):22-33. [In Persian]
25. Nasiri R, Mirzaei B, Faramarzi M, Shirazian F. Comparison of the effect of two moderate and high-intensity endurance and resistance training methods on

obese Zucker rats. *Nutrients*.2017;9(6):587.

37. Muzaffar H, Faisal MN, Anwar H, Hussain A, Khan JA, Muhammad F, et al., Fish protein intake is a novel dietary approach for managing diabetes-associated complications in diabetic wistar rat model. *Food Sci Nutr*. 2021;9(2):1017-24.

38. Pashaei Z, Jafari A, Alivand M. The effect of high intensity interval training on lipid profile and glucose homeostasis in overweight/obese middle-aged women. *J Appl Health Stud Sport Physiol*. 2020; 6(2):56-64. [In Persian]

39. Da Silva A, Caldas APS, Hermsdorff HHM, Bersch-Ferreira AC, Torreglosa CR, Weber B, et al. Triglyceride-glucose index is associated with symptomatic coronary artery disease in patients in secondary care. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18:1-8.

systemized narrative review of animal studies. *Life Sci*. 2019;224:139-48.

34. Ghadery B, Ghazalian F, Hosseini SA, Natanzy HA, Shamsoddini A. Effect of high-intensity interval training with eryngium campestre on lipid profile and glycemic indices in high-fat diet-induced obese rats. *Hormozgan Med J*. 2020; 24(2):e98982.

35. Abbasi B, Samadi A, Bazgir B. The combined effect of high-intensity interval training and intermittent fasting on lipid profile and peroxidation in wistar rats under high-fat diet. *Sport Sci Health*. 2020;16:645-652.

36. French WW, Dridi S, Shouse SA, Wu H, Hawley A, Lee SO, et al. A high-protein diet reduces weight gain, decreases food intake, decreases liver fat deposition, and improves markers of muscle metabolism in



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.

Content

Formulation and Evaluation of Clove Extract-Loaded Chitosan Hydrogel on the Mouse Fibroblast Cell Line	1
--	---

Sevda Shemshad, Fereshteh Sharifi

A Survey on Gastrointestinal Helminths of <i>Cynogossus bilineatus</i> Caught from the Coasts of Bandar Abbas	13
---	----

Abdolhossein Dalimi, Karaneh Parizadeh

The Effect of Silymarin in Milk Thistle on Lipid Profile, Liver Enzymes and Inflammatory Cytokines in the Blood of Male Wistar Rats	25
---	----

Hoda Jahangiri, Parichehreh Yaghmaei, Azadeh Ebrahim Habibi, Shahrbanoo Oryan

Evaluation of the Quality and Health of Embryos Resulting from In Vitro Maturation (IVM) under the Influence of Stem Cell Secretome	39
---	----

Hilda Rastegari, Nasim Hayati Roudbari, Somayeh Kazemnezhad, Soheila Ansaripour

Protective Effect of Nano Magnesium Oxide on Renal Ischemia/ Reperfusion Injury on Renal Function and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Male Wistar Rats	51
---	----

Marzieh Minaei, Akram Eidi, Pejman Mortazavi, Ahmad Asghari

Hemolymph Biochemical and Immune Indices of Green Tiger Shrimp (<i>Penaeus semisulcatus</i>) in a Biofloc Aquaculture System: Influenced By Different Feeding Levels	65
--	----

Mohammad Hossein Khanjani

Study of White Leg Shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>) of Shrimp Farming Complexes in Gomishan, Golestan Province, with the Perspective of Contamination by Heavy Metals and Risk Evaluation for Consumer	77
--	----

Reza Khalili, Reza Salighehzadeh, Marjan Mosafer

The Effect of Hydroxyl Selenomethionine on Performance, Egg Quality Traits and Blood Parameters Old Broiler Breeders	
--	--

Ahmad Manafi, Yahya Ebrahimnezhad, Habib Aghdam Shahriar, Abdolabad Shaddel Telli, Abolfazl Ghorbani, Naser Maheri-Sis	87
--	----

Investigating the Effects of Organic and Inorganic Forms of Zinc, Copper and Manganese on the Qualitative Traits of the Broiler Breeder Eggshell	99
--	----

Seyede Atiye Mojaverian, Shahabodin Gharahveysi*, Mohsen Hajipour

The Pattern of Bioaccumulation of Heavy Metals Mercury, Zinc and Nickel in the Soft Tissues of the Blue Swimming Crab (<i>Portunus segnis</i>) in Makoran Coasts	109
--	-----

Samaneh Ebrahimi, Mohammad Mansour Tootooni, Mehran Loghmani

Comparison of the Effects of Barberry and Saffron Extracts Combined with a Period of Endurance Physical Activity on POMC and MC4R Genes in Female Wistar Rats Addicted to Methamphetamine	123
---	-----

Daniyal Hakak¹, Rambod Khajaei, Sayyed Javad Ziaolhagh, Akbar Safipour-Afshar

The Effect of High-Intensity Interval Training and High-Protein Diet on Plasma Levels of Apolipoprotein A1 and B and Lipid Profile in obese Male Rats	137
---	-----

Marziyeh Saghebjo, Mahdi Aliakbari, Haniyeh Habibi Sangani



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

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/>

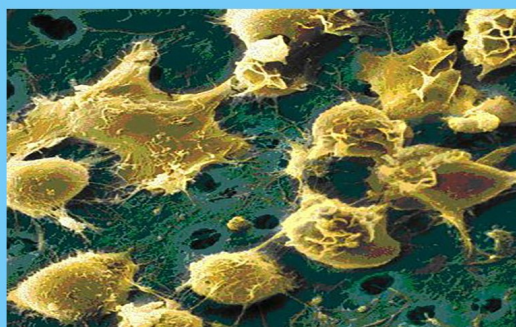
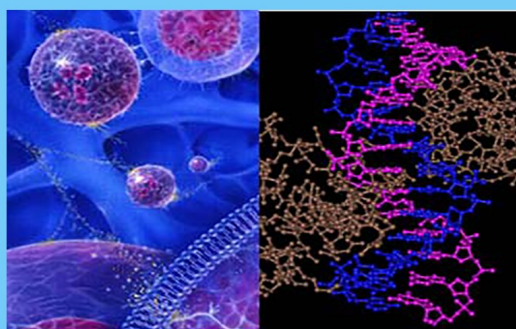
Journal of Animal Biology



Damghan Branch

Vol. 17, Spring 2025, Available online

ISSN:1735-9724



sanad.iau.ir/journal/ascij