



فصلنامه زیست‌شناسی جانوری

ISSN:1735-9724

سال نهم، زمستان ۱۴۰۳، دارای نسخه الکترونیک



sanad.iau.ir/journal/ascij



فصلنامه زیست شناسی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

علمی - پژوهشی، سال هفدهم، زمستان ۱۴۰۳

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

مدیرمسئول: دکتر هومن شجعی

سر دبیر: دکتر غلامحسین واعظی

مدیر داخلی: دکتر ویدا حجتی

هیأت تحریریه:

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

ویراستار: دکتر ویدا حجتی

تنظیم و صفحه آرایی: سمانه مروی زاده

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

واحد دامغان دارای مجوز انتشار می باشد.

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

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

ISSN : ۱۷۳۵ - ۹۷۲۴

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

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

تلفکس: ۰۲۳ - ۳۵۲۲۵۰۵۸

پست الکترونیک: Faslnameh.zist@gmail.com

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

۱	تاثیر مصرف جیره‌های مکمل‌شده با سطوح مختلف گوانیدینواسید بر صفات لاشه، برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون، فعالیت آنزیم‌های کبدی، جمعیت میکروبی و ریخت‌شناسی روده در بلدرچین‌های گوشتی ژاپنی
	رضا علی‌پور فیل‌آبادی، مصطفی فغانی، فرشید خیری
۱۱	مطالعه اوروگرافی ترشچی و آناتومی دستگاه ادراری در سگ سرابی
	سجاد خدا و قانون، سیامک عزیزاده، محمدرضا حسینچی
۲۵	شناسایی صفات ظاهری و تولیدی بز بومی لرستان
	علیرضا چگنی، بهروز یاراحمدی، محسن محمدی ساعی
۳۵	مطالعه فلزات سنگین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی منطقه سوسن سرخاب اندیکا
	ولید چنانه، رضا سلیقه‌زاده، محسن پورنیا، مرجان مسافر
۴۵	نقش miR-143 در تنظیم التهاب و فیروز ریه ناشی از گاز خردل: پتانسیل‌های درمانی و کاربردهای بالینی
	عطیه توکلی، نسرین کریمی، محمد ولی‌زاده، محدثه ولی‌زاده
۵۵	بررسی تاثیر فراآوری غلاف کپور بر عملکرد، قابلیت هضم و فراسنجه‌های خونی بلدرچین ژاپنی
	جواد نواصر، علی آقائی، محمدرضا قربانی، طاهره محمد آبادی، صالح طباطبایی وکیلی
۶۷	مقایسه اثرات استفاده از روغن کاملینا با روغن سویا در جیره بر سیستم ایمنی، پروفیل‌های لیپیدی و آنزیم‌های کبدی جوجه‌های گوشتی آرین
	کریم قربانی، محسن محمدی ساعی، بهروز یاراحمدی، حسن نورزبان، امین کاظمی‌زاده
۷۷	تاثیر جایگزینی پودر گاماروس به‌جای گرده‌ی گل در تغذیه کلونی‌های زنبور عسل بر عملکرد و شاخص‌های رفتاری آن‌ها
	کاوه جعفری خورشیدی، اسماعیل گنجی جامه‌شوران، منیرالسادات صلواتیان
۹۱	بررسی سونوگرافیک روند تخمک‌گذاری در سگ‌های بومی فحل تحت تاثیر hCG و GnRH اگزوزن در زمان افزایش هورمون LH با ۱۲ ساعت فاصله زمانی
	عرفان خدادادی، سکینه اسدزاده، عیسی فلاح
۱۰۱	بررسی هیستومورفولوژی کلیه و برخی شاخص‌های خون‌شناسی تیلاپای نیل (<i>Oreochromis niloticus</i>) طی جایگزینی پودر خون بجای پودر ماهی در جیره غذایی
	امل مشعشی، رحیم عبدی، رحیم پیغان
۱۱۵	بررسی میزان صید ماهیان استخوانی در سواحل جنوبی دریای خزر در شهرستان‌های استان مازندران از سال‌های ۱۳۹۸ تا ۱۴۰۱
	مهران مسلمی، مهدی سحابی، عبدالغفار عبادی، سمیه قاسمی چراتی

۱۲۷	بررسی خاصیت ضدسرطانی و تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی سلول‌های سرطانی Hela تیمار شده با پپتید HL-10 در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی مریم رضواند، زهرا ستایش مهر، فاطمه حدادی
۱۴۱	بیماری‌های ژئونوز ناشی از سگ در ایران: بررسی وضعیت فعلی، چالش‌های بهداشتی و راهکارهای پیشگیری محبوبه سادات حسین‌زاده
۱۵۵	بررسی اثر مقادیر عناصر ماکرو خاک و علوفه بر روی سطوح سرمی عناصر ماکرو در گوسفندان تحت چرای مراتع استان گلستان جلال‌الدین خال لی‌زاده، محمد اسدی
۱۶۷	اثر کارواکرویل بر پارامترهای اسپرم بر آسیب بیضه القا شده توسط واریکوسل در موش‌های صحرایی نر الهام قهرمان، اکرم عیدی، پژمان مرتضوی، احمد اصغری، معصومه اصل روستا
۱۸۳	سنتر و مشخصه‌یابی نانوحامل‌های لیپوزومی حاوی عصاره گل انار به منظور بررسی سمیت آن بر روی رده‌ی سلولی MCF-7 سرطان پستان آیدا شفیق، لیدا افتخاری‌وش، علی اکبر سیفی اشکذری
۱۹۹	اثر بنتونیت و ترکیبات جاذب آفلاتوکسین بر کبد و فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی نژاد راس مهسا محرری، رضا وکیلی، نفیسه رحمانیان شریف‌آباد
۲۱۳	عصاره هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه پنیرک (<i>Malva parviflora</i>) بر مهار رشد و القای آپوپتوز در رده سلولی سرطان ریه A549 فریده رحیمی، زهره ولی‌زاده
۲۲۵	تهیه داربست‌های سلول‌زدایی‌شده‌ی رگ گاو و ارزیابی مدل‌های هایپرالاستیک به منظور کاربرد در مهندسی بافت عروق مهرداد شیخلو، آرش عبدالملکی، عباس صباحی نمینی
۲۳۹	اثر دوزهای مختلف سلیوم آلی بر بیان ژن‌های اینترلوکین ۱۰، فاکتور نکروز تومور آلفا و وضعیت آنتی‌اکسیدانی در موش‌های نر نژاد ویستار تحت تنش گرمایی حمید اشرفی

Research Article

Effect of Different Levels of Dietary Guanidinoacetic Acid Supplementation on Carcass Traits, Some Blood Biochemical, Liver Enzyme Activities, Intestinal Microbial Population and Morphology in Broiler Japanese Quails

Reza Alipour Filabadi, Mostafa Faghani*, Farshid Kheiri

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

*Corresponding author: m.faghani@gmail.com

Received: 25 September 2024

Accepted: 27 January 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1185104

Abstract

In order to investigate the effect of consuming diets supplemented with different levels of guanidinoacetic acid on performance, some biochemical parameters of blood, microbial population and intestinal morphology in Japanese meat quails, 288 Japanese quails aged 1-35 days were used with 4 experimental treatments including control group and consuming guanidinoacetic acid with levels of 0.5, 1 and 1.5 g/kg of standard feed with 6 replications and 12 laying quails in each replication. At the end of the period (35 days of age), after slaughtering two birds from each replicate, carcass traits of quails, blood parameters such as cholesterol, triglyceride, very low density lipoprotein (VLDL) and high density lipoprotein (HDL) as well as the activity of liver enzymes such as alkaline phosphatase (ALP), alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) were examined. Sampling was performed to evaluate the tissue and population of the small intestine microbial flora. The results showed that the consumption of diets supplemented with guanidinoacetic acid significantly improved carcass traits in the quails under study ($p \leq 0.05$). Supplementation of the diet with guanidinoacetic acid caused a significant decrease in serum concentrations of blood parameters of cholesterol, triglycerides and LDL and subsequently increased HDL ($p \leq 0.05$). Improvement in liver enzyme activity was observed under the influence of guanidinoacetic acid levels ($p \leq 0.05$). A significant increase in the beneficial microbial population of Lactobacilli and, on the contrary, a decrease in the colony population of pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in the intestine, along with an increase in the level of villi and the density of the number of goblet cells, indicated the effect of supplementation with different levels of guanidinoacetic acid on improving intestinal health in the quails under study ($p \leq 0.05$). The results of this study showed the benefits of consuming different levels of guanidinoacetic acid on carcass traits, blood biochemical parameters, liver enzymes, morphology, and gut microbial population in Japanese quails.

Keywords: Guanidinoacetic acid, Carcass trait, Blood biochemical, Liver enzyme, Japanese quails.

تاثیر مصرف جیره‌های مکمل شده با سطوح مختلف گوانیدینواستیک‌اسید بر صفات لاشه، برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون، فعالیت آنزیم‌های کبدی، جمعیت میکروبی و ریخت‌شناسی روده در بلدرچین‌های گوشتی ژاپنی

رضا علی‌پور فیل‌آبادی، مصطفی فغانی*، فرشید خیری

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

*مسئول مکاتبات: m.faghani@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۴

DOI: 10.60833/ascij.2025.1185104

چکیده

به منظور بررسی اثر مصرف جیره‌های مکمل شده با سطوح مختلف گوانیدینواستیک‌اسید بر عملکرد، برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون، جمعیت میکروبی و ریخت‌شناسی روده در بلدرچین‌های گوشتی ژاپنی، تعداد ۲۸۸ قطعه بلدرچین ژاپنی در سن ۱-۳۵ روزگی با ۴ تیمار آزمایشی شامل گروه شاهد و مصرف کننده گوانیدینواستیک‌اسید با سطوح ۰/۵ و ۱ و ۱/۵ گرم/کیلوگرم از خوراک استاندارد با ۶ تکرار و ۱۲ قطعه بلدرچین تخم‌گذار در هر تکرار استفاده گردید. در انتهای دوره (۳۵ روزگی) پس از کشتار دو قطعه پرنده از هر تکرار، صفات لاشه بلدرچین‌ها، فراسنجه‌های خونی نظیر کلسترول، تری‌گلیسرید، لیپوپروتئین با چگالی بسیار کم (VLDL) و لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) و همچنین فعالیت آنزیم‌های کبدی نظیر آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین ترانس‌آمیناز (ALT) و آسپارات ترانس‌آمیناز (AST) بررسی شد. برای ارزیابی بافت و جمعیت فلور میکروبی روده باریک، نمونه‌برداری صورت گرفت. نتایج نشان داد مصرف جیره‌های مکمل شده با گوانیدینواستیک‌اسید سبب بهبود معنی‌دار صفات لاشه در بلدرچین‌های تحت مطالعه شد ($p \leq 0/05$). مکمل‌سازی جیره با گوانیدینواستیک‌اسید سبب کاهش معنی‌دار بر غلظت سرمی فراسنجه‌های خونی کلسترول، تری‌گلیسرید و LDL و متعاقباً افزایش HDL شد ($p \leq 0/05$). بهبود وضعیت فعالیت آنزیم‌های کبدی تحت تاثیر مصرف سطوح گوانیدینواستیک‌اسید مشاهده گردید ($p \leq 0/05$). افزایش معنی‌دار جمعیت میکروبی مفید لاکتوباسیلوس‌ها و در مقابل کاهش جمعیت کلونی باکتری‌های بیماری‌زای /شرشیاکلی و سالمونلا /اتریکا در روده همراه با افزایش سطح ویلی‌ها و تراکم تعداد سلول‌های گابلت نشان‌دهنده اثر مکمل‌سازی سطوح مختلف گوانیدینواستیک‌اسید بر بهبود وضعیت سلامت روده در بلدرچین‌های تحت مطالعه بود ($p \leq 0/05$). نتایج این مطالعه نشانگر سودمندی مصرف سطوح مختلف گوانیدینواستیک‌اسید بر صفات لاشه، فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون، آنزیم‌های کبدی، ریخت‌شناسی و جمعیت میکروبی روده در بلدرچین‌های ژاپنی بود.

کلمات کلیدی: گوانیدینواستیک‌اسید، فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون، آنزیم کبدی، ریخت‌شناسی روده، بلدرچین ژاپنی.

مقدمه

امروزه به دلیل وجود ویژگی‌های غذایی مناسب گوشت بلدرچین، پرورش این پرنده به صورت صنعتی سودآور به جهت تامین مایحتاج نیاز پروتئینی جامعه مورد نظر است (۲۷). گوشت بلدرچین به دلیل پایین بودن قیمت در مقایسه با گوشت قرمز و همچنین غنی بودن از مواد معدنی و آلی از جایگاه

خاصی در تغذیه انسانی برخوردار است (۲۲). اسید آمینه آرژنین نقش مهمی در رشد بلدرچین‌های گوشتی و تخم‌گذار دارد، به طوری که کمبود این اسید آمینه می‌تواند رشد بلدرچین‌ها و سلامت روده را تحت تأثیر خود قرار بدهد و به عبارت دیگر کمبود آرژنین می‌تواند باعث بدتر شدن رشد، افزایش ضریب تبدیل خوراک و ورم روده شود (۱۴ و ۲۹). کراتین به عنوان یک ترکیب مهم به منظور ذخیره سازی انرژی با دریافت گروه فسفات از آدنوزین‌تری‌فسفات تبدیل به کراتین فسفات می‌شود که در متابولیسم انرژی کوتاه‌مدت به‌ویژه در سلول‌های ماهیچه‌ای به عنوان یک پشتیبان مهم برای ATP عمل می‌کند (۱۲). گوانیدینواستیک اسید با نام اختصاری GAA، یک ترکیب آلی با فرمول شیمیایی $C_4H_9N_3O_2$ است (۱۳). این ماده یک ترکیب واسطه متابولیکی است و از اسید آمینه‌های گلايسین و آرژنین ساخته می‌شود، که عمدتاً این سنتز در کلیه و پانکراس صورت می‌گیرد؛ سپس در کبد تبدیل به کراتین می‌شود (۲۸). روند تشکیل کراتین از گوانیدینواستیک اسید یک روند غیر قابل برگشت است (۱۸). GAA به عنوان تنها پیش‌ساز کراتین در بافت‌های حیوانی است که معمولاً از گلايسین و آرژنین در کلیه تولید شده و در کبد با واسطه آنزیمی پس از متیله شدن به کراتین تبدیل می‌گردد (۴، ۶). کراتین فسفات به صورت مستقیم در تولید انرژی نقشی ندارد و با انتقال فسفات پر انرژی خود به ADP و تبدیل آن به ATP نوعی انرژی سهل الوصول را برای سلول‌های ماهیچه‌ای فراهم می‌نماید (۱۲). حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد نیاز روزانه کراتین در بدن بلدرچین‌ها از باز سنتز به دست می‌آید و مابقی نیاز بدن از طریق خوراک بایستی تامین گردد و از آنجایی که کراتین و گوانیدینواستیک اسید در منابع گیاهی وجود ندارند، در شرایط تغذیه حیوانات از منابع گیاهی این ترکیب

توسط سنتز در بدن موجود زنده ایجاد و تامین می‌گردد که علاوه بر ایجاد فشار مضاعف به کبد و کلیه سبب کاهش رشد و راندمان مواد غذایی در آنها می‌گردد (۳۰). از این جهت مکمل گوانیدینواستیک اسید به عنوان جایگزینی برای اسید آمینه آرژنین و عاملی در حفظ تعادل و هموستاز انرژی بدن بلدرچین‌ها مورد توجه است و به نظر می‌رسد اگر از منبع خارجی گوانیدینواستیک اسید در تغذیه حیوانات اهلی استفاده شود امکان ادامه سوخت و ساز و تولید کراتین و کراتین فسفات وجود دارد (۲۱). مصرف سطح آرژنین با میزان ۱۰ درصد بالاتر از توصیه NRC و مصرف سطوح ۰/۶ و ۲۱ گرم/کیلوگرم از مکمل گوانیدینواستیک اسید در جیره بلدرچین‌های ژاپنی سبب افزایش وزن لاشه، بهبود کیفیت ساختار گوشت و کاهش محتوی سرمی تری‌گلیسیرید و کلسترول خون گردید (۴). احتیاجات غذایی جوجه‌ها به آرژنین با افزایش سن بالاتر می‌رود و استفاده از مکمل گوانیدینواستیک اسید می‌تواند نقش مهمی در بهبود عملکرد و صفات لاشه در جوجه‌ها داشته باشد (۱۴). ابراهیمی و همکاران آثار مثبت مصرف مکمل آرژنین بر افزایش وزن روزانه، محتوای ماهیچه لاشه، بازده خوراک، وزن لاشه، وزن و ضخامت ماهیچه سینه و ران و بهبود ریخت‌شناسی روده در جوجه‌های گوشتی را نشان دادند (۸). فرناندز و همکاران نشان دادند استفاده از سطوح بالای آرژنین و مکمل‌سازی جیره با گوانیدینواستیک اسید منجر به افزایش خطی وزن بافت ماهیچه‌ای سینه و فیله در جوجه‌های گوشتی شد (۱۰). مصرف مکمل جیره‌ای آرژنین و گوانیدینواستیک اسید سبب کاهش سطوح پلاسمایی کلسترول و HDL در جوجه‌های گوشتی شد (۹). استفاده از مکمل گوانیدینواستیک اسید به منظور تامین آرژنین جیره در سطح ۰/۵ و ۰/۶ تأثیر معنی‌داری بر افزایش وزن بدن و کیفیت صفات لاشه در جوجه‌های

گوشتی نداشت (۲). مکمل‌سازی جیره با آرژنین و گوانیدینواستیک‌اسید سبب اثر بر ترشح انسولین از سلول‌های بتا پانکراس و افزایش ترشح هورمون رشد از غده هیپوفیز می‌گردد و اثرات آنابولیکی بر ماهیچه اسکلتی دارد. استفاده از مکمل گوانیدینواستیک‌اسید سبب بهبود خصوصیات لاشه از نظر افزایش بازده گوشت سینه و ران می‌گردد (۵). نتایج مطالعات راعی و همکاران نشان داد مصرف گوانیدینواستیک‌اسید در سطوح (۰/۶، ۱/۲ و ۱/۸ گرم/کیلوگرم) نشان‌دهنده بهبود وضعیت آنزیم‌های کبدی و افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در جوجه‌های آزمایشی بود (۲۳). مصرف مکمل گوانیدینواستیک‌اسید به دلیل تامین انرژی ماهیچه‌ای منجر به استفاده بهینه از اسیدهای آمینه نظیر میتونین شده و سبب بهبود رشد و تولید در بلدرچین‌های ژاپنی می‌گردد (۱۷). هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثرات اثر مصرف جیره‌های مکمل شده با سطوح مختلف گوانیدینواستیک‌اسید بر عملکرد، برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون، ریخت‌شناسی و جمعیت میکروبی روده در بلدرچین‌های گوشتی ژاپنی بود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۸۸ قطعه بلدرچین ژاپنی (*Coturnix japonica*) یک روزه با میانگین وزنی تقریباً یکسان (13.5 ± 1) گرم و در سن (۱ لغایت ۳۵ روزگی) استفاده گردید. بلدرچین‌ها در ابتدای دوره آزمایش به صورت دسته جمعی وزن کشی شده و گروه‌های با میانگین وزنی یکسان در بین تیمارهای مختلف، تقسیم شدند و استانداردهای درجه حرارت، رطوبت، نور، تهویه و تغذیه مورد توجه قرار گرفت. چهار تیمار آزمایشی شامل گروه شاهد و گروه‌های مصرف‌کننده سطوح مختلف گوانیدینواستیک‌اسید (۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم/کیلوگرم) با ۶ تکرار و ۱۲ قطعه بلدرچین

ژاپنی در هر تکرار استفاده گردید. کلیه اجزای جیره بلدرچین‌های تحت مطالعه بر اساس روش تجزیه و تحلیل ترکیبات شیمیایی خوراک مورد آنالیز قرار گرفت (۲) و جیره بلدرچین‌های آزمایشی بر اساس توصیه‌های تغذیه‌ای مربوط به بلدرچین‌های ژاپنی گوشتی (۲۰) با استفاده از نرم افزار UFFDA متعادل گردید (جدول ۱). جیره‌های آزمایشی، آب تازه و سالم آشامیدنی به صورت آزاد و نامحدود در اختیار بلدرچین‌ها قرار داده شد. در انتهای دوره آزمایش تعداد ۲ قطعه بلدرچین از هر جایگاه آزمایشی انتخاب و پس از وزن کشی، ذبح و پرکنی، امعا و احشا داخل بدن بلدرچین‌ها تخلیه گردید و تفکیک لاشه صورت با ترازوی ۰/۰۱ گرفت. به منظور اندازه‌گیری تعیین کلسترول و تری‌گلیسیرید سرم خون از دستگاه طیف‌سنج نوری مدل Bichrom Libra با طول موج ۵۴۶ نانومتر و استفاده از کیت‌های زیست‌شیمی با روش آنزیمی رنگ‌سنجی استفاده گردید و غلظت آنها با استفاده از رابطه‌های ریاضی به صورت میلی‌گرم/دسی‌لیتر بیان شد. اندازه‌گیری HDL و LDL توسط دستگاه طیف‌سنج نوری با طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از کیت‌های تشخیصی پارس آزمون صورت گرفت. ارزیابی فعالیت سرمی آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) با استفاده از دستگاه آنالایزر خودکار با استفاده از کیت‌های تجاری پارس آزمون طبق دستورالعمل سازنده تعیین شد. به منظور ارزیابی فلور میکروبی روده و تخمین جمعیت باکتری‌های /شرشیاکلی، لاکتوباسیلوس و سالمونلا، یک گرم از نمونه‌های گوارشی روده جمع‌آوری شده با ۰/۰۹ درصد NaCl استریل تا ده برابر رقیق شد. به منظور انجام شمارش جمعیت باکتریایی سالمونلا /ینتریکا با استفاده از محیط MRS-Agar و روش انکوباسیون در محیط بی‌هوازی به مدت ۴۸ ساعت

اندازه‌گیری شد. طول و عرض پرزهای عمودی کامل از پنج پرز برای هر بلدرچین محاسبه شد. شمارش تعداد سلول‌های جامی از چهار پرز مشابه تعیین شد و تراکم آنها با واحد میلی‌متر مربع ذکر شد (۱۶). داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS ۹/۱ با رویه مدل خطی عمومی GLM آنالیز شدند (۲۰). مقایسه بین میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (۷) در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. مدل آماری طرح به شرح:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + e_{ijk}$$

بود که در آن Y_{ijk} مقدار هر مشاهده، μ : میانگین جامعه، α_i : اثر مکمل‌سازی جیره با گوانیدینواسیتیک‌اسید و e_{ijk} : اثر اشتباه در آزمایش، بود.

در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، شمارش باکتری‌های *اشرشیا کولی* انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت و دمای ۳۷ درجه سلسیوس و برای تعیین جمعیت کلونی باکتریایی *لاکتوباسیلوس* از محیط کشت MRS1-Agar به مدت ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس استفاده شد. پس از انکوباسیون، باکتری‌ها در ظروف پتری‌دیش شمارش شدند و با محاسبه باکتری‌ها در حجم اولیه و شمارش‌ها به صورت $\log^{10}$ واحد کلونی/گرم در هر گرم گزارش شد (۱۶). برای ارزیابی ریخت‌شناسی روده باریک، بخش‌های مختلف روده از تعداد ۲ قطعه بلدرچین ذبح شده از هر تکرار جدا شد و تجزیه و تحلیل بر روی مقاطع بافت هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شده گردید و ارتفاع پرز، عمق کریپت و سطح پرز

جدول ۱- درصد ترکیبات و محتوی مواد مغذی جیره آزمایشی مورد استفاده در بلدرچین‌های ژاپنی

Table 1. Percentage of ingredients and nutrient content of the experimental diet used in Japanese quails

Ration items ¹	Percent (%)
Corn kernels	52.94
Soybean meal	40.04
Vegetable oil	1.75
Fish powder	3.00
Calcium carbonate	1.09
Dicalcium phosphate	0.39
Salt	0.20
L-lysine	0.01
DL-methionine	0.08
Mineral and vitamin supplement ²	0.50
Calculated nutrients	
Metabolizable energy (kcal/kg)	2900
Crude protein (%)	24
Calcium (%)	2.5
Available phosphorus (%)	0.38
Sodium (%)	0.15
Methionine + Cysteine (%)	0.91
Lysine (%)	1.35
Threonine (%)	0.96

۱- جیره متعادل شده براساس NRC، ۱۹۹۴. هر کیلوگرم مکمل ویتامینه شامل ۱۱۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۲۳۰۰ واحد ویتامین D₃، ۲۲ واحد ویتامین E، ۲ میلی‌گرم ویتامین K₃، ۳ میلی‌گرم تیامین، ۴۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین، ۱۸ میلی‌گرم پانتوتنیک اسید، ۴ میلی‌گرم پیروکسیدین، ۰/۰۱۷ میلی‌گرم سیانوکوبالامین، ۶۵ میلی‌گرم نیاسین، ۰/۳ میلی‌گرم بیوتین، ۰/۰۷۵ میلی‌گرم فولیک اسید و ۶۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید بود. ۲- هر کیلوگرم مکمل معدنی شامل ۸ میلی‌گرم آهن، ۱۰۰ میلی‌گرم منیزیم، ۶۰ میلی‌گرم روی، ۸ میلی‌گرم مس، ۰/۵ میلی‌گرم ید و ۰/۱۵ میلی‌گرم سلنیوم بود.

1- Balanced diet based on NRC, 1994. ** Each kg of vitamin supplement contained 11,000 IU of vitamin A, 2,300 IU of vitamin D₃, 22 IU of vitamin E, 2 mg of vitamin K₃, 3 mg of thiamine, 40 mg of riboflavin, 18 mg of pantothenic acid, 4 mg of pyridoxine, 0.017 mg of cyanocobalamin, 65 mg of niacin, 0.3 mg of biotin, 0.075 mg of folic acid and 600 mg of choline chloride. 2- Each kg of mineral supplement contained 8 mg of iron, 100 mg of magnesium, 60 mg of zinc, 8 mg of copper, 0.5 mg of iodine and 0.15 mg of selenium.

نتایج

جمعیت میکروبی روده: جدول ۵ نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار جمعیت کلونی باکتری *لاکتوباسیلوس* تحت عنوان فلور میکروبی مناسب و در مقابل کاهش معنی‌دار جمعیت *سالمونلا* / *انتريکا* و *اشرشیا کلی* که به عنوان فلور مضر و بیماری‌زا در محیط روده طیور محسوب می‌گردند، تحت تاثیر مصرف سطوح مختلف گوانیدینواستیک‌اسید واقع شد ($p \leq 0/05$).
ریخت‌شناسی بافت روده: جدول ۶ نشان می‌دهد ارتفاع پرزها، عمق کریپت و سطح پرزهای روده نسبت به گروه کنترل تحت‌تاثیر مصرف گوانیدینو استیک‌اسید افزایش یافته است. بررسی تعداد و تراکم سلول‌های گابلت نشان‌دهنده افزایش تراکم سلول‌های گابلت با سطوح جیره‌های مکمل‌شده با گوانیدینو استیک‌اسید بود ($p \leq 0/05$).

صفات لاشه: جدول ۲ نشان می‌دهد با مصرف سطوح مختلف گوانیدینواستیک‌اسید وزن ران، سینه، بال و وزن چربی محوطه شکمی به طور معنی‌دار نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($p \leq 0/05$).
فراسنجه‌های شیمیایی سرم خون: جدول ۳ نشان می‌دهد که محتوی سرمی کلسترول، تری‌گلیسیرید و LDL در بلدرچین‌های مصرف‌کننده سطوح مختلف گوانیدینواستیک‌اسید به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p \leq 0/05$). همچنین نشانگر افزایش معنی‌دار میزان HDL تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی بود ($p \leq 0/05$).
فعالیت آنزیم‌های کبدی: فعالیت آنزیم‌های ALT و AST به عنوان یک شاخص مهم برای تعیین فعالیت و سلامت کبد، تحت‌تاثیر مصرف گوانیدینو استیک‌اسید به طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۴) ($p \leq 0/05$).

جدول ۲- اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر صفات لاشه در بلدرچین‌های ژاپنی

Table 2. Effect of experimental treatments on carcass traits in Japanese quails

Treatment	Supplementation (g/kg)	Thigh weight (g)	Wing weight (g)	Breast weight (g)	Abdominal fat (g)
Control	0	32.31d	7.71d	37.81c	1.85a
	0.5	33.45c	7.82c	39.42b	1.72b
Guanidine Acetic Acid	1	35.52b	7.92b	39.96b	1.64c
	1.5	36.14a	7.99a	40.11a	1.55d
SEM	-	0.014	0.002	0.016	0.029

تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف غیر مشترک نشان‌دهنده معنی‌داری است ($p \leq 0/05$), SEM (میانگین خطای استاندارد)

Differences between means in each column with different letters indicate significance ($p \leq 0.05$), SEM (The Standard Error of the Mean)

جدول ۳- اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون در بلدرچین‌های ژاپنی

Table 3. Effect of experimental treatments on serum biochemical parameters in Japanese quails

Treatment	Supplementation (g/kg)	Triglyceride (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
Control	0	259.32a	192.16a	102.16a	96.76a
	0.5	256.14b	184.24b	104.51b	94.45b
Guanidine Acetic Acid	1	250.26c	180.35c	105.36c	92.69c
	1.5	246.52d	176.44d	106.72d	90.14d
SEM	-	1.20	1.15	0.451	0.652

جدول ۴- اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر فعالیت آنزیم‌های کبدی در بلدرچین‌های ژاپنی

Table 4. Effect of experimental treatments on liver enzyme activity in Japanese quails

Treatment	Supplementation (g/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)
Control	0	36.8a	29.4a	95.6a
	0.5	34.5b	28.2b	94.2b
Guanidine Acetic Acid	1	33.2c	26.5c	92.4c
	1.5	30.7d	24.1d	82.1d
SEM	-	0.091	0.045	0.069

جدول ۵- اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر جمعیت میکروبی روده در بلدرچین‌های ژاپنی

Table 5. Effect of experimental treatments on intestinal microbial population in Japanese quails

Treatment	Supplementation (g/kg)	<i>E. coli</i> (Colony/g)	<i>Salmonella enterica</i> (Colony/g)	<i>Lactobacillus</i> (Colony/g)
Control	0	5.85a	5.71a	5.31d
	0.5	5.62b	5.40b	5.46c
Guanidine Acetic Acid	1	5.51b	5.16c	5.79b
	1.5	5.45b	5.02d	6.08a
SEM	-	0.008	0.011	0.009

جدول ۶- اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر ریخت‌شناسی روده در بلدرچین‌های ژاپنی

Table 6. Effect of experimental treatments on intestinal morphology in Japanese quails

Treatment	Supplementation (g/kg)	Villus height (μm)	Villus surface (μm)	Crypt depth (μm)	Number of goblet cells
Control	0	594.9d	0.594c	139.0d	10.8c
	0.5	601.2c	0.604b	143.5c	11.5b
Guanidine Acetic Acid	1	605.3b	0.604b	146.5b	12.1a
	1.5	608.5a	0.611a	148.4a	12.2a
SEM	-	1.54	0.002	0.045	0.014

بحث

گوآنیدینو استیک‌اسید بر سیستم کراتین-کراتین‌کیناز در بیوانرژیک سلولی اشاره شده است (۱). دیلگر و همکاران نشان دادند مکمل‌سازی جیره با گوآنیدینو استیک‌اسید می‌تواند با افزایش ذخایر کراتین به عنوان منبع انرژی سلولی و تامین آرژنین برای سنتز پروتئین و تکثیر سلولی می‌تواند سبب افزایش عملکرد و بهبود صفات کمی و کیفی لاشه طیور شود (۶). رینگل و همکاران بیان کردند افزودن سطوح مختلف گوآنیدینو استیک‌اسید به جیره با تاثیر بر بهبود و افزایش جریان فاکتور رشد شبه‌انسولین منجر به توانایی رشد سلول‌های ماهیچه‌ای و بهبود معنی‌دار اجزای لاشه ویژه ران و سینه در جوجه‌های گوشتی گردید (۲۴). همچنین توسنبرگر و همکاران نشان دادند مصرف گوآنیدینو استیک‌اسید سبب افزایش

پژوهش‌های اخیر نشان داده که ترکیب گوآنیدینو استیک‌اسید می‌تواند به طور موثری جایگزین آرژنین در جیره پرندگان شود و از آنجایی که این ترکیب دارای ثبات و پایداری بالای و قیمت پایینتر نسبت به مکمل‌های آرژنین و کراتین دارد به عنوان یک مکمل خوراکی موثر در تغذیه طیور مودر توجه قرار می‌گیرد. راعی و همکاران نشان دادند در جوجه‌های گوشتی و پرندگان دیگر با رشد سریع سیستم کراتین-کراتین فسفات در مدیریت انرژی بسیار حائز اهمیت است (۱۱، ۱۴). مکمل‌سازی جیره جوجه‌های گوشتی با ترکیب گوآنیدینو استیک‌اسید به دلیل سرعت رشد بالا و نیاز این پرندگان به منابع کراتینه جهت رشد سلول‌های ماهیچه‌ای بسیار مفید و سودمند است. طی مطالعه احمدی‌پور و همکاران بر اثرات مهم مکمل

وزن زنده، کاهش ضریب تبدیل غذایی، بهبود راندمان و کیفیت لاشه و افزایش وزن نسبی ماهیچه ران و سینه شد (۲۶). لیمه و همکاران نیز بیان داشتند که استفاده از گوانیدینواستات به میزان ۰/۶ و ۱/۲ گرم/کیلوگرم خوراک جوجه‌های گوشتی تأثیر معناداری بر روی وزن گوشت سینه داشت که برای نرها و ماده‌ها بهترین وزن گوشت سینه را ایجاد نمود (۱۵). گوانیدینواستیک اسید پس از مصرف از طریق کلیه‌ها جذب و توسط گردش خون به کبد رسیده و در کبد با اس-آدنوزیل متیونین واکنش نشان می‌دهد تا کراتین تولید کند. کراتین در گردش خون پخش می‌شود و یک سیستم اسید فسفریک را با کراتین فسفات تشکیل می‌دهد (۱۷، ۱۸). هنگامی که عرضه ATP کافی نیست، کراتین فسفات به سرعت یک گروه اسید فسفریک را به ADP منتقل می‌کند و ATP را بازسازی می‌کند. هیدرولیز ATP انرژی بیشتری را آزاد می‌کند که مستقیم‌ترین منبع انرژی موجود در ارگانیسم است. بنابراین، اضافه کردن گوانیدینواستیک اسید می‌تواند موجب افزایش ذخیره انرژی و متابولیسم بدن بلدرچین‌های ژاپنی شود (۱). ابراهیمی و همکاران نشان دادند مصرف مکمل‌های کراتینه سبب تأثیر بهتر آرژنین بر هورمون‌های تیروئیدی و کاهش غلظت پلاسمایی کلسترول و تری‌گلیسیرید می‌گردد (۸) همچنین نصیرالاسلامی و همکاران بیان کردند مصرف مکمل گوانیدینواستیک اسید سبب ایجاد تغییرات معنی‌دار بر غلظت سرمی کلسترول و تری‌گلیسیرید شد (۱۹). مطالعه درمان کوهی و همکاران نشان داد مصرف مصرف سطوح مختلف گوانیدینواستیک اسید در جیره بلدرچین‌های گوشتی سبب کاهش میزان سرمی کلسترول، تری‌گلیسیرید و LDL و متعاقباً افزایش HDL شد (۴). فوآد و همکاران نشان دادند مصرف مکمل‌های آرژنین نظیر گوانیدینواستیک اسید در جیره سبب کاهش بیان ژن

آنزیم اسید چرب سنتتاز کبدی و نهایتاً منجر به کاهش تری‌گلیسیرید پلاسما می‌شود (۱۱). کاهش فعالیت آنزیم اسید چرب سنتتاز کبدی منجر به کاهش قابلیت دسترسی اسیدهای چرب برای استریفیه شدن به تری‌گلیسیرید می‌شود و آنزیم ۳ هیدروکسی ۳ متیل گلو تاریل کوآ ردوکتاز که یک آنزیم حیاتی در بیوسنتز کلسترول می‌باشد با کاهش بیان ژن این آنزیم سبب کاهش میزان تری‌گلیسیرید و کلسترول خون می‌شود (۱، ۱۴). مطالعات راعی و همکاران نشان داد مصرف گوانیدینواستیک اسید در سطوح ۰/۶، ۱/۲ و ۱/۸ گرم در کیلوگرم) سبب کاهش ضخامت موکوس، افزایش سطح و افزایش طول ویلی، کاهش عمق کریپت و افزایش نسبت ویلی/کریپت در جوجه‌های آزمایشی شد (۲۳). توسنبرگ و همکاران بیان کردند مصرف مکمل گوانیدینواستیک اسید سبب افزایش ارتفاع و سطح پرزها، عمق کریپت، افزایش تعداد سلول‌های گابلت و بهبود وضعیت فلور میکروبی روده شد که احتمالاً به دلیل تأثیر گوانیدینواستیک اسید بر تغییر مثبت فلور میکروبی می‌باشد (۲۶).

نتیجه‌گیری

یافته‌ها نشان داد که صفات لاشه به صورت مثبت تحت تأثیر پاسخ به مکمل‌سازی با گوانیدینواستیک-اسید قرار گرفتند. همچنین محتوی سرمی فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون نظیر کلسترول و تری‌گلیسیرید و LDL تحت تأثیر مصرف گوانیدینواستیک اسید کاهش یافت. مصرف سطوح مختلف گوانیدینواستیک اسید سبب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های کبدی به عنوان شاخص مهم در تعیین وضعیت سلامت فعالیت کبد شد. همچنین نتایج نشان داد مصرف گوانیدینواستیک اسید در سطوح ۰/۰۵، ۱ و ۱/۵ گرم/کیلوگرم جیره بلدرچین‌های ژاپنی سبب کاهش جمعیت میکروبی

parameters, thyroid hormones, mortality and performance of broilers with cold-induced ascites. *Research Journal of Livestock Science*, 107:195-206.

10. Fernandes, J.I.M., Murakami, A.E., Martins, E.N., Sakamoto, M.I., Garcia, E. R.M. 2009. Effect of arginine on the development of the pectoralis muscle and the diameter and the protein: deoxyribonucleic acid rate of its skeletal myofibers in broilers. *Poultry Science*, 88:1399-1406.

11. Fouad, A.M., El-Senousey, H.K., Yang, X.J., Yao, H. 2013. Dietary L-arginine supplementation reduces abdominal fat content by modulating lipid metabolism in broiler chickens. *Animal*, 7:1239-1245.

12. Halle, I., M. Henning and P. Kohler. 2006. Studies of the effects of creatine on performance of laying hens, on growth and carcass quality of broilers. *Landbauforschung Volkenrode*, 56:11-18.

13. Khalil, S., Saenbungkhor, N., Kesnava, K., Sivapirunthep, P., Sitthigripong, R., Jumanee, S., Chaosap, C. 2021. Effects of guanidinoacetic acid Supplementation on Productive performance, pectoral myopathies, and meat quality of broiler chickens. *Animals*, 11(11):3180.

14. Khajali, F., Wideman R.F. 2010. Dietary arginine: Metabolic, environmental, immunological and physiological interrelationships. *World's Poultry Science Journal*, 66: 751-766.

15. Lemme, A., Ringel, J., Rostagno, H.S., Redshaw, M.S. 2007. Supplemental guanidino acetic acid improved feed conversion, weight gain, and breast meat yield in male and female broilers. *16th European Symposium on Poultry Nutrition*, pp:26-30.

16. Lev, R., Spicer, S.S. 1964. Specific staining of sulphate groups with Alcian blue at low pH. *Journal of Histochemical and Cytochemistry*, 12:309-310.

مضر روده و بهبود صفات ریخت‌شناسی روده باریک
بلدرچین‌های ژاپنی تحت مطالعه شد.

منابع

1. Ahmadipour, B., Khajali, F., Sharifi, M.R. 2018. Effect of guanidinoacetic acid supplementation on growth performance and gut morphology in broiler chickens. *Poultry Science Journal*, 6:19-24.

2. Al-Daraji, H.J., Salih, A.M. 2012. Effect of dietary L-arginine on carcass traits of broilers. *Animal Veterinary Science*, 2:40-44.

3. AOAC. 2005. Official methods of analysis, Association of official analytical chemists. AOAC Press, Gaithersburg, USA.

4. Darmankohi, H., Tavakoli, P., Mohit, A., Mohammadpour, F. 2017. Effects of dietary supplementation of Guanidino acetic acid and L-arginine on performance, blood metabolites and carcass characteristics of Japanese quails. *Animal Production Research*, 8.9.2:1-10.

5. Davis, S.L. 2011. Plasma levels of prolactin, growth hormone, and insulin in sheep following the infusion of arginine, leucine and phenylalanine. *Endocrinology*, 91:549-555.

6. Dilger, R.N., Bryant-Angeloni, K., Payne, R.L., Lemme, A., Parsons, C.M. 2013. Dietary guanidino acetic acid is an efficacious replacement for arginine for young chicks. *Poultry Science*, 92:171-177.

7. Duncan, D.B. 1995. Multiple range test and F-test. *Biometrics*, 11:1-42.

8. Ebrahimi, M., Zare, A., Shivazad, M., Ansari Pirsaraei, Z., Tebyanian, M., Adib Moradi, M., nourijelyani, K. 2015. The Effects of L-arginine Supplement on Growth, Meat Production, and Fat Deposition in Broiler Chickens. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 5(4):281-290.

9. Fathi, M. 2015. Effects of L-Arginine levels supplementation on some blood

- nutrient retention and serum profile responses of laying Japanese quails to increasing addition levels of dietary guanidinoacetic acid. *Italian Journal of Animal Science*, 19(1):75-85.
24. Ringel, J., Lemme, A., Araujo, L.F. 2008. The effect of supplemental guanidinoacetic acid in Brazilian type broiler diets at summer conditions. *Poultry Science*, 87:154.
25. SAS Institute. 2001. SAS.STAT user's guide for personal computer. Release 6.12 SAS Institute, Inc., Cary, N.C., USA.
26. Tossenberger, J., Rademacher, M., Nemeth, K., Halas, V., Lemme, A. 2016. Digestibility and metabolism of dietary guanidinoacetic acid fed to broilers. *Poultry Science*, 95:2058-2067.
27. Vali N. 2008. The Japanese quail. A Review. *International Journal of Poultry Science*, 7:925-931.
28. Wang, L., Shi, B., Shan, A., Zhang, Y. 2012. Effects of guanidinoacetic acid on growth performance, meat quality and antioxidation in growing-finishing pigs. *Journal of Animal Veterinary Advances*, 11:631-636.
29. Wu, L.Y., Fang, Y.J., Guo, X.Y. 2011. Dietary L-arginine supplementation beneficially regulates body fat deposition of meat type ducks. *British Poultry Science*, 52: 221-226.
30. Wyss, M., Kaddurah-Daouk, R. 2000. Creatine and creatinine metabolism. *Physiological Review*, 80:1107-1213.
17. Michiels, J., Maertens, L., Buyse, J., Lemme, A., Rademacher, M., Dierick, N.A. De Smet, S. 2012. Supplementation of guanidinoacetic acid to broiler diets: Effects on performance, carcass characteristics, meat quality, and energy metabolism. *Poultry Science*, 91:402-412.
18. Mousavi, S.N., Afsar, A., Lotfollahian, H. 2013. Effects of guanidinoacetic acid supplementation to broiler diets with varying energy contents. *Poultry Science*, 22:47-54.
19. Nasiroleslami, M., Torki, M., Saki, A.A., Abdolmohammadi A.R. 2018. Effects of dietary guanidinoacetic acid and betaine supplementation on performance, blood biochemical parameters and antioxidant status of broilers subjected to cold stress. *Journal of Applied Animal Research*, 46:1016-1022
20. NRC., National Research Council. 1994. Nutrient requirements of poultry. 9th Rev.Ed., Washington, DC. National Academy Press.
21. Ostojic, S.M. 2015. Advanced physiological roles of guanidinoacetic acid. *European Journal of Nutrition*, 54:1211-1215.
22. Rahimian, Y., Kheiri, F., Faghani, M. 2024. Evaluation the effect of dietary vitamin E, sesamin and thymoquinone bioactive compounds on immunological response, intestinal traits and MUC-2 gene expression in broiler Japanese quails (*Coturnix japonica*). *Animal Biotechnology*, 35(1):1-11.
23. Raei, A., Karimi, A., Sadeghi, A. 2019. Performance, antioxidant status,

Research Article

Study of Secretory Urography and Anatomy of the Urinary Tract in Sarabi Dog

Sajad Khoda ve Ghanon¹, Siamak Alizadeh^{2*}, Moahammadreza Hosseini¹

1. Department of Veterinary, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

2. Department of Veterinary, Naghadeh Branch, Islamic Azad University, Naghadeh, Iran

*Corresponding author: s_alizadeh01@yahoo.com

Received: 28 September 2024

Accepted: 25 December 2024

DOI: 10.60833/ascij.2025.1185340

Abstract

Secretory urography is a method for imaging the kidneys, ureters, and bladder, which uses iodinated contrast media. The aim of this study was the anatomical examination of the kidneys, ureters and bladder of the Sarabi dog, so that these findings can be used in the interpretation of clinical results and decisions. The current study used 10 Sarabi dogs (5 males and 5 females) with an average age of 3.2 ± 0.11 years and a mean weight of 79.7 ± 0.37 kg. Following the intravenous administration of meglumine compound 60% with a dose of 850 mgI/kg, radiographs were performed in lateral and ventro-dorsal recumbency. The length of the second vertebral lumbar body was measured to be used as an index in determining the size of the kidneys. Based on the obtained results, both kidneys of Sarabi dogs were bean-shaped and their dorsal and ventral surfaces were convex. The right kidney was located in the margins of the caudal vena cava. The left kidney was located next to the aorta and had more peritoneal covering than the right kidney. The bladder was completely covered with peritoneum, and the neck of the bladder was close to the front edge of the pubic bone, and the body of the vertex area was located next to the navel of the animal. The mean ratio of the length, width, and thickness of the left kidney and the ratio of the left ureter length to the length of the second vertebral lumbar body were 2.87, 1.34, 1.19 and 6.97 cm, and the same ratio in the right kidney were 3.00, 1.33, 1.25 and 8.96 cm, respectively. Based on the findings of the present study, the anatomical structure of the urinary system of the Sarabi dog is similar to other dog breeds. The findings of this study can be used in the interpretation of the results and clinical decisions to determine the normal and abnormal size of kidneys, ureters and bladder in Sarabi dogs.

Keywords: Secretory urography, Anatomy, Sarabi dog, Urinary system, Meglumine compound.

مطالعه اوروگرافی ترشچی و آناتومی دستگاه ادراری در سگ سرابی

سجاد خدا و قانون^۱، سیامک علیزاده^{۲*}، محمدرضا حسینی^۱

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

۲- گروه دامپزشکی، واحد نقده، دانشگاه آزاد اسلامی، نقده، ایران

*مسئول مکاتبات: s_alizadeh01@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۷

DOI: 10.60833/ascij.2025.1185340

چکیده

اوروگرافی ترشچی روشی برای تصویربرداری از کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه است که در آن از مواد حاجبی که حاوی ترکیبات یددار است، استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی تشریحی کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه سگ نژاد سرابی بود تا از این یافته‌ها در تفسیر نتایج و تصمیم‌گیری‌های بالینی استفاده شود. در این مطالعه از ۱۰ قلابه سگ سرابی (۵ نر و ۵ ماده) با میانگین سنی ۰/۱۱ ± ۳/۲ سال و میانگین وزنی ۰/۳۷ ± ۷۹/۷ کیلوگرم استفاده شد. متعاقب تجویز وریدی ترکیب مگلو مین ۶۰ درصد با دوز ۸۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم رادیوگرافی در حالت‌گماری‌های جانبی و شکمی-پشتی انجام گرفت. در رادیوگراف‌های جانبی طول بدنه دومین مهره کمری اندازه‌گیری شد تا از آن به عنوان شاخصی در تعیین اندازه کلیه‌ها استفاده شود. بر اساس نتایج بدست آمده هر دو کلیه سگ سرابی لوبیایی شکل و سطوح پشتی (دورسال) و شکمی (ونترال) آن‌ها محدب بودند. کلیه راست در موازات بزرگ سیاهرگ زیرین قرار داشت. کلیه چپ به موازات آئورت بوده و نسبت به کلیه راست از پوشش صفاقی بیشتری برخوردار بود. سطوح پشتی کلیه سمت چپ در تماس با عضلات زیر کمری بود. مثانه به طور کامل با صفاق پوشیده شده بود و گردن مثانه در مجاورت لبه‌ی قدامی استخوان عانه قرار داشت و بدنه ناحیه ورتکس نیز در کنار ناف حیوان واقع شده بود. میانگین نسبت طول، عرض و ضخامت کلیه سمت چپ و نسبت طول حالب سمت چپ به طول بدنه دومین مهره‌ی کمری در سگ‌های سرابی به ترتیب ۲/۸۷، ۱/۳۴، ۱/۱۹ و ۶/۹۷ سانتی‌متر بوده و همین نسبت در کلیه سمت راست به ترتیب ۳/۰۰، ۱/۳۳، ۱/۲۵ و ۸/۹۶ سانتی‌متر بود. بر اساس نتایج مطالعه حاضر ساختار آناتومیک سیستم ادراری سگ سرابی مشابه سایر نژادهای سگ می‌باشد. یافته‌های این مطالعه می‌تواند در تفسیر نتایج و تصمیم‌گیری‌های بالینی برای تعیین اندازه طبیعی و غیرطبیعی کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه در سگ‌های سرابی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: اوروگرافی ترشچی، آناتومی، سگ سرابی، سیستم ادراری، مگلو مین.

مقدمه

منشأ آن، شهر سراب در آذربایجان ایران است (۲۸). ماستیف ایرانی آرام، کنترل شده، مستقل، قدرتمند و محافظ است. وزن این نژاد از سگ در نرها بین ۷۰ تا ۱۰۰ کیلوگرم و ماده‌ها ۶۰ تا ۸۰ کیلوگرم است. ارتفاع جنس نر بین ۷۰ تا ۱۰۰ سانتی‌متر و ماده‌ها بین

سگ سرابی یا ماستیف ایرانی (Persian Mastiff) از نژاد سگ‌های ایرانی بزرگ اندام است (۲). ظاهر این سگ به سگ کانگال شباهت‌هایی دارد اما سگ سرابی از لحاظ جثه کمی بزرگتر از سگ کانگال است (۲۴). سگ سرابی از سگ‌های نژاد بزرگ ایران هست که

۶۰ تا ۸۵ سانتی‌متر است (۳). دستگاه ادراری سگ‌ها متشکل از دو کلیه‌ی لوبیایی شکل، دو حالب، یک مثانه و یک مجرای خروجی ادرار می‌باشد (۱۴). کلیه‌ها به رنگ صورتی متمایل به قرمز بوده و در فضای رتروپریتونال قرار داشته و در قسمت خلفی محوطه شکمی در طرفین ستون مهره‌ها جای می‌گیرند. کلیه‌ها مواد زائد نیتروژنی را دفع کرده، حجم و ترکیب مایعات بدن را با فیلتراسیون، بازجذب مجدد آب و مواد محلول تصفیه شده و ترشح الکترولیت‌ها تنظیم می‌کنند (۱۹). حالب‌ها وظیفه هدایت ادرار از کلیه‌ها به طرف مثانه را بر عهده دارند و در نهایت مثانه ادرار را ذخیره و از راه مجرای خروجی ادرار دفع می‌کند. حالب مجرای باریکی است که از ناف کلیه تا مثانه ادامه می‌یابد. حالب‌ها در طرف خط میانی بدن و در قسمت پشتی شکم قرار دارند. هر حالب توسط چینی از صفاق احشایی به نام مزوپیوروتر از دیواره‌ی پشتی بدن آویزان می‌باشد (۲۵). مطالعات آناتومیکی محققین مختلف نشان می‌دهد که میانگین وزن کلیه چپ و راست در سگ‌های نژاد متوسط حدود ۴۰/۳ گرم بوده و متوسط طول، عرض و ضخامت کلیه راست به ترتیب ۵۲/۲۲، ۲۰/۴۰ و ۲۶/۵۹ میلی‌متر و حجم آن ۲۸/۲۲ سانتی‌متر مکعب بوده و همین مقادیر برای کلیه چپ به ترتیب ۲۸/۲۹، ۱۹/۹۵ و ۲۶/۵۵ میلی‌متر و ۲۸/۵۵ سانتی‌متر مکعب می‌باشد. میانگین عرض بخش قشری و میانی کلیه راست به ترتیب ۶/۴ و ۶/۵ میلی‌متر و ۶/۸ و ۶/۶ میلی‌متر میلی‌متر می‌باشد (۶۸). مطالعات اولتراسونوگرافی در این زمینه نیز نشان می‌دهد که هر یک از کلیه‌ها واجد یک بخش قشری خارجی و یک بخش میانی داخلی بوده که هر دو توسط پاپیلای کلیه ختم می‌شوند (۲۱). اوروگرافی ترشحي روشی برای تصویربرداری از کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه است که در

آن از مواد حاجبی که حاوی ترکیبات یددار است، استفاده می‌شود. در صورتی که این مواد حاجب به صورت تزریقی مورد استفاده قرار گیرند؛ از طریق جریان خون وارد شبکه گلوومرولی شده و از طریق کلیه‌ها فیلتره شده و بدین ترتیب در بافت کلیه تجمع یافته و سبب روشن تر دیده شدن بافت پارانشیم کلیه، مجاری ادراری، حالب‌ها و مثانه می‌شوند. در این روش تصاویر ایجاد شده به وسیله اشعه ایکس به رادیولوژیست کمک می‌کند تا آناتومی و عملکرد کلیه‌ها، حالب و مثانه را به خوبی بررسی نماید (۲۷). اوروگرافی داخل وریدی اصلی‌ترین روش رادیولوژی اکتشافی است که امکان ارزیابی ریخت‌شناسی و عملکردی اندام‌های ادراری را فراهم می‌کند (۴، ۹). در مطالعه‌ای که در رابطه با اوروگرافی سگ‌های بالغ صورت گرفته گزارش شده است طول کلیه‌ها در نمای شکمی-پشتی ۲/۹۸ برابر طول دومین مهره کمری بوده و در نمای جانبی ۲/۷۹ برابر آن بوده است. در این مطالعه گزارش شده است که در رابطه با نسبت طول کلیه به دومین مهره کمری در بین سگ‌های دالیکوسفالیک و مزاتیسفالیک تفاوت معنی داری وجود دارد به عبارتی نسبت طول کلیه‌ها به طول دومین مهره کمری در نژادهای مختلف سگ متفاوت می‌باشد (۲۲). مطالعه‌ای دیگری نشان می‌دهد که ۵ دقیقه بعد تزریق زیرجلدی ماده حاجب یددار به سنجاب ایرانی، کلیه‌ها به صورت مشخص در رادیوگراف‌های جانبی و شکمی-پشتی قابل رویت بوده و کلیه‌ها لوبیایی شکل بوند. کلیه راست در مقایسه با کلیه چپ جلوتر بوده و در محازات مهره‌های اول تا سوم کمری بوده و کلیه چپ هم در محازات مهره‌های سوم تا پنجم کمری قرار داشتند. اندازه کلیه‌ها دوبرابر طول بدنه دومین مهره کمری بودند. مثانه متسع شده به شکل گلابی بوده و تا پنجمین مهره کمری نیز می‌رسید. در این مطالعه فاز

بین‌المللی کمیته اخلاق انجام شده است (۳۰). مراقبت از تک‌تک حیوانات این مطالعه با کد ثبتی IR.IAU.URMIA.REC.1403.084 در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه ثبت شده است.

طرح مطالعه و حیوانات: در این مطالعه توصیفی مقطعی از ۱۰ قلاده سگ سرابی (۵ نر و ۵ ماده) با میانگین سنی $0/11 \pm 3/2$ سال و میانگین وزنی $0/37 \pm 79/7$ کیلوگرم که مطابق با معیارهای پژوهش، سالم تشخیص داده شدند استفاده شد. در حیوانات تحت مطالعه آزمایشات خونی ۷ روز قبل از مطالعه انجام شد (۱۱).

روش کار: قبل از تجویز ماده حاجب، به هر یک از سگ‌ها ۱۸-۲۴ ساعت محرومیت از غذا و ۶ ساعت محرومیت از مصرف آب داده شد و ۶ ساعت قبل از آن نیز داروی دایمیتیکون (شرکت چینگرت، چین) با دوز ۱۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی تجویز گردید. در هنگام تجویز ماده حاجب برای تسکین حیوان و گرفتن رادیوگراف‌هایی با کیفیت مناسب، داروی رامپون (شرکت دام‌ایران، ایران) با دوز ۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و دیازپام (شرکت شیمی دارو، ایران) با دوز ۰/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت عضلانی تزریق گردید.

پردازش و تکنیک رادیوگرافی: ابتدا رادیوگراف‌هایی ساده با حالت‌گماری‌های جانبی چپ و راست، شکمی-پشتی و پشتی-شکمی تهیه شدند. سپس ماده حاجب مگلو مین کامپند ۶۰ درصد (شرکت بایره‌سپانیا، آلمان) با دوز ۸۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به طور آهسته به ورید سفالیک تزریق گردید (۱۸). متعاقب تزریق ماده حاجب، رادیوگرافی در حالت‌گماری‌های جانبی چپ و راست، شکمی-پشتی و پشتی-شکمی در دقایق صفر، یک و پنج انجام گرفت و سپس این عمل هر ۵

پیلوگرام، فاز اوروتروگرامو فاز سیستوگرام به ترتیب ۲۰ الی ۲۳۰ دقیقه، ۶۰ الی ۲۳۰ دقیقه و ۲۵ الی ۲۳۴ دقیقه بعد از تجویز ماده حاجب مشاهده گردیده است (۳۱). در مطالعه‌ای که اوروگرافی ترشچی در گربه‌ها و کوالاها صورت گرفته نشان می‌دهد که در دقایق ۵ الی ۹۰ فازهای نفروگرام، پیلوگرام و سیستوگرام قابل مشاهده بوده و اندازه کلیه چپ هم $2/6$ برابر دومین مهره کمری بوده است (۱، ۷). در مطالعه‌ی دیگری گزارش گردیده است که اوروگرافی ترشچی در خرگوش برای ارزیابی آناتومی کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه روش مناسبی بوده و بر اساس این تحقیق کلیه راست خرگوش در محازات بین سیزدهمین مهره پشت و دومین مهره کمری و کلیه چپ هم در محازات بین دومین و چهارمین مهره کمری قرار دارد (۹). با روش اوروگرافی می‌توان برخی از اختلالات و ناهنجاری‌های سیستم ادراری نظیر سنگ‌های کلیوی، وجود پارگی در مجاری ادراری، تومورها یا توده‌های مربوط به کلیه، حالب‌ها و مثانه، تأثیرات جراحی بر سیستم ادراری، مشکلات مادرزادی سیستم ادراری مثل حالب نابجا و غیره را تشخیص داد (۱۵). با توجه به اینکه تا کنون تحقیقی در خصوص ارزیابی سیستم ادراری به روش اوروگرافی با تزریق داخل وریدی ماده حاجب در سگ‌های سرابی انجام نگرفته است، هدف این مطالعه، ارزیابی ساختارهای آناتومیک سیستم ادراری در فازهای نفروگرام و پیلوگرام بوده و همچنین تعیین اندازه‌ای دقیق برای اندازه کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه در سگ‌های سرابی بود تا در تفسیر نتایج و تصمیم‌گیری‌های بالینی برای تعیین اندازه طبیعی و غیرطبیعی این ارگان‌ها استفاده شود.

مواد و روش‌ها

ملاحظات اخلاقی: تمامی تحقیقات انجام گرفته در این مطالعه بر اساس دستورالعمل‌های انجمن

درصد هالتان در اکسیژن در یک سیستم بسته دستگاه بی‌هوشی استنشاقی ادامه یافت. پس از آماده‌سازی موضع جراحی، برشی در خط وسط شکم از ناحیه زایفونید تا لیگامنت پیش عانه‌ای بر روی پوست، بافت‌های زیرجلدی و خط سفید داده شد. بعد از انجام مطالعات آناتومیکی سیستم ادراری، شکاف لاپاراتومی به روش مرسوم بسته شد و مراقبت‌های بعد از عمل نیز اعمال گردید.

آنالیز آماری: برای تعیین اندازه طبیعی قسمت‌های مختلف سیستم ادراری سگ سرابی از تکنیک Confidence Interval و برای تجزیه و تحلیل داده‌های پارامتریک از آزمون t زوج (Paired t -test) با کمک نرم افزار SPSS ویرایش ۲۱ استفاده شد. همه مقادیر به عنوان میانگین و انحراف معیار بیان شده و $P \leq 0.05$ معنی‌دار و حدود اطمینان ۹۵٪ در نظر گرفته شد.

نتایج

مطالعات رادیولوژی با ماده حاجب: در همه سگ‌های تحت مطالعه در دقیقه صفر ماده حاجب در عروق کلیوی دیده شد به عبارتی ماده حاجب در گلوبول‌های کلیوی پخش گردیده و دانسته کلیه‌ها افزایش یافته بودند و وضوح تصویر کلیه‌ها در رادیوگراف بیشتر شده بود که در واقع نمایان شدن فاز نفروگرام بود و در دقایق بعدی ماده حاجب از کپسول بومن به داخل لوله‌های هنله فیلتر شده و وارد لگنچه شده و بعد به حالب‌ها و مثانه رسیده بود که نشان‌دهنده فاز پیلوگرام بود. در تمامی حیوانات تحت مطالعه تا دقیقه ۱۵ هم فاز نفروگرام و هم فاز پیلوگرام دیده شدند که نشان دهنده عملکرد نرمال کلیه‌ها بودند. مطالعه اوروگرافی ترشچی در سگ‌های سرابی در حالت گماری‌های جانبی و شکمی-پشتی انجام گردید. در این مطالعه مشخص گردید که کلیه

دقیقه یکبار تا دقیقه ۶۰ ادامه یافت تا فاز پیلوگرام پایان یابد و رادیوگراف‌هایی با تصاویر مناسب از سیستم ادراری به دست آید. دستگاه رادیولوژی که برای این منظور استفاده شد از نوع دیجیتال DDR مدل GXR-SD 152 (Varian N.V. Co, Made in South Korea) بود. فاصله کانونی فیلم ۱۰۰ سانتی‌متر و پیک کیلوولتاژ و میلی‌آمپر ثانیه نیز به ترتیب ۱۱۲ و ۵۰ در نظر گرفته شد. دکتور مورد استفاده از نوع فلتپنل SCI با سایز ۲۴ در ۳۰ سانتی‌متر بوده و نرم افزار مورد استفاده برای پردازش تصاویر و اندازه‌گیری ساختارهای بافتی Varian و Drgem بود.

تعیین اندازه طول بدنه دومین مهره کمری: از آنجایی که برای ارزیابی اندازه کلیه‌ها از اندازه بدنه دومین مهره کمری استفاده می‌شود (۲۹)، از این‌رو در رادیوگراف‌های جانبی هر یک از سگ‌های سرابی، طول بدنه دومین مهره کمری اندازه‌گیری شد تا از آن به عنوان شاخصی در تعیین اندازه نرمال کلیه‌ها استفاده شود.

انجام لاپاراتومی اکتشافی برای مطالعات آناتومیکی: ده روز بعد از اوروگرافی ترشچی، برای انجام مطالعات آناتومیکی کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه سگ‌های تحت مطالعه، اقدام به عمل لاپاراتومی اکتشافی شد. در واقع هدف از عمل لاپاراتومی اکتشافی بررسی کلیه‌ها (اندازه‌گیری طول، عرض و ضخامت) و حالب‌ها (اندازه‌گیری طول و ضخامت) بود. برای این منظور ۱۲ ساعت قبل از عمل به هر سگ محدودیت غذایی اعمال شد و علائم بالینی هر حیوان یک ساعت پیش از شروع عمل ثبت گردید. پیش بی‌هوشی با تزریق وریدی آسه‌پرومازین با دوز ۰/۲ میلی-گرم/کیلوگرم به صورت داخل عضلانی انجام شد و ۲۰ دقیقه بعد القایی‌هوشی با تزریق وریدی ۲/۵ درصد تیوپنتال سدیم با دوز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم انجام گرفت. نگهداری بی‌هوشی با مخلوط ۱-۱/۵

راست از محازات قسمت خلفی سیزدهمین مهره پشت تا انتهای سومین مهره‌ی کمری قرار داشته و کلیه سمت چپ نیز در محازات مهره‌های دوم تا چهارم کمری قرار داشت. البته در تمامی موارد کلیه‌ی چپ نسبت به کلیه راست تا حدودی پایین‌تر قرار گرفته بود. در بررسی نفروگرام‌های جانبی مشخص گردید که کلیه سمت چپ نسبت به کلیه راست در موقعیت خلفی-شکمی قرار گرفته و ناف کلیه‌ها نیز به سمت داخل قرار داشتند. در نفروگرام‌های تهیه شده در دقیقه صفر پس از تجویز ماده حاجب در حالت‌گماری‌های جانبی و شکمی-پشتی، کلیه‌ها به صورت ساختارهای بافت نرم متراکمی قابل رویت شدند که این کلیه‌ها مرزهای مشخصی را نسبت به ساختارهای مجاور نشان می‌دادند. در نفروگرام شکمی-پشتی، مرز بین قسمت‌های قشری و مدولای بافت پارانشیم کلیه قابل تشخیص بود در حالیکه این مرز در نفروگرام جانبی غیر قابل تشخیص بود (شکل ۳). در دقیقه پنجم اوراگرافی ترشچی، در نفروگرام‌های شکمی-پشتی و جانبی، لگنچه‌ی کلیه‌ها به همراه مقداری از قسمتی و نترال حالب‌ها مشاهده شد که در واقع فاز پیلوگرافی بود (شکل ۴) و در دقیقه ۱۰، حالب مشخص شد که حالب سمت چپ نسبت به حالب سمت راست مرز مشخص‌تری از بافت‌های اطراف داشت. متعاقب ۲۰ دقیقه بعد از تزریق ماده حاجب، مثانه با ماده حاجب پر شد و تقریباً به شکل گلابی مشاهده گردید که در واقع مرحله سیستوگرافی بود. در هر دو رادیوگراف جانبی و شکمی-پشتی بدنه و گردن مثانه به طور کامل مشخص بودند. مثانه اتساع یافته در قسمت خلفی شکم قرار داشته و قدام مثانه در محازات انتهای خلفی ششمین مهری کمر قرار داشت (شکل ۵). از نظر مورفولوژی اندازه کرانیوکودال کلیه سمت چپ نسبت به کلیه سمت راست طولی‌تر بود و عرض آن نیز

بیشتر بود و ناف کلیه چپ قطر بیشتری نسبت به کلیه راست داشت (جداول ۲ و ۳). طول، عرض، ضخامت کلیه‌های سمت راست و چپ، طول حالب‌ها نیز به در مقایسه با اندازه کرانیوکودال طول بدنه دومین مهره کمری در جداول ۴ و ۵ درج شده است.

مطالعات آناتومی: در بررسی‌های آناتومیکی مشخص گردید که هر دو کلیه سگ‌های سرابی لوبیای شکل بوده و سطوح دورسال و و نترال هر یک از این کلیه‌ها محدب بوده و این تحدب در سطح پروگزیمال آنها قدری کمتر بود و سطح و نترال نیز گردتر دیده می‌شد. سطح بیرونی کلیه‌ها صاف و به رنگ قهوه‌ای مایل به تیره بود. کلیه‌ها در ناحیه‌ی زیر کمر و به صورت خارج صفاقی قرار داشتند. کلیه چپ در محازات آئورت و کلیه راست در محازات ورید اجوف خلفی قرار داشت. کلیه سمت راست در سگ‌های تحت مطالعه در مجاورت بدنه‌های سه مهره اول کمری و در یک مورد کمی جلوتر و در کنار بدنه سیزدهمین مهره پشت قرار داشت. قطب قدامی کلیه راست در گودی کلیوی بر روی لب کودال کبد قرار گرفته بود و قطب خلفی کلیه راست از سطح دورسال در تماس با عضله زیرکمری و از سطح و نترال با شاخه راست پانکراس و دوازدهه در ارتباط بود (شکل ۱). بر اساس نتایج به دست آمده کلیه سمت چپ سگ‌های سرابی تا حدودی از لحاظ محل قرارگیری ثابت نبود و نسبت به کلیه راست از پوشش صفاقی بیشتری برخوردار بود. در مواردی که معده حیوان پر بود، کلیه چپ حیوان تا حدودی به سمت عقب کشیده شد بود به طوری که انتهای قدامی این کلیه در محازات انتهای خلفی کلیه سمت راست قرار داشت. سطوح دورسال کلیه‌های سمت چپ در تماس با عضلات زیر کمر قرار داشته و سطوح شکمی آنها نیز در تماس با کولون نزولی بود. لبه‌ی جانبی این کلیه‌ها با طحال و تهیگاه سمت چپ تماس بود و قطب قدامی آنها نیز

در ارتباط با معده و انتهای سمت چپ پانکراس بود. ناف کلیه‌ها در قسمت میانی لبه داخلی‌شان قرار داشتند که این قسمت در ارتباط با عروق، اعصاب و حالب‌ها بود. در واقع هر حالب در امتداد لگنچه قرار داشته و از آن منشأ گرفته و به سمت خلف و پایین در محازات عضله‌ی خاصره‌ای مازویی به سمت مثانه نزول پیدا می‌کند. میانگین طول حالب راست و چپ به ترتیب ۳۹/۱۹ و ۳۰/۱۹ سانتی متر بود (جداول ۲ و ۳). در تمامی سگ‌ها حالب سمت راست طویل‌تر از حالب سمت چپ بود که می‌تواند به علت موقعیت

قدامی‌تر کلیه سمت راست نسبت به کلیه چپ باشد. میانگین اندازه طول، عرض و ضخامت کلیه‌های چپ و راست در سگ‌های سرابی نر و ماده در جداول ۲ و ۳ درج شده است. مثانه به طور کامل با صفاق پوشیده شده بود و مثانه خالی از ادرار در داخل لگن قرار داشت اما وقتی که مثانه پر بود، گردن مثانه در مجاورت لبه‌ی قدامی استخوان عانه مشاهده گردید و بدنه ناحیه ورتکس در کنار ناف حیوان دیده می‌شد (شکل ۲).

جدول ۱- اندازه طول (کرانیوکودال) بدنه دومین مهره‌ی کمری در سگ‌های سرابی (بر حسب سانتی‌متر)

Table 1. The length (craniocaudal) of the second lumbar vertebral body in Sarabi dogs (cm)

Table 1: The length (cranio-caudal) of the second lumbar vertebral body in Shar Pei dogs (cm)													
Dogs	Male						Female						
Second lumbar vertebral body length	1	2	3	4	5	mean	6	7	8	9	10	mean	Total
	4.78	4.55	4.63	4.70	4.66	4.66	3.98	4.11	3.88	4.05	4.00	4.00	4.33

جدول ۲- طول، عرض و ضخامت کلیه چپ و طول حالب چپ در سگ‌های سرابی (بر حسب سانتی‌متر)

Table 2. Length, width and thickness of the left kidney and the length of the left ureter in Sarabi dogs (cm)

Number	Length	Width	Thickness	Ureter length
1	13.57	6.55	6.15	32.66
2	13.22	6.45	6.02	31.99
3	13.60	6.13	6.22	32.09
4	13.12	6.00	6.12	32.45
5	13.78	6.44	6.45	32.11
Mean(male)	13.45	6.31	6.19	32.26
6	11.66	5.70	4.66	28.49
7	11.55	5.60	4.45	28.01
8	11.11	5.06	4.02	27.89
9	11.56	4.95	4.13	28.15
10	11.78	5.50	4.21	28.14
Mean(female)	11.53	5.36	4.29	28.13
Total	12.49	5.83	5.24	30.19

جدول ۳- طول، عرض و ضخامت کلیه راست و طول حالب راست در سگ‌های سرابی (بر حسب سانتی‌متر)

Table 3. Length, width and thickness of the right kidney and the length of the right ureter in Sarabi dogs (cm)

Number	Length	Width	Thickness	Ureter length
1	13.86	6.33	6.31	41.95
2	13.85	6.18	6.35	41.80
3	13.22	6.45	6.29	41.75
4	13.45	6.09	6.07	42.10
5	12.98	6.22	6.00	41.88
Mean(male)	13.47	6.25	6.20	41.89
6	12.61	5.58	4.95	36.81
7	12.54	5.31	4.90	36.15
8	12.74	5.18	4.45	36.67
9	12.56	5.07	4.78	36.09
10	12.19	5.66	4.61	36.75
Mean(female)	12.52	5.36	4.73	36.49
Total	12.99	5.80	4.46	39.19

جدول ۴- نسبت طول، عرض و ضخامت کلیه چپ (سانتی‌متر) و نسبت طول حالب چپ به طول دومین مهره‌ی کمری در سگ‌های سرابی

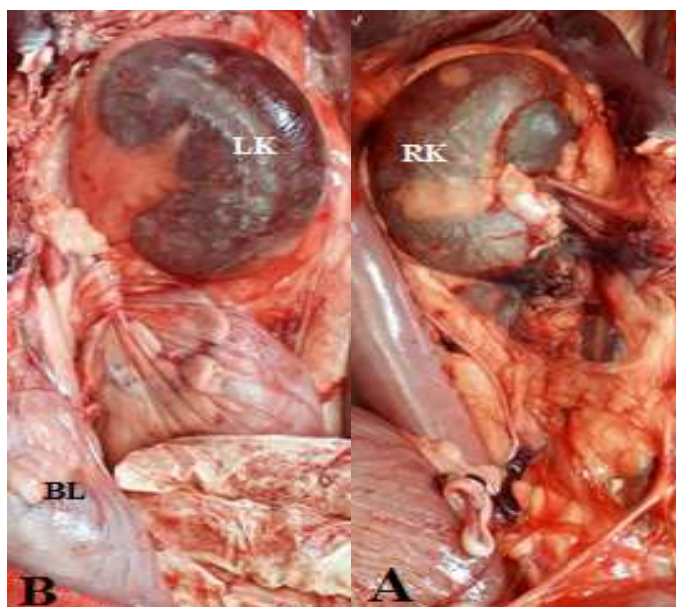
Table 4. The ratio of the length, width and thickness (cm) of the left kidney and the ratio of the left ureter length to the length of the second lumbar vertebrae body in Sarabi dogs

Number	Length ratio	Width ratio	Thickness ratio	Ureter length ratio
1	2.91	1.40	1.31	7.00
2	2.83	1.38	1.29	6.86
3	2.91	1.31	1.33	6.88
4	2.81	1.28	1.31	6.96
5	2.95	1.38	1.38	6.89
Mean(male)	2.88	1.35	1.32	6.91
6	2.91	1.42	1.16	7.12
7	2.88	1.40	1.11	7.00
8	2.77	1.26	1.00	6.97
9	2.89	1.23	1.03	7.03
10	5.89	1.37	1.05	7.33
Mean(female)	2.86	1.33	1.07	7.04
Total	2.87	1.34	1.19	6.97

جدول ۵- نسبت طول، عرض و ضخامت کلیه راست و نسبت طول حالب راست به طول دومین مهره‌ی کمری در سگ‌های سرابی

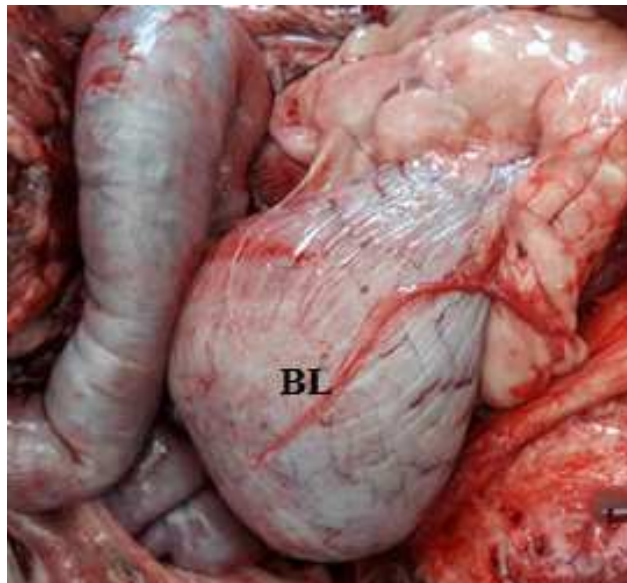
Table 5. The ratio of the length, width and thickness of the right kidney and the ratio of the right ureter length to the length of the second lumbar vertebrae body in Sarabi dogs

Number	Length ratio	Width ratio	Thickness ratio	Ureter length ratio
1	2.97	1.35	1.35	9.04
2	2.97	1.31	1.36	8.96
3	2.83	1.38	1.34	8.95
4	2.88	1.30	1.30	8.13
5	2.78	1.33	1.28	8.98
Mean(male)	2.88	1.33	1.32	8.81
6	3.15	1.39	1.23	9.20
7	3.13	1.32	1.22	9.03
8	3.18	1.29	1.11	9.16
9	3.14	1.26	1.19	9.02
10	3.04	1.41	1.15	9.18
Mean(female)	3.12	1.33	1.18	9.11
Total	3.00	1.33	1.25	8.96



شکل ۱- کلیه‌های طبیعی راست (A) و چپ (B) در یک سگ سرابی ۳ ساله. RK: کلیه راست، LK: کلیه چپ، BL: مثانه.

Fig 1. Normal right (A) and left (B) kidneys in a 3-year-old male Sarabi dog. RK: right kidney, LK: Left kidney, BL: bladder.



شکل ۲- مثانه طبیعی (BL) در یک سگ سرابی ماده ۳ ساله. مثانه به طور کامل با صفاق پوشیده شده است و گردن مثانه در مجاورت لبه‌ی قدامی استخوان عانه قرار دارد و بدنه ناحیه ورتکس نیز در کنار ناف حیوان قابل مشاهده می‌باشد.

Fig 2. Normal bladder (BL) in a 3-year-old female Sarabi dog. The bladder is completely covered with peritoneum, and the neck of the bladder is close to the front edge of the pubic bone, and the body of the vortex area is also visible next to the navel of the animal. BL: Bladder.



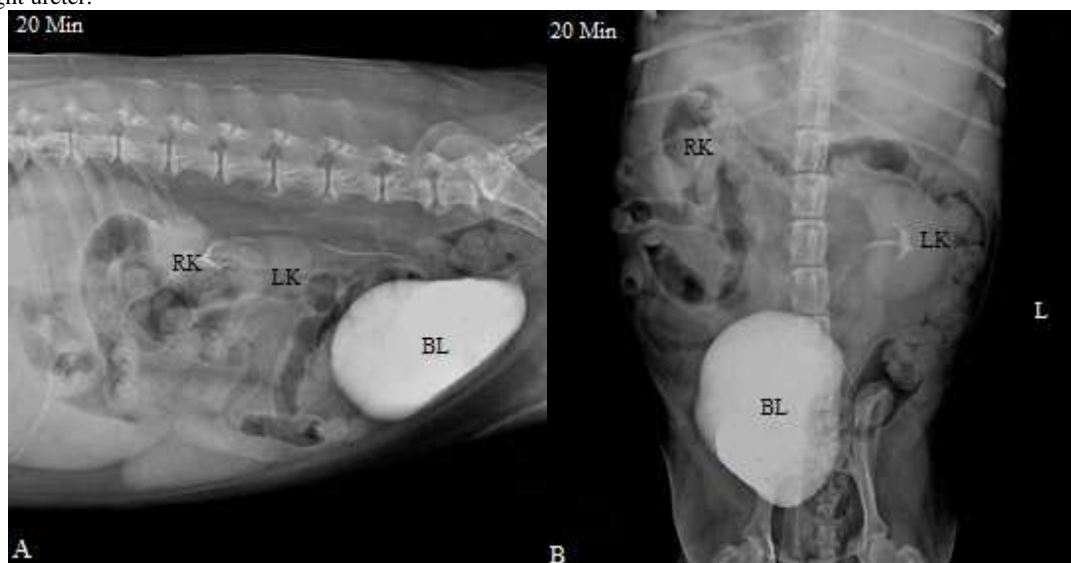
شکل ۳- فاز نفروگرام کلیه‌های طبیعی در نمای جانبی (A) و شکمی-پشتی (B) در یک سگ سرابی نر ۴ ساله. هر دو رادیوگراف ۱۰ ثانیه پس از تزریق وریدی ماده حاجب مثبت گرفته شده است. در واقع ماده حاجب در گلوبول‌های کلیوی پخش گردیده و دانسیته کلیه‌ها افزایش یافته و وضوح تصویر کلیه‌ها بیشتر شده است. در این نفروگرام‌ها، کلیه‌ها به صورت ساختارهای بافت نرم متراکمی قابل رویت هستند و مرزهای مشخصی را نسبت به ساختارهای مجاور نشان می‌دهند.

Fig 3. Nephrogram phase of normal kidneys in lateral (A) and ventrodorsal (B) views in a 4-year-old male Sarabi dog. Both radiographs were taken 10 seconds after intravenous injection of positive contrast media. In these nephrograms, the kidneys can be seen as dense soft tissue structures and show clear borders with respect to the adjacent structures.



شکل ۴- فاز پیلوگرام کلیه‌های طبیعی در نمای جانبی (A) و شکمی-پشتی (B) در همان سگ سرابی نر ۴ ساله. هر دو رادیوگراف ۵ دقیقه پس از تزریق وریدی ماده حاجب مثبت گرفته شده است. در دقیقه پنجم اوراگرافی داخل وریدی، در نفروگرام های شکمی-پشتی و جانبی، لگنچه کلیه‌ها به همراه قسمتی از حالب‌ها مشاهده شد که حالب سمت چپ نسبت به حالب سمت راست مرز مشخص‌تری از بافت‌های اطراف دارد.

Fig 4. Phase pyelogram of normal kidneys in lateral (A) and ventrodorsal (B) views in the same 4-year-old male Sarabi dog. Both radiographs were taken 5 minutes after intravenous injection of positive contrast media. In the fifth minute of intravenous urography, in the ventrodorsal and lateral nephrograms, the pelvis of the kidneys along with a part of the ureters was observed, and the left ureter has a more distinct border from the surrounding tissues than the right ureter.



شکل ۵- فاز سیستوگرافی در نمای جانبی (A) و شکمی-پشتی (B) در همان سگ سرابی نر ۴ ساله. ۲۰ دقیقه پس از تزریق ماده حاجب مثبت، مثانه پر شده است و تقریباً به شکل گلابی مشاهده می‌گردد.

Fig 5. Cystography phase in lateral (A) and ventrodorsal (B) views in the same 4-year-old male Sarabi dog. 20 minutes after the injection of the positive contrast media, the bladder is filled and looks almost like a pear.

بحث

برای بررسی و تشخیص عوارض سیستم ادراری سگ‌ها روش‌های مختلفی ذکر شده است که رادیوگرافی با ماده حاجب یکی از مهم‌ترین آنها به شمار می‌رود (۱۶، ۱۲). با توجه به نژادهای مختلف سگ لازم است که مطالعات اختصاصی در این زمینه انجام پذیرد. در مطالعه حاضر، ویژگی‌های آناتومیک و رادیولوژیکی کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه طبیعی در سگ‌های نژاد سراسی مورد بررسی قرار گرفت تا از نتایج آن در تشخیص موارد غیرطبیعی سیستم ادراری این نژاد استفاده گردد. در این مطالعه مشخص گردید که کلیه سمت راست کمی جلوتر از کلیه سمت چپ قرار داشته و در کنار قسمت انتهایی مهره آخر سینه تا قسمت قدامی سومین مهره کمر و کلیه سمت چپ نیز در کنار مهره اول کمر تا انتهای خلفی مهره سوم کمر قرار می‌گیرد. در هنگام خالی بودن معده کلیه سمت چپ در کنار بدنه مهره دوم تا چهارم کمر قرار می‌گرفت به طوری که قطب قدامی این کلیه در موازات ناف کلیه سمت راست مشاهده شد. در این مطالعه برای تعیین اندازه کلیه‌ها از اندازه طول بدنه دومین مهره کمری استفاده گردید (۲۹) لذا در رادیوگراف‌های جانبی اخذ شده از هر یک از سگ‌های سراسی تحت مطالعه، طول بدنه دومین مهره کمری اندازه‌گیری شد تا از آن به عنوان شاخصی در ارزیابی اندازه استاندارد کلیه‌ها استفاده گردد. در بررسی نفروگرام‌های جانبی مشخص می‌شود که کلیه چپ نسبت به کلیه راست حالت خلفی شکمی داشته و در نمای شکمی-پشتی ناف کلیه‌ها به سمت داخل قرار دارند. این نتایج مشابه تحقیقات صورت گرفته در نژادهای دیگر سگ می‌باشد (۲۰، ۲۲) اما برخی مطالعات دیگر نشان می‌دهند که ممکن است انتهای قدامی کلیه سمت چپ در کنار انتهای خلفی مهره اول کمر قرار گیرد (۵) که این مورد در مطالعه ما مشاهده

نشد. بر اساس مطالعات صورت گرفته در سگ، گربه، سنجاب، خرگوش و سایر حیوانات نیز مشخص شده است که کلیه راست نسبت به کلیه سمت چپ حالت جایگزینی سری‌تری را دارا هست ولی با این وجود محل قرارگرفتن کلیه‌های حیوانات مختلف در شماره-های مختلف مهره‌های کمر و نیز دنده‌ها قرار می‌گیرد که این حالت به دلیل تفاوت‌های گونه حیوان است (۱۰). مطالعه رادیوگرافیک ساده دستگاه ادراری در سگ‌های سراسی نشان داد که کلیه راست و چپ به صورت بافت نرم و با اوپسیتی کم مشخص می‌شوند که فقط قسمت خلفی شکمی آنها قابل شناسایی است. نقطه تماس زائده دمی کبد و کلیه راست قابل شناسایی نبوده و لبه داخلی کلیه راست که محل قرارگیری ناف است به صورت نسبی قابل شناسایی بود و هر دو لبه داخلی و خارجی کلیه‌ها هم تا حدود کمی قابل شناسایی بودند. اوپسیتی هر دو کلیه به طور قابل توجهی از بافت‌های نرم اطراف و همچنین ساختارهای استخوانی قابل شناسایی و تشخیص بود. حالب از لگنچه منشأ گرفته و به سمت خلف و پایین نزول پیدا کرده و به سمت مئانه حرکت می‌کرد. طول حالب سمت راست مقداری طولی‌تر از حالب سمت چپ بود و در نمای جانبی، حالب‌ها تا انتهای خلفی مهره کمری قابل مشاهده بودند و بعد از آن به سمت خلف امتداد یافته و در نهایت با استخوان‌های لگن همپوشانی داشتند. مثانه پر در جلوی لبه قدامی استخوان عانه به صورت بیضی شکل و با اوپسیتی کم مشاهده می‌شد. این مطالعه نشان داد که تفاوت‌کمترین اندازه کلیه راست و چپ وجود دارد و این تفاوت‌ها در مقادیر می‌تواند به علت تفاوت در سن، نژاد و عوامل محیطی از جمله رژیم‌های غذایی باشد که مطابق با مطالعات سایر محققین در این زمینه بود (۱۳)، (۲۳، ۲۶). نتایج مربوط به نسبت طول، عرض و

طول حالب به طول بدنه دومین مهره کمر در سگ‌های نژاد سرابی بیان می‌شود.

نتیجه‌گیری

میانگین نسبت طول، عرض و ضخامت کلیه سمت چپ و نسبت طول حالب سمت چپ به طول بدنه دومین مهره‌ی کمری در سگ‌های سرابی به ترتیب ۲/۸۷، ۱/۳۴، ۱/۱۹ و ۶/۹۷ سانتی‌متر بوده و همین نسبت در کلیه سمت راست به ترتیب ۳/۰۰، ۱/۳۳، ۱/۲۵ و ۸/۹۶ سانتی‌متر بود. تفاوت‌هایی در اندازه طول، عرض و ضخامت کلیه‌های سمت چپ و راست و همچنین طول حالب‌ها در سگ نژاد سرابی وجود دارد و این تفاوت‌ها در بین جنس‌های نر و ماده نیز معنی‌دار بود. به دلیل موقعیت قدامی‌تر کلیه راست، طول حالب سمت راست طول‌تر از حالب سمت چپ بوده و ابعاد کلیه راست بزرگ‌تر از کلیه چپ بود و همچنین این ابعاد در حیوان جنس نر بزرگ‌تر از حیوان جنس ماده بود. براساس یافته‌های مطالعه حاضر ساختار آناتومیک سیستم ادراری سگ سرابی مشابه سایر نژادهای سگ می‌باشد. یافته‌های این مطالعه می‌تواند در تفسیر نتایج و تصمیم‌گیری‌های بالینی برای تعیین اندازه طبیعی و غیرطبیعی کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه در سگ‌های سرابی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Ajadi, R., Adetunji, A., Omoerah, V., Okoh, J. 2006. Influence of dosage and chemical restraints on feline excretory urography. *Journal of the South African Veterinary Association*, 77(4): 202-204.
2. Alizadeh, M., Masoudi, A.A., VaezTorshizi, R., Allahyar, Khan Khorasani, D. 2014. Study of the Genetic Structure of Iranian Native dogs Using Mitochondrial DNA information. *Agricultural Biotechnology Journal*, 5(4):67-82.

ضخامت کلیه‌ها در سگ‌های هاسکی نشان داد میانگین نسبت طول کلیه سمت راست به طول بدنه دومین مهره کمر در سگ‌های نر ۲/۸۸ و در سگ‌های ماده ۳/۱۲ می‌باشد. میانگین نسبت عرض کلیه سمت راست به طول بدنه دومین مهره کمر در سگ‌های نر و ماده نیز ۱/۳۳ می‌باشد. میانگین نسبت ضخامت کلیه سمت راست به طول بدنه دومین مهره کمر در سگ‌های نر ۱/۳۲ و در سگ‌های ماده ۱/۱۸ می‌باشد. میانگین نسبت طول کلیه سمت چپ به طول بدنه دومین مهره کمر در سگ‌های نر ۲/۸۸ و در سگ‌های ماده ۲/۸۶ می‌باشد. میانگین نسبت عرض کلیه سمت چپ به طول بدنه دومین مهره کمر در سگ‌های نر ۱/۳۵ و در سگ‌های ماده نیز ۱/۳۳ می‌باشد. میانگین نسبت ضخامت کلیه سمت چپ به طول بدنه دومین مهره کمر در سگ‌های نر ۱/۳۲ و در سگ‌های ماده ۱/۰۷ می‌باشد. بر اساس داده‌های فوق می‌توان نتیجه گرفت که نسبت طول، عرض و ضخامت کلیه راست بزرگ‌تر از کلیه چپ بوده و همچنین نسبت طول، عرض و ضخامت کلیه‌ها در سگ‌های نر بزرگ‌تر از سگ‌های ماده می‌باشد و تنها نسبت عرض کلیه سمت چپ در حیوان نر کوچک‌تر از حیوان ماده می‌باشد. میانگین نسبت طول حالب سمت راست به طول بدنه دومین مهره کمر در سگ‌های نر ۸/۸۱ برابر و در سگ‌های ماده ۹/۱۱ می‌باشد. میانگین نسبت طول حالب سمت چپ به طول بدنه دومین مهره کمر در سگ‌های نر ۶/۹۱ و در سگ‌های ماده ۷/۰۴ می‌باشد و این داده‌ها نشان می‌دهند که طول حالب سمت راست طول‌تر از حالب سمت چپ می‌باشد و این وضعیت در مقایسه با محل قرار گرفتن کلیه‌ها نرمال به نظر می‌رسد. نسبت طول حالب سمت راست و چپ در حیوان نر در مقایسه با حیوان جنس ماده طول‌تر می‌باشد. این برای اولین بار است که طول حالب بر مبنای نسبت

12. Habing, A.M., Byron, J.K. 2015. Imaging of the urinary tract. *Veterinary image-guided interventions*, 261-288.
13. Hargaden, M., Singer, L. 2012. Anatomy, physiology, and behavior. In the laboratory rabbit, Guinea pig, hamster, and other rodents. *Elsevier*, 575-602.
14. Herold, L. 2016. The renal system. Monitoring and intervention for the critically ill small animal. *The Rule*, 20:225-245.
15. Heuter, K.J. 2005. Excretory urography. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 20(1):39-45.
16. Huynh, E. 2023. Urogenital Tract. *Atlas of Small Animal Diagnostic Imaging*, 720-757.
17. Kaya, M., Bumin, A., Şenel, O.O. 2010. Perirenal pseudocyst in a cat. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 5(3):147-153.
18. Kealy, J.K., McAllister, H., Graham, J.P. 2010. Diagnostic radiology and ultrasonography of the dog and cat. *Elsevier Health Sciences*, 12(2):124-139.
19. Khan, K.N., Hard, G.C., Li, X., Alden, C.L. 2018. Urinary system. Fundamentals of Toxicologic Pathology. *Elsevier*, 213-271.
20. Lamb, C.R., Dirrig, H., Cortellini, S. 2018. Comparison of ultrasonographic findings in cats with and without azotaemia. *Journal of feline medicine and surgery*, 20(10):948-954.
21. Lang, J. 2006. Ultrasound Artefacts. *Diagnostic ultrasound in small animal practice*, 20-25.
22. Lobacz, M.A., Sullivan, M., Mellor, D., Hammond, G., Labruyère, J., Dennis, R. 2012. Effect of breed, age, weight and gender on radiographic renal size in the dog. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 53(4):437-441.
3. AmiriGhanatsaman, Z., Wang, G.D., AsadiFoz, M., Zhang, Y.P., Esmailizadeh, A. 2020. Genome resequencing data for Iranian local dogs and wolves. *BMC Research Notes*, 13:1-4.
4. Asghar, M. 2010. Evaluation of renal excretory function by intravenous urography. *Gomal Journal of Medical Sciences*, 8(1):15-29.
5. Behmanesh, R., Sorouri, Z. 2024. Radiological Assessment of the Ratio of Kidney Length to the Length of Lumbar Vertebrae in Cats Referred to Tehran-Pet Clinic. *Iranian Journal of Veterinary Surgery*, 77-81.
6. Breshears, M.A., Confer, A.W. 2017. The urinary system. *Pathologic basis of veterinary disease*, 617.
7. Carlisle, C., Brown, A., Filippich, L., Reynolds, K., Reynolds, W. 1989. Intravenous urography in the koala (*Phascolarctos cinereus*). *Veterinary Radiology*, 30(1):34-40.
8. Chew, D.J., DiBartola, S.P., Schenck, P. 2010. *Canine and feline nephrology and urology*. *Elsevier Health Sciences*, 18(4):100-119.
9. Dimitrov, R., Chaprazov, T. 2012. An anatomic and contrast enhanced radiographic investigation of the rabbit kidneys, ureters and urinary bladder. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 163(10):469-474.
10. Drost, W.T., Henry, G.A., Meinkoth, J.H., Woods, J.P., Lehenbauer, T.W. 2000. Quantification of hepatic and renal cortical echogenicity in clinically normal cats. *American Journal of Veterinary Research*, 61(9):1016-1020.
11. Fielding, C.L., Mayer, J.R., Dechant, J.E., Epstein, K.L., Magdesian, K.G. 2021. Clinical and biochemical factors associated with survival in equids attacked by dogs: 28 cases (2008-2016). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 35(1):532-537.

28. Rezaei, M., Jajarmi, M., Kamani, S., Khalili, M., Babaei, H. 2023. Prevalence of canine herpesvirus 1 and associated risk factors among bitches in Iranian breeding kennels and farms. *Veterinary Medicine and Science*, 9(6):2497-2503.
29. Sohn, J., Yun, S., Lee, J., Chang, D., Choi, M., Yoon, J. 2016. Reestablishment of radiographic kidney size in Miniature Schnauzer dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(12):1805-1810.
30. Väättäjä, H.K., Pesonen, E.K. 2013. Ethical issues and guidelines when conducting HCI studies with animals. CHI'13 Extended Abstracts on Human Factors in Computing Systems, 2159-2168.
31. Veshkini, A., Tavana, M., Haghdost, I.S., Masouleh, M.N., Savojbolaghi, S.H. 2011. Excretory Urography by Subcutaneous Injection of Iodixanol in Persian Squirrel (*Sciurus Anomalous*). *Pakistan Veterinary Journal*, 31(1):22-31.
23. Maurya, H., Kumar, T., Kumar, S. 2018. Anatomical and physiological similarities of kidney in different experimental animals used for basic studies. *Journal of Clinical and Experimental Nephrology*, 3(09):113-128.
24. Parés-Casanova, P.M., Siddiq, A.B., Onar V. 2020. Cranial size and shape sexual dimorphism in the Kangal dog from Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 44(2):396-403.
25. Patel, S., Bhargava, M., Jawre, S. 2015. Radiographic, sonographic and laparoscopic identification of kidneys in dogs. *Journal of Interacademia*, 19(1):116-121.
26. Paul, C., Didia, B. 2012. The effect of methanolic extract of *Moringaoleifera* lam roots on the histology of kidney and liver of guinea pigs. *Asian Journal of Medical Sciences*, 4(1):55-60.
27. Rademacher, N. 2018. Diagnostic imaging of the urinary tract. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 49(2):261-286.

Research Article**Recognition the Appearance and Production Characteristics of Native Lorestan Goats****Alireza Chegeni*, Behrouz Yarahmadi, Mohsen Mohamadi Saei**

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

*Corresponding author: chegeni48@yahoo.com

Received: 13 November 2024

Accepted: 8 February 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1190360

Abstract

One hundred fifty female and 12 male goats were selected from the herds of Lorestan province in a random stratified and clustered method. Morphological characteristics including 17 factors and qualitative and typical characteristics of the body including 27 characteristics during 4 years and milk records, birth weights up to 9 months in males and females using SPSS and SAS software and descriptive statistics were analyzed. Hair samples were taken from the right side of 90 female goats (1, 2 and 3 years old) in four seasons to determine hair length, efficiency and fat percentage. The data were analyzed by SAS software package and GLM method. 40 male goats at the ages of 4, 6, 8, and 10 months were selected from the goat herds, and each age group was kept in individual places and after 20 days of preliminary period for 90 days with a total mixed ration (12.32% protein, and 2.33 Mcal/kg of energy) were fed. No significant difference was observed between different age groups, except for chest depth and hand width. In the comparison of milk production in different seasons, the highest milk production was obtained in May with 943.2 milliliters/h and the lowest amount of milk was obtained in August with 28.5 milliliters. The average duration of the milking period was 4 months and the average daily milk production of one head was about 384 milliliters. The effect of gender on birth weight was not significant. In the study of the effect of age on hair length, efficiency, fat percentage and hair diameter, no significant difference was observed except hair length. The effect of gender on different weights from weaning to 9 months was significant. In fattening goats, the highest daily gain at 10 months was 132.99g/d and the lowest at 6 months with 95.59g/d.

Keywords: Morphological characteristics, Productive characteristics, Goat, Lorestan, Fattening, Hair goat.

شناسایی صفات ظاهری و تولیدی بز بومی لرستان

علیرضا چگنی^{*}، بهروز یاراحمدی، محسن محمدی ساعی

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

کشاورزی، خرم‌آباد، ایران

^{*}مسئول مکاتبات: cheqeni48@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۳

DOI: 10.60833/ascij.2025.1190360

چکیده

تعداد ۱۵۰ رأس بز ماده و ۱۲ رأس بز نر از بین گله‌های استان لرستان بصورت طبقه‌ای تصادفی و خوشه‌ای انتخاب شدند. مشخصات مرفولوژیک شامل ۱۷ مورد و مشخصات کیفی و تیپیک بدن شامل ۲۷ خصوصیت طی ۴ سال و رکوردهای شیر، اوزان تولد تا ۹ ماهگی در جنس‌های نر و ماده با استفاده از بسته‌های نرم‌افزاری SPSS و SAS و آمار توصیفی بررسی و تجزیه و تحلیل شدند. از ناحیه پهلوی راست ۹۰ رأس بز ماده (۱، ۲ و ۳ ساله) در چهار فصل نمونه‌یالیف برای تعیین طول‌الیاف، راندمان و درصد چربی برداشت گردید داده‌های بدست آمده توسط نرم‌افزار SAS و روش GLM آنالیز شدند. ۴۰ رأس بزغاله نر در سنین ۴، ۶، ۸ و ۱۰ ماهگی از گله‌های بز استان لرستان انتخاب و هر گروه سنی در جنس نر در جایگاه‌های انفرادی نگهداری و پس از ۲۰ روز دوره مقدماتی به مدت ۹۰ روز با جیره‌ای شامل ۱۲/۳۲ درصد پروتئین و ۲/۳۳ مگاکالری انرژی در کیلوگرم به صورت کامل مخلوط پروار شدند. بجز صفات عمق سینه و پهنای دست‌ها، در بین گروه‌های سنی مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در مقایسه شیر تولیدی در فصول مختلف، بیشترین شیر تولیدی در اردیبهشت با ۹۴۳/۲ میلی‌لیتر بازای هر رأس و کمترین میزان شیر در مرداد با ۲۸/۵ میلی‌لیتر بدست آمد. متوسط طول دوره شیردهی ۴ ماه و میانگین کل تولید شیر روزانه یک رأس در گله حدود ۳۸۴ میلی‌لیتر بود. اثر جنس بر وزن تولد معنی‌دار نشد. در بررسی اثر سن بر طول مو، راندمان، درصد چربی و قطر مو بجز طول مو تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. اثر جنس بر وزن‌های مختلف از شیرگیری تا ۹ ماهگی معنی‌دار شد. در پروار بزغاله‌ها بالاترین افزایش وزن روزانه در ۱۰ ماهگی، ۱۳۲/۹۹ گرم و کمترین آن در ۶ ماهگی با ۹۵/۵۹ گرم در روز بود.

کلمات کلیدی: صفات ظاهری، صفات تولیدی، بز، لرستان، پرواربندی، الیاف بز.

مقدمه

محیطی باعث شده تا نگهداری و پرورش این حیوان به‌ویژه در شرایط روستایی و در سطح دامداران خرده‌پا موردتوجه قرار گیرد. در بسیاری از نقاط جهان بزها علاوه بر اینکه به‌عنوان منابع تولید مواد غذایی هستند، پوست مفید و در بعضی کشورها الیاف با ارزشی نیز تولید می‌کنند (۲۵). بر اساس آمار فائو

بز به‌عنوان یکی از نشخوارکنندگان اهلی، در نقاط مختلف دنیا پرورش داده می‌شود. این دام محصولات متنوعی را تولید می‌کند. یکی از اهداف عمده پرورش‌دهندگان بز تولید گوشت و شیر است. جثه کوچک، قدرت سازگاری زیاد، کم‌توقعی و مقاومت زیاد بز به بسیاری از بیماری‌ها و شرایط نامساعد

بزهای بومی استان لرستان طراحی و با استفاده از گله‌های دامداران اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

بمنظور شناسایی صفات ظاهری و تولیدی بز بومی استان لرستان تعداد ۱۵۰ رأس بز ماده و ۱۲ رأس بز نر با توجه به توزیع ناهمگن جمعیت بز در سطح استان بصورت طبقه‌ای خوشه‌ای از گله‌های استان انتخاب و بمدت ۴ سال، ۱۷ مورد مشخصات مورفولوژیک (کمی) و ۲۷ مورد مشخصات کیفی و تیپیک بدن مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت (۱۲). رکوردهای مشخصات مورفولوژیک بدن، مشخصات کیفی بدن، رکوردهای شیر، اوزان تولد تا ۹ ماهگی در جنس‌های نر و ماده با استفاده از بسته‌های نرم افزاری SPSS و SAS و آمار توصیفی مورد تجزیه و تحلیلی قرار گرفت. در مورد خصوصیات الیاف (طول الیاف، راندمان و درصد چربی)، از ناحیه پهلوی راست ۹۰ راس بز ماده (۱، ۲ و ۳ ساله) در چهار فصل نمونه الیاف برداشت گردید. تمام نمونه‌های برداشت شده از هر بز از یک محل برداشته شد. محل نمونه‌برداری دام‌ها خالکوبی شدند. تعداد نمونه‌ها برای هر یک از سنین ۱، ۲ و ۳ ساله در هر فصل ۳۰ نمونه و در کل ۳۶۰ بود.

طول دسته الیاف: برای اندازه‌گیری طول دسته الیاف قاعده آن مقابل صفر خط‌کش قرار گرفت و عدد مربوطه یاد داشت گردید. برای هر نمونه آزمایشی حداقل طول سه دسته اندازه‌گیری شد و میانگین آن گزارش گردید. ابتدا نمونه را از مواد خارجی پاک کرده و پس از شستشو در آب ۴۵ درجه و شوینده، خشک کردن در هوای آزاد و غوطه‌ور کردن در دیکلرومتان و خشک شدن، الیاف ضخیم و ظریف از یکدیگر جدا شده و در اتو ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفت و پس از سرد شدن در

(۸) در کل دنیا تعداد ۹۲۱ میلیون رأس بز وجود دارد و پراکندگی این تعداد در نواحی مختلف است. سهم محوری این‌گونه‌ی دامی در کشاورزی و توسعه پایدار روستایی به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه که بیشتر از ۹۰ درصد از جمعیت جهانی بز را در خود جای داده‌اند، غیرقابل انکار می‌نماید (۲۵). اهمیت بز و سهم آن در دامپروری پایدار به دلیل ریسک کمتر، بازگشت سریع سرمایه، طولانی بودن فصل تولیدمثل، بازار همیشگی در طول سال، هزینه کمتر، توانایی عملکرد خوب در محدوده وسیع از خوراک و توانایی استثنایی تحمل تنش‌های شدید گرما، رطوبت و سرما نه تنها در آسیا بلکه در آفریقا بیشتر شده است (۲۳). بر اساس اطلاعات مرکز آمار ایران در سال ۱۴۰۲ تعداد بز و بزغاله در ایران به ۱۷/۵ میلیون رأس می‌رسد، که نقش مهمی در تأمین گوشت، شیر و پوست و الیاف مورد نیاز کشور دارد. در استان لرستان ۶/۲ واحد دامی وجود دارد، بیش ۱/۶۶ رأس آن بز و بزغاله می‌باشد که بصورت گله‌های خالص و مخلوط با گوسفند پرورش داده می‌شوند (۶، ۷). بزها معمولاً توسط خانواده‌هایی نگهداری می‌شوند که در مناطق با خاک فقیر، بارندگی کم و مزارع با مساحت کوچک زندگی می‌کنند. در این نواحی شیر و گوشتی که بزها تولید می‌کنند، می‌تواند بخش با ارزشی از خوراک روزانه کشاورزان را تأمین کند. تا کنون اطلاعات دقیقی از خصوصیات ظاهری و تولیدی بزهای ایران که برگرفته از تحقیقات باشد کمتر وجود دارد. قبل از اقدام به هرگونه عملیات اصلاح نژادی از قبیل دورگ‌گیری، وارد نمودن ژن‌های جدید به گله‌ها و ... شناسایی پتانسیل‌ها و خصوصیات توده‌ها و نژادهای بومی کشور امری ضروری است (۶، ۱۶). این پژوهش در چهار سال متوالی برای نیل به اهداف فوق در راستای بررسی خصوصیات ظاهری و تولیدی

دیسکاتور با ترازوی حساس با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم توزین گردیده و درصد وزنی الیاف محاسبه گردید.

قطر: پس از شستشوی نمونه و استخراج مواد گیاهی و غوطه‌ورکردن در دیکلرومتان، از الیاف ظریف و مو به تفکیک با مقطع‌گیر هاردی برش تهیه شد و پس از قرار دادن بر روی لام با پارافین مایع مخلوط و توسط دستگاه میکروپروژکتور که تصویری به بزرگنمایی ۵۰۰ برابر ایجاد می‌کند با خط‌کش‌های مخصوص در تاریکخانه، حداقل قطر ۳۰۰ تار اندازه‌گیری و میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات هر نمونه محاسبه شد (۲، ۳). داده‌های بدست آمده در نرم‌افزار Excel ذخیره، و توسط بسته نرم‌افزاری SAS و روش GLM آنالیز شدند (۲۴). در پایان خصوصیات مختلف الیاف اندازه‌گیری شد. مدل آماری طرح به صورت زیر است: $Y_{ij} = \mu + B_j + e_{ij}$ که اثر اشتباه آزمایشی e_{ij} ، میانگین جامعه μ = اثر سن (تیمار) = B_j می‌باشند. داده‌های به دست آمده در خصوص پروراندی و خصوصیات لاشه با استفاده از طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه آماری قرار گرفت (۴). مدل طرح کاملاً تصادفی به صورت زیر است: $X_{ij} = \mu + T_j + E_{ij}$ که X_{ij} = مقدار عددی مشاهده، μ = میانگین کل جمعیت، T_j = اثر تیمار، E_{ij} = اثر خطای آزمایشی است.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های به دست آمده در فایل جداگانه در بسته نرم‌افزاری Excel ذخیره گردید و جهت تجزیه و تحلیل آماری از بسته نرم‌افزاری SAS (نسخه ۹/۱) استفاده شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از روش مقایسه چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد استفاده گردید (۴، ۲۴).

نتایج

بز بوی لرستان غالباً دارای گوش بلند، جثه متوسط با شاخ‌های کمانی متوسط و روئینی صاف، برجستگی

دور چشم صاف. حدود ۵۷ درصد پیشانی برجسته و ۴۳/۵ درصد پیشانی صاف، حدود ۸۳ درصد دست و پای بلند با دم کوتاه، حدود ۸۷ درصد بدون منگوله و ۹۰ درصد کپل خمیده می‌باشد. اکثراً دارای ریش و گردن پوشیده از الیاف و بیش از ۷۳ درصد رنگ الیاف بدن سیاه و سایر رنگ‌ها از قهوه‌ای تیره تا روشن تا رنگ کرمی و سفید نیز با درصد کمتری دیده می‌شود. رنگ سر ۲۷ درصد سیاه، ۲۹ درصد قهوه‌ای-سیاه، ۳۱ درصد قهوه‌ای-سیاه و سفید و در ۹۸ درصد پستانی قرینه داشتند. در خصوص ارتفاع لگن، دور قفسه سینه، عمق قفسه سینه، پهنای استخوان لگن، عرض ران‌ها، عرض دست‌ها، طول لگن تا جدوگاه، دور میچ پاها، طول مفصل خرگوشی، عرض استخوان پستی (عرض راسته)، عرض استخوان کمر (عرض فیله)، ارتفاع کمر و ارتفاع جدوگاه از زمین (قد)، در مقاطع سنی ۱، ۲، ۳ و چهار ساله و بیشتر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$) (جدول ۱).

در عمق سینه و پهنای دست‌ها در مقاطع سنی فوق تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید ($p < 0/05$) (جدول ۱). در پروار بزغاله‌های ۴، ۶، ۸ و ۱۰ ماهه میانگین اضافه وزن روزانه به ترتیب ۹۸/۱۷، ۹۵/۵۹، ۱۱۶/۵۳ و ۱۳۲/۹۹ گرم در روز بود. بالاترین اضافه وزن روزانه در بزغاله‌های ۱۰ ماهه بود ($p < 0/05$) (جدول ۲). میانگین وزن نهایی در گروه‌های فوق به ترتیب ۲۲/۹۵، ۲۵/۶۲، ۳۱/۰۲ و ۳۸/۲۳ کیلوگرم بود ($p < 0/05$) (جدول ۲).

مقایسه شیر تولیدی در فصول مختلف نشان داد که بیشترین مقدار در اردیبهشت با ۹۴۳ میلی‌لیتر و کمترین در مرداد با ۲۸/۵ میلی‌متر برای هر رأس بدست آمد. میانگین کل تولید شیر روزانه یک رأس در گله حدود ۳۸۴ میلی‌لیتر بود. بیشترین درصد زایش در ماه دی و کمترین آن خرداد اتفاق افتاد. در طول دوره شیردهی مجموع شیر تولیدی ۵۷/۶ لیتر

بود. ۸۹/۳ درصد زایش‌ها بصورت تک قلو و ۱۰/۷ درصد دوقلو بود. اثر جنس بر وزن تولد و اندازه‌های بدن و دور سینه، ارتفاع جدوگاه و فاصله لگن تا جدوگاه معنی‌دار نشد ($p > 0.05$) (جداول ۲ و ۳). اوزان تولد تا ۹ ماهگی بز داشتی بومی لرستان در جدول ۴ آورده شده است. وزن تولد، اوزان ۷، ۸ و ۹ ماهگی در جنس‌های نر ماده تفاوت معنی‌داری نشان دادند ($p < 0.05$). در بررسی اثر سن بر قطر، درصد چربی، راندمان و طول مو، در سنین مخلف بز بومی لرستان در جدول شماره ۵ بیان شده است. بجز در طول مو در سایر صفات تفاوت معنی‌داری در سنین مختلف مشاهده نشد ($p > 0.01$).

جدول ۱- میانگین مربعات و خطای معیار برخی خصوصیات مختلف اندازه بدن در بز بومی لرستان (سانتیمتر)

Table 1. Mean square and standard deviation of some different characteristics of body size in native goats of Lorestan (cm)*

Age	Hip height from the ground	chest width	chest deep	Hip bone width	Legs width	Hands width	Hip to Withers distance
one year	63.5 ^a ± 3.44	15.1 ^a ± 1.64	27.82 ^b ± 2.32	15.47 ^a ± 1.38	28.85 ^a ± 4.68	23.25 ^b ± 3.19	47.8 ^a ± 2.60
Two years	63.17 ^a ± 3.84	15.23 ^a ± 1.22	28.98 ^a ± 1.44	15.62 ^a ± 1.23	29.89 ^a ± 3.02	24.96 ^a ± 3.34	48.03 ^a ± 2.82
Three years	63.86 ^a ± 3.44	15.5 ^a ± 1.5	29.02 ^a ± 2.02	15.77 ^a ± 1.33	29.45 ^a ± 3.81	25.04 ^a ± 2.45	48.38 ^a ± 4.27
4 years and up	63.94 ^a ± 2.89	15.78 ^a ± 1.21	29.31 ^a ± 1.5	16 ^a ± 1.33	29.84 ^a ± 3.51	25.26 ^a ± 2.55	49.36 ^a ± 2.71
Mean	63.55 ± 3.43	15.40 ± 1.41	28.84 ± 1.91	15.72 ± 1.31	29.52 ± 3.72	24.73 ± 2.90	48.36 ± 3.43
SEM	1.70	0.69	0.91	0.658	1.88	1.56	1.55
P	0.91	0.56	0.73	0.66	0.79	0.38	0.81

Age	ankle circumference	hock joint length	chest circumference	Back bone width	Lumbar bone width	Lumbar height	Withers height
One year	10.60 ^a ± 0.68	26.2 ^a ± 1	78.1 ^a ± 7.97	8.58 ^a ± 0.79	47.95 ^a ± 2.74	63.15 ^a ± 2.99	65.52 ^a ± 3.00
Two years	10.71 ^a ± 0.60	26.32 ^a ± 3.62	79.85 ^a ± 5.15	8.85 ^a ± 0.83	48.71 ^a ± 3.11	63.28 ^a ± 2.69	65.73 ^a ± 2.79
Three years	10.38 ^a ± 4.27	26.54 ^a ± 1.17	81.06 ^a ± 4.87	9.07 ^a ± 0.73	50.20 ^a ± 3.13	63.48 ^a ± 3.12	66.12 ^a ± 2.86
4 years and up	10.78 ^a ± 0.42	26.63 ^a ± 1.11	81.33 ^a ± 3.16	9.10 ^a ± 0.63	50.52 ^a ± 3.23	64.15 ^a ± 3.68	67.13 ^a ± 2.96
Mean	10.72 ± 0.60	26.44 ± 1.62	80.26 ± 5.47	8.93 ± 0.77	49.47 ± 3.19	63.49 ± 3.08	66.09 ± 2.89
SEM	0.37	0.86	2.64	0.372	1.53	1.56	1.45
P	0.83	0.46	0.95	0.23	0.76	0.64	0.33

a, b و c حروف متفاوت در هر ستون نمایانگر اختلاف معنی دار در بین تیمارها است ($p < 0.05$)

a. b. c Values within a column with different superscripts differ significant ($p < 0.05$)

جدول ۲- اثر سن بر میانگین و انحراف معیار افزایش وزن در بزغاله‌های نر بومی لرستان

Table 2. The effect of age on the mean of weight gain in Lorestan native male goats.

	4 month	6 month	8 month	10 month	SEM	P
Initial body weight(kg)	14.95 ^d	17.48 ^c	22.01 ^b	27.18 ^a	1.39	0.03
Average daily gain (g)	98.17 ^c	95.59 ^c	116.53 ^{ab}	132.99 ^a	12.02	0.04
Final body weight(kg)	22.95 ^d	25.62 ^c	31.02 ^b	38.23 ^a	1.15	0.01

جدول ۳- میانگین مربعات و خطای معیار صفت تولید شیر در بز بومی لرستان

Table 3. mean square and standard error of milk production traits in Lorestan native goats

	Milk yield(ml/d)		
	Morning	Evening	Total
March- April	392.5 ^b ± 142	114.6 ^b ± 78.3	507.1 ^b ± 165.6
April-May	700.8 ^a ± 19.1	242.4 ^a ± 103.8	943.2 ^a ± 245
May-Jun	100.7 ^c ± 24.0	64.3 ^c ± 21.5	165 ^d ± 36.8
Jun-July	380.9 ^b ± 139.3	55.9 ^c ± 17.9	436.8 ^c ± 140.1
July-August	19.2 ^d ± 4.5	9.3 ^d ± 2.4	28.5 ^e ± 6.7

Mean	295.9 ± 82.2	88.7 ± 92.5	384.5 ± 329.4
SEM	32.89	22.39	59.42
P	0.001	0.02	0.04

جدول ۴- میانگین مربعات و خطای معیار بر روی وزن بدن بز بومی لرستان در سنین و جنس های مختلف

Table 4. mean square and standard error on the body weight of Lorestan native

Age	Birth Weight	Weaning Weight	4 Month	5 Month	6 Month	7 Month	8 Month	9 Month
Male	2.71 ^a ± 0.313	7.85 ^a ± 1.05	8.97 ^a ± 1.18	11.58 ^a ± 1.47	14.8 ^a ± 1.74	17.64 ^a ± 1.99	20.26 ^a ± 2.34	23.2 ^a ± 2.14
Female	2.59 ^b ± 0.47	7.67 ^a ± 1.29	8.85 ^a ± 1.43	11.43 ^a ± 1.64	14.28 ^a ± 1.64	16.72 ^b ± 1.65	19.13 ^b ± 1.91	21.59 ^b ± 1.88
Mean	2.45 ± 0.42	7.74 ± 1.19	8.9 ± 1.33	11.47 ± 1.56	14.49 ± 1.69	17.08 ± 1.83	19.58 ± 2.14	22.22 ± 2.12
SEM	0.20	0.60	0.65	0.78	0.85	0.91	0.53	0.53
P	0.03	0.82	0.33	0.67	0.21	0.04	0.02	0.04

جدول ۵- میانگین مربعات و خطای معیار برخی خصوصیات مو در بز بومی لرستان

Table 5. Mean square and standard error of some hair characteristics in Lorestan native goats

Age	Diameter (micron)	Fat %	hair efficiency%	hair length (cm)
1 year	74.46 ^a ± 13.91	1.91 ^a ± 0.65	89.22 ^a ± 1.26	16.12 ^a ± 1.75
2 year	79.85 ^a ± 9.10	1.91 ^a ± 0.73	89.87 ^a ± 1.37	15.34 ^{ab} ± 1.69
3 year	77.49 ^a ± 3.40	2.39 ^a ± 1.59	88.74 ^a ± 1.86	14.49 ^{ab} ± 1.07
4 years and up	80.75 ^a ± 8.07	2.22 ^a ± 1.52	88.45 ^a ± 4.18	14.12 ^b ± 1.29
Mean	78.91 ± 8.04	2.16 ± 1.30	88.98 ± 2.92	14.75 ± 1.51
SEM	4.32	0.65	1.46	0.75
P	0.32	0.41	0.56	0.02

بحث

نر و ماده به ترتیب ۶۹/۷ و ۶۴/۸ سانتی‌متر و دور سینه نیز ۸۰ و ۷۳/۸ سانتی‌متر گزارش شده است (۱۸) که با مطالعه حاضر تفاوت داشت. در بز مهابادی اصفهان طول بدن، ارتفاع جدوگاه و دور سینه به ترتیب در نرها و ماده‌ها (۵۳-۵۲/۱)، (۷۲-۶۹) و (۹۵/۹-۹۰/۴) سانتی‌متر گزارش شده است (۱۸). تفاوت ظاهری توده‌ها و نژادهای بز ایران بیشتر ناشی از شرایط ژنتیکی و محیطی-اکولوژیکی می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های کیانزاد (۱۹۹۵)، مقصودی-نژاد (۱۵) و چگنی (۷) مطابقت داشت. ایلامی (۸) نشان داد بزغال‌های با وزن اولیه پایین در شروع پروار ضریب تبدیل بهتری دارند و تاثیر وزن اولیه پروار و سطوح مختلف انرژی جیره بر خصوصیات لاشه متفاوت بود. یافته‌های آبه (۱) نشان داد که بزهای کشتار شده در سن بالاتر، درصد گوشت و چربی لاشه

اندازه بدن و وزن بز بستگی به نژاد آن دارد. به عنوان مثال بلندی بعضی از بزهای خیلی کوچک پاکستانی حدود ۴۷/۵ سانتی‌متر از زمین تا شانه (ارتفاع جدوگاه) است و ۹ کیلوگرم نیز وزن دارند. وزن بعضی از بزهای نر نژاد سفید آلمانی تا ۱۱۰ کیلوگرم و بلندی قامت نژاد جمناباری هند تا ۱۲۲ سانتی‌متر می‌رسد (۲۵). اکثر رنگ توده بزهای ایرانی از جمله مهابادی (اصفهان) و بزهای خلخال، بوشهری، افشاری، بختیاری، بز بومی سیستان و بلوچستان، سمنان، زنجان، فارس، گیلان سیاه است اگرچه سایر رنگ‌ها کمابیش بصورت ترکیبی نیز در آنها دیده می‌شود. رنگ بز مهابادی آذربایجان غربی دارای سرو گردنی سیاه ولی بدنی سفید است. رنگ بز نجدی بیشتر (حدود ۶۰ درصد) آهویی تا قهوه‌ای است طول بدن در این بز نجدی به ترتیب ۹۳/۷ و ۹۲/۷ سانتی‌متر در نر و ماده بالغ می‌باشد. ارتفاع جدوگاه در

بیشتری داشتند. ایلامی و همکاران (۹) اثرات دو گروه وزن اولیه پروار (۱۸/۳ و ۲۷/۴ کیلوگرم) و سه سطح انرژی جیره (۱/۹، ۲/۱ و ۲/۳ مگا کالری انرژی قابل متابولیسم در کیلوگرم) بر خصوصیات رشد و ویژگی‌های لاشه بزغاله‌های نر بومی فارس را بررسی کردند. میانگین اضافه وزن روزانه و ضریب تبدیل غذایی بین دو گروه وزنی و در جیره‌های مختلف تفاوت آماری معنی‌داری نشان داد ($p < 0/05$). درصد وزن لاشه سرد به وزن زنده بین دو گروه وزنی ($p < 0/01$) و در بین جیره‌ها ($p < 0/05$) تفاوت داشت. آنها در نهایت بیان کردند که پروار بزغاله‌های با وزن پایین و با جیره پرانرژی اقتصادی‌تر بود. از عوامل موثر بر خصوصیات رشد، ضریب تبدیل غذایی و مقدار ماده خشک مصرفی در بزغاله‌های بومی ایران سطوح انرژی و پروتئین می‌باشد (۲۲). مقدار شیر بزهای بوی آذربایجان شرقی، مهابادی (آذر بایجان غربی)، خلخال، مهابادی (اردستان اصفهان)، بوشهری، افشاری، سمنان، کرکی آباد ۱۸۰، ۲۱۶، ۱۲۸، ۱۴۵، ۶۵، ۱۲۰، ۱۰۳، ۲۰۰، ۳۵ لیتر در یک سال گزارش شده است (۱۸). بزغاله‌های نژاد نجدی خوزستان دارای چندقلوبی بالایی بوده و از نظر تولد مثل جز بهترین نژادها است. متوسط تولید شیر در این نژاد حدود یک لیتر در روز است (۲۱). میزان شیر تولیدی بزهای سانن در دوره ۲۸۰ روزه‌ای شیردهی به ۷۰۰ کیلوگرم می‌رسد. نژادهای رکورددار سانن در آمریکا در یک سال بیش از ۲ هزار کیلوگرم شیر تولید کرده‌اند (۲۵). مقدار تولید شیر، تداوم تولید و ترکیبات شیر به سطح انرژی و پروتئین شیر وابسته است (۱۷). با توجه به اینکه پرورش بز در ایران بیشتر در مناطق روستای و عشایری با مراتع فقیر پرورش داده می‌شود کم بودن تولید شیر در بزهای ایرانی ناشی از عدم تامین نیازهای تغذیه‌ای آنها در سطح مطلوب، بخصوص در دوره شیردهی می‌باشد.

در یک تحقیق وزن تولد بز نجدی در نر و ماده به ترتیب ۲/۷۰ و ۲/۴۶ کیلوگرم بود. لذا مقایسه وزن تولد بزغاله‌های بومی لرستان با سایر نژادهای ایران در حدود ۳-۲/۵ کیلوگرم گزارش کرده‌اند (۲۱). بزها از نظر اندازه‌های بدن به طور چشمگیری با هم تفاوت دارند (۲۱). در نژاد سانن وزن بزهای ماده در حدود ۵۰ کیلوگرم و وزن نرها ۶۰ تا ۶۵ کیلوگرم و در بز نژاد آلپاین وزن متوسط بلوغ در جنس نر ۶۵ تا ۸۰ کیلوگرم و در جنس ماده ۵۰ تا ۶۰ کیلوگرم گزارش شده است.

پایی و میرزائی (۱۸) اوزان تولد، از شیرگیری، ۶ ماهگی و بز بالغ را در بز کرکی آباد، بز بومی سمنان، نجدی، عدنی بوشهر و بز سیاه بوشهر را برترتیب در جنس‌های نر و ماده (۲/۵، ۳/۵)، (۱۶، ۱۴)، (۲۵، ۲۲)، (۴۸، ۳۸) کیلوگرم - (۲/۳، ۱/۹)، (۲۱، ۱۸)، (۲۸، ۲۴)، (۳۴، ۲۹) کیلوگرم - (۲/۶، ۲/۴)، (۱۳/۲، ۱۱/۶)، (۱۶، ۱۴/۳)، (۳۳/۷، ۲۶/۷) کیلوگرم - (۲/۳، ۲/۴)، (۶/۸، ۶/۴)، (۱۵/۵، ۱۴/۱)، (۳۵، ۲۰) کیلوگرم - (۱/۶، ۱/۴)، (۱۶/۵، ۱۵/۳)، (۲۴/۵، ۲۱/۵) و (۳۱/۳، ۳۵/۵) کیلوگرم گزارش کردند که در وزن متناظر تفاوت‌های معنی‌داری با پژوهش حاضر نشان دادند. در یک مطالعه طول دسته الیاف برای بزهای راینی در سن ۸ ساله $0/51 \pm 6/54$ سانتی‌متر بدست آمد (۱۹) در صورتیکه در بزهای ۱، ۲ و ۳ ساله لری به ترتیب $0/11 \pm 5/54$ ، $0/11 \pm 5/28$ و $0/10 \pm 5/84$ سانتی‌متر بدست آمد. ملاحظه می‌شود که در بز لری طول دسته الیاف از بزهای راینی پایین‌تر می‌باشد. در یک مطالعه طول تک تار مو در بزهای نر $0/7 \pm 12/8$ سانتی‌متر) بیش از بزهای ماده $0/5 \pm 10/2$ سانتی‌متر) بود و در بزهای بومی، آمیخته نسل اول و دوم به ترتیب $0/12 \pm 6/0$ ، $0/4 \pm 10/3$ و $1/1 \pm 12/2$ سانتی‌متر بود. وزن بیده در بزهای آمیخته بومی با کرکی جنوب خراسان در مقایسه با بزهای بومی قم،

پرور بزرگاله‌ها بالاترین افزایش وزن روزانه در ۱۰ ماهگی، ۱۳۲/۹۹ گرم و کمترین آن در ۶ ماهگی با ۹۵/۵۹ گرم در روز بود.

منابع

1. Abebe, G. 2000. Carcass characteristics of Somali goats slaughtered at different ages. Proc. of the 7th international conf. on goats, France. 15-21 May 2000. Pp 829.
2. American Society for Testing Materials. 1978. Diameter of wool and other animal fibers by microprogection. D2130-78.32:498-507.
3. American Society for Testing Materials. 1987. Test method for diameter and other animal fibers by microprogection. D2130-22. approved March 10, 2000. Published June 2000. Annual Book of ASTM Standards Publications, 7(1):11.
4. Asad, M. 1997. Design and analysis of agricultural experiments. Shiraz University Press, Pp: 544. [In Persian]
5. Asadi Moghadam, R., Zakhari, J., Kashanian, N. Razaqzadeh S. 1997. investigation of quantitative and qualitative characteristics of Marquz goat fibers and the effect of some factors on them. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*. 28(1):1-10. [In Persian]
6. Chegani, A.R., Sarhadi, F., Moneem, M. Viarhamdi, B. 2004. Identification of phenotypic and production characteristics of Lorestan's native goat, final report, Lorestan Agriculture and Natural Resources Research Center, AREEO, Khorramabad, Iran, Pp: 35. [In Persian]
7. Chegeni, A.R. 2003. Investigating the effect of age and sex on the characteristics and composition of the carcass of Lori sheep. Master's thesis, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz. [In Persian]
8. Food and Agriculture Organization (FAO). 2023. Major Food and Agricultural

۲۱ گرم افزایش داشت که این تفاوت معنی‌دار نبود (۲۰). در مطالعه‌ای ویژگی‌های کمی و کیفی الیاف بزهای مرغز ایستگاه دامپروری سنندج شامل میانگین قطر الیاف در نمونه‌ها $28/6 \pm 0/62$ میکرون بوده و اثر جنس بر روی قطر الیاف معنی‌دار ($p < 0/05$) و اثر سن بسیار معنی‌دار بود ($p < 0/0001$). میانگین طول الیاف در سیستم Hautcur در نمونه‌ها برابر $45/2 \pm 2/07$ میلی‌متر و در سیستم Barbe برابر $73/8 \pm 3/64$ میلی‌متر بوده و سن جنس و رنگ اثر معنی‌داری روی طول الیاف نداشت (۵). زاخری (۲۶) میانگین چربی الیاف بز راینی را ۱/۲۹ تا ۳/۱ درصد، میانگین قطر الیاف را ۱۴/۶۳ تا ۱۸/۷۵ میکرون و متوسط طول الیاف را ۴۷/۴ تا ۶۲/۵ میلی‌متر گزارش نموده است که با نتایج پژوهش حاضر تفاوت معنی‌داری داشتند. با توجه به اهمیت الیاف بز صادره از کشور که از نظر اقتصادی بعد از چین مقام دوم را در جهان دارد (۵) باید توجه لازم به تفکیک انواع الیاف بز تولیدی در کشور مبذول گردد و از تداخل این الیاف در محموله‌های تجاری جلوگیری به عمل آید.

نتیجه‌گیری

بنابر نتایج، بجز صفات عمق سینه و پنهایی دست‌ها، در بین گروه‌های سنی مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در مقایسه شیر تولیدی در فصول مختلف، بیشترین شیر تولیدی در اردیبهشت با ۹۴۳/۲ میلی‌لیتر بازای هر رأس و کمترین میزان شیر در مرداد با ۲۸/۵ میلی‌لیتر بدست آمد. متوسط طول دوره شیردهی ۴ ماه و میانگین کل تولید شیر روزانه یک رأس در گله حدود ۳۸۴ میلی‌لیتر بود. اثر جنس بر وزن تولد معنی‌دار نشد. در بررسی اثر سن بر طول مو، راندمان، درصد چربی و قطر مو بجز طول مو تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. اثر جنس بر وزن‌های مختلف از شیرگیری تا ۹ ماهگی معنی‌دار شد. در

17. Moranm Fehr, P., Sauvant, D. 1980. Composition and Yield of Goat Milk as Affected by Nutritional Manipulation. *Journal of Dairy Science*. 63(10): 1671-1680. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)83129-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)83129-8).
18. Papi, N., Mirzaei, F. 2019. Introduction of Iran's native goats, Agricultural Education Publication, Iran, Pp: 124 [In Persian]
19. Salehi, M. Tahirpour, N., Kurang Beheshti, M. 2000. The effect of environmental factors (age and gender) and the type of rearing on the characteristics of the fur of Rayini goats, *Research and Production*. 47: 90-95. [In Persian]
20. Savar Sofla, S., Salehi M. 2016. The study of fiber characteristics in cross bred Qom native goats × South Khorasan woolly goats, *Livestock products*. 18(3) 635-646. [In Persian]
21. Sayad Nejad, M.B. 1992. Investigating phenotypic traits and production characteristics of Najdi goat (Khuzestan). Master's thesis, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University. [In Persian]
22. Shadnoosh, Gh. 2015. The effect of dietary energy and protein levels on the growth and fattening performance of native goats. *Animal Production Research*. 2:57-68. [In Persian]
23. Singh, M. K., Singh, S.K., Dige, M.S. Kumar, A. 2021. Genetic and non-genetic factors affecting first parity growth, reproductive and lactation traits in Barbari goats under semi-intensive management in semi-arid region of India. *Indian Journal of Animal Sciences*. 91(2):128-136.
24. Soltani, A.D. 2002. The use of SAS software in statistical analysis (for agricultural fields), Jihad Academician, Mashhad Unit Publications. P: 168. [In Persian]
25. Yarahmadi, B., Chegini, A. 2024. Principles of rearing goats and kids. Commodities and Producers, <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity>.
9. Ilami B., Naji Zawareh, A. 2011. The effect of initial live weight and diet energy on the growth and carcass characteristics of male goats native to Fars. *Journal of Animal Science (Research and Production)*, 24(2):51-58. [In Persian]
10. Iran Institute of Standards and Industrial Research. 1975. The method of determining the percentage of fibers with modulus by microscope. Tehran, Ministry of Industries. Standard number: 1458. [In Persian]
11. Iran Institute of Standards and Industrial Research. 1986. The method of determining the the ratio of fibers present in sheep's wool. Tehran Ministry of Industries. Standard number: 2259. [In Persian]
12. Karimi Far, M. 2011. Statistics in social sciences, Payam Noor Publications, Pp: 235. [In Persian]
13. Khaldari, M. 2004. Sheep and goat husbandry, Jihad University Publications, Tehran branch. Pp: 505. [In Persian]
14. Kianzadeh, M.R. 1995. Investigating the effect of age and sex on the growth rate and carcass characteristics of fattening lambs. Master's thesis, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tehran. [In Persian]
15. Maqsoodi Nejad, Q., Rezaei, M., Sajadi, B., Jafari KHorshidi, K.1997. Investigating the effect of age and sex of Mazandaran Zel lambs on fattening ability and carcass characteristics. Final report, Ilam Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Ilam, Iran. [In Persian].
16. Monem, M. Ismaili Rad, I., Dukhanchi, S. 1988. project of identification native sheep of Iran - Mughani sheep - Animal Science Research Institute of Iran. National identifier of the scientific document No.: R-1086239, Pp:120. [In Persian].

Lorestan Academic Jihad Publishing
Organization, Pp: 221 [In Persian]

26. Zakhari, J. 2016. Investigating the quality of the production of fur in the country in relation to the establishment of hair pulling industries and the rearing of native goats. Standard Industrial Research Institute of Iran. Pp: 24. [In Persian]

Research Article

Study of Heavy Metals in Farmed Rainbow Trout in Sousan-e Sorkhab Andika

Valid Chenaneh¹, Reza Salighehzadeh^{1*}, Mohsen Pournia², Marjan Mosafer³

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

2- Department of Microbiology, Masjed-Soleiman Branch, Islamic Azad University, Masjed-Soleiman, Iran

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

*Corresponding author: rezasalighehzadeh@yahoo.com

Received: 11 July 2024

Accepted: 6 October 2024

DOI: 10.60833/ascij.2025.1126234

Abstract

With the transfer of pollutants to the aquatic environment, there is a possibility of absorption and accumulation of some heavy metals in the tissues of the fish body through the food chain or water. The higher average concentration of heavy metals in fish compared to international standards can be considered as a serious alarm for relevant officials and institutions because the continuous use of this products can cause dangerous diseases. Therefore, the purpose of the present study was to study heavy metals in farmed rainbow trout of SosanSorekh region of Andika water. For this purpose, this study was carried out on the farmed trout fish of SosanSorekh region of Andika water. After preparing samples from fish, measuring the concentration of heavy metals remaining in fish muscle, including As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sn and Zn was measured. Results showed that Zn and Cd were the maximum and minimum concentrations in meat of rainbow trout. Compared the values of heavy metals measured with international hygienic standards showed that the concentration of all metals were significantly lower than the limit ($p < 0.05$). The assessment of health risk showed that daily and continuous consumption of these products by consumers except Pb, Hg and As is completely safe and there is no risk for them. The mean concentration of all measured heavy metals were less than global standards. Estimation of daily receiving in all metals, except for As and Pb, showed that the use of rainbow trout did not currently cause a danger for human health, However, in order to prevent the occurrence of potential pollution in the future, management should be paid more attention to these pollutants and resources.

Keywords: Heavy metals, *Oncorhynchus mykiss*, Sousan-e Sorkhab, Assessment of health risk.



مطالعه فلزات سنگین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی منطقه سوسن سرخاب اندیکا

ولید چنانه^۱، رضا سلیقه‌زاده^{۱*}، محسن پورنیا^۲، مرجان مسافر^۳

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

۲- گروه میکروبیولوژی، واحد مسجد سلیمان، دانشگاه آزاد اسلامی، مسجد سلیمان، ایران

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

*مسئول مکاتبات: rezasalighehzadeh@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۲۱

DOI: 10.60833/ascij.2025.1126234

چکیده

انتقال آلاینده‌ها به محیط‌های آبی و جذب و انباشته‌شدن برخی از فلزات سنگین در درون بافت‌های بدن ماهی از طریق زنجیره غذایی به عنوان زنگ خطری جدی برای مسئولان و نهادهای ذیربط به شمار می‌آید زیرا استفاده مداوم از این محصولات می‌تواند سبب بروز بیماری‌های خطرناک گردد. لذا هدف از انجام مطالعه حاضر، مطالعه فلزات سنگین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی منطقه سوسن سرخاب اندیکا بود. بدین منظور، پس از تهیه نمونه از ماهیان، سنجش غلظت فلزات سنگین باقیمانده در عضله ماهی‌ها، شامل آرسنیک، کادمیوم، کبالت، کروم، جیوه، مس، آهن، منگنز، مولیبدن، نیکل، سرب، قلع و روی اندازه‌گیری شدند. یافته‌های تحقیق نشانگر این بودند که فلزات روی و کادمیوم به ترتیب دارای بیشترین و کمترین غلظت در بافت عضله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بودند. مقایسه مقادیر فلزات سنگین اندازه‌گیری شده با استانداردهای بهداشتی بین‌المللی نشان داد که غلظت تمامی عناصر به طور معنی‌داری کمتر از حد مجاز بودند ($p < 0/05$). ارزیابی خطر بهداشتی نشان داد که مصرف روزانه و مداوم این محصولات توسط مصرف‌کنندگان به جز سرب، جیوه و آرسنیک کاملاً ایمن بوده و مخاطره‌ای از این نظر برای آنها وجود ندارد. میانگین غلظت تمام فلزات اندازه‌گیری شده از استانداردهای جهانی کمتر بودند. برآورد دریافت روزانه در همه فلزات به جز آرسنیک، جیوه و سرب نشان داد که مصرف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در حال حاضر خطری را برای سلامتی انسان ایجاد نمی‌کنند، با این وجود برای پیشگیری از رخداد آلودگی احتمالی در آینده از نظر مدیریتی باید توجه بیشتری به این آلاینده‌ها و منابع احتمالی آنها شود.

کلمات کلیدی: فلزات سنگین، قزل‌آلای رنگین‌کمان، سوسن سرخاب، ارزیابی خطر بهداشتی.

مقدمه

بخش اعظمی از آلودگی‌های زیست بوم آبی را شامل می‌شوند (۱۴). موضوع شایان ذکر اینجاست که همانگونه که مطالعات بسیاری نشان می‌دهند رابطه مستقیمی میان نوع و میزان تجمع فلزات سنگین در رسوبات، ستون آب و جانوران آبی وجود دارد. از

امروزه آلودگی محیط‌های آبی با فلزات سنگین یکی از مشکلات جهان شمول می‌باشد. فلزات سنگین به صورت طبیعی از طریق هوازدگی سنگ بسترها و یا از طریق فعالیت‌های انسانی همچون معدنکاری، حمل‌ونقل، کشاورزی و سایر فعالیت‌های صنعتی

این‌رو فلزات سنگین، با منشاء آب آلوده به سهولت در بافت بدن آبزیان تجمع یافته و از طریق تغذیه ماهیان آلوده توسط مصرف‌کنندگان وارد بدن انسان می‌شوند. نگرانی حاصل از این مورد، این است که مصرف ماهی آلوده ممکن است به اثرات سوء بهداشتی در انسان منجر شود. حتی فلزات انباشته شده در اندام‌های ماهی ممکن است خطرهای بهداشتی بیشتری نسبت به فواید ماهی برای سلامتی انسان به ویژه برای جمعیت‌های با میزان سرانه بالای مصرف ماهی داشته باشد. این فلزات زمانی که به وسیله انسان مصرف می‌شوند، اغلب اثرات قوی و زیان‌باری را به همراه دارند. جیوه، کادمیوم، کبالت و سرب از جمله فلزات غیرضروری می‌باشند که آثار ناگواری همچون ایجاد استرس، افزایش ابتلا به سرطان، عقب ماندگی و ناهنجاری‌های ذهنی در کودکان، افزایش فشار خون، اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیک اندام‌هایی همچون کلیه‌ها و کبد تنها بخشی از آثار مخرب ناشی از تجمع این نوع از فلزات سنگین می‌باشد (۱، ۱۳، ۲۲). از دیگر فلزات غیرضروری می‌توان به فلزات کروم و نیکل اشاره نمود که قرار گرفتن مداوم در معرض فلزات مذکور می‌تواند سبب آسیب به کبد، اختلال در سیستم ایمنی و سرطان‌زایی شود (۳، ۱۸، ۲۷). تجمع فلزات آرسنیک و کبالت می‌تواند منجر به ایجاد طیف وسیعی از اختلالات بیولوژیکی و فیزیولوژیکی شود، از جمله مهمترین این آسیب‌ها می‌توان به ایجاد افسردگی، آسیب به کبد و ماکرومولکول‌های مختلف شامل DNA، لیپیدها، و پروتئین‌ها اشاره نمود (۱۶، ۱۳، ۶). فلز آهن از جمله فلزات ضروری می‌باشد. مطالعات بسیاری در اقصی نقاط دنیا بیان می‌دارند که فقر آهن شایع ترین نوع کمبود مواد مغذی در جهان بوده که منجر به مرگ آمار بسیار بالای از افراد جوامع شده است (۳۰، ۲۶، ۲۰، ۱۱). منگنز، روی، مولیبدن و مس از دیگر فلزات ضروری جهت بهبود عملکرد

بسیاری از واکنش‌های بیوشیمیایی همچون تنظیم فعالیت بسیاری از ژن‌ها و آنزیم‌ها می‌باشند که کمبود آنان می‌تواند عواقب نامطلوب بسیاری همچون آسیب به مغز و کلیه شود (۲، ۲۹). با این‌حال علیرغم ایجاد آسیب‌های متعدد ناشی از تجمع فلزات سنگین، چنانچه بررسی‌ها نشان می‌دهند تا کنون مطالعه‌ای در خصوص بررسی غلظت فلزات سنگین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی منطقه سوسن سرخاب اندیکا صورت پذیرفته است. از این‌رو در مطالعه حاضر با هدف بررسی سیزده نوع از فلزات سنگین، سعی بر آن شد تا گام موثری در رفع خلا کمبود اطلاعات مرتبط با ارزیابی سلامت گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی برداشته شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: محل نمونه‌برداری شهرستان اندیکا در شمال شرقی استان خوزستان بود. پس از انتخاب محل نمونه‌برداری و جمع‌آوری نمونه‌ها، توزین نمونه‌های ماهی‌ها صورت پذیرفت، در مرحله بعد نمونه‌های بسته‌بندی و نشانه‌گذاری شده تحت دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شده و در میان کیسه‌های حاوی یخ به آزمایشگاه ارسال شدند. شایان ذکر است که کلیه ظروف مورد نیاز پیش از آغاز آزمایش به طور کامل اسیدشویی شد. بدین صورت که ابتدا توسط مواد شوینده شستشو و سپس به مدت ۲۴ ساعت در محلول اسید نیتریک ۱۰ درصد قرار گرفتند؛ سپس با استفاده از آب دو بار تقطیر به طور کامل شستشو و در آون خشک شدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها: آماده‌سازی نمونه به روش توصیف شده توسط Gholamhosseini و همکاران (۲۰۲۱) از طریق هضم شیمیایی نمونه‌ها با ترکیب اسید نیتریک و اسید پرکلریک (نسبت ۷:۱) انجام شد.

سنجش غلظت فلزات سنگین: سنجش غلظت فلزات سنگین باقیمانده در عضله ماهی‌ها، شامل آرسنیک، کادمیوم، کبالت، کروم، مس، آهن، منگنز، مولیبدن، نیکل، سرب، قلع و روی از طریق دستگاه طیف بینی جذب اتمی انجام شد. همچنین با استفاده از منحنی کالیبراسیون مقادیر جذب به غلظت تبدیل و مقدار نهایی گزارش شد.

تعیین مقدار جیوه: برای تعیین مقدار جیوه انباشته شده در بافت خوراکی ماهی‌ها از روش الکتروشیمیایی ولتامتری با دستگاه پلاروگراف متروم استفاده شد.

ارزیابی خطر بهداشتی: به منظور ارزیابی خطر بهداشتی مصرف این محصولات آبی، شاخص دریافت روزانه (DI) بکار گرفته شد:

$$\text{رابطه ۱: } DI = \frac{(Cm \times IR)}{BW}$$

که Cm غلظت اندازه‌گیری شده در بافت خوراکی (عضله) ماهی بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر، و از آنجایی که ماهی‌ها به شکل تازه (بدون فرایند خشک کردن) توسط مصرف‌کنندگان مورد تغذیه قرار می‌گیرند، غلظت‌های سنجیده شده بر حسب وزن خشک نمونه از طریق رابطه ۲ به به وزن تر تبدیل شدند.

رابطه ۲:

$$\text{Con. In WW} = ((100 - 70\% \text{ of water})/100) * \text{Con in DW}$$

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 ماهی در جامعه مصرف‌کنندگان در نظر گرفته شده است.

تجزیه و تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده ابتدا نرمال بودن آنها با آزمون

کولموگروف-اسمیرنوف بررسی گردید. سپس مقادیر حاصله از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و آزمون تعقیبی دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد با یکدیگر مقایسه شدند. جهت مقایسه غلظت عناصر سنگین با استانداردهای سازمان بهداشت جهانی (WHO) و سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO) از آزمون تی تک‌نمونه‌ای بهره گرفته شد، همچنین کلیه عملیات محاسبات آمار توصیفی و استنباطی در محیط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ صورت گرفت.

نتایج

ارزیابی خطر بهداشتی نشان داد که با توجه به حداکثر مصرف روزانه قابل تحمل (MTDI) فلزات سنگین، مصرف روزانه و مداوم این ماهی توسط گروه‌های سنی مختلف (کودکان و بزرگسالان) مصرف‌کنندگان به جز آرسنیک، جیوه و سرب، کاملاً ایمن بوده و مخاطره‌ای از این نظر برای آنها وجود ندارد (جدول ۱). نتایج حاصل از آمار توصیفی مقدار باقیمانده عناصر آرسنیک، کادمیوم، کبالت، کروم، مس، آهن، جیوه، منگنز، مولیبدن، نیکل، سرب، قلع و روی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در جدول ۲ نشان داده شده است. فلزات روی و کادمیوم به ترتیب دارای بیشترین و کمترین غلظت در بافت عضله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بودند. مقایسه مقادیر فلزات سنگین باقیمانده در گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استانداردهای بهداشتی بین‌المللی نشان داد که غلظت تمامی عناصر به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کمتر از حد مجاز بودند (جدول ۳).

جدول ۱- نتایج ارزیابی ریسک سلامت قزل‌آلای رنگین‌کمان نسبت به فلزات سنگین

Table 1. The results of health risk assessment of rainbow trout of regarding heavy metals			
Heavy metal	Daily intake (mg/g of body weight per day)		MTDI*
	children	Adults	(mg.g ⁻¹ BW/day)
Arsenic (As)	1.29×10^{-1}	7.42×10^{-2}	5×10^{-2}
Cadmium (Cd)	5.87×10^{-3}	3.35×10^{-3}	6×10^{-3}
Cobalt (Cb)	7.4×10^{-3}	4.23×10^{-3}	
Chromium (Cr)	1.21×10^{-1}	6.92×10^{-2}	2
Copper (Cu)	4.18×10^{-2}	2.39×10^{-2}	3×10^1
Iron (Fe)	7.5×10^{-1}	4.29×10^{-1}	1×10^2
Mercury (Hg)	7.6×10^{-2}	4.34×10^{-2}	3×10^{-2}
Manganese (Mn)	1.66×10^{-3}	9.51×10^{-4}	
Molybdenum (Mo)	1.57×10^{-2}	9.01×10^{-3}	
Nickel (Ni)	1.32×10^{-1}	7.53×10^{-2}	3×10^{-1}
Lead (Pb)	4.35×10^{-2}	2.49×10^{-2}	2.1×10^{-1}
Tin (Sn)	1.42×10^{-1}	8.12×10^{-2}	
Zinc (Zn)	8.02×10^{-1}	4.58×10^{-1}	6×10^1

* MTDI: حداکثر مصرف روزانه قابل تحمل (NRC, 1989; JECFA, 2000)

* MTDI: Maximum Tolerable Daily Intake (NRC, 1989; JECFA, 2000)

جدول ۲- آمار توصیفی میزان فلزات سنگین سنجیده شده در ماهیان مورد مطالعه (برحسب میلی گرم بر کیلوگرم وزن خشک)

Table 2. Descriptive statistics of heavy metals in the studied fish (mg/kg of dry body weight)	
Heavy metals	Concentration
Arsenic (As)	0.28 ± 0.01
Cadmium (Cd)	0.01 ± 0.01
Cobalt (Cb)	0.01 ± 0.01
Chromium (Cr)	0.26 ± 0.05
Copper (Cu)	0.09 ± 0.01
Iron (Fe)	1.62 ± 0.30
Mercury (Hg)	0.16 ± 0.01
Manganese (Mn)	0.01 ± 0.01
Molybdenum (Mo)	0.03 ± 0.01
Nickel (Ni)	0.28 ± 0.08
Lead (Pb)	0.09 ± 0.01
Tin (Sn)	0.30 ± 0.01
Zinc (Zn)	1.93 ± 0.61

جدول ۳- نتایج مقایسه آماری میزان فلزات سنگین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استانداردهای جهانی (FAO/WHO)

Table 3. The comparison of the amount of heavy metals in rainbow trout with international standards (FAO/WHO)					
Heavy metals	Standard value (PPM)	Difference between the mean and the standard	t statistic	Df	P-Value
Arsenic (As)	0.5	-0.21920	-5.447	9	0.000
Cadmium (Cd)	0.2	-0.18730	-5.483	9	0.000
Cobalt (Cb)	50	-49.98400	-3.242	9	0.000
Chromium (Cr)	30	-29.73777	-1.780	9	0.000
Copper (Cu)	100	-99.90960	-4.016	9	0.000
Iron (Fe)	100	-98.37700	-1.005	9	0.000
Mercury (Hg)	0.2	-0.03550	-1.764	9	0.000
Manganese (Mn)	50	-49.99640	-7.026	9	0.000
Molybdenum (Mo)	150	-149.96590	-2.981	9	0.000
Nickel (Ni)	0.5	-0.21700	-8.547	9	0.000
Lead (Pb)	0.4	-0.30580	-3.071	9	0.000
Tin (Sn)	250	-249.72391	-7.209	9	0.000
Zinc (Zn)	150	-249.69270	-2.402	9	0.000

بحث

نخواد داشت. Khoshbin و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه‌ای به بررسی تجمع زیستی سرب، نیکل و کادمیوم در بافت عضله، کبد و پوست ماهی شوریده و کوتر چشم درشت پرداختند و گزارش نمودند میزان غلظت سرب و کادمیوم در بافت عضله ماهیان شوریده و کوتر چشم درشت کمتر از حد مجاز استانداردهای وزارت شیلات و کشاورزی انگلستان (MAFF)، سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA)، سازمان جهانی غذا و کشاورزی (FAO) و آژانس حفاظت محیط‌زیست آمریکا (USEPA) بود، درحالی‌که غلظت فلز نیکل در مقایسه با حد مجاز استاندارد سازمان بهداشت جهانی (WHO) بیشتر به دست آمد (۱۰). نوروزی و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه‌ای به بررسی تجمع فلزات سنگین در بافت‌های سه گونه ماهی در آب‌های خلیج فارس و ارتباط آن با برخی مشخصات زیست‌سنجی پرداختند و گزارش نمودند طبق داده‌های ثبت شده و مقایسه با استانداردهای سازمان بهداشت جهانی، سازمان کشاورزی و غذایی سازمان ملل و اداره محیط زیست آمریکا هر ۴ فلز سرب، کادمیوم، جیوه و آرسنیک بالا تر از حد مجاز استاندارد بود و برای سلامتی انسان مضر است (۱۵). Barrientos و همکاران (۲۰۱۹) در بررسی سلامت مصرف ماهی قزل‌آلا در سه حوزه آبخیز در شیلی در بیان نمود، میزان غلظت فلزات سنگین ارزیابی شده شامل مس، منگنز، آهن، سرب، کادمیوم و روی کمتر از استاندارد بیان شده توسط FAO بود. Łuczyn'ska و همکاران در سال ۲۰۲۲ در بررسی فلزات سنگین در ۱۰ گونه از کپور ماهیان بیان نمودند شاخص HI کمتر از یک بوده و مصرف گونه‌های مورد بررسی خطری برای مصرف‌کنندگان به همراه نداشت و میزان غلظت فلزات سنگین از محدوده استانداردهای بیان شده توسط FAO تجاوز

فلزات سنگین پس از ورود به بوم سامانه‌های آبی در بافت‌ها و اندام‌های آبزیان و از جمله ماهیان تجمع می‌یابند. از آنجایی‌که ماهی‌ها بخشی از رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهند، این فلزات می‌توانند بوسیله تغذیه از ماهیان آلوده وارد بدن انسان گردند. از این‌رو بررسی آلودگی ماهیان به یکی از دغدغه‌های اساسی تبدیل شده است (۱۹، ۱۷، ۸). در دهه اخیر مطالعات متعددی بر روی ارزیابی فلزات فلزات سنگین گونه‌های مختلف ماهیان انجام شده است (۲۸، ۲۵، ۲۳، ۹). بررسی صورت گرفته در راستای سنجش غلظت فلزات سنگین نشان داد که فلزات روی و کادمیوم به ترتیب دارای بیشترین و کمترین غلظت در بافت عضله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بودند. شرفی و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعه‌ای به ارزیابی خطر سرطان‌زایی فلزات سنگین ناشی از مصرف ماهی در شهر بندرعباس گزارش نمودند که مقادیر فلز سرب و کادمیوم در ماهی‌های سطح زی، میان زی و کفزی به ترتیب برابر ۰/۰۳، ۰/۰۱۹، ۰/۰۴، ۰/۰۲۸، ۰/۰۰۲ و ۰/۰۰۵۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بودند. Khoshbin و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه‌ای به بررسی تجمع زیستی سرب، نیکل و کادمیوم در بافت عضله، کبد و پوست ماهی شوریده و کوتر چشم درشت پرداختند و گزارش نمودند میزان سرب در عضله ماهیان شوریده و کوتر چشم درشت به ترتیب ۰/۵۹ و ۰/۵۵ غلظت کادمیوم به ترتیب ۰/۷ و ۰/۹ میلی‌گرم/کیلوگرم به دست آمد (۹). Solgi و Beigzadeh-Shahraki در سال ۲۰۱۹ مس بیشترین و کبالت کمترین میزان غلظت در ماهی قزل‌آلا ۸ شهر در استان چهارمحال و بختیاری را شامل می‌شدند (۲۳). در مقایسه غلظت فلزات ارزیابی شده با حد مجاز استانداردهای ذکر شده، ماهیان مورد بررسی در مطالعه حاضر، کمتر از حد مجاز بود و برای سلامتی انسان آسیبی در پی

نکرد (۱۱). میزان غلظت فلزات سنگین مس، آهن، روی، منیزیم و نیکل با استانداردهای WHO، USPA و FAO نشان داد غلظت فلزات مذکور کمتر از حد مجاز بود. Tahsini و همکاران در سال ۱۳۹۷ بیان نمودند میانگین غلظت فلزات سنگین (مس، آهن، روی، نیکل، منیزیم) پایین تر از حدی بود که با توجه به غلظت فلزات در صورت مصرف بتواند آسیب جدی داشته باشد از سوی دیگر با توجه به سنجش حداکثر مصرف روزانه قابل تحمل نیز نشان داد مصرف روزانه و مداوم این ماهی توسط گروه های سنی مختلف (کودکان و بزرگ سالان) مصرف کنندگان به جز آرسنیک و سرب، کاملاً ایمن بوده و مخاطره ای از این نظر برای آنها وجود ندارد. Ezemonye و همکاران (۲۰۱۹) در بررسی سلامتی غلظت فلزات سنگین در سطح آب، میگو (*Macrobrachium macrobrachion*) و ماهی (*Brycinus longipinnis*) از رودخانه Benin، نیجریه بیان نمود میزان THQ در میگو کمتر از یک بود در حالیکه در ماهی بیشتر از یک بود. از این رو علیرغم ایمن بودن مصرف میگو، مصرف ماهی خطر بالقوه سلامتی را به همراه داشت.

Tahsini و همکاران در سال ۱۳۹۷ بیان نمودند میانگین غلظت فلزات سنگین (مس، آهن، روی، نیکل، منیزیم) شاخص ارزیابی ریسک نشان داد برای فلزات مس و روی بیش از یک بود که نشان داد مصرف ماهی قزل‌آلا با نرخ مصرف ۲۵ گرم در روز برای مصرف‌کنندگان ریسک‌های آشکاری را به همراه دارد. با توجه به شاخص ریسک، حد مجاز مصرف این ماهی به میزان ۷/۸۸۸ گرم در روز برای

بزرگسالان و ۷/۱۷۷ گرم در روز برای کودکان محاسبه شد. Sharafi و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعه‌ای به ارزیابی خطر سرطان‌زایی فلزات سنگین ناشی از مصرف ماهی در شهر بندرعباس پرداختند و گزارش نمودند از دیدگاه سلامت انسان، مقادیر THQ برای هر عنصر و مقادیر کل خطر هدف (TTHQ) برای هر دو عنصر کمتر از ۱ بودند. علاوه بر این، مقادیر CR برای هر دو فلز کمتر از خطر قابل قبول ابتلا به سرطان در طول عمر (10^{-5}) بود (۲۱). لازم به ذکر است که برای توجیه آلودگی بالای ماهیان حوزه آبریز خلیج فارس به فلزات سنگین باید عنوان نمود که فعالیت‌های اقتصادی در سال‌های اخیر مانند پالایش نفت خام، تولیدات آلومینیوم و روی، تعمیر و ساخت کشتی، تخلیه و بارگیری انواع مواد معدنی و شیمیایی و غیره در سواحل جنوب کشور ایران شکل گرفته است که این موضوع موجب تشدید بار آلودگی و تخریب اکوسیستم حساس آب‌های ساحلی منطقه شده است. لذا شناسایی، اندازه‌گیری و ردیابی عناصر فلزات سنگین با توجه به اثرات زیانباری که بر اکوسیستم‌های دریایی و از جمله آبزیان و به تبع آن بر انسان اثر می‌گذارد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر حاکی از عدم آلودگی ماهیان قزل‌آلای شهرستان اندیکا به فلزات سنگین می‌باشد. با توجه به نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر توصیه می‌شود که جهت جلوگیری از آلودگی ماهیان به فلزات سنگین، اصول و قوانین زیست محیطی رعایت گردد.

منابع

- by inductively coupled plasma -mass spectrometry (ICP -MS) in edible fish collected from three eutrophic reservoirs. Their consumption represents a risk for human health. *Microchemical Journal*, 130:236-244.
9. Jiang Z., Xu N., Liu B., Zhou L., Wang J., Wang C., Dai B., Xiong W. 2018. Metal concentrations and risk assessment in water, sediment and economic fish species with various habitat preferences and trophic guilds from Lake Caizi, Southeast China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157:1-8.
10. Khoshbin A., Pourkhabaz A. ۲۰۲۲. Bioaccumulation of lead, nickel and cadmium in the muscle tissue, liver and skin of salted fish and large-eyed cuttlefish. *Scientific Journal of Iranian Fisheries*, 31(2):1-11. (In Persian).
11. Levi M., Simonetti M., Marconi E., Brignoli O., Cancian M., Masotti A., Pegoraro, V., Heiman, F., Cricelli, C., Lapi, F. 2019. Gender differences in determinants of iron-deficiency anemia: A population-based study conducted in four European countries. *Annals of Hematology*, 98:1573-1582.
12. Łuczyn'ska J., Paszczyk B., Łuczyn'ski, M.J. 2018. Fish as a bioindicator of heavy metals pollution in aquatic ecosystem of Pluszne Lake, Poland, and risk assessment for consumer's health. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 153:60-67.
13. Mitra, S., Chakraborty, A., Tareq, A., Emran, T., Nainu, F., Khusro, A., Idris, A., Khandaker, M., Osman, H., Alhumaydhi, F., Simal-Gandara, J. 2022. Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *Journal of King Saud University – Science*, 34:101865.
14. Noorollahi S., Asghari Moghadam A., Fijani A., Barzegar, R. ۲۰۱۸. Investigating factors affecting the quality of underground
1. Al Olayan E.M., Aloufi A.S., AlAmri O.D., El-Habit O.H., Abdel Moneim A.E. 2020. Protocatechuic acid mitigates cadmium-induced neurotoxicity in rats: Role of oxidative stress. *inflammation and apoptosis. Science of the Total Environment*, 723:137969.
2. Alengebawy A., Abdelkhalek S.T., Qureshi S.R., Wang M.Q. 2021. Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: ecological risks and human health implications. *Toxics*, 9(3):42.
3. Banerjee N., Wang H., Wang G., Khan M.F. 2020. Enhancing the Nrf2 antioxidant signaling provides protection against trichloroethene-mediated inflammation and autoimmune response. *Toxicological Sciences*, 175(1):64-74.
4. Barrientos C., Tapia J., Bertran C., Pena-Cort F., Hauenstein E., Fierro F., Vargas-Chacoff L. 2019. Is eating wild rainbow trout safe? The effects of different land-uses on heavy metals content in Chile. *Environmental Pollution*, 254:112995.
5. Ezemonyea L.I., Adebayoa P.O., Enunekuc,d A.A., Tongoa I., Ogbomidab E. 2019. Potential health risk consequences of heavy metal concentrations in surface water, shrimp (*Macrobrachium macrobrachion*) and fish (*Brycinus longipinnis*) from Benin River, Nigeria. *Toxicology Reports*, 6:1-9.
6. Garza-Lombó C., Pappa A., Panayiotidis M.I., Gonsebatt M.E., Franco R. 2019. Arsenic-induced neurotoxicity Packer: a mechanistic appraisal. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 24 (8):1305–1316.
7. Gholamhosseini A., Shiry N., Soltanian S., Banaee M. 2021. Bioaccumulation of metals in marine fish species captured from the northern shores of the Gulf of Oman, Iran. *Regional Studies in Marine Science*, 41:101599. (In Persian).
8. Griboff J., Wunderlin D.A., Monferran M.V. 2017. Metals, as and Se determination

- City. *Journal of Preventive Medicine*, 8(2):16-24.
22. Singh N., Kumar A., Gupta V.K., Sharma B. 2018. Biochemical and molecular bases of lead-induced toxicity in mammalian systems and possible mitigations. *Chemical Research in Toxicology*, 31:1009e1021.
 23. Solgi E., Beigzadeh-Shahraki F. 2019. Accumulation and human health risk of heavy metals in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from different fish farms of eight cities of Chaharmahal and Bakhtiari Province, Iran. *Thalassas: An International Journal of Marine Sciences*, 35:305-317.
 24. Tahsini H., Alizadeh M., gavilian H. 2019. Evaluation of heavy metals concentration and its consumption risk in trout fish (*Oncorhynchus Mykiss*). *Journal of Environmental Health Engineering*, 6(2):187-196. (In Persian).
 25. Varol M., Kurt Kaya G., Raşit Sünbül M. 2019. Evaluation of health risks from exposure to arsenic and heavy metals through consumption of ten fish species. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(32):33311-33320.
 26. Vos T., Abajobir A.A., Abate K.H., Abbafati C., Abbas K.M., Abd-Allah F., Abdulkader R.S., Abdulle A.M., Abebo T.A., Abera S.F. 2017. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*, 390:1211-1259.
 27. Witkowska D., Joanna S., Karolina C. 2021. Heavy metals and human health: Possible exposure pathways and the competition for protein binding sites. *Molecules*, 26(19):6060.
 28. Yua B., Wang X., Dongc K.F., Xiaoc, G., Ma D. 2020. Heavy metal concentrations in aquatic organisms (fishes, shrimp and crabs) and health risk water in Mashginshahr plain aquifer (Ardebil province) with an emphasis on the possible origin of some heavy metals. *Scientific Quarterly Journal of Sciences the Earth*, 29(114):143. (In Persian).
 15. Nowrozi M., Sadeghi M.M., Bagheri Towani M., Zandavar H. 2018. Accumulation of heavy metals in the tissues of three species of fish in the waters of the Persian Gulf and its relationship with some biometric characteristics. *Environmental Science and Technology*, 21(6):197-212. (In Persian).
 16. Packer, M. 2016. Cobalt cardiomyopathy: a critical reappraisal in light of a recent resurgence. *Circulation: Heart Failure - American Heart Association Journals*, 9:12.
 17. Rajeshkumar S., Li X. 2018. Bioaccumulation of heavy metals in fish species from the meiliang bay, taihu lake, China. *Toxicology Reports*, 5:288-295.
 18. Renu K., Chakraborty R., Myakala H., Koti R., Famurewa A.C., Madhyastha H., Vellingiri B., George A., Gopalakrishnan A.V. 2021. Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium)-induced hepatotoxicity, A review. *Chemosphere*, 271:129735.
 19. Saha N., Mollah M.Z.I., Alam M.F., Rahman M.S. 2016. Seasonal investigation of heavy metals in marine fishes captured from the Bay of Bengal and the implications for human health risk assessment. *Food Control*, 70:110-118.
 20. Seo H., Yoon S.Y., Ul-Haq A., Jo S., Kim S., Rahim M.A., Park H.A., Ghorbanian F., Kim M.J., Lee M., Kim K.H., Lee N., Won J.H., Song H.Y. 2023. The Effects of Iron Deficiency on the Gut Microbiota in Women of Childbearing Age. *Nutrients*, 15(3):69.
 21. Sharafi P., Dindarloo K., Davoodi S.H., Heidari M., Shamsedini M. 2021. Evaluation of heavy metals carcinogenesis due to fish consumption in Bandar Abbas

iIntestinal damage. *Dose Response*, 18(1):1559325820904547.

30. Zurawski D.V., McLendon M.K. 2020. Monoclonal antibodies as an antibacterial approach against bacterial pathogens. *Antibiotics*, 9:155.

assessment in China. *Marine Pollution Bulletin*, 159:1115050.

29. Zhong L., Dong A., Feng Y., Wang X., Gao Y., Xiao Y., Zhang J., He D., Cao J., Zhu W., Zhang S. 2020. Alteration of metal elements in radiation injury: radiation-induced copper accumulation aggravates

Research Article

The Role of miR-143 in Regulating Inflammation and Pulmonary Fibrosis Induced by Mustard Gas: Therapeutic Potential and Clinical Applications

Atieh Tavakoli¹, Nasrin Karimi¹, Mohammad Valizadeh², Mohadeseh Valizadeh^{3*}

1- Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

2- School of Medicine, International Campus, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran

3- Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Shahid beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding Author: Mohadesehvali@sbmu.ac.ir

Received: 11 July 2024

Accepted: 6 October 2024

DOI: 10.60833/ascij.2025.1194119

Abstract

miR-143 is one of the important microRNAs involved in regulating cellular processes such as growth, differentiation, and cell death. Mustard gas (Sulfur Mustard, SM) is a chemical agent known for its destructive effects on the lungs. The damage caused by SM to lung cells can lead to changes in the expression of microRNAs, including miR-143. The aim of this study was to investigate the effects of mustard gas on the expression of miR-143 in the lung tissue of chemical warfare veterans. In this study, 30 lung biopsy samples were collected from chemical warfare veterans with varying degrees of damage (10 samples with moderate damage and 10 samples with severe damage), along with 10 healthy control samples. Total RNA was extracted, and after cDNA synthesis, miR-143 expression was measured using Real-time PCR. U6snRNA was used as an internal control, and GraphPad Prism version 6.07 software was used for statistical analysis. The results showed a significant decrease in miR-143 expression in the lungs of chemical warfare veterans compared to the control group. Specifically, in the severe damage group, this decrease was much more pronounced than in the other groups ($p < 0.0001$). In the moderate damage group, a less significant decrease was observed ($p = 0.7602$). ROC curve analysis also showed that miR-143 could be considered a potential biomarker for identifying lung damage caused by SM, though confirmation of these findings requires further studies.

Keywords: miR-143, Mustard gas, Lung, Gene expression, Biomarker, Chemical injury.

نقش miR-143 در تنظیم التهاب و فیروز ریه ناشی از گاز خردل: پتانسیل‌های درمانی و کاربردهای بالینی

عطیه توکلی^۱، نسرين کریمی^۱، محمد ولی‌زاده^۲، محدثه ولی‌زاده^{۳*}

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- دانشکده پزشکی، پردیس بین‌الملل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران

۳- گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: Mohadesevali@sbmu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۲۱

DOI: 10.60833/ascij.2025.1194119

چکیده

miR-143 یکی از microRNA های مهم است که در تنظیم فرآیندهای سلولی نظیر رشد، تمایز، و مرگ سلولی نقش دارد. گاز خردل (SM) به عنوان یک عامل شیمیایی با اثرات مخرب بر ریه‌ها شناخته می‌شود. آسیب‌های ناشی از SM به سلول‌های ریوی می‌تواند باعث تغییرات در بیان microRNA ها، از جمله miR-143، شود. هدف این مطالعه بررسی اثرات گاز خردل بر بیان miR-143 در بافت ریه جانبازان شیمیایی می‌باشد. در این تحقیق، ۳۰ نمونه بیوپسی ریه از جانبازان شیمیایی با درجات مختلف آسیب (۱۰ نمونه با آسیب متوسط و ۱۰ نمونه با آسیب شدید) و ۱۰ نمونه کنترل سالم جمع‌آوری شد. RNA Total استخراج و پس از سنتز cDNA، بیان miR-143 با استفاده از Real-time PCR اندازه‌گیری شد. از U6 snRNA به عنوان کنترل داخلی و از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه 6.07 جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها استفاده شد. نتایج نشان‌دهنده کاهش معنادار بیان miR-143 در ریه جانبازان شیمیایی نسبت به گروه کنترل بود. به ویژه، در گروه جانبازان با آسیب شدید، این کاهش به طور چشمگیری بیشتر از گروه‌های دیگر بود ($p < 0.001$). در حالی که در گروه آسیب‌های متوسط، کاهش کمتری مشاهده شد ($p = 0.076$). نتایج منحنی ROC نیز نشان داد که miR-143 می‌تواند به عنوان یک بیومارکر بالقوه برای شناسایی آسیب‌های ریوی ناشی از SM در نظر گرفته شود، اما تایید این یافته‌ها نیازمند مطالعات بیشتری است.

کلمات کلیدی: miR-143، گاز خردل، ریه، بیان ژن، بیومارکر، آسیب شیمیایی.

مقدمه

دستگاه تنفسی دارد. یکی از عوارض مهم و شایع گاز خردل، آسیب‌های ریوی است که در جانبازان شیمیایی منجر به مشکلات تنفسی مزمن، التهابی و فیروزی می‌شود. این آسیب‌ها معمولاً به دنبال مواجهه با این عامل شیمیایی، تغییرات متابولیکی و ژنتیکی در سلول‌های ریوی ایجاد می‌کنند که موجب آسیب‌های

گاز خردل (Sulfur Mustard, SM) یک عامل شیمیایی با خواص تاول‌زایی و سمیت سلولی است که در طول جنگ‌های شیمیایی، از جمله جنگ جهانی اول و جنگ ایران و عراق، به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته است. این ماده شیمیایی تأثیرات مخربی بر روی اندام‌های مختلف بدن، به ویژه پوست، چشم‌ها و

گاز خردل و سایر آسیب‌های مشابه مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، نمونه‌های بیوپسی ریه از ۳۰ فرد جمع‌آوری شد که شامل ۱۰ جانباز در معرض گاز خردل (SM) با عوارض متوسط ریوی (moderately SM-exposed patients)، ۱۰ جانباز در معرض گاز خردل با عوارض شدید ریوی (highly SM-exposed patients) و ۱۰ نفر به عنوان گروه کنترل بدون سابقه مواجهه با عوامل دیگر بودند (جدول ۱). نمونه‌های بافت ریه این تحقیق از بخش برونکوسکوپی مجتمع بیمارستانی بقیه‌الله الاعظم جمع‌آوری شدند. این نمونه‌ها تحت نظارت مستقیم پزشکان فوق تخصص ریه و با دستگاه برونکوسکوپی جمع‌آوری گردیدند. گروه مصدومین شامل بیمارانی بودند که به دلیل ناراحتی‌های ریوی ناشی از مسمومیت قبلی با سولفور موستارد و به دستور پزشکان تحت عمل برونکوسکوپی قرار گرفته بودند. نمونه‌های گروه شاهد از بانک زیستی بیمارستان بقیه‌الله (عج) تهیه شدند. تمامی افراد پیش از انجام مطالعه، رضایت‌نامه کتبی و آگاهانه خود را به تأیید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات (شماره IR.IAU.SRB.REC.1399.095) رساندند. نمونه‌ها از محل ضایعات ریوی جمع‌آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (جدول ۱). استخراج RNA کل با استفاده از معرف TRIZOL (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) طبق پروتکل سازنده انجام شد. سپس غلظت RNA با استفاده از ابزار NanoDrop (ND-1000) اندازه‌گیری شد. کیفیت RNA با استفاده از ژل الکتروفورز و اسپکتروفتومتر Vis ارزیابی گردید. جهت سنتز cDNA، ۲۰ نانوگرم از RNA کل خالص‌شده با استفاده از DNase I و کیت Universal cDNA synthesis Kit (Exiqon, Denmark) انجام شد. فرآیند سنتز cDNA در دمای ۴۲

دائمی به بافت ریه می‌گردد (۱۳، ۱۴). microRNAها (miRNAs) مولکول‌های RNA غیرکدگذاری هستند که در تنظیم بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی از جمله تمایز سلولی، تکثیر سلولی، مرگ سلولی و پاسخ‌های التهابی نقش دارند. این مولکول‌ها از طریق هدف‌گیری mRNA های خاص و مهار ترجمه آن‌ها، می‌توانند در فرآیندهای سلولی مختلف اثرگذار باشند (۱). تغییرات در سطح بیان miRNA ها می‌تواند نشانه‌ای از اختلالات و بیماری‌ها باشد و آن‌ها را به‌عنوان ابزارهای تشخیصی و درمانی بالقوه معرفی می‌کند (۲). miR-143 یکی از miRNA هایی است که در بسیاری از فرآیندهای سلولی از جمله تنظیم التهابات و فیبروزی نقش کلیدی دارد. این miRNA به‌ویژه در بیماری‌های ریوی و آسیب‌های بافتی مرتبط با فیبروز ریه و التهاب، مورد توجه قرار گرفته است (۱۸). miR-143 با تنظیم عوامل مختلف ژنتیکی و پروتئینی که در فرآیندهای التهابی و فیبروزی دخیل هستند، به‌طور مستقیم بر تغییرات ساختاری و عملکردی بافت‌ها تأثیر می‌گذارد (۱۱). مطالعات نشان داده‌اند که بیان بالای miR-143 می‌تواند موجب تسریع فرآیندهای فیبروزی در بافت ریه شود که در نتیجه منجر به مشکلات تنفسی مزمن و کاهش عملکرد ریه می‌گردد (۵). در این مطالعه، هدف بررسی اثرات گاز خردل بر بیان miR-143 در بافت ریه جانبازان شیمیایی است. نتایج تحقیقاتی نشان داده‌اند که گاز خردل می‌تواند باعث تغییرات در سطح بیان miR-143 و در پی آن تأثیرات قابل توجهی در فرآیندهای التهابی و فیبروزی ریه ایجاد کند (۱۲). از آنجایی که miR-143 در تنظیم این فرآیندها نقش کلیدی دارد، بررسی این مولکول می‌تواند به عنوان یک ابزار بیولوژیکی جدید برای شناسایی و درمان آسیب‌های ریوی ناشی از گاز خردل مطرح گردد. این مطالعه می‌تواند به عنوان زمینه‌ای برای تحقیقات بیشتر در زمینه تشخیص و درمان بیماری‌های ریوی ناشی از

۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه برای ۴۵ سیکل، کارایی جفت پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار LinRegPCR (12.x) تعیین شد. سطح بیان ژن‌های کاندید با استفاده از روش -CTΔΔ2 محاسبه شد و به وسیله ژن مرجع U6 snRNA نرمالیزه گردید. تمام آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد ارائه شده و با استفاده از آزمون T-Test تجزیه و تحلیل شدند. برای تعیین حساسیت و ویژگی miR-143 انتخابی در تشخیص بیماران در معرض سولفور موستارد از گروه کنترل، منحنی‌های مشخصه عملکرد گیرنده (ROC) و سطح زیرمنحنی (AUC) ROC مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز آماری با استفاده از GraphPad Prism V. 6.07 (GraphPad Software Inc., CA, USA) انجام شد.

درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد و سپس در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای غیرفعال کردن آنزیم RT انکوبه گردید. برای تقویت miRNA، مجموعه پرایمرهای LNA خاص شامل مخلوط پرایمرهای اختصاصی برای تقویت Real-time PCR miR-143 و U6 snRNA (Exiqon; product: U6 snRNA: 203906 and miR-143: 205053) استفاده شد. آزمایش Real-time PCR با استفاده از SYBR Green Master Mix (Takara, Japan) دستگاه ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) به شرح زیر انجام شد: فعال‌سازی پلیمراز در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، سپس دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، و در نهایت مرحله بازپخت و گسترش در دمای

جدول ۱- مشخصات بالینی نمونه‌ها

Table 1. Clinical Characteristics of the Samples

Type	Age/ Gender	Sample	Type	Age/ Gender	Sample	Type	Age/ Gender	Sample
N1	60/Male	Normal volunteer	C1	42/Male	Moderately SM-exposed patient	C11	39/Male	Highly SM-exposed patient
N2	37/Male	Normal volunteer	C2	57/Male	Moderately SM-exposed patient	C12	49/Male	Highly SM-exposed patient
N3	38/Male	Normal volunteer	C3	46/Male	Moderately SM-exposed patient	C13	47/Male	Highly SM-exposed patient
N4	49/Male	Normal volunteer	C4	58/Male	Moderately SM-exposed patient	C14	39/Male	Highly SM-exposed patient
N5	44/Male	Normal volunteer	C5	43/Male	Moderately SM-exposed patient	C15	56/Male	Highly SM-exposed patient
N6	49/Male	Normal volunteer	C6	57/Male	Moderately SM-exposed patient	C16	41/Male	Highly SM-exposed patient
N7	49/Male	Normal volunteer	C7	42/Male	Moderately SM-exposed patient	C17	31/Male	Highly SM-exposed patient
N8	60/Male	Normal volunteer	C8	47/Male	Moderately SM-exposed patient	C18	35/Male	Highly SM-exposed patient
N9	63/Male	Normal volunteer	C9	40/Male	Moderately SM-exposed patient	C19	41/Male	Highly SM-exposed patient
N10	49/Male	Normal volunteer	C10	48/Male	Moderately SM-exposed patient	C20	58/Male	Highly SM-exposed patient

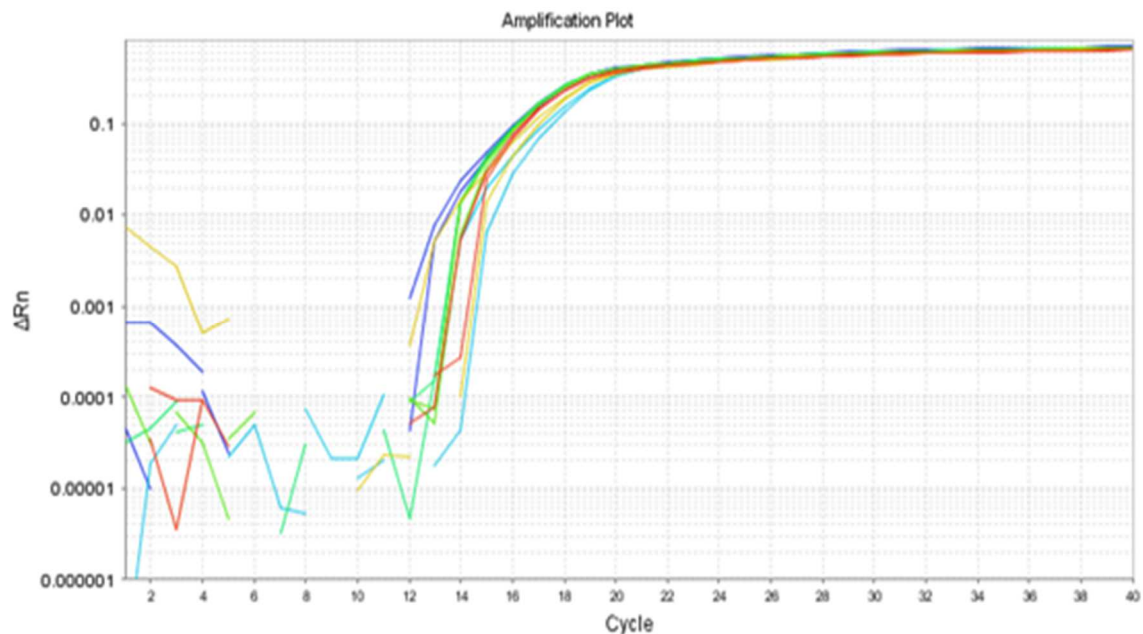
نتایج

دستگاه StepOnePlus™ Real-Time PCR System رسم گردید (شکل‌های ۱ و ۲). در این مطالعه، با توجه به مشخصات بالینی بیماران در معرض سولفور موستارد (SM) و افراد سالم، تست Real-Time PCR

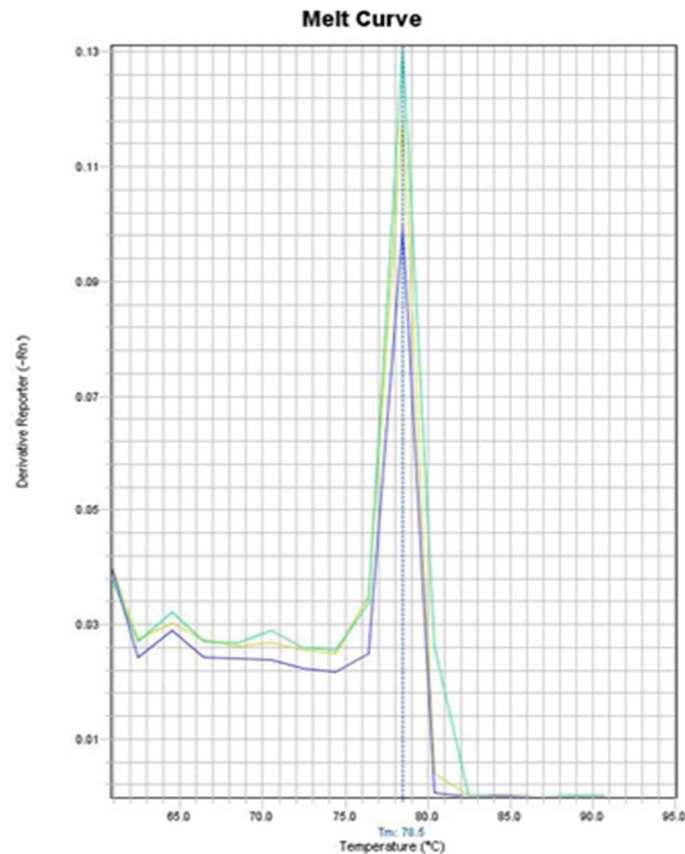
در این تحقیق، برای تأیید اتصال صحیح پرایمرها، اطمینان از تکثیر قطعات اختصاصی و بررسی نبود قطعات غیراختصاصی و دایمر پرایمرها، از رنگ فلورسانس استفاده شد و منحنی تکثیر و ذوب توسط

تمایز بین گروه‌های بیماران (highly SM و moderately SM) و گروه کنترل انجام شد (شکل ۳). سطح زیر منحنی (AUC) برای miR-143 در گروه highly SM برابر با ۰/۹۸۴ و در گروه moderately SM برابر با ۰/۹۵۲ بود. حساسیت و اختصاصیت miR-143 در گروه highly SM به ترتیب ۱ و ۰/۹۴ و در گروه moderately SM به ترتیب ۱ و ۰/۸۷ به دست آمد.

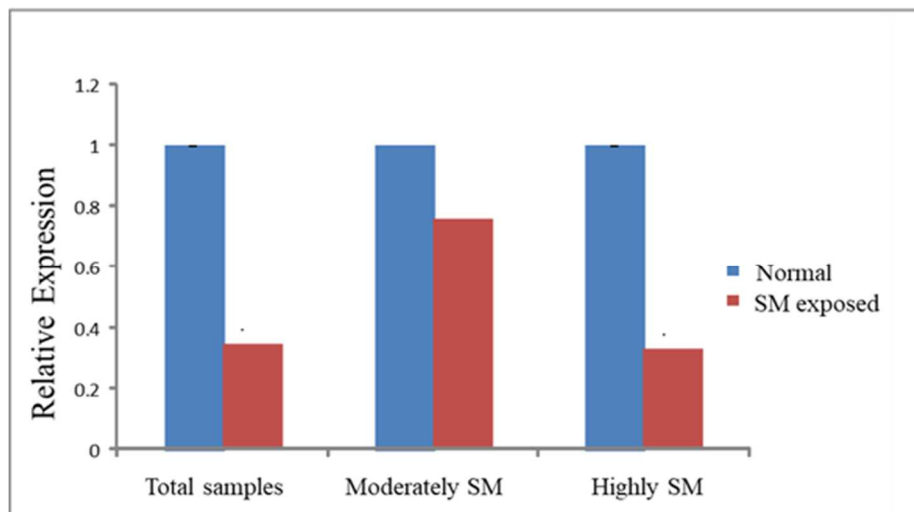
برای miR-143 و U6 snRNA بهینه‌سازی گردید و داده‌ها با استفاده از آزمون T-test در نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۶/۰۷ تجزیه و تحلیل شدند. در مقایسه نتایج بیان miR-143 در نمونه‌های بیماران با تماس شدید و متوسط با SM، اختلاف معناداری در مقایسه با نمونه‌های کنترل مشاهده شد. به‌طور خاص، کاهش بیان miR-143 در بیماران با تماس شدید با SM نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید (شکل ۲). برای ارزیابی ارزش بیومارکری، تحلیل منحنی ROC برای



شکل ۱- منحنی تکثیر miR-143
Fig. 1. Amplification Curve of miR-143

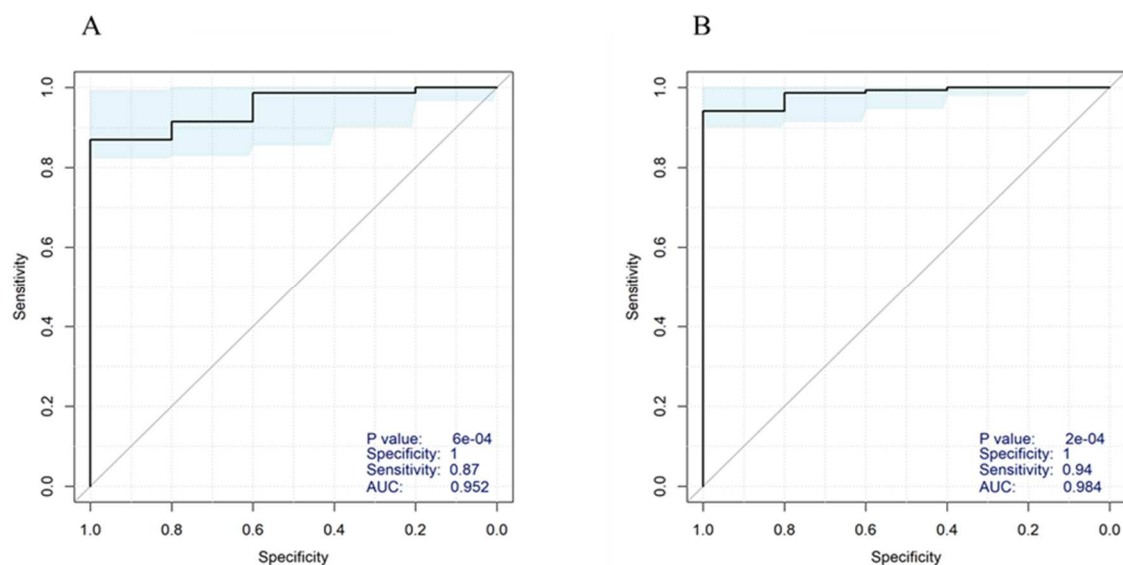


شکل ۲- منحنی ذوب miR-143
Fig. 2. Melt Curve of miR-143



شکل ۳- نمودار مقایسه بیان ژن miR-143 در نمونه‌های جانبازان و نمونه‌های کنترل ($p < 0.0001$) و بررسی بیان miR-143 در جانبازان مبتلا به عوارض متوسط ریوی (Moderately SM) و نمونه‌های کنترل ($p = 0.7602$)، بررسی بیان miR-143 در جانبازان مبتلا به عوارض شدید ریوی (Highly SM) و نمونه‌های کنترل ($p < 0.0001$).

Fig. 3. Comparison of miR-143 gene expression in samples from veterans and control samples ($p < 0.0001$). Analysis of miR-143 expression in veterans with moderately SM compared to control samples ($p = 0.7602$). Analysis of miR-143 expression in veterans with highly SM compared to control samples ($p < 0.0001$).



شکل ۴- بررسی منحنی ROC. (A) منحنی ROC در بیماران مبتلا به Moderately SM و نمونه کنترل. (B) منحنی ROC در بیماران مبتلا به Highly SM و نمونه کنترل.

Fig. 4. ROC curve analysis. (A) ROC curve for patients with moderately SM compared to control samples. (B) ROC curve for patients with highly SM compared to control samples.

بحث

می‌تواند یک عامل مهم در توسعه بیماری‌های مزمن ریوی باشد و توجه به آن در درمان بیماری‌های ریوی ضروری است (۸، ۱۶). در این زمینه، miR-143 نیز به‌عنوان یک عامل تنظیم‌کننده کلیدی در فرآیندهای التهابی و فیبروزی شناخته شده است (۲۱). مطالعات نشان داده‌اند که miR-143 نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای بیولوژیکی مرتبط با بیماری‌های ریوی ایفا می‌کند. این microRNA به‌ویژه در مسیرهای فیزیولوژیکی مرتبط با التهاب، فیبروز و آسیب به بافت‌های ریوی دخیل است. در بیماری‌های ریوی مانند آمفیزم، فیبروز ریوی و سرطان ریه، تغییرات در سطح بیان miR-143 می‌تواند نشان‌دهنده تغییرات در فعالیت‌های بیولوژیکی سلول‌ها و بافت‌های ریه باشد (۲۲، ۲۳). یکی از مکانیسم‌های مهم که miR-143 از طریق آن می‌تواند بر سلامت ریه تأثیر بگذارد، تنظیم ژن‌های دخیل در پاسخ التهابی و فرآیندهای فیروتیک است. برای مثال، تحقیقات نشان داده‌اند که miR-143

سولفور به عنوان یکی از عناصر شیمیایی مهم در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی و متابولیسمی شناخته شده است. در مطالعات اخیر، اثرات سولفور بر فعالیت‌های سلولی و فرآیندهای آسیب‌زایی در بافت‌های مختلف از جمله ریه مورد توجه قرار گرفته است. سولفور از طریق ترکیب با سایر مولکول‌ها و تشکیل ترکیبات سولفوره می‌تواند به تغییرات مولکولی و بیوشیمیایی در سلول‌ها منجر شود. این ترکیبات به‌ویژه در فرآیندهای التهابی و فیبروزی نقش دارند و می‌توانند موجب آسیب به بافت‌های ریه شوند (۱۰). مطالعات نشان داده‌اند که ترکیبات سولفور، مانند سولفید هیدروژن (H_2S)، می‌توانند اثرات پیچیده‌ای بر فرآیندهای سلولی در ریه داشته باشند و در تنظیم پاسخ‌های التهابی و فیبروزی دخیل باشند (۶). همچنین، افزایش سطح سولفور در برخی شرایط می‌تواند به تقویت واکنش‌های التهابی و آسیب‌دیدگی بافت‌ها منجر شود. این ویژگی‌ها نشان می‌دهند که سولفور

می‌تواند به‌طور مستقیم ژن‌های مربوط به سیتوکاین‌ها، فاکتورهای رشد و سایر مولکول‌های تنظیم‌کننده التهاب را هدف قرار دهد و به تنظیم این مسیرها کمک کند (۲۴). این microRNA در کاهش التهاب و جلوگیری از فیروز با کاهش فعالیت مسیرهای سیگنال‌دهی خاص که در التهاب مزمن دخیل هستند، عمل می‌کند (۱۷). در واقع، miR-143 می‌تواند به‌عنوان یک مهارکننده طبیعی فرآیندهای التهابی عمل کند و به کاهش آسیب‌های ناشی از بیماری‌های مزمن ریه مانند آسم و COPD کمک کند (۳). علاوه بر این، miR-143 در مسیرهای فیروزی نیز نقش کلیدی ایفا می‌کند. فیروز ریوی یکی از علل اصلی ناتوانی و مرگ و میر در بیماران مبتلا به بیماری‌های ریوی مزمن است. تحقیقات نشان داده‌اند که miR-143 به‌طور مستقیم با مهار ژن‌هایی مانند $TGF-\beta$ (تبدیل فاکتور رشد بتا) و COL1A1 (کلاژن نوع I) که در فرآیند فیروز نقش دارند، می‌تواند از توسعه فیروز ریوی جلوگیری کند (۷، ۹). این ویژگی‌های miR-143 موجب شده است که این microRNA به‌عنوان یک کاندید مناسب برای درمان‌های هدفمند در بیماری‌های ریوی مزمن مطرح گردد (۱۹). در ارتباط با آسیب‌های ناشی از آلاینده‌ها و مواد شیمیایی، miR-143 می‌تواند در پاسخ به تماس با آلاینده‌های محیطی مانند دود سیگار، آلاینده‌های صنعتی و سایر مواد سمی موجود در هوا، تغییرات قابل توجهی را نشان دهد (۲۰). تغییرات در سطح miR-143 می‌تواند پیش‌بینی‌کننده‌های خوبی برای آسیب‌های سلولی و التهابات مزمن ناشی از این تماس‌ها باشد. برخی تحقیقات همچنین پیشنهاد کرده‌اند که miR-143 به‌عنوان یک نشانگر زیستی برای شناسایی آسیب‌های ریوی ناشی از آلاینده‌ها مورد استفاده قرار گیرد (۱۵). در مجموع، miR-143 به‌عنوان یک عامل تنظیم‌کننده در آسیب‌های ریوی و فرآیندهای التهابی و فیروزی شناخته شده است. تغییرات در سطح بیان این

microRNA می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در خصوص وضعیت بالینی بیماران مبتلا به بیماری‌های ریوی و واکنش‌های التهابی به دست دهد. این یافته‌ها زمینه را برای استفاده از miR-143 به‌عنوان یک ابزار تشخیصی و درمانی در بیماری‌های ریوی فراهم می‌کند (۴).

نتیجه‌گیری

مطالعات اخیر نشان می‌دهند که miR-143 می‌تواند نقش تعیین‌کننده‌ای در بیماری‌های ریوی ایفا کند. این microRNA نه تنها در کنترل فرآیندهای التهابی و فیروزی مؤثر است، بلکه پتانسیل بالایی برای استفاده به‌عنوان نشانگر زیستی و حتی درمان‌های هدفمند در بیماری‌های مزمن ریوی دارد. با توجه به ارتباط miR-143 با مسیرهای مولکولی کلیدی در آسیب‌های ریوی، تحقیق بیشتر در این زمینه می‌تواند به بهبود تشخیص و درمان بیماری‌های ریوی کمک شایانی کند.

تشکر و قدردانی

از اساتید دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله سرکار خانم دکتر انسیه واحدی فوق تخصص ریه، دکتر محمدرضا نورانی متخصص بافت‌شناسی و دکتر محمود تولایی متخصص ژنتیک انسانی جهت همراهی و همکاری کمال تشکر را داریم. نویسندگان هیچ تضاد منافعی را اعلام نمی‌کنند.

منابع

1. Ambros, V., 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006):350-355.
2. Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2):215-233.
3. Du, Y., Zhang, X., Li, H., Wang, J., 2021. MicroRNA-143 as a key regulator in chronic lung diseases and its therapeutic potential. *Frontiers in Medicine*, 8: 457.

14. Sweeney, T., Brown, L., Garcia, R., Nelson, F., 2018. Sulfur mustard and its effects on respiratory function: A review of clinical findings and pathophysiology. *Toxicological Sciences*, 65(4):426-433.
15. Wu, J., Zhao, B., Zhang, H., Liu, G., 2020. MiR-143 as a biomarker for environmental lung damage. *Toxicology Letters*, 333:35-42.
16. Xie, H., Sun, Q., Wang, L., Cheng, Y., 2021. Sulfur compounds and their roles in lung diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1):21.
17. Yang, S., Li, F., Zhou, Y., Chen, K., 2020. MicroRNA-143 in chronic lung disease: A new therapeutic target? *Journal of Thoracic Disease*, 12(5):1827-1838.
18. Yang, X., Liu, Z., Zhao, M., Wang, N., 2013. The role of microRNA-143 in the regulation of fibrotic diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1832(11):2155-2165.
19. Yang, Y., Zhao, X., Li, W., Sun, P., 2021. MicroRNA-143 as a novel therapeutic target in pulmonary fibrosis. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 23:1-9.
20. Yang, Y., Wu, Q., Zhang, L., Chen, J., 2021. MicroRNA-143 and environmental pollutants: Implications for lung injury and disease. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 81:103507.
21. Zhang, Z., Xu, T., Wang, B., Liu, Y., 2020. The role of miR-143 in pulmonary fibrosis and inflammation. *Journal of Cellular Physiology*, 235(4):3312-3322.
22. Zhao L., Ma J., Sun R., Yang W., 2020. MicroRNA-143 regulates inflammation and fibrosis in lung diseases. *Scientific Reports*, 10(1):11234.
23. Zhao, Y., Li, H., Chen, G., Wang, Q., 2020. MicroRNA-143 in lung diseases: A review. *Journal of Medical Genetics*, 57(6):381-388.
24. Zhao, Y., Zhou, X., Liu, P., Zhang, R., 2020. MicroRNA-143 and its target genes in
4. Du, Y., Zhang, X., Li, H., Wang, J., 2021. The clinical potential of miR-143 in lung diseases. *Frontiers in Medicine*, 8:457.
5. Feng, X., Liu, Y., Chen, J., Zhao, Q., 2017. The role of miR-143 in fibrosis and its potential as a therapeutic target. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 22(1):1-8.
6. Ji, Y., Sun, H., Liu, W., Zhao, K., 2019. Hydrogen sulfide: A key player in pulmonary diseases. *Journal of Thoracic Disease*, 11(3):749-758.
7. Li, J., Wang, P., Chen, Y., Zhou, L., 2018. The role of miR-143 in lung fibrosis and inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 59(6):678-688.
8. Li, J., Zhang, T., Yang, X., Zhao, W., 2020. The role of sulfur compounds in inflammatory lung diseases. *Journal of Inflammation Research*, 13: 307-319.
9. Li, Z., Qiu, H., Sun, Y., Zhao, L., 2018. Role of miR-143 in pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 197(4):457-468.
10. Li, Z., Wu, M., Xu, Y., Huang, P., 2020. Sulfur compounds in pulmonary inflammation and fibrosis: The role of hydrogen sulfide. *Frontiers in Pharmacology*, 10:497.
11. Liu, J., Yang, D., Wang, X., Chen, F., 2016. The role of miR-143 in the regulation of inflammation and fibrosis in lung diseases. *Scientific Reports*, 6: 24411.
12. Patterson, A., Jones, M., Smith, R., Clarke, P., 2015. Sulfur mustard-induced lung injury and the role of microRNAs. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 78(7):368-378.
13. Pettigrew, G., Richards, B., Allen, D., White, S., 2017. Chronic lung disease in survivors of sulfur mustard exposure: Long-term effects and potential biomarkers. *Journal of Respiratory Medicine*, 112:156-164.

the pathogenesis of pulmonary fibrosis.
Experimental and Therapeutic Medicine,
20(4):2961-2967.

Research Article

Investigating the Effect of *Prosopis juliflora* Pods Processing on Performance, Digestibility and Blood Parameters of Japanese Quail

Jawad Nawaser¹, Ali Aghaei^{1*}, Mohammad Reza Ghorbani², Tahereh Mohammadabadi¹, Saleh Tabatabaei Vakili¹

1- Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

2- Department of Animal Sciences, Shirvan Faculty of Agriculture, University of Bojnord, Bojnord, Iran

*Corresponding author: aghaei@asnrukh.ac.ir

Received: 25 January 2024

Accepted: 24 June 2024

DOI: 10.60833/ascij.2025.1091249

Abstract

The present study was conducted to investigate the use of *Prosopis juliflora* pods (PJP) and the processing performed along with the effect of nattozyme enzyme on performance, digestibility and blood parameters of Japanese quail. Number 700 one-day-old Japanese male and female quail chicks were used in a completely randomized design with 7 treatments, 5 replications and 20 quail in each replication. Experimental treatments include: base-basal diet (control), base diet with 15% PJP, base diet with 15% water-soaked PJP, base diet with 15% water-treated PJP, ration Base was accompanied by 15% PJP with enzyme, basal diet was accompanied by 15% PJP soaked in water with enzyme and basal diet was accompanied by 15% PJP processed with water vapor with enzyme. The results showed that the effect of experimental treatments on feed intake in the first, second and third weeks was not significant ($p < 0.05$). The highest weight gain was observed in the third, fourth and fifth weeks in the treatment receiving 15% of steamed PJP with water enzyme and control treatment ($p < 0.05$). Birds treated with PJP containing diets with enzyme and control treatment showed better conversion ratio than other treatments ($p < 0.05$). The digestibility of crude protein and crude fat in the control diet and the diet containing 15% of steamed PJP with enzyme increased compared to other treatments ($p < 0.05$). Experimental treatments did not show a significant effect on the relative weight of carcass, breast, thighs, gills and gastrointestinal tract and on the blood parameters of Japanese quail ($p > 0.05$). The results of this experiment showed that the processing of PJP with steamed water with enzyme improved the performance and digestibility of nutrients in Japanese quail.

Keywords: Enzyme, Blood parameters, Digestibility, Mesquite, Japanese quail.

بررسی تاثیر فراوری غلاف کهور بر عملکرد، قابلیت هضم و فراسنجه‌های خونی بلدرچین ژاپنی

جواد نواصر^۱، علی آقائی^{۱*}، محمدرضا قربانی^۲، طاهره محمد آبادی^۱، صالح طباطبایی وکیلی^۱

۱- گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

۲- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی شیروان، دانشگاه بجنورد، بجنورد، ایران

*مسئول مکاتبات: aghaei@asnrkh.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۰۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۵

DOI: 10.60833/ascij.2025.1091249

چکیده

پژوهش حاضر به منظور بررسی استفاده از غلاف کهور و فراوری‌های انجام شده به همراه اثر آنزیم ناتوزیم بر عملکرد، قابلیت هضم و فراسنجه‌های خونی بلدرچین ژاپنی انجام شد. از ۷۰۰ قطعه جوجه یک روزه بلدرچین ژاپنی نر و ماده در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۷ تیمار، ۵ تکرار و ۲۰ قطعه بلدرچین در هر تکرار استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل: جیره بر پایه‌ی (شاهد)، جیره پایه همراه با ۱۵ درصد غلاف کهور، جیره پایه همراه با ۱۵ درصد غلاف کهور خیسانده شده با آب، جیره پایه همراه با ۱۵ درصد غلاف کهور فراوری شده با بخار آب، جیره پایه همراه با ۱۵ درصد غلاف کهور به همراه آنزیم، جیره پایه همراه با ۱۵ درصد غلاف کهور فراوری شده با بخار آب به همراه آنزیم و جیره پایه همراه با ۱۵ درصد غلاف کهور فراوری شده با بخار آب به همراه آنزیم بود. نتایج نشان داد که اثر تیمارهای آزمایشی بر مصرف خوراک در هفته اول، دوم و سوم معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). بیشترین افزایش وزن در هفته سوم، چهارم و پنجم در تیمار دریافت کننده ۱۵ درصد غلاف کهور فراوری شده با بخار آب به همراه آنزیم و تیمار شاهد مشاهده شد ($p < 0.05$). پرنده‌گان تیمارهایی که از جیره‌های حاوی کهور فراوری شده به همراه آنزیم و جیره تیمار شاهد مصرف کرده‌اند ضریب تبدیل بهتری نسبت به سایر تیمارها از خود نشان داده‌اند ($p < 0.05$). قابلیت هضم پروتئین خام و چربی خام در جیره شاهد و جیره حاوی ۱۵ درصد غلاف کهور فراوری شده با بخار آب به همراه آنزیم نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت ($p < 0.05$). تیمارهای آزمایشی تاثیر معنی‌داری بر وزن نسبی لاشه، سینه، ران‌ها، سنگدان و دستگاه گوارش و بر فراسنجه‌های خونی بلدرچین ژاپنی نشان ندادند ($p > 0.05$). نتایج این آزمایش نشان داد که فراوری‌های غلاف کهور با بخار آب به همراه آنزیم باعث بهبود عملکرد و قابلیت هضم مواد مغذی در بلدرچین ژاپنی شد.

کلمات کلیدی: آنزیم، فراسنجه خونی، قابلیت هضم، کهور، بلدرچین ژاپنی.

مقدمه

هزینه تولیدات طیور شده و در نتیجه سود مناسب عاید مرغداران نمی‌گردد. تحقیقات نشان داده است که استفاده از ضایعات کشاورزی و فراورده‌های جانبی کارخانجات به جای مواد اصلی جیره غذایی می‌تواند هزینه تمام شده تولید را کاهش دهد. از طرفی در

در طیور حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد هزینه پرورش، مربوط به خوراک می‌باشد. غلات منبع اصلی انرژی برای طیور می‌باشند که از بین آنها ذرت اصلی‌ترین ماده غذایی در جیره غذایی را شامل می‌شود در کشور ما قیمت بالای ذرت و واردات آن باعث افزایش

ایران مناطقی مثل خوزستان و هرمزگان وجود دارد که سالانه بیش از ۲۰۰ هزار تن غلاف کهور با قیمت ارزان ۳۰ تا ۴۰ تومان (مربوط به هزینه جمع‌آوری هر کیلوگرم) بعنوان یک ماده غذایی غیرمعمول بدست می‌آید. درخت کهور در کشورهای مختلف از قبیل هندوستان، پاکستان، مکزیک، بعضی از کشورهای آفریقایی و ایران با شرایط آب و هوای گرم و مرطوب به وفور یافت می‌گردد و همچنین بسیار مقاوم به گرما و بی‌آبی است (۱۳). مواد مغذی غلاف کهور در نواحی مختلف بر حسب شرایط آب و هوایی باهم فرق دارد. با توجه به میزان فیبر بالا و پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای در چنین مواردی می‌توان از مکمل‌های آنزیمی و انجام فراآوری مناسب استفاده نمود. در این زمینه تحقیقات نشان داده‌است که افزودن آنزیم به غلات موجب هیدرولیز دیواره سلولی و در دسترس قرار گرفتن بیشتر مواد مغذی و افزایش انرژی قابل سوخت و ساز می‌گردد و همچنین باعث شکسته شدن ساختمان پلی‌ساکاریدهای غیر نشاسته‌ای گردیده و میزان چسبندگی روده‌ای را کاهش و در نتیجه باعث افزایش مصرف مواد مغذی و ذخیره انرژی متابولیسمی می‌گردد (۱۳). میوه (غلاف) درخت کهور به شکل لوبیا می‌باشد و شامل یک کپسول و تعدادی دانه است که پس از رسیدن، خشک و زرد گردیده و روی زمین می‌ریزد. این کپسول پروتئین و قند فراوانی دارد (۵)، بنابراین می‌توان این منبع با ارزش غذایی را با هزینه ناچیزی جمع‌آوری و در تغذیه دام و طیور مورد استفاده قرارداد (۳). Girma و همکاران (۸) در بررسی میزان سطوح مختلف دانه کهور بر عملکرد رشد و وزن لاشه در جوجه گوشتی گزارش دادند، افزودن سطح ۲۰ درصد جیره بر میزان رشد و قابلیت هضم و وزن لاشه نسبت به سایر تیمارهای تفاوت معنی‌داری داشته است. Al-Marzooqi و همکاران (۲) در بررسی اثر عمل‌آوری

غلاف کهور با آنزیم‌های آگزونااز بر میزان رشد، کیفیت گوشت و سلامتی جوجه‌های گوشتی نشان داده‌اند که افزودن این نوع آنزیم‌ها در جیره‌های حاوی ۵ درصد کهور بدون هیچ گونه اثر سوئی قابل انجام است. با توجه به کمبود ترکیبات اصلی جیره غذایی طیور از جمله ذرت، کنجاله سویا و پودر ماهی که اغلب با هزینه‌های زیاد از کشورهای مختلف وارد می‌شوند، از این منابع بومی ارزان قیمت و با کیفیت می‌توان جهت جبران بخشی یا کل منابع غذایی و همچنین جلوگیری از خروج ارز از کشور استفاده کرد (۱). بنابراین این پژوهش با هدف بررسی تاثیر فراآوری غلاف کهور بر عملکرد، قابلیت هضم و فراسنجه‌های خونی بلدرچین ژاپنی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

روش آماده‌سازی غلاف کهور: غلاف درخت کهور از مناطق مختلفی از استان خوزستان (شهرستان‌های اهواز، کارون، حمیدیه و دشت آزادگان بصورت دستی جمع‌آوری شد و پس از تمیز نمودن آن‌ها از گرد و خاک و سایر مواد موجود ابتدا آن‌ها را خرد کرده و در زیر آفتاب به نحوی که هر ۲ ساعت آن‌ها را بصورت دستی جهت هوا دهی بیشتر جابه‌جا کرده تا کاملاً رطوبت آن از بین برود در مرحله بعدی همه مواد موجود را به صورت مساوی به سه دسته پس از مخلوط نمودن کامل با برآوردی از میزان مورد نیاز هرکدام از تیمارهای مورد آزمایش تقسیم شده‌اند تا بعداً به هر کدام از آن‌ها به دو گروه جهت اضافه نمودن مولتی آنزیم و تیمارهای بدون مولتی آنزیم تقسیم شوند. در روش خیس نمودن بر اساس عملکرد گزارش شده توسط Ausol و همکاران (۴) به نحوی که کهور جدا شده در قسمت قبل را به مدت ۲۴ ساعت در مقدار ۲ برابر آن در آب با دمای محیط نگه داشته شد و بعد از آن جهت خشک شدن در زیر

آفتاب پهن شد و هر ۲ ساعت به وسیله بیل جهت هوادهی جابه‌جا شد. کهورهایی که باید بخار دهی می‌شده‌اند، ابتدا کهورهای جدا شده در قسمت اول را در گونی‌های با جنس کتونی قرار داده و سپس در دستگاه اتوکلاو به مدت یک ساعت و با فشار بخار ۲۱ کیلو بار گذاشته شد و بعداً همانند قسمت خیس شده در زیر آفتاب خشک شد. بعد از طی مراحل فوق غلاف کهور را در آسیاب چکشی با توری درجه ریز مناسب جهت تغذیه بلدرچین خرد شد.

آنزیم مورد استفاده در این آزمایش: آنزیم استفاده شده در این آزمایش با نام تجاری ناتوزیم‌پی و محصولی از شرکت تک نام پندار آریا (کشور سازنده: استرالیا) بوده، و بنابر کاتالوگ شرکت تولیدکننده دارای مشخصات موجود در جدول ۱ بود. براساس توصیه شرکت سازنده میزان ۳۵۰ گرم در هر تن خوراک از آن در کل غلاف کهور مورد استفاده در زمان آماده‌سازی اضافه شد.

پرنده‌ها، شرایط محیطی و جیره آزمایشی: این پژوهش در مزرعه پرورش بلدرچین واقع در ۵ کیلومتری شهرستان حمیدیه و آزمایشگاه تغذیه تکمیلی گروه علوم دامی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین (خوزستان) واقع در شهر ملاتانی در ۳۶ کیلومتری شمال شرقی اهواز انجام شد، از تعداد ۷۰۰ قطعه جوجه یک روزه بلدرچین ژاپنی که تمام جوجه‌ها به ۳۵ واحد آزمایشی شامل ۷ تیمار و ۵ تکرار و هر تکرار ۲۰ قطعه تقسیم شدند و پس از وزن‌کشی اولیه به‌طور تصادفی در داخل قفس‌های مربوط به خود جای داده شدند. جوجه‌ها در سه روز اول به مدت ۲۴ ساعت در معرض روشنایی مداوم قرار گرفته و سپس برنامه نوری به مدت ۲۳ ساعت روشنایی و یک ساعت تاریکی در طول روز تا پایان دوره پرورش اعمال شد. در طول انجام آزمایش، تمامی پرندگان دسترسی آزاد به آب و خوراک داشتند.

از ابتدای ۱ روزگی تغذیه پرندگان با تیمارهای آزمایشی اعمال خواهد شد و سپس تا پایان دوره پرورش ادامه داشت. جیره‌های آزمایشی توسط برنامه جیره نویسی UFFDA با سطوح پروتئین و انرژی قابل متابولیسم یکسان تنظیم شدند (جدول ۲). جیره-های آزمایشی شامل: ۱- تیمار شاهد (جیره پایه)؛ ۲- تیمار حاوی ۱۵ درصد غلاف کهور؛ ۳- تیمار حاوی ۱۵ درصد غلاف کهور خیس‌انده شده با آب؛ ۴- تیمار حاوی ۱۵ درصد غلاف کهور به همراه مولتی آنزیم؛ ۵- تیمار حاوی ۱۵ درصد غلاف کهور به همراه مولتی آنزیم؛ ۶- تیمار حاوی ۱۵ درصد غلاف کهور خیس خورده با آب به همراه آنزیم ۷- تیمار حاوی ۱۵ درصد غلاف کهور فرآوری شده با بخار آب به همراه آنزیم بودند.

خوراک مصرفی: خوراک هر واحد آزمایشی در ابتدای هر هفته به درون ظروف نگهداری مربوط به هر واحد آزمایشی ریخته می‌شد و پس از توزین به تدریج در طول هفته به دانخوری مربوطه افزوده می‌شد. خوراک باقیمانده در پایان هفته توزین تا مصرف خوراک هر واحد آزمایشی با رابطه ۱ محاسبه شود:

رابطه ۱: مقدار خوراک مصرفی = تعداد جوجه/وزن خوراک ابتدای هفته-وزن خوراک انتهای هفته)

افزایش وزن بدن: در روز اول دوره پرورش، جوجه بلدرچین‌ها وزن شده و میانگین وزن آن‌ها ثبت شد. در پایان هر هفته، وزن‌کشی جوجه‌های هر واحد آزمایشی با ترازوی دیجیتالی با دقت ± 1 گرم انجام و نتایج به صورت میانگین وزن یادداشت گردید. قبل از وزن‌کشی حدود ۴-۳ ساعت به جوجه‌ها گرسنگی داده شد. برای محاسبه افزایش وزن در هر مقطع زمانی، اختلاف وزن ابتدا و انتهای مقطع پرورش با رابطه ۲ تعیین گردید

رابطه ۲: افزایش وزن (گرم) = تعداد جوجه/وزن جوجه ابتدای هفته-وزن جوجه انتهای هفته)

ضریب تبدیل خوراک: ضریب تبدیل خوراک (گرم خوراک مصرفی/گرم افزایش وزن زنده) با توجه به افزایش وزن و مصرف خوراک هر واحد آزمایشی در هر دوره با رابطه ۳ محاسبه شد:

رابطه ۳: ضریب تبدیل خوراک (گرم) = افزایش وزن بدن (گرم) - میزان مصرف خوراک (گرم)

قابلیت هضم ظاهری مواد غذایی: برای اندازه‌گیری قابلیت هضم مواد مغذی در سن ۲۸ روزگی، به میزان سه گرم در کیلوگرم اکسید کروم بعنوان مارکر غیر قابل هضم به مدت هفت روز در جیره‌های آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت (بختیاری معز، ۱۳۹۵). در روز کشتار ابتدا از هر تکرار ۲ عدد پرنده که وزن آنها نسبت به میانگین کل پرنده‌های تکرار نزدیک بود را جهت کشتار انتخاب و پس از انجام کشتار، نمونه‌های محتویات ایلئومی هر یک از پرنده‌ها جمع‌آوری و در ظرف حاوی یخ خشک به آزمایشگاه سریعاً منتقل گردید در آنجا این نمونه‌ها در آون (۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت) خشک، توزین و توسط آسیاب آزمایشگاهی (با توری یک میلی‌متر) آسیاب شدند. جهت بررسی قابلیت هضم میزان ماده خشک، پروتئین خام و چربی خام محتویات ایلئومی اندازه‌گیری شد.

نمونه‌گیری فراسنجه‌های بیوشیمیایی پلاسمای خون: در ۳۵ روزگی از دوره پرورش از هر واحد آزمایشی دو قطعه جوجه نر و ماده بلدرچین ژاپنی که به میانگین وزن تکرار نزدیکتر بودند، انتخاب و پس از کشتار آنها حدود ۲/۵ میلی‌لیتر خون گرفته شد. پس از خون‌گیری نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در سانتیفریوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه جهت جدا سازی سرم

خون از بقیه مواد خون قرار داده شدند. نمونه‌های سرم خون توسط دستگاه آنالیزور اتوماتیک بیوشیمیایی خون، (Clima Ral, Co ,Espain) با استفاده از کیت‌های متناسب (پارس آزمون، ایران) برای هر کدام از فراسنجه‌های بیوشیمیایی خونی شامل کلسترول، گلوکز، تری گلیسرید، HDL مورد بررسی قرار گرفتند.

تفکیک لاشه: در پایان دوره، دو قطعه جوجه بلدرچین نر و ماده از هر واحد آزمایشی که از نظر وزنی نزدیک به میانگین وزن آن واحد بود انتخاب و پس از توزین، ذبح شدند. پس از کشتار، پر کنی از پرنده بلافاصله انجام شد و بعد از خالی کردن لاشه از دستگاه گوارش، تفکیک لاشه انجام گردید و اجزاء مختلف لاشه شامل: لاشه قابل طبخ، وزن سینه، وزن ران‌ها، دستگاه گوارش و سنگدان با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم توزین و ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۷ تیمار و ۵ تکرار در هر کدام از تیمارها، تجزیه و تحلیل شده‌اند.

$Y_{ijk} = \mu + T_i + e_{ijk}$ که در آن μ میانگین کل جامعه، T_i اثر سطوح مختلف تیمار و e_{ijk} خطای آزمایش برای هر مشاهده می‌باشد. در پایان، داده‌های حاصل از نتایج تحقیق که توسط نرم افزار اکسل وارد و ثبت گردیدند، برای تجزیه واریانس از نرم‌افزار آماری SAS (۲۰۰۹ ویرایش ۹/۴) با رویه‌ی GLM استفاده گردید. سپس میانگین‌ها به وسیله‌ی آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($p < 0.05$) مقایسه شدند.

جدول ۱- نوع آنزیم‌های مورد استفاده در مولتی آنزیم ناتوزیم پی

Table 1. Types of enzymes used in the multi-enzyme Natozyme P

Enzyme (u/kg)	Activity level
Cellulase	6000000
Xylanase	10000000
Beta-glucanase	700000
Alpha amylase	700000
Pectinase	70000
Phytase	1500000
Lipase	30000
Protease	3000000

جدول ۲- ترکیب موادغذایی و مواد مغذی جیره‌ها در طول دوره برحسب درصد

Table 2. Composition of food and nutrients of diets during the period in percentage

Meal	Control (%)	Treatments
Corn	47.55	39.57
Soybean meal (44% crude protein)	36.53	32.5
Soybean oil	1.56	4.52
Wheat	4.00	0
Wheat bran	4.00	0
Full mesquite pod	0	15
Fish Powder (60% protein)	2.91	5/63
Dicalcium phosphate	0.75	0.35
shell	1.40	1.27
Salt (sodium chloride)	0.28	0.25
DL-methionine	0.2	0.2
Lysine	0.07	0.07
Mineral supplement ¹	0.25	0.25
Vitamin supplement ²	0.25	0.25
Threonine	0.14	0.14
Amounts supplied		
Metabolizable energy (Kcal/Kg)	2900	2900
Crude protein (percentage)	24.00	24.00
Calcium (percentage)	0.80	0.80
Available phosphorus (percentage)	0.30	0.30
Methionine (percentage)	0.50	0.50
Lysine (percentage)	1.39	1.39
Methionine + Cystine	0.88	0.88
Sodium	0.15	0.15

۱-هر کیلوگرم مکمل معدنی دارای: کلسیم پنتوتانات، ۴۰ میلی‌گرم. کولین کلراید، ۸۴۰ میلی‌گرم. اتوکسی کوئین، ۰/۱۲۵ میلی‌گرم. سولفات روی، ۶۰ میلی‌گرم. سولفات منیزیم، ۱۰۰ میلی‌گرم. سولفات مس، ۱۰۰ میلی‌گرم. سلنیم، ۰/۲ میلی‌گرم. ید، ۱ میلی‌گرم. آهن، ۵۰ میلی‌گرم. ۲- هر کیلوگرم مکمل ویتامینی دارای: ۸۵۰۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۲۵۰۰۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D₃، ۱۱۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین E، ۲۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین K₃، ۱۴۷۷ میلی‌گرم ویتامین B₁، ۴۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین B₂، ۷۸۴۰ میلی‌گرم ویتامین B₃، ۳۴۶۵۰ میلی‌گرم ویتامین B₅، ۲۴۶۴ میلی‌گرم ویتامین B₆، ۱۱۰ میلی‌گرم ویتامین B₉، ۱۰ میلی‌گرم ویتامین B₁₂، ۴۰۰۰۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید می‌باشد.

1-Each kilogram of mineral supplement contains: Calcium pantothenate, 40 mg. Choline chloride, 840 mg. Ethoxyquin, 0.125 mg. Zinc sulfate, 60 mg. Magnesium sulfate, 100 mg. Copper sulfate, 100 mg. Selenium, 0.2 mg. Iodine, 1 mg. Iron, 50 mg. 2- Each kilogram of vitamin supplement contains: 8,500,000 international units of vitamin A, 2,500,000 international units of vitamin D₃, 11,000 international units of vitamin E, 2,200 mg of vitamin K₃, 1,477 mg of vitamin B₁, 4,000 mg of vitamin B₂, 7,840 mg of vitamin B₃, 34,650 mg of vitamin B₅, 2,464 mg of vitamin B₆, 110 mg of vitamin B₉, 10 mg of vitamin B₁₂, 400,000 mg of choline chloride.

نتایج

مصرف خوراک: اثر جیره‌های آزمایشی بر میانگین مصرف خوراک جوجه‌های بلدرچین ژاپنی در هفته‌های مختلف پرورش در جدول ۳ نشان داده شده است. در هفته چهارم و پنجم اختلاف معنی‌داری در مصرف خوراک بین تیمارها مشاهده شد، به نحوی که تیمار دریافت کننده ۱۵ درصد غلاف تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشتند ($p < 0/05$).

افزایش وزن: اثر جیره‌های آزمایشی بر میانگین افزایش وزن جوجه‌های بلدرچین ژاپنی در هفته‌های مختلف پرورش در جدول ۴ نشان داده شده است. در هفته اول، سوم، چهارم و پنجم دوره پرورشی وزن بدن به صورت معنی‌داری تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت ($p < 0/05$). در هفته اول بیشترین افزایش وزن در تیمار شاهد مشاهده شد. در هفته سوم تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری از لحاظ وزن با همدیگر داشتند ($p < 0/05$)، به نحوی که تیمارهای شاهد و تیمار دریافت کننده ۱۵ درصد غلاف کهور فرآوری شده با بخار آب به همراه آنزیم بالاترین وزن را داشتند ($p < 0/05$). در هفته چهارم و هفته پنجم دوره پرورش کمترین میزان در تیمار دریافت کننده کهور بخار داده شده همراه با آنزیم بود. **ضریب تبدیل غذایی:** اثر جیره‌های آزمایشی بر ضریب تبدیل غذایی جوجه‌های بلدرچین ژاپنی در هفته‌های مختلف پرورش در جدول ۵ نشان داده شده است. همانطور که از نتایج جدول پیداست در هفته اول و دوم پرورش تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری با همدیگر نداشتند ($p > 0/05$). در هفته چهارم، پنجم و ششم ضریب تبدیل تیمار شاهد و تیمار دریافت کننده ۱۵ درصد غلاف کهور فرآوری شده با بخار آب به همراه آنزیم ضریب تبدیل بهتری نسبت به سایر تیمارها داشتند ($p < 0/05$).

تاثیر فرآوری‌های مختلف کهور بر خصوصیات لاشه: تاثیر تیمارهای مختلف بر خصوصیات لاشه (درصد) در جدول ۶ نشان داده شده است. تیمارهای آزمایشی تاثیر معنی‌داری بر وزن نسبی لاشه، سینه، ران‌ها، سنگدان و دستگاه گوارش نداشتند ($p > 0/05$). **تاثیر فرآوری‌های مختلف کهور بر قابلیت هضم ماده خشک، پروتئین، چربی:** نتایج مربوط به اثر سطوح مختلف تیمارها بر قابلیت هضم ایلئومی مواد غذایی در جدول ۷ گزارش شده است بطور کلی اختلاف معنی‌داری بین قابلیت هضم ایلئومی مواد غذایی در نتیجه اثر تیمارها روی گروه‌های آزمایشی مشاهده شد. در بررسی قابلیت هضم ماده خشک در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید ($0/05 > p$). از نظر عددی بالاترین میزان قابلیت هضم ماده خشک مربوط به اثر تیمار شاهد با مقدار ۷۲/۹ درصد و کمترین میزان آن مربوط به اثر تیمار حاوی ۱۵ درصد غلاف کهور خشک با مقدار ۷۱/۳ درصد بوده است. قابلیت هضم پروتئین خام تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت و تیمار شاهد و تیمار دارای کهور فرآوری شده با بخار آب همراه آنزیم دارای بالاترین درصد هضم پروتئین خام بود، و کمترین درصد هضم پروتئین در تیمار کهور خشک مشاهده شد. قابلیت هضم چربی خام، تفاوت معنی‌داری بین اثر تیمارهای مختلف مشاهده گردید. در این بررسی بهترین قابلیت هضم چربی در تیمار شاهد مشاهده شده اما تفاوت معنی‌داری با تیمار دریافت کننده ۱۵ درصد غلاف کهور فرآوری شده با بخار آب به همراه آنزیم نداشت ($0/05 > p$). از لحاظ عددی بالاترین قابلیت هضم چربی خام در تیمار شاهد با مقدار ۸۵/۵ درصد و کمترین میزان آن در تیمار دریافت کننده ۱۵ درصد غلاف کهور با مقدار ۸۳/۵ درصد مشاهده شد.

فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون: اثرات تیمارهای آزمایشی روی متابولیت‌های بیوشیمیایی خون جوجه‌های گوشتی در جدول ۸ ارائه شده است. سطح کلسترول، تری‌گلیسرید، HDL، LDL و VLDL به صورت معنی‌داری تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند ($p > 0.05$). اگرچه استفاده از غلاف کهور از نظر عدد باعث کاهش کلسترول و تری‌گلیسرید نسبت به تیمار شاهد شد.

جدول ۳- اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین مصرف خوراک جوجه‌های بلدرچین در هفته‌های مختلف (گرم/هفته)

Table 3. Effect of experimental treatments on average feed consumption of quail chicks in different weeks (g/week)

Treatments	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5
1	35.6	101.0	139.8	216.0c	270.6c
2	36.4	104.4	142.2	219.2a	286.2a
3	36.2	102.6	141.5	217.6abc	283abc
4	36.0	102.2	141.3	217.2abc	280.6abc
5	36.4	103.1	142.0	218.4ab	283.8ab
6	36.2	102.0	140.8	217.abc	279.2bc
7	35.8	101.2	140.0	216.2bc	278.2bc
p	0.96	0.33	0.67	0.03	0.02
SEM	0.62	1.06	1.131	0.7	1.84

در هر ستون میانگین‌های با حروف نامشابه دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد هستند. ۱-جیره شاهد ۲-جیره با غلاف کهور خشک ۳-جیره با غلاف کهور خیس ۴-جیره با غلاف کهور بخار داده شده ۵-جیره با غلاف کهور خشک به همراه آنزیم ۶-جیره با غلاف کهور خیس به همراه آنزیم ۷-جیره با غلاف کهور بخار داده شده به همراه آنزیم.

In each column, means with different letters are significantly different at the 5% level. 1- Control diet 2- Diet with dry melon pods 3- Diet with wet melon pods 4- Diet with steamed melon pods 5- Diet with dry melon pods with enzyme 6- Diet with wet melon pods with enzyme 7- Diet with steamed melon pods with enzyme.

جدول ۴- اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین افزایش وزن (گرم) جوجه‌های بلدرچین در هفته‌های آزمایشی

Table 4. Effect of experimental treatments on average weight gain (grams) of quail chicks in experimental weeks

Treatments	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5
1	15.6a	45.2	67.2a	59.8	61.2ab
2	15.0b	43.8	61.2b	57.2	58.2c
3	15.1b	44.2	61.8b	58.0	59.0bc
4	15.3ab	44.4	62.0b	58.2	59.4bc
5	15.1b	44.0	61.4b	57.8	58.8bc
6	15.3ab	44.6	62.2b	59.0	60.2abc
7	15.4ab	45.2	67.8a	60.2	62.4a
p	0.046	0.53	0.0028	0.811	0.080
SEM	0.13	0.58	1.35	0.686	0.0772

جدول ۵- اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین ضریب تبدیل جوجه‌های بلدرچین در هفته‌های آزمایشی

Table 5. Effect of experimental treatments on the average feed conversion ratio of quail chicks in experimental weeks

Treatments	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5
1	2.28	2.23	2.08b	3.61c	4.42d
2	2.42	2.38	2.32a	2.83a	4.92a
3	2.39	2.32	2.29a	3.75ab	4.79abc
4	2.35	2.30	2.28a	3.73ab	4.72bc
5	2.41	2.34	2.32a	3.78ab	4.82ab
6	2.36	2.29	2.26a	3.68bc	4.64cd
7	2.32	2.24	2.07b	3.59c	4.46d
p	0.27	0.111	0.0002	0.001	0.0001
SEM	0.0445	0.0395	0.051	0.038	0.059

جدول ۶- اثر تیمارهای آزمایشی بر خصوصیات لاشه جوجه‌های بلدرچین (درصد نسبت به وزن زنده)

Table 6. Effect of experimental treatments on carcass characteristics of quail chicks (percentage relative to live weight)

Treatments	Carcass	Thighs	Chest	Gizzard	Digestive system
1	66.4	17.5	25.8	1.5	2.1
2	67.2	17.7	25.7	1.9	2.7
3	66.8	17.2	24.0	1.5	2.4
4	65.6	17.9	23.8	1.7	2.3
5	65.9	17.4	23.5	1.8	2.5
6	65.6	17.5	22.9	1.5	2.4
7	68.1	18.1	24.2	1.7	2.4
p	0.5	0.8	0.6	0.08	0.49
SEM	1.02	0.52	0.51	0.11	0.21

جدول ۷- اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین قابلیت هضم مواد مغذی در جوجه‌های بلدرچین

Table 7. Effect of experimental treatments on average nutrient digestibility in quail chicks

Treatments	DM	CP	EE	ASH
1	72.9	71.0a	85.5a	65.4a
2	71.3	67.9c	83.5d	63.1d
3	71.4	68.2c	83.6d	63.4cd
4	72.0	68.7c	84.5c	64.2bc
5	71.7	68.5c	84.1cd	63.5cd
6	72.4	69.2bc	84.7bc	64.8ab
7	72.8	70.5ab	85.2ab	64.9ab
p	0.0653	0.0032	0.0001	0.0001
SEM	0.43	0.57	0.21	0.27

جدول ۸- مقایسه اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های خونی (میلی‌گرم/دسی‌لیتر) جوجه‌های بلدرچین

Table 8. Comparison of the effects of experimental treatments on blood parameters (mg/dL) of quail chicks

Treatments	Glucose	Cholesterol	Triglyceride	HDL	LDL	VLDL
1	383.9	219.1	222.9	52.6	121.9	44.6
2	375.5	209.6	160.0	66.7	110.9	32.0
3	362.8	210.6	182.2	60.2	114.0	36.4
4	373.2	213.8	212.9	58.5	12.7	42.6
5	366.7	214.0	176.8	62.8	115.8	35.4
6	375.7	216.2	191.9	58.1	119.7	38.4
7	382.3	217.9	213.6	56.4	118.8	42.7
p	0.519	0.980	0.168	0.072	0.146	0.168
SEM	10.55	8.82	18.31	3.16	8.85	3.66

بحث

گوشتی نداشته که به دلیل وجود ماده ضد تغذیه‌ای بتاگلوکان است زیرا این ماده موجب افزایش ویسکوزیته محتویات روده و کاهش سرعت هضم و جذب مواد مغذی می‌شود بخاطر اینکه در دستگاه گوارش جوجه‌ها آنزیم بتاگلوکوناز وجود ندارد (۱۵). نوروزی و همکاران (۱۳) اثرات غلاف کهور را همراه

براساس نتایج بدست آمده تیمار دریافت کننده ۱۵ درصد غلاف کهور خام بالاترین میزان مصرف خوراک را داشت که با نتایج گزارش شده توسط ساکی و همکاران (۱۵) مطابقت دارد. این محققین گزارش کردند افزودن آنزیم در جیره‌های حاوی جو اثر معنی‌داری بر خوراک مصرفی در جوجه های

و بدون آنزیم بر روی عملکرد جوجه گوشتی بررسی نموده و گزارش کردند کاهش عملکرد مرغ‌های تغذیه شده با سطوح بالای غلاف کهور ممکن است به دلیل مقدار بالای پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای (فیبر) موجود در غلاف کهور باشد که باعث افزایش چسبندگی محتویات روده و کاهش سرعت عبور غذا می‌شود و یا ممکن است بدلیل تاثیر فیبر برروی قابلیت هضم مواد مغذی باشد که احتمالاً از دسترس قرارگرفتن این قبیل مواد مغذی ضروری جلوگیری کرده چنانچه در دیگر مواد مغذی فیبری این امر مشهود است که در نتیجه آن، مرغ‌ها عملکرد ضعیفی را نشان داده‌اند. Yusuf و همکاران (۱۷) در بررسی اثر جایگزینی غلاف کهور با کنجاله سویا برروی میزان رشد جوجه‌های گوشتی انجام داده‌اند آنها گزارش نمودن که افزایش نسبت جایگزینی غلاف کهور به میزان ۷۵ درصد سبب افزایش وزن پرنده شده است که موافق با نتایج این تحقیق می‌باشد. نتایج افزودن آنزیم سبب افزایش عملکرد جوجه‌های بلدرچین شد که با نتایج تحقیق Mariam (۱۱)، همخوانی دارد. بر اساس تحقیقات افزودن آنزیم سبب بهبود ضریب تبدیل و افزایش وزن جوجه‌ها شده است (۱۱، ۱۵) که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت. ساکی و همکاران (۱۵) در آزمایشی اثر سطوح مختلف جو و مولتی آنزیم را بر عملکرد جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار داده و گزارش کردند افزودن آنزیم در سنین پایین تاثیر بیشتری دارد و با افزایش سن میکروفلورای روده نسبت به جیره بهتر تطابق می‌یابند. این محققین همچنین گزارش کردند بخش پلی-ساکاریدهای غیر نشاسته‌ای غلات، چربی‌ها، نشاسته و پروتئین‌ها را محافظت کرده، در نتیجه سبب محدود شدن دسترسی آنزیم‌های هضمی به ترکیبات جیره می‌شوند. مکمل نمودن جیره با آنزیم‌ها، ویسکوزیته محتویات روده را کاهش و ابقای ظاهری مواد مغذی

و خوراک مصرفی را افزایش داده و در نهایت افزایش تولید در جوجه‌های گوشتی می‌شوند. ابراهیمی و همکاران (۷) در آزمایشی اثر سطوح مختلف تربیتکاله در جیره با و بدون مکمل آنزیمی بر عملکرد دستگاه گوارش بلدرچین ژاپنی را بررسی و گزارش کردند که افزودن آنزیم سبب بهبود شاخص‌های عملکردی پرندگان می‌شود. در تیمارهای دریافت کننده فیبر وزن نسبی بخش قدامی دستگاه گوارش کاهش اما بخش خلفی افزایش یافت. همچنین وزن نسبی دستگاه گوارش در تیمارهای دریافت کننده آنزیم نسبت به سایر تیمارها کاهش معنی‌داری نشان داد. در تیمارهای حاوی آنزیم میزان قابلیت هضم نسبت به تیمارهای دیگر افزایش یافته است که با تحقیقات هوشمندی و همکاران (۹) که اثر شکل فیزیکی خوراک، رقم جو و افزودن آنزیم (در سطح صفر و ۰/۰۵ گرم/کیلوگرم) بر قابلیت هضم ایلئومی مواد مغذی و انرژی قابل متابولیسم جیره جوجه‌های گوشتی را بررسی نموده اند همخوانی دارد. خیس کردن غلاف کهور باعث بهبود قابلیت هضم، کاهش عوامل ضد تغذیه‌ای و توکسین موجود در آن می‌شود. در خیس نمودن کهور قابلیت هضم ماده خشک، پروتئین خام، چربی خام و NFE نسبت به حالت خشک آن افزایش می‌یابد که بر عملکرد پرنده اثر مثبتی خواهد گذاشت (۴). پس از بخار دهی ملایم، تقریباً ۶۰ درصد همی سلولز محلول می‌شود اما بهبود اندکی در مواد جامد باقیمانده‌ی دیواره سلولی مشاهده شده که نشان دهنده وجود یک سد فیزیکی شیمیایی در نمونه‌های بخار داده شده است که سبب محدود شدن دسترسی آنزیم‌های باکتریایی با منشا خارجی به دیواره سلولی می‌شود (۱۲). در طیور تخمیر الیاف (محلول و غیرمحلول) در انتهای روده کوچک و روده بزرگ محدود می‌باشد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت افزایش میزان الیاف خام جیره‌ها، دلیلی برای کاهش قابلیت

اثر جیره‌های نیمه خالص مربوط به فیبر در بلدرچین ژاپنی را بررسی نموده‌اند همخوانی دارد. آنها زارش کردند که جیره‌های حاوی ۳ درصد فیبر نامحلول در مقایسه با جیره‌های فاقد آن، سطح تری‌گلیسرید و کلسترول سرم خون بلدرچین ژاپنی را کاهش دادند.

نتیجه‌گیری

در کل نتایج پژوهش نشان داد که فراوری‌های غلاف کهور با بخار آب به همراه آنزیم تأثیری بر خصوصیات لاشه و پروفیل‌های لیپیدی ندارد، اما باعث بهبود عملکرد و قابلیت هضم مواد مغذی در بلدرچین ژاپنی شد.

منابع

1. Alemzadeh, B., Taheri, B., Kardooni, A., Hoseini, S.M. 2015. Determining the digestibility of Mesquite fruit (*Prosopis juliflora*) by Invivo method and degradability of seed and Mesquite fruit by Insitu method. *Applied Animal Science Research Journal*, 4(15):65-72.
2. Al-Marzooqi, W., Al-Kharousi, K., Kadim, I., Mahgoub, T., Zekri, S., Al-Maqbaly, R., Al-Busaidi, M. 2015. Effects of feeding *Prosopis juliflora* pods with and without exogenous enzyme on performance, meat quality and health of broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 14 (2):76-88.
3. Al-Soqeer, A.A., Menshawy, A.M., Mousa, H.M., Aggag, A.M., Motawei, M.I. 2023. Genetic diversity of the chemical composition and pod production of *Prosopis juliflora* trees grown in Saudi Arabia. *Heliyon*, 9(11): e21649.
4. Ausol, Z. E. and Mukhtar, A.M. 2011. Effect of feeding broiler chicks on graded levels of soaked prosopis seeds. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(7): 45-48.
5. Bone, G., Houdijk, J., Lopez-Franco, Y., Ceballos-Bernal, C., Castro-Castro, A., Soto-Luzania, X., Gonzalez-Carranza, Z. 2023. Differential sensitivity to processed

هضم مواد مغذی در این تیمارها می‌باشد (۶). رضایی پور و همکاران (۱۴) اثر تغاله گوجه فرنگی را بر قابلیت هضم جوجه گوشتی مورد بررسی قرار داده و گزارش کردند، با افزایش میزان تغاله گوجه فرنگی قابلیت هضم چربی می‌یابد، همچنین نتیجه گرفتند که این مسأله می‌تواند مربوط به تأثیر متقابل بین هضم چربی خام و میزان الیاف خام جیره‌ها باشد. الیاف خام قادر به جذب اسیدها و نمک‌های صفراوی و نهایتاً کاهش بازجذب از روده و دفع آنها از طریق مدفوع شوند. همزمان با افزایش یک درصد از یک ترکیب الیافی مانند کربوکسی متیل سلولز، فعالیت باکتریایی در روده کوچک افزایش می‌یابد، همچنین افزایش باکتری‌های متصل شده به اسیدهای صفراوی ممکن است مسئول کاهش تشکیل میسل‌ها در روده باشد، بنابراین قابلیت هضم چربی به طرز چشمگیری کاهش می‌یابد (۱۶). اساسی‌ترین عامل که سبب کاهش هضم چربی در جیره‌های الیافی می‌گردد، قابلیت باند شدن الیاف در این نوع جیره‌ها با نمک‌ها و اسیدهای صفراوی و در نهایت محدود کردن و کاهش تشکیل میسل می‌باشد، این امر از یک سو منجر به افزایش ترشح این مواد از کلیه‌ها (مکانیسم فیدبک) و از طرفی افزایش دفع این نمک‌ها از طریق مدفوع و کاهش بازجذب آنها در روده می‌شود (۱۲). نتایج بدست آمده از این آزمایش با نتایج محمدی و همکاران (۱۳۹۹) در بررسی تأثیر غلاف کهور در جیره‌های غذایی پلت و آردی بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون و پایداری اکسیداتیو گوشت جوجه‌های گوشتی که گزارش نمودند افزودن غلاف کهور به جیره‌ها سبب کاهش میزان کلسترول، تری‌گلیسرید و LDL شده و کاهش کلسترول می‌تواند به دلیل وجود ماده موثره کوئرتستین و سایر ترکیبات فلاوونیدی موجود در غلاف کهور باشد، همخوانی داشت. همچنین با نتایج امام‌پور و همکاران (۱۰)، که

enzymes. *Journal of Current Research in Science*, 1(2):90-95.

12. Mohammadabadi, T., Chaji, M., Bojarpour, M. 2012. The effect of processing raw sugarcane peat with steam pressure on gas production parameters using isolated rumen microorganisms. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 4(3):240-246.

13. Norouzi, S., Yaghobfar, A., Shokrpour, M., Safamehr, A. 2013. Determination of nutritive value and effect of different levels of *Prosopis juliflora* pods on performance of laying hens. *Research On Animal Production*, 4(7):62-77.

14. Rezaeipour, V., Boldaji, F. A., Dastar, B., Yaghoubfar, A., Gheysari, A.A. 2009. Determination of apparent nutrients digestibility and metabolizable energy of diets with different inclusion of Dried Tomato Pomace in broiler chickens. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 16(1):90-102.

15. Saki, A.A., Mirzaei Gudarzi, S., Ghazi, S., Moini, M.M., Sahibi Alaa. F. 2011. Effect of different levels of barley and multi-enzyme on metabolizable energy, digestibility of dry matter and dietary protein and performance of broiler chickens. *Animal Sciences of Iran*, 42(3):275-283.

16. Smits, C.H.M. 1996. Viscosity of dietary fibre in relation to lipid digestibility in broiler chickens. *Agricultural and Food Sciences*, 1996:82205809.

17. Yusuf, N.D., Ogah, D.M., Hassan, D.I., Musa, M.M., Doma, U.D. 2008. Effect of decorticated fermented prosopis seed meal (*Prosopis africana*) on growth performance of broiler chicken. *International Journal of Poultry Science*, 7(11):1054-1057.

Mezquite from two areas of Mexico on broiler chicken performance. *Animal-Science Proceedings*, 14(2):302-303.

6. Choct, M., Hughes, R.J., Wang, J., Bedford, M.R., Morgan, A.J., Annison, G. 1996. Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti nutritive activity of non starch polysaccharides in chickens. *British Poultry Science*, 37(3):609-621.

7. Ebrahimi, E., Sobhanirad, S. and Zarghi, H. 2017. Effect of triticale level and exogenous enzyme in the grower diet on performance, gastrointestinal tract relative weight, jejunal morphology and blood lipids of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 19(3): 569-580.

8. Girma, M., Mengistu, U., Getachew, A. 2011. Ground *Prosopis juliflora* pods as feed ingredient in poultry diet: effects on growth and carcass characteristics of broilers *International. Journal of Poultry Science*, 10(12):970-976.

9. Hooshmandi, A. M., Yaghobfar, A. K. B. A. R., Bojarpour, M., Salari, S. 2019. The effect of processing barley cultivars on intestinal morphology, enzyme activity and volatile fatty acids of the small intestine and serum lipid levels of broiler chickens. *Journal of Veterinary Research*, 73(4):403-418.

10. Imampour, V., Karimi Tarshizi, M.A., Shariatmadari, F. 2014. Preparation and evaluation of semi-pure diet for fiber studies in Japanese quail. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 6(4):365-373.

11. Mariam, A.E.Y., Mukhtar, A.M., Mohamed, K.A. 2013. The effect of feeding broiler chicks on prosopis pods flour supplemented with combinations of microbial xylam and phytase

Research Article

Comparison of the Effects of Camellia Oil and Soybean Oil in the Diet on the Immune System, Lipid Profiles, and Liver Enzymes of Arian Broiler Chickens

Karim Ghorbani^{1*}, Mohsen Mohammadi Saei¹, Behroz Yarahamdi¹, Hassan Norouzian², Amin Kazmizadeh¹

1- Department of Animal Science Research, Lorestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Khorramabad, Iran

2- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

*Corresponding author: karim_ghorbani@yahoo.com

Received: 25 September 2024

Accepted: 27 January 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1091252

Abstract

This study was conducted to investigate the effects of adding levels of camelina oil and soybean oil to broiler diets on the immune system, lipid profiles, and liver enzymes in broiler chickens. For this purpose, 360 one-day-old Arian broiler chickens were used in a completely randomized 2x2 factorial design including (two levels of soybean oil 1 and 2% and two levels of camelina oil 1 and 2%) with 4 treatments, 6 replications, and 15 chickens in each replication. The main effects of soybean oil and camelina oil and the interaction effects of soybean oil and camelina oil had no effect on the antibody titer against Newcastle disease and the antibody titer against influenza ($p < 0.05$). Numerically, the antibody titer against influenza in the treatments receiving camelina tended to be significant ($p = 0.09$). The main effects of soybean oil on SRBC had no significant effect ($p < 0.05$). The main effects of camelina oil and the interaction effects of camelina oil and soybean oil on SRBC tended to be significant ($p = 0.090$ and $p = 0.080$). Triglyceride and cholesterol parameters were lower in birds fed 2% camelina oil and 2% camelina oil and 1% soybean oil. The main effects of soybean oil and the main effects of camelina oil and the interaction effects of soybean oil and camelina oil on aspartate aminotransferase (AST) were not significant ($p < 0.05$). The liver enzymes alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) were affected by the main effects of soybean oil and camelina oil and the interaction effects of soybean oil and camelina oil ($p < 0.05$). Overall, the results of the study showed that the use of camelina oil reduces triglyceride and cholesterol concentrations and improves liver enzymes in broiler chickens.

Keywords: Liver enzymes, Immunity, Lipid profile, Antibody titer, Camellia oil.

مقاله پژوهشی

مقایسه اثرات استفاده از روغن کاملینا با روغن سویا در جیره بر سیستم ایمنی، پروفیل‌های
لیپیدی و آنزیم‌های کبدی جوجه‌های گوشتی آرینکریم قربانی^{۱*}، محسن محمدی ساعی^۱، بهروز یاراحمدی^۱، حسن نورزبان^۲، امین کاظمی‌زاده^۱

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

۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

*مسئول مکاتبات: karim_ghorbani@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۴

DOI: 10.60833/ascij.2025.1091252

چکیده

این پژوهش با هدف اثرات افزودن سطوح روغن کاملینا و روغن سویا در جیره‌های جوجه گوشتی بر سیستم ایمنی، پروفیل‌های لیپیدی و آنزیم‌های کبدی در جوجه گوشتی انجام شد، برای این منظور از تعداد ۳۶۰ قطعه جوجه گوشتی یک روزه نژاد آرین، در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل ۲×۲ شامل (دو سطح روغن سویا ۱ و ۲ درصد و دو سطح روغن کاملینا ۱ و ۲ درصد) با ۴ تیمار، ۶ تکرار و تعداد ۱۵ قطعه جوجه گوشتی در هر تکرار استفاده شد. اثرات اصلی روغن سویا و روغن کاملینا و اثرات متقابل روغن سویا و روغن کاملینا تأثیری بر عیار پادتن علیه نیوکاسل و عیار پادتن علیه آنفولانزا ندارد ($p > 0.05$). از نظر عددی میزان عیار پادتن علیه آنفولانزا در تیمارهای دریافت شده کاملینا تمایل به معنی‌داری نشان داد ($p = 0.09$). اثرات اصلی روغن سویا روی SRBC تأثیر معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$). اثرات اصلی روغن کاملینا و اثرات متقابل روغن کاملینا و روغن سویا روی SRBC تمایل به معنی‌داری نشان داد ($p = 0.09$ و $p = 0.08$). فراسنجه‌های تری‌گلیسرید و کلسترول در پرندگانی که با سطح ۲ درصد روغن کاملینا و سطح ۲ درصد روغن سویا کاملینا و ۱ درصد روغن سویا تغذیه شدند، پایین‌تر بود. اثرات اصلی روغن سویا و اثرات اصلی روغن کاملینا و اثرات متقابل روغن سویا و روغن کاملینا بر آنزیم‌های آسپارات آمینوترانسفراز (AST) معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) تحت تأثیر اثرات اصلی روغن سویا و روغن کاملینا و اثرات متقابل روغن سویا و روغن کاملینا قرار گرفت ($p < 0.05$). در کل نتایج پژوهش نشان داد استفاده از روغن کاملینا باعث کاهش غلظت تری‌گلیسرید و کلسترول و بهبود آنزیم‌های کبدی در جوجه گوشتی می‌شود.

کلمات کلیدی: آنزیم کبدی، ایمنی، پروفیل لیپیدی، تیتراژ، روغن کاملینا.

مقدمه

صنعت کشاورزی به عنوان محوری‌ترین صنعت نقش بارزی را بر عهده دارد. در این راستا دام پروری از اهمیت بسزایی برخوردار است از نظر ارزش غذایی منابع پروتئین حیوانی، در رأس هرم مواد غذایی قرار

جمعیت جهان با رشد تصاعدی در حال افزایش است و برآورد شده که تا سال ۲۰۵۰ به ۹ میلیارد نفر می‌رسد (۱۵). با این رشد جمعیت نیاز به فناوری قدرتمند برای تأمین مواد خوراکی احساس می‌شود و

دارد. در میان منابع پروتئین حیوانی، پروتئین موجود در تولیدات طیور از نظر اقتصادی و ارزش غذایی جایگاه منحصر به فردی دارد. با توجه به رشد جمعیت و محدودیت منابع غذایی مورداستفاده، یافتن منابع جدید و همچنین افزایش راندمان کمی و کیفی تولیدات طیور دارای اهمیت زیادی است. گیاه روغنی کاملینا ساتیوا (*Camelina sativa*) جزء خانواده براسیکاسه است و در آزمایشات مختلف نشان داده شده است که احتیاجات آبی بسیار کمتر و مقاومت به سرمای بهاره بیشتری نسبت به سایر گیاهان روغنی بخصوص کلزا دارد. همچنین این گیاه مقاومت بسیار بالایی نسبت به آفات رایج در دانه‌های روغنی مانند سوسک‌های گرده‌خوار و آسیب‌پرنده‌گان دارد (۱۷). روغن کاملینا به عنوان به عنوان فرآورده دانه کاملینا علاوه بر مصارف خوراکی و غذایی به دلیل بالا بودن میزان امگا ۳، ویتامین E و آنتی‌اکسیدان‌های موجود در آن خواص درمانی بسیاری دارد (۴، ۱۳). کاملینا حاوی سطوح بالایی از توکروفل و ترکیبات فنولیکی می‌باشد، که باعث پایداری اکسیداتیو و بالاتر آن نسبت به سایر روغن‌ها غیر اشباع مانند کتان است (۱۲، ۲۳). با توجه به اینکه بیشتر از ۵۰ درصد از اسیدهای چرب در روغن کاملینا را اسیدهای چرب غیراشباع با چند باند مضاعف تشکیل می‌دهند، بنابراین کاملاً مستعد اکسیداسیون می‌باشد و دوره ماندگاری روغن را کوتاه می‌کند؛ اما وجود آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند توکوفرول که باعث پایداری بیشتر چربی‌های اشباع نشده در برابر اکسیداسیون می‌شوند، موجب شده است که روغن کاملینا ماندگاری بهتری نسبت به روغن کتان داشته باشد (۱۴، ۲۳). اثر اسیدهای چرب امگا-۶ و امگا-۳ بر پروفیل لیپیدی پلاسمای خون پرنده‌گان متفاوت است؛ به طوری که گزارش شده است که اسیدهای چرب امگا-۳ سبب کاهش و اسیدهای چرب امگا-۶ سبب

افزایش سطوح تری‌گلیسریدهای پلاسمایی مرغ‌های تخم‌گذار می‌شوند. در واقع خوراندن جیره‌ی حاوی اسیدهای چرب امگا-۳ سبب کاهش سنتز و ترشح تری‌گلیسرید از سلول‌های روده‌ای شده و بنابراین سنتز کبدی اسیدهای چرب را کاهش می‌دهد (۱). با توجه به نیاز کشور به واردات روغن سویا جهت مصرف انسانی و از طرفی استفاده از روغن سویا در تغذیه طیور، در سال‌های اخیر با کمبود و افزایش قیمت روغن سویا مواجه بوده‌ایم و متخصصین تغذیه به دنبال جایگزین روغن سویا هستند و پژوهش‌های متعددی در این زمینه صورت گرفته است. گیاه کاملینا گیاهی است که به خصوص در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است و مهم‌ترین مزیت آن مقاومت بالای آن به خشکی و سرمای بهاره است. کشت این گیاه در اقلیم خشک کشور می‌تواند نتایج مطلوبی از قبیل کاهش وابستگی به واردات دانه‌های روغنی، حفظ منابع آبی و استفاده بهینه از مزارع دیم را به دنبال داشته باشد. بنابراین این پژوهش با هدف مقایسه اثرات استفاده از روغن کاملینا با روغن سویا در جیره بر سیستم ایمنی، پروفیل‌های لیپیدی و آنزیم‌های کبدی جوجه‌های گوشتی آراین انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه روغن دانه کاملینا: دانه‌های روغنی کاملینا از بازار محلی شهر خرم‌آباد تهیه شد. پس از جدا کردن ناخالصی‌ها و تمیز کردن دانه‌ها، استخراج روغن از دانه‌های روغنی با روش پرس سرد انجام شد. پرس سرد روشی مبتنی بر اعمال فشار در دستگاه بوده و این فشار معمولاً توسط یک محور حلزونی شکل که در داخل یک استوانه ثابت در حال گردش است، به وجود می‌آید. در این روش، قسمت حلزونی دانه‌ها را به جلو می‌رانند و هرچه به خروجی نزدیک‌تر می‌شود، ضمن ثابت بودن قطر استوانه ثابت بیرونی، قطر محور

مرکزی چرخنده‌ی حلزونی شکل آن بیش‌تر می‌شود و در نتیجه محتوی پرس در حین جلو رفتن با مقاومت روبرو شده و تحت فشار قرار می‌گیرد. به دلیل بالا رفتن فشار، بخش مایع روغن موجود در دانه از بخش جامد آن جدا می‌گردد. روغن حاصل پس از صاف نمودن در شیشه‌های در بسته و دور از نور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

پرنده‌ها، شرایط محیطی و جیره آزمایشی: این آزمایش در اسفند سال ۱۴۰۱ در سالن مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان (ایستگاه تحقیقات سراب چنگایی خرم‌آباد) انجام گرفت. این پژوهش با تعداد ۳۶۰ قطعه جوجه یک‌روزه سویه آرین (نر و ماده) در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل ۲×۲ (دو سطح روغن سویا ۱ و ۲ درصد و دو سطح روغن کاملینا ۱ و ۲ درصد) با ۴ تیمار، ۶ تکرار و تعداد ۱۵ قطعه جوجه گوشتی در هر تکرار شد. جیره‌های آزمایشی در هر دوره پرورش با استفاده از نرم افزار UFFDA و بر اساس جداول احتیاجات غذایی جوجه‌های گوشتی (آرین) تنظیم شدند.

فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون: برای تهیه نمونه‌های خون جهت آزمایشات بیوشیمیایی، بعد از ۸ ساعت گرسنگی در پایان دوره آزمایش از هر تکرار دو جوجه انتخاب شد. با استفاده از سرنگ یکبار مصرف ۵ میلی‌لیتر خون از سیاهرگ زیر بال آن‌ها تهیه و در لوله‌های غیرپارینی ویژه ریخته شد. نمونه‌ها یک ساعت در دمای اتاق و سپس بطور مورب در فلاسک یخ قرار گرفتند تا لخته به وجود آمده از سرم جدا شود. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند تا سرم آن‌ها جدا شود. غلظت کلسترول، پروتئین‌کل، تری‌گلیسرید، LDL و HDL، آلبومین و فعالیت آنزیم‌های کبدی آسپاراتات

آمینوترانسفراز، آلانین آمینو ترانسفراز و آلکالین فسفاتاز موجود در سرم با استفاده از کیت‌های تجاری (پارس آزمون) با دستگاه اتوآنالایز (آلیسون-۳۰۰، آمریکایی) اندازه‌گیری شدند. تیترا آنتی‌بادی برای نیوکاسل و آنفولانزا در نمونه‌های سرم با استفاده از کیت‌های تجاری الیزا طبق دستورالعمل سازنده انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به صورت فاکتوریل ۲×۲ اجرا شد. مدل آماری طرح به صورت زیر می‌باشد: $Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + e_{ijk}$ و بسته، μ = میانگر میانگین جامعه برای متغیر موردنظر، A_i = اثر نوع روغن B_j = اثر سطح روغن، $(AB)_{ij}$ = اثر متقابل نوع و سطح روغن و e_{ijk} = خطای آزمایشی خواهد بود. داده‌های بدست آمده با استفاده از نسخه ۹/۱ نرم‌افزار آماری SAS و (۲۰۰۳) رویه GLM آنالیز شد، برای مقایسه میانگین از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۰/۰۵ درصد استفاده شد.

نتایج

نتایج مربوط به اثر اصلی روغن کاملینا و روغن سویا و نیز اثر متقابل آن‌ها بر پروفیل‌های لیپیدی خون جوجه‌های گوشتی در جدول ۱ ارائه شده است. هیچ‌کدام از فراسنجه‌های خونی تحت تاثیر اثرات اصلی روغن سویا قرار نرفت ($p > 0/05$)، با این وجود پرنده‌گانی که با سطح ۲ درصد روغن سویا تغذیه شده بودند غلظت فراسنجه‌های آلبومین، پروتئین و پروفیل‌های لیپیدی از نظر عدد نسبت به سطح ۱ درصد روغن سویا بالاتر بود. اثرات اصلی روغن کاملینا بر فراسنجه‌های کلسترول و تری‌گلیسرید معنی‌دار بود ($P < 0/05$)، به طور که پرنده‌گانی که با سطح ۲ درصد روغن کاملینا تغذیه شده بود غلظت کمتری نسبت به پرنده‌گانی که با سطح ۱ درصد روغن

درصد روغن کاملینا تغذیه شده بودند نسبت به پرندگان که با سطح ۱ درصد روغن کاملینا و سطح ۲ و ۱ درصد روغن کاملینا تغذیه شده بودند بالاتر بود. استفاده همزمان ۲ درصد روغن کاملینا و ۱ درصد روغن سویا نسبت به سایر اثرات متقابل روغن کاملینا و روغن سویا بالاتر بود. نتایج مربوط به اثرات اصلی روغن سویا و روغن کاملینا و نیز اثر متقابل روغن سویا و روغن کاملینا بر عیار پادتن علیه نیوکاسل و عیار پادتن علیه آنفولانزا جوجه‌های گوشتی در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج آزمایش نشان می‌دهد که استفاده از اثرات اصلی روغن سویا و روغن کاملینا و اثرات متقابل روغن سویا و روغن کاملینا تأثیری بر عیار پادتن علیه نیوکاسل و عیار پادتن علیه آنفولانزا ندارد ($p > 0.05$). از نظر عددی میزان عیار پادتن علیه آنفولانزا در تیمارهای دریافت شده کاملینا تمایل به معنی‌داری نشان داد ($p = 0.09$). اثرات اصلی روغن سویا روی SRBC تأثیر معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$). اثرات اصلی روغن کاملینا و اثرات متقابل روغن کاملینا و روغن سویا روی SRBC تمایل به معنی‌داری نشان داد ($p = 0.09$ و $p = 0.08$). در واقع از نظر عددی استفاده از ۲ درصد روغن کاملینا و استفاده همزمان از ۲ درصد روغن کاملینا و ۱ درصد روغن سویا باعث افزایش توان ایمنی شده بود.

کاملینا تغذیه شدند نشان داد. فراسنجه‌های لیپوپروتئین با چگالی بالا و پایین، پروتئین و آلبومین تحت تأثیر اثرات اصلی روغن کاملینا قرار نگرفت ($p > 0.05$). اثرات متقابل روغن کاملینا و روغن سویا فقط بر فراسنجه‌ها کلسترول و تری‌گلیسرید معنی‌دار بود ($p < 0.05$); کمترین غلظت کلسترول و تری‌گلیسرید در پرندگانی که با سطح ۲ درصد روغن کاملینا و ۱ درصد روغن سویا تغذیه شدند مشاهده شد. فراسنجه‌های لیپوپروتئین با چگالی بالا و پایین، پروتئین و آلبومین تحت تأثیر اثرات متقابل روغن کاملینا و روغن سویا قرار نگرفت ($p > 0.05$). نتایج مربوط به اثرات اصلی روغن کاملینا و روغن سویا و اثرات متقابل آن‌ها بر آنزیم‌های کبدی جوجه‌های گوشتی در جدول ۲ ارائه شده است. اثرات اصلی روغن سویا و اثرات اصلی روغن کاملینا و اثرات متقابل روغن سویا و روغن کاملینا بر آنزیم AST معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). آنزیم‌های کبدی ALT و ALP تحت تأثیر اثرات اصلی روغن سویا و روغن کاملینا و اثرات متقابل روغن سویا و روغن کاملینا قرار گرفت. استفاده از سطح ۲ درصد روغن سویا باعث افزایش سطح آنزیم‌های کبدی ALT و ALP پرندگان نسبت به سطح ۱ درصد روغن سویا شده بود. عملکرد این دو آنزیم در پرندگانی که با سطح دو

جدول ۱- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر پروفیل لیپیدی جوجه‌های گوشتی (میلی‌گرم/دسی لیتر)

Table 1. The effect of experimental treatments on blood metabolites in broiler chickens (mg/dl)

Main effects		Cholesterol	Triglyceride	HDL	LDL	Total protein	Albumin
Soybean oil (%)							
1		135.93	57.73	53.00	60.10	3.70	2.45
2		137.60	59.46	55.06	63.23	3.79	2.53
SEM		0.13	3.13	0.70	1.89	0.09	0.09
Camelina oil (%)							
1		120.20 ^a	54.85 ^a	55.25	55.40	3.80	2.48
2		114.30 ^b	48.30 ^b	59.40	59.40	3.92	2.54
SEM		3.96	3.70	0.46	2.43	0.08	0.08
Interaction							
Soybean oil (%)	Camelina oil (%)						
1	1	121.80 ^c	54.50 ^b	56.30	57.70	3.74	2.65
1	2	110.60 ^d	46.30 ^c	62.80	50.20	3.98	2.69
2	1	139.40 ^a	64.40 ^a	50.90	65.40	3.67	2.50

2	2	129.6 ^b	61.20 ^a	52.20	60.1	3.71	2.63
SEM		2.96	2.84	0.65	2.42	0.209	0.02
P-value							
Soybean oil (%)		0.749	0.315	0.594	0.299	0.355	0.123
Camelina oil (%)		0.001	0.003	0.571	0.197	0.597	0.255
Camelina oil * Soybean oil		0.001	0.005	0.659	0.090	0.234	0.355

a-d: حروف متفاوت در هر ستون نمایانگر اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها است ($p < 0.05$).

a-d Values within a column with different superscripts differ significant ($p < 0.05$)

جدول ۲- تاثیر تیمارهای آزمایشی بر آنزیم‌های کبدی جوجه‌های گوشتی

Table 2. The effect of experimental treatments on Liver enzymes in broiler chickens

Main effects		AST	ALT	ALP
Soybean oil (%)				
1		352.86	4.54 ^b	4677.50 ^b
2		363.56	4.85 ^a	5000/70 ^a
SEM		5.84	0.25	146.44
Camelina oil (%)				
1		36.50	4.75 ^b	4723.60 ^a
2		373.20	5.00 ^a	5126.30 ^b
SEM		5.84	0.25	146.44
Interaction				
Soybean oil (%)	Camelina oil (%)			
1	1	349.80	4.71 ^b	4998.10 ^b
1	2	366.70	5.21 ^a	5328.40 ^a
2	1	362.10	4.51 ^c	4662.90 ^c
2	2	376.20	5.01 ^b	5028.30 ^b
SEM		4.96	0.21	180.02
P-value				
Soybean oil (%)		0.13	0.002	0.003
Camelina oil (%)		0.1	0.001	0.001
Camelina oil* Soybean oil		0.15	0.001	0.008

a-c: حروف متفاوت در هر ستون نمایانگر اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها است ($p < 0.05$).

a-c Values within a column with different superscripts differ significant ($p < 0.05$)

جدول ۳- تاثیر تیمارهای آزمایشی بر SRBC و تیتیر نیوکاسل و آنفولانزا جوجه‌های گوشتی

Table 3. Effect of experimental treatments on SRBC and Newcastle disease and influenza titers in broiler chickens

Main effects		SRBC	NDV (log2)	ALV (log2)
1		4.95	6.50	7.21
2		5.01	6.66	7.30
SEM		0.50	0.48	0.05
Camelina oil (%)				
1		5.02	6.73	7.25
2		5.10	7.05	7.40
SEM		0.60	0.35	0.07
Interaction				
Soybean oil (%)	Camelina oil (%)			
1	1	5.03	6.44	7.17
1	2	5.13	7.08	7.45
2	1	4.87	6.70	7.38
2	2	5.09	7.12	7.60
SEM		0.62	0.52	0.08
P-value				
Soybean oil (%)		0.120	0.28	0.31
Camelina oil (%)		0.090	0.09	0.23
Camelina oil* Soybean oil		0.080	0.18	0.27

بحث

روغن دانه گیاه کاملینا در مقایسه با سایر روغن‌های گیاهی (سویا، آفتابگردان، زیتون) دارای مقادیر بالایی از اسیدهای چرب ضروری و اسیدهای چرب غیر اشباع با کیفیت بالا است (۱). این روغن منبع خوبی از آلفا لینولنیک اسید است که یک پیش ماده برای اسید چرب امگا ۳ و موثر در سلامت انسان می‌باشد (۵، ۱۰، ۲۱). همچنین گزارش شده است که روغن کاملینا منبع عمده اسیدهای چرب ضروری لینولنیک (۱۸:۲) و لینولنیک اسید (۱۸:۳) و یک منبع خوب از اسید چرب امگا-۳ می‌باشد (۸، ۱۳). اسیدهای چرب امگا-۳ باعث کاهش بیماری‌های قلبی و عروقی، کلسترول، تری‌گلیسرید و لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین، حفظ سیالیت غشاهای زیستی، حفظ و نرمی سلامت پوست، انعقاد خون و فعالیت‌های مهم دیگر موثر است (۹). در پژوهش حاضر، میزان غلظت کلسترول و تری‌گلیسرید در تیمارهای دریافت کننده روغن کاملینا پایین‌تر بود، به طوری کلی با افزایش سن جوجه‌های گوشتی میزان میزان غلظت پروفیل‌های لیپیدی بخصوص بعد از سن ۴۶ به صورت خطی افزایش می‌یابد. کلسترول خون افرادی که روزانه ۳۰ میلی‌لیتر روغن کاملینا به مدت ۶ هفته مصرف کردند از ۵/۳ به ۵/۶ میلی‌مول بر لیتر کاهش یافت، که با نتایج حاضر مطابقت دارد (۸). مقادیر بالای اسید چرب آلفا لینولنیک و توکروپول و سایر آنتی‌اکسیدان‌های موجود در روغن کاملینا آن را به یک ماده مغذی بسیار جذاب تبدیل کرده است. اثر اسیدهای چرب امگا-۶ و امگا-۳ بر پروفیل لیپیدی پلاسمای خون پرندگان متفاوت است؛ به طوری که گزارش شده است که اسیدهای چرب امگا-۳ سبب کاهش و اسیدهای چرب امگا-۶ سبب افزایش سطوح تری‌گلیسریدهای پلاسمایی مرغ‌های تخم‌گذار می‌شوند (۲). در واقع این محققین چنین تفسیر کردند

که خوراندن جیره‌ی حاوی اسیدهای چرب امگا-۳ سبب کاهش سنتز و ترشح تری‌گلیسرید از سلول‌های روده‌ای شده و بنابراین سنتز کبدی اسیدهای چرب را کاهش می‌دهد (۲). در مطالعه‌ی ستاری نجف‌آبادی و همکاران (۱۹) که به بررسی تاثیر منابع مختلف پودر چربی کلسمی امگا-۳ و ۶ بر لیپیدهای خون در مرغ‌های مادر گوشتی مسن پرداختند نشان دادند، که استفاده از سطح ۱/۵ و ۳ درصد پودر چربی (روغن کتان و روغن ماهی) باعث کاهش غلظت تری‌گلیسرید، کلسترول و لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین در مرغ‌های مادر می‌شود، در حالی که غلظت لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا را نسبت به گروه آزمایشی شاهد افزایش می‌دهد، که با پژوهش حاضر مطابقت داشت. چیچلوسکا و همکاران (۷) گزارش کردند که استفاده از دانه کاملینا در رت به مدت ۳۰ روز سبب کاهش کلسترول به میزان قابل توجهی شد. پژوهشگران نشان دادند که اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه با مهار تولید چربی و افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب کبدی سطوح تری‌گلیسریدی خون را کاهش می‌دهند (۶، ۱۱). در کل اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در مقایسه با اسیدهای چرب اشباع، غلظت سرمی لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین و کلسترول را کاهش و غلظت لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا را افزایش می‌دهند (۲۲). ایده‌ین و همکاران (۸) گزارش کردند که استفاده از روغن کاملینا در جیره خوک‌ها باعث کاهش تری‌گلیسرید در سرم خون شد. احتمال داده شده است که اسیدهای چرب غیراشباع با مهار هیدروکسیل متیل گلو تاریل-کوآنزیم A رودکتاز (HMG-CoA) کبدی که آنزیم محدودکننده سرعت تولید کلسترول است، منجر به کاهش غلظت سرمی کلسترول شوند (۳). لیپوپروتئین‌ها مسئول انتقال

کلسترول در خون هستند. لیپیدهای جیره‌ای می‌توانند غلظت لیپوپروتئین‌های پلاسما و سوخت و ساز کبدی را تغییر دهند. اسیدهای چرب اشباع می‌توانند غلظت لیپوپروتئین‌های با چگالی بسیار پایین و لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین پلاسمایی را از طریق کاهش گیرنده‌های مرتبط با جذب کلسترول افزایش دهند؛ در حالی که اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه از جمله ترکیبات امگا-۳، غلظت کلسترول، تری‌گلیسرید، لیپوپروتئین‌های با چگالی بسیار پایین و لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین را در سرم خون کاهش و غلظت لیپوپروتئین‌های با چگالی بسیار بالا را افزایش می‌دهند، که این عمل باعث انتقال کلسترول از بافت کبد و تسریع آن برای تبدیل به اسیدهای صفراوی و دفع مدفوعی می‌باشد (۲). شیم و همکاران (۲۰) بیان کردند که میزان کلسترول کل و تری‌گلیسرید خون همبستگی مثبت بالایی با غلظت آنها در لاشه دارد، بنابراین می‌توان انتظار داشت که با کاهش این متابولیت‌ها در خون، غلظت آنها در لاشه نیز کاهش یافته و از دیدگاه سلامتی سبب ارتقا کیفیت گوشت برای مصرف‌کننده می‌شود. حاجی عزیزی و همکاران (۱۰) به بررسی اثرات گنجاندن گیاه کاملینا ساتیوا در جوجه‌های گوشتی بر پروفیل‌های لیپیدی در جوجه‌های گوشتی در معرض سرما پرداختند و گزارش کردند استفاده از روغن کاملینا تا سطح ۲ درصد باعث کاهش سطح تری‌گلیسرید و کلسترول در پرندگان می‌شود که با نتایج حاضر مطابقت دارد. کبد یکی از اندام‌های مهم جهت جذب، متابولیزه کردن و دفع داروها و سایر مواد مضر است. این اندام همواره در معرض عوارض سمی داروها و مواد مختلف بوده و به همین دلیل مورد توجه خاص می‌باشد. چندین آزمایش بیوشیمیایی در تشخیص بیماری‌های کبدی استفاده می‌شود که مهم‌ترین آنها، تعیین فعالیت

آمینوترانسفرازهای سرمی (AST، ALT و ALP) می‌باشد که نشان‌دهنده صدمه به هپاتوسیت‌ها است افزایش فعالیت این آنزیم‌ها حضور یک بیماری فعال کبدی را هشدار می‌دهد. ترکیبات فنولی (لیگنان، اسیدهای فنولی، کوماریک‌اسید، فرولیک‌اسید، گلیکوزیدها، فلاونوئیدها و تانن) که در روغن کاملینا موجود می‌باشد، جهت پایداری اکسیداتیو اسیدهای چرب غیر اشباع ضروری می‌باشد (۱۲، ۱۳). در مطالعه رحیمی و همکاران (۱۸) که به بررسی روغن دانه کتان و روغن سیاه دانه بر میزان آنزیم‌های کبدی و برخی از فاکتورهای التهابی در موش‌های صحرایی نر مبتلا به کبد چرب پرداختند، نشان دادند که بیش‌ترین کاهش معنی‌دار در سطح سرمی آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز در گروهی بود که از تیمار روغن سیاه دانه استفاده کرده و در مرتبه بعد ترکیب روغن‌های سیاه دانه و کتان می‌باشد که نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد، در ارتباط با سطوح آنزیم آلانین‌آمینو ترانسفراز، بیش‌ترین کاهش در ترکیب روغن‌ها و در مرتبه‌های بعدی روغن دانه ک و بعد روغن سیاه دانه نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد. روغن کاملینا حاوی مقادیر بالایی از ویتامین‌ها از جمله تیامین، نیاسین و پانتوتیک اسد می‌باشد (۲۵). روغن کاملینا به دلیل داشتن آلفا-توکوفرول و ویتامین E بالا که خود آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد (۲۴). روغن کاملینا حاوی سطح بالایی از توکوفرول و ترکیبات فنولیکی می‌باشد که باعث پایداری بالاتر این روغن می‌باشد (۱۲). بنابراین روغن کاملینا از طریق آنتی‌اکسیدانی احتمال دارد باعث بهبود در آنزیم‌های کبدی شود. در این پژوهش اثرات روغن کاملینا بر تیترا آنتی‌بادی نیوکاسل و SRBC تاثیر نداشت، اما با این وجود در تیترا آنفولانزا تمایل به معنی‌داری نشان داد. میرزاده و همکاران (۱۶) به بررسی تاثیر روغن کتان بر تیترا

Broilers. *Pakistan Journal of Nutrition*, 17 (11):512-517.

4. Aziza, A.E., Quezada, N., Cherian, G. 2010. Feeding *Camelina sativa* meal to meal-type chickens: Effect on production performance and tissue fatty acid composition. *Journal of Applied Poultry Research*, 19(2):157-168.

5. Belayneh, H.D., Wehling, R.L., Cahoon, E., Ciftci, O.N. 2015. Extraction of omega-3-rich oil from *Camelina sativa* seed using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 104:153-159.

6. Bussler, S., Vogel, M., Pietzner, D., Harms, K., Buzek, T., Penke, M., Flemming, G. 2018. New pediatric percentiles of liver enzyme serum levels (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, γ -glutamyltransferase): effects of age, sex, body mass index, and pubertal stage. *Hepatology*, 68(4):1319-1330.

7. Chichłowska, J., Florysiak, M., Szkudelski, T., Kilber, A. 1997. The changes of lipid metabolism indicators in rats fed on diet supplemented with seed of flax and hemp. *Rośliny Oleiste Poznań*, 15-16:30.

8. Eidhin, D.N., Burke, J., Lynch, B., O'Beirne, D. 2003. Effects of dietary supplementation with *Camelina* oil on porcine blood lipids. *Journal of food science*, 68(2):671-679.

9. Gogus, U., Smith, C. 2010. N-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(3):417-436.

10. Hajiazizi, F., Sadeghi, A., Karimi, A. 2023. The effects of dietary inclusion of *Camelina sativa* on performance and ascites incidence in broilers subjected to cold exposure. *Veterinary Medicine and Science*. 9:1711-1725.

11. Hassan, M.S.H., Radwan, N.L., Khalek, A.M.A., El-Samad, M.H.A. 2011. Effect of different dietary linoleic acid to linolenic

نیوکاسل در خروس‌های مادر گوشتی پرداختند نشان دادند که نتایج پژوهش نشان می‌دهد که استفاده از روغن کتان بر عیار پادتن علیه نیوکاسل تمایل معنی‌داری نشان داد که یا نتایج حاضر مطابقت داشت. روغن کتان از نظر ترکیبات بسیار مشابه با روغن کاملینا می‌باشد. میرزاده و همکاران (۱۶) به بررسی تاثیر روغن کتان بر تیترا آنتی‌بادی علیه آنفولانزا در خروس‌های مادر گوشتی پرداختند، نتایج پژوهش نشان می‌دهد که استفاده از روغن کتان بر عیار پادتن علیه آنفولانزا تمایل معنی‌داری نشان داد؛ اگر چه روغن کتان توانسته بود از نظر عددی باعث افزایش عیار پادتن علیه آنفولانزا شده بود، که با نتایج این پژوهش که استفاده از سطح ۲ درصد روغن کاملینا باعث تمایل معنی‌داری در تیترا آنتی‌بادی علیه آنفولانزا شده بود مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری

در کل نتایج پژوهش نشان داد که استفاده از روغن کاملینا باعث کاهش غلظت کلسترول و تری‌گلیسرید و بهبود آنزیم‌های کبدی در جوجه‌های گوشتی می‌شود، به طوری که استفاده از سطح ۲ درصد روغن کاملینا در جیره‌های جوجه گوشتی توصیه می‌شود.

منابع

1. Abramovic, H., Abram, V. 2005. Physico-chemical properties, composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil. *Food Technology and Biotechnology*, 43(1):63-70.

2. Ahmad, S., Ahsan-ul-Haq, Y.M., Sabri, MA. Kamran, Z. 2012. Response of laying hens to omega-3 fatty acids for performance and egg quality. *Avian Biology Research*, 5(1):1-10.

3. Al-Hilali, A. H. 2018. Research Article Effect of Dietary Flaxseed Oil on Growth Performance and Serum Lipid Profiles in

- liver disease. *Animal Biology Quarterly*, 18(3):1426-1418.
19. Sattari Najafabadi, F., Mohit, A., Moravej, H., Darmani Kuhi, H., Ghavi, Hossein-Zadeh, N. 2020. Effect of different sources of omega-3 and omega-6 calcium fat powder on performance, hatchability, serum lipids and ovarian follicles count in old broiler breeder hen. *Animal Production Research*, 9(3):1-15.
 20. Shim, K.S., Park, G.H., Choi, C.J., Na, C.S. 2004. Decreased triglyceride and cholesterol levels in serum, liver and breast muscle in broiler by the supplementation of dietary *Codonopsis lanceolata* root. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 17(4):511-513.
 21. Tejera, N., Vauzour, D., Betancor, M.B., Sayanova, O., Usher, S., Cochard, M., Minihane, A.M. 2016. A transgenic *Camelina sativa* seed oil effectively replaces fish oil as a dietary source of eicosapentaenoic acid in mice. *Journal of nutrition*, 146(2):227-235.
 22. Viveros, A., Ortiz, L.T., Rodríguez, M.L., Rebolé, A., Alzueta, C., Arija, I., Brenes, A. 2009. Interaction of dietary high-oleic-acid sunflower hulls and different fat sources in broiler chickens. *Poultry Science*, 88(1):141-151.
 23. Wang, L., Zhang, Y., Chen, J.F., Luo, Y.Y., Zou, C.X., Qin, L.K., Jia, Y.L. 2023. Study on preparation and properties of *Camellia oleifera* seed oil microcapsules by complex coacervation and spray drying. *LWT- Food Science and Technology*, 184:115056.
 24. Woods, V.B., Fearon, A.M. 2009. Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: A review. *Livestock Science*, 126(1-3):1-20.
 25. Zubr, J. 2010. Carbohydrates, vitamins and minerals of *Camelina sativa* seed. *Nutrition & Food Science*, 40(5):523-531.
 - acid ratios on some productive, immunological and physiological traits of Dandarawy chicks. *Egyptian Poultry Science Journal*, 31(1):149-160.
 12. Hrastar, R., Petrisic, M.G., Ogrinc, N., Kosir, I.J. 2009. Fatty acid and stable carbon isotope characterization of *Camelina sativa* oil: implications for authentication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2): 579-585.
 13. Jiang, L., Wu, J., Liu, S., Wu, W., Liao, L. 2023. Effect of alkaline microcrystalline cellulose deacidification on chemical composition, antioxidant activity and volatile compounds of camellia oil. *LWT- Food Science and Technology*, 186: 115214.
 14. Johnson, E.N., Falk, K., Klein-Gebbinck, H., Lewis L., Vera, C., Gan, Y., Phelps, S. 2009. Update on *Camelina* agronomy research trials. *AAFC Research Station, Saskatoon, SK*, pp:233-251.
 15. Mirzadeh, K., Kazemizadeh, A., Ansari, Pirsaraei, Z. 2022. The effect of kefir and peppermint extract (*Mentha piperita*) extract in drinking water on performance, lipid profiles, thyroid hormones and testosterone hormone of Japanese quail. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 14(1):83-95.
 16. Mirzadeh, K. Kazemizadeh, A. 2021. The effect of linseed oil on Newcastle antibody titer in broiler hens. The 5th National Innovation Conference in Agriculture, Animal Sciences and Veterinary Medicine.
 17. Pavlista, A.D., Isbell, T.A., Baltensperger, D.D., Hergert, G.W. 2011. Planting date and development of spring-seeded irrigated canola, brown mustard and camelina. *Industrial Crops and Products*, 33(2):451-456.
 18. Rahimi, M., Hosseini, S.A., Edalatmanesh, M.A. 2019. Comparison of the effect of linseed oil and black seed oil on liver enzymes and some inflammatory factors in male rats with non-alcoholic fatty

Research Article

The Effect of Replacing Gammarus Powder Instead of Flower Pollen in Feeding Bee Colonies on Their Performance and Behavioral Indicators

Kaveh Jafari Khorshidi^{1*}, Esmacil Ganji Jamehshooran^{2*}, Monirolsadat Salavatian¹

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

2- Department of Animal Sciences, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran

*Corresponding author: esmaeelganji@gmail.com

Received: 27 December 2024

Accepted: 26 August 2024

DOI: 10.60833/ascij.2025.1091221

Abstract

Bees naturally receive carbohydrates through flower nectar, proteins, fats, vitamins and minerals through pollen. In this regard, the present research was carried out using Gammarus as a protein source to replace pollen in desert conditions and on the common honey bee *Apis mellifera*. The factorial experiment was conducted in the form of a randomized complete block design with 4 treatments and 4 replications, a total of 16 hives during a period of 6 months. The treatments included: 1- pollen (pure), 2- gammarus (33.3) percent + pollen (66.6) percent, 3- gammarus (66.6) percent + pollen (33.3) percent and 4- gammarus powder (pure). A significant difference was observed between different treatments in terms of food consumption in different periods at the end of the experiment ($p < 0.05$). In other words, the highest food consumption was related to control treatment (pollen) with 195.4 grams and the lowest consumption was related to treatment 3 with 91.99 grams in each period. Also, a significant difference was observed among the different treatments in the different periods of the experiment in terms of honey storage in the tested colonies ($p < 0.05$). The average honey reserve in different periods in treatments 1 to 4 was 2.49, 3.34, 2.33 and 4.1 kg respectively. The average cost of feed to produce each kilogram of food in the Gammaros treatment was about 2 times more economical than the control treatment. And in other studied traits, according to the obtained results, no significant difference was observed. The use of Gamarus food composition instead of pollen in honey bee colonies is perfectly compatible with the diet of honey bees, and in terms of economic characteristics, it can be used as a new product instead of flower pollen, which was about 2 times more economical. It is recommended

Keywords: Honey Bee, Replacement Feed, Pollen, Gamarous, Biological Behaviors.

تاثیر جایگزینی پودر گاماروس به جای گرده‌ی گل در تغذیه کلونی‌های زنبور عسل بر عملکرد و شاخص‌های رفتاری آن‌ها

کاوه جعفری خورشیدی^۱، اسماعیل گنجی جامه شوران^{۲*}، منیرالسادات صلواتیان^۱

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

۲- گروه علوم دامی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

*مسئول مکاتبات: esmaeelganji@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۶

DOI: 10.60833/ascij.2025.1091221

چکیده

زنبور عسل به‌طور طبیعی کربوهیدرات‌ها را از طریق شهد گل، پروتئین‌ها، چربی‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی را از طریق گرده دریافت می‌نماید. پژوهش حاضر با استفاده از گاماروس به‌عنوان منبع پروتئینی جهت جایگزینی گرده در شرایط صحرا و بر روی زنبور عسل معمولی (*Apis mellifera*) انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۴ تیمار و ۴ تکرار، جمعاً ۱۶ کندو در طی مدت ۶ ماه اجرا شد. تیمارها شامل: ۱-گرده (خالص)، ۲- گاماروس (۳۳/۳) درصد + گرده (۶۶/۶) درصد، ۳- گاماروس (۶۶/۶) درصد + گرده (۳۳/۳) درصد و ۴- پودر گاماروس (خالص) بودند. بین تیمارهای مختلف از نظر مصرف غذا در دوره‌های مختلف اختلاف معنی‌داری در پایان آزمایش مشاهده گردید ($p < 0/01$). به‌عبارت دیگر بیشترین مصرف غذا مربوط به تیمار شاهد (گرده گل) با ۱۹۵/۴ گرم و کم‌ترین مصرف مربوط به تیمار ۳ با ۹۱/۹۹ گرم در هر دوره بود. همچنین در بین تیمارهای مختلف در دوره‌های مختلف آزمایش از نظر ذخیره عسل در کلونی‌های مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($p < 0/01$). میانگین ذخیره عسل در دوره‌های مختلف در تیمارهای ۱ تا ۴ به‌ترتیب برابر ۲/۴۹، ۳/۳۴، ۲/۳۳ و ۴/۱ برحسب کیلوگرم بود. میانگین هزینه خوراک برای تولید هر کیلوگرم غذا در تیمار گاماروس حدود ۲ برابر اقتصادی‌تر بود از تیمار شاهد بود. و در سایر صفات مورد مطالعه با توجه به نتایج به‌دست آمده تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. استفاده از ترکیب غذایی گاماروس به‌جای گرده در کلونی‌های زنبور عسل کاملاً با رژیم غذایی زنبوران عسل سازگار بوده و از نظر صفات اقتصادی به‌عنوان یک محصول جدید (گاماروس) به‌جای گرده گل که حدود ۲ برابر اقتصادی‌تر بود، قابل توصیه است.

کلمات کلیدی: زنبور عسل، تغذیه جایگزین، گرده گل، گاماروس، رفتارهای حیاتی.

مقدمه

معدنی، ویتامین‌ها و آب برای رشد و نمو طبیعی نیاز دارد. زنبور عسل سه گروه از ترکیبات شامل آب، شهد و گرده گل را برای تامین نیازهای غذایی خود جمع‌آوری می‌کند که شهد مهم‌ترین منبع تامین انرژی

تغذیه زنبور عسل مبنای زنبورداری موفق را تشکیل می‌دهد (۱۲). زنبور عسل برای تامین احتیاجات غذایی خود به انواع مختلفی از مواد مغذی شامل پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها، لیپیدها، عناصر

که به شکل کربوهیدرات بوده و گرده به‌عنوان منبع پروتئینی با ترکیبات شیمیایی متنوع به عنوان تامین کننده پروتئین مورد نیاز زنبور عسل می‌باشد. کمبود هرکدام از این مواد مغذی سبب افت شدید جمعیت زنبور عسل، کاهش طول عمر آن‌ها، افزایش میزان حساسیت در برابر بیماری و نهایتاً تلف شدن کلونی می‌شود (۱). مهم‌ترین ترکیب پروتئین است، گرچه ترکیب اسید آمینه‌های تشکیل‌دهنده آن نیز مورد توجه می‌باشد. حداقل پروتئین خام مورد نیاز زنبور عسل ۲۰ تا ۲۵ درصد تعیین شده است. ۱۰ اسید آمینه برای تأمین نیاز غذایی زنبورهای عسل ضروری تشخیص داده شده‌اند و عبارتند از: ترئونین، والین، متیونین، ایزولوسین، لوسین، فنیل‌آلانین، هیستیدین، لیزین، آرژنین و تربیتوفان. اسید آمینه‌های گلیسین، پرولین و سرین برای رشد ضروری نیستند ولی برای تحریک رشد مطلوب، مؤثر می‌باشند. مهم‌ترین اسید آمینه محدود کننده در گرده جمع شده توسط زنبور عسل، ایزولوسین می‌باشد. در سالیان اخیر محققین با توجه به اهمیت گرده در تغذیه کلونی‌های زنبور عسل و تاثیر آن بر فعالیت‌های بیولوژیکی، تلاش گسترده‌ای را نموده تا با استفاده از مواد جایگزین یا مکمل گرده در تغذیه زنبوران عسل به‌ویژه در زمان عدم دسترسی زنبوران عسل به منابع گرده در طبیعت، مانع از کاهش جمعیت، رشد کلونی‌ها و سایر فعالیت‌های حیاتی کلونی‌ها گردند. لذا دستیابی به منابع مناسب پروتئینی و قابل استفاده برای کلونی‌ها لازم و ضروری می‌باشد. گرده گل جدا از نقش آن در تغذیه زنبورها و نوزادان آن‌ها در سالیان اخیر در تغذیه انسان بسیار رایج شده است. از خواص گرده می‌توان به عنوان غذای کامل برای سلامتی انسان و تقویت کننده کودکان و بزرگسالان و همچنین مکمل غذایی انرژی-زا برای ورزش‌کاران و هم برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند درمان پروستات، ناتوانی جنسی،

بیماری‌های عصبی، دیابت و افزایش طول عمر مورد استفاده قرار می‌گیرد. مسائل مدیریتی ممکن است در پی کمبود گرده یا کیفیت پایین گرده‌های جمع‌آوری شده به‌وسیله زنبورهای مزرعه به‌وجود آید. بنا بر عقیده هیداک (۱۹۶۵) کلونی‌هایی که دانه گرده کافی نداشته باشند در زمستان عسل کم‌تری مصرف می‌کنند، گرچه زنبور کم‌تری می‌میرد، ولی مقدار لارو و نوزاد در بهار سال بعد کم‌تر می‌شود. اگر گرده کافی یا خوراک مکمل مناسب در دسترس نباشد کلونی‌ها سریعاً ضعیف می‌شوند. مدیریت جمعیت به‌طور قابل توجهی به کمیت و کیفیت گرده بستگی دارد. کاهش حجم گرده، منطقه تخم‌ریزی توسط کلونی پرورش را کاهش می‌دهد. با کاهش کیفیت گرده کلونی نیازمند میزان جذب مواد مغذی ضروری بیش‌تری برای توسعه می‌باشد. طبق نظریه هیداک (۱۹۶۵) تولید نوزاد همیشه به رشد غده بالا حلقی زنبورهای پرستار وابسته است. با تامین به‌موقع احتیاجات پروتئین و چربی کلونی‌ها از طریق خوراندن کیک‌های جانشین یا مکمل گرده به‌صورت خمیرهای شیرین به آن‌ها، تخم‌گذاری ملکه بیش‌تر شده و جمعیت به‌طور تدریجی ولی به‌سرعت افزایش می‌یابد، بدیهی است که کلونی‌های قوی و پرجمعیت کم‌تر مورد حمله آفات و عوامل بیماری‌زا قرار گرفته و زمستان‌های سرد و طولانی را به‌راحتی پشت‌سر خواهند گذاشت (۱۳). عدم وجود گرده و یا کمبود آن در تغذیه زنبور عسل باعث کاهش یا عدم تولید ژله رویال، کاهش طول عمر، کاهش تولید موم و شان‌سازی، کاهش میزان تخم‌گذاری ملکه، عدم تولید زهر و عدم رشد مناسب تخمدان‌ها می‌شود. این عوارض به‌تدریج باعث کاهش جمعیت کلونی شده و بازده فعالیت کندوها را کاهش می‌دهد که در نهایت باعث از بین رفتن کلونی می‌شود (۸). بنابراین درمواقعی از سال که گرده گل در طبیعت کمیاب است استفاده از جانشین

شونده‌های آن ضرورت دارد، درجیره‌های غذایی زنبور عسل اگر مکمل‌های پروتئینی همراه با گرده (۵ تا ۲۵ درصد) باشد اصطلاحاً به آن مکمل گرده می‌گویند ولی اگر جیره غذایی فقط از مکمل پروتئینی و بدون گرده باشد آن را جانشین گرده می‌نامند (۱۲). گرده‌ای که توسط زنبوران در سلول‌های شان ذخیره می‌شود نان گرده یا نان زنبور نامیده می‌شود. کلونی‌هایی که با مکمل گرده و یا جانشین گرده تغذیه می‌شوند در بهار پرورش نوزاد را زودتر از سایر کلونی‌ها شروع می‌کنند و کارگران بیش‌تری در فصل افزایش جمعیت پرورش می‌دهند (۶ و ۲۴). گاماروس‌ها می‌توانند یک جایگزین مناسب به‌عنوان مکمل گرده یا جانشین گرده مورد استفاده قرار گیرند که در تحقیق حاضر از آن استفاده شده است. گاماروس‌ها از نظر رده‌بندی متعلق به شاخه بندپایان، رده سخت‌پوستان، زیررده سخت‌پوستان عالی راسته ناجورپایان و زیرراسته گاماریده می‌باشند (۲۵). اندازه متوسط گاماروس‌ها حدود یک سانتی‌متر و بدن آن‌ها بند بند می‌باشد. قسمت سینه‌ای دارای هفت بند و شکم واجد شش بند و دارای اسکلت خارجی آهکی می‌باشند (۲۷). پژوهش حاضر با هدف بررسی تاثیر جایگزینی پودر گاماروس به‌جای گرده‌ی گل در تغذیه کلونی‌های زنبور عسل بر عملکرد و شاخص‌های رفتاری آن‌ها انجام شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در زنبورستان مرکز آموزش پرورش زنبور عسل شهید حسن‌پور واقع در استان مازندران شهرستان بابلسر در پاییز ۱۴۰۰ تا بهار ۱۴۰۱ در شرایط صحرا و بر روی زنبور عسل معمولی *Apis mellifera* اجرا گردید. میانگین ترکیبات گرده گل با ترکیبات گاماروس براساس صددرصد ماده خشک جهت استفاده زنبور عسل در جدول ۱ نشان داده شده

است. برای انجام دقیق آزمایش و جلوگیری از اختلاف سن و نژاد ملکه لازم بود که تمام کندوهای مورد آزمایش دارای ملکه‌هایی بودند که از یک ملکه مادر به‌وجود آمده بودند (خواهرهای تنی) به همین دلیل در این تحقیق از کلونی‌های با ملکه خواهرهای تنی به تعداد ۱۶ کلونی استفاده گردید. کلیه کندوهای انتخابی از نظر میزان جمعیت و تعداد قاب همسان و همگی دارای ۵ قاب جمعیت بودند. در این آزمایش از پودر گاماروس دریای خزر، گرده گل درختان جنگلی خرمالو و کرات (جنگل‌های مازندران) که طی انجام آنالیز، پروتئین آن به‌ترتیب ۲۱ و ۴۴/۲۹ درصد، همچنین عسل با کیفیت متوسط و آب برای تهیه کیک استفاده گردید. در ابتدا قبل از انجام هر کاری کلیه اقلام جامد و دانه‌ای تهیه شده جهت امکان استفاده شدن توسط زنبور عسل به حالت پودر درآمد، به همین علت ابتدا بعد از صید گاماروس‌ها، مرحله اول خشک شدن با پخش آن‌ها در مجاورت نور خورشید به‌مدت ۲-۳ روز به‌طول انجامید. در این مرحله جداسازی گاماروس‌ها از صدف و سایر موجودات صورت گرفت. مرحله بعدی خشک کردن گاماروس‌ها در گرم‌خانه بود که این‌کار هم ۲-۳ روز طول کشید. خشک شدن تا از بین رفتن نهایی رطوبت در گاماروس ادامه یافت، در این مرحله نیز جداسازی گاماروس از صدف و سایر موجودات صورت گرفت. سپس توسط دستگاه پودرکن (مش) یا الک ۵۰۰ میکرون خرد و پودر شدند. سپس تمامی مواد اولیه توسط ترازوی دیجیتال آزمایشگاهی با دقت یک صدم توزین شدند. پس از توزین مواد اولیه پودری یعنی پودر گاماروس، گرده، و عسل مربوط به هر تیمار به‌طور جداگانه بر روی روزنامه کاملاً با هم مخلوط گردید. آب نیز توزین گردید البته برای تیمارهای حاوی گرده، آب توزین شده هر فرمول ۲ ساعت قبل از تهیه کیک برای تهیه کیک بهتر بر روی گرده گل آن

ریخته شد تا دانه‌های گرده گل نرم و له گردد. عسل توزین شده را در ظرف مناسب دوجداره ریخته و روی اجاق حرارت داده شد تا کاملاً شل و روان گردد و در طی تهیه کیک نیز شعله گاز ملایم و روشن بود. بعد از این‌که عسل حالت آبکی پیدا کرد، مخلوط مواد پودری تهیه شده از قبل را به تدریج با عسل مخلوط و به‌طور ممتد به هم و ورز داده شد. هم‌چنین در ادامه پس از اتمام مخلوط مواد پودری، آب اضافه تا کیک کاملاً مخلوط و به‌صورت خمیر مثل خمیر نانویی درآمد. کیک تهیه شده برای هر تیمار را که به‌طور جداگانه آماده شده بود با ترازوی دیجیتالی برای هر کلونی آزمایشی به میزان ۱۸۰ گرم با نسبت‌های پیش-بینی شده در طرح توزین، سپس در صورت نیاز با آب به‌عنوان ماده روان کننده وزن و با ترکیب غذایی مخلوط و در نهایت در کاغذ مخصوص بسته‌بندی شد، و جهت استفاده زنبور بر روی هر کلونی قرار داده شد. در صورت مصرف کیک توسط هر کلونی مجدداً کیک تهیه و در اختیار کلونی‌ها قرار داده شد. در این آزمایش خصوصیات ذیل اندازه‌گیری شد.

برآورد نسل (تخم، لارو و شفیره): برای اندازه‌گیری میزان تخم‌گذاری ملکه زنبور عسل یک قاب (کادر) خالی را به‌وسیله سیم به مربع‌های ۵×۵ سانتی‌متر تقسیم و در داخل هر مربع حدوداً صد سلول شان قرار داده شد، لذا از این کادر جهت اندازه‌گیری میزان مساحت تخم، لارو و شفیره استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان تخم‌گذاری ملکه اولاً در ابتدای شروع طرح مساحت اولیه تخم‌گذاری اندازه‌گیری و سپس ۳ مرحله با فاصله ۱۴ روز در دوره پایانی طرح انجام گردید که رکوردهای به‌دست آمده جهت تجزیه و تحلیل ثبت گردید.

اندازه‌گیری میزان جمعیت کلونی: به‌روش بصیری انجام گردید (۶). روش کار به‌صورت قابی بود. یعنی وجود زنبور به‌طور کامل در دو طرف قاب را یک

قاب کامل و کم‌تر از آن را کسری از عدد یک در نظر گرفته شد. برای اندازه‌گیری میزان جمعیت کلونی نیز اولاً در ابتدای شروع طرح مساحت اولیه جمعیت اندازه‌گیری و سپس ۳ مرحله با فاصله ۱۴ روز در دوره پایانی طرح انجام گردید و رکوردهای به‌دست آمده جهت تجزیه و تحلیل ثبت گردید.

تمایل کلونی به بچه دادن: سنجش به‌روش بصیری انجام گردید (۶). معمولاً زمانی که کلونی آماده بچه دادن شد، زنبورهای کارگر در قسمت پایین و کناره شان‌ها شروع به ساختن شاخون کردند. تعداد شاخون به تمایل کلونی برای بچه دادن بستگی داشت که در طرح مذکور هیچ گونه شاخونی در کلونی‌ها مشاهده نشد.

روش اندازه‌گیری رفتار دفاعی: به‌روش بصیری انجام گردید (۶). روش کار بدین صورت بود که یک گلوله چرمی سیاه رنگ به قطر ۳ سانتی‌متر به یک طناب سفید رنگ به‌طول یک متر آویزان شده و این گلوله را به ترکیبات معطر آروماتیک (ان استات بوتیل) که محرک برای رفتار نیش زدن و دفاعی بود در اطراف دریچه پرواز کندو به‌مدت ۶۰ ثانیه حرکت داده شد، سپس گلوله در یک پاکت نایلونی گذاشته شد و به آزمایشگاه منتقل و تعداد نیش‌های موجود در گلوله شمارش شد. آزمایش در روزهای آفتابی و آرام بین ساعات ۱۱ تا ۱۵ و در فصل برقراری جریان شهد طبیعی انجام شد (۲۵).

روش اندازه‌گیری فعالیت صحراگردی: به‌روش بصیری انجام گردید (۶). برای سنجش کلونی، در فصل برقراری جریان شهد (گرده) در یک روز آفتابی مناسب در بین ساعات ۱۱/۵ تا ۱۳، دریچه پرواز کلونی را ۶۰ ثانیه مسدود، و پس از این مدت، با دوربین مجهز به ماکرولنز (۵۵ میلی‌متری) و در فاصله مناسب و یکسان برای تمام کلونی‌ها، از دریچه پرواز هر کلونی عکس‌برداری گردید. پس از ظهور

عکس‌ها، زنبورهای در حال برگشت از صحراگردی شمارش گردید.

برآورد جمع‌آوری گرده: با توجه به شروع فصل بهار و گل‌دهی گیاهان، زنبور عسل برای افزایش جمعیت، گسترش و تغذیه تخم و نوزادان مبادرت به جمع‌آوری گرده گل هم‌زمان با گرده‌افشانی نمودند که پس از گذشت مدتی از گل‌دهی گیاهان، جمع‌آوری گرده از طریق قرار دادن تله گرده‌گیر در جلوی دریچه پرواز کندو اقدام شد. لذا در این طرح هم‌زمان با گل‌دهی گیاهان طی سه روز به مدت ۵-۴ ساعت تله گرده‌گیر بر روی کلونی‌ها قرار داده شد و گرده گل جمع‌آوری شده هر کندو را به‌طور جداگانه با ترازوی دیجیتال با دقت یک صدم گرم توزین و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

رشد بهاره کلونی‌ها: به‌روش بصیری انجام گردید (۶). با آغاز فصل بهار و اندازه‌گیری جمعیت و نسل که با موفقیت زمستان‌گذرانی را طی نمودند اندازه‌گیری و ثبت گردید.

میزان رغبت به مصرف غذا: برای اندازه‌گیری این صفت پس از هر بار تغذیه میزان غذای مصرفی

کلونی‌ها قبل و بعد از تغذیه (در صورت باقی‌ماندن از تغذیه قبلی) اندازه‌گیری و ثبت گردید. در این تحقیق تاثیر استفاده از سطوح مختلف پودر گاماروس و گرده در تغذیه زمستانه زنبور عسل در شرایط صحرا مورد ارزیابی قرار گرفت. اجزاء تشکیل دهنده هر تیمار به-شرح جدول ۳ بود. تیمارها شامل: ۱-گرده (خالص)، ۲-گاماروس (۳۳/۳) درصد + گرده (۶۶/۶) درصد، ۳-گاماروس (۶۶/۶) درصد + گرده (۳۳/۳) درصد و ۴-پودر گاماروس (خالص) بود.

تجزیه و تحلیل آماری: طرح آماری مورد استفاده در این تحقیق از نوع آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۴ تیمار و ۴ تکرار، جمعاً ۱۶ کندو در طی مدت حدود ۹ ماه اجرا شد. روش آنالیز آماری از نوع تجزیه واریانس (ANOVA) و از نرم‌افزار آماری SAS برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. برای نرمال بودن باقی‌مانده‌های مدل، تجزیه و تحلیل صفت جمعیت از کوئتانژانت استفاده گردید. برای صفات تبدیل شده از میانگین خام تیمارها استفاده شد. برای نرمال بودن باقی‌مانده مدل تجزیه و تحلیل صفت رشد و نسل از تبدیل سینوسی استفاده گردید.

جدول ۱- مقایسه میانگین ترکیب مواد گرده خشک در ۱۰۰ گرم ماده خشک گرده گل گاماروس (۱۴، ۲۵)

Table 1- Comparison Average composition of Materials in 100 g of dry matter gammarus and flower pollen (14, 25)

Composition	Flower Pollen	Gammarus
Water	11	6
Crude Protein	21	44.29
Ash	3	33.63
Crude Fat	5	16.9
Revival Sugars	26	--
Nonrevival Sugars	3	--
Starch	3	--
Crude Energy(Calories Per 100g)	115	356
Unknown Material	29	--

جدول ۲- میانگین محتوای اسیدهای آمینه در گرده گیاهان در مقایسه با میانگین ترکیبات گاماروس (۱۸)

Table 2- The average content of amino acids in plant pollen compared to the average of gammarus compounds (20)

Amino Acid	Average Pollen	Average Gammarus
Arginine	3.2	5.3
Histidine	1.3	2.5
Isoleucine	1.9	5.1
Leucine	3.4	7.1
Lysine	3	6.4
Metaionine	1.1	1.9
Phenylalanine	2.3	4.1
Threonine	1.2	4.1
Tryptophan	1.1	1.4
Valin	2.3	5.8

جدول ۳- ترکیب جیره غذایی هر یک از تیمارهای آزمایشی (بر اساس درصد)

Table 3- Dietary composition of each of the experimental treatments (based on percentage)

Feed Components	Treatment			
	1	2	3	4
Honey	60	60	60	60
Gammarus Powder	0	40	80	120
Flower Pollen	120	80	40	0
Water	26	75	55	70

نتایج

۳، ۳/۲۵، ۲/۷۵ و ۳ بود. با توجه به زمان انجام آزمایش در فصل پائیز که به‌طور طبیعی با کاهش جریان گرده شاهد کاهش جمعیت کلونی‌ها می‌باشیم، اما در این پژوهش با استفاده از گرده به‌عنوان تیمار شاهد و گاماروس به‌عنوان جایگزین گرده در سطوح ۳۳/۳، ۶۶/۶ و ۱۰۰ درصد کل جیره نه تنها جمعیت کلونی‌ها در تیمارهای مختلف کاهش نیافته بلکه جمعیت در تیمارهای مختلف نیز از نظر آماری معنی‌دار نگردیده است ($p < 0/01$). نسل (تخم، لارو، شفیره) در بین تیمارهای مختلف در شروع و پایان آزمایش اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. میانگین اولیه در تیمارهای ۱ تا ۴ به‌ترتیب ۳۵۰، ۲۱۴/۵۱، ۲۸۳/۸۷ و ۳۳۲/۲۶ سانتی‌متر مربع و میانگین در پایان آزمایش به‌ترتیب ۳۵۲/۶۷، ۱۱۶۲/۷۵، ۲۲۷/۲۵ و ۹۰۱/۶۷ سانتی‌متر مربع بود. به‌عبارت دیگر استفاده از گاماروس به‌عنوان جایگزین گرده در تغذیه کلونی‌های

میانگین رفتار تهاجمی کلونی‌ها، جمعیت کلونی‌ها، فعالیت صحراگردی کلونی‌ها، برآورد نسل، وزن کلونی، وزن ۲۰ عدد زنبور، جمع‌آوری گرده گل، رشد بهاره کلونی‌ها و تمایل کلونی به بچه دادن در شروع و پایان آزمایش در جداول ۴ و ۵ آمده است. رفتار تهاجمی کلونی‌ها بین تیمارهای مختلف در پایان آزمایش اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. میانگین اولیه رفتار تهاجمی در تیمارهای ۱ تا ۴ به‌ترتیب ۱، ۰/۷۵، ۲ و ۱/۲۵ و در پایان آزمایش به‌ترتیب ۰/۳۳، ۰/۳۸، ۰/۲۵ و ۰/۳۳ بود. این نتایج نشان داد که استفاده از گاماروس تا ۱۰۰ درصد کل جیره نسبت به جیره شاهد تفاوت قابل ملاحظه‌ای را ایجاد ننمود. جمعیت کلونی‌ها در بین تیمارهای مختلف در شروع و پایان آزمایش اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. میانگین اولیه جمعیت کلونی‌ها در تیمارهای ۱ تا ۴ به‌ترتیب ۳، ۳، ۳ و ۳/۲۵ و در پایان آزمایش به‌ترتیب

زنبور عسل نسبت به جیره شاهد (بدون گاماروس) تفاوت قابل ملاحظه‌ای را در تولید نسل در تیمار جایگزین ایجاد نمود. نتایج این تحقیق با نتایج اعلام شده توسط سعادت‌مند (۱۹۹۳) مطابقت دارد (۲۵). وزن کلونی در بین تیمارهای مختلف در شروع و پایان آزمایش اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. میانگین اولیه در تیمارهای ۱ تا ۴ به ترتیب ۲۱، ۲۰/۷، ۱۷/۰۷ و ۱۸/۴۵ و میانگین در پایان آزمایش به ترتیب ۱۵/۹۷، ۱۷/۴، ۱۴/۷ و ۱۶/۸ بود. وزن ۲۰ عدد زنبور در بین تیمارهای مختلف در شروع و پایان آزمایش اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. میانگین اولیه در تیمارهای ۱ تا ۴ به ترتیب ۱/۶۶، ۱/۸، ۱/۹۱ و ۱/۸۳ گرم و میانگین در پایان آزمایش به ترتیب ۱/۷۹، ۱/۶۷، ۱/۷۱ و ۱/۷۴ گرم بود. به عبارت دیگر استفاده از گاماروس در مقایسه با تیمار شاهد و وزن کلونی‌ها در شروع آزمایش منجر به کاهش وزن زنبوران عسل که نشان دهنده‌ی کمبود پروتئین در کلونی‌های مورد آزمایش می‌باشد مشاهده نگردید. بنابراین استفاده از ۱۰۰ درصد جایگزینی گاماروس با گرده در تغذیه کلونی‌های زنبور عسل تفاوت قابل ملاحظه‌ای را در وزن زنبوران کارگر کلونی ایجاد نمود. جمع‌آوری گرده گل بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری در پایان آزمایش مشاهده نگردید. میانگین در تیمارهای ۱ تا ۴ در پایان آزمایش به ترتیب ۳۱/۰۱، ۳۶/۳۲، ۲۵/۳۱ و ۴۱/۲۳ گرم بود. رشد بهاره کلونی‌ها بین تیمارهای مختلف در پایان آزمایش اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. میانگین رشد بهاره کلونی‌ها در تیمارهای ۱ تا ۴ در پایان آزمایش به ترتیب ۵/۶۷، ۶/۲۵، ۵/۲۵ و ۵/۶۷ بود. بنابراین با توجه به صفت رشد بهاره در کلونی‌های زنبور عسل، نتایج نشان می‌دهد که استفاده از گاماروس به عنوان جایگزین گرده در تغذیه کلونی‌ها تفاوت قابل ملاحظه‌ای را با تیمار شاهد نداشته و به راحتی قابل مصرف برای

کلونی‌های زنبور عسل می‌باشد. بچه‌دهی کلونی‌ها در پایان آزمایش در همه تیمارهای آزمایشی صفر بود. صفات چند بار اندازه‌گیری شده در آزمایش: برخی از صفات مورد مطالعه با توجه به نحوه اندازه‌گیری صفات نیاز به اندازه‌گیری صفات در فواصل زمانی معین بوده که در این پژوهش تحت عنوان صفات چند بار اندازه‌گیری شده مورد ارزیابی قرار گرفت و میانگین نسل، مصرف غذا و ذخیره در دوره‌های مختلف به فواصل ۲۱ روز یکبار در جدول ۶ آمده است. نسل (تخم، لارو و شفیره) در بین تیمارهای مختلف در دوره‌های مختلف اندازه‌گیری اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/01$). تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین تیمار شاهد (گرده) با تیمار جایگزین (گاماروس) مشاهده نگردید. بنابراین می‌توان اظهار کرد استفاده از گاماروس برای تغذیه کلونی‌های زنبور عسل به جای گرده گل به راحتی قابل جایگزینی در تغذیه می‌باشد. مصرف غذا در دوره‌های مختلف بین تیمارهای مختلف در پایان آزمایش اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/01$). میانگین در دوره‌های مختلف آزمایش به ترتیب ۱۹۵/۴، ۱۰۳/۷، ۹۱/۹۹ و ۱۱۱/۳۲ گرم بود. به عبارت دیگر بیشترین مصرف غذا مربوط به تیمار شاهد (گرده گل) با ۱۹۵/۴ گرم و کمترین مصرف مربوط به تیمار ۳ با ۹۱/۹۹ گرم در هر دوره بود. نتایج نشان داد تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری با تیمارهای ۲، ۳ و ۴ داشت. ولی در بین تیمارهای ۲، ۳ و ۴ اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p > 0/01$). با توجه به سایر فاکتورهای مورد مطالعه می‌توان اظهار نمود در شرایط یکسان استفاده از میزان گاماروس کمتر در شرایط مساوی با گرده بازده یکسانی را در رفتارهای بیولوژیک داشت. لذا استفاده از گاماروس به تنهایی با وزن کم‌تر بازده یکسانی را نسبت به تیمار شاهد داشت. ذخیره عسل در بین تیمارهای مختلف در دوره‌های مختلف آزمایش

اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.01$). میانگین ذخیره عسل در دوره‌های مختلف تیمارهای ۱ تا ۴ به ترتیب برابر ۲/۴۹، ۳/۳۴، ۲/۳۳ و ۴/۱ بر حسب کیلوگرم بود. با توجه به نتایج آزمایشات مشاهده گردید که استفاده از گاماروس در تیمار صددرصد جایگزین میزان مصرف غذای زمستانه نزدیک به دو برابر کاهش را نسبت به تیمار شاهد نشان داد.

بررسی اقتصادی: قیمت یک کیلوگرم مواد غذایی بر اساس نگهداری در فضای آزاد و قیمت یک کیلوگرم ترکیبات جیره غذایی در زمان آزمایش به ترتیب در جداول ۷ و ۸ آمده است. ارزش جیره‌های غذایی با توجه به قیمت مواد خوراکی در زمان آزمایش برای تیمارهای ۱ تا ۴ به ترتیب برابر ۳۷۹۳۶۸۰، ۳۲۸۲۶۲۰، ۲۷۷۱۵۶۰ و ۲۲۶۰۵۰۰ ریال بود (بر اساس شرایط نگهداری در فضای آزاد قبل از آماده سازی). میانگین هزینه خوراک برای تیمار شاهد برابر ۳۷۹۳۶۸۰ ریال و برای تیمار گاماروس ۲۲۶۰۵۰۰ ریال و در نتیجه تولید هر کیلوگرم غذا برای تیمار گاماروس ۱۵۳۳۱۸۰ ریال ارزان‌تر از تیمار شاهد شد. بنابراین استفاده از جیره غذایی حاوی ۱۰۰ درصد گاماروس به جای گرده گل، حدود ۲ برابر اقتصادی‌تر بود.

جدول ۴- میانگین صفات مطالعه شده کلونی‌های زنبور عسل قبل از انجام آزمایش

Table 4- The average studied characteristics of bee colonies before the experiment

Characteristics	Treatment				Coefficient of changes	p
	1	2	3	4		
Aggressive Behavior	1.41 ± 1	0.95 ± 0.75	2.30 ± 2	0.5 ± 1.25	0.45	0.10 ^{ns}
Colony Population	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	0.5 ± 3.25	1.1	0.42 ^{ns}
Desert Tour	13.75 ± 5.05	9.87 ± 6.25	5 ± 7.5	5.96 ± 12.75	6.735	0.34 ^{ns}
Generation	350 ± 236.89	214.51 ± 61.51	112.73 ± 283.87	332.26 ± 216.58	58.56	0.69 ^{ns}
Colony Weight	21 ± 1.47	20.7 ± 3.67	1.55 ± 17.07	18.45 ± 2.05	12.24	0.10 ^{ns}
The Weight of 20 Bees	1.66 ± 0.07	1.8 ± 0.31	0.38 ± 1.91	1.83 ± 0.13	0.26	0.6 ^{ns}

تیمارها شامل: ۱-گرده (خالص)، ۲-گاماروس (۳۳/۳) درصد + گرده (۶۶/۶) درصد و ۴-پودر گاماروس (خالص)، ns: تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.

The treatments include: 1- Pollen (pure), 2- Gammaros (33.3) % + Pollen (66.6) %, 3- Gammaros (66.6) % + Pollen (33.3) % and 4- Gammaros Powder (Pure), ns: There is no significant difference.

جدول ۵- میانگین صفات مطالعه شده کلونی‌های زنبور عسل پس از انجام آزمایش

Table 5- The average studied characteristics of bee colonies after the experiment

Characteristics	Treatment				p
	1	2	3	4	
Aggressive Behavior	0.33 ± 0.57	0.38 ± 0.54	0.25 ± 0.5	0.33 ± 0.57	0.99 ^{ns}
Colony Population	3 ± 0	3.25 ± 0	2.75 ± 0.5	3 ± 0	0.14 ^{ns}
Desert Tour	13.33 ± 3.51	41 ± 7.276	10.5 ± 4.35	19.33 ± 6.42	0.6 ^{ns}
Generation	352.67 ± 294.38	1162.75 ± 182.57	227.25 ± 138.9	901.67 ± 89.49	0.2 ^{ns}
Colony Weight	15.97 ± 2.53	17.4 ± 2.04	14.7 ± 1.24	16.8 ± 0.41	0.18 ^{ns}
The Weight of 20 Bees	1.79 ± 0.07	1.67 ± 0.15	1.71 ± 0.16	1.74 ± 0.2	0.76 ^{ns}
Collect Pollen	31.01 ± 29.70	36.32 ± 29.85	25.31 ± 13.24	41.23 ± 8.81	0.8 ^{ns}
Colony Spring Growth	5.67 ± 0.57	6.25 ± 1.89	5.25 ± 0.5	5.67 ± 0.57	0.7 ^{ns}
Giving Birth	0	0	0	0	0

جدول ۶- میانگین صفات چند بار تکرار شده در کلونی‌های زنبور عسل پس از انجام آزمایش

Table 6- Average traits repeated several times in bee colonies after the experiment

Characteristics	Treatment				Coefficient of changes	p
	1	2	3	4		
Honey	411.5	440.3	263.3	423.5	0.6384 ^{ns}	93
Flower Pollen	195.4 ^a	103.7 ^b	91.99 ^b	111.32 ^b	0.0001 ^{**}	24.8
Gammarus	2.49 ^b	3.34 ^a	2.33 ^b	4.1 ^a	0.0005 ^{**}	32

جدول ۷- قیمت مواد غذایی برحسب یک کیلوگرم

Table 7- Food prices per 1 kg

Food Material	Price in Rials
Honey	1800000
Flower Pollen	4800000
Gammarus	2500000

جدول ۸- قیمت مواد خوراکی بر اساس نگهداری در فضای آزاد در تیمارهای آزمایشی

Table 8- Price of edible ingredients (Rials) based on storage in open space in experimental treatments

Characteristics	Treatment			
	1	2	3	4
Honey	594000	594000	594000	594000
Flower Pollen	3199680	2133120	1066560	0
Gammarus	0	555500	1111000	1666500

بحث

شهد و گرده مورد استفاده زنبور عسل حاوی پروتئین، کربوهیدرات، لیپید، مواد معدنی و ویتامین‌های آنتی-اکسیدانی (ویتامین E, C و بتاکاروتن و هم‌چنین پرو ویتامین A) است (۱۹). در تغذیه زنبور عسل تأمین این مواد مغذی ضروری بوده، طبق بررسی‌های انجام شده در زمینه تأثیر پودر گاماروس بر روی کلنی‌های زنبور عسل، در طی اجرای آزمایش انتظار بر این بود که پودر گاماروس تأثیر قابل توجهی بر پارامترهای رفتار تهاجمی، جمعیت کلونی، صحرا گردی، نسل (تخم، لارو و شفیره)، وزن کلونی، وزن ۲۰ عدد زنبور، جمع‌آوری گرده گل، رشد بهاره کلونی و بچه-دهی بگذارد، اما نتایج آزمایش طبق انتظار نبود. نتایج آزمایش حاضر نشان داد که غلظت‌های مختلف پودر گاماروس بر روی پارامترهای اشاره شده تأثیر معنی‌دار نداشته است. ولی در صفات چند بار اندازه‌گیری شده نظیر میانگین نسل، مصرف غذا و ذخیره عسل در دوره‌های مختلف به فواصل ۲۱ روز یک‌بار نتایج کاملاً معنی‌دار شده است. بررسی‌ها نشان داده است که تعداد تخم‌ها در یک کلونی با جمعیت زنبورهای بالغ در کلونی ارتباط دارد. علاوه بر این میزان تخم-گذاری ملکه با فصول سال، وفور یا کمبود شهد و

گرده در طبیعت و کیفیت و نژاد ملکه نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۱۷). عدم معنی‌داری در صفات اشاره شده موافق با نتایج تحقیقات رشید و همکاران (۲۰۲۰) بوده، ولی با نتایج پاتریسیا و همکاران (۲۰۱۱) و (۲۰۱۷)، لازار و همکاران (۲۰۲۱) مغایرت داشت. در تحقیقات پاتریسیا و همکاران (۲۰۱۱)، لازار و همکاران (۲۰۲۱) تغذیه کلونی‌های زنبور عسل با عصاره‌های گیاهی موجب تحریک فعالیت تخم‌گذاری ملکه شده است. تعداد شان‌های پوشیده شده با زنبورهای بالغ نشان‌دهنده قدرت کلونی و در نتیجه تراکم جمعیت زنبورهای کارگر بالغ در کلونی است. نتایج مربوط به میزان جمعیت نشان داد که گروه‌های تیماری از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. نتایج اخیر در مورد میزان جمعیت با نتایج تحقیقات القمدی و همکاران (۲۰۲۱)، الزاروگ و الباسیونی (۲۰۱۳) هم‌خوانی ندارد. الزاروگ و الباسیونی (۲۰۱۳) گزارش کردند که عصاره‌های آویشن، شنبلیله و افسنتین باعث افزایش تعداد نوزادان در نهایت افزایش جمعیت زنبورها شده است (۴). القمدی و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کرده‌اند که عصاره بابونه و نعناع موجب افزایش رشد کلونی‌های

زنبور عسل شده است (۲). علت اصلی تطبیق پذیری گاماروس با گرده در صفت رفتار تهاجمی برابری ارزش پروتئینی گاماروس با گرده بوده که از نظر آزمایشگاهی گاماروس دارای ارزش نسبتاً بالاتری می‌باشد در نتیجه کمبود پروتئین در کلونی‌های مورد آزمایش که منجر به افزایش صفت رفتار تهاجمی می‌گردد مشاهده نگردیده که این نتایج با نتایج ایراندوست و عبادی، (۲۰۱۳) مطابقت دارد (۱۱). ضمناً صفت رفتار تهاجمی کلونی‌ها ضریب وراثت پذیری بسیار بالایی دارد. به طوری که ضریب وراثت پذیری رفتار تهاجمی کلونی‌های زنبور عسل در صربستان (کارنیکا) ۰/۳۵۹ در اتریش (کارنیکا) ۰/۳۸ و در سوریه ۰/۲۸ گزارش شد (۶، ۲۳). در تحقیق سراج و شهرکی (۲۰۱۸) نتایج به دست آمده در مورد صفت رفتار عمومی بیانگر این نکته بود که روش تغذیه شاهد با آرام‌ترین رفتار عمومی و روش تغذیه آهسته با ظروف تغذیه پلاستیکی حاوی ۳۰ سوراخ به عنوان ناآرام‌ترین کندوها اختلاف معنی‌داری داشتند (۲۶) که دلیل این موضوع می‌تواند کمتر بودن سطح تماس زنبوران عسل با شربت شکر باشد. و زنبوران گروه شاهد نیز به علت عدم تغذیه (استرس و تحریک کمتر زنبوران عسل به علت باز نکردن درب کندوها) آرام‌ترین گروه بودند. گاماروس به لحاظ دارا بودن مواد مغذی بسیار نزدیک به گرده بوده حتی در بعضی از موارد نسبت به گرده برتری دارد. و همین مسئله باعث حفظ جمعیت کلونی‌ها شده است. این تحقیق با نتایج تحقیقات ایراندوست و عابدی، (۲۰۱۳)، سعادت‌مند، (۱۹۹۳) تطابق دارد (۱۱، ۲۵). تغذیه کلونی‌های زنبور عسل در فصول کمبود گرده گل (پاییز، زمستان، اوایل بهار یا ایام خشک‌سالی و فقدان پوشش گیاهی) با مواد جانشین گرده مناسب بدون شک باعث قوی‌تر شدن کلونی‌ها خواهد شد. با گزارش‌هایی که در ارتباط با تأثیر مثبت ریز مغذی‌ها

بر روی عملکرد کلونی‌های زنبور عسل صورت گرفته است انتظار بر این بود که ریز مغذی‌های موجود در گاماروس نیز تأثیر معنی‌داری بر وزن کلونی، جمعیت کلونی و بچه‌دهی بگذارد. این تفاوت در نتایج احتمالاً ناشی از نوع ریز مغذی موجود در گاماروس، روش تهیه و آماده‌سازی، مقدار استفاده شده از گاماروس باشد. مرادیان و همکاران (۲۰۰۵)، در ارزیابی محتویات گرده تازه و پس از فرآیند دهیدراسیون، به این نتیجه رسیدند که ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانی پس از فرآیند دهیدراسیون گرده‌ها از بین می‌رود (۳) لازم به ذکر است با توجه به رطوبت بالای ترکیب گرده، فرآیند دهیدراسیون برای جلوگیری از تخمیر سریع و خراب شدن ترکیبات ضروری است (۱۹)، پس دلیل دیگر برای تفاوت در نتایج این است که طبق گزارش‌های المیدامرادیان و همکاران (۲۰۰۵) احتمال داده می‌شود که در روند تهیه و تولید، برخی از ریزمغذی‌ها و ویتامین‌های موجود در مواد غذایی از بین رفته باشد. با جمع‌بندی مطالب فوق به این نتیجه می‌توان رسید که ترکیبات و ریزمغذی‌های گرده و گاماروس تا حدودی مشابه بوده و در صورت عدم دسترسی به شهد و گرده می‌توان از پودر گاماروس به عنوان مکمل تغذیه برای حفظ عملکرد و رشد کلونی استفاده کرد. به عبارت دیگر استفاده از گاماروس در سطوح مختلف تغذیه کلونی‌های مورد آزمایش تأثیر نامطلوبی در تیمارهای مختلف مشاهده نگردید. در تضاد با نتایج تحقیق حاضر در پژوهشی با بررسی تأثیر اسیدهای آمینه ایزولوسین، والین و لوسین نتایج نشان داد در کلونی‌های زنبور عسل استفاده از مکمل‌های اسیدهای آمینه باعث افزایش پرورش نوزاد، افزایش جمعیت و تولید عسل نسبت به گروه شاهد به‌خاطر بهبود در صفات موثر بر رشد و توسعه کلونی مثل پروتئین همولنف است. در نتیجه استفاده از اسیدهای آمینه محدود کننده موجب افزایش میزان پروتئین نوزاد و

میزان جمعیت در اوایل فصل می‌شود (۷). استفاده از تغذیه مکمل و جایگزین در صورت تطبیق با گرده جمعیت کلونی‌ها را افزایش می‌دهد. طبق اظهارات سومرویله (۲۰۰۱) خوش‌خوراکی و میزان مصرف غذا، از عوامل مهم در جیره‌های تکمیلی در زنبور عسل است، یعنی با افزایش مصرف، معمولاً رشد کلونی‌ها نیز افزایش می‌یابد میزان مصرف غذا را به دلایل بیولوژیکی (نوع جیره غذایی، اندازه کلونی، پرورش نوزاد، زمان مورد استفاده و حضور منابع غذایی دیگر در داخل یا خارج کندو) دستخوش تغییرات زیاد دانسته‌اند و میزان مصرف در شرایط متفاوت، فرق می‌کند (۲۸). استفاده از گاماروس در سطوح مختلف و به‌ویژه جایگزینی کامل با گرده موفقیت رشد بهاره کلونی را به‌همراه داشته و می‌تواند کاملاً مطابق با گرده مورد استفاده زنبور عسل قرار گیرد. در یک تحقیق، رشد بهاره کلونی مناسب نقش مهمی در صفات تولیدی کلنی‌های زنبور عسل داشته است (۹). جواهری (۲۰۰۲) نشان داد که تغذیه مناسب مواد پروتئینی در بالا بردن جمعیت و هم‌چنین اثر مستقیمی در بهبود رشد بهاره کلونی کلونی‌ها خواهد گذاشت. در صورت بالا بودن جمعیت قبل از زمستان بهترین میزان تولید نیز در این کلونی‌ها مشاهده می‌گردد. تمایل به بچه‌دهی در کلونی‌های زنبور عسل یکی از صفات مهم و اقتصادی می‌باشد. عمل بچه‌دهی در طبیعت زنبوران عسل قرار داده شده تا در مواقعی که با برخی از مشکلات نظیر کمبودهای غذایی مواجه شد با اقدام به این کار مشکل خود را رفع کند برای کنترل بچه‌دهی باید طوری عمل کرد تا حتی‌الامکان زنبوران با این مشکلات مواجه نشوند. لذا در تحقیق حاضر با توجه به ارزش بالای گاماروس مخصوصاً از نظر اسیدهای آمینه، زنبوران عسل دچار کمبودهای غذایی نشده‌اند، در نتیجه اقدامی برای بچه‌دهی نکردند. نتایج این پژوهش در خصوص نسل (تخم،

لارو و شفیره) با توجه به منبع تامین گاماروس که دریا می‌باشد با نتایج ایران‌دوست و عابدی، (۲۰۱۳) مطابقت ندارد، بنابراین مهم‌ترین دلیل آن تفاوت ترکیبات پودر ماهی با گاماروس می‌تواند باشد. لذا احتمالاً گاماروس نسبت به پودر ماهی دارای قابلیت مصرف و جذب بیشتری در کلونی‌های زنبور عسل می‌باشد. مقایسه ترکیبات گاماروس با گرده نشان داد که بیش از دو برابر پروتئین و سه برابر انرژی در ۱۰۰ گرم ماده خشک دارد. بنابراین مصرف به‌عنوان جایگزین گرده در فصول سرد با توجه به عدم پر شدن سریع رکتوم زنبوران کارگر و نتایج مثبت بر روی سایر صفات بیولوژیک توصیه می‌گردد. از آنجایی که عسل از نظر سایر مواد مغذی غنی بوده و می‌تواند همه نیازهای نوزادان را تامین کند باعث افزایش میزان زاد و ولد و افزایش نسل می‌گردد. در تحقیقی بین میزان تولید عسل و رشد و نمو افراد جمعیت (نسل) همبستگی منفی و معنی‌داری (۰/۰۱۴) = r^2 وجود دارد. به‌عبارتی در فصل افزایش رشد و نمو نوزادان و تخم‌ریزی ملکه میزان جمع‌آوری عسل و در فصل جمع‌آوری عسل نیز میزان تخم‌ریزی ملکه و رشد و نمو جمعیت کاهش یافت (۵). این نتایج موافق با تحقیقات محب‌الدینی و همکاران (۲۰۱۳) و جوانوویچ و همکاران (۲۰۲۱) می‌باشد (۱۶، ۲۰). در یک زنبورستان علاوه بر نژاد و سن ملکه، تولید عسل در هر کندو به مقدار زیادی تابع جمعیت کندو می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها در تمامی صفات مورد مطالعه که از نظر بیولوژیکی (رفتار، صحرا گردی، نسل، جمعیت و وزن ۲۰ عدد زنبور) برای پرورش دهندگان زنبور عسل و کلونی‌های زنبور عسل حائز اهمیت می‌باشد، تفاوت

behavior and the amount of honey stored in the bee colony. *Ecology of Agricultural Plants*, 2(2):15-23.

6. Basiri, M.R. 2008. Principles of honey bee breeding, Jihad Agricultural Higher Education Institute, 37. Department of Animal Science, 7. (In Persian)

7. Chang, H., Ding, G., Jia, G., Feng, M., Huang, J., 2022. Hemolymph Metabolism Analysis of Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Response to Different Bee Pollens. *Insects*, 14(1):37.

8. Ebadi, R., Ahmadi, A.A., 2011. Bee breeding. Arkan Danesh Publications. [In Persian]

9. Edris, M.F., Salehi, M., Mustajran, M., 2001. Phenotypic correlation winterization, short-term weight gain and pollen collection with honey production, Meza Honey bee brood and colony population in Isfahan region. A collection of articles of the fifth country bee seminar, 1-2. [In Persian]

10. Haydak, M.H., 1965. Brood rearing by honeybees confined to a pure carbohydrate diet. *Journal of Economic Entomology*, 28:657-660.

11. Irandoust, H., Ebadi, R., 2013. Nutritional effects of high protein feeds on growth, development, performance and overwintering of honey bee (*Apis mellifera* L.). *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 1:601-613. [In Persian]

12. Jaber, L., 1998. A preliminary study of the biology of amphipods of the Caspian Sea (Noor region and neighboring beaches) Master's thesis - Marine Biology, Tarbiat Modares University, 132. [In Persian]

13. Jafari-Ahangari, Y., 2016. Bee Breeding, Publications of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, p: 128. [In Persian]

14. Javaheri, S.D., 1996. Investigating the stimulating feeding of honey bees with pollen protein supplements and substitutes

معنی‌داری مشاهده نگردید. به عبارت دیگر استفاده از ترکیب غذایی گاماروس به جای گرده در کلونی‌های زنبور عسل نه تنها هیچ‌گونه عارضه منفی ایجاد نمود، بلکه کاملاً با رژیم غذایی زنبوران عسل سازگار بود. ولی از نظر صفات اقتصادی (میزان ذخیره عسل و مصرف غذا) در دوره‌های مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید که با توجه به جایگزینی یک محصول جدید (گاماروس) به جای گرده گل در تغذیه کلونی‌های زنبور عسل و کاهش هزینه تمام شده‌ی خوراک در تیمار جایگزین بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

منابع

1. Alavi Yeganeh, M., Abedian Kanari, A., Rezaei, M., 2008. The effect of using sea and river gammarus flour as a food supplement on the growth and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. *Journal of Research and Construction, Livestock and Aquatic Affairs*, 77:113-123. [In Persian]
2. Al-Ghamdi, A.A., Abou-Shaara, H.F., Ansari M.J., 2021. Effects of sugar feeding supplemented with three plant extracts on some parameters of honey bee colonies. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(4):2076-2082.
3. Almeida-Muradian, L.B., Pamplona, L.C., Coimbra, S., Barth, O.M., 2005. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18:105-111.
4. Al-Zarog, A.A., El-Bassiouny, A.M., 2013. Influence of some plant extracts on Varroa mite and performance of honey bee *Apis mellifera* colonies. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, Toxicology and Pest Control*. 5(2):15-20.
5. Asadi-Dizji, A., Iraqi, M., Moini-Alisha, H., 2007. The effect of different carbohydrates on the queen's spawning

- influence of a piary biostimulators on bee families development in spring. *Animal Science and Biotechnologies*, 44(2):267-270.
22. Patruica, S., Mot D., Popovici D., 2017. The effect of using medicinal plant extracts upon the health of bee colonies. *Romanian Biotechnological Letters*, 6(22):13182-13185.
23. Rashid, B., Khani, A., Ghasemi, V., Ghadamyari, M., Sahebzadeh, N., Moharrampour, S. 2020. Evaluation of a new plant-based formulation for the treatment of varroosis in the honey bee colonies: efficacy and safety. *Apidologie*, 51:1074-1090.
24. Razzaghi, S.H., 2000. identification of plants used by honey bees in Noor River watershed, Mazandaran province, Master's thesis, Imam Khomeini Education Center (RA). [In Persian]
25. Saadatmand, S.J., 1993. Comparison of different diets in honey bee nutrition. Scientific and Industrial Research Organization of Iran. [In Persian]
26. Sedraj, H., Shafiei-Shahraki, H., 2018. Investigating the effect of different methods and levels of sugar syrup feeding on baby rearing, general behavior and the level of varroa mite contamination in honey bees. *Proceedings of the National Conference of Bee Products from the Point of View of Biology, Health and Economy*. [In Persian]
27. Seifabadi, S.J., Negarestan, H., Moghadasi, B., 2004. Chemical composition of the gammarus, *Pontogammarus maeoticus*. along the southern coast of the Caspian Sea. *Journal of Marine Sciences*, 3(1):51-55. [In Persian]
28. Somerville, D., 2001. Nutritional value of honeybee collected pollens. RIRDC publication No, 01:047.
- and their effect on the growth and resistance of colonies and honey production. Master's thesis in animal science. Faculty of Agriculture, University of Tehran of adult life in the honey bee. *Journal Apic Research*, 1:49-52. [In Persian]
15. Javaheri, S.D., 2002. Honey bee feeding and wintering. Publications of the Shagaig Village Cultural Institute. [In Persian]
16. Jovanovic, N.M., Glavinic, U., Delic, B., Vejnovic, B., Aleksic, N., Mladjan, V., Stanimirovic, Z., 2021. Plant-based supplement containing B-complex vitamins can improve bee health and increase colony performance. *Preventive Veterinary Medicine*. 190:105322.
17. Khoury, D.S., Myerscough, M.R., Barron, A.B., 2011. A quantitative model of honey bee colony population dynamics. *PLoS ONE*, 6:e18491.
18. Lazar, R.N., Mot, D., Alexa, E., Boldea, M., Ștef, L., Patruica, S., 2021. Influence of essential oils on bioproductive indices and health of bee colonies. *Scientific Papers: Series D, Animal Science-The International Session of Scientific Communications of the Faculty of Animal Science*, 64(2):247-253.
19. Melo, I.L.P., Almeida-Muradian, L.B., 2010. Stability of antioxidants vitamins in bee pollen samples. *Quim. Nova*, 33(3):514-518. 20.
20. Mohebodini, H., Tahmasbi, Gh.H., Dastar, B., Jafari Ahangari, Y., Zerehdaran, S., 2013. Effect of dietary thiamin on growth of the Iranian honey bee colonies COLONIES (*Apis mellifera meda*) in different seasons. *Agriculture and Forestry*, 59:119-126.
21. Patruica, S., Dunea, I.B., Jivan, A., Jivan, A., Stroe, A., 2011. Research on the

Research Article

Sonographic Evaluation of Ovulation Process in Native Breed Bitches Induced by Exogenous hCG and GnRH Administration at the Time of LH Surge with a 12-Hour Interval

Erfan Khodadadi¹, Sakineh Asadzadeh^{2*}, Eisa Fallah¹

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

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

*Corresponding author: asadzadeh80@gmail.com

Received: 1 November 2024

Accepted: 27 January 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1189011

Abstract

The aim of this study was to investigate the sonographic effect of GnRH and hCG hormones on the process of ovulation and pregnancy in estrous bitches. Thirty – two native dogs were divided into two groups: a control group of 20 and a treatment group of 12. After determining the sexual cycle of the dogs through blood tests and vaginal smears, as well as inducing estrus in those dogs that were in the anestrus phase, blood sampling was performed every 12 hours from the third day after the onset of vaginal bleeding to determine the LH peak. When the LH hormone concentration exceeded above 5 ng/ml, GnRH and hCG hormones were administered to all dogs in the treatment group. The process of ovulation and pregnancy diagnosis was carried out through ultrasound. The ovulation rate in the treated and control groups was 100% and 70%, respectively, which was statistically significant ($p < 0.05$). Additionally, ovulation occurred 48 hours after the LH peak in 83.3% of the dogs in the treated group and 60 hours after the LH peak in 16.7% of them. This was significantly different from the control group, where ovulation occurred 72 hours after the LH peak ($p < 0.05$). The pregnancy rate in the treated and control groups was 100% and 70%, respectively, and this difference was also statistically significant ($p < 0.05$). The results of this study indicated that the use of GnRH and hCG hormones can be employed to increase the ovulation rate, shorten the time to ovulation, and enhance the pregnancy rate in dogs.

Keyword: Ultrasound, ovulation, dog, hCG, GnRH, LH.



بررسی سونوگرافیک روند تخمک‌گذاری در سگ‌های بومی فحل تحت تأثیر GnRH و hCG اگزوزن در زمان افزایش هورمون LH با ۱۲ ساعت فاصله زمانی

عرفان خدادادی^۱، سکینه اسدزاده^{۲*}، عیسی فلاح^۱

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

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

*مسئول مکاتبات: asadzadeh80@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۱۱

DOI: 10.60833/ascij.2025.1189011

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی سونوگرافیک تأثیر هورمون‌های GnRH و hCG در روند تخمک‌گذاری و آبستنی سگ‌های بومی فحل بوده است. به این منظور تعداد ۳۲ قلاده سگ بومی در دو گروه شاهد ۲۰ تایی و گروه تیمار ۱۲ تایی دسته‌بندی شدند. پس از تعیین سیکل جنسی سگ‌ها از طریق آزمایش خون و اسمیر واژن و نیز القای فحلی در آن دسته از سگ‌هایی که در فاز آنستروس بودند، از روز سوم پس از شروع خون‌ریزی از واژن، به منظور تعیین زمان پیک LH، هر ۱۲ ساعت از سگ‌ها خون‌گیری صورت گرفت و زمانی که غلظت هورمون LH به بالاتر از ۵ نانوگرم/میلی‌لیتر رسید، به همه‌ی سگ‌های گروه تیمار هورمون‌های GnRH و hCG تزریق شد. بررسی روند تخمک‌گذاری و تشخیص آبستنی از طریق سونوگرافی صورت پذیرفت. درصد تخمک‌گذاری در سگ‌های گروه تیمار و گروه شاهد به ترتیب ۱۰۰ و ۷۰ درصد بوده است که دارای تفاوت معناداری می‌باشد ($p < 0/05$). همچنین زمان تخمک‌گذاری در ۸۳/۳ درصد از سگ‌های گروه تیمار ۴۸ ساعت پس از پیک LH و در ۱۶/۷ درصد از آن‌ها ۶۰ ساعت پس از پیک LH بوده است و تفاوت معناداری نسبت به سگ‌های گروه شاهد که ۷۲ ساعت پس از پیک LH تخمک‌گذاری کردند، مشاهده گردید ($p < 0/05$) میزان آبستنی در سگ‌های گروه تیمار و گروه شاهد به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۷۰ درصد بوده است و تفاوت معناداری وجود داشت ($p < 0/05$). نتایج این پژوهش نشان داد استفاده از هورمون‌های GnRH و hCG می‌تواند در جهت افزایش درصد تخمک‌گذاری، کوتاه‌تر کردن زمان تخمک‌گذاری و افزایش درصد آبستنی در سگ‌ها به کار برده شود.

کلمات کلیدی: سونوگرافی، تخمک‌گذاری، سگ، hCG، GnRH، LH.

مقدمه

برای بسیاری از گونه‌های پستانداران، از جمله سگ‌ها، دانش دینامیک فولیکول تخمدان، بررسی نشده است، بنابراین یافتن روشی برای القای فحلی به طور موثر و قابل پیش‌بینی در سگ‌ها می‌تواند در مدیریت بالینی

سگ حیوانی با مونواستروس غیر وابسته به فصل بوده و دوره‌ی آنستروس ۲ تا ۱۰ ماهه را متعاقب زایمان و یا چرخه‌های غیرآبستنی نشان می‌دهد. معمولاً فواصل بین استروس در سگ بین ۵-۱۲ ماه متغیر می‌باشد.

آنستروس طولانی‌مدت یا ناباروری مفید باشد. زمانی که یک فولیکول آماده تخمک‌گذاری در دسترس باشد، گنادوتروپین‌هایی مثل LH، GnRH و hCG می‌توانند آن فولیکول را وادار به تخمک‌گذاری کنند. در این حالت از بروز تخمک‌گذاری تأخیری جلوگیری خواهد شد (۵). hCG یا گنادوتروپین جفتی انسان یک هورمون گلیکوپروتئین است که نقش مهمی در تولیدمثل دارد و برای تشخیص بارداری مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. چندین مطالعه نقش حیاتی آن را در ایجاد و حفظ بارداری نشان داده‌است. هورمون hCG با تقلید از هورمون LH که در اواخر فاز فولیکولی ایجاد می‌شود، از طریق ایجاد فولیکول نهایی، بلوغ اووسیت و تخمک‌گذاری، در پروتکل‌های کمک باروری استفاده می‌شود (۱۵). تزریق GnRH یا آنالوگ آن، سبب افزایش ناگهانی LH و FSH شده که این افزایش ناگهانی منجر به تخمک‌ریزی می‌شود، تزریق GnRH در طول آنستروس ممکن است زمان اوولاسیون، نرخ باروری، نمو جسم زرد، ترشح پروژسترون و زنده‌مانی رویان را تحت تأثیر قرار دهد. GnRH به طور غیر مستقیم با اثر بر آزادسازی LH و FSH عمل می‌کند، اما اثر مستقیم آن روی دستگاه تولیدمثل شناخته نشده‌است (۱۴). تخمک‌گذاری تقریباً ۲-۳ روز پس از افزایش هورمون (LH) اتفاق می‌افتد و قبل از تخمک‌گذاری، غلظت پروژسترون سرم از مقادیر پایه همزمان با پیک LH شروع به افزایش می‌کند. اطلاعات در مورد زمان تخمک‌گذاری در دسترس است، اما اطلاعات محدودی در مورد رشد فولیکولی از طریق آنستروس و فحلی وجود دارد. علاوه بر این، رشد فولیکولی در سگ‌ها معمولاً به‌طور غیرمستقیم از طریق مشاهدات رفتاری، اسمیر واژینال و آزمایش‌های هورمونی شناسایی شده‌است. اگرچه سونوگرافی می‌تواند رشد فولیکول‌های تخمدان سگ را نشان دهد اما هیچ روشی برای تعیین

یا پیش‌بینی دقیق زمان تخمک‌گذاری موجود نیست. مکان و اندازه کوچک تخمدان‌ها، تصویربرداری را دشوار می‌کند ولی می‌توان رشد فولیکولی را با استفاده از تصویربرداری اولتراسوند به راحتی کنترل کرد (۷). زمانی که پروژسترون سرم بالا رود می‌توان اطمینان حاصل نمود که فرآیند تخمک‌گذاری کامل شده‌است (۱۱). تلفات جنینی یکی از دلایل اصلی محدود کردن حداکثر بازده تولید مثل در حیوانات است و تحقیقات نشان داده که بیشترین تلفات آبستنی در گونه‌های مختلف پستانداران در ابتدای بارداری اتفاق می‌افتد. عوامل متعددی می‌توانند در ایجاد این وضعیت نقش داشته باشند که مهم‌ترین آنها ترشح ناکافی پروژسترون توسط جسم زرد است. هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) بر تحریک تشکیل جسم زرد و افزایش غلظت پروژسترون و در نتیجه، بهبود عملکرد تولید مثلی در روزهای مختلف پس از جفت‌گیری می‌تواند بسیار مهم باشد (۶، ۱۰). با توجه به این که منبع اصلی درآمد پرورش‌دهندگان سگ، فروش توله‌های سگ‌های مولد آن مجموعه می‌باشد، آبستنی هرچه بیشتر مولدهای ماده یکی از مهم‌ترین فاکتورها برای سود اقتصادی بیشتر این مجموعه‌ها است، بر اساس مراجعات زیادی که از سوی صاحبان سگ‌ها در ارتباط با مشکل باروری وجود دارد سعی بر آن شد که یک ارزیابی اولیه بالینی با استفاده از هورمون‌های hCG و GnRH صورت گیرد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر، تعداد ۳۲ قلاده سگ بومی در محدوده سنی ۲ تا ۴ سال، با وزن ۲۰ تا ۳۰ کیلوگرم انتخاب شد و در دو گروه ۲۰ تایی شاهد و ۱۲ تایی تیمار مورد مطالعه قرار گرفتند. پژوهش حاضر در کلینیک دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل انجام شد و در ارتباط با چگونگی کار با

حیوانات کد اخلاق مربوطه دریافت گردید. در ابتدا به منظور بررسی سلامت عمومی سگ‌ها، دمای بدن، ضربان قلب و تعداد تنفس ارزیابی شد. سپس با اولتراسونوگرافی سلامت دستگاه تناسلی تایید و در موارد مشکوک، سگ‌های ناسالم رهاسازی شدند. انگل تراپی و واکسیناسیون به صورت کامل در همه‌ی سگ‌ها انجام شد برای تشخیص سیکل فحلی از کلیه سگ‌ها نمونه خون و اسمیر واژن تهیه شد و بر اساس نتایج به دست آمده اقدامات بعدی صورت گرفت. برای خون‌گیری از ورید سفالیک دست هر سگ ۵ میلی‌لیتر خون اخذ شد و سرم جدا شده در کنار یخ خشک جهت آزمایش سرولوژی به آزمایشگاه منتقل شد (۱). به منظور ارزیابی مراحل چرخه‌های فحلی سگ‌های تحت آزمایش، اسمیر واژن تهیه شد به طوری که اگر در گسترش آن‌ها بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها پارابازال بودند و سلول‌های بینابینی و گلبول‌های سفید و قرمز بسیار محدودی مشاهده شد، از نظر سیکل فحلی آنستروس در نظر گرفته شدند. برای شروع چرخه‌ی فحلی و ایجاد پرواستروس در آن دسته از سگ‌هایی که در فاز آنستروس بودند، از قرص کابروگولین ۰/۵ میلی‌گرم استفاده شد در همه سگ‌ها پس از ۱۴ تا ۲۱ روز علائم پرواستروس که همراه با ترشحات سروزی خونی از واژن بود، مشاهده شد. استفاده از کابروگولین تا ۲ روز پس از شروع علائم پرواستروس ادامه یافت. از روز سوم پس از شروع خون‌ریزی از واژن، با توجه به این‌که مدت زمان پیک هورمون LH به طور تقریبی کمتر از ۲۴ ساعت است، هر ۱۲ ساعت خون‌گیری انجام شد (۹). با بررسی پژوهش‌های گذشته، حداکثر غلظت هورمون LH زمانی اتفاق می‌افتد که مقدار این هورمون به بالاتر از ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر برسد. در این زمان تزریق هورمون GnRH با نام تجاری بوسونگاد به میزان دوز ۵۰ میکروگرم به صورت

تزریق عضلانی (IM) و ۱۲ ساعت بعد، تزریق هورمون hCG با نام تجاری گنارکس به میزان ۱۰۰۰ واحد بین‌المللی (IU)، به صورت ۵۰۰ واحد تزریق عضلانی (IM) و ۵۰۰ واحد تزریق وریدی (IV) در هر قلاده سگ گروه تیمار انجام شد (۹). جهت بررسی روند تخمک‌گذاری از روز سوم پس از فاز پرواستروس تا آغاز فاز دای استروس هر ۱۲ ساعت اولتراسونوگرافی با پروب لینیر (خطی) انجام شد. جهت بررسی دقیق تخمدان‌ها از فرکانس ۷/۵ تا ۸ مگاهرتز استفاده شد و در طول این مطالعه هر دو تخمدان مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی میزان آبستنی در سگ‌های گروه تیمار و گروه شاهد ۴۸ ساعت پس از تخمک‌گذاری، جفت‌گیری صورت گرفت (۹). به طوری که از دو قلاده سگ نر که از پیش انتخاب شده بودند و سلامت عمومی و کیفیت اسپرم آن‌ها مورد تایید قرار گرفته بود، استفاده شد. جهت بررسی نتیجه‌ی جفت‌گیری در گروه شاهد و گروه تیمار، ۳۰ روز بعد از پیک LH یا ۲۶ روز پس از جفت‌گیری اولتراسونوگرافی انجام شد.

نتایج

تاثیر تزریق هورمون‌های GnRH و hCG بر تخمک‌گذاری: جهت ارزیابی آماری نتایج تخمک‌گذاری در گروه‌های شاهد و تیمار از نرم‌افزار SPSS و آزمون مربع کای استفاده شد با توجه به نتایج بدست آمده تزریق هورمون‌های GnRH و hCG سبب تخمک‌گذاری در ۱۰۰ درصد سگ‌های گروه تیمار شده است. در حالی که در گروه شاهد ۳۰ درصد از سگ‌ها قادر به انجام تخمک‌گذاری نبودند. و با توجه به جدول ۱ اختلاف معناداری بین وضعیت تخمک‌گذاری در دو گروه شاهد و گروه تیمار مشاهده شد ($p < ۰/۰۵$).

تاثیر تزریق هورمون‌های GnRH و hCG بر زمان

تخمک‌گذاری: در طول این مطالعه وضعیت تخمدان‌ها و فولیکول‌ها هر ۱۲ ساعت از طریق سونوگرافی بررسی شد و زمان از بین رفتن فولیکول‌ها و مشاهده جسم خونریزی دهنده، به عنوان زمان تخمک‌گذاری در نظر گرفته شد. در سگ‌های گروه شاهد که هورمونی دریافت نکرده بودند، در ۱۴ سگ از ۲۰ سگ، ۷۲ ساعت بعد از پیک LH تخمک‌گذاری انجام شد و در ۶ مورد هیچگاه تخمک‌گذاری انجام نشد. در بررسی سونوگرافیک گروه تیمار که همگی سگ‌ها بعد از پیک LH هورمون GnRH و ۱۲ ساعت بعد هورمون hCG دریافت کردند، در ۱۰ سگ از ۱۲ سگ (در ۸۳/۳ درصد)، ۴۸ ساعت پس از پیک LH و در ۲ سگ از ۱۲ سگ (۱۶/۷ درصد)، ۶۰ ساعت پس از پیک LH فولیکول‌های سطح تخمدان ناپدید شدند و تخمک‌گذاری انجام شد (جدول ۲).

تاثیر تزریق هورمون‌های GnRH و hCG بر میزان

آبستنی: به منظور بررسی باروری موفق در گروه شاهد که هیچ هورمونی دریافت نکرده بودند، همگی سگ‌ها ۴۸ ساعت پس از مشاهده جسم خونریزی دهنده با یکی از سگ‌های نر مجموعه جفت‌گیری کردند و ۲۵ روز پس از جفت‌گیری مورد ارزیابی سونوگرافیک قرار گرفتند. از بین ۲۰ قلابه سگ گروه

شاهد، ۱۴ قلابه آبستن و ۶ قلابه غیر آبستن تشخیص داده شد. به منظور بررسی باروری موفق در سگ‌های گروه تیمار که در زمان پیک LH هورمون‌های GnRH و hCG دریافت کرده بودند، ۲۶ روز پس از جفت‌گیری مورد ارزیابی سونوگرافیک قرار گرفتند. از بین ۱۲ قلابه سگ گروه تیمار، همگی آن‌ها آبستن تشخیص داده شدند. بررسی داده‌های زمان تخمک‌گذاری و همچنین آنالیز نتایج به‌دست آمده با استفاده از آزمون مربع کای در جدول ۳ نشان داد که تفاوت معناداری بین زمان تخمک‌گذاری در سگ‌های گروه شاهد و گروه تیمار وجود دارد ($p < 0/05$). داده‌های به دست آمده از طریق آزمون مربع کای مورد ارزیابی قرار گرفت. بنابراین با توجه به جدول ۳ تفاوت معناداری در میزان آبستنی بین سگ‌های گروه شاهد و گروه تیمار مشاهده شد ($p < 0/05$). از روز ششم پرواستروس فولیکول‌ها به صورت ساختارهای کروی تیره با مرکز آن اکوتیک و دیواره‌ی مجزا، با قطرهای مختلف و به طور یکنواخت بر روی قسمت قشری هر دو تخمدان ظاهر شده بودند. بر روی هر تخمدان ۳ تا ۷ فولیکول مشاهده شد (شکل ۱). پس از تخمک‌گذاری و مشاهده‌ی جسم خونریزی‌دهنده، این اجسام تشکیل ساختارهای هیپراکوتیک با لومن آن اکوتیک به نام جسم زرد دادند که به ابعاد ۳/۵ تا ۴ میلی‌متر در سطح تخمدان‌ها مشاهده شدند (شکل ۲).

جدول ۱- تاثیر تزریق هورمون‌های GnRH و hCG بر تخمک‌گذاری

Table 1. The effect of GnRH and hCG hormone injections on ovulation

	Ovulation		Total	Pearson Chi-Square value	P value
	Control	Negative			
Groups	14	6	20	14.933	0.0001*
Treatment	0	12	12		
Total	14	18	32		

جدول ۲- تاثیر تزریق هورمون‌های GnRH و hCG بر زمان تخمک‌گذاری

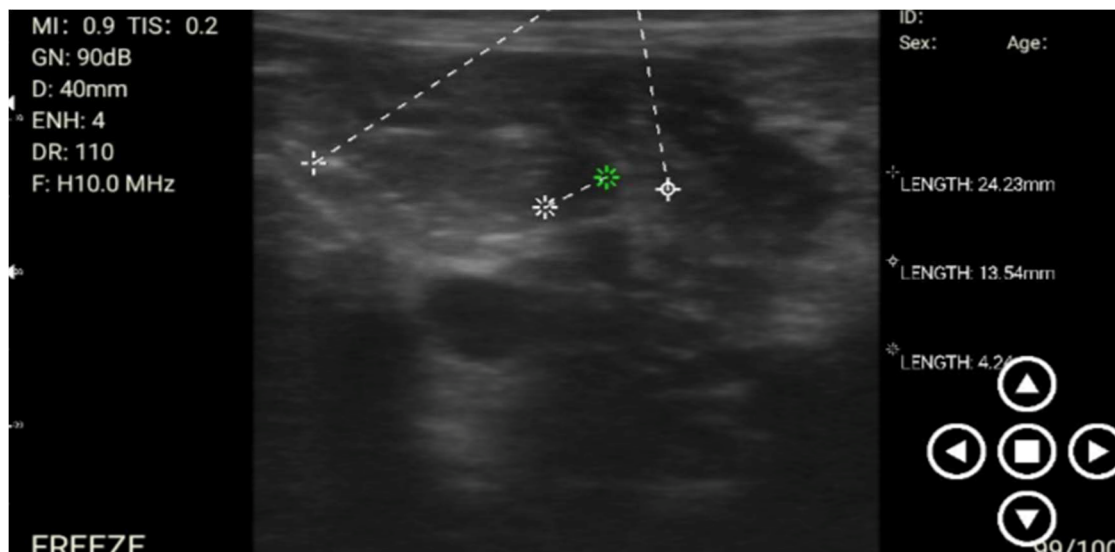
Table 1. The effect of GnRH and hCG hormone injections on ovulation time

		Ovulation time			Total	Pearson Chi-Square value	P value
		After 48 h	After 60 h	after 72 h			
Groups	Control	0	0	14	14	26	0.0001*
	Treatment	10	2	0	12		
Total		10	2	14	26		

جدول ۳- تاثیر تزریق هورمون‌های GnRH و hCG بر میزان آبستنی

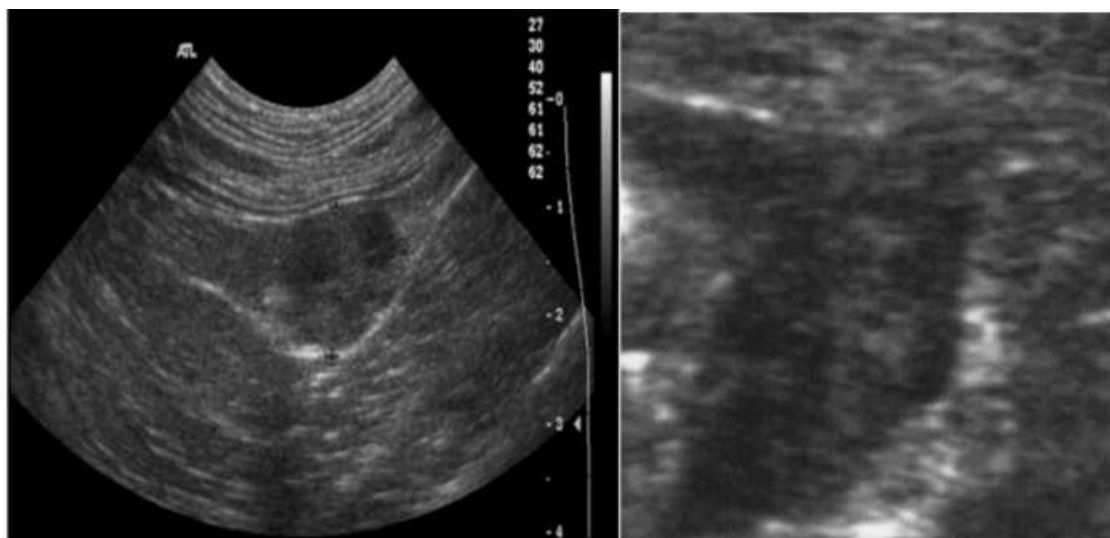
Table 3. The effect of GnRH and hCG hormone injections on conception rates

		conception			Pearson Chi-Square value	P value
		Positive	Negative	total		
Groupse	Control	14	6	20	4.430769	0.035*
	Treatmente	12	0	12		
Total		26	6	32		



شکل ۱- فولیکول‌های موجود بر روی تخمدان روز ۶ پرواستروس

Fig1. Follicles on the ovary on the 6th day of proestrus



شکل ۲- سونوگرافی تخمدانی که به تازگی تخمک‌گذاری کرده است

Fig 2. Sonographic image of ovary following ovulation



شکل ۳- سونوگرافی در روز ۲۶ آبستنی

Fig3. Sonographic image at 26 days of gestation

بحث

تاثیر هورمون‌های PMSG و hCG بر میزان فحلی و آبستنی سگ‌های نژاد ژرمن شپرد نشان دادند که تزریق این دو هورمون در ایجاد استروس موثر می‌باشد و همچنین موجب تخمک‌گذاری در ۵ سگ از ۶ سگ تحت مطالعه شد بطوری که میزان استروس ۸۳ درصد و میزان آبستنی در سگ‌های تحت درمان ۶۵ درصد بوده است. صمدی و همکاران (۱۳۸۸) در

پژوهش حاضر با هدف بررسی سونوگرافیک روند تخمک‌گذاری در سگ‌های بومی فحل تحت تاثیر هورمون‌های hCG و GnRH در زمان افزایش هورمون LH صورت گرفت و با توجه به این‌که تاکنون تحقیقی در ارتباط با اثر همزمان این دو هورمون در سگ‌ها انجام نشده، ما به بررسی این ارتباط در تحقیق خود پرداختیم. علیزاده و همکاران (۱۳۸۷) با بررسی

بررسی تاثیر هورمون‌های hCG و PMSG بر عملکرد تولیدمثلی میش‌های آتابای به این نتیجه رسیدند که که میزان آبستنی میش‌هایی که هیچ هورمونی دریافت نکردند، در مقایسه با میش‌های دریافت کننده PMSG و میش‌های دریافت کننده هر دو هورمون hCG و PMSG به ترتیب ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد بوده است. پژوهش حاضر سگ‌های گروه تیمار که هر دو هورمون GnRH و hCG را دریافت کردند، به میزان ۱۰۰ درصد قادر به انجام تخمک‌گذاری و آبستنی شدند و تفاوت معناداری در مقایسه با گروه شاهد که تنها ۷۰ درصد سگ‌ها قادر به انجام تخمک‌گذاری و آبستنی شدند، مشاهده شد که در مقایسه با نتایج سایر محققین، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از هورمون hCG و PMSG هیچ‌گونه تاثیری بر میزان آبستنی نداشته است (۱)، زیرا ۶۵ درصد از سگ‌های دریافت‌کننده هورمون آبستن شدند، این در حالی است که در پژوهش حاضر، سگ‌ها بدون دریافت هورمون هم به میزان ۷۰ درصد آبستنی را نشان دادند. با مقایسه این مطالعه با پژوهش‌های مشابه دیگر می‌توان نتیجه گرفت که اگرچه استفاده از هورمون hCG و PMSG در میش‌ها منجر به آبستنی ۱۰۰ درصد می‌شود و به طور معناداری کارآمد می‌باشد، اما استفاده از آن در سگ‌ها هیچ‌گونه تاثیری بر میزان آبستنی ندارد (۱، ۱۳). نیکبخت و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه‌ای نشان دادند که GnRH و hCG دو روز پس از جفت‌گیری علاوه بر افزایش غلظت پروژسترون سرم، فعالیت‌های مختلف تولیدمثلی را بهبود می‌بخشند و از سوی دیگر، hCG در مقایسه با GnRH تأثیر بیشتری بر غلظت پروژسترون، تعداد بره‌های متولد شده و نرخ باروری داشت (۱۰). رستگاریا و همکاران (۱۳۹۰) در مطالعه‌ای نشان دادند که تزریق هورمون hCG در روزهای اول و سوم استروس هیچ تأثیر قابل توجهی بر میزان آبستنی سگ‌های نژاد تربیر

ندارد. جنتی و همکاران (۱۳۹۹) نشان دادند که تزریق هورمون hCG در روزهای اول و سوم استروس هیچ تأثیر قابل توجهی بر میزان آبستنی سگ‌های نژاد ژرمن شپرد ندارد. آپیش بینی محققان این بود که با توجه به تقلید hCG از هورمون LH، تخمک‌گذاری افزایش یافته و در نتیجه‌ی آن میزان آبستنی نیز افزایش پیدا کند ولی با توجه به نتایج به دست آمده دریافتند که میزان آبستنی در دو گروه شاهد و گروه تیمار تفاوت معناداری باهم ندارد و هورمون hCG نمی‌تواند موجب افزایش درصد آبستنی در سگ‌ها گردد (۱۲). آذری و همکاران (۱۳۹۹) در پژوهش خود به بررسی تأثیر زمان‌های مختلف تزریق hCG بر عملکرد تولیدمثلی و غلظت پروژسترون سرم میش‌های ترکی قشقای سوپر اووله شده با eCG در فصل پاییز پرداختند، یافته‌های آن‌ها نشان داد که تزریق hCG طی روزهای مختلف بعد از جفت‌گیری موجب افزایش غلظت پروژسترون سرمی نسبت به گروه شاهد گردید و نرخ بره‌زایی در گروه دریافت‌کننده‌ی hCG در روز هفت پس از جفت‌گیری بالاتر بود. همچنین کولسنو همکاران (۲۰۱۵) دریافتند که hCG ممکن است سطح پروژسترون را افزایش داده و کارایی تولید مثل را در گوسفندان بهبود می‌بخشد که با تحقیق حاضر همخوانی دارد. بابازاده اقدام و همکاران (۱۳۹۷) در پژوهش خود به بررسی اثر هم‌زمان‌سازی فحلی و استفاده از GnRH بر برخی شاخص‌های سرمی و میزان باروری گوسفندان نژاد ماکویی در فصل تولیدمثل پرداختند. آن‌ها نتیجه گرفتند که تزریق ۵ میلی‌لیتر GnRH در روز ۱۲ بعد از تلقیح، نرخ باروری میش را بهبود می‌بخشد. باتوجه پژوهش حاضر تزریق هورمون‌های GnRH و hCG منجر به کوتاه تر شدن زمان تخمک‌گذاری می‌گردد و تفاوت معناداری بین زمان تخمک‌گذاری در سگ‌های گروه شاهد و گروه تیمار مشاهده می‌شود ($p < 0/05$)؛ به طوری که

Veterinary Medicine, 2(4):7-13. [In persian].

2. Arnold, S., Arnold, P., Concannon, P.W., Weilenmann, R., Hubler, M., Casal, M., Dobeli, M., Faiburn, A., Eggenberger, E., Rusch, P., 2003. Effect of duration of PMSG treatment on induction of estrus, pregnancy rates and the complication of hyper oestrogenism in dogs. *Journal of Reproductin and Fertility*, 39:112-115.

3. Azari, K., Habibizad, J., Samadian, F., Qadiri Zafarayi, M., 2020. The Effect of hCG Injection on Different Days After Mating on Reproductive Performance and Serum Progesterone Concentration in Qashqai Sheep. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 16(68):40-46. [In persian].

4. Babazadeh, A., Moghadam, A., Daghigh, Kia G.A., Raft, S.A., Bakhshayesh, Khyabani, A., Moghadam, S., 2018. Investigation of the effect of estrous synchronization and GnRH administration on some serum parameters and fertility rate in Makui breed sheep during the breeding season, *Journal of Clinical Veterinary Pathology*, 12(3):219-231. [In persian].

5. Cavalcanti, A.S., Brandão, F.Z., Nogueira, L.A.G., Fonseca, J.F., 2012. Effects of GnRh administration on ovulation and pregnancy in ewes subjected to estrous synchronization. *Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 41(6):1412-1418.

6. Coleson, M.P., Sanchez, N.S., Ashley, AK., 2015. Human chorionic gonadotropin increases serum progesterone, number of corpora lutea and angiogenic factors in pregnant sheep. *Reproduction*, 150(1):43-52.

7. Hirata, M., Tanihara, F., Taniguchi, M., Takagi, M., Terazono, T., Otoi, T., 2018. Follicular development of canine ovaries stimulated by a combination treatment of ECG and hCG. *Veterinary Medicine and Science*, 4(4):333-340.

8. Janati, S., Shahrokhisor, N., 2020. Induction of estrus using hCG and

در ۸۳/۳ درصد از سگ‌های گروه تیمار، تخمک‌گذاری ۴۸ ساعت پس از پیک LH و در ۱۶/۷ درصد از سگ‌های گروه تیمار، تخمک‌گذاری ۶۰ ساعت پس از پیک LH صورت می‌گیرد؛ این در حالی است که زمان تخمک‌گذاری در سگ‌های گروه شاهد ۷۲ ساعت پس از پیک LH بوده‌است. حال با مقایسه این پژوهش با دیگر پژوهش‌های مشابه می‌توان نتیجه گرفت که اگرچه هورمون hCG در افزایش رشد فولیکول‌های مرحله انتهایی تخمک‌گذاری و تحریک تخمک‌گذاری موثر می‌باشد، اما نمی‌تواند منجر به آزادسازی تخمک‌ها شود. به همین دلیل تزریق این هورمون در برخی پژوهش‌ها نتوانست بر میزان آبستنی تاثیر بگذارد (۸، ۱۲)، اما در مطالعه حاضر هورمون hCG در کنار هورمون GnRH توانست به طور معناداری سرعت تخمک‌گذاری و میزان آبستنی را افزایش دهد، زیرا هورمون GnRH با القای رشد فولیکول‌ها و تحریک فولیکول‌ها به تخمک‌گذاری و متعاقب آن تزریق هورمون hCG، با تحریک بیشتر فولیکول‌ها به تخمک‌گذاری توانستند هم سرعت تخمک‌گذاری را کوتاه‌تر کنند و هم میزان تخمک‌گذاری و در نهایت آبستنی را افزایش دهند.

نتیجه‌گیری

طی بررسی نتایج پژوهش اخیر استفاده از هورمون های GnRH و hCG می‌تواند به طور موثری سبب افزایش درصد تخمک‌گذاری، کوتاه‌تر شدن زمان تخمک‌گذاری و آبستنی موفق در سگ‌های بومی شود..

منابع

1. Alizadeh, S., Alavi Shooshtari, M., Rostegarnia, A., 2008. Induction of estrus and pregnancy rate in female German Shepherd dogs using a combination of PMSG and hCG gonadotropins, *Journal of*

hCG in Anestrous Terrier dogs. *Journal of Clinical Veterinary Research*, 2(3):135-146. [In persian].

13. Samadi, F., 2009. The Effects of Season and PMSG and hCG Gonadotropins on reproductive performance of Atabay Ewes. *Journal of Agricultural and Natural Resources Sciences*, 16(3):105-111. [In persian].

14. Taponen, J., 2003. Ovarian function in dairy cattle after gonadotropin-releasing hormone treatments during perioestrus. *J. Faculty of veterinary medicine*, University of Helsinki Hameentie, 57, Helsinki.

15. Theofanakis, C., Drakakis, P., Besharat, A., Loutradis, D., 2017. Human chorionic gonadotropin: the pregnancy hormone and more. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5):1059.

16. Vanderlip, S.L., 2003. Ovulation induction in anestrous bitches by pulsatile administration of GnRH. *Lab Animal Sciences*, 27:459.

cabergoline in police dogs (German Shepherd Breed). *Journal of Hamedan Law Enforcement Science*, 7(3):73-84. [In Persian].

9. Johnson, M.H., 2013. Essential reproduction. 7nd ed., West Sussex, Wiley-Blackwell.

10. Nikbakht, K., Habibizad, J., Meamar, M., 2022. Effect of GnRH and hCG injection on the reproductive performance and serum progesterone concentration of ewes during spring season. *Veterinary Research Forum*, 13(4):553-561.

11. Ponglowhapan, S., Suthamnatpong, A., Khamanarong, A., Akaraphutoporn, E., Kulabsri, S., Jamikorn, U., 2018. Failure to conceive in deslorelin-induced oestrous bitches with regard to removal of hormone implants after ovulation. *Journal of Veterinary Medicine*, 48(2):211-217.

12. Rostegarnia, A., Fatehfar M., Amirkhah A., Moradi N., 2011. Induction of estrus using a combination of Cabergoline and

Research Article**Histomorphology of Kidney and Hematological Indices of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* on Replacement of Blood Powder Instead of Fish Meal in the Diet****Amal Moshashai¹, Rahim Abdi^{*1}, Rahim Peyghan²**

1- Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

2- Department of Clinical Sciences and Excellence Center of Warm Water Fish Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

*Corresponding author: abdir@kmsu.ac.ir

Received: 24 November 2024

Accepted: 10 February 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1191475

Abstract

The present study aimed to investigate the effect of replacing blood powder with fish powder on the histomorphology of kidney tissue and some blood indices of Nile tilapia. After preparation, the fish were fed with designed diets for 8 weeks, including control, 25, 50, 75, and 100% blood powder. After this period, the fish were anesthetized and blood was collected from the caudal peduncle with a heparin syringe. While opening the abdominal cavity, five-millimeter samples were taken from the kidney. After placing in a 10% buffered formalin fixative solution and undergoing dehydration with alcohol, clarification with xylene, and paraffin blocking, sections were made to a thickness of 4-6 microns with a microtome. They were then stained with hematoxylin-eosin and studied with a light microscope. Results showed that in the group receiving blood powder, numerous complications such as hyaline accumulation, epithelial rupture, Bowman's capsule dilation, hyperemia, increased melanomacrophage centers, and glomerular necrosis and tubules were observed. As the percentage of blood powder in the diet increased, so did the severity of the lesions. With increasing the replacement of blood powder instead of fish powder in the diet, the number of red blood cells, the percentage of hematocrit, and the amount of hemoglobin show a decreasing trend. The number of lymphocytes, monocytes, and neutrophils increased with increasing levels of blood powder. There was a significant difference between treatments, especially at high levels ($p < 0.05$). According to the results of this study, blood powder can be tolerated and replaced up to 75% of the diet for this species.

Keywords: Histomorphology, Kidney, Blood powder, Blood Powder, Nile tilapia.



بررسی هیستومورفولوژی کلیه و برخی شاخص‌های خون‌شناسی تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) طی جایگزینی پودر خون بجای پودر ماهی در جیره غذایی

امل مشعشی^۱، رحیم عبدی^{۱*}، رحیم پیغان^۲

۱- گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
۲- گروه علوم درمانگاهی و قطب علمی بهداشت ماهیان گرمابی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
*مسئول مکاتبات: abdir@kmsu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۴

DOI: 10.60833/ascij.2025.1191475

چکیده

مطالعه حاضر با هدف تأثیر جایگزینی پودر خون به جای پودر ماهی بر هیستومورفولوژی بافت کلیه و برخی شاخص‌های خونی تیلاپای نیل صورت گرفت. ماهیان تیلاپا پس از آماده‌سازی به مدت ۸ هفته با جیره‌های طراحی شده شامل کنترل، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد پودر خون تغذیه شدند. پس از این مدت ماهیان بیهوش شده و خون‌گیری از ساقه دم با سرنگ هپارینه انجام شد. ضمن باز کردن محوطه شکمی نمونه‌های به ابعاد پنج میلی‌متر از کلیه برداشت شد. پس از قرار دادن در محلول ثبوتی فرمالین بافر ۱۰ درصد و پس از طی مراحل آبگیری با الکل، شفاف‌سازی با گزیلول، بلوک‌گیری با پارافین، برش‌گیری به ضخامت ۴-۶ میکرون با میکروتوم انجام گرفت. در ادامه ضمن رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، مطالعه با میکروسکوپ نوری انجام گرفت. نتایج نشان داد که در گروه دریافت کننده پودر خون تغییرات متعددی مانند تجمع هیالین، کنده شدن اپیتلیوم، اتساع کپسول بومن، پرخونی، افزایش مراکز ملانوماکروفاژ و نکروز گلوبومرول و توبول‌ها مشاهده گردید که هرچه بر مقدار درصد پودر خون جیره افزوده شده بر شدت ضایعات وارده نیز افزوده گردید. با افزایش میزان جایگزینی پودر خون بجای پودر ماهی در جیره تعداد گلبول‌های قرمز، درصد هماتوکریت، میزان هموگلوبین خون روند کاهشی و تعداد لنفوسیت‌ها، مونوسیت و نوتروفیل‌ها با افزایش سطح پودر خون روند افزایشی نشان دادند و بین تیمارها بویژه در سطوح بالا اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($p < 0.05$). بنابر نتایج این تحقیق، پودر خون در جیره غذایی گونه مورد نظر تا حدود ۷۵ درصد قابل تحمل و جایگزینی در جیره می‌باشد.

کلمات کلیدی: هیستومورفولوژی، کلیه، پودر خون، خون‌شناسی، تیلاپای نیل.

مقدمه

و غلضت‌های بالای آمونیاک نسبت به بیشتر ماهیان پرورشی آب شیرین قدرت تحمل بیشتری دارد (۲۹). امروزه تیلاپا به عنوان گونه‌ای بومی در بیشتر ملیت‌های آسیا شناخته می‌شود. مهمترین شاخص پرورش این ماهیان رشد سریع، مقاومت بالا در برابر طیف وسیعی از شرایط زیست‌محیطی، مقاومت نسبت به

ماهی تیلاپا از اعضای خانواده سیکلید و از راسته سوف‌ماهیان بوده که دارای بدنی مستطیلی‌شکل با فلس‌های ریز می‌باشد. بیشتر تیلاپاهایی که در آبزی-پروری پرورش داده می‌شوند از جنس اورئوکرومیس می‌باشند (۲، ۵). به طور معمول تیلاپا در برابر شوری زیاد، درجه‌ی حرارت بالای آب، اکسیژن محلول پایین

بیماری‌ها، تحمل بالا در برابر کیفیت پایین آب، قدرت تولیدمثل بالا و دوره کوتاه تولیدمثلی در اسارت، تغذیه از مواد غذایی کم ارزش، دسترسی آسان به منابع غذایی و امکان استفاده از غذای مصنوعی پس از جذب کیسه زرده می‌باشد بطوری که در حال حاضر پرورش تیلاپیا در جهان پس از کپورماهیان در درجه-ی دوم اهمیت قرار دارد (۳، ۴). صنعت آبی‌پروری در حال حاضر به سرعت در جهان در حال توسعه می‌باشد، از این رو به منظور افزایش تولید آبزیان به صورت موفقیت‌آمیز نیاز به یک برنامه مدیریتی خوب می‌باشد. از مهمترین مسائل در پرورش آبزیان به صورت مصنوعی توجه به امر تغذیه می‌باشد به طوری که در آبی‌پروری بیش از نیمی از هزینه‌های جاری یک مزرعه پرورشی ماهی به این امر اختصاص داده می‌شود. شیوع بیماری‌ها در ماهیان معمولاً زمانی اتفاق می‌افتد که در اثر تغییر فاکتورهای مثل تغذیه تحت استرس قرار می‌گیرند (۷، ۹). مقدار زیادی از فراورده‌های غنی از پروتئین از صنایع فرآوری مانند پوست، استخوان و خون حاصل از کشتارگاه‌های بازرایی و استفاده از آنها به عنوان عناصر کاربردی در سیستم-های غذایی یک جاگزین بسیار هیجان‌انگیز و امیدوارکننده است با توسعه فناوری‌های آنزیمی برای بازرایی و اصلاح پروتئین تولید طیف گسترده‌ای از مواد غذایی و محصولات صنعتی از دورریز صنایع جانبی امکان پذیر خواهد بود. پودر خون ارزانترین فرآورده به دست آمده از ضایعات حیوانی به شمار آمده که به دلیل دارا بودن پروتئین بالا و قابلیت هضم مناسب به طور گسترده‌ای در جیره آبزیان به کار می‌رود (۶). در آبزیان اندام‌های مختلفی از جمله کلیه در تنظیم اسمزی و تعادل آب و الکترولیت‌ها دخالت دارند. مطالعات مختلف نشان داد که با توجه به شرایط تکاملی و زیستی ماهیان در ساختار کلیه تغییراتی از نظر بافتی و فیزیولوژیکی به وجود آمده

است. بررسی بافت‌شناسی و تعیین ساختارهای پایه کلیه ماهیان دارای اهمیت فراوانی در مطالعات تشخیص آسیب‌شناسی و پیشگیری از بیماری‌های مختلف داشته باشد. لذا آگاهی از ساختمان بافت-شناسی کلیه در ماهیان قبل از بررسی ضایعات پاتولوژیک و بیماری‌ها ضروری است، تا از این طریق تغییرات ایجاد شده در بافت‌ها را مورد ارزیابی قرار داد. همچنین شناخت ساختار اندام‌های موجودات در شرایطی مانند دریافت تغذیه جدید می‌تواند درک بهتری از سازش‌ها با شرایط اکولوژیک مختلف فراهم نماید (۸).

یکی از حیاتی‌ترین بخش‌های بدن جانداران، خون می‌باشد، لذا آگاهی از وضعیت خونی ماهیان و بخصوص شناخت اثر محیط‌های جدید پرورشی بر شاخص‌های خونی می‌تواند ما را در پیشبرد اهدافی همانند حفظ، تکثیر، نگهداری و پرورش این ماهیان یاری نماید. خون به عنوان یک بافت سیال و دسترسی آسان، یکی از مهمترین مایعات بیولوژیک بدن بوده که تحت تأثیر حالات مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک ترکیبات آن دستخوش نوسان و تغییر می‌گردد. ویژگی‌های خون‌شناسی ماهیان یکی از مهم‌ترین شواهد مراحل فیزیولوژیک آنها و منعکس کننده ارتباط خصوصیات اکوسیستم آبی و سلامتی آنها می‌باشد. به همین دلیل آگاهی از دامنه طبیعی پارامترهای خونی یک ماهی می‌تواند به عنوان شاخص زیستی مورد استفاده قرار گیرد (۱۰).

بنابراین با توجه به قیمت مناسب، سهل‌الوصول بودن و دارا بودن پروتئین پودر خون نسبت به پودر ماهی مطالعه اخیر به منظور بررسی مقدماتی امکان جایگزینی آن بجای پودر ماهی در جیره غذایی و تأثیر آن بر بافت‌شناسی کلیه و برخی فاکتورهای خونی تیلاپای نیل به مرحله اجرا درآمده است.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق پس از انتقال ماهی‌های تیلاپیا به آکواریوم های ۱۰۰ لیتری از قبل ضدعفونی شده موجود در بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان جهت هوادهی و تامین اکسیژن در هر یک از آکواریوم‌ها دو عدد سنگ هوا که به منبع هواده متصل بود، نصب گردید و تنها در هنگام غذادهی، هوادهی موقتاً قطع و سپس مجدداً برقرار می‌شد. آب مورد نیاز از آب لوله کشی شهری که قبلاً با قرار دادن در مخزن کلرزدایی شده بود استفاده گردید و به مدت دو هفته سازگاری انجام پذیرفت (۱۲ و ۲۲). پس از این مدت ۱۵۰ قطعه ماهی با وزن حدود 30 ± 0.5 گرم بطور تصادفی به ۵ گروه با سه تکرار شامل گروه شاهد دریافت کننده جیره تجاری فاقد پودر خون، گروه A دریافت‌کننده جیره تجاری حاوی ۲۵ درصد پودر خون، گروه B دریافت‌کننده جیره تجاری حاوی ۵۰ درصد پودر خون، گروه C دریافت‌کننده جیره تجاری حاوی ۷۵ درصد پودر خون، گروه D دریافت‌کننده جیره تجاری حاوی ۱۰۰ درصد پودر خون با پروتئین پایه ۴۰ درصد در تمامی گروه‌ها به مدت ۸ هفته دسته بندی شدند. برای آماده سازی جیره مورد نیاز و به منظور بالا بردن قابلیت هضم در ابتدا به خوبی با یک دیگر مخلوط شده و ترکیب حاصل با اقلام با ذرات درشت‌تر یعنی پودر ماهی و پودر خون با درصدهای ذکر شده ترکیب شدند. در پایان به مخلوط حاصل مقدار مساوی آب و سپس کمی روغن سویا اضافه شد تا اینکه یک مخلوط خمیری همگن به دست آید. سپس خمیر حاصل بوسیله چرخ گوشت به پلت تبدیل شد. پس از خشک شدن رشته‌های چرخ شده روی سینی به مدت ۲۴ ساعت در معرض جریان هوا قرارداده شدند تا رطوبت موجود در آنها به کمتر از ۱۰ درصد برسد. سپس این رشته‌ها خرد و شکسته شده و جیره متناسب با سایز دهان ماهیان

کمتر از ۲ میلی متر (مطابق استاندارد سازمان شیلات ایران) ساخته شد. پلت‌های آماده شده تا زمان مصرف در کیسه‌های پلاستیکی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. باید در نظر داشته باشیم که تیمارهای غذایی برای گروه‌های مختلف از لحاظ میزان پروتئین و انرژی یکسان بودند. میانگین پروتئین خام 40 ± 5 درصد و انرژی 20 ± 2 مگاژول که بر اساس نیازمندی ماهی تیلاپیا در محدوده وزنی حاضر اندازه‌گیری شدند (۱۳). در طول مدت آزمایش سنجش خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب از قبیل شوری، دما، pH و اکسیژن محلول به ترتیب با استفاده از رفرکتومتر نوری (Horiba U-10، ژاپن)، ترمومتر دیجیتال (Horiba U-10، ژاپن)، دستگاه قابل حمل سنجش pH مدل ebro.PHT-3140 انجام شد (۱۱). همچنین اکسیژن محلول با استفاده از دستگاه دیجیتال اندازه‌گیری اکسیژن مدل TECPEL DO-1609 بطور روزانه اندازه‌گیری می‌شد. همچنین جهت اندازه‌گیری فاکتورهای آمونیاک، نیتريت، نیترات و سختی کل آب از دستگاه کالریتر هک (مدل ۸۹، شرکت هک، آمریکا) استفاده گردید. در طول مدت نگهداری و آزمایش، آب آکواریوم‌ها به میزان ۲۰ درصد حجم آکواریوم به صورت روزانه و پس از اتمام تغذیه جهت جلوگیری از افزایش آمونیاک و متابولیت‌های دیگر از ناحیه کف سیفون و تخلیه می‌گردید. غذا دهی ماهیان به میزان ۳ درصد وزن بدن در دو نوبت صبح و عصر با غذای تهیه شده انجام می‌گرفت (۲۸). به منظور مطالعات بافتی نمونه‌هایی به ابعاد پنج میلی متر از بافت کلیه جدا و درون سبدهای نمونه‌گیری قرار داده شد و بعد از نامگذاری در محلول ثبوتی فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار گرفته و پس از ۴۸ ساعت اقدام به تعویض فرمالین نمونه‌ها و جایگزینی آنها با الککل ۷۰ درصد انجام شد (۱۴). در ادامه جهت انجام پاساژ بافتی نمونه‌ها پس از ثبوت، طبق روش معمول

بافتی آماده و پس از گذراندن مراحل پاساژ بافتی شامل آگیری توسط الکل با درصدهای صعودی سپس شفاف سازی بوسیله محلول گزیلول و آغشتگی به پارافین در دمای ۵۸-۶۰ درجه سانتیگراد با استفاده از دستگاه پاساژ بافت (مدل RX-11B, Tissue Tekrotary, Japan) انجام و در نهایت نمونه‌ها برای انجام قالب‌گیری آماده‌سازی شدند. در نهایت برش‌های با ضخامت ۶-۴ میکرون تهیه شده بوسیله میکروتوم مدل LEICA-RM2245 ساخت کشور آلمان، رنگ‌آمیزی عمومی هماتوکسیلین-ائوزین که توسط میکروسکوپ نوری مجهز به لنز Dino-Lite و سیستم کامپیوتر مجهز به نرم افزار داینو کپچر بررسی و عکسبرداری بر روی آنها انجام گرفت (۳۰). برای اندازه‌گیری فاکتورهای خونی پس از بیهوش نمودن ماهی‌ها با قرار دادن آنها در محلول پودر گل میخک به میزان ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر خونگیری به وسیله سرنگ و سرسوزن شماره ۲۱ از طریق ورید ساقه دمی به میزان ۲ سی‌سی صورت گرفت. برای شمارش گلبول‌های سفید از رقیق سازی ۲۰ میکرولیتر خون در ۰/۴ میلی‌لیتر محلول Lewis و بررسی نمونه روی لام نئوبار استفاده شد و سپس عدد به دست آمده در ۵۰ ضرب شد تا تعداد گلبول‌های سفید در هر میلی‌متر مکعب خون تعیین شود. شمارش گلبول‌های قرمز پس از رقیق‌سازی نمونه خون به نسبت ۱ به ۲۰۰ در محلول Lewis، در مربع میانی لام نئوبار انجام و برای تعیین تعداد گلبول‌های قرمز در هر میلی‌متر مکعب خون عدد حاصله در ۱۰۰۰۰ ضرب شد. سنجش هموگلوبین از روش سیانومت هموگلوبین انجام گرفت، بدین ترتیب که پس از حل کردن ۲۰ میکرولیتر نمونه خون در ۵ میلی‌لیتر محلول درابکین و قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی، قرائت شاخص جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر (Unico UV/Vis 2100، آمریکا) و

مقایسه شاخص جذب با منحنی استاندارد انجام گرفت (۱۷). برای تعیین هماتوکریت از روش میکروهماتوکریت استفاده شد. لوله‌های هماتوکریت حاوی خون به صورت متقارن در میکروسانتریفیوژ (Nuve NF 048، ترکیه) قرار داده شدند و پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، اندازه‌گیری فاز جدا شده گلبول‌های قرمز در لوله‌های میکروهماتوکریت به وسیله خط کش مخصوص انجام و مقدار هماتوکریت بر حسب درصد تعیین شد. همچنین شاخص‌های MCHC، MCH، MCV بر اساس داده‌های حاصل از شمارش گلبول‌های قرمز و سنجش هموگلوبین و هماتوکریت اندازه‌گیری شدند (۲۵). داده‌های بدست آمده بر اساس میانگین $\pm$ خطای معیار از میانگین آماری گزارش گردیدند. همچنین برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS ver. 21 استفاده شد. برای مقایسه از آزمون آنوای یک طرفه استفاده و گروه‌ها بر اساس تغذیه‌های متفاوت مورد مقایسه قرار گرفتند. در مواردی که تداخل بین تیماری وجود داشت جزئیات مقایسه درون‌گروهی و بین گروهی ارائه و در مواردی که اختلاف آماری بین گروه‌ها معنی دار بود از پس آزمون توکی برای مشخص نمودن اختلاف معنی دار بین تک تک گروه‌ها استفاده شد. در تمامی موارد $(p < 0/05)$ به عنوان معنی‌دار بودن در نظر گرفته شد (۲۴).

نتایج

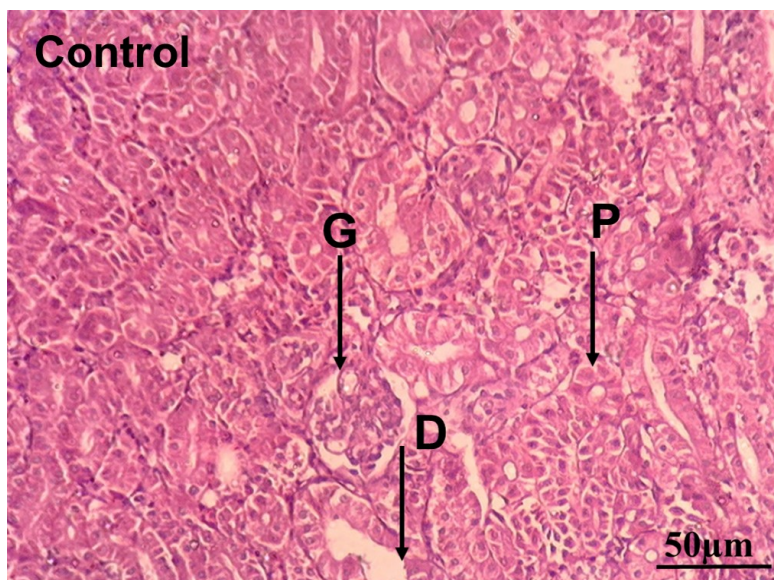
نتایج ماکروسکوپی: نتایج حاصل از مطالعات ماکروسکوپی بر روی بافت کلیه تیلایپای نیل در گروه کنترل نشان داد که کلیه به رنگ قرمز تیره در مجاورت ستون فقرات و به صورت خارج صفاقی در بالای کیسه شنا و در امتداد ستون فقرات از ناحیه سر تا انتهای خلفی بدن کشیده شده و همانند سایر ماهیان

استخوانی حقیقی شامل راس و بدنه بوده است. در مطالعات میکروسکوپی مشخص گردید که این بافت در سطح خارجی توسط کپسول بسیار ظریفی از بافت همبند سست به همراه و یک ردیف سلول مزوتیلیایی پوشیده شده بود.

نتایج میکروسکوپی: در این مطالعه تاثیر غلظت‌های مختلف جیره حاوی پودر خون بر قسمت‌های مهم بخش دفعی کلیه مورد بررسی قرار گرفته است. بخش دفعی کلیه شامل نفرون‌ها که شامل جسمک کلیوی که به شکل ساختارهای کروی شکل در سراسر بافت کلیه به صورت پراکنده مشاهده شدند. جسمک‌ها از گلومرول و کپسول بومن تشکیل شده هر جسمک کلیوی دارای دو قطب عروقی و ادراری می‌باشد که در مقابل یک دیگر قرار داشتند. همچنین مجاری جمع‌کننده ادرار که شامل لوله‌های ادراری که شامل بخش پروکسیمال، دیستال و لوله‌های جمع‌کننده ادراری می‌باشند. در نتیجه در معرض قرار دادن ماهی‌های تیلپایا در معرض جیره حاوی درصد‌های بالای پودر خون تغییرات بافتی شامل تجمع هیالن،

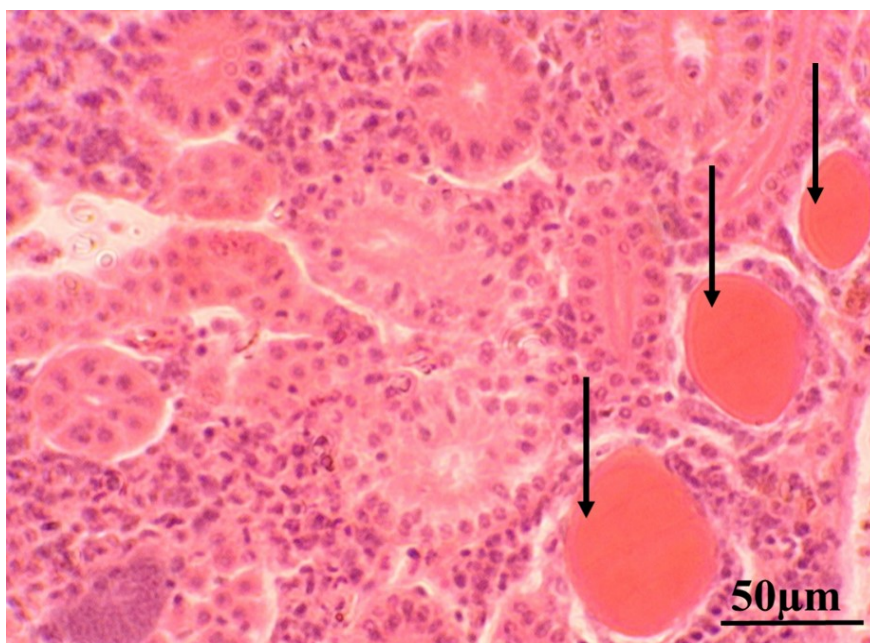
کنده شدن اپیتلیوم، اتساع کپسول بومن، پرخونی، افزایش مراکز ملانوماکروفاژ و نکروز گلومرول و توبول‌ها مشاهده گردید که هرچه بر مقدار درصد پودر خون جیره افزوده شده بر شدت ضایعات وارده نیز افزوده گردید (شکل‌های ۱ تا ۷، جدول ۱).

نتایج خون‌شناسی: بر اساس نتایج جدول ۲ میزان پودر خون جیره بر پارامترهای خون‌شناسی تیلپایای نیل از جمله تعداد گلبول‌های قرمز، تعداد گلبول‌های سفید، درصد هماتوکریت، میزان هموگلوبین، لنفوسیت، نوتروفیل و اندیس‌های خونی تاثیر معنی‌دار داشته است. تعداد گلبول‌های قرمز، درصد هماتوکریت، میزان هموگلوبین خون روند کاهشی و تعداد لنفوسیت‌ها، مونوسیت و نوتروفیل‌های تیلپایای نیل با افزایش سطح پودر خون روند افزایشی نشان دادند. کمترین عدد مربوط به تیمار شاهد و بیشترین عدد مربوط به تیمار ۱۰۰ درصد دریافت‌کننده پودر خون بوده است.



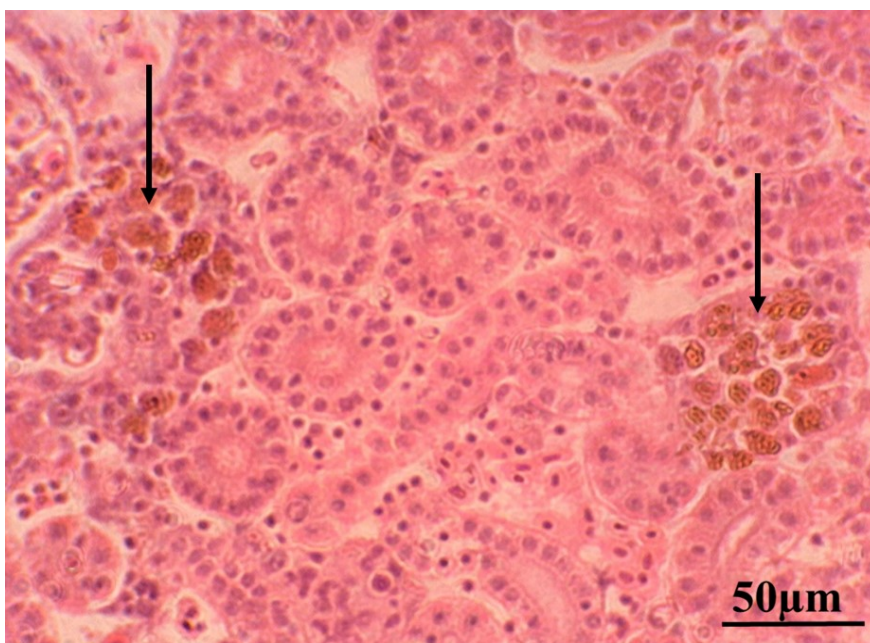
شکل ۱- میکروگراف بافت کلیه تیلپایای نیل گروه کنترل (بزرگ‌نمایی ۴۰ و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئئوزین). گلومرول (G)، توبول دیستال (D) و توبول پروگسیمال (P)

Fig. 1. Histological micrograph of Nile tilapia kidneys of the control group (H&E, x40). Glomerulus (G), distal tubule (D), and proximal tubule (P).



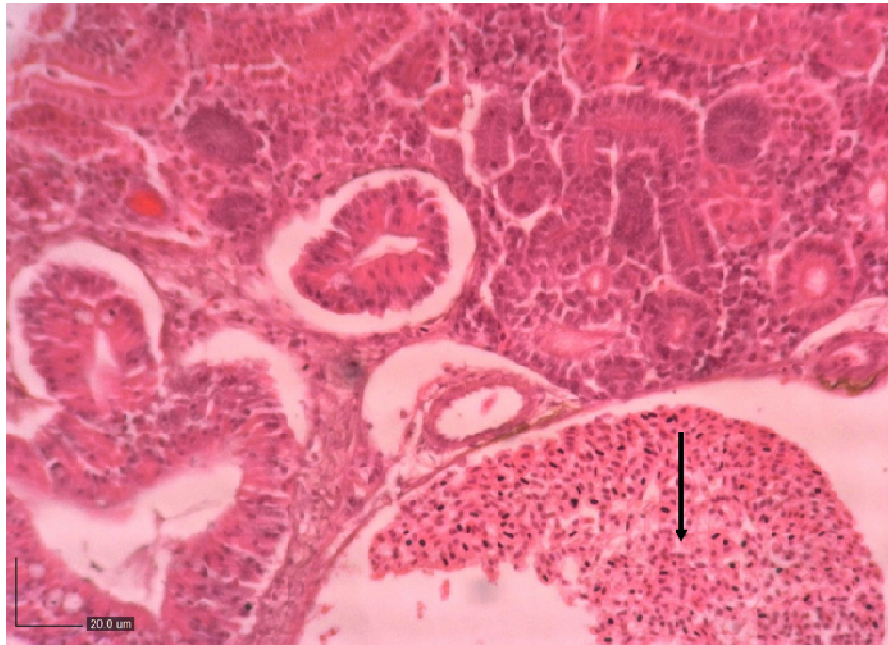
شکل ۲- میکروگراف بافتی مربوط به کلیه تیلاپای نیل گروه ۱۰۰ درصد دریافت کننده پودر خون (بزرگ‌نمایی ۴۰ و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین). این تصویر تجمع ذرات هیالن (پیکان‌ها) در بافت کلیه تیلاپای نیل را نشان می‌دهد.

Fig. 2. Histological micrograph of Nile tilapia kidney of the group receiving 100% blood powder (H&E, x40). This image shows the accumulation of hyaline particles (arrows) in the kidney tissue of Nile tilapia.



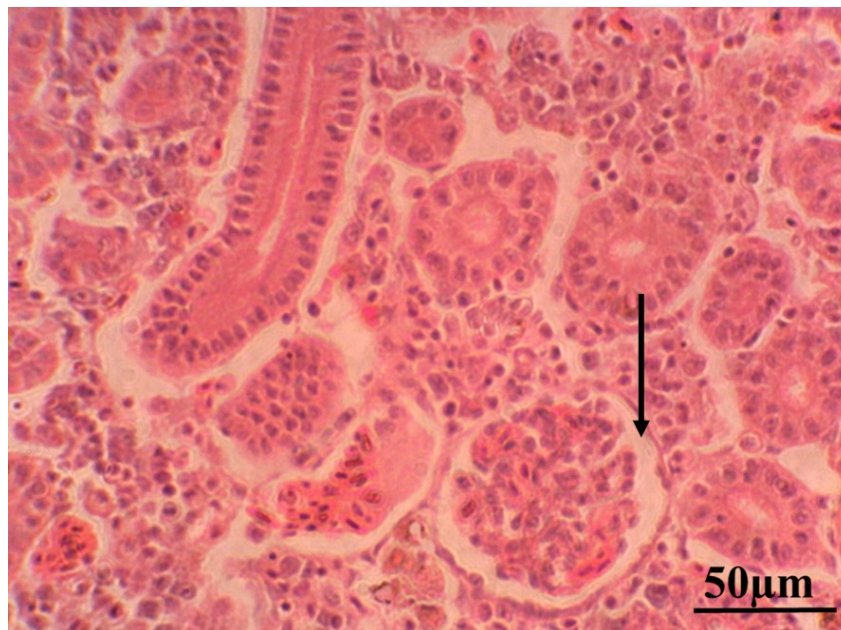
شکل ۳- میکروگراف بافتی مربوط به کلیه تیلاپای نیل ۱۰۰ درصد دریافت کننده پودر خون (بزرگ‌نمایی ۴۰ و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین). این تصویر افزایش مراکز ملانوماکروفاژ (پیکان‌ها) در بافت کلیه تیلاپای نیل را نشان می‌دهد.

Fig. 3. Tissue micrograph of Nile tilapia kidney receiving 100% blood powder (H&E, x40). This image shows the increase of melanoma-macrophage centers (arrows) in the kidney tissue of Nile tilapia.



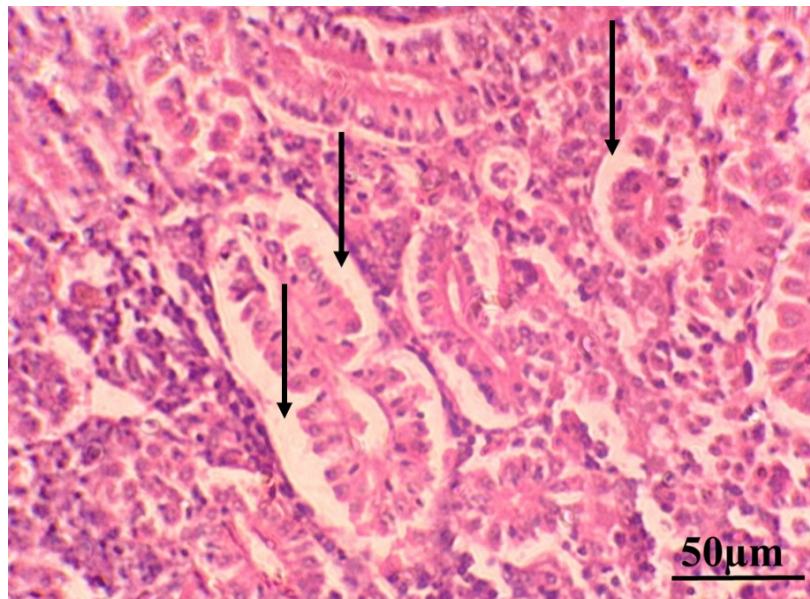
شکل ۴- میکروگراف بافتی مربوط به کلیه تیلاپای نیل ۱۰۰ درصد دریافت کننده پودر خون (بزرگ‌نمایی ۴۰ و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اِئوزین). این تصویر پرخونی عروقی (پیکان) در بافت کلیه تیلاپای نیل را نشان می‌دهد.

Fig. 4. Tissue micrograph of Nile tilapia kidney receiving 100% blood powder (H&E, x40). This image shows the vascular hyperemia (arrow) in the kidney tissue of Nile tilapia.



شکل ۵- میکروگراف بافتی مربوط به کلیه تیلاپای نیل ۱۰۰ درصد دریافت کننده پودر خون (بزرگ‌نمایی ۴۰ و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اِئوزین). این تصویر اتساع فضای ادراری (پیکان) در بافت کلیه تیلاپای نیل را نشان می‌دهد.

Fig. 5. Tissue micrograph of Nile tilapia kidney receiving 100% blood powder (H&E, x40). This image shows the expansion of the urinary space (arrow) in the kidney tissue of Nile tilapia.



شکل ۶- میکروگراف بافتی مربوط به کلیه تیلاپای نیل ۱۰۰ درصد دریافت کننده پودر خون (بزرگ‌نمایی ۴۰ و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اِئوزین). این تصویر کننده شدن اپیتلیوم (پیکان‌ها) در بافت کلیه تیلاپای نیل را نشان می‌دهد.

Fig. 6. Tissue micrograph of Nile tilapia kidney receiving 100% blood powder (H&E, x40). This image shows the epithelium (arrows) in the kidney tissue of Nile tilapia.



شکل ۷- میکروگراف بافتی مربوط به کلیه تیلاپای نیل ۱۰۰ درصد دریافت‌کننده پودر خون (بزرگ‌نمایی ۴۰ و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اِئوزین). این تصویر نکروز توبول (پیکان‌ها) در بافت کلیه تیلاپای نیل را نشان می‌دهد.

Fig. 7. Tissue micrograph of Nile tilapia kidney receiving 100% blood powder (H&E, x40). This image shows tubule necrosis (arrows) in the kidney tissue of Nile tilapia.

جدول ۱- تغییرات بافتی تیلاپای نیل به دنبال جایگزینی پودر خون به جای پودر ماهی در جیره غذایی در تیمارهای مختلف در مدت ۸ هفته

Table 1. Tissue changes in Nile tilapia following replacement of blood meal in the diet in different treatments for 8 weeks

Factor	Control	A	B	C	D
Aggregation of hyaline particles	-	+	++	++	+++
Melanomacrophage centers	-	+	++	++	+++
Hyperemia	-	+	++	++	+++
Dilation of the urinary space	-	-	-	+	++
Epithelial detachment	-	-	+	++	+++
Tubular necrosis	-	-	+	++	+++

جدول ۲- شاخص‌های خونی تیلاپای نیل به دنبال جایگزینی پودر خون به جای پودر ماهی در جیره غذایی تیمارها در مدت ۸ هفته

Table 2. Blood indices of Nile tilapia following replacement of blood meal with fish meal in the diet in different treatments for 8 weeks

Factor	Control	A	B	C	D
RBC ($\times 10^6$ mm)	2.94 ± 0.37^a	2.63 ± 0.27^a	2.36 ± 0.53^a	1.76 ± 0.33^b	1.13 ± 0.27^b
WBC ($\times 10^3$ mm)	11.41 ± 1.57^a	11.82 ± 1.33^a	12.44 ± 1.51^b	12.85 ± 1.66^b	13.21 ± 1.62^c
Hematocrit (%)	24.31 ± 1.31^a	23.33 ± 1.47^a	22.46 ± 1.37^a	21.11 ± 1.26^b	20.39 ± 1.38^b
Hemoglobin (gr/dl)	8.11 ± 0.36^a	7.79 ± 0.32^a	7.61 ± 0.66^a	6.51 ± 0.77^b	5.81 ± 0.64^b
MCV (fl)	117.61 ± 28.12^a	121.44 ± 21.8^a	127.55 ± 23.14^b	131.63 ± 23.68^b	135.66 ± 24.11^b
MCH (pg)	56.41 ± 3.35^a	57.44 ± 4.22^a	57.98 ± 4.66^a	60.39 ± 5.45^b	61.44 ± 5.34^b
MCHC (gr)	23.11 ± 1.36^a	22.19 ± 1.33^a	20.71 ± 1.86^b	19.15 ± 1.55^b	18.32 ± 1.66^c
Lymphocyte (%)	64.54 ± 4.41^a	61.34 ± 4.56^a	58.51 ± 4.71^b	53.56 ± 4.49^b	49.43 ± 3.21^c
Monocyte (%)	1.15 ± 0.13^a	2.43 ± 0.76^a	2.95 ± 0.63^a	3.33 ± 0.27^b	4.18 ± 0.19^b
Neutrophil (%)	21.28 ± 1.38^a	26.22 ± 1.73^a	31.24 ± 1.37^a	36.22 ± 2.18^b	45.58 ± 3.31^c

حروف نامشابه در هر ردیف نشان از وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مختلف در سطح $p < 0.05$ می‌باشد.

Different letters in each row indicate significant differences between different groups at the $p < 0.05$ level.

بحث

مواد معدنی، نقش اصلی کلیه، در ماهیان آب شیرین دفع مقدار زیادی از آب اسمزی انباشته شده و حذف یون‌های اضافی استخراج شده از غذا به ویژه کلسیم، سولفات و فسفات است (۲۱). در نتیجه در معرض قرار دادن ماهی‌های تیلاپیا در معرض جیره حاوی درصد‌های مختلف پودر خون تغییرات بافتی از جمله تجمع هیالین مشاهده شد. ایجاد دانه‌های هیالین، به شکل گرانول‌های ائوزینوفیلی بزرگ در درون سلول مشخص می‌شوند، این گرانول‌ها ممکن است درون سلول به دلیل عدم جذب مجدد پروتئین‌های پلاسمایی ایجاد شود که به آسیب جسمک‌های کلیوی می‌انجامد. اتساع کپسول بومن، نکروز گلومرول و توبول‌ها از دیگر تغییرات مشاهده شده بود. تحلیل رفتن گلومرول‌ها منتج به افزایش فضای بومن و در نتیجه اختلال در فرآیند فیلتراسیون و افزایش حجم ادرار دفعی در ماهی‌ها می‌گردد. ادامه یافتن آسیب‌های

ضایعات کشتارگاهی دام و طیور مثل پودر خون و پودر پر به عنوان منبع پروتئین حیوانی یک جایگزین کم‌هزینه به جای پودر ماهی در جیره غذایی آبزیان به شمارآمده و از لحاظ ترکیبات اسیدهای آمینه و چرب بر پروتئین‌های گیاهی برتری و علاوه بر آن فاکتورهای ضد تغذیه‌ای منابع پروتئین گیاهی نیز در آنها وجود ندارد (۱، ۲۰). در این مطالعه تاثیر غلظت‌های مختلف جیره حاوی پودر خون بجای پودر ماهی بر قسمت های مهم بخش دفعی کلیه و هماتولوژی ماهی تیلاپای نیل مورد بررسی قرار گرفته است. کلیه، اندامی حیاتی است که نقش بسیار مهمی در تنظیم الکترولیت‌ها و آب بدن و همچنین حفظ و نگهداری هموستاز بدن موجودات ایفا می‌کند. نقش چند منظوره کلیه‌ها در ماهی ترکیبی از عملکرد ریه‌ها، کلیه‌ها و روده در مهره‌داران است که به‌وسیله ساختارهای پیچیده منعکس می‌گردد. از نظر تنظیم

سلول‌های توبولی در نهایت می‌تواند به نکروز سلولی ختم شود. در مطالعه حاضر، افزایش قابل توجهی در تعداد تجمعات ملانوماکروفاژی در کلیه ماهیان مورد مطالعه مشاهده شد. پیش از این افزایش مراکز ملانوماکروفاژی کلیوی در گونه‌هایی که در معرض سطوح بالای مواد شیمیایی قرار داشتند، گزارش شده بود (۲۳ و ۲۶). این مراکز ملانوماکروفاژی در به دام انداختن آنتی‌ژن‌ها و معرفی آنها به لنفوسیت‌ها و جداسازی محصولات تجزیه سلولی عمل می‌کنند. علاوه بر در مطالعه‌ای بیان نمودند که افزایش تعداد مراکز ملانوماکروفاژی، منجر به افزایش فعالیت‌های فاگوسیتوزی و کیموتاکسیک و به دنبال آن مهاجرت لوکوسیت‌ها به درون بافت‌ها و تراکم لوکوسیتی در آنها می‌شود. بنابراین افزایش مراکز ملانوماکروفاژی به عنوان شاخص استرس محیطی مورد توجه قرار گرفته است (۱۵، ۱۹). یکی دیگر از ضایعات مشاهده شده کنده شدن اپیتلیوم بافت کلیه بویژه در درصدهای بالای پودرخون بود. بافت اپیتلیوم از سلول‌های چندضلعی اجتماع یافته‌ای تشکیل شده‌است که پوشش سلولی سطوح داخلی کلیه را می‌پوشاند. این بافت در بالای بافت همبند قرار گرفته و این دولایه توسط غشای پایه از هم جدا می‌شوند. از آنجایی که کلیه اندام دفاعی هم محسوب می‌شود و در سم زدایی و دفع آلاینده‌ها همکاری دارد بنابراین تغییرات در اندازه و ساختار سلول‌های اپیتلیوم و انسداد فضای لومن بازدارنده به عنوان یک این عملکرد در چنین مواردی می‌باشد. پرخونی نیز با تجمع گلبول‌های قرمز به صورت منتشر در اطراف لوبول‌های ادراری از دیگر ضایعات مشاهده شده طی جایگزینی پودر خون به جای پودر ماهی در جیره غذایی ماهی تیلاپیا بوده که در بیشتر تحقیقات انجام گرفته بر روی گونه‌های متعدد در معرض آلودگی و عناصر سنگین گزارش شده است. پرخونی بدلیل افزایش جریان خون بافتی

در کلیه ماهیان دریافت گنده مقدار بالای پودر خون که این موضوع ناشی از افزایش جریان خون بدلیل واکنش طبیعی بدن یا در هنگام تحریک سیستم ایمنی در بدن ماهی گزارش گردید (۲۷). بررسی‌های خون شناسی یا هماتولوژی می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را جهت نظارت، کنترل و پایش سلامت ماهی در شرایط پرورشی قرار دهد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر بین تیمارهای آزمایشی از نظر تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، هموگلوبین، هماتوکریت، شاخص‌های MCV، MCH، MCHC، تعداد لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها در برخی گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید. کاهش میزان گلبول‌های قرمز و کاهش همزمان هموگلوبین و هماتوکریت می‌تواند نشان‌دهنده کم‌خونی ماهی در نتیجه مهار ساخت گلبول‌های قرمز در اندام‌های خون‌ساز باشد (۱۶). گلبول‌های قرمز ماهی سلول‌های هسته‌دار هستند که برخلاف پستانداران حاوی اندامک‌هایی در سیتوپلاسم خود می‌باشند. جدا از نقش شناخته شده آنها در تبادل گاز، اخیراً مجموعه‌ای از نقش‌های بیولوژیکی جدید برای گلبول‌های قرمز هسته‌دار مرتبط با پاسخ ایمنی گزارش شده است. گلبول‌های قرمز هسته‌دار می‌توانند فاگوسیتوز و به عنوان سلول‌های ارائه دهنده آنتی ژن عمل کنند. آنها می‌توانند به الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن مختلف پاسخ داده، فعالیت لکوسیت را تعدیل کرده و فاکتورهای شبه سیتوکین را آزاد کنند (۱۸). در این بررسی سطح هموگلوبین تا ۲۵ درصد جایگزینی پودر خون نسبت به تیمارهای شاهد افزایش یافت اما با افزودن پودر خون به نسبت‌های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد با کاهش روبه رو شد. وجود تفاوت معنی‌دار در سطح هموگلوبین و درصد هماتوکریت در مطالعه حاضر بر ایجاد اختلال فیزیولوژیکی در اثر فرایند جایگزینی دلالت دارد. گلبول‌های سفید خون ماهی از مهم‌ترین مکانیزم‌های

2. Abdelhamed, H., Ibrahim, I., Baumgartner, W., Lawrence, M.L., Karsi, A. 2017. Characterization of histopathological and ultrastructural changes in channel catfish experimentally infected with virulent *Aeromonas hydrophila*. *Frontier Microbiology*, 8:1519.
3. Adeniran, A., Adeyemo, O.K., Emikpe, B., Alarape, S. 2017. Organosomatic indices, haematological and histological assessment as biomarkers of health status in feral and cultured *Clarias gariepinus*. *African Journal Biomedical Research*, 20(2):189-194.
4. Ahmad Mohamad, S. 2009. Effect of different artificial on growth rate condition and histological structure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Research Journal of Fish Hydrobiology*, 4(1):29- 34.
5. Ahmed, S.A., Ibrahim, R.E., Farroh, K.Y., Moustafa, A.A., Al-Gabri, N. A., Alkafafy, M., Amer, S.A. 2021. Chitosan vitamin E nanocomposite ameliorates the growth, redox, and immune status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under different stocking densities. *Aquaculture*, 541:736804.
6. Ale, A., Bacchetta, C., Rossi, A.S., Galdoporpora, J., Desimone, M.F., Fernando, R., Cazenave, J. 2018. Nanosilver toxicity in gills of a neotropical fish: Metal accumulation, oxidative stress, histopathology and other physiological effects. *Ecotoxicology Environment Safty*, 148:976-984.
7. Amerm, S.A., Ahmedm, S.A., Ibrahim, R.E., Al-Gabrim, N.A., Osmanm, A., Sitohym, M. 2020. Impact of partial substitution of fish meal by methylated soy protein isolates on the nutritional, immunological, and health aspects of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Aquaculture*, 518:734871.
8. Amiripour, L., Abdi, R., Movahedini, A., Sahraian, MR. 2015. Study of liver and intestine tissue structure in orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*) during

دفاعی سلولی بدن جانوران به شمار می‌روند. انواع مختلف لکوسیت‌های خونی شامل نوتروفیل، بازوفیل، ائوزینوفیل، منوسیت و لنفوسیت‌ها می‌باشند. چهار گروه نخست در عمل فاگوسیتور و لنفوسیت‌ها بیشتر در ایمنی اختصاصی سلولار نقش دارند. استرس باعث تغییر در تعداد و ترکیب گلبول‌های سفید خون ماهی می‌شود (۱۹). در این تحقیق میزان گلبول‌های سفید، منوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، MCV ها و MCH ها با افزودن پودر خون نسبت به گروه شاهد افزایش یافتند اما میزان لنفوسیت نسبت به گروه شاهد با کاهش رو به رو شد. معمولا استرس‌های کوتاه مدت باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید و درصد نوتروفیل‌ها و کاهش درصد لنفوسیت‌ها می‌شوند. این پاسخ باعث می‌شود که بدن در حالت ایمنی فعال قرار گرفته و از بروز عفونت‌های ناشی از عوامل بیماری‌زای فرصت-طلب جلوگیری کند. بنابراین افزایش تعداد گلبول‌های سفید می‌تواند در نتیجه یک واکنش محافظتی بدن در طول استرس باشد. همچنین افزایش میزان MCV و MCH به عنوان نشانه‌ای از بی‌نظمی و اختلال در فعالیت اندام‌های خون‌ساز مانند طحال و کبد و بروز مسمومیت و کم خونی تلقی شود (۳۰).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که با توجه به هزینه بالای پودر ماهی، به صرفه بودن و تهیه آسان پودر خون همچنین نتایج مطالعات خونی و میکروسکوپی استفاده از آن در جیره غذایی تا حدود ۷۵ درصد جیره برای گونه مورد نظر قابل تحمل و قابل جایگزینی در ترکیب غذایی می‌باشد.

منابع

1. Aanyu, M., Betancor, M.B., Monroig, O. 2020. The effects of combined phytogenics on growth and nutritional physiology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 519:734867.

16. Hill, J.C., Alam, M.S., Watanabe, W.O., Carroll, P.M., Seaton, P.J., Bourdelais, A.J. 2019. Replacement of menhaden fish meal by poultry by-product meal in the diet of juvenile red porgy. *North American Journal of Aquaculture*, 81(1):81-93.
17. Kabir, K.A., Verdegem, M.C.J., Verreth, J.A.J., Phillips, M.J., Schrama, J.W. 2019. Effect of dietary protein to energy ratio, stocking density and feeding level on performance of Nile tilapia in pond aquaculture. *Aquaculture*, 511:634200.
18. Khodabakhshian, M., Shirali, S., Abdi, R. 2022. Microscopic survey of Balbiani bodies in Yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*), Abu Mullet (*Planiliza abu*), Common carp (*Cyprinus carpio*) and Benni (*Barbus sharpeyi*). *Journal of Animal Research*, 34(4):375-389.
19. Li, Y., Kortner, T.M., Chikwati, E.M., Belghit, I., Lock, E.J., Kroghdahl, A. 2020. Total replacement of fish meal with black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal does not compromise the gut health of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 520:734967.
20. Moallem, Z., Abdi, R., Movahedinia, A., Shirali, S., Salati, A.P. 2015. Gonad histology and gonadosomatic index variations during gonadal development of wild female *Tenualosa ilisha*. *Journal Persian Gulf*, 6(19):53-58.
21. Mohamed, M., Abdi, R., Ronagh, M.T., Salari-Aliabadi, M.A., Basir, Z. 2021. Comparative histomorphology of epidermis of head and caudal peduncle in *Otolithes ruber*, *Huso huso* and *Pangasius hypophthalmus* fish. *Iranian Journal Aquatic Animal Health*, 7(1):10-20.
22. Mohamed, M., Abdi, R., Ronagh, M.T., Salari-Aliabadi, M.A., Basir, Z. 2020. Comparative histomorphometry of dorsal, ventral and lateral skin in macroscopy, microscopy and free scale fish. *Iranian Veterinary Journal*, 16(2):47-53.
- larval development. *Journal of Oceanography*, 6(23):87-92.
9. Basir, Z., Peyghan, R. 2016. The process of kidney gradual changes in, *Tenualosa ilisha* during migration from sea to the river. *Journal of Persian Gulf*, 7(26): 47-56.
10. Basir, Z., Peyghan, R. 2021. The Effect of Replacement of Poultry by-Product with Fish Meal in the Diet of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) on their Intestine Histology. *Journal of Veterinary Research*, 76(4):467-475.
11. Besson, M., Feeney, W.E., Moniz, I., Francois, L., Brooker, R.M., Holzer, G., Metian, M., Roux, N., Laudet, V., Lecchini, D. 2020. Anthropogenic stressors impact fish sensory development and survival via thyroid disruption. *Nature Communications*, 11:1-10.
12. Dastan, V., Abdi, R., Movahedinia, A., Salari-Aliabadi, M.A. 2017. Study of gill and kidney tissue changes in *Tenualosa ilisha* during migration from sea to the Karun and Bahmanshir rivers. *Iranian Fisheries Science Journal*, 25(4):53-62.
13. El-Naby, F.S.A., Naiel, M.A.E., Al-Sagheer, A.A., Negm, S.S. 2019. Dietary chitosan nanoparticles enhance the growth, production performance, and immunity in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 501:82-89.
14. Hasanzadeh, S., Abdi, R., Salari-Aliabadi, M.A., Movahedinia, A., Basir, Z. 2018. Comparative histomorphology of esophagus and intestine in two carnivorous and phytoplankton feeder fish of Persian Gulf. *Journal of Animal Environment*, 10(4):381-388.
15. Hassaan, M.S., Goda, M.A.S., Kumar, V. 2017. Evaluation of the nutritive value of fermented deoiled Physic nut, *Jatropha curcas* seed meal for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, 23(3):571-584.

27. Roshanfekr, K., Abdi, R., Salari-Aliabadi, M.A., Basir, Z. 2017. The impact of spent mushroom compost and fertilizer on esophagus histological indices of some cultured warm water species. *Journal of Animal Biology*, 10(1):23-33.
28. Roshanfekr, K., Abdi, R., Salari-Aliabadi, M.A., Basir, Z. 2018. The impact of spent mushroom compost and fertilizer on changes of intestinal tissue of cultured warm water species. *Journal of Animal Physiology Development*, 4(32):11-25.
29. Wardani, WW., Alimuddin, A., Zairin, M., Setiawati, M., Nuryati, S., Suprayudi, M.A., 2020. Evaluation of cysteamine supplementation in red tilapia (*Oreochromis sp.*) diet: Serum insulin and somatostatin, IGF-1 and GLUT4 genes expression, growth performance, and robustness against stress. *Aquaculture*, 528:735514.
30. Younis, EM., Abdel-Warith, AA., AL-Asgan, NA. 2012. Hematological and enzymatic responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during short and long term sublethal exposure to zinc. *African Journal of Biotechnology*, 11:4442-4446.
23. Moradkhani, A., Abdi, R., Salari-Aliabadi, M.A., Nabavi, S., Basir, Z. 2020. Quantification and description of gut-associated lymphoid tissue in, shabbout, *Arabibarbus grypus* (actinopterygii: cypriniformes: cyprinidae), in warm and cold season. *Acta Ichthyology et Piscatoria*, 50(4):423-432. [In Persian]
24. Nochalabadi, A., Morovvati, H., Abdi, R. 2023. Histomorphometry of Liver and some Blood Factors of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* Exposed to Different Concentrations of Ammonia. *Pollution*, 9(3):1225-1235.
25. Nochalabadi, A., Morovvati, H., Abdi, R. 2023. The Effect of different concentrations of ammonia on histomorphometry of kidney and some blood factors of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Iranian Veterinary Journal*, 19(3):64-71.
26. Pourkhadje, M., Abdi R., Zolgharnein, H., Hoseinzade, Sahafi, H., Morovvati, H. 2014. Effects of different salinity on number and area of chloride cells in gill of juvenile grouper (*Epinephelus coioides*). *Iranian Journal of Fisherise Science*, 23(2):1-10.

Research Article

Study of the Amount of Bony Fish Caught on the Southern Coast of the Caspian Sea in the Cities of Mazandaran Province from 2019 to 2022

Mehran Moslemi^{1*}, Mehdi Sahabi², Abdolghafar Ebadi¹, Somaye Ghasemi Cherati²

1. Department of Agriculture and Natural Resources, Jouybar Branch, Islamic Azad University, Jouybar, Iran

2. Department of Marine Biology, Jouybar Branch, Islamic Azad University, Jouybar, Iran

*Corresponding author: m_moslemi1000@yahoo.com

Received: 16 December 2024

Accepted: 5 February 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1196568

Abstract

The purpose of this research is to determine the species composition of the fly fishing method in Mazandaran province in 1401 and to compare it with the years 1398, 1399 and 1400. Sampling operations were carried out at different stations on a monthly basis, and fish catch statistics were also taken from the entire fisheries of Mazandaran in 2022. The stations studied are: Azadegan Kordkoy-Ashuradeh in Amirabad-Shahid Kargar located west of the Tajan River in Sari-Shahid Madani located in the left bank of the Joibar River-Shahid Ghasemi located in Namak Abrood-Chalus and Shahid Shirodi in Ramsar, which are named after the first three stations respectively. The total amount of catch at these stations in 2022 was 74614 kilograms. It has been that most of them were related to mullet fish. Compared to 5 last year, 2018 had the highest amount of catch and 2021 had the lowest amount of catch. White fish had the highest amount of catch in the past fluctuations. The amount of bony fish caught in Mazandaran province has had many fluctuations in the last five years, which was the lowest in 2021 with 39,768 kg. Expanding the explanations on the results of the graphs shows that the observed differences in catch rates depend on various factors such as environmental conditions, pollution and climate change. Therefore, to improve the management of marine resources and increase fish stocks, it is necessary to reduce pollution and better manage fishing methods.

Keywords: White fish, Mullet, Carp, Catch, Station, Spearfishing.

بررسی میزان صید ماهیان استخوانی در سواحل جنوبی دریای خزر در شهرستان‌های استان مازندران از سال‌های ۱۳۹۸ تا ۱۴۰۱

مهران مسلمی^{۱*}، مهدی سبحانی^۲، عبدالغفار عبادی^۱، سمیه قاسمی چراتی^۲

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

۲- گروه زیست‌شناسی دریا، واحد جویبار، دانشگاه آزاد اسلامی، جویبار، ایران

*مسئول مکاتبات: m_moslemi1000@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۲۶

DOI: 10.60833/ascij.2025.1196568

چکیده

تحقیق حاضر با هدف تعیین ترکیب گونه‌ای روش صیدپره در استان مازندران در سال ۱۴۰۱ و مقایسه آن با سال‌های ۱۳۹۸، ۱۳۹۹ و ۱۴۰۰ می‌باشد. عملیات نمونه‌برداری در ایستگاه‌های مختلف به صورت ماهانه صورت گرفت و آمارهای صید ماهی در سال‌های گذشته نیز از اداره کل شیلات مازندران گرفته شد. ایستگاه‌های مورد مطالعه عبارتند از: آزادگان کردکوی-اشوراده در امیرآباد-شهید کارگر واقع در غرب رودخانه تجن ساری-شهید مدنی واقع در چیکرود جویبار-شهید قاسمی واقع شده در نمک-آبرود چالوس و شهید شیروودی رامسر که به ترتیب ایستگاه‌های اول تا ششم نام گرفتند. کل میزان صید در ایستگاه‌های مزبور در سال ۱۴۰۱ به میزان ۷۴۶۱۴ کیلوگرم بوده است که بیشترین آن مربوط به ماهی کفال بود و نیز در مقایسه با سال‌های گذشته سال ۱۳۹۸ دارای بیشترین میزان صید و سال ۱۴۰۰ دارای کمترین مقدار صید بوده است. ماهی سفید بیشترین میزان صید را در نوسانات گذشته داشته است و ماهی کپور دریایی کمترین میزان صید را دارا بود. در ایستگاه‌های مختلف بالاترین میزان صید مربوط به ایستگاه ۳ بوده است. است ایستگاه ۲ که در محل خروجی بندر امیرآباد قرار دارد به علت آلودگی‌های نفتی و صنعتی ناشی از این بندر میزان صید رابه شکل قابل توجهی پایین آورده است. میزان صید ماهیان استخوانی در استان مازندران در پنج سال اخیر دارای نوسانات متعددی بوده است که در سال ۱۴۰۰ با ۳۹۷۶۸ کیلوگرم کمترین میزان صید را دارا بود. گسترش توضیحات در مورد نتایج نمودارها نشان می‌دهد که تفاوت‌های مشاهده‌شده در میزان صید به عوامل مختلفی مانند شرایط زیست‌محیطی، آلودگی‌ها و تغییرات آب و هوایی وابسته است. از این رو، برای بهبود مدیریت منابع دریایی و افزایش ذخایر ماهیان، ضروری است که آلودگی‌ها کاهش یابد و مدیریت بهتری بر روش‌های صید اعمال شود.

کلمات کلیدی: ماهی سفید، ماهی کفال، ماهی کپور، صید، ایستگاه، تور پره.

مقدمه

می‌باشد (۸). شرکت‌های تعاونی پره موجود در استان مازندران هر ساله حدود ۲۶ لغایت ۲۸ هزار بار پره-کشی انجام می‌دهند. که حاصل آن ۴ تا ۵ هزار تن از انواع ماهیان استخوانی می‌باشد. ماهی سفید و کفال

اکوسیستم دریای خزر یک حوزه آبی محدود و قاره-ای با آبی لب شور است که قسمت اعظم آن را بی-مهرگان کفزی تشکیل می‌دهند. بر اساس نظر قاسم بتوزهای دریای خزر شامل ۷۲۴ گونه و زیرگونه

طلایی حدود ۸۵ درصد صید را دربرگرفته و ۱۵ درصد باقی مانده متعلق به کپور، کلمه، شگ‌ماهیان، سیم، سوف و ... می‌باشد (۴). بدیهی است باتوجه به گونه ماهی و میزان مصرف هر ماهی از ماکروبتوزهای خزری دانستن ترکیب صید و خوراک مورد نیاز آن کمک شایانی در دلایل نوسان ماکروبتوزها در هر منطقه می‌نماید. تحقیقات اخیر نشان داده است که آلودگی‌های صنعتی و نفتی در سواحل دریای خزر، به‌ویژه در مناطق نزدیک به بنادر صنعتی، تأثیرات منفی بر تراکم ماکروبتوزها و در نتیجه کاهش ذخایر ماهیان می‌گردد و نیز سبب نقص این عوامل موجب کاهش تنوع زیستی و تهدید منابع دریایی می‌شوند (۵). نوع تور ساحلی مورد استفاده برای صید ماهیان استخوانی در این منطقه تور پره نام دارد که طول آن بین ۱۱۰۰ تا ۱۵۰۰ متر است. ویژگی‌های تور شامل ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ متر، طول کیسه ۱۲۰ تا ۳۶۰ متر و اندازه چشمه‌ها ۳۰ تا ۳۳ میلی‌متر است. این روش صید با اینکه یکی از مشاغل اصلی ساحل‌نشینان محسوب می‌شود، می‌تواند منجر به صید ضمنی و کاهش ذخایر گونه‌های نابالغ شود (۶). برای کاهش تأثیرات منفی این روش صید، اقدامات حفاظتی متعددی توصیه شده است. این اقدامات شامل افزایش اندازه چشمه تورها برای جلوگیری از صید گونه‌های نابالغ، تعیین مناطق ممنوعه برای صید در فصل‌های تخم‌ریزی، و استفاده از تورهای زیست‌محیطی با طراحی‌های نوین است که اثرات مخرب بر بستر دریا را کاهش می‌دهند (۷). علاوه بر این، آموزش و توانمندسازی صیادان در زمینه مدیریت پایدار منابع می‌تواند نقش مؤثری در بهبود شرایط ذخایر ماهیان ایفا کند (۱). شرکت‌های تعاونی پره در استان مازندران سالانه ۲۶ تا ۲۸ هزار بار پره‌کشی انجام می‌دهند که منجر به صید ۴ تا ۵ هزار تن انواع ماهیان استخوانی می‌شود. تغییرات زیست‌محیطی

ناشی از افزایش آلودگی‌های نفتی و صنعتی، بهره‌برداری بیش از حد، و تخریب زیستگاه‌ها موجب کاهش ذخایر برخی از گونه‌های مهم شده است. این عوامل تأثیرات منفی بلندمدتی بر پایداری منابع دریایی دریای خزر دارند و نیازمند توجه ویژه برای مدیریت و حفاظت از این اکوسیستم حیاتی هستند. ماهی سفید و کفال طلایی حدود ۸۵ درصد از صید را تشکیل می‌دهند و ۱۵ درصد باقی‌مانده شامل ماهی کپور، کلمه، شگ‌ماهیان، سیم و سوف است (۴). اهداف این تحقیق شامل: تعیین ترکیب درصد صید در تورهای پره، بررسی تغییرات صید در ماه‌های مختلف، مقایسه گونه‌های صید شده در سال‌های مختلف و بررسی فراوانی صید در ایستگاه‌های مختلف. باتوجه به کارهای انجام شده بر روی صید با تور پره در سواحل شمالی و جنوبی دریای خزر، مطالعه جدید در سال‌های اخیر که ترکیب گونه‌ای را به طور دقیق نشان دهد ضروری به نظر می‌رسد. لذا در این مطالعه سعی گردید میزان صید به همراه ترکیب‌های گونه‌ای صید شده در سه سال اخیر به طور دقیق مطالعه و آمار آن به بحث گذاشته شود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در کل دریای خزر در قسمت مازندران انجام گرفت که به این منظور چند ایستگاه در این استان انتخاب و پس از نمونه‌برداری و گرفتن آمارهای صید در ماه‌های مختلف، این آمارها با سال‌های قبل از آن که از اداره کل شیلات مازندران گرفته شد مورد مقایسه و سنجش دقیق قرارگرفت. به علت گستردگی تعاونی‌های پره در استان مازندران تعدادی از تعاونی‌های پره آن به عنوان ایستگاه انتخاب گردید. ایستگاه‌های مورد مطالعه عبارتند از: آزادگان کردکوی-آشوراده در امیرآباد- شهید کارگر واقع در غرب رودخانه تجن ساری- شهید مدنی واقع

در چپک‌رود جوبیار-شهید قاسمی واقع شده در نمک ابرود چالوس و شهید شیروودی رامسر که به ترتیب ایستگاه‌های اول تا ششم می‌باشند. این ایستگاه‌ها بر اساس ویژگی‌های زیست‌محیطی، فاصله از منابع آلاینده، و ویژگی‌های اکولوژیکی متنوع انتخاب شدند تا نمونه‌ای جامع از شرایط مختلف صید در استان مازندران فراهم آید. نمونه‌برداری‌ها به صورت ماهانه در ۴ ماه از سال ۱۴۰۱ (از مهر تا دی) انجام گرفت. در هر ایستگاه، تورهای پره به عنوان ابزار اصلی صید استفاده شدند. این تورها به طور متوسط ۱۲۰۰ متر طول داشتند و اندازه چشمه‌ها در قسمت کیسه ۳۰ تا ۳۳ میلی‌متر بود. این تورها برای صید ماهیان استخوانی از جمله ماهی سفید، کفال طلایی، و ماهی کپور طراحی شده‌اند. ماهیان صید شده پس از برداشت، در شرایط استاندارد نگهداری و سپس شمارش و اندازه‌گیری شدند. انتخاب ایستگاه‌ها بر اساس ویژگی‌های اکولوژیکی و زیست‌محیطی آن‌ها صورت گرفت. این ایستگاه‌ها در مناطق مختلف استان مازندران پراکنده بودند و دارای ویژگی‌های متفاوت از نظر عمق، شوری، و تراکم ماکروبتوزها بودند. ایستگاه‌هایی که در نزدیکی منابع آلاینده صنعتی قرار داشتند (مانند ایستگاه ۲ در بندر امیرآباد)، به طور خاص مورد توجه قرار گرفتند تا اثرات آلودگی بر میزان صید بررسی شود. سایر ایستگاه‌ها در مناطق با شرایط طبیعی‌تر انتخاب شدند تا مقایسه‌ای مناسب بین مناطق آلوده و غیرآلوده ایجاد گردد. پس از پایان نمونه‌برداری آمارهای سال نمونه‌برداری با آمارهای گرفته شده از اداره کل شیلات در سال‌های ۱۳۹۸ تا ۱۴۰۱ مورد مقایسه قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: از آزمون مربع کای برای بررسی ترکیب گونه‌ای ماهیان صید شده در ماه‌های مختلف استفاده گردید. برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموکوف-اسمیرنوف استفاده شد. برای

تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای اکسل و SPSS 16 استفاده شد.

نتایج

میانگین صید ماهی سفید (*Rutilus frissi kutum*)

بر اساس سال: با استفاد از آزمون تحلیل واریانس مقایسه شده است که بر این اساس $p = 0/39 > 0/05$ فرضیه برابری میانگین در گروه‌ها تایید شده است و بین گروه‌ها اختلاف معنی‌دار آماری وجود ندارد.

میانگین صید ماهی سفید بر اساس ایستگاه: با استفاد از آزمون تحلیل واریانس مقایسه شده است که بر اساس مقدار $p = 0/05 < 0/042$ فرضیه برابری میانگین در گروه‌ها رد شده است و بین ایستگاه‌ها اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد. با توجه به نمودار میانگین صید ماهی سفید در ایستگاه ۵ بیشترین مقدار و در ایستگاه ۲ کمترین مقدار می‌باشد. میانگین صید ماهی سفید بین ایستگاه (۱ و ۳)، (۱ و ۵)، (۲ و ۳)، (۲ و ۵)، (۳ و ۶) تفاوت معنی‌دار آماری نشان می‌دهد.

میانگین صید ماهی کفال (*Mugil cephalus*)

بر اساس سال: با استفاد از آزمون تحلیل واریانس مقایسه شده است که بر اساس مقدار $p = 0/23 < 0/05$ فرضیه برابری میانگین در گروه‌ها رد شده است و بین گروه‌ها اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد. نمودار ۲ میانگین صید ماهی کفال بر اساس سالهای مختلف را نشان می‌دهد. بیشترین میانگین صید ماهی در سال ۱۴۰۱ و کمترین صید ماهی در سال ۱۳۹۹ می‌باشد. تفاوت بین میانگین صید ماهی کفال بر اساس سال (۱۳۹۸ و ۱۴۰۱)، (۱۳۹۹ و ۱۴۰۱) و (۱۴۰۰ و ۱۴۰۱) معنی‌دار است.

ماهی کفال بر اساس ایستگاه: با استفاد از آزمون تحلیل واریانس مقایسه شده است که بر اساس مقدار $p = 0/43 > 0/05$ فرضیه برابری میانگین در گروه‌ها

تایید شده است و بین ایستگاه‌ها اختلاف معنی‌دار آماری وجود ندارد.

میانگین صید ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) بر اساس سال: با استفاد از آزمون تحلیل واریانس مقایسه شده است که بر اساس مقدار $0/05 > 0/81 = p$ فرضیه برابری میانگین در گروه‌ها تایید شده است و بین گروه‌ها اختلاف معنی‌دار آماری وجود ندارد.

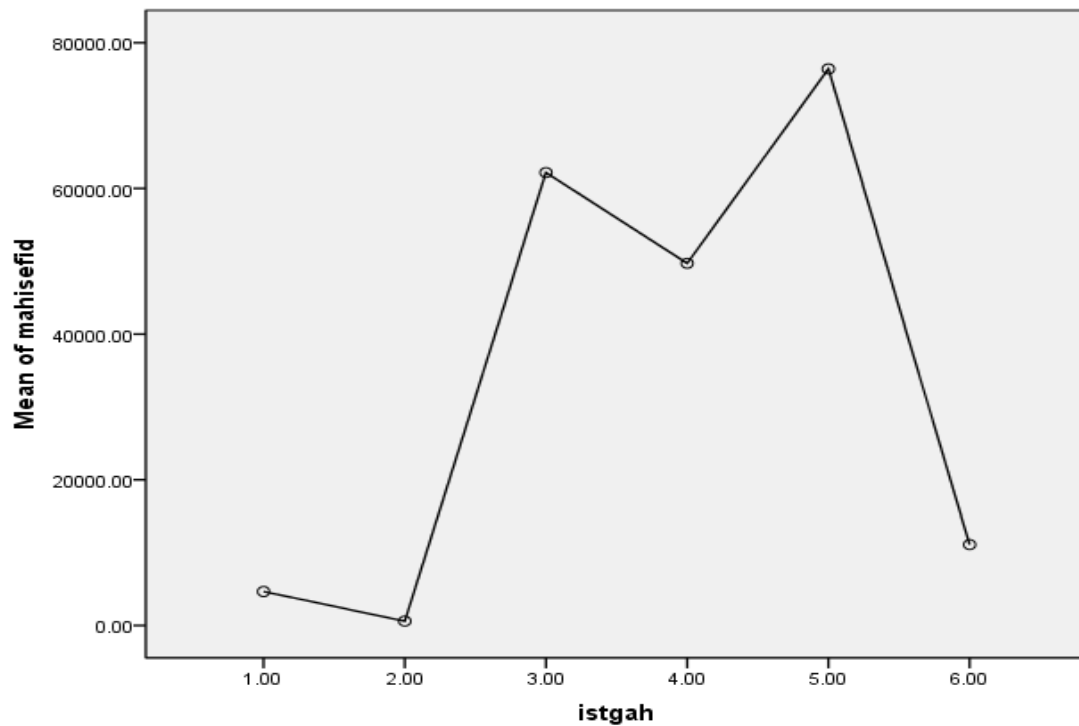
میانگین صید ماهی کپور بر اساس ایستگاه: با استفاد از آزمون تحلیل واریانس مقایسه شده است که بر اساس مقدار $0/05 < 0/000 = p$ فرضیه برابری میانگین در گروه‌ها رد شده است و بین ایستگاه‌ها اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد. با توجه به نمودار ۳ که میانگین صید ماهی کپور بر اساس ایستگاه‌های مختلف را نشان می‌دهد. میانگین صید ماهی کپور در ایستگاه ۳ بیشترین مقدار و در ایستگاه ۶ کمترین مقدار می‌باشد. میانگین صید ماهی کپور بین ایستگاه (۱ و ۳)، (۳ و ۲)، (۲ و ۴)، (۴ و ۵)، (۵ و ۶)، (۶ و ۳)، (۳ و ۱) و (۴ و ۵) تفاوت معنی‌دار آماری وجود دارد.

میانگین صید سایر ماهی‌ها بر اساس سال: با استفاده از آزمون تحلیل واریانس مقایسه شده است که بر اساس مقدار $0/05 > 0/67 = p$ فرضیه برابری

میانگین در گروه‌ها تایید شده است و بین گروه‌ها اختلاف معنی‌دار آماری وجود ندارد.

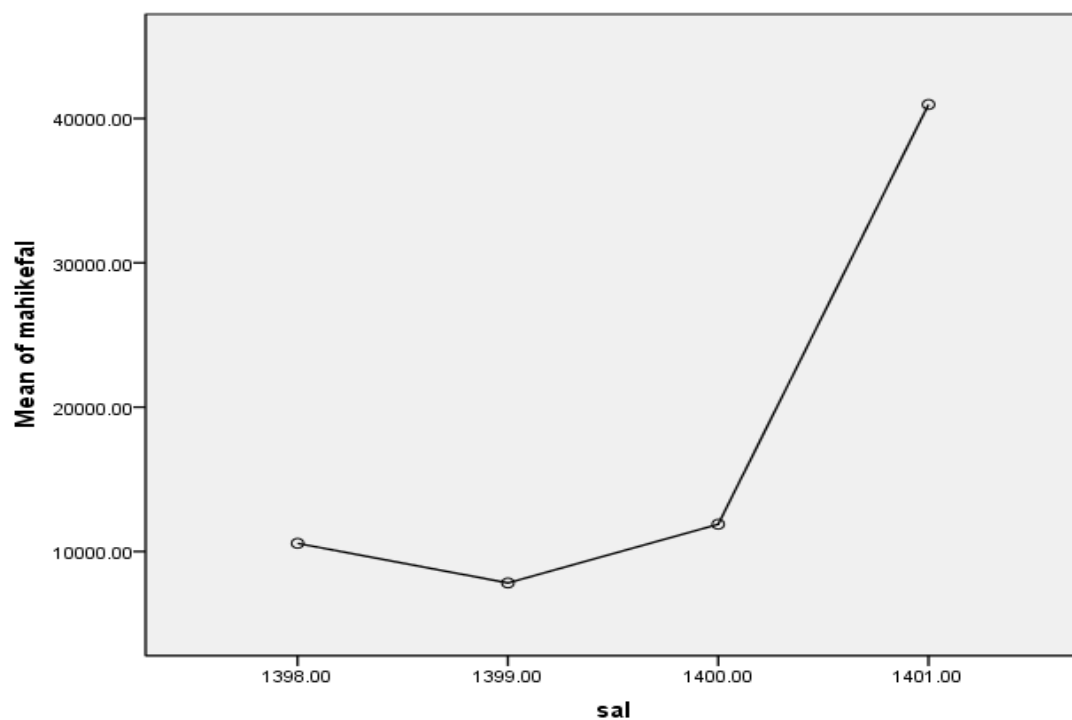
میانگین صید سایر ماهی‌ها بر اساس ایستگاه: با استفاد از آزمون تحلیل واریانس مقایسه شده است که بر اساس مقدار $0/05 < 0/000 = p$ فرضیه برابری میانگین در گروه‌ها رد شده است و بین ایستگاه‌ها اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد. با توجه به نمودار ۴ میانگین صید سایر ماهی‌ها در ایستگاه ۴ بیشترین مقدار و میانگین صید سایر ماهی‌ها در ایستگاه ۶ کمترین مقدار می‌باشد. میانگین صید سایر ماهی‌ها بین ایستگاه (۱ و ۴)، (۴ و ۵)، (۵ و ۲)، (۲ و ۳)، (۳ و ۴) و (۴ و ۵) تفاوت معنی‌دار آماری وجود دارد.

میانگین صید کل ماهی‌ها بر اساس ایستگاه: با استفاد از آزمون تحلیل واریانس مقایسه شده است که بر اساس مقدار $0/05 < 0/009 = p$ فرضیه برابری میانگین در گروه‌ها رد شده است و بین ایستگاه‌ها اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد. با توجه به نمودار ۵ میانگین صید کل ماهی‌ها در ایستگاه ۳ بیشترین مقدار و میانگین صید کل ماهی‌ها در ایستگاه ۲ کمترین مقدار می‌باشد. میانگین صید کل ماهی‌ها بین ایستگاه (۱ و ۳)، (۳ و ۵)، (۵ و ۲)، (۲ و ۴) و (۴ و ۵) تفاوت معنی‌دار آماری وجود دارد.



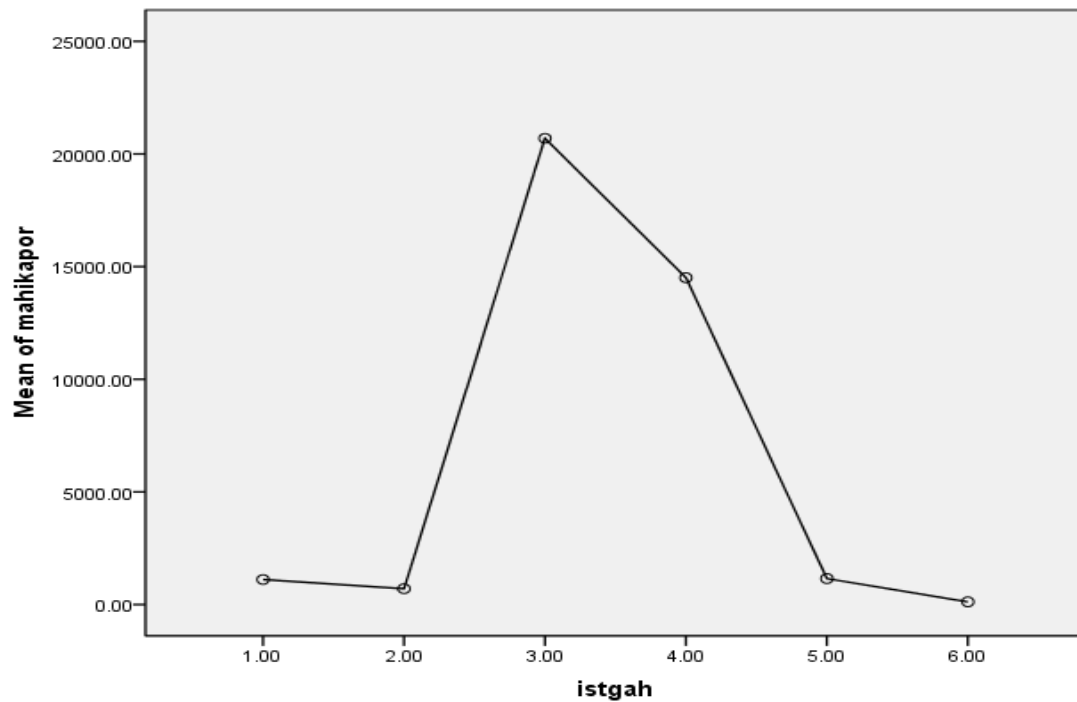
نمودار ۱- مقایسه میانگین صید ماهی سفید بر اساس ایستگاه‌ها

Fig. 1. Comparison of average whitefish catch by stations



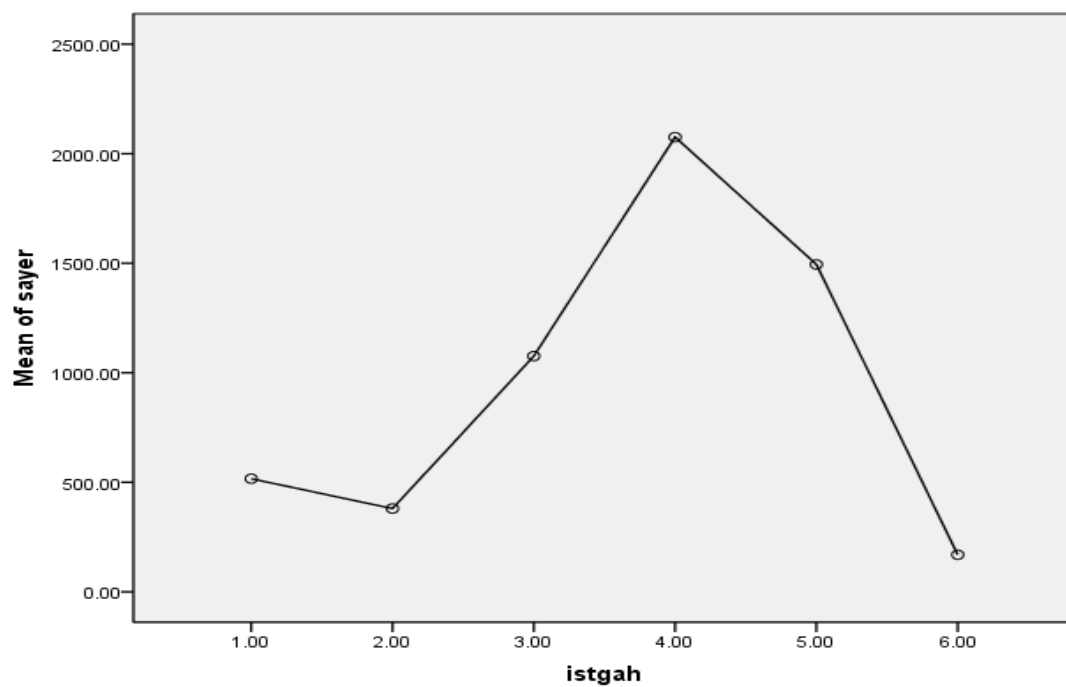
نمودار ۲- مقایسه میانگین صید ماهی کفال (*Mugil cephalus*) بر اساس سال

Fig. 2. Comparison of average mullet (*Mugil cephalus*) catch by year



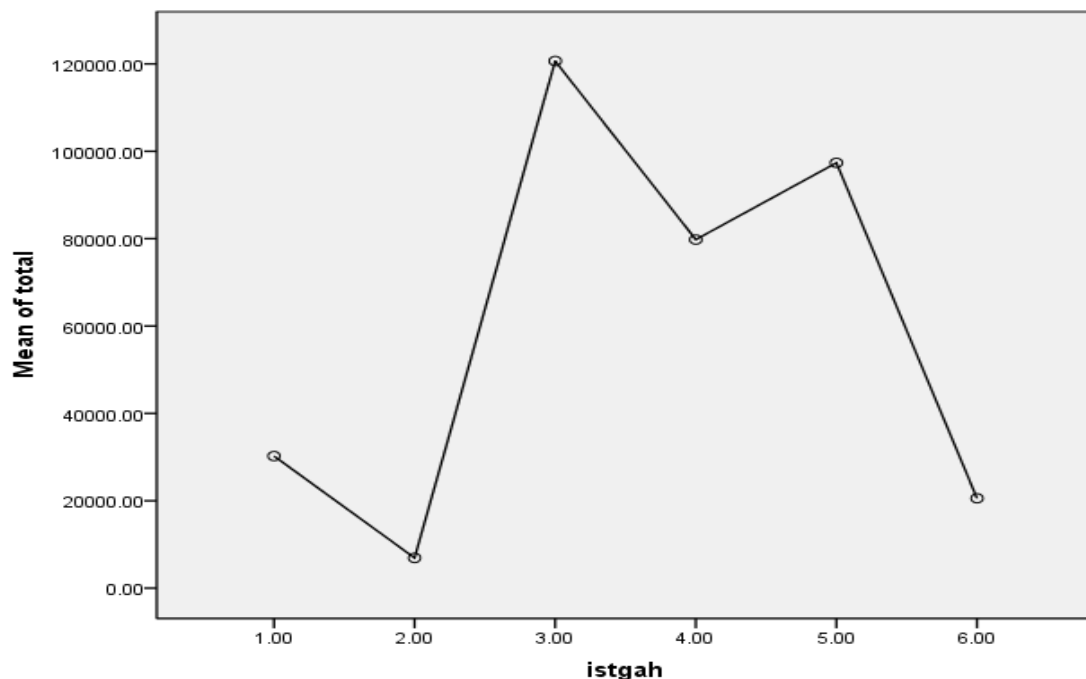
نمودار ۳- مقایسه میانگین صید ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) بر اساس ایستگاه‌ها

Fig. 3. Comparison of average carp (*Cyprinus carpio*) catch based on stations



نمودار ۴- مقایسه میانگین صید سایر ماهی‌ها بر اساس ایستگاه‌ها

Fig. 4. Comparison of average catches of other fish based on stations



نمودار ۵- مقایسه میانگین صید کل ماهی‌ها بر اساس ایستگاه‌ها
Fig. 5. Comparison of average total fish catch by stations

بحث

اقدامات می‌تواند به حفظ تنوع زیستی و بهبود تعادل اکولوژیکی دریای خزر کمک کند. عدم اختلاف معنی‌دار در صید ماهی سفید بر اساس سال می‌تواند نشان‌دهنده ثبات نسبی در ذخایر ماهی سفید در سواحل جنوبی دریای خزر باشد. این ثبات ممکن است به دلیل مدیریت پایدار منابع، تغییرات فصلی و اکولوژیکی، و یا حتی استفاده از تورهای زیست محیطی باشد. همچنین، اثرات آلودگی‌های محیطی به طور مستقیم تأثیر قابل توجهی بر این گونه نداشته است. از سوی دیگر، شرایط محیطی مانند دما و عمق آب می‌تواند بر فعالیت ماهی سفید تأثیر بگذارد، که به همین دلیل نوسانات در طول سال‌ها مشاهده نمی‌شود. نمودار ۱ میانگین صید ماهی سفید بر اساس ایستگاه‌های مختلف را نشان می‌دهد. تغییرات صید ماهی کفال در سال‌های مختلف می‌تواند ناشی از شرایط محیطی خاص در هر سال باشد. به طور

بررسی میانگین صید در سال‌های اخیر نشان داد که تفاوت‌های ثبت شده در مقادیر صید به عواملی همچون شرایط محیطی، آلودگی‌ها و استفاده بیش از حد از ابزار صید مرتبط است. مناطق نزدیک به بندرهای صنعتی، مانند ایستگاه ۲، تحت تأثیر شدید آلودگی‌های نفتی و صنعتی قرار گرفته‌اند که منجر به کاهش چشمگیر صید شده است. به عنوان مثال، آلودگی‌های ناشی از فعالیت‌های صنعتی و شهری باعث کاهش تراکم ماکروبتوزها به عنوان منابع غذایی اصلی ماهیان شده‌اند. مطالعات مشابه نشان داده‌اند که مدیریت بهتر منابع از طریق محدود کردن استفاده از ابزارهای صید غیرمجاز و اعمال قوانین سخت‌گیرانه‌تر می‌تواند تأثیر مثبتی بر ذخایر ماهیان داشته باشد. علاوه بر این، کاهش آلودگی‌های ساحلی با توسعه فناوری‌های پاک و بهبود زیرساخت‌های مدیریت پسماند صنعتی و شهری ضروری به نظر می‌رسد. این

خاص، سال ۱۴۰۱ ممکن است شرایط بهتری از نظر دما، شوری و منابع غذایی برای ماهی کفال فراهم کرده باشد. در مقابل، در سال ۱۳۹۹ احتمالاً تغییرات آب و هوایی یا آلودگی‌های صنعتی تأثیر منفی بر فعالیت ماهی‌ها و ذخایر آن‌ها داشته است. همچنین، استفاده از روش‌های نوین در صید ماهی کفال، مانند تورهای با اندازه چشمه‌های بزرگتر، می‌تواند به کاهش صید ماهیان نابالغ و افزایش ذخایر آن‌ها کمک کرده باشد. تفاوت صید ماهی کپور در ایستگاه‌های مختلف به وضوح به ویژگی‌های زیست‌محیطی ایستگاه‌ها مربوط است. ایستگاه ۳، که در منطقه‌ای با بسترهای شنی و تراکم بالای ماکروبتوزها قرار دارد، شرایط ایده‌آلی برای تجمع ماهیان کپور فراهم کرده است. این ویژگی‌ها به ماهیان کمک می‌کند تا در این ایستگاه‌ها بیشتر تجمع کنند و صید بیشتری از آنجا به دست آید. در مقابل، ایستگاه ۶ به دلیل آلودگی‌های نفتی و صنعتی در نزدیکی بندر امیرآباد، دارای شرایط ضعیف‌تری برای رشد و تکثیر ماهیان است، که به وضوح کاهش صید را در این ایستگاه نشان می‌دهد. تفاوت میانگین صید بر اساس ایستگاه‌ها می‌تواند به تفاوت‌های اکولوژیکی در ایستگاه‌ها مربوط باشد. ایستگاه ۴، که دارای محیط‌های زیست‌محیطی غنی‌تری برای سایر ماهی‌ها است، بیشترین میزان صید را از آن خود کرده است. در مقابل، ایستگاه ۶، به دلیل آلودگی‌های صنعتی و نفتی در منطقه، صید کمتری را در پی داشته است. این نتایج نشان‌دهنده ارتباط مستقیم میان شرایط زیست‌محیطی و تراکم ماهیان است. بررسی میانگین صید کلیه ماهیان در سال‌های اخیر ثابت کرد که علی‌رغم تفاوت صید در سال‌های اخیر و برتری محسوس سال ۱۳۹۸ نسبت به سال‌های دیگر این تفاوت صید معنی‌دار نیست. بدیهی است برتری نسبی سال ۱۳۹۸ نسبت به سال‌های دیگر می‌تواند به آلودگی کمتر دریا در این سال نسبت به

سایر سال‌های باشد که با مطالعات فضلی و غنی نژاد در سال ۱۳۸۲ (۲) و نیز مطالعات آماری سازمان شیلات در سال ۱۳۹۰ مطابقت دارد (۳). کل میزان صید در سال ۱۴۰۱ در ایستگاه‌های مختلف ۷۴،۶۱۴ کیلوگرم بوده است که بیشترین صید مربوط به ماهی کفال بوده است. در مقایسه با سال‌های گذشته، سال ۱۳۹۸ بیشترین میزان صید را داشت و سال ۱۴۰۰ کمترین میزان صید را ثبت کرد. این نوسانات در میزان صید می‌تواند ناشی از چند عامل باشد. در سال ۱۳۹۸، شرایط زیست‌محیطی مانند دمای مناسب، کمبود آلودگی و تراکم بالای منابع غذایی برای ماهیان می‌تواند باعث افزایش صید شده باشد. از سوی دیگر، در سال ۱۴۰۰، با توجه به کاهش ذخایر ماهیان و احتمالاً تغییرات اقلیمی یا افزایش آلودگی‌ها، صید کاهش یافته است. به علاوه، مشکلات زیست‌محیطی مانند آلودگی نفتی، که بیشتر در ایستگاه‌های نزدیک به بنادر صنعتی مشاهده می‌شود، تأثیر زیادی بر کاهش صید داشته است. بررسی میانگین صید در سال‌های اخیر نشان داد که تفاوت‌های ثبت شده در مقادیر صید به عواملی همچون شرایط محیطی، آلودگی‌ها و استفاده بیش از حد از ابزار صید مرتبط است. مناطق نزدیک به بندرهای صنعتی، مانند ایستگاه ۲، تحت تأثیر شدید آلودگی‌های نفتی و صنعتی قرار گرفته‌اند که منجر به کاهش چشمگیر صید شده است. به عنوان مثال، آلودگی‌های ناشی از فعالیت‌های صنعتی و شهری باعث کاهش تراکم ماکروبتوزها به عنوان منابع غذایی اصلی ماهیان شده‌اند (۹). مطالعات مشابه نشان داده‌اند که مدیریت بهتر منابع از طریق محدود کردن استفاده از ابزارهای صید غیرمجاز و اعمال قوانین سخت‌گیرانه‌تر می‌تواند تأثیر مثبتی بر ذخایر ماهیان داشته باشد. علاوه بر این، کاهش آلودگی‌های ساحلی با توسعه فناوری‌های پاک و بهبود زیرساخت‌های مدیریت پسماند صنعتی و شهری

دارای نوسانات متعددی بوده است. پیشنهاد می‌شود تحقیقات بیشتری در مورد تأثیرات ترکیبی آلودگی و تغییرات اقلیمی بر زیستگاه‌های ماهیان و تراکم ماکروبتوزها انجام شود. همچنین اجرای برنامه‌های پایش مستمر و استفاده از فناوری‌های پیشرفته برای شناسایی مناطق حساس می‌تواند به کاهش آسیب‌ها و افزایش بهره‌وری صید کمک کند (۲).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر اهمیت مدیریت پایدار منابع دریایی و نظارت بر روش‌های صید را نشان می‌دهد. کاهش صید ماهیان نابالغ و رعایت فصل‌های ممنوعه صید می‌تواند به حفظ تعادل اکوسیستم دریای خزر کمک کند. گسترش توضیحات در مورد نتایج نمودارها نشان می‌دهد که تفاوت‌های مشاهده‌شده در میزان صید به عوامل مختلفی مانند شرایط زیست‌محیطی، آلودگی‌ها و تغییرات آب و هوایی وابسته است. ایستگاه‌ها با ویژگی‌های خاص محیطی و تغییرات فصلی در تراکم ماهیان، تفاوت‌های قابل توجهی در میزان صید نشان می‌دهند. از این رو، برای بهبود مدیریت منابع دریایی و افزایش ذخایر ماهیان، ضروری است که آلودگی‌ها کاهش یابد و مدیریت بهتری بر روش‌های صید اعمال شود.

منابع

1. Alizadeh M., Jafari H. 2020. Sustainable fishing practices in Caspian Sea coastal areas: Challenges and solutions. *Fisheries Management and Ecology*, 27(5):518-526.
2. Fazli H., Ghaninejad D. 2003. Review of the fisheries management in the Caspian Sea. *Iranian Fisheries Journal*, 32(3):120-135.
3. Iranian Fisheries Organization. 2011. Iranian Fisheries Statistical Yearbook 2000-2010, 60 pages.

ضروری به نظر می‌رسد (۱۱). اقدامات نظیر می‌تواند به حفظ تنوع زیستی و بهبود تعادل اکولوژیکی دریای خزر کمک کند. بدیهی است ایستگاه ۲ که درمحل خروجی بندر امیرآباد قرار دارد به علت آلودگی‌های نفتی و صنعتی ناشی از این بندر میزان صید رابه شکل قابل توجهی پایین آورده است. کل میزان صید در سال ۱۴۰۱ در ایستگاه‌های مربوطه ۷۴۶۱۴ کیلوگرم بوده است و بیشترین صید مربوط به ماهی کفال بوده است و نیز در مقایسه با سال‌های گذشته سال ۱۳۹۸ دارای بیشترین میزان صید بوده است و سال ۱۴۰۰ دارای کمترین میزان صید بوده است. بدیهی است صید بی‌رویه توسط صیادان دام‌گستر و نیز صید ماهیان ریز و نیز شرایط آب و هوایی می‌تواند در میزان صید موثر باشد. ایستگاه ۳ بیشترین میزان صید کل ماهیان را در سال ۱۴۰۱ به خود اختصاص داد. این ایستگاه در منطقه‌ای قرار دارد که از نظر زیست‌محیطی به دلیل وجود بسترهای شنی مناسب و تراکم بالای ماکروبتوزها، شرایط ایده‌آلی برای تجمع ماهیان فراهم کرده است. جریان‌های آبی پایدار و نبود آلودگی‌های صنعتی عمده در این منطقه نیز به افزایش ذخایر ماهیان کمک کرده‌اند. این ویژگی‌ها باعث شده است که ایستگاه ۳ به عنوان یکی از بهره‌ورترین مناطق صید در استان مازندران شناخته شود. این ایستگاه در منطقه‌ای با تراکم بالای ماکروبتوزها قرار دارد. از سوی دیگر، ایستگاه ۲ به دلیل آلودگی‌های نفتی و صنعتی بندر امیرآباد، کمترین میزان صید را ثبت کرد که با مطالعات طهماسبی و مسلمی در سال ۱۴۰۱ (۱۰) هم‌خوانی کامل دارد. ماهی سفید بیشترین میزان صید را در سال‌های گذشته داشته است و ماهی کپور دریایی کمترین میزان صید را دارا بود. در ایستگاه‌های مختلف صید ماهی ایستگاه ۳ دارای بالاترین میزان صید بوده است. میزان صید ماهیان استخوانی در استان مازندران در پنج سال گذشته

8. Qasim F. 1996. The Caspian Benthos. *International Marine Journal*, 22(2):117-125.
9. Rahimzadeh F., Kargar M. 2020. The effect of seasonal and environmental factors on the fishery yield in Caspian Sea. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(16):19807-19815.
10. Tahmasbi F., Moslemi M. 2022, Investigation of spearfishing on macrobenthos of the eastern coasts of Mazandaran Province. Master's Thesis in Marine Biology, Islamic Azad University, Jooybar Branch.
11. Zeynali S., Gharibi S. 2019. The effects of macrofauna biodiversity on fish stocks in the Caspian Sea ecosystem. *Ecological Indicators*, 103:284-290.
4. Khanipour S., Ghaffari H., Zamani N. 2009. The effects of environmental changes on the fish population in the Caspian Sea. *Iranian Journal of Fisheries Science*, 18(1): 47-61.
5. Khodadadi M., Ebrahimi M. 2021. The impact of industrial pollution on fish stocks in the southern Caspian Sea. *Journal of Marine Environmental Studies*, 14(3):233-245.
6. Moghimi M., Fazli H., Khoshbakht R. 2004. Bycatch in Beach Seine Fisheries. *Iranian Journal of Fisheries Science*, 23(4):98-106.
7. Moghim M., Ghaninejad D., Fazli H. 1994. Assessment of the stocks of bony fish of the Caspian Sea coast. *Iranian Journal of Fisheries*, 3(1):35-52.

Research Article

Examining the *in vitro* and *in vivo* Effects of the HL-10 Peptide on the Immune System Modulation and Anticancer Activities of Hela Cancer Cells

Maryam Rezavand, Zahra Setayesh-Mehr*, Fatemeh Hadadi

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran

*Corresponding author: setayeshmehr@uoz.ac.ir

Received: 17 MAy 2024

Accepted: 29 August 2024

DOI: 10.60833/ascij.2025.1120054

Abstract

The present study aimed to assess the anti-cancer properties, immune system regulation, and apoptosis signaling pathway impact of the HL-10 peptide through gene expression analysis of Bcl-2, Cytochrome c, and Bim. HeLa cervical cancer cells were subjected to treatment with HL-10 peptide for both 24 and 48 hours at varying concentrations. To assess the *in vivo* impacts of the HL-10 peptide, BALB-c mice were infected with cervical cancer. Serum levels of IFN- β and IL-4 were subsequently quantified via ELISA. Using real-time PCR, the expression of the genes Bim, Cytochrome c, and Bcl-2 in cells and tumors treated with the HL-10 peptide was analyzed, along with the percentage of viable cells and toxicity. The HL-10 peptide decreases the survival rate of HeLa cells in a way that is dependent on both the concentration and duration of exposure. The HL-10 peptide exhibited an IC₅₀ value of 18.49 μ M after 24 hours and 30.62 μ M after 48 hours. The findings demonstrated that the HL-10 peptide exerted a significant impact on the expression of the investigated genes. The HL-10 peptide upregulated the expression of the BIM and Cytochrome c genes while downregulating the expression of the Bcl-2 gene in cancer cells treated with the HL-10 peptide, both *in vitro* and *in vivo*. The results indicated a significant decrease in the quantity of inflammatory components INF- γ , IL-1 β , and IL-6 in the serum of untreated cancer mice (Sham) compared to untreated healthy mice (NC). Conversely, there was a significant rise in the concentration of IL-4 ($p < 0.05$). The HL-10 peptide likely functions in the modulation of the immune system and in the intrinsic pathways of apoptosis. The HL-7 peptide appears to be a viable and auspicious candidate in the realm of cervical cancer treatment.

Keywords: Peptide, Cancer, Apoptosis, Inflammatory factor, Immune system.



مقاله پژوهشی

بررسی خاصیت ضدسرطانی و تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی سلول‌های سرطانی **Hela** تیمار شده با پپتید **HL-10** در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی

مریم رضاوند، زهرا ستایش مهر*، فاطمه حدادی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران

*مسئول مکاتبات: setayeshmeh@uoz.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۸

DOI: 10.60833/ascij.2025.1120054

چکیده

در این مطالعه خاصیت ضدسرطانی، تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی و همچنین اثر پپتید HL-10 بر مسیر سیگنال‌دهی آپوپتوز با اندازه‌گیری بیان ژن‌های Bcl-2، Cytochrome c و Bim بررسی شد. سلول‌های سرطان دهانه رحم HeLa با پپتید HL-10 در غلظت‌های مختلف و زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. به منظور ارزیابی اثرات درون‌تنی پپتید HL-10، سرطان دهانه رحم در موش balb-c القا شد. سپس، سطوح IFN- γ و IL-4 سرم، با استفاده از ELISA اندازه‌گیری شد. سمیت و درصد بقای سلولی، بیان ژن‌های Bim، Cytochrome c و Bcl-2 سلول‌ها و تومور تیمار شده با پپتید HL-10 به روش Real Time PCR بررسی شد. پپتید HL-10 زنده‌مانی سلول‌های HeLa را به صورت وابسته به غلظت و زمان کاهش می‌دهد. مقدار IC50 برای پپتید HL-10 در زمان ۲۴ ساعت، ۱۸/۴۹ میکرومولار و در زمان ۴۸ ساعت، ۳۰/۶۲ میکرومولار بدست آمد. نتایج نشان داد که پپتید HL-10 تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن‌های مورد مطالعه داشت. پپتید HL-10 باعث افزایش در بیان ژن BIM و Cytochrome c و کاهش بیان ژن Bcl-2 در سلول‌های سرطانی درمان شده با پپتید HL-10 در مقایسه با سلول‌های درمان نشده در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی شد. همچنین، نتایج نشان داد که غلظت فاکتورهای التهابی IFN- γ ، IL-1 β و IL-6 در سرم موش‌های سرطانی بدون تیمار (Sham) نسبت به موش‌های سالم بدون تیمار (NC) کاهش معنادار، درحالی‌که غلظت IL-4 افزایش نشان داد ($p < 0/05$). احتمالاً پپتید HL-10 در مسیرهای ذاتی آپوپتوز و همچنین در تنظیم سیستم ایمنی نقش دارد. به نظر می‌رسد پپتید HL-7 می‌تواند یک کاندید مناسب و امیدوارکننده برای درمان سرطان دهانه رحم باشد.

کلمات کلیدی: پپتید، سرطان، آپوپتوز، فاکتور التهابی، سیستم ایمنی.

مقدمه

تحقیقات نشان داده است که قسمت‌های مختلف بدن عقرب یا سموم آنها، جهت درمان بسیاری از بیماری‌ها از قبیل سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۳). سموم عقرب‌ها دارای ترکیبات مختلفی از جمله، پپتیدها، یونها، مواد معدنی و آنزیم‌ها می‌باشند (۳۵). پپتیدهای فعال زیستی موجود در سموم عقرب‌ها را به

عقرب‌ها، گروهی سازش‌یافته از حیوانات سمی هستند که از ۱۵۰۰ میلیون سال در کره زمین زندگی می‌کرده‌اند. عامل اصلی بقای آنها، تولید سموم قوی است که برای کشتن یا فلج کردن طعمه و شکارچیان مورد استفاده قرار می‌دهند (۱۰). سموم عقرب‌ها از دیرباز است که در پزشکی سنتی کاربرد دارد.

دو دسته کلی پپتیدهای دارای پل دی‌سولفیدی (DBPs) و پپتیدهای فاقد پل دی‌سولفیدی (NDBPs) تقسیم می‌کنند (۳۴). نوروتوکسین‌ها که جز پپتیدهای دارای پل دی‌سولفیدی می‌باشند، قادرند تا عملکرد انواع کانال‌های یونی هدف در سلول‌ها را اصلاح یا مسدود سازند. بنابراین، برخی از نوروتوکسین‌ها، به عنوان هدف درمانی برای توسعه دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند که دارای فعالیت‌های ضد میکروبی، ضد مالاریایی، سرکوب‌کننده سیستم ایمنی و ضد سرطانی می‌باشند (۲۳). پپتیدهای بدون پل دی‌سولفیدی جز مهمی از سموم عقرب‌ها می‌باشند، در عین حال درصد کمی از پپتیدها را شامل می‌شوند. از این رو، توجه محققین، معمولاً به سمت پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین تغییر یافت. با توجه به کشف فعالیت بیولوژیکی متنوع، NDBPs را می‌توان به عنوان کاندیدای دارویی امیدبخش در آینده مورد بررسی بیشتر قرار داد (۳۴). در دهه های اخیر، پیشرفت قابل توجهی در تشخیص و روش درمان بیماری سرطان وجود داشته است. با این حال، عدم انتخاب پذیری مناسب برای سلول‌های توموری و بنابراین هدفگیری غیراختصاصی سلول‌های سالم با اثرات جانبی زیان بار، به طور جدی اثر داروهای شیمی درمانی موجود در بازار را محدود میکند (۲۴و۹). پپتیدهای ضد سرطانی، ترکیبات مهمی برای طراحی داروهای هدفگیری توموری و متعاقباً جلوگیری از توسعه و پیشرفت سرطان می‌باشند (۱۴)، (۱۶). مطالعات نشان داده اند که پپتیدهای استخراجی از سم عقرب بواسطه توقف چرخه سلولی، تنظیم کانال‌های یونی، مهار تکثیر و رگ زایی و همچنین القای آپوپتوز به درمان سرطان کمک می‌کنند (۱۵). به عنوان مثال، پپتیدی به نام بنگالین (Bengalin) استخراجی از سم عقرب سیاه هندی (*Heterometrus bengalensis*) سبب مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی از جمله

لوسمی انسانی (U937) گردید، در صورتی‌که هیچ اثر سمیت معناداری بر سلول‌های لنفوسیت های طبیعی انسان نداشت. مشاهدات بیشتر نشان داد که پپتید بنگالین خواص ضد سرطانی خود را از طریق افزایش بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹، افزایش بیان نسبت Bax به Bcl-2 و افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری اعمال کرد (۶). بررسی اثر سم عقرب *Buthus martensii* Karsch بر سلول‌های گلیوما در شرایط درون تنی و برون تنی نشان داده که سم جدا شده منجر به القای آپوپتوز در رده سلولی گلیوما U251-MG در شرایط برون تنی شد، همچنین رشد سلول‌های تومور گلیوما را در درون بدن سرکوب کرد (۲۱). در شرایط طبیعی، سیستم ایمنی بدن سبب شناسایی و از بین بردن سلول‌های سرطانی در ابتدای شکل‌گیری می‌شود. بنابراین، بررسی وضعیت سیستم ایمنی و عوامل موثر بر آن در محیط شیمیایی سلول‌های توموری نقش بسیار مهمی در تشخیص، پیشرفت و درمان سرطان دارد. در این راستا، مطالعات نشان داده اند که سایتوکاین‌ها با تنظیم پاسخ ایمنی قادر به ایجاد یا مهار بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان هستند (۱۵). پاسخ ایمنی، یکی از حیاتی‌ترین پاسخ‌های بدن هنگام مواجهه با انواع تومورها است که این قبیل واکنش‌های طبیعی، شامل ترشح سایتوکاین‌هایی مانند اینترفرون گاما (γ -INF) و اینترلوکین ۴ (IL-4) می‌باشد (۲۲). افزایش بیان IL-4 در افزایش تکثیر و رشد سلول‌های توموری و همچنین متاستاز آنها در بدن نقش دارد. از طرفی دیگر، سایتوکاین دیگری به نام γ -INF، یک عامل متوقف‌کننده رشد سلول‌های توموری، تقویت فعالیت ماکروفاژها و سلول‌های کشنده طبیعی است (۲). در انواع سرطان‌ها بیان ژن‌های مرتبط با کانال‌های یونی کنترل می‌گردد. تنظیم بیان کانال‌های یونی منجر به تغییر مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی و متعاقباً تنظیم فعالیت سلول‌های ایمنی می‌شود (۱۵).

سم عقرب *Tityus serrulatus* فعالیت تنظیم‌کنندگی ایمنی ماکروفاژها را بر عهده دارد. تزریق سم عقرب به موش سبب افزایش بیان فاکتور نکروز توموری آلفا ($TNF-\alpha$) و اینترلوکین‌ها ($IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-8$ و $IL-10$) در ماکروفاژها می‌شود (۲۰). همچنین برخی از پپتیدهای فاقد پیوند دی‌سولفیدی مانند پارابوتوپورین (Parabutopurin) و اپیستوپورین (Opistopurin)، علاوه بر خواص ضد قارچی و ضدباکتریایی دارای فعالیت تنظیم‌کننده سیستم ایمنی نیز هستند. این پپتیدها قادر به فعال کردن اگزوسیتوز یا مهار تولید سوپراکسید در گرانولوسیت‌ها هستند (۳۱). بنابراین، سم عقرب و اجزای آن، تأثیر بسزایی در تنظیم سیستم ایمنی دارند و تحقیقات بیشتر در این زمینه می‌تواند سم عقرب را به عنوان یک عامل مهم در درمان بیماری‌های مرتبط با سیستم ایمنی و سرطان معرفی کند (۱۸). به دلیل وجود پپتیدهای فعال زیستی در سم عقرب، کشف فعالیت بیولوژیکی پپتیدها به ویژه در درمان سرطان و متعاقباً معرفی آن‌ها به عنوان عوامل امیدوارکننده در ساخت داروها، مطالعات اخیر به سمت بررسی بیشتر این نوع ترکیبات پیش رفته است. در مطالعات قبلی‌مان، خواص ضدسرطانی پپتید HL-10 بر رده‌های سلول سرطانی A549، MCF-7 و HepG2 بررسی شد (۲۶، ۲۷). در مطالعه حاضر، اثر پپتید HL-10 بر رده سلول سرطانی دهانه رحم HeLa در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

کشت و نگهداری سلول: پس از خریداری سلول‌های سرطانی دهانه رحم HeLa از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 حاوی FBS ده درصد و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتوزوسین یک درصد کشت داده شدند. فلاسک‌های حاوی سلول در ۳۷ درجه

سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت انکوبه شدند. پاساژهای سلول‌ها در دوره‌های زمانی ۴۸ ساعت و متعاقباً جایگزین محیط کشت سلولی تازه انجام گردید، تا زمانیکه تراکم سلول‌ها به ۷۰ درصد رسید.

اندازه‌گیری زنده‌مانی سلول: برای بررسی درصد زنده‌مانی سلول‌ها، از روش MTT استفاده شد. ابتدا سلول‌ها جهت چسبیدن به کف فلاسک محیط کشت و ایجاد شرایط پایدار، به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سپس میزان $10^6 \times 5$ سلول شمارش و به چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای اضافه شدند. تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ میکرومولار پپتید HL-10 در زمان‌های مختلف ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. پس از اضافه شدن محلول MTT (۱۰ میکرولیتر)، پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در تاریکی انکوبه شدند و پس از اضافه شدن DMSO (۱۵۰ میکرولیتر) به هر چاهک، میزان جذب پلیت‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. درصد زیست‌پذیری سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر اندازه‌گیری شد: $Cell viability (\%) = [A] sample / [A] control \times 100$ در این رابطه؛ $[A] sample$ میزان جذب نمونه و $[A] control$ میزان جذب کنترل است.

حیوانات: تمامی آزمایشات بر روی موش‌های ماده نژاد balb/c (تهیه شده از موسسه انستیتو پاستور کرج)، در سن ۸-۶ هفته‌ای و محدوده وزنی ۲۵-۳۰ گرم انجام شد. کلیه مراحل آزمایشات درون‌تنی توسط کمیته اخلاق دانشگاه زابل تایید شد (IR.UOZ.REC.1401.012). موش‌ها تحت شرایط کنترل شده از لحاظ نور، دما و رطوبت در مرکز حیوانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل نگهداری شدند.

ایجاد مدل سرطان دهانه رحم در موش: به منظور القای مدل توموری سرطان گردن رحم در موش، از رده سلول سرطانی دهانه رحم HeLa استفاده شد که به میزان ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی در سالین استریل (5×10^6 سلول) به صورت زیر پوستی به ناحیه فلانک راست هر موش تزریق شد (۲۹). پس از گذشت ۱۰ روز و براساس حجم تومور، ۲۴ سر موش به چهار گروه ($n=6$) تقسیم شدند: گروه کنترل منفی (NC: Negative Control) (گروه موش‌های سالم که تحت عمل جراحی قرار نگرفتند و فقط سالین نرمال دریافت کردند)؛ گروه شام (sham) (گروه موش‌هایی که بدون دریافت هیچ نوع تیماری تحت عمل جراحی قرار گرفتند و فقط سالین نرمال دریافت کردند)؛ و گروه‌های درمانی (که دریافت‌کننده پپتید HL-10 با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بودند). تمام تیمارها به مدت سه هفته هر روز به صورت داخل صفاقی تزریق شدند.

سنجش فاکتورهای التهابی در سرم: تقریباً ۵ هفته پس از القای سرطان، موش‌ها با زایلازین (۱۰ میلی-گرم/کیلوگرم) و کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند. پس از باز کردن قفسه سینه با کمک قیچی و پنس استریل، با استفاده از سرنگ انسولین عمل خون‌گیری از قلب انجام شد. پس از انتقال خون به میکروتیوپ، نمونه مورد نظر به مدت ۵ دقیقه و با دور ۱۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی جمع‌آوری و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کیت‌های ELISA برای اندازه‌گیری $IL-1\beta$ ، $IL-6$ ، $IL-4$ ، $IFN-\gamma$ طبق پروتکل سازنده استفاده شد.

تهیه سلول‌ها از بافت توموری جهت سنجش بیان ژن‌های Bcl-2، Bim و Cyt c: تومور جداسازی شده، در ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS با استفاده از کف سرنگ ۲ میلی‌لیتری خرد شد

و تجمعات بافتی خارج گردید. برای تهیه سوسپانسیون سلولی، بافت تومور از یک شبکه سیمی به قطر ۰/۲ میلی‌متری عبور داده شد. پس از افزودن ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه (۳۰۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی FBS ۱۰ درصد حل گردید. پس از شمارش و سنجش میزان زنده‌مانی سلول‌ها با رنگ‌آمیزی، از هر نمونه، سوسپانسیون سلولی با غلظت 1×10^6 سلول تهیه شد. این سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه ای به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور کشت داده شدند. سپس مایع رویی جمع‌آوری و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA: برای انجام میزان بیان ژن، از روش Real time PCR استفاده شد. ابتدا سلول‌ها با غلظت $1 \times 10^6 \times 4$ سلول در محیط مکمل RPMI1640 کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌های HeLa، با غلظت‌های ۱۵ و ۲۵ میکرومولار از پپتید HL-10 به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. سپس جداسازی RNA توسط کیت Denazist از آن، Co. Mashhad، Iran از سلول‌ها استخراج گردید. پس از آن، کیت Kiagene Fanavar، Tehran، Iran برای سنتز cDNA استفاده شد. ابتدا مخلوطی شامل ۳ میکرولیتر RNA کل، ۱ میکرولیتر پرایمر الیگو dT و ۱۰ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز تهیه گردید و به دنبال آن، محلول حاصله به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. به مخلوط ایجاد شده، ۲ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۶ میکرولیتر بافر PCR 5X و یک میکرولیتر آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس اضافه شد و به ترتیب انکوباسیون با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در زمان ۵ دقیقه و دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در زمان ۵ دقیقه انجام شد. در نهایت

سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه تنظیم گردید. از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. توالی پرایمرها برای آنالیز Real time PCR در جدول ۱ آمده است.

آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPadPrism و آزمون ANOVA و Tuckey تجزیه و تحلیل شدند نمودارها با نرم‌افزار GraphPadPrism رسم شدند. سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

cDNA ساخته شده از RNA، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و ذخیره گردید.

Real time PCR: واکنش RT-PCR، در دستگاه Real Time PCR (مدل X960B) انجام شد. در هر واکنش، محلول‌های مورد استفاده شامل ۱۰ میکرولیتر SYBR Green PCR master mix، یک میکرولیتر cDNA، ۳ میکرولیتر پرایمر و ۶ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بودند و زمان و دمای مناسب برای انجام واکنش‌ها، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

Table 1- Sequences of primers used in this study

Genes	Primer sequences 5' 3'
GAPDH	Forward: AGCCAAAAGGGTCATCATC Reverse: TAAGCAGTTGGTGGTGCAGG
Bcl-2	Forward: GGACCCAGAATACCAAGTGCAG Reverse: GTTGCTGGTGAGTGTGCATTCC
CytC	Forward: AAGGGAGGCAAGCACAAGACTG Reverse: CTCCATCAGTGTATCCTCTCCC
Bim	Forward: TAAGTTCTGAGTGTGACCGAGA Reverse: GCTCTGTCTGTAGGGAGGTAGG

نتایج

درصد زیست‌پذیری سلولی و محاسبه IC50: نتایج سنجش MTT نشان داد که ارتباطی معکوس میان درصد زنده مانی سلول‌های زنده سرطانی HeLa تیمار شده با غلظت‌های مختلف پپتید HL-10 و سلول‌های بدون تیمار وجود داشت، بطوریکه با افزایش غلظت پپتید HL-10، درصد سلول‌های زنده تیمار شده کاهش نشان داد ($p < 0/05$). مقدار IC50 برای پپتید HL-10 در زمان ۲۴ ساعت، ۱۸/۴۹ میکرومولار و در زمان ۴۸ ساعت، ۳۰/۶۲ میکرومولار بدست آمد (شکل ۱).

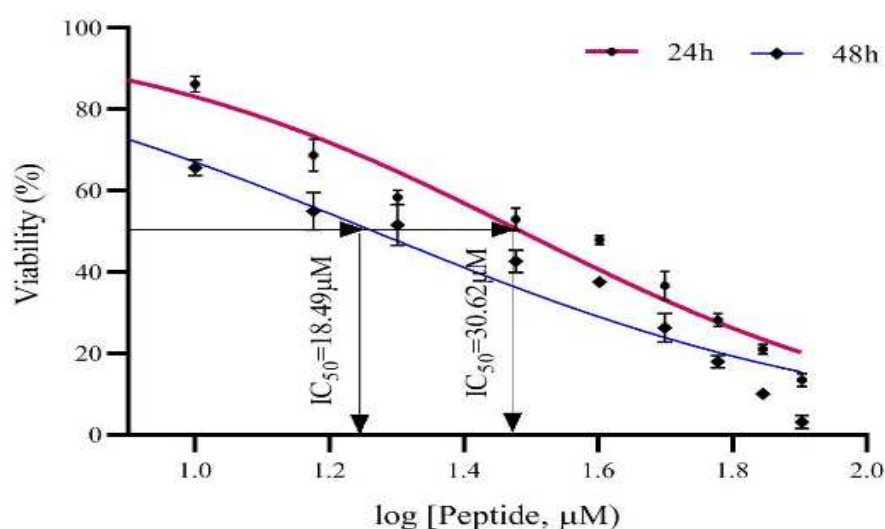
بیان ژن‌های Bcl-2، Bim و CytC: شکل دو، بیان ژن‌های Bcl-2، Bim و CytC در سلول‌های سرطانی دهانه رحم Hela تیمار شده با غلظت‌های ۱۵ و ۲۵

میکرومولار در شرایط برون‌تنی و غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پپتید HL-10 را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از این مطالعه در مطالعات برون‌تنی نشان داد که پپتید HL-10، اثر معناداری بر روی بیان ژن‌های Bcl-2، Bim و CytC داشت، بدین صورت که پپتید HL-10، سبب افزایش معنادار بیان ژن Bim و CytC در سلول‌های سرطانی تیمار شده نسبت به سلول‌های بدون تیمار شد، در حالیکه تغییرات بیان ژن برای Bcl-2 کاهشی بود ($p < 0/05$). همچنین نتایج مطالعات درون‌تنی نشان داد که بیان ژن‌های Bim و CytC در گروه موش‌های سرطانی تیمار شده با دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، افزایش داشت، در صورتی‌که بیان ژن Bcl-2 کاهش معناداری نشان داد

سطوح سرمی IL-4 در موش‌های سرطانی تیمار شده با ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پپتید HL-10 نسبت به موش‌های سرطانی بدون تیمار (Sham)، کاهش معناداری داشت ($p < 0/001$). میان سطوح این سایتوکاین در موش‌های سرطانی تیمار شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پپتید HL-10 در مقایسه با موش‌های سالم بدون تیمار (NC) تفاوت معناداری دیده نشد ($p < 0/05$). نتایج نشان داد که غلظت IL-1 β و 6 در سرم موش‌های سرطانی بدون تیمار نسبت به موش‌های سالم بدون تیمار (NC) کاهش معناداری نشان داد. میان سطوح IL-6، در موش‌های سرطانی تیمار شده با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پپتید HL-10 در مقایسه با موش‌های سالم بدون تیمار (NC) تفاوت معناداری دیده نشد ($p < 0/05$). همچنین میان سطوح IL-1 β موش‌های سرطانی تیمار شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پپتید HL-10 در مقایسه با موش‌های سالم بدون تیمار (NC) تفاوت معناداری دیده نشد ($p < 0/05$).

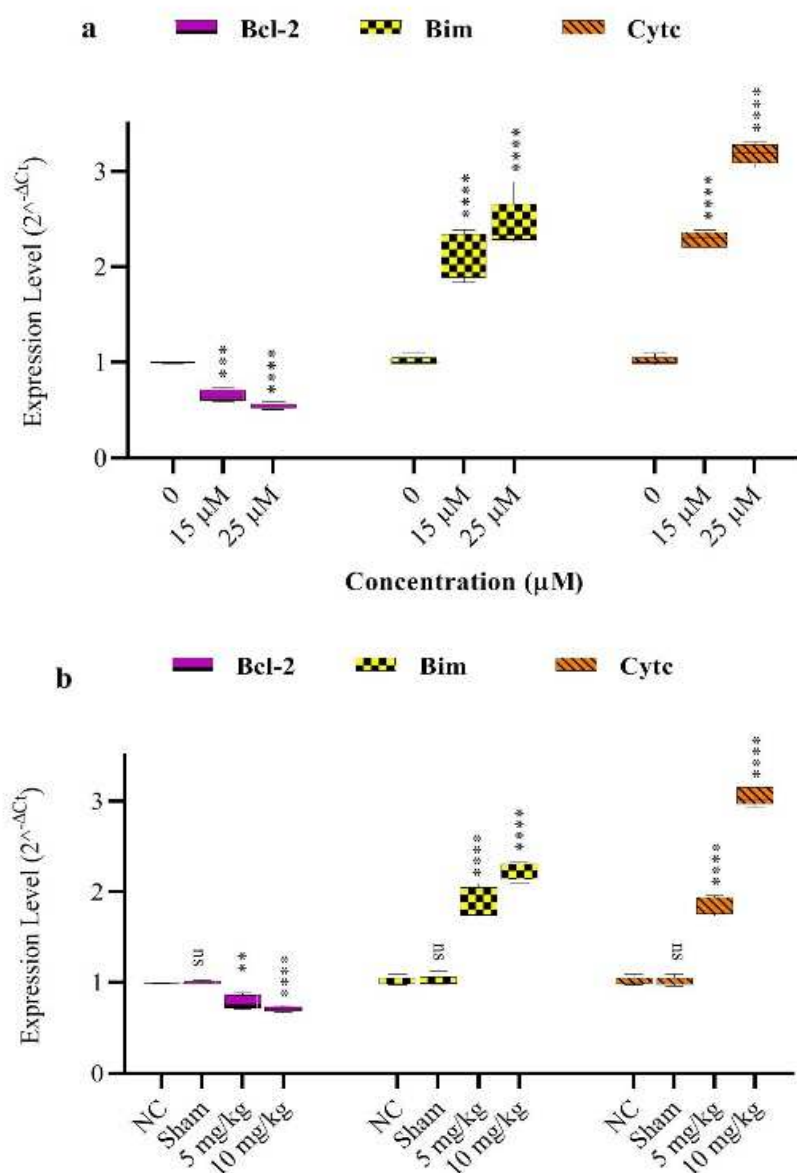
($p < 0/05$). میان بیان هر سه ژن مورد مطالعه گروه موش‌های سرطانی بدون تیمار (Sham) در مقایسه با گروه موش‌های سالم بدون تیمار (NC) اختلاف معناداری دیده نشد ($p < 0/05$).

فاکتورهای التهابی: همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، مقادیر IFN- γ در سرم موش‌های سرطانی بدون تیمار (Sham) و موش‌های سرطانی تیمار شده با دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پپتید HL-10 در مقایسه با موش‌های سالم بدون تیمار کمتر بود. سطوح این فاکتور میان سرم موش‌های سرطانی تیمار شده با دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پپتید HL-10 در مقایسه با موش‌های سالم بدون تیمار (NC) تفاوت معناداری نداشت ($p < 0/05$). در حالیکه سطوح IFN- γ موش‌های سرطانی بدون تیمار (Sham) در مقایسه با موش‌های سالم بدون تیمار (NC) کاهش معناداری نشان داد ($p < 0/001$). نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت IL-4 در سرم موش‌های سرطانی بدون تیمار (Sham) نسبت به موش‌های سالم بدون تیمار (NC) افزایش معناداری نشان داد.



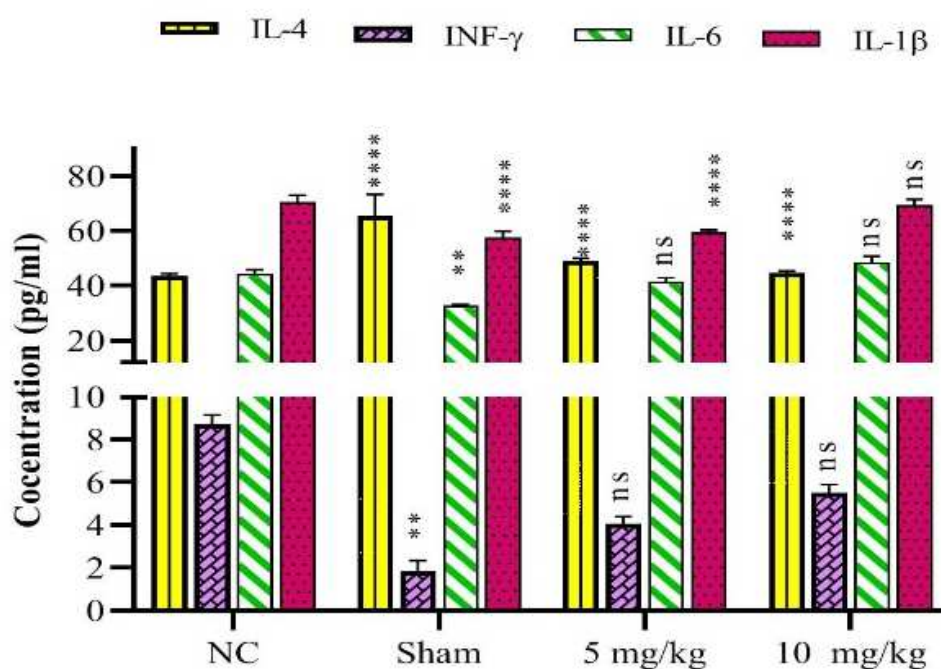
شکل ۱- منحنی دوز پاسخ حاصل از تیمار سلول‌های سرطانی دهانه رحم HeLa با غلظت‌های مختلف پپتید HL-10 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت.

Fig. 1. The dose-response curve shows the impact of HL-10 peptide treatment at varying concentrations on HeLa cervical cancer cells at the 24- and 48-hour time points.



شکل ۲- نتایج Real time PCR ژن های BCL-2، Bim، و Cyt c در سلول‌های سرطانی دهانه رحم HeLa (a) و سلول‌های بافت تومور در مدل موش‌های balb-c دارای سرطان دهانه رحم تیمار شده با پپتید HL-10، ۰، ۱۵ و ۲۵ میکرومولار: میزان بیان ژن‌های Bcl-2، Bim و Cyt c در سلول‌های سرطانی دهانه رحم HeLa تیمار شده با غلظت‌های ۰، ۱۵ و ۲۵ میکرومولار پپتید HL-10: NC: کنترل منفی (گروه موش‌های سالم تیمار نشده)؛ Sham: گروه شم (گروه موش‌های سرطانی تیمار نشده)؛ ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (گروه موش‌های سرطانی تیمار شده با پپتید HL-10 در دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم). ****، بیانگر اختلاف معنادار میان بیان ژن‌های مذکور و نمونه کنترل بدون تیمار است ($p < 0.0001$).

Fig. 2. The real-time PCR findings of the BCL-2, Bim, and Cyt c genes in HeLa cervical cancer cells (a) and tumor tissue cells in the balb-c mice model with cervical cancer treated with HL-10 peptide are as follows: The expression levels of the Bcl-2, Bim, and Cyt c genes in HeLa cervical cancer cells were measured after treatment with doses of 0, 15, and 25 μM of the HL-10 peptide. NC refers to the negative control, which is a group of healthy mice that were not treated. Sham refers to the Sham group, which is a group of cancer mice that were also not treated. The 5 and 10 mg/kg groups are groups of cancer mice that were treated with the HL-10 peptide at two different concentrations: 5 mg/kg and 10 mg/kg. **** denotes a significant difference in the expression of the specified genes compared to the control sample that did not receive any treatment ($p < 0.0001$).



شکل ۳- سطوح سرمی $IL-4$ ، $INF-\gamma$ ، $IL-6$ و $IL-1\beta$ پس از القای سرطان با رده سلولی Hela در گروه‌های تیمار شده با پپتید HL-10. NC: کنترل منفی (گروه موش‌های سالم تیمار نشده با پپتید HL-10)؛ Sham: شام (گروه موش‌های سرطانی تیمار نشده با پپتید HL-10)؛ ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (گروه موش‌های سرطانی و تیمار شده با پپتید HL-10 در دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم). $p < 0.01$ و $p < 0.0001$ نشان‌دهنده وجود اختلاف معنادار میان بیان ژن‌ها میان سلول‌های سرطانی تیمار شده با پپتید HL-10 در مقایسه با کنترل بدون تیمار است.

Fig. 3. In groups treated with HL-10 peptide, serum concentrations of INF-, IL-4, IL-6, and IL-1 β were measured subsequent to cancer induction using the Hela cell line. NC represents the negative control, which consisted of healthy mice that were not exposed to the HL-10 peptide. Sham denotes the group of cancer mice that were not treated with the HL-10 peptide. The doses of HL-10 peptide administered to the cancer mice were 5 and 10 mg/kg. Significant differences in gene expression were observed between cancer cells treated with HL-10 peptide and untreated control cells, as indicated by ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.0001$).

بحث

BmKn-2 استخراج شده از سم عقرب را بر سلول‌های سرطانی و طبیعی دهانی بررسی کردند. نتایج تیمار سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت توسط BmK-2 نشان داد که پپتید مذکور، از طریق القاء فرایندهای آپتوز، دارای اثرات سمیت سلولی قوی بر سلول‌های سرطانی دهان بود. همچنین نتایج آنها نشان داد که در غلظت‌هایی پپتید سبب مرگ سلول‌های سرطانی می‌شوند. در همان غلظت‌ها، زیست‌پذیری سلولی و القاء آپتوز در سلول‌های طبیعی، تحت تأثیر قرار نگرفت (۲۵). القاء آپتوز توسط پپتید BmK-2 در سلول‌های سرطانی، در ارتباط با فعال‌سازی بیان ژن

یکی از راهبردهای مهم در درمان سرطان، حذف هدف‌مند سلول‌های سرطانی از طریق القاء آپتوز است (۴، ۵). در این مطالعه، اثر پپتید HL-10 بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم در غلظت‌های مختلف و در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. نتایج بیانگر کاهش زنده‌مانی و افزایش سمیت سلول‌های سرطانی تیمار شده با پپتید HL-10 در یک روند وابسته به دوز و زمان بود. مقدار IC_{50} برای پپتید HL-10 در زمان ۲۴ ساعت، ۱۸/۴۹ میکرومولار و در زمان ۴۸ ساعت، ۳۰/۶۲ میکرومولار بدست آمد. Satitmanwivat و همکاران (۲۰۱۶)، اثر پپتید

فعال‌سازی مسیر بیرونی آپتوز سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی دهانه رحم شدند (۱۲). در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شد که اسکولوپین ۲ (Scolopin-2)، پپتید کاتیونی استخراجی از سم هزارپا، اثرات ضدسرطانی داشت. بررسی‌های بیشتر در این رابطه نشان داد که این پپتید مسیر آپتوز درونی وابسته به میتوکندری را در سلول‌های سرطانی Hela تحریک کرده و درصد زنده مانی سلولی را با روشی وابسته به دوز کاهش داد (۳۲). نتایج تحقیقی نشان داد که پپتید لیکوزین-۱ (Lycosin-1)، استخراجی از سم عنکبوت *Lycosa singoriensis*، با کانفورماسیون آلفا هلیکال خطی خود سبب مهار رشد سلول‌های توموری در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی گردید. لیکوزین ۱ با غلظت ۴۰ میکرومولار بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها را در رده سلول سرطانی انسانی از جمله H1080، H1299، Hela و A549 مهار کرد. نتایج بیانگر ورود پپتید به درون سلول و فعال‌سازی مسیر آپتوز درونی، افزایش بیان ژن P27 و متعاقباً مهار تکثیر سلولی بود (۱۳). همچنین تحقیقات درون‌تنی در موش‌های حامل زئوگرافت Hela، H1299 و A549 انجام شد. نتایج نشان داد که پپتید لیکوزین ۱ سبب مهار رشد تومورهای کاشته شده در یک روش وابسته به دوز گردید. علاوه بر این سلول‌های بافت توموری تیمار شده با پپتید لیکوزین تغییرات مورفولوژیکی در ارتباط با آپتوز را نشان دادند (۱۳). در مطالعه حاضر، افزایش بیان ژن‌های Bim و CytC و کاهش بیان Bcl-2 می‌تواند بیانگر فعال‌سازی مسیر درونی آپتوز در سلول‌های سرطانی دهانه رحم در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی باشد. مطالعات در محیط تومور، بیانگر تغییر ترشح برخی از سایتوکاین‌ها، تکثیر سلول‌های ایمنی و کاهش پاسخ ایمنی است (۷). سایتوکاین‌های ترشح شده از سلول‌های T کمکی نوع یک (Th1: type 1 T helper)

p53، افزایش بیان ژن Bax و کاهش Bcl-2 بود (۲۵). نتایج آنالیز Real Time PCR نشان داد که پپتید HL-10، سبب کاهش بیان ژن Bcl-2 و افزایش بیان ژن-های BIM و CytC در سلول‌های سرطانی تیمار شده با پپتید نسبت به سلول‌های سرطانی بدون تیمار شد. مطالعات نشان داده است که ملیتین، به‌عنوان ترکیبی مهم در سم زنبور عسل، خاصیت ضدسرطانی خود را از طریق افزایش بیان ژن Bax و کاهش Bcl-2 بر دو رده سلولی سینه و کبد نشان داد (۸). همچنین، مون و همکاران، اثر سم زنبور عسل را بر سلول‌های سرطانی لوسمی U937 بررسی کردند. نتایج بیانگر آن بود که زهر زنبور عسل سبب کاهش بیان ژن‌های ERK و Bcl-2 شده و بدین‌صورت سبب آغاز فرایند آپتوز می‌شود (۱۷). در گزارش قبلی مان، دو پپتید HL-7 و HL-10، اثرات ضدتوموری خود را بر سلول‌های سرطانی کبدی HepG2 از طریق افزایش بیان $TNF-\alpha$ و همچنین افزایش نسبت Bax به Bcl-2 نشان دادند (۲۸). در مطالعه حاضر، خواص ضدسرطانی پپتید HL-10 از طریق فرآیند آپتوز بررسی گردید. این ویژگی، بواسطه افزایش بیان ژن‌های Bim و CytC و همچنین کاهش بیان ژن Bcl-2 نشان داده شد. در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی، تغییرات در بیان ژن‌های مورد مطالعه در سلول‌های Hela تیمار شده با پپتید HL-10 نسبت به سلول‌های بدون تیمار معنادار بود ($p < 0.05$). لی و همکاران (۲۰۱۵) دریافتند که تیمار موش‌های balb/c حامل سرطان دهانه رحم با سم زنبور عسل سبب افزایش بیان گیرنده‌های مرگ (DR، DR3، DR6، FAS) و همچنین پروتئین‌های پروآپتوزی (کاسپاز ۳ و Bax)، و کاهش بیان Bcl-2 و NF-kB گردید. این نتایج بیانگر مهار رشد سلول‌های سرطانی دهانه رحم از طریق مهار مسیر NF-Kb بود. نتایج نشان داد که توکسین‌های طبیعی سم زنبور عسل، به عنوان عوامل ضدسرطانی از طریق

حامل سلول‌های F3II با دوزهای مختلف سم به مدت ۲۴ ساعت بررسی گردید. نتایج نشان داد که سم عقرب قادر به کاهش غلظت IL-6، IFN- γ و IL-1 β بود، در حالیکه سطوح IL-12 و TNF- α را بر اساس غلظت سم و طول دوره انکوباسیون آن افزایش داد (۳۳). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مقادیر IFN- γ ، IL-6 و IL-1 β در موش‌های حامل سلول‌های Hela تیمار شده با دو غلظت از پپتید HL-10 نسبت به موش‌های حامل سلول‌های Hela بدون تیمار افزایش نشان داد، در حالیکه مقدار IL-4 کاهش معناداری نشان داد ($p < 0/05$). به نظر می‌رسد که پپتید HL-10 سیستم ایمنی موش‌های balb/c حامل سلول‌های سرطانی دهانه رحم تحریک کرده که منجر به فعالیت ضدتوموری آن می‌گردد. اثرات تحریک کنندگی پپتید HL-10 بر سیستم ایمنی، خاصیت درمانی پپتید را در بیماری سرطان نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی، اثر پپتید HL-10 بر بیان ژن‌های Bcl-2، Bim و Ctsc در تنظیم برنامه سلولی آپوپتوز مورد تایید قرار گرفت این گزارش، بیانگر دخیل بودن احتمالی پپتید HL-10 در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ آپوپتوز سلولی و در نهایت مرگ سلولی است. یکی دیگر از عوامل موثر در اثرات ضدتوموری پپتید HL-10 را می‌توان به تنظیم سیستم ایمنی از طریق تغییر در سطوح سایتوکاین‌ها نسبت داد. در آینده، مطالعات بیشتری در مورد آپوپتوز و ابعاد مولکولی آن و همچنین بررسی بیشتر در زمینه تعدیل سیستم ایمنی برای تایید خواص ضدسرطانی پپتید HL-10 مورد نیاز است.

منابع

1. Abdel-Salam M.A.L., Pinto B., Cassali G., Bueno L., Pegas G., Oliveira F., Silve I., Klein A., de Souza-Fagundes E.M., de Lima M.E., Carvalho-Tavares J., 2021. LyeTx I-b peptide attenuates tumor burden

(مانند IFN- γ)، سبب تقویت خواص ضدسرطانی شده و از طریق فعال‌سازی لنفوسیت‌های T کشنده (CTLs: cytotoxic T lymphocytes) مانع رشد سلول‌های سرطانی می‌شوند (۱۹). مطالعات نشان داده است که برخلاف IFN- γ ، مقدار اینترلوکین ۴ (IL-4) مترشح از سلول‌های Th2، به طور معناداری در طول رشد و گسترش سلول‌های سرطانی افزایش یافت (۱۱). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پس از گذشت ۵ هفته تزریق سلول‌های سرطان دهانه رحم Hela و متعاقباً القای تومور در موش‌های balb/c، افزایش معناداری در سطوح سرمی IFN- γ در موش‌های سرطانی تیمار شده با پپتید HL-10 در مقایسه با موش‌های سالم بدون تیمار دیده شد، در حالیکه کاهش قابل توجهی در سطوح سرمی IL-4 مشاهده گردید. در مطالعه ای، اثرات ضدسرطانی و تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی پپتید LyeTxI-b، استخراجی از سم عنکبوت *Lycosa erythrognatha* در مدل موش حامل زئونگرافت 4T1 بررسی گردید. نتایج نشان داد که تیمار با پپتید LyeTxI-b، بیان فاکتور پیش‌التهابی IL-1 β را در بافت تومور مهار کرد. از سوی دیگر، بیان فاکتور ضدالتهابی IL-10 در بافت توموری تیمار شده با پپتید افزایش پیدا کرد (۱). در گزارشی، فعالیت ضدتوموری و اثرات تحریک کننده ایمنی الیگوپپتیدهای صدف خوراکی در موش‌های balb/c حامل S180 بررسی گردید. نتایج مطالعه نشان داد که فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی، تکثیر لنفوسیت‌ها در طحال و میزان فاگوسیتوز ماکروفاژها در موش‌های حامل S180 بطور قابل توجهی پس از تزریق هیدرولیزات‌های صدف به موش‌ها افزایش یافت (۳۰). در مطالعه دیگر، توانایی سم عقرب *Heteroctenus juneus* بر تنظیم و تعدیل غلظت سایتوکاین‌ها بررسی گردید. در این مطالعه، غلظت سایتوکاین‌های بافت تومور پس از تیمار موش‌های

- antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(2):357-375.
10. Jeyaprakash J., Hoy M.A., 2009. First divergence time estimate of spiders, scorpions, mites and ticks (subphylum: *Chelicerata*) inferred from mitochondrial phylogeny. *Experimental and Applied Acarology*, 47(1):1-18.
 11. Kawakami K., Kawakami M., Husain S.R., Puri R.K., 2003. Effect of interleukin (IL)-4 cytotoxin on breast tumor growth after in-vivo gene transfer of IL-4 receptor alpha chain. *Clinical Cancer Research*, 9(5):1826-1836.
 12. Lee H.L., Park S.H., Kim T.M., Jung Y.Y., Park M.H., Oh S.H., Yun H.S., Jun H.O., Yoo H.S., Han S.B., Lee U.S., Yoon J.H., Song M.J., Hong J.T., 2015. Bee venom inhibits growth of human cervical tumors in mice. *Oncotarget*, 6(9):7280-7292.
 13. Liu Z., Deng M., Xiang J., Ma H., Hu W., Zhao Y., Li D.W.C., Liang S., 2012. A novel spider peptide toxin suppresses tumor growth through dual signaling pathways. *Current Molecular Medicine*, 12(10):1350-1360.
 14. Meki A.R., Nassar A.Y., Rochat H., 1995. A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. *Peptides*, 16(8): 1359-1365.
 15. Mikaelian A.G., Traboulay E., Zhang X.M., Yeritsyan E., Pedersen P.L., Hee Ko.Y., Matalaka K.Z., 2020. Pleiotropic Anticancer properties of scorpion venom peptides: *Rhopalurus princeps* venom as an anticancer agent. *Drug Design, Development and Therapeutics*, 14:881-893.
 16. Miyashita M., Sakai A., Matsushita N., Hanai Y., Nakagawa Y., Miyagawa H., 2010. A novel amphipathic linear peptide with both insect toxicity and antimicrobial activity from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(2): 364-369.
 - and metastasis in a mouse 4T1 breast cancer model. *Antibiotics (Basel)*, 10(9):1136.
 2. Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C., Cousens L.P., Salazar-Mather T.P., 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology*, 17:189-220.
 3. Gao L., Shan B.E., Chen J., Liu J.H., Song D.X., Zhu B.C., 2005. Effects of spider *Macrothele raven* venom on cell proliferation and cytotoxicity in HeLa cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26:369-376.
 4. Gu Y., Liu S-L., Ju W-Z., Li C-Y., Cao P., 2013. Analgesic-antitumor peptide induces apoptosis and inhibits the proliferation of SW480 human colon cancer cells. *Oncology letters*, 5(2): 483-488.
 5. Guo Y., Srinivasula S.M., Druilhe A., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S., 2002. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16): 13430-13437.
 6. Gupta S.D., Gomes A., Debnath A., Saha A., Gomes A., 2010. Apoptosis induction in human leukemic cells by a novel protein Bengalin, isolated from Indian black scorpion venom: through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins. *Chemico-Biological Interactions*, 183:293-303.
 7. Harirchi I., Karbaksh M., Kashefi A., Momtahn A.J., 2004. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 5(1):24-27.
 8. Heidari Esfahani E., Doosti A., 2021. The Effects of melittin coding gene of bee venom on *Bcl-2* and *Bax* genes expression in ACHN cells. *Anatomical Sciences Journal*, 18(2):85-91.
 9. Hoskin D.W., Ramamoorthy A., 2008. Studies on anticancer activities of

- apoptosis in cancerous but not in normal human oral cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84: 1042-1050.
26. Setayesh-Mehr Z., Asoodeh A., 2017. The inhibitory activity of HL-7 and HL-10 peptide from scorpion venom (*Hemiscorpius lepturus*) on angiotensin converting enzyme: Kinetic and docking study, *Bioorganic Chemistry*, 75:30-37.
 27. Setayesh-Mehr Z., Asoodeh A., 2019. Inhibitory effect of HL-7 and HL-10 peptides on human breast cancer cells by induction of the expression of antioxidant enzymes. *International Journal of Peptide Science and Therapeutics*, 25(40):1343-1341.
 28. Setayesh-Mehr Z., Asoodeh A., Poorsargol M., 2021. Upregulation of Bax, TNF- α and down-regulation of Bcl-2 in liver cancer cells treated with HL-7 and HL-10 peptides. *Biologia*, 76:2735-2743.
 29. Sun X., Xu Q., Zeng L., Xie L., Zhao Q., Xu H., Wang X., Jiang N., Fu P., Sang M., 2020. Resveratrol suppresses the growth and metastatic potential of cervical cancer by inhibiting STAT3Tyr705 phosphorylation. *Cancer Medicine*. 9(22):8685-8700.
 30. Wang Y.K., He H.L., Wang G.F., Wu H., Zhou B.C., Chen X.L., Zhang Y.Z., 2010. Oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates produced on a plant scale have antitumor activity and immunostimulating effects in BALB/c mice. *Marine Drugs*, 8(2):255-268.
 31. Willems J., Moerman L., Bosteels S., Bruyneel E., Ryniers F., Verdonck F., 2004. Parabutopirin an antibiotic peptide from scorpion venom can both induce activation and inhibition of granulocyte cell functions. *Peptides*, 25(7):1079-1084.
 32. Yan W., Lu J., Li G., Wei H., Ren W.H., 2018. Amidated Scolopin-2 inhibits proliferation and induces apoptosis of Hela cells *in vitro* and *in vivo*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65:672-679.
 17. Moon D-O., Park S-Y., Heo M-S., Kim K-C., Park C., Ko W.S., 2006. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *International immunopharmacology*, 6(12):1796-1807.
 18. Ortiz E., Gurrola G.B., Schwartz E.F., Possani L.D., 2015. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*, 93:125-135.
 19. Otsuki N., Dang N.H., Kumagai E., Kondo A., Iwata S., Morimoto C., 2010. Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(3):760-767.
 20. Petricevich V.L., Lebrun I., 2005. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions *in-vitro*. *Mediators of Inflammation*, 1:39-49.
 21. Pipelzadeh M.H., Dezfulian A.R., Jalali M.T., Mansori A.K. 2006. *In vitro* and *in vivo* studies on some toxic effects of the venom from *Hemiscorpius lepturus* scorpion. *Toxicon*, 48: 93-103.
 22. Piperi C., Zisakis A.W., Lea R., Kalofoutis A., 2005. Role of cytokines in the regulation of glioma tumour growth and angiogenesis. *American Journal of Immunology*, 1:106-113.
 23. Possani L.D., Becerril B., Delepierre M., Tytgat J., 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *European Journal of Biochemistry*, 264:287-300.
 24. Riedl S., Zweytick D., Lohner K. 2011. Membrane-active host defense peptides-challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(8):766-781.
 25. Satitmanwivat S., Changsangfa C., Khanuengthong A., Promthep K., Roytrakul S., Arpornsuwan T., 2016. The scorpion venom peptide BmKn2 induces

- (BmKbpp) related to a bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *IUBMB Life*, 49(3):207-210.
35. Zeng X., Corzo G., Hahin R., 2005. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB Life*, 57(1):13-21.
33. Yglesias-Rivera A., Sánchez-Rodríguez H., Soto-Febles C., Monzote L., 2023. *Heteroctenus junceus* scorpion venom modulates the concentration of pro-inflammatory cytokines in F3II tumor cells. *Life (Basel)*, 13(12):2287.
34. Zeng X.C., Li W.X., Peng F., Zhu Z.H. 2000. Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide

Review Article

Zoonotic Diseases Caused By Dogs in Iran: A Review of the Current Situation, Health Challenges, and Prevention Strategies

Mahboubeh Sadat Hosseinzadeh*

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Birjand, Birjand, Iran

*Corresponding author: m.hosseinzadeh@birjand.ac.ir

Received: 28 October 2024

Accepted: 3 February 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1200476

Abstract

Rabies, hydatid cysts, and leishmaniasis are among the diseases transmitted to humans by dogs and, according to the World Health Organization, are considered endemic diseases in Iran. Also, the status of the three zoonotic diseases rabies, cutaneous leishmaniasis, and cystic echinococcosis shows a worrying trend of their spread in different regions of the country. The purpose of this review study is to examine the spread of these diseases, the research conducted in Iran, and ultimately to provide solutions for their control. To prevent rabies, wearing protective clothing, washing wounds with soap and water, and rabies vaccination seem to be essential as primary measures. Over the past three decades, despite many efforts to control cutaneous leishmaniasis in Iran, the incidence rate has remained high in some areas. This indicates that the infrastructure and executive and support plans related to diagnosis, medication, and vaccines have been inadequate. In general, to control echinococcosis vectors, ethical strategies for reducing the stray dog population, such as sterilization, identification of suspect dogs by periodic direct agglutination tests, and prompt treatment or monitoring of positive cases, are recommended. Given the importance of detecting human cases, effective treatment and targeted public health education are also essential, especially in endemic areas.

Keywords: Zoonotic disease, Rabies, Dog, Leishmaniasis, Echinococcosis.

مقاله مروری

بیماری‌های زئونوز ناشی از سگ در ایران: بررسی وضعیت فعلی، چالش‌های بهداشتی و راهکارهای پیشگیری

محبوبه سادات حسین‌زاده*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

*مسئول مکاتبات: m.hosseinzadeh@birjand.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۰۷

DOI: 10.60833/ascij.2025.1200476

چکیده

هاری، کیست هیداتید و لیشمانیوز از جمله بیماری‌هایی هستند که از طریق سگ به انسان منتقل می‌شوند و بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت، جزء بیماری‌های بومی ایران محسوب می‌شوند. همچنین وضعیت سه بیماری زئونوز هاری، لیشمانیوز جلدی و اکینوкокوز کیستیک، نشان‌دهنده روند نگران‌کننده‌ای از شیوع آنها در مناطق مختلف کشور است. هدف از انجام این مطالعه مروری، بررسی گسترش این بیماری‌ها، پژوهش‌های انجام‌شده در ایران و در نهایت ارائه راهکارهایی برای کنترل آنهاست. برای پیشگیری از بیماری‌های، استفاده از لباس محافظ، شست‌وشوی زخم‌ها با آب و صابون، و واکسیناسیون هاری به عنوان اقدامات اولیه ضروری به نظر می‌رسد. طی سه دهه گذشته، با وجود تلاش‌های فراوان برای کنترل بیماری لیشمانیوز جلدی در ایران، میزان ابتلا در برخی مناطق همچنان بالا باقی مانده است. این امر نشان می‌دهد که زیرساخت‌ها و طرح‌های اجرایی و حمایتی مرتبط با تشخیص، دارو و واکسن ناکافی بوده‌اند. به‌طور کلی، برای کنترل ناقلان بیماری اکینوкокوز، استفاده از استراتژی‌های اخلاقی در کاهش جمعیت سگ‌های ولگرد، مانند عقیم‌سازی، شناسایی سگ‌های مشکوک با آزمایش‌های دوره‌ای آگلوتیناسیون مستقیم، و درمان یا پایش سریع موارد مثبت پیشنهاد می‌شود. همچنین با توجه به اهمیت تشخیص موارد انسانی، درمان مؤثر و آموزش هدفمند بهداشت عمومی، به‌ویژه در مناطق بومی، ضروری است.

کلمات کلیدی: بیماری زئونوز، هاری، سگ، لیشمانیوز، اکینوкокوز.

مقدمه

بیماری‌های هیداتید ایران (Iranian Research Center for Hydatid Disease: RCH) در سال ۲۰۱۳ شدت گرفته است (۷۸). هاری بیماری مشترک بین انسان و دام است که در بسیاری از نقاط جهان نادیده گرفته شده و سالانه بیش از ۵۹,۰۰۰ مرگ‌ومیر به دنبال دارد. برای پیشگیری از این بیماری، هر ساله تعداد زیادی از افراد در مناطق مختلف واکسینه می‌شوند (۳۵، ۸۳). تاکنون حداقل ۳۰ گونه به‌عنوان مخزن ویروس هاری

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization: WHO)، در ایران، بیماری‌های منتقله از سگ مانند اکینوкокوز کیستیک، هاری و لیشمانیوز از جمله بیماری‌های بومی در ایران به شمار می‌روند و بار قابل‌توجه بهداشتی و اقتصادی برای جامعه دارند. با این وجود، تلاش‌ها برای کنترل این بیماری‌های مشترک انسان و حیوان، به‌ویژه اکینوкокوز کیستیک، از زمان تأسیس مرکز تحقیقات

شناسایی شده‌اند؛ از جمله گوشتخواران خشکی‌زی، خفاش‌های خون‌آشام و حشره‌خواران. با این حال، ۹۶ درصد از انتقال بیماری از طریق گازگرفتگی سگ به انسان رخ می‌دهد (۱). ویروس هاری از خانواده Rhabdoviridae و جنس *Lyssavirus* است که حاوی ژنوم RNA تک‌ رشته‌ای است (۱۰). این ویروس نوروتروپیک است، یعنی به طور اختصاصی سلول‌های عصبی را آلوده می‌کند (۳۸). پس از گزش، ویروس در محل زخم تکثیر یافته و سپس از طریق آکسون‌های محیطی به صورت رتروگراد به سمت مغز حرکت می‌کند و باعث آنسفالیت پیشرونده می‌شود که تقریباً همیشه کشنده است (۲۹، ۷۹). عدم آشنایی با علائم بالینی بیماری، عدم تشخیص، عدم تأیید مرگ ناشی از هاری یا نادیده گرفتن بیماری از سوی آسیب‌شناس از دلایل عدم تأیید مرگ ناشی از هاری است (۳۳). دوره نهفتگی بیماری معمولاً بین ۲۰ تا ۹۰ روز طول می‌کشد، اما ممکن است تنها چند روز یا حتی بیش از یک سال باشد (۶۵). در انسان دو شکل بالینی از هاری وجود دارد: مغزی (Encephalitic) و فلجی (Paralytic). هاری مغزی در حدود ۸۰ درصد از بیماران و هاری فلجی در ۲۰ درصد از بیماران رخ می‌دهد. در فرم مغزی، بیماران دچار دوره‌هایی از تحریک‌پذیری یا برانگیختگی عمومی می‌شوند که متناوباً دارای دوره‌های هوشیاری می‌باشند (۷۸). اختلال عملکرد اتونوم در هاری شایع است و شامل موارد زیر می‌شود: افزایش ترشح بزاق، تعریق، سیخ شدن موها (پوست‌مرغی شدن) و نعوظ مداوم و دردناک. اکثر بیماران مبتلا به هاری مغزی دچار آب‌هراسی می‌شوند که یک ویژگی خاص و مشخصه هاری است (۲۰). هاری فلجی ممکن است به اشتباه به‌عنوان سندرم گیلن-باره (Guillain-Barre syndrome) تشخیص داده شود، که شامل هر دو مورد پلی‌رادیکوپاتی التهابی حاد میلین‌ساز (اختلالی که در

آن سیستم ایمنی به بخشی از سیستم عصبی محیطی حمله می‌کند) و نوروپاتی حسی-حرکتی با شروع حاد با درگیری آکسونال غالب (که سندرم گیلن-باره آکسونال نامیده می‌شود) می‌باشد (۶۰). درگیری اسفنکتر (عضلات کنترل‌کننده دفع ادرار و مدفوع) که منجر به بی‌اختیاری ادرار می‌شود در هاری فلجی شایع است، درحالی‌که در سندرم گیلن باره این مورد نادر است (۶). با پیشرفت بیماری، عضلات بلع و تنفس در هاری فلجی ضعیف می‌شوند که منجر به مرگ بیمار می‌شود (۳۰). لیشمانیوز یکی دیگر از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است که از مدت‌ها پیش شناخته شده، اما به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته و به‌تدریج فراتر از محدوده‌های جغرافیایی سنتی گسترش یافته است. همچنین در بین میزبان‌های مختلف و ناقلان متعدد پراکنده شده است (۴۵). لیشمانیوزها بیماری‌هایی منتقل‌شونده توسط ناقلان هستند که در سراسر جهان مشاهده می‌شوند و عامل آن‌ها تک‌یاخته اجباری جنس *Leishmania* از خانواده Trypanosomatidae است که بیش از ۲۱ گونه بیماری‌زا دارد. این بیماری بار قابل توجهی بر سلامت انسان تحمیل کرده و یکی از مشکلات عمده بهداشت جهانی به‌شمار می‌رود (۴۹، ۶۱، ۷۳). این بیماری معمولاً از طریق نیش پشه خاکی از جنس *Phlebotomus* در دنیای قدیم (آسیا، آفریقا و اروپا) یا *Lutzomyia* در دنیای جدید (آمریکا) به مهره‌داران منتقل می‌شود (۶۲). بسته به محل استقرار انگل در بافت پستانداران، چندین تظاهرات بالینی عمده شناسایی شده است، از جمله: لیشمانیوز جلدی، لیشمانیوز جلدی منتشر، لیشمانیوز مخاطی-پوستی، لیشمانیوز احشایی، لیشمانیوز جلدی پس از کالآزار، و موارد عودکننده (۵۲). اگرچه لیشمانیوز احشایی یا کالآزار کشنده‌ترین نوع بیماری است، اما شایع‌ترین شکل بیماری، لیشمانیوز جلدی است که حدود

هستند (۵۰). در سال‌های اخیر چند مورد که دارای ضایعات پوستی با ویژگی‌های مشابه لیشمانیوز جلدی ناشی از *L. infantum* در نقاط مختلف ایران گزارش شده است (۸). بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۱۵، کیست هیداتید سالانه موجب حدود ۱۹۰۳۰۰ مرگ و ۸۷۱۰۰۰۰ سال بار بیماری بر حسب شاخص DALYs (Disability-adjusted life years) (مجموع سال‌های از دست‌رفته به‌علت مرگ زودرس یا زندگی با ناتوانی) می‌شود. همچنین بار اقتصادی ناشی از درمان بیماری و کاهش تولیدات دامی، سالانه حدود ۳ میلیارد دلار برآورد شده است (۸۷). *اکینوкокوس کیستیک* و *اکینوкокوس آلوئولار* به‌ترتیب توسط مراحل لاروی *Echinococcus granulosus* و *Echinococcus multilocularis* ایجاد می‌شوند. سگ‌ها و سایر گوشت‌خواران، میزبان قطعی *E. granulosus* محسوب می‌شوند؛ درحالی‌که نشخوارکنندگان (مانند گوسفند و گاو) میزبان حدواسط آن هستند. سگ‌ها نیز می‌توانند در صورت بلعیدن پستانداران کوچک، به‌ویژه جوندگان به *E. multilocularis* آلوده شوند. *E. granulosus* پراکندگی جهانی دارد، درحالی‌که *E. multilocularis* عمدتاً به نیمکره شمالی محدود می‌شود (۸۴). شیوع آلودگی به انگل *اکینوкокوس مولتی‌کولاریس* در حدود ۴۰ درصد روباه‌های هوکایدو، شمالی‌ترین جزیره ژاپن، گزارش شده است (۴۷). انگل اساساً در چرخه وحشی نگهداری می‌شود چرخه‌ای، که در آن روباه میزبان قطعی و ول میزبان حدواسط هستند. با این حال، زیستگاه روباه‌ها نزدیک به یا همپوشانی با سکونتگاه‌های انسانی دارد، که این مسئله ایجاد خطر بالقوه عفونت برای انسان و حیوانات همراه آنها را به‌دنبال دارد (۱۹، ۳۷، ۵۵، ۷۴). در اروپای مرکزی، چندین مطالعه شیوع آلودگی *اکینوкокوس مولتی‌کولاریس* در سگ‌های خانگی حدود ۰/۳ تا ۷ درصد

سه‌چهارم موارد ابتلا را تشکیل می‌دهد (۴). هنوز هم سومین بیماری منتقل‌شونده توسط ناقلان در جهان به‌شمار می‌رود. این بیماری در مناطق گرمسیری، نیمه‌گرمسیری و حوضه مدیترانه بومی است، و بنابر گزارش‌های سازمان جهانی بهداشت، از تمام قاره‌ها به‌جز اقیانوسیه مواردی از آن گزارش شده است (۶۴). به‌طوریکه در ۹۸ کشور، حدود ۱۲ میلیون نفر در معرض خطر ابتلا قرار دارند و سالانه بین ۲۰ تا ۴۰ هزار مرگ ناشی از آن ثبت می‌شود (۵، ۸۶). در ایران، سالانه ۲۰،۰۰۰ مورد جدید لیشمانیوز جلدی گزارش می‌شود (۷، ۴۸). در ایران دو نوع عمده لیشمانیوز جلدی وجود دارد: لیشمانیوز جلدی زئونوز و لیشمانیوز جلدی آنترپونوز یا انسانی است که لیشمانیوز جلدی زئونوز ناشی از گونه *Leishmania major* و لیشمانیوز جلدی آنترپونوز یا انسانی توسط *Leishmania tropica* ایجاد می‌شود (۵۱). لیشمانیوز احشایی توسط گونه‌های *L. donovani*، *L. infantum* و *Leishmania chagasi* ایجاد می‌شود و در صورت عدم درمان می‌تواند تا ۱۰۰ درصد مرگ و میر بیماران آلوده را به همراه داشته باشد (۵، ۸۲). گونه پشه خاکی *Phlebotomus papatasi* بعنوان ناقل لیشمانیوز جلدی زئونوز در مناطق مختلف ایران گزارش شده است (۲۸). همچنین گونه‌های مختلف جوندگان از جمله *Meriones libycus*، *Rhombomys opimus*، *Nesokia indica* و *Meriones hurrianae* به‌طور مکرر به *L. major* آلوده شده و به عنوان میزبان‌های مخزن لیشمانیوز جلدی زئونوز در کانون‌های مختلف بومی ایران شناخته شده است (۲، ۲۶، ۶۳). پشه خاکی گونه *Phlebotomus sergenti* ناقل برای لیشمانیوز جلدی آنترپونوز یا انسانی اثبات شده است که انسان و سگ بعنوان میزبان‌های اولیه و ثانویه بترتیب محسوب می‌شوند (۲، ۳۱، ۴۸). سگ‌های نژاد دابرمین به لیشمانیا اینفانتوم حساس‌تر

بدست آمده، مقالات دارای یافته‌های نوین مورد استفاده قرار گرفت.

بیماری‌های

مطالعات انجام‌شده کنستانتین انتقال بیماری‌های از طریق آئروسول (ذرات معلق در هوا) را تأیید کرده است مانند شواهد تأیید شده در مورد این نحوه انتقال بیماری در غاری در تگزاس که محل سکونت میلیون‌ها خفاش دم آزاد برزیل است، ویروس از طریق مسیر بویایی مستقیماً به مغز دسترسی می‌یابد (۷۲، ۸۱). انتقال از طریق پیوند عضو نیز گزارش شده است؛ از جمله هشت مورد انتقال از طریق پیوند قرنیه از کشورهای نظیر آلمان، کویت، ایالات متحده و چین گزارش شده است (۳۹، ۶۶، ۷۶). در ایران، ابتلا به بیماری از طریق سگ، روباه، شغال، گربه و گرگ صورت می‌گیرد که ۹۹ درصد مربوطه به سگ و گربه است (۱). در سال‌های اخیر، مطالعات منتشرشده در مجلات علمی معتبر به افزایش آمار گزش حیوانات و چالش‌های مربوط به کنترل هاری در ایران اشاره کرده‌اند. در مطالعه‌ی در استان گیلان طی سال‌های ۲۰۱۶ تا ۲۰۲۲، میزان ابتلا ۳۸۵/۳ مورد به هاری در ازاء هر ۱۰۰,۰۰۰ نفر نسبت به میانگین کشوری ۲۸۲ مورد در هر ۱۰۰,۰۰۰ نفر، بسیار بالاتر است. از ۴۰۹۲۲ مورد گزش گزارش شده در طول دوره مطالعه، ۶۵/۹ درصد مرد و ۳۴/۱ درصد زن بودند (۱۷). این مطالعه نشان داده فراوانی گزش حیوانات اهلی بیشتر از حیوانات غیر اهلی است. از بین ۴۹۵۰۰ مورد، ۴۰۱۵۷ (۸۱/۳ درصد) بوسيله حیوانات اهلی گزش اتفاق افتاده است. در مجموع، سگ‌ها مسئول ۳۳۲۷۷ مورد گزش (۸۱ درصد)، گربه‌ها برای ۵۶۲۴ (۱۳/۷ درصد)، گاو برای ۱۰۵۴ (۲/۵ درصد) و موارد باقیمانده مربوط به سایر حیوانات است (۱۷). در طول دوره شش ساله مطالعه، چهار مورد مرگ ناشی از

برآورد کرده اند (۱۸، ۲۷). در برخی موارد، سگ ممکن است از طریق خوردن جوندگی آلوده که توسط گربه تهیه شده مبتلا به انگل شود. این پتانسیل مسیر عفونت، جنبه جدیدی است که در پیشگیری از آلودگی سگ‌های خانگی باید در نظر گرفته شود (۴۷). در واقع، عفونت انسانی توسط کرم نواری *E. granulosus* می‌تواند منجر به بروز اکینوкокوز کیستیک یا هیداتیدوز شود (۸۴). حیواناتی مانند دام‌ها و انسان، با مصرف غذا، آب یا خاک آلوده به تخم انگل، به‌ویژه از طریق سبزیجات شسته‌نشده، به‌عنوان میزبان حدواسط آلوده می‌شوند. مرحله لاروی انگل عمدتاً در کبد و ریه مستقر شده و باعث ایجاد کیست‌های هیداتید می‌شود (۴۴، ۸۶). این چرخه زمانی کامل می‌شود که گوشت‌خواران (مانند سگ‌ها) احشاء آلوده لاشه میزبان حدواسط را مصرف کنند. در ایران، برآوردها نشان می‌دهد که خسارات مستقیم و غیرمستقیم ناشی از این بیماری سالانه حدود ۲۳۲ میلیون دلار است (۲۴). مطالعات انجام‌شده در مناطق مختلف کشور، شیوع در این مقاله، مروری بر سه بیماری مهم مشترک بین انسان و سگ شامل هاری، لیشمانیوز و اکینوкокوز کیستیک انجام شده است. تلاش شده است ضمن معرفی این بیماری‌ها، اطلاعاتی درباره وضعیت جهانی و ملی آنها، و راهکارهای پیشگیری و کنترل ارائه شود.

روش تحلیل داده‌ها

این مطالعه مروری با استفاده از مقالات، اطلاعات موتورهای جستجو Google scholar، Web of science و Pubmed و هم‌چنین پایگاه اطلاعاتی فارسی بنام Magiran و Scientific Information Database (SID)، بر اساس کلید واژه‌های اکینوкокوز کیستیک، لیشمانیوز و هاری در ایران، به فارسی و انگلیسی مورد جستجو قرار گرفت و از بین مقالات و مطالعات

هاری در منطقه مورد مطالعه گزارش شد. در این مطالعه انتقال بیماری‌های از گاوها نیز نشان داده شده است که بوسیله شغال به گاوها منتقل می‌شود و زمانیکه گاو علائمی را نشان می‌دهد صاحب دام به تصور اینکه دام پلاستیک خورده است برای درآوردن پلاستیک از دهان گاو به آن نزدیک می‌شود که دچار گازگرفتگی می‌گردد (۱۷). در مطالعه دیگری در بیرجند گزارش شده است ۸۶/۳ از گزش‌ها با حیوانات اهلی انجام شده است (۹). در مطالعه‌ای که در استان سیستان و بلوچستان انجام شد، ۶۰۸۵ مورد گزش حیوانات بین سال‌های ۲۰۱۹ تا ۲۰۲۱ ثبت شد؛ ۶۶/۹ درصد از قربانیان مرد بودند و ۶۷/۱ درصد از موارد در مناطق روستایی گزارش شده است. سگ‌ها عامل ۸۹/۸ درصد گزش‌ها بودند و هشت مورد مثبت

هاری نیز در حیوانات گزارش گردید (۳۶). همچنین، بررسی دیگری در استان آذربایجان شرقی نشان داد که ۸۵ درصد از قربانیان گزش مرد بودند و ۸۰ درصد از گزش‌ها توسط سگ‌ها انجام شده بود (جدول ۱). بر اساس این مطالعه، پیش‌بینی می‌شود که نرخ سالانه گزش حیوانات در سال ۲۰۲۴ به ۳۱۱ مورد در هر ۱۰۰،۰۰۰ نفر برسد (۴۰). نتایج مطالعه‌ای بر روی ۱۶ فرد مبتلا به بیماری‌های در ایران نشان می‌دهد که استفاده از روش پیشگیری برای مواجهه بدون استفاده ازایمنوگلوبولین انسانی ضد‌هاری و روش پیشگیری برای مواجهه به همراه ایمنوگلوبولین انسانی ضد‌هاری هیچ کدام باعث جلوگیری از مرگ بیماران نشده است و بنظر می‌رسد واکسیناسیون علی‌رغم هزینه زیاد راه اصلی در جلوگیری از ابتلا به این بیماری است (۱).

جدول ۱- شواهد اپیدمیولوژیک و شیوع گزش حیوانات و احتمال هاری در ایران بر اساس مطالعات ۱۹۹۰ تا ۲۰۲۵

Table 1. Epidemiological evidence, prevalence of animal bites and the likelihood of rabies in Iran based on studies 1990-2025

Study Area	Incidence Rate (per 100000 people)	Predominant Gender	Key Findings	Ref.
South Khorasan (Birjand)	From 54.36 in 2002 to 86.74 in 2009 (highest: 101.89 in 2005)	Men (78.3%)	86% of bites were from domestic animals; highest incidence in men and in June; 64.2% of bites occurred in rural areas	9
Iran (national data)	1,320 bites	Predominantly men (14.9 men vs. 4.55 women per 1,000)	Highest incidence in West Azerbaijan Province (146.83 per 1,000); human immunoglobulin found ineffective; vaccination identified as best solution	1
Sistan and Baluchestan (Iranshahr)	151	66.9% men	6,085 bite cases; 89.8% by dogs; 8 confirmed rabies cases	36
Gilan	386.3	65.9% men, 34.5% women	40,922 bite cases; 81% by dogs; incidence in northern areas above national average; rural areas reported higher rates; stray dogs main cause	17
West Azerbaijan (Maku)	387.4	73.7% men	90.8% of bites by dogs; highest incidence in summer and rural areas	56
Hamedan	269	77.1% men	77% of bites caused by dogs; 68.9% occurred in rural areas; victims' legs most affected	42
East Azerbaijan (Tabriz)	311	85% men	80% of bites by dogs; 58% of victims from rural areas	40

بیماری لیشمانیوز

جمعیت لیشمانیوز احشایی، سگ‌ها مخزن بالقوه بیماری هستند (۸۱، ۱۴). تشدید لیشمانیوز احشایی در میان سگ‌سانان وحشی، از جمله روباه و گرگ، منجر به ایجاد یک چرخه وحشی برای انگل *L. infantum* شده است. این چرخه متعاقباً به چرخه خانگی سرریز می‌شود و بر جمعیت سگ‌های خانگی تأثیر می‌گذارد و به افزایش کلی لیشمانیوز احشایی سگی کمک می‌کند (۴۳). در مطالعه‌ای که وجود انگل لیشمانیا در سگ‌ها با استفاده از استخراج DNA و تکنیک الیزا مورد بررسی قرار گرفت از ۳۶۰ سگ مورد مطالعه از زابل دو نمونه آلوده به *L. tropica* و ۱۰ نمونه آلوده به *L. infantum* و از ۱۴۰ سگ از کرمان هشت نمونه آلوده به *L. tropica* و ۱۶ نمونه آلوده به *L. infantum* بودند (۳). در مطالعه‌ای میان نیروهای نظامی ایران بین سال‌های ۲۰۱۸ تا ۲۰۲۲، استان‌های اصفهان، خوزستان و ایلام بالاترین تعداد موارد ابتلا را داشتند (جدول ۲)، در مجموع ۲۸۹۴ مورد گزارش و پیش‌بینی شد که روند بیماری تا پایان سال ۲۰۲۵ ادامه یابد (۷۰). همچنین، پژوهشی در استان کرمان نشان داد که بیان ژن‌های *CβS* و *ODC* با مقاومت دارویی مرتبط است (۸۹).

بالاترین شیوع لیشمانیوز جلدی مربوط به اصفهان با ۶۶ درصد (۵۳-۷۸ درصد)، گلستان ۶۴ درصد (۶۵-۶۲ درصد) و استان فارس با ۶۳ درصد (۳۸-۸۴ درصد) و کمترین میزان شیوع در استان کرمانشاه ۴ درصد (۵-۴ درصد) و هرمزگان ۱۰ درصد (۸-۱۱ درصد)، بوشهر ۱۲ درصد (۱-۳۵ درصد) و کرمان ۱۵ درصد (۹-۲۲ درصد) برآورد شده است (۵۷). در بررسی سگ‌های آلوده استان‌های اردبیل، گلستان و تهران، *L. infantum* شناسایی شد. و همین‌طور *L. tropica* از استان گلستان شناسایی شده است (۷۱). محبعلی و همکاران در سال ۲۰۲۳ در مطالعه‌ای در ۱۰ استان ایران، میزان آنتی‌بادی لیشمانیا با استفاده از تست آگلوتیناسیون مستقیم در میزبان‌های انسانی و حیوانی را مورد سنجش قرار داد. به طور کلی، ۵۶۱۰ نمونه سرم میزبان مخزن (۵۱۶۰ نمونه *Canis familiaris* ۱۹۵، *Felis catus* ۱۸۰، *Canis aureus* ۶ و *Vulpes vulpes*) از سال ۲۰۱۳ تا ۲۰۲۲ گزارش شد. به صورت کلی، ۱۰۳۵ از نمونه های سگ دارای سطح آنتی‌بادی لیشمانیای (*L. infantum*) بالاتر $\leq 1:320$ بودند (۴۳). شیوع سرمی لیشمانیوز احشایی برای سگ‌ها از ۷/۸ درصد (۲۰۱۳) تا ۳۳/۵ درصد (۲۰۱۹) متغیر بود. در مناطق کم-

جدول ۲- شواهد اپیدمیولوژیک و شیوع لیشمانیوز در ایران بر اساس مطالعات ۱۹۹۰ تا ۲۰۲۵

Table 2. Epidemiological evidence and prevalence of Leishmaniasis in Iran based on studies from 1990 to 2025.

Study Area	Prevalence/ Incidence per 100,000	Predominant Gender	Key Findings	Ref.
Isfahan Province	45	Children (under 10 years)	Highest prevalence in children; transmission through sandflies in rural areas	46
Iran (national data)	318.7	Predominantly women (unlike other studies)	High prevalence of cutaneous leishmaniasis in arid and semi-arid regions including North, South, and Razavi Khorasan, Semnan, Isfahan, Qom, Yazd, and Sistan-Baluchestan	53
10 provinces	—	—	Increase in canine visceral leishmaniasis in northwestern and southern regions	43
Golestan Province	—	52.7% men	Highest incidence reported in November (33.9%)	41
Military personnel (Isfahan, Ilam, Khuzestan)	—	All male population	2,894 cases; disease predicted to continue until 2025	70
Khuzestan	126.2 to 285.8	54.7% men	Higher prevalence in children under 10 years	13
Kerman	—	—	Expression of CβS and ODC genes identified in treatment-resistant patients	89

بیماری اکینوкокوز کیستیک

در ایران میزان عفونت به اکینوкокوس گرانولوزوس در سگ‌های ولگرد شیوع ۵ تا ۴۹ درصدی را در نقاط مختلف نشان می‌دهد (۱۶، ۲۳، ۵۹). در مطالعه گسترده‌ای که در ۱۳ استان ایران انجام گرفت، شیوع اکینوкокوس گرانولوزوس در سگ‌های گله ۲۷/۱۷ درصد شناسایی شد (۲۲). بر این اساس، کمترین و بیشترین شیوع ۳/۳ درصد در سیستان و بلوچستان و ۶۳/۳ درصد در اصفهان است. شدت عفونت به اکینوкокوس گرانولوزوس در هر سه سگ به ازاء ۲۰۰۰ سگ در غرب ایران گزارش شد (۱۶). ۸۱ درصد از سگ‌های آلوده دارای ۱-۱۰۰ کرم، ۱۳ درصد ۱۰۰-۱۰۰۰ کرم و ۴ درصد از سگ‌های آلوده بیش از ۱۰۰۰ بار کرم داشت. در مطالعه دیگری، میزان آلودگی در اکثر سگ‌ها کمتر از ۵۰ کرم انگل گزارش گردید (۲۲). مرحله لاروی انگل، کیست‌های هیداتید در احشاء میزبان به ویژه در ریه‌ها و کبد انسان و حیوانات گیاهخوار ایجاد می‌شود. این باعث کاهش بهره‌وری این حیوانات می‌شود. اگر سگ‌ها به اندام‌های آلوده دسترسی داشته باشند و آنها را بخورند، در اثر مرگ یک گیاهخوار آلوده یا کشتار آن برای مصرف انسان و رهاسازی احشای آلوده در محیط، چرخه زندگی انگل را کامل می‌کند. این باعث ایجاد چرخه سگ-گونه‌های اهلی می‌شود (۹۰). شیوع انگل اکینوкокوس گرانولوزوس در سگ در کشور پرو ۲۷/۷ درصد (۷۵) و ۶/۹ درصد در جنوب شیلی (۲۱) گزارش شده است. در مطالعه‌ای که بر روی مدفوع سگ‌ها برای بررسی آلودگی به تخم اکینوкокوس گرانولوزوس در مناطق اقلیمی مختلف تونس صورت گرفت شاخص آلودگی مدفوع سگ از ۸/۳ درصد تا ۴۱/۳ درصد متغیر بود (۱۱). در شرق الجزایر بر اساس کالبد شکافی‌ها در نتایج مشابه در سایر کشورهای همسایه (مصر، لیبی یا مراکش)

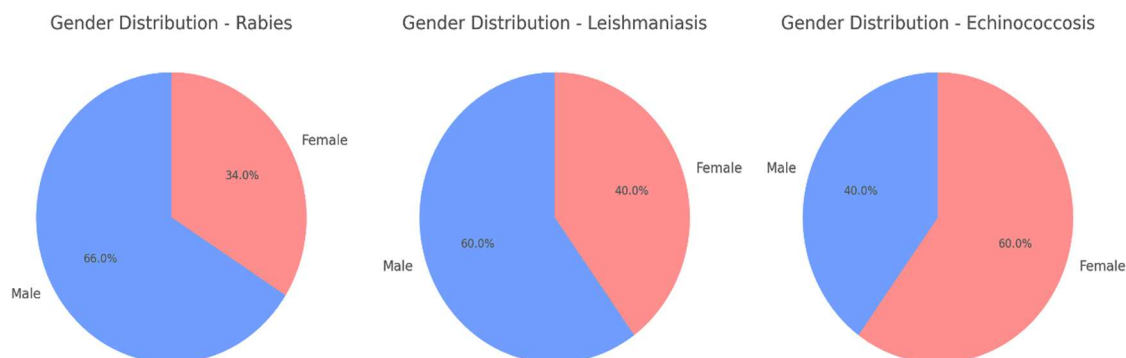
رأیید می‌کند (۱۵). کشتار خانگی هنوز بدون هر گونه نظارت دامپزشکی شهرداری انجام می‌شود و احتمالاً منبع مهم عفونت سگ نیز می‌باشد (۱۲). امکان بقای تخم انگل اکینوкокوس گرانولوزوس در مدفوع سگ در مناطق گرم‌تر و مرطوب‌تر بیشتر است (۳۴). در مطالعه‌ای در استان گیلان، از میان ۳۸۴ گاومیش ذبح‌شده، ۴۲ مورد کیست هیداتید شناسایی شد که نشان‌دهنده شیوع ۱۰/۹ درصد در دام‌ها است و تحلیل ژنتیکی مشخص کرد که گونه غالب *E. granulosus* از ژنوتیپ G1 بوده است (۲۵). همچنین در مطالعه‌ای بیمارستانی در استان مازندران، از میان ۷۹ بیمار مبتلا به کیست هیداتید، ۵۳ درصد زن و بیشتر ساکن مناطق شهری بودند (جدول ۳)؛ کبد شایع‌ترین عضو درگیر بود و بیش از نیمی از بیماران هیچ تماس مستقیمی با حیوانات نداشتند (۳۲). شکل (۱).

تحلیل شواهد سه بیماری زئونوز در ایران

بررسی وضعیت سه بیماری زئونوز مهم در ایران، یعنی هاری، لیشمانیوز جلدی و اکینوкокوز کیستیک، نشان‌دهنده روند نگران‌کننده‌ای از گسترش این بیماری‌ها در مناطق مختلف کشور است (شکل‌های ۱ و ۲). هاری، با نرخ فزاینده حیوان‌گزیدگی در مناطق شهری و روستایی، به‌ویژه از سوی سگ‌های بدون صاحب، به یکی از چالش‌های جدی بهداشت عمومی تبدیل شده است. شناسایی زیرگونه‌های ژنتیکی متنوع ویروس هاری در ایران و عدم پوشش کامل واکسیناسیون، خطر شیوع مداوم را افزایش می‌دهد (۳۶). لیشمانیوز، علی‌رغم تلاش‌های سه دهه گذشته، همچنان در استان‌های خوزستان، ایلام، اصفهان، و گلستان فعال است. انتشار انگل از طریق ناقلان (پشه‌های خاکی) در مناطق جنگلی و شهری، در کنار بروز مقاومت دارویی در برخی سویه‌ها، مقابله با این

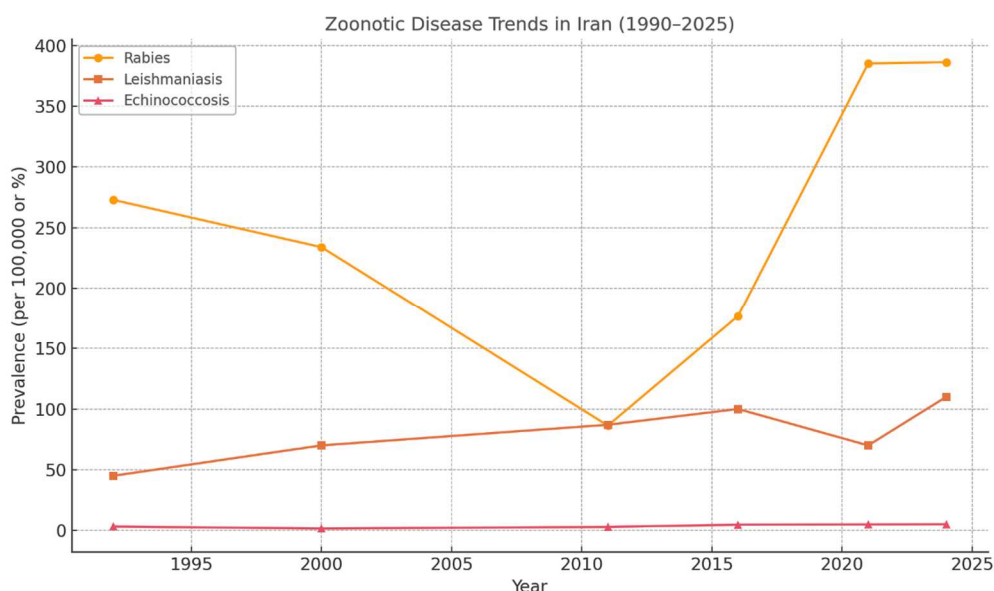
شواهد به‌وضوح نشان می‌دهد که هر سه بیماری در مناطق مختلف کشور فعال بوده و با وجود اقدامات پراکنده، نیاز به سیاست‌گذاری ملی، آموزش هدفمند، پایش ناقلان و اجرای برنامه‌های واکسیناسیون و بهداشت دام همچنان احساس می‌شود.

بیماری را دشوارتر کرده است (۸۹). وجود انگل در دام‌های ذبح شده بررسی شده و حاکی از شیوع بالا در استان‌هایی مانند کردستان، گیلان، خراسان، اردبیل و فارس دارد که صرف‌نظر از خسارت‌های اقتصادی و مالی بسیار فراوان و جبران‌ناپذیر، بعنوان منبعی برای انتقال انگل به انسان نیز محسوب می‌شود (۷۷). این



شکل ۱- توزیع جنسیتی سه بیماری زئونوز اکینوкокوز، لیشمانیوز و هاری (بر اساس نرخ گزش‌های حیوانات که بالقوه بعنوان ناقل هاری در نظر گرفته می‌شوند) بر اساس مطالعات سال‌های ۱۹۹۰-۲۰۲۵

Fig. 1. Gender distribution patterns of Echinococcosis, Leishmaniasis and Rabies (based on the incidence of animal bites potentially classified as rabies exposures) according to studies from 1990 to 2025.



شکل ۲- میزان شیوع سه بیماری زئونوز اکینوкокوز، لیشمانیوز و هاری (بر اساس نرخ گزش‌های حیوانات برآورده شده است) بر اساس مطالعات سال‌های ۱۹۹۰-۲۰۲۵

Fig. 2. The estimated prevalence of Echinococcosis, Leishmaniasis and Rabies (based on the incidence of animal bites potentially classified as rabies exposures) according to studies from 1990 to 2025.

جدول ۳ شواهد اپیدمیولوژیک و شیوع بیماری اکینوкокوز کیستیک در ایران بر اساس مطالعات (۱۹۹۰ تا ۲۰۲۵)

Table 3. Epidemiological evidence and prevalence of cystic echinococcosis in Iran based on studies (1990-2025)			
Study Area	Prevalence / Incidence per 100,000	Key Findings	Ref.
13 provinces	–	Main cause of infection: contact with shepherd dogs (17.27% infection rate)	22
Iran	1.33 in Hamedan, 3 in Kashan, 1.18 in Babol; 0.61 overall in Iran	Stray dogs' infection rates range from 5% to 49% in different parts of Iran	54
Gilan	–	10.9% prevalence in buffaloes; dominant genotype: G1	25
Mazandaran	–	Liver most commonly affected organ; half of patients had no history of animal contact	32
North Khorasan	–	58.3% of patients were women; liver most frequently involved organ	58
Iran (slaughtered livestock)	13.9% among cattle, sheep, goats, camels, buffaloes	Higher prevalence in provinces like Kurdistan, Gilan, Khorasan, Ardabil, and Fars	77

in an endemic area of Central Iran: a GIS-based survey, *PloS One*, 11(8): e0161317 .

3. Akhtardanesh, B., Sadr, S., Khedri, J., Bamorovat, M., Salarkia, E., Sharifi, I. 2024. Canine leishmaniasis caused by *Leishmania Tropica* in southeastern Iran: a case series study. *Scientific Reports*, 14(1):25599.

4. Alatif H. Burden and Trends of Leishmaniasis over the last one decade across the globe: Trend analysis of WHO regions. *Integr J Med Sci [Internet]*. 2020 Dec. 8 [cited 2025 Jun 10];8. Available from: <https://mbmj.org/index.php/ijms/article/view/295>

5. Alvar, J., Vélez, I.D, Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7:e35671.

6. Asbury, A.K., Cornblath, D.R. 1990. Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barre syndrome. *Annals of Neurology*, 27(1):S21-S24.

7. Badirzadeh, A., Mohebbali, M., Asadgol, Z., Soong, L., Zeinali, M., Mokhayeri, Y. 2017. The burden of leishmaniasis in Iran, acquired from the global burden of disease during 1990-2010. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 7(9):513-518.

8. Badirzadeh, A., Mohebbali, M., Ghasemian, M., Amini, H., Zarei, Z., Akhound, B. 2013. Cutaneous and post kala-azar dermal leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in endemic areas of visceral leishmaniasis, northwestern Iran 2002–2011: a case series, *Pathogens and Global Health*, 107(4):194-197.

9. Bijari, B., Sharifzadeh, GR, Abbasi, A., Salehi, S. 2011. Epidemiological survey of animal bites in east of Iran. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases*, 6(2):90-92.

نتیجه‌گیری

اقدامات و راهکارهای پیشگیرانه برای کنترل و کاهش روند رو به رشد و گسترش بیماری‌های زئونوز باید در نظر گرفته شود که برخی از آنها بصورت پیشنهاد ارائه می‌گردد: ۱- کنترل جمعیت سگ‌های ولگرد از طریق عقیم‌سازی، پلاک‌گذاری و نگهداری ایمن، ۲- ایجاد سامانه یکپارچه گزارش‌دهی و مراقبت از بیماری‌ها با مشارکت مراکز بهداشتی و دامپزشکی، ۳- غربالگری و درمان رایگان افراد مشکوک یا آلوده، با اولویت مناطق بومی، ۴- آموزش هدفمند و پایدار به جامعه محلی، روستایی و کارکنان بهداشتی، ۵- پایش ژنتیکی ناقلان (پشه خاکی و سگ‌ها) و سویه‌های بیماری‌زا، برای ارتقای راهبردهای درمانی و پیشگیری و ۶- تقویت همکاری بین‌بخشی بین وزارت بهداشت، دامپزشکی، محیط‌زیست و شهرداری‌ها. اجرای ترکیبی این اقدامات، می‌تواند زمینه کاهش پایدار بار بیماری‌های زئونوز را در ایران فراهم سازد.

منابع

1. Abedi, M., Doosti-Irani, A., Jahanbakhsh, F., Sahebkar A. 2019. Epidemiology of animal bite in Iran during a 20-year period (1993-2013): a meta-analysis. *Tropical Medicine and Health*, 47:55.
2. Abedi-Astaneh, F., Hajjarian, H., Yaghoobi-Ershadi, M.R., Hanafi-Bojd, A.A., Mohebbali M., Shirzadi, M.R. 2016. Risk mapping and situational analysis of cutaneous leishmaniasis

21. Eisenman, E.J.L., Uhart, M.M., Kusch, A., Vila, A.R., Vanstreels, R.E.T., Mazet, J.A. K., Briceño, C. 2023. Increased prevalence of canine echinococcosis a decade after the discontinuation of a governmental deworming program in Tierra del Fuego, Southern Chile. *Zoonoses and Public Health*, 70:213-222.
22. Eslami, A., Hosseini, SH. 1998. *Echinococcus granulosus* infection of farm dogs in Iran. *Journal of Parasitology Research*, 84(3):205-207.
23. Fallah, M., Taherkhani, H., Sadjjadi, M. 1995. Echinococcosis in stray dogs in Hamedan, west of Iran. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 29:170-172.
24. Fasihi Harandi, M., Budke, C.M., Rostami, S. 2012. The Monetary Burden of Cystic Echinococcosis in Iran. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(11):e1915.
25. Ghanbari, F., Ashrafi, K., Fasihi Harandi, M., Abbaszadeh, S., Ashouri, A., Hajjalilo, E., Sharifdini, M. 2025. Frequency and Sequence Analysis of *Echinococcus granulosus* Sensus Lato Isolated from Buffaloes in Northern Iran. *Veterinary Medicine and Science*, 11(3):e70328.
26. Gholamrezaei, M., Mohebbali, M., Hanafi-Bojd, A.A., Sedaghat, M.M., Shirzadi, M.R. 2016. Ecological Niche Modeling of main reservoir hosts of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran, *Acta Tropica*, 160:44-52.
27. Gottstein, B., Saucy, F., Deplazes, P., Reichen, J. 2001. Is high prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild and domestic animals associated with disease incidence in humans? *Emerging Infectious Diseases*, 7:408-412.
28. Hanafi-Bojd, A.A., Yaghoobi-Ershadi, M.R., Haghdoost, A.A., Akhavan, A.A., Rassi, Y., Karimi, A. 2015. Modeling the distribution of cutaneous leishmaniasis vectors (Psychodidae: Phlebotominae) in Iran: a potential transmission in disease prone areas. *Journal of Medical Entomology*, 52(4):557-565.
29. Hemachudha, T., Wacharapluesadee, S., Mitrabhakdi, E., Wilde, H., Morimoto, K., Lewis, RA. 2005. Pathophysiology of human paralytic rabies. *Journal of Neurovirology*, 11(1):93-100.
30. Hemachudha, T., Phanuphak, P., Sriwanthana, B., Manutsathit, S., Phanthumchinda, K., Siriprasomsup, W., Ukachoke, C., Rasameechan, S., Kaoroptham, S. 1988. Immunologic study of human
10. CDC. 2024. Rabies-General Information. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/rabies/index.html>.
11. Chaâbane-Banaoues, R., Oudni-M'rad, M., Cabaret, J., M'rad, S., Mezhoud, H., Babba, H. 2015. Infection of dogs with *Echinococcus granulosus*: causes and consequences in an hyperendemic area. *Parasites and Vectors*, 8:1-9.
12. Chahed, M.K., Bellali, H., Touinsi, H., Cherif, R., Safta, B., Essoussi, M., Kilani, T. 2010. Distribution of surgical hydatidosis in Tunisia, results of 2001-2005 study and trends between 1977 and 2005. *Archives de L'institut Pasteur de Tunis*, 87(1-2):43-52.
13. Chenani-Rahimi, K., Maleki, M., Behbahani, A. 2022. Cutaneous Leishmaniasis Analyses in an Endemic Focus in Southwest Iran (2016-2020). *Disease and Diagnosis*, 11(4):137-141.
14. Ciaramella, P., Oliva, G.d., De Luna, R. 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record Case Reports*, 141(21):539-543.
15. Dakkak, A. 2010. Echinococcosis/ hydatidosis: A severe threat in Mediterranean countries. *Veterinary Parasitology*, 174:2-11.
16. Dalimi, A., Motamedi, G., Hosseini, M., Mohammadian, B., Malaki, H., Ghamari, Z. 2002. Echinococcosis/ hydatidosis in western Iran. *Veterinary Parasitology*, 105(2):161-171.
17. Davoudi-Kiakalayeh, A., Gharib, Z., Mohammadi, R., Kanafi Vahed, L., Davoudi-Kiakalayeh, S. 2024. Trends in Animal Bites and Rabies-related Deaths in Northern Iran: Implications for Public Health Interventions. *Archives of Iranian Medicine*, 27(5):272-276.
18. Deplazes, P., Alther, P., Tanner, I., Thompson, R.C.A. 1999. *Echinococcus multilocularis* coproantigen detection by enzyme linked immunosorbent assay in fox, dog, and cat populations. *Journal of Parasitology Research*, 85:115-121.
19. Eckert, J., Conraths, F.J., Tackmann, K. 2000. Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *International Journal for Parasitology*, 30:1283-1294.
20. Editorial. 1975. Diagnosis and management of human rabies. *British Medical Journal*, 3:721-722.

Journal of Zoonotic Diseases.
https://doi.org/10.22034/jzd.2025.64699.1336

41. Moghaddam, Y., Ziaei Hezarjaribi, H., Fakhar, M., Pagheh, A.S., Saberi, R., Nazar, E., Sharbatkhori, M., Ghalehnoei, H. 2022. New epidemiological feature of cutaneous leishmaniasis in an endemic focus in Golestan province. *Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*, 27(3):77-88.
42. Mohammadzadeh, A., Mahmoodi, P., Sharif, A., Moafi, M., Erfani, H., Siavashi, M. 2017. A three-year epidemiological study of animal bites and rabies in Hamedan Province of Iran. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 4(2):45031-45031.
43. Mohebbali, M., Edrissian, G., Akhoundi, B., Shirzadi, M., Hassanpour, G., Behkar, A., Rassi, Y., Hajjaran, H., Keshavarz, H., Gouya, M. M., Arshi, S., Zeinali, M., Zarei, Z., Sharifi, I., Kakooei, Z. 2023. Visceral Leishmaniasis in Iran: An Update on Epidemiological Features from 2013 to 2022. *Iranian Journal of Parasitology*, 18(3):279-293.
44. Moro, P., Schantz, P.M. 2006. Cystic echinococcosis in the Americas. *Parasitology International*, 55:S181-S186.
45. Mostafavi, E., Ghasemian, A., Abdinasir, A., Nematollahi Mahani, SA, Rawaf, S, Salehi Vaziri, M. 2021. Emerging and re-emerging infectious diseases in the WHO eastern Mediterranean region, 2001-2018. *International Journal of Health Policy and Management*, 11:1286-300.
46. Nadirn, A., Javadian, E., Mohebbali, M. 1997. The experience of leishmanization in the Islamic Republic of Iran. *Eastern Revent*, 3(2):284.
47. Nonaka, N., Iida, M., Yagi, K., Ito, T. 1996. Time course of coproantigen excretion in *Echinococcus multilocularis* infections in foxes and an alternative definitive host, golden hamsters. *International Journal for Parasitology*, 26:1271-1278.
48. Norouzinezhad, F., Ghaffari, F., Norouzinejad, A., Kaveh, F., Gouya, M.M. 2016. Cutaneous leishmaniasis in Iran: results from an epidemiological study in urban and rural provinces. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(7):614-619.
49. Oryan, A., Akbari, M. 2016. Worldwide risk factors in leishmaniasis, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(10):925-932.
- encephalitic and paralytic rabies: preliminary report of 16 patients. *The American Journal of Medicine*, 84(4):673-677.
31. Holakouie-Naieni, K., Mostafavi, E., Boloorani, A.D., Mohebbali, M., Pakzad, R. 2017. Spatial modeling of cutaneous leishmaniasis in Iran from 1983 to 2013. *Acta Tropica*, 166:67-73.
32. Islami Parkoohi, P., Jahani, M., Hosseinzadeh, F., Taghian, S., Rostami, F., Mousavi, A., Rezai, M.S. 2018. Epidemiology and Clinical Features of Hydatid Cyst in Northern Iran from 2005 to 2015. *Iranian Journal of Parasitology*, 13(2):310-316.
33. Jackson, A.C. 2018. Rabies: a medical perspective. *Revue Scientifique et Technique*, 37(2):569-580.
34. Jenkins, E.J., Schurer, J.M., Gesy, K.M. 2011. Old problems on a new playing field: Helminth zoonoses transmitted among dogs, wildlife, and people in a changing northern climate. *Veterinary Parasitology*, 182:54-69.
35. Johnson, N., Un, H., Fooks, A.R., Freuling, C., Müller, T., Aylan, O. 2010. Rabies epidemiology and control in Turkey: past and present. *Epidemiology and Infection*, 138(3):305-312.
36. Khoubfekr, H., Rahmanian, V., Jokar, M., Balouchi, A., Pourvahed, A. 2024. Epidemiological analysis of cases of animal bite injuries at rabies prevention centers affiliated with Iranshahr University of Medical Sciences. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 65:E491-E498.
37. Oku, Y., Kamiya, M. 2003. Biology of *Echinococcus*. In Otsuru, M, Kamegai, S, Hayashi, S, eds. *Progress of Medical Parasitology in Japan*. Tokyo: Meguro Parasitological Museum, pp:293-318.
38. Lentz, T.L., Burrage, T.G., Smith, A.L., Tignor, G.H. 1983. The acetylcholine receptor as a cellular receptor for rabies virus. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 56(4):315.
39. Maier T., Schwarting A., Drosten C. 2010. Management and outcomes after multiple corneal and solid organ transplantations from a donor infected with rabies virus. *Clinical Infectious Diseases*, 50(8):1112-1119.
40. Mirzaei, B., Doshmangir, L., Khabiri, R., Teimouri, H., Razzaghi A., Gordeev, V.S. 2025. Incidence and forecasting of animal bites and trends in post-exposure prophylaxis (PEP) consumption in East Azerbaijan province.

61. Shokri, A., Sharifi, I., Khamesipour, A., Nakhaee, N., Fasihi Harandi, M., Nosratabadi, J. 2012. The effect of verapamil on in vitro susceptibility of promastigote and amastigote stages of *Leishmania tropica* to meglumine antimoniate, *Journal of Parasitology Research*, 110(3):1113-1117.
62. Shokri, A., Fakhar, M., Teshnizi, S.H. 2017. Canine visceral leishmaniasis in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Acta Tropica*, 165:76-89.
63. Shokri, A., Saeedi, M., Fakhar, M., Morteza-Semnani, K., Keighobadi, M., Teshnizi, S.H. 2017. Antileishmanial activity of *Lavandula angustifolia* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and nano-emulsions on *Leishmania major*, Iran. *Journal of Parasitology Research*, 12(4):622.
64. Shokri, A., Sabzevari, S., Hashemi, S.A. 2020. Impacts of flood on health of Iranian population: infectious diseases with an emphasis on parasitic infections. *Parasite Epidemiology and Control*, 9:e00144.
65. Smith, J.S., Fishbein, D.B., Rupprecht, C.E. Clark, K. 1991. Unexplained rabies in three immigrants in the United States: a virologic investigation. *The New England Journal of Medicine*, 324(4):205-211.
66. Srinivasan, A., Burton, E.C., Kuehnert, M.J., Rupprecht, C., Sutker, W.L., Ksiazek, T.G., Paddock, C.D., Guarner, J., Shieh, W.J., Goldsmith, C., Hanlon, C.A. 2005. Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. *The New England Journal of Medicine*, 352:1103-1111.
70. Tadayonfar, R., Dabbagh-Moghaddam, A., Barati, M., Kazemi-Galougahi, M.H., Aminifarsani, Z., Jalallou, N., Khaghani, R. 2024. Analysis of cutaneous leishmaniasis among military personnel in the Islamic Republic of Iran: a spatiotemporal study between 2018 and 2022, trend forecasting based on ARIMA model. *BMC Infectious Diseases*, 24(1):1310.
71. Teimouri, A., Mohebbali, M., Kazemirad, E., Hajjaran, H. 2018. Molecular identification of agents of human cutaneous leishmaniasis and canine visceral leishmaniasis in different areas of Iran using internal transcribed spacer 1 PCR-RFLP. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 12 (2): 162.
72. Tillotson, J.R., Axelrod, D. Lyman, D.O. 1977. Rabies in a laboratory worker. New York.
50. Pasa, S., Kargin, F., Bildik, A., Seyrek, K., Ozbel, Y., Ozensoy, S. 2003. Serum and hair levels of zinc and other elements in dogs with visceral leishmaniasis. *Biological Trace Element Research*, 94(2):141-147.
51. Piroozi, B., Moradi, G., Alinia, C., Mohamadi, P., Gouya, M.M., Nabavi, M., 2019. Incidence, burden, and trend of cutaneous leishmaniasis over four decades in Iran, Iran. *Journal of Public Health Medicine*, 48:28-35.
52. Postigo, J.A.R. 2010. Leishmaniasis in the world health organization eastern mediterranean region. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36:S62-S65.
53. Rejali, M., Mohammadi Dashtaki, N., Ebrahimi, A., Heidari, A., Maracy, M.R. 2022. Cutaneous leishmaniasis based on climate regions in Iran (1998-2021): A systematic review and meta-analysis. *Advanced Biomedical Research*, 11:120.
54. Rokni, M.B. 2009. Echinococcosis/hydatidosis in Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 4(2):1-16.
55. Romig, T. 2002. Spread of *Echinococcus multilocularis* in Europe? In Craig, P, Pawlowski, Z, eds. *Cestode Zoonosis: Echinococcosis and Cysticercosis*. Amsterdam: IOS Press, pp:65-80.
56. Rostampour, F. 2024. Epidemiological patterns of animal bites in Northwest of Iran. *Health Science Monitor*, 3(2):141-147.
57. Sabzevari, S., Hosseini Teshnizi, S., Shokri, A., Bahrami, F., Kouhestani, F. 2021. Cutaneous leishmaniasis in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, 152:104721.
58. Salehi, M., Adinezhade, A., Khodajou, R., Saberi karimian, Z., Yousefi, A. 2013. The epidemiologic survey of operated patients with hydatid cyst in hospitals of North Khorasan province during 2010-2011. *North Khorasan University of Medical Sciences*, 4(4):623-629
59. Sharifi, I., Daneshvar, H., Ziaali, N., Fasihi harand, M., Nikian, Y., Ebrahimi, A. 1996. Evaluation of a Control Program on Hydatid Cyst in City of Kerman. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 3(4):168-174
60. Sheikh, K.A., Ramos-Alvarez, M., Jackson, A.C., Li, C.Y., Asbury, A.K., Griffin, J.W. 2005. Overlap of pathology in paralytic rabies and axonal Guillain-Barre syndrome. *Annals of Neurology*, 57(5):768-772.

82. World Health Organization. 2010. Control of the leishmaniasis. World Health Organ (Tech Rep Ser), 949:1-186.
83. World Health Organization. 2011. Interagency Meeting on Planning the Prevention and Control of Neglected Zoonotic Disease (NDZs). Geneva .
84. World Health Organization. 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases. World Health Organization.
85. World Health Organization. 2019. Leishmaniasis. Fact Sheet, WHO, 2019. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
86. World Health Organization. 2020. *Echinococcosis Fact Sheet*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/echinococcosis>.
87. World Health Organization. 2021. Echinococcosis. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/echinococcosis>.
88. World Health Organization. 2022. Tackling dog-related zoonoses in the Islamic Republic of Iran: momentum grows to prevent and control cystic echinococcosis. <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/tackling-dog-related-zoonoses-in-the-islamic-republic-of-iran> 21 June 2022.
89. Zarrinkar, F., Sharifi, I., Oliaee, R. T., Afgar, A., Molaakbari, E., Bamorovat, M., Asadi, M. 2025. Identification of C β S and ODC antimony resistance markers in anthroponotic cutaneous leishmaniasis field isolates by gene expression profiling. *Parasite Epidemiology and Control*, 2025:e00413.
90. Zuñiga-A, I., Jaramillo-A, C.J., Martínez-M J.J., Cárdenas-L, J. 1999. Investigación experimental de la equinococosis canina a partir de quiste hidatídico de origen porcino en México. *Revista de Saúde Pública*, 33(3):302-308.
- The Morbidity and Mortality Weekly Report*, 26: 183-184.
73. Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M.R., Ruiz-Esmenjaud, J., Arenas, R. 2017. Leishmaniasis, a review. *F1000Research*. 6:750.
74. Tsukada, H., Morishima, M., Nonaka, N., Oku, Y. 2000. Preliminary study of the role of red foxes in *Echinococcus multilocularis* transmission in the urban area of Sapporo, Japan. *Parasitology*, 120:423-428.
75. Valderrama, A.A., Mamani, G., Uzuriaga, F.J. 2023. Determination of copro-prevalence of *Echinococcus granulosus* and associated factors in domestic dogs: a household cross-sectional study in Huancarama, Peru. *Austral Journal of Veterinary Science*, 55:167-175.
76. Vora, N.M., Basavaraju, S.V., Feldman, K.A., Paddock, C.D., Orciari, L., Gitterman, S., Griesse, S., Wallace, R.M., Said, M., Blau, D.M., Selvaggi, G. 2013. Raccoon rabies virus variant transmission through solid organ transplantation. *The Journal of the American Medical Association*, 310(4):398-407.
77. Vaisi-Raygani, A., Mohammadi, M., Jalali, R., Salari, N., Hosseini-Far, M. 2021. Prevalence of cystic echinococcosis in slaughtered livestock in Iran: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 21(1):429
78. Warrell, D.A., Davidson, N.M., Pope, H.M., Bailie, W.E., Lawrie, J.H., Ormerod, L.D., Kertesz, A. Lewis, P. 1976. Pathophysiologic studies in human rabies. *American Journal of Medicine Studies*, 60(2):180-190.
79. Warrell, M.J., Warrell, D.A. 2004. Rabies: the clinical features. *Seminars in Neurology*.
80. Winkler, W.G., Fashinell, T.R., Leffingwell, L., Howard, P. Conomy, J.P. 1973. Airborne rabies transmission in a laboratory worker. *The Journal of the American Medical Association*, 226:1219-1221.
81. World Health Organization (WHO). 1995. Report of the Second WHO Meeting on Emerging Infectious Diseases, Geneva, Switzerland, and 12-13 January 1995.

Research Article

Investigating the Effect of Soil and Fodder Macro Elements on the Serum Levels of Macro Elements of Sheep Grazing in Pastures of Golestan Province

Jalal-e-din Khallizadeh^{1*}, Mohammad Asadi²

1- Department of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- Department of Animal and Poultry Nutrition, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Gorgan, Iran

*Corresponding author: jalal.addinn@gmail.com

Received: 21 October 2024

Accepted: 26 December 2024

DOI: 10.60833/ascij.2025.1187831

Abstract

Every year, many cases of clinical diseases caused by the lack of mineral elements in sheep are reported in Golestan province; while researches related to soil and plant elements and their interaction effects on livestock in the region are limited. The aim of the present study is to investigate the effect of soil and fodder macro elements on the serum levels of macro elements of sheep grazing in pastures of Golestan province. For this purpose, 50 soil samples, pasture fodder and sheep blood serum samples from 5 regions were collected and tested. The results showed that there was a significant difference in the amounts of organic carbon, phosphorus, magnesium and potassium of soil samples in case study pastures ($p < 0.05$), so that the highest amount of these elements was found in the pasture of Qoranaq. While the amounts of calcium, sulfur, sodium and chlorine in soil samples were not significantly different among different pastures. A significant difference was observed in the amounts of phosphorus, magnesium and potassium of plant samples in different pastures ($p < 0.05$), but there was no significant difference in the amounts of calcium, sulfur, sodium and chlorine in these pastures. A significant difference was found in the concentration of phosphorus and magnesium in the blood serum of grazing sheep in different pastures ($p < 0.05$), so that the concentration of phosphorus in the blood serum of grazing sheep in Qoranaq region was higher than that of sheep in other pastures, and also the concentration of magnesium in the blood serum of grazing sheep in Haji Goshan region was lower. It was from sheep of other pastures ($p < 0.05$). While there was no significant difference in the concentration of calcium, potassium, sulfur, sodium and chlorine in the blood of grazing sheep in different pastures. In general, the results showed that the amount of mineral elements of soil and pasture plants can influence the status of serum mineral elements of grazing sheep in Golestan pastures.

Keywords: Soil, Pasture fodder, Blood parameters, Ewe, Macro mineral.

بررسی اثر مقادیر عناصر ماکرو خاک و علوفه بر روی سطوح سرمی عناصر ماکرو در گوسفندان تحت چرای مراتع استان گلستان

جلال‌الدین خال‌لی‌زاده^{۱*}، محمد اسدی^۲

۱- گروه مهندسی علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

۲- گروه تغذیه دام و طیور، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، گرگان، ایران

*مسئول مکاتبات: jalal.addinn@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۳۰

DOI: 10.60833/ascij.2025.1187831

چکیده

سالانه موارد زیادی از بیماری‌های بالینی ناشی از کمبود عناصر معدنی در گوسفندان در استان گلستان گزارش می‌شود؛ در حالیکه پژوهش‌ها در رابطه با عناصر خاک و گیاه و اثرات متقابل آنها بر دام‌های منطقه محدود است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر مقادیر عناصر ماکرو خاک و علوفه بر روی سطوح سرمی عناصر ماکرو گوسفندان تحت چرا در مراتع استان گلستان می‌باشد. نتایج نشان داد که در مقادیر کربن آلی، فسفر، منیزیم و پتاسیم نمونه‌های خاک در چراگاه‌های مورد مطالعه، تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید ($p < 0/05$)، بطوریکه بالاترین مقدار این عناصر در چراگاه قرناق یافت شد. در حالیکه مقادیر کلسیم، گوگرد، سدیم و کلر نمونه‌های خاک در بین چراگاه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت. مقادیر فسفر، منیزیم و پتاسیم نمونه‌های گیاهی در چراگاه‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید ($p < 0/05$) اما در این چراگاه‌ها مقادیر کلسیم، گوگرد، سدیم و کلر نمونه‌های گیاهی اختلاف معنی‌داری نداشت. در غلظت فسفر و منیزیم سرم خون گوسفندان چراکننده در مراتع مختلف تفاوت معنی‌داری یافت شد ($p < 0/05$) بطوریکه غلظت فسفر سرم خون گوسفندان چراکننده در منطقه قرناق بیشتر از گوسفندان سایر چراگاه‌ها بود و همچنین غلظت منیزیم سرم خون گوسفندان چراکننده در منطقه حاجی قوشان کمتر از گوسفندان سایر چراگاه‌ها بود ($p < 0/05$). در حالیکه در غلظت کلسیم، پتاسیم، گوگرد، سدیم و کلر سرم خون گوسفندان چراکننده در مراتع مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در حالت کلی نتایج نشان داد که میزان عناصر معدنی خاک و گیاهان مرتعی می‌تواند بر وضعیت عناصر معدنی سرم میش‌های چراکننده در مراتع گلستان مؤثر باشد.

کلمات کلیدی: خاک، علوفه مرتعی، فراسنجه‌های خونی، میش، ماکرو مینرال.

مقدمه

اکوسیستم‌های مرتعی شده است (۱۱، ۳۷). تولیدات گیاهی و غنای گونه‌ای دو ویژگی اساسی مراتع هستند و این دو ویژگی می‌توانند ساختار و عملکرد اکوسیستم‌های مرتعی را منعکس کنند (۳۹، ۴۲). فلات لسی استان گلستان دارای مراتع با اهمیتی

مراتع اکوسیستم‌های مهمی هستند که تقریباً ۳۰ درصد از مساحت زمین را تشکیل می‌دهند و منابع مهمی برای تولید علوفه دام و حفاظت از تنوع زیستی هستند (۴). تغییرات آب و هوایی و فعالیت‌های بشر سبب کاهش بهره‌وری مراتع و از بین رفتن تنوع گونه‌ای

می‌باشد که یکی از اصلی‌ترین کاربرد آن‌ها تامین علوفه و چرای دام‌ها است. در استان گلستان و به ویژه در مراتع فلات لسی شهرستان کلالة، مطالعه‌ای با توجه به وسعت و تنوع مراتع در زمینه میزان عناصر معدنی خاک و گیاهان مرتعی و ارتباط آن با وضعیت تأمین عناصر معدنی در دام‌های چراکننده در مراتع که فقط از گیاهان مرتعی به عنوان منبع تغذیه استفاده می‌کنند، انجام نگرفته است، بنابراین ضرورت دارد تحقیقاتی در این زمینه انجام و میزان اطلاعات بومی، منطقه‌ای و ملی در این ارتباط افزایش یابد. ارتباط بین محتویات و در دسترس بودن عناصر معدنی در خاک با ترکیبات معدنی در گیاهان و محتوای مواد معدنی که به حیوانات منتقل می‌شود بسیار مهم است. ترکیب معدنی گیاهان علوفه‌ای تحت تأثیر عوامل خاک-گیاه از جمله pH خاک، زهکشی، کوددهی، گونه‌های علوفه و بلوغ علوفه قرار می‌گیرد (۲۰). مواد معدنی مختلف بر عملکرد تولید مثلی نشخوارکننده به تنهایی یا در ترکیب با عناصر دیگر تأثیر می‌گذارند، دام‌ها معمولاً بیشتر مواد معدنی خود را از خوراک و علوفه-هایی که مصرف می‌کنند به دست می‌آورند (۴۱) و میزان مواد معدنی آن‌ها تحت تأثیر عواملی است که میزان مواد معدنی گیاهان را تعیین می‌کند، غلظت تمام مواد معدنی در دام‌ها تا حد زیادی به چهار عامل: (i) ژنوتیپ گیاه، (ii) عناصر خاک، (iii) آب و هوا و (vi) مرحله بلوغ دام بستگی دارد (۳۸). در میان این عوامل، خاک نقش عمده‌ای در تولید و سلامت دام ایفا می‌کند، زیرا دام‌ها مواد مغذی خود را از خوراک و علوفه به دست می‌آورند که به نوبه خود مواد مغذی را از خاک به دست می‌آورند (۱۵). نقش خاک و کیفیت تغذیه‌ای گیاهان با توجه به سلامت و تولید دام بسیار مهم می‌باشد و از مکانی به مکان دیگر متفاوت است (۴۱). عواملی که بر ترکیب مواد معدنی در گیاهان تأثیر می‌گذارند بسته به محل رشد آن‌ها بسیار

متفاوت هستند و به طور کلی ترکیب شیمیایی گیاهان تا حد زیادی تحت تأثیر خواص ذاتی خاک است (۱۷). با این حال ممکن است تمام مواد معدنی مورد نیاز گوسفندان تحت چرا از علوفه مراتع تامین نشود (۱۳)، این موضوع می‌تواند باعث رشد ضعیف حیوانات و مشکلات تولید مثلی حتی زمانی که عرضه علوفه کافی باشد، شود و می‌تواند مستقیماً با کمبود مواد معدنی ناشی از غلظت کم مواد معدنی در خاک و علوفه‌ها مرتبط باشد (۱۵). عناصر کلسیم، منیزیم، فسفر، پتاسیم، سدیم، کلر و گوگرد به مقدار نسبتاً زیادی برای دام‌ها مورد نیاز هستند که برای حیوان اهمیت حیاتی دارند (۲۳). کلسیم، فسفر و منیزیم در متابولیسم وظایف مشابهی به عهده دارند، یکی از مهم‌ترین وظایف آن‌ها مشارکت در ساختمان استخوان و دندان‌ها می‌باشد (۳۸). همچنین عناصر کلسیم و منیزیم برای فعال کردن یک سری آنزیم‌ها نیز حائز اهمیت می‌باشند؛ مثلاً کلسیم فعال‌کننده آنزیم‌های هضمی (تریپسین) و همچنین آنزیم‌های متابولیسم میانی از جمله ترمبوکیناز که برای انعقاد خون مهم است، می‌باشد و منیزیم فسفات‌های قلیائی، ارژینازها و کینازها را فعال می‌کند (۳۱). کلسیم و منیزیم علاوه بر این برای تحریک اعصاب و انقباض ماهیچه‌ها نیز ضروری هستند (۲۳). گذشته از این‌ها کلسیم بطور کلی بر نفوذپذیری سلول‌ها تأثیر داشته و موجب انتقال مواد از جدار مشترک سلول‌ها می‌شود. فسفر که در بدن حیوان فقط به شکل ترکیبات اسید اورتوفسفریک یافت می‌شود، در ساختمان اسیدنوکلیک، فسفو پروتیدها و فسفوپپتیدها و بسیاری از آنزیم‌ها مشارکت دارد و بنابراین برای فرآیندهای حیاتی از اهمیت بنیادی برخوردار است (۸، ۳۱). علاوه بر این فسفر در انتقال و ذخیره انرژی نقش اساسی دارد و در خون و مایعات درون سلولی به عنوان آنیون توازن بار الکتریکی را بر عهده

دارد (۳۸). عناصر سدیم، پتاسیم و کلر برای حفظ فشار اسمزی مایعات بدن و موجودی اسید و باز ضروری می‌باشند؛ همچنین وجود سدیم توأم با پتاسیم برای پولاریزاسیون غشاء سلول‌های عصبی و تحریک تارهای عضلانی ضروری است (۳۱، ۳۵). این دو عنصر سهم عمده‌ای نیز در حفظ پتانسیل غشاء سلول‌ها دارند، در نتیجه بر انتقال مواد مغذی تأثیر گذار هستند (۱۸). همچنین پتاسیم فعال کننده آنزیم‌های متابولیسم کربوهیدرات و چربی نیز می‌باشد و کلر نیز به عنوان کوآنزیم آلفا آمیلاز پانکراس در واکنش‌های آنزیمی مشارکت دارد و برای تولید اسید کلریدریک معده نیز ضروری است (۳۱، ۳۸). فلات لسی استان گلستان دارای مراتع با اهمیتی می‌باشد که یکی از اصلی‌ترین کاربرد آن‌ها تامین علوفه و چراگاه دام است. در استان گلستان و به ویژه در مراتع فلات لسی شهرستان کلاله، مطالعه‌ای با توجه به وسعت و تنوع مراتع در زمینه میزان عناصر معدنی خاک و گیاهان مرتعی و ارتباط آن با وضعیت تأمین عناصر معدنی در دام‌های چراکننده در مراتع که فقط از گیاهان مرتعی به عنوان منبع تغذیه استفاده می‌کنند، انجام نگرفته است، بنابراین ضرورت دارد تحقیقاتی در این زمینه انجام و میزان اطلاعات بومی، منطقه‌ای و ملی در این ارتباط افزایش یابد. با توجه به این که نقش خاک و کیفیت تغذیه‌ای گیاهان بر سلامت و تولید دام بسیار مهم می‌باشد، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر مقادیر عناصر ماکرو خاک و علوفه بر روی سطوح سرمی عناصر ماکرو گوسفندان تحت چرا در مراتع استان گلستان صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: این مطالعه در خرداد ماه فصل بهار سال ۱۴۰۲ در شهرستان کلاله انجام گرفت، تعداد ۵۰ نمونه خاک از ۵ منطقه مختلف شهرستان کلاله

(روستاهاى آق چاتال، یلی بدراق، گچی سو، قرقناق، حاجی قوشان) از هر منطقه ۱۰ نمونه به فاصله ۵۰۰ متر از عمق ۱۵-۰ سانتی متری خاک (وزن هر نمونه ۲۵۰ گرم) و نیز تعداد ۵۰ نمونه علوفه بالغ مرتعی که ترکیب همگنی از گونه‌های علوفه‌ای بودند (وزن خشک شده هر نمونه خشک ۵۰ گرم) زمین چیده و پس از بسته‌بندی، برای اندازه‌گیری مقادیر عناصر کلسیم، فسفر، منیزیم، پتاسیم، گوگرد، سدیم و کلر به آزمایشگاه منتقل شدند؛ همچنین تعداد ۵۰ نمونه خون گوسفندان مناطق تحت بررسی (هر منطقه ۱۰ رأس) که به صورت تصادفی انتخاب شدند، با هدف ارزیابی مقدار سرمی عناصر ماکرو خون نیز به آزمایشگاه منتقل گردید. لازم به ذکر است که همه‌ی گوسفندان مورد مطالعه ماده‌ی بالغ با سن بیش از یک سال بودند. پرورش گوسفندان در هر پنج منطقه مورد مطالعه به صورت سنتی و تغذیه‌ی آن‌ها در سه ماه منتهی به بررسی حاضر، به طور غالب متکی به مراتع مناطق مورد مطالعه بوده است.

خصوصیات شیمیایی و عناصر خاک: پس از هوا خشک و الک کردن، پهاش خاک به روش الکتروود شیشه‌ای در عصاره ۱:۵ خاک و آب اندازه‌گیری شد. در این روش ۴ گرم خاک را در ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته و مقدار ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه کرده و ۱۵ دقیقه تکان داده شد. سپس به مدت ۱ ساعت استراحت داده و بعد از آن به مدت ۵ دقیقه (۱۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ و سپس صاف و قرائت شد (۱۰). قابلیت‌هدایت‌الکتریکی در عصاره اشباع با استفاده از دستگاه هدایت‌سنج‌الکتریکی دیجیتال و تصحیح آن برای دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد (۱۰). کربن آلی به روش والکی‌بلاک اصلاح شده، توسط دی‌کرومات‌پتاسیم در مجاورت اسیدسولفوریک غلیظ اکسید و سپس توسط آمونیوم فروسولفات نیم نرمال در مجاورت معرف

اورتوفناترولین با روش تیتراسیون اندازگیری شد (۲۵). درصد کربنات کلسیم معادل (آهک) با روش تیتراسیون اسید اضافه با سود، اندازگیری شد (۲۷). فسفر قابل جذب در خاک با عصاره‌گیری خاک با بی‌کربنات سدیم ۰/۵ نرمال و به روش رنگ آبی در طول موج ۶۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری تعیین شد (۲۶). پتاسیم قابل جذب و سدیم خاک با استات آمونیوم یک نرمال پهاش خشی عصاره‌گیری و با دستگاه فلیم فتومتری قرائت شد (۱۴). غلظت عناصر کلسیم و منیزیم خاک به روش تیتراسنجی تشکیل کمپلکس با EDTA و غلظت کلر خاک به روش تیتراسیون با نیترات نقره تعیین شد (۳۶). گوگرد خاک به روش کدورت سنجی و در طول موج ۴۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (۳۶).

عناصر علوفه: جهت آگاهی از عناصر معدنی در نمونه‌های علوفه، از دستگاه پلاسما جفت‌شده القایی (Agilent Technologies, 700 series ICP-OES, USA) استفاده گردید. به‌منظور حداقل کردن تأثیر اندازه ذرات روی خصوصیات اندازه‌گیری شده، تمامی نمونه‌های علوفه پس از آسیاب، از الک ۶۳ میکرومتر عبور داده شد. نیم گرم نمونه را با دو اسید HClO_4 و HF به نسبت ۱۰:۴ در ظروف تفلونی مربوط به حجم چهار اسیدی مخلوط کرده و روی دستگاه گرم‌کن به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. پس از شکستن بافت نمونه‌ها توسط این دو اسید محلول ژل‌های شفاف به دست آمد. در مرحله بعد، دومین هضم اسیدی بعد از خنک شدن کامل این محلول ژل‌ها به‌وسیله دو اسید HNO_3 و HClO_4 به نسبت ۴:۲ به مدت دو ساعت در دمای ۱۵۰-۱۷۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه گرم‌کن انجام گرفت که نتیجه این هضم، ماده شفاف رنگی است که رنگ آن بسته به نوع عنصر موجود در نمونه متفاوت است.

در ادامه، پس از خنک شدن در بالن‌های ۵۰ میلی-لیتری و عملیات رقیق سازی با آب، ماده به حجم ۵۰ رسانده و با کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف گردید؛ سپس بلافاصله نمونه‌ها برای خواندن با دستگاه ICP-OES به فالكون‌ها منتقل شدند (۴۳).

اندازه‌گیری عناصر سرم خون: نمونه‌های خون جهت اندازه‌گیری عناصر سرمی در صبح زود از ورید گردن اخذ گردید. عمل خون‌گیری با استفاده از لوله‌های ونوجکت صورت گرفت و بلافاصله نمونه‌ها به منظور جداسازی پلاسما در ۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و تا روز آزمایش در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت کلسیم، منیزیم، فسفر، پتاسیم، سدیم، کلر و گوگرد با استفاده از دستگاه آنالیز خودکار (SFT-526/King hawk-China) و کیت‌های شرکت پارس آزمون تعیین شد (۱).

طرح آزمایشی و تحلیل آماری داده‌ها: اطلاعات حاصل از آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۱۰ تکرار با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS ویرایش ۹/۱ (۲۰۰۴) تجزیه آماری گردید. مدل آماری به‌صورت زیر بود و مقایسات میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح معنی‌داری پنج درصد و محاسبه ضریب همبستگی پیرسون انجام شد.
$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$
 که Y_{ij} = هر مشاهده از متغیر مورد اندازه‌گیری، μ = میانگین کل، T_i = اثر تیمار i ام و e_{ij} = اثر خطای آزمایشی مربوط به تیمار i ام در تکرار j ام می‌باشند.

نتایج

اطلاعات مربوط به خصوصیات خاک مراتع مورد استفاده در آزمایش در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان داد که در مقادیر کربن آلی، فسفر، منیزیم و پتاسیم نمونه‌های خاک در چراگاه‌های مختلف،

تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید ($p < 0/05$)، بطوریکه بالاترین مقدار این عناصر در چراگاه قرناق یافت شد و در مرتع حاجی قوشان مقدار کربن آلی، فسفر و منیزیم کمترین مقدار بوده است، همچنین مقدار پتاسیم در خاک مرتع گچی سو نسبت سایر مراتع کمتر بوده است. در حالیکه مقادیر کلسیم، گوگرد، سدیم و کلر نمونه‌های خاک در بین چراگاه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت ($p > 0/05$). اطلاعات مربوط به عناصر ماکرو علوفه‌های مرتعی مناطق مورد آزمایش در جدول ۲ آمده است. نتایج نشان داد که مقادیر فسفر، منیزیم و پتاسیم نمونه‌های گیاهی در چراگاه‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید ($p < 0/05$) بطوریکه بالاترین مقدار این عناصر در چراگاه قرناق یافت شد و در گیاهان علوفه‌ای مرتع حاجی قوشان مقدار فسفر و منیزیم کمترین مقدار بوده است، همچنین مقدار پتاسیم در علوفه مرتع گچی سو نسبت به سایر مراتع کمتر بوده است. اما در این چراگاه‌ها مقادیر کلسیم، گوگرد، سدیم و کلر نمونه‌های گیاهی اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > 0/05$). اطلاعات مربوط به عناصر ماکرو

سرم گوسفندان چراگر مناطق مورد آزمایش در جدول ۳ آمده است. در غلظت فسفر و منیزیم سرم خون گوسفندان چراکننده در مراتع مختلف تفاوت معنی‌داری یافت شد ($p < 0/05$) بطوریکه غلظت فسفر سرم خون گوسفندان چراکننده در منطقه قرناق بیشتر از گوسفندان سایر چراگاه‌ها بود و همچنین غلظت منیزیم سرم خون گوسفندان چراکننده در منطقه حاجی قوشان کمتر از گوسفندان سایر چراگاه‌ها بود ($p < 0/05$). در حالیکه در غلظت کلسیم، پتاسیم، گوگرد، سدیم و کلر سرم خون گوسفندان چراکننده در مراتع مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). اطلاعات مربوط به رابطه رگرسیونی عناصر ماکرو بین خاک، مرتع و دام در جدول ۴ آمده است. بیشترین مقدار همبستگی بین خاک و گیاه مراتع در عناصر فسفر ($R^2=0/1867$)، پتاسیم ($R^2=0/1746$) و منیزیم ($R^2=0/1341$) مشاهده گردید. بیشترین مقدار همبستگی بین دام و گیاه مراتع مربوط به منیزیم ($R^2=0/2355$) و بیشترین مقدار همبستگی بین دام و خاک مربوط به فسفر ($R^2=0/2918$) بوده است.

جدول ۱- خصوصیات و غلظت عناصر ماکرو در خاک های مراتع مختلف استان گلستان

Table 1- Characteristics and concentration of macro elements in the soils of different pastures of Golestan province

Mineral	Unit	Pasture name					SEM	p
		Agh Chatal	Ghernagh	Haji Ghoshan	Yelli Badragh	Gachi Su		
EC	dS/m	2.40	2.14	2.44	2.13	2.91	0.613	0.0688
pH	-	7.81	7.68	7.64	7.77	7.69	0.277	0.6320
CaCO ₃	%	19.26	19.60	19.47	19.87	19.16	0.769	0.2696
OC	%	1.65 ^{bc}	2.27 ^a	1.12 ^d	1.86 ^b	1.36 ^{cd}	0.311	0.0001
Ca		2815.90	2684.30	2741.20	2785.80	2717.60	123.755	0.1443
P		14.99 ^b	18.03 ^a	10.65 ^c	15.29 ^b	13.11 ^b	1.748	0.0001
Mg		1476.80 ^a	1493.60 ^a	1288.80 ^b	1517.80 ^a	1587.20 ^a	145.48	0.0007
K	mg/Kg	372.60 ^a	381.70 ^a	326.90 ^{bc}	354.20 ^{ab}	303.70 ^c	31.472	0.0001
S		497.70	446.70	496.80	492.80	463.10	28.380	0.3829
Na		56.91	63.45	55.71	65.05	57.06	5.722	0.2716
Cl		55.79	58.80	63.64	55.51	60.38	7.021	0.5380

جدول ۲- غلظت عناصر ماکرو در گیاهان مراتع مختلف استان گلستان

Table 2- Concentration of macro elements in plants of different pastures of Golestan province

Mineral	unit	Pasture name					SEM	p
		Agh Chatal	Ghernagh	Haji Ghoshan	Yelli Badragh	Gachi Su		
Ca		0.58	0.58	0.60	0.61	0.57	0.055	0.4937
P		0.38 ^b	0.43 ^a	0.33 ^c	0.39 ^b	0.38 ^b	0.061	0.0023
Mg		0.25 ^a	0.27 ^a	0.20 ^b	0.25 ^a	0.26 ^a	0.036	0.0483
K	%	1.44 ^a	1.44 ^a	1.33 ^{ab}	1.45 ^a	1.23 ^b	0.136	0.0413
S		0.26	0.25	0.24	0.26	0.24	0.031	0.4085
Na		0.13	0.15	0.14	0.14	0.14	0.021	0.6230
Cl		0.04	0.05	0.05	0.06	0.04	0.027	0.5245

جدول ۳- غلظت عناصر ماکرو در سرم خون گوسفندان شیری

Table 3- The concentration of macro elements in the blood serum of dairy sheep

Mineral	unit	Pasture name					SEM	p
		Agh Chatal	Ghernagh	Haji Ghoshan	Yelli Badragh	Gachi Su		
Ca	mg/dl	11.43	11.09	11.08	11.37	11.22	0.582	0.5671
P	mg/dl	6.18 ^b	7.15 ^a	5.63 ^c	6.21 ^b	6.25 ^b	0.347	0.0434
Mg	mg/dl	1.54 ^a	1.54 ^a	1.27 ^b	1.54 ^a	1.53 ^a	0.111	0.5469
K	mg/dl	4.99	5.01	5.04	5	4.98	0.172	0.9313
S	μg/dl	0.36	0.35	0.38	0.36	0.35	0.048	0.6554
Na	mg/l	152.78	153.01	151.14	151.35	151.21	6.395	0.9634
Cl	mg/dl	109.31	109.44	108.19	106.35	107.53	4.889	0.6042

جدول ۴- رابطه رگرسیون عناصر ماکرو در خاک-مرتع-دام

Table 4- Regression relationship of macro elements in soil-pasture-animal

Mineral	Soil and Plant	R ²	Plant and Blood	R ²	Soil and Blood	R ²
Ca	y = 9E-05x + 0.345	0.0433	y = -0.0101x + 0.7068	0.0278	y = -5.6025x + 2812.4	0.0016
P	y = 0.0064x + 0.1047	0.1867	y = 0.0171x + 0.0658	0.0918	y = 2.0627x - 2.1863	0.2918
Mg	y = 8E-05x + 0.1348	0.1341	y = 0.1144x + 0.0773	0.2355	y = 226.96x + 1134.8	0.0406
K	y = 0.0017x + 0.7827	0.1746	y = -0.1899x + 2.3327	0.0337	y = -22.531x + 460.67	0.0081
S	y = 1E-05x + 0.2491	0.0023	y = -0.0681x + 0.2797	0.0113	y = 480.54x + 302.87	0.0332
Na	y = -5E-05x + 0.1472	0.0008	y = 0.0006x + 0.0469	0.0341	y = 0.339x + 8.2049	0.031
Cl	y = -0.0003x + 0.0692	0.0166	y = -0.0011x + 0.1703	0.0389	y = 0.4305x + 12.262	0.0303

بحث

به طور کلی، اطلاعات بسیار کمی در مورد مشخصات عناصر ماکرو در میش‌های چراکننده در مناطق تپه ای نیمه گرمسیری در دسترس است، اگرچه مشخصات بیوشیمیایی آنها گزارش شده است (۶، ۱۶). مطالعه حاضر محتوای مواد معدنی در خاک، علوفه و میش را ارزیابی کرد و زنجیره خاک- علوفه- حیوان را در اکوسیستم کشاورزی تپه نیمه گرمسیری گزارش کرد. تغییرات گسترده‌ای در غلظت مواد معدنی خاک مراتع گزارش شده است (۱۲، ۲۴، ۲۸، ۳۴). عوامل متعددی به تغییرات غلظت مواد معدنی در خاک مراتع و منطقه تپه‌ای نسبت داده شده است. خاک‌های منطقه تپه‌ای شمال شرقی ایران عمدتاً قلیایی ($\text{pH} > 7$) هستند. بالا بودن pH خاک در منطقه اساساً به دلیل مقدار آهک بالا می‌باشد. در مطالعه حاضر، از آنجاییکه سطوح کلسیم و فسفر خاک در حد بهینه بوده، تمام نمونه‌های علوفه‌های مرتعی کلسیم و فسفر بالاتری از حد بحرانی داشتند که همسو با نتایج سایر مطالعات بوده است (۲، ۲۲). همچنین دلیل بالا بودن سطح کلسیم در خاک را می‌توان به آهکی بودن خاک منطقه مورد مطالعه نسبت داد. در پژوهش حاضر، در مرتع قرقاق مقدار فسفر خاک و علوفه در بالاترین میزان بوده و در سرم خون میش‌های چراکننده در این مراتع نیز افزایش فسفر خون نسبت به سایر مراتع مشاهده شد. همسو با نتایج حاضر گزارش شده که منابع علوفه‌ای غنی از فسفر سبب افزایش فسفر خون دام می‌شود. همچنین همبستگی مثبت فسفر علوفه و سرم خون دام توسط کاماریسان و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شده است (۱۵). در پژوهش حاضر مقدار منیزیم و پتاسیم خاک مراتع آق‌چاتال، پلی بدراق و قرقاق بیشتر از سایر مراتع بوده و همان نسبت مقدار این عناصر در علوفه‌های مرتعی این مراتع بیشتر از سایر مراتع بوده است. همسو با نتایج حاضر اشرف و

همکاران (۲۰۰۶) بیان داشتند که افزایش عناصر منیزیم و پتاسیم در خاک سبب افزایش این عناصر در پوشش گیاهی منطقه می‌شود (۲). در مراحل اولیه رشد، گیاه معمولاً حاوی مقدار زیادی فسفر و پتاسیم است، اما با بالغ شدن گیاه به سرعت کاهش می‌یابد. این یافته‌ها با یافته‌های گزارش شده توسط لانگ و همکاران (۱۹۹۹) مطابقت داشت (۱۹)، که در آن به نظر می‌رسد خطر کمبود فسفر و پتاسیم در گاومیش‌های چراکننده در اواخر زمستان گسترده است. در پژوهش حاضر، در مرتع حاجی قوشان مقدار منیزیم خاک و علوفه در پایین‌ترین میزان بوده و در سرم خون میش‌های چراکننده در این مراتع نیز کاهش منیزیم خون نسبت به سایر مراتع مشاهده شد. همسو با نتایج کاماریسان و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که منابع علوفه‌ای غنی از منیزیم سبب افزایش منیزیم خون دام می‌شود (۱۵). گوگرد برای کاهش اسیدیته خاک ضروری است و همچنین به عنوان یک ماده غذایی ضروری برای رشد طبیعی گیاه استفاده می‌شود. در پژوهش حاضر مقدار گوگرد خاک مراتع اندک بوده است که سبب افزایش pH خاک می‌شود (۳۰). در pH قلیایی مقدار جذب عناصر در دسترس گیاه کاهش می‌یابد و در نتیجه مقدار این عناصر در علوفه‌های مرتعی منطقه کم بوده است (۲۸). اکثر گیاهان حاوی غلظت نسبتاً کمی سدیم در مقایسه با نیازهای حیوانات هستند که توسط مک داول (۱۹۹۶) گزارش شده است (۲۱). بررسی حاضر نشان داد که غلظت سدیم علوفه مراتع مورد مطالعه بسیار کم است (جدول ۳) و دلیل این امر شوری اندک خاک منطقه می‌باشد. همچنین فریر و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که دام‌های چراکننده در مراتع لسی در معرض کمبود سدیم و کلر قرار می‌گیرند، لذا مصرف مکمل- های بلوک نمک را پیشنهاد نمودند (۹). در تقابل با

و لبنیات دام در رابطه با عناصر کلسیم و منیزیم را گزارش نمودند (۱۲).

نتیجه‌گیری

از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که در خاک و علوفه مراتع استان گلستان با وجود این که عناصر ماکرو در حد بهینه وجود دارد اما میش‌های شیری چراکننده در این مراتع در معرض کمبود مواد معدنی هستند و مصرف مکمل‌های معدنی به دام‌های چراکننده در این مراتع قابل توصیه و برای تولید بهینه ضروری است. علاوه بر این، مطالعه حاضر رابطه بین خاک، علوفه و دام را در منطقه تپه نیمه گرمسیری نشان داد.

منابع

1. Asadi M., Toghdory A., Ghoorchi T., Hatami M. 2024. The effect of maternal organic manganese supplementation on performance, immunological status, blood biochemical and antioxidant status of Afshari ewes and their newborn lambs in transition period. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 108:493-499.
2. Ashraf M.Y., Khan A., Ashraf M., Zafar S. 2006. Studies on transfer of mineral nutrients from feed, water, soil and plants to buffaloes under arid environments. *Journal of Arid Environments*, 65:632-643.
3. Beeson K.C., Matrone G., 1976. The soil factor in nutrition: Animal and Human, Nutrition and Clinical Nutrition Volume 2, Marcel Dekker. New York.
4. Bi X., Li B., Zhang L., Nan B., Zhang X., Yang Z. 2020. Response of grassland productivity to climate change and anthropogenic activities in arid regions of Central Asia. *Peer-reviewed journal*, 8: 9797.
5. Cabrera MC., Saadoun A. 2014. An overview of the nutritional value of beef

این نتایج ژین و همکاران (۲۰۱۱) در پژوهشی نشان دادند که سدیم نسبتاً کافی در سرم گوسفند می‌تواند به دلیل هضم خاک باشد زیرا رفتار خاک لیسیدن گوسفند مشهود است (۴۴). این تا حدی توضیح می‌دهد که اگرچه سطح کمی سدیم در مرتع وجود دارد، سدیم سرم نسبتاً بالاتری در گوسفند ممکن است وجود داشته باشد. محتوای معدنی علوفه‌ها به نوع خاک و شرایط محیطی که در آن رشد می‌کنند بستگی دارد (۳، ۲۱). فقط مقدار کمی از مواد معدنی موجود در خاک بسته به ترکیبات ژئوفیزیکی و شیمیایی توسط گیاهان جذب می‌شود (۲۹). غلظت کم مواد معدنی خاص در خاک باعث کاهش محتوای مواد معدنی در گیاهان رشد شده در چنین خاکی می‌شود. با این حال، خاک غنی از یک ماده معدنی خاص ممکن است به سطح بالاتر آن در گیاه منجر نشود و این امر می‌تواند به دلیل مکانیسم جذب موجود در ریشه گیاهان باشد (۲۳). محتوای غیرعادی عناصر معدنی در حیوانات، به ویژه در خون، کلیه، کبد و سایر قسمت‌ها، می‌تواند نشان‌دهنده بیماری یا مسمومیت حیوان باشد (۳۳). در هنگام چرا، عناصر معدنی موجود در خاک و علوفه در نهایت در دام منعکس می‌شود (۴۰). عناصر معدنی موجود در علوفه تأثیر مهمی بر محتوای و تعادل عناصر معدنی در دام دارند. کمبود عناصر معدنی در علوفه در نهایت منجر به وضعیت کمبود غلظت سرمی دام‌های چرا می‌شود (۵). به عنوان مثال، گاوهای در حال چرا به سطوح بالاتر منیزیم در دوران شیردهی نیاز دارند (۳۲). رشد حیوانات جوان و حیوانات مولد به سطوح معدنی بالاتری نسبت به سایر مراحل فیزیولوژیکی نیاز دارد (۷). همبستگی مثبت بین خاک، علوفه و دام تمام عناصر بجز کلسیم در پژوهش کاماریسان و همکاران (۲۰۱۰) آمده است. همچنین خلیلی و همکاران (۱۹۹۳) همبستگی مثبت بین علوفه و خون

- macro and micro mineral status of dairy cattle in subtropical hill agro ecosystem. *Tropical Animal Health and Production*, 42: 569-577
16. Kumaresan A., Prabhakaran P.P., Bujarbaruah K.M., Pathak K. A., Chhetri B., Ahmed S.K. 2009. Reproductive performance of crossbred dairy cows reared under traditional low input production system in the eastern Himalayas. *Tropical Animal Health and Production*, 41(1):71-78.
 17. Kuria S.G., Wahome R.G., Gachui C.K. Wanyoike M.M. 2004. Evaluation of forages as mineral sources for camels in western Marsabit, Kenya. *South African Journal of Animal Science*, 3:3.
 18. Lewis D. 1969. Applied Animal Nutrition. *Outlook on Agriculture*, 6:89-89.
 19. Long R.J., Zhang D.G., Wang X., Hu Z.Z., Dong S.K. 1999. Effect of strategic feed supplementation on productive and reproductive performance in yak cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 38:195-206.
 20. Marschner P. 2011. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition, 651 p.
 21. McDowell L.R. 1996. Feeding minerals to cattle on pasture. *Animal Feed Science and Technology*, 60(3-4):247-271.
 22. McDowell L.R., Conrad J.H. 1977. Trace mineral nutrition in Latin America. *World Animal Review*, 24:24.
 23. McDowell L.R., Conrad J.H., Hembry, F.G. 1993. Minerals for grazing ruminants in tropical regions. University of Florida, Gainesville
 24. Ndebele N., Mtimuni J.P., Mpofu I.D.T., Makuza S., Mumba, P. 2005. The status of selected minerals in soil, forage and beef cattle tissues in a semi-arid region of Zimbabwe. *Tropical Animal Health and Production*, 37:381-393.
 - and lamb meat from South America. *Meat Science*, 98: 43544.
 6. Das K.C., Malik S., Subudhi P.K. 2006. Chemical composition of tree leaves and shrubs used as fodder in Mizoram. *Indian Journal of Animal Sciences*, 76:163-164.
 7. Dove H., Masters D.G., Thompson A.N. 2016. New perspectives on the mineral nutrition of livestock grazing cereal and canola crops. *Animal Production Science*, 56:135060.
 8. Edwards R.A. 1923. Animal nutrition. *Nature*, 111:651.
 9. Freer M, Dove H, Nolan JV. Nutrient requirements of domesticated ruminants. Collingwood Australia: CSIRO Publishing; 2007.
 10. Jackson M.L. 1967. Soil Chemical Analysis, Prentice Hall of India Private Limited, New Delhi. 205p.
 11. Jiang W., Yuan L., Wang W., Cao R., Zhang Y., Shen W. 2015. Spatio-temporal analysis of vegetation variation in the Yellow River Basin. *Ecological Indicators*, 51:117-126.
 12. Khalili M., Lindgren E., Varvikko T. 1993. A survey of mineral status of soil, feeds and cattle in the Seale Ethiopian highlands. *Tropical Animal Health and Production*, 25:193-201.
 13. Khan Z.I., Ahmed K., Ashraf M., Valeem E.E., Javed I. 2008. A comparative study on mineral status of blood plasma of small ruminants and Pastures in Punjab, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 41: 67-72.
 14. Khallizadeh J., Ghorbani Nasrabadi R., Etesami H. 2025. Synergistic effects of silicate and *Streptomyces chartreusis* on water deficit resistance in soybean (*Glycine max* L.). *Rhizosphere*, 34:101064.
 15. Kumaresan A., Bujarbaruah K. M., Pathak K.A., Brajendra., Ramesh T. 2010. Soil plant animal continuum in relation to

- Uttarpradesh. *Indian Journal of Veterinary Medicine*, 23:4-8.
35. Simeanu D., Radu-Rusu R.M. 2023. Animal Nutrition and Productions. *Agriculture*, 13:943.
 36. Sparks D.L., Page A.L., Helmke P.A., Loeppert R.H. 2020. Methods of soil analysis, part 3: Chemical methods. John Wiley & Sons. Pp:1424.
 37. Su Y., Ma X., Le J., Li K., Han W., Liu X. 2021. Decoupling of nitrogen and phosphorus in dominant grass species in response to long-term nitrogen addition in an Alpine Grassland in Central Asia. *Plant Ecology*, 222:261-274.
 38. Suttle N., 2022. Mineral nutrition of livestock. 5th Edition, 609 p. DOI:10.1079/9781789240924.0003.
 39. Tilman D., Reich P.B., Knops J.M.H. 2006. Biodiversity and ecosystem stability in a decade-long grassland experiment. *Nature*, 441:629-632.
 40. Wang H., Liu Y.M., Qi Z.M. 2014. The estimation of soil trace elements distribution and soilplantanimal continuum in relation to trace elements status of sheep in huangcheng area of qilian mountain grassland, China. *Journal of Integrative Agriculture*, 13:1407.
 41. Whitehead D.C. 2000. Nutrient elements in grassland: soil-plant-animal relationships. Introduction. Nutrient Elements in Grassland: Soil-Plant-Animal Relationships, Pp:1-14.
 42. Wu Q., Ren H., Wang Z., Li Z., Liu Y., Wang Z., Li Y., Zhang R., Zhao M., Chang S.X., Han G. 2020. Additive negative effects of decadal warming and nitrogen addition on grassland community stability. *Journal of Ecology*, 108:1442-1452.
 43. Xin G.S., Hu Z., Zhou W., Yang Z.Q., Guo X.S., Long R.J. 2010. Determination of inorganic elements in the soil-grass-animal system by sealed microwave
 25. Nelson D.W., Sommers L.E. 1996. Total carbon, organic carbon, and organic matter. In A.L. Page et al (Eds.), Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties (pp. 961-1010). 2nd Edition, Agronomy Series No. 9, ASA SSSA, Madison.
 26. Olsen S. R., Cole C. V., Watanabe F. S., Dean L. A. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. Circular, Vol 939 (p. 19). Washington, DC: US Department of Agriculture.
 27. Page A.L., Miller R.H. Keeney D.R. 1982. Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Methods. American Society of Agronomy. Soil Science Society of America. Madison, WI.
 28. Pereira J.V., McDowell L.R., Conrad J.H., Wilkinson N., Martin F. 1997. Mineral status of soils, forages and cattle in Nicaragua. I. Micro minerals. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 14:73-89.
 29. Reid R.L., Horvath D.J. 1980. Soil chemistry and mineral problems in farm livestock: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 5:95.
 30. Reisenauer H.M. 1966. Mineral nutrients in soil solution. In: Altman, PL., Dittmer, DS (EDS), Environmental Biology. Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, Pp:507-508
 31. Saha S.K., Pathak N.N. 2021. Fundamentals of Animal Nutrition.
 32. Schonewille J.T. 2013. Magnesium in dairy cow nutrition: an overview. *Plant Soil*, 368:167-178.
 33. Sedat Ç., Fatmagül Y. 2016. Levels of trace elements in muscle and kidney tissues of sheep with fluorosis. *Biological Trace Element Research*, 174 (1):82-84.
 34. Sharma M.C., Joshi C., Gupta S. 2003. Prevalence of mineral deficiency in soils, plants and cattle of certain districts of

digestion ICP-AES. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 30(2):546-550.

44. Xin G.S., Long R.J., Guo X.S., Irvine J., Ding L.M., Ding L.L. Shang Z.H. 2011. Blood mineral status of grazing Tibetan sheep in the Northeast of the Qinghai-Tibetan Plateau. *Livestock Science*, 136(2-3):102-107.

*Research Article***Effect of Carvacrol on Sperm Profile on Varicocele-Induced Testicular Damage in Rats****Elham Ghahraman¹, Akram Eidi^{1*}, Pejman Mortazavi², Ahmad Asghari², Masoumeh Asle Roust³**

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

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

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

*Corresponding author: akram_eidi@yahoo.com

Received: 23 November 2024

Accepted: 23 February 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1191253

Abstract

Carvacrol is a phenolic monoterpene found in the essential oils of numerous aromatic herbs and spices from the Lamiaceae family. This compound possesses a range of pharmaceutical properties, including antioxidant, anti-apoptotic, anti-cancer, and anti-microbial effects. In our study, we explored the protective effects of carvacrol against infertility induced by varicocele in rats. The animals were randomly divided into nine groups: control, sham-operated, carvacrol alone at doses of 10, 20, 40 mg/kg body weight per day, varicocele-induced control, and varicocele-induced rats receiving carvacrol treatment. After a 30-day treatment period, the animals were euthanized for analysis. Blood and sperm sampling were collected, with blood drawn from the heart for serum isolation. We then measured serum levels of testosterone, LH and FSH. Additionally, sperm count, morphology, viability, and motility were assessed. Our findings indicated that the induction of varicocele significantly reduced sperm count, viability, and motility when compared to the control group. Furthermore, rats with varicocele exhibited a notable increase in sperm abnormalities. The infertile control group showed a significant decrease in serum testosterone levels, alongside increased levels LH and FSH. Notably, carvacrol administration at doses of 20 and 40 mg/kg body weight led to substantial improvements in hormonal levels and sperm quality parameters, effectively countering the negative effects associated with varicocele. In conclusion, carvacrol demonstrates the potential to protect rat testes from oxidative stress related to varicocele, attributed to its antioxidant and free radical scavenging properties.

Keywords: Carvacrol, Oxidative stress, Varicocele, Rats.



اثر کارواکروл بر پارامترهای اسپرم بر آسیب بیضه القا شده توسط واریکوسل در موش‌های صحرایی نر

الهام قهرمان^۱، اکرم عیدی^{۱*}، پژمان مرتضوی^۲، احمد اصغری^۲، معصومه اصل روستا^۳

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

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

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

*مسئول مکاتبات: akram_eidi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۳

DOI: 10.60833/ascij.2025.1191253

چکیده

کارواکروл مونوترپن فنلی است که در اسانس گیاهان معطر و ادویه‌های مختلف متعلق به خانواده نعنائیان یافت می‌شود. کارواکروл دارای خواص دارویی مختلفی مانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدآپوپتوز، ضدسرطان و ضد میکروبی است. در تحقیق حاضر اثر محافظتی کارواکروл بر آسیب بیضه ناشی از واریکوسل در موش صحرایی بررسی گردید. حیوانات به طور تصادفی به ۹ گروه تقسیم شدند: کنترل، شم، تجربی سالم با تیمار کارواکروл در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، کنترل واریکوسل، تجربی واریکوسل با القا واریکوسل و تیمار کارواکروл در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن. بعد از ۳۰ روز تیمار، حیوانات بیهوش گردیده و نمونه‌گیری خون و اسپرم صورت گرفت. نمونه‌گیری خون از قلب انجام شد و سرم جدا گردید. سطح سرمی تستوسترون، LH و FSH بررسی شد. تعداد، موفولوژی، زنده‌مانی و تحرک اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که القا واریکوسل منجر به کاهش معنی‌دار تعداد، زنده‌مانی و تحرک اسپرم در مقایسه با گروه کنترل سالم شد. علاوه بر این موش‌های با القا واریکوسل افزایش معنی‌دار در ناهنجاری‌های اسپرم نشان دادند. سطح سرمی تستوسترون در گروه کنترل واریکوسل به طور معنی‌داری کاهش و سطوح LH و FSH افزایش یافت. پیشرفت واریکوسل منجر به کاهش قابل توجه تعداد، زنده‌مانی و تحرک اسپرم در مقایسه با گروه کنترل شد. تیمار کارواکروл در دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن منجر به بهبود معنی‌دار در پارامترهای هورمونی و اسپرم شد و اثرات نامطلوب القای واریکوسل را کاهش داد. در نتیجه کارواکروл توانست از بیضه موش در برابر اثرات استرس اکسیداتیو واریکوسل به دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد محافظت کند.

کلمات کلیدی: کارواکروл، استرس اکسیداتیو، واریکوسل، موش صحرایی.

مقدمه

واریکوسل یکی از دلایل ناباروری در مردان است. واریکوسل به وضعیتی اطلاق می‌شود که طی آن اتساع و پیچش غیرطبیعی شبکه وریدی پامپینفرم طناب اسپرماتیک رخ می‌دهد. این اختلال ۲۵-۱۵ درصد جمعیت مردان را دربرمی‌گیرد که ۱۹ تا ۴۱ درصد این افراد نابارور می‌شوند (۱۷، ۳۳). عوامل مختلفی از جمله هیپرترمی، آسیب‌های

ناشی از افزایش جریان خون بیضه‌ای، رفلکس متابولیت-های کلیوی و آدرنال، استرس اکسیداتیو، آپوپتوز در پاتورنز این اختلال نقش دارند (۳۰). در بیماری واریکوسل، فاکتورهای عملکردی و ساختاری بیضه دچار اختلال و تغییر می‌شوند. تعداد اسپرم در نمونه مایع منی افراد نابارور مبتلا به واریکوسل کاهش می‌یابد (۲۱). از سوی دیگر واریکوسل بر سلول‌های سرتولی اثر می‌گذارد و سبب واکوئل شدن و آزاد شدن زودرس (پیش از بلوغ کامل) اسپرم می‌شود که اینگونه باعث افزایش حضور اسپرم نابالغ در انزال و کاهش کیفیت نمونه مایع منی فرد مبتلا به واریکوسل می‌شود. تحرک اسپرم نیز در بسیاری از مردان نابارور مبتلا به واریکوسل به تنهایی یا همراه با سایر پارامترهای اسپرمی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۳۰). در مردان مبتلا به واریکوسل بین استرس اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدان‌ها عدم تعادل مشاهده می‌شود. استرس اکسیداتیو از طریق مکانیسم‌های مختلف می‌تواند سبب آسیب پروتئین، لیپید، قند و اسیدهای نوکلئیک شود که در نهایت منجر به آسیب اسپرم و ناباروری می‌گردد (۲۴). در مجرای تولیدمثلی مردانه مقادیر فیزیولوژیک گونه‌های آزاد اکسیژن نقش مهمی در عملکرد اسپرم، تنظیم ظرفیت یابی و واکنش اسپرماتوزا با اووسیت دارد (۳۵). افزایش رادیکال‌های آزاد با اثر گذاشتن بر پارامترهای اسپرم باروری اسپرم را کاهش می‌دهند (۳۶). مداخلات درمانی مانند واریکوسلکتومی بطور معمول برای مردان دارای واریکوسل انجام می‌شود. اگرچه جراحی واریکوسلکتومی پارامترهای اسپرمی و هورمونی را بهبود می‌بخشد، یافتن روش‌هایی که عوارض کمتری نسبت به جراحی داشته باشد، حائز اهمیت است. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند پارامترهای اسپرمی را بهبود بخشد (۲۷). کارواکرو (۲-متیل-۵-(۱-متیل‌اتیل‌فنول) از خانواده فنول‌ها و ترکیبات آروماتیک می‌باشد (۲۰). کارواکرو می‌تواند رادیکال‌های آزاد مثل رادیکال پروکسیل، رادیکال-های سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و نیتریک اکساید را خنثی کند (۲۲). کارواکرو فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد که به عامل هیدروکسیل حلقه‌های آروماتیک مربوط می‌شود (۵). این ترکیب فنولی بر عملکرد سیستم تولیدمثلی مردان

موثر واقع می‌شود (۴۲). تیمار کارواکرو در موش‌های صحرایی دیابتی موجب افزایش سطح تستوسترون گردیده و بر روی عملکرد جنسی مردان نیز موثر است. کارواکرو باعث افزایش میزان FSH و LH در موش‌های دیابتی شده می‌شود (۳۹). هدف از این مطالعه بررسی اثر تیمار کارواکرو بر پارامترهای اسپرم و همچنین سطح گنادوتروپین‌ها و تستوسترون در موش‌های صحرایی تحت القای واریکوسل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی می‌باشد و مطابق با استانداردهای بین‌المللی و دارای کد اخلاق به شماره IR.IAU.SRB.REC.1402.175 می‌باشد. ۴۵ سر موش آزمایشگاهی نر صحرایی بالغ نژاد ویستار در یک محیط کنترل شده، در دمای 23 ± 2 درجه سانتی گراد، رطوبت $50 \pm$ درصد، دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفته و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. حیوانات در ۹ گروه که هر گروه شامل ۶ سر موش بودند بصورت تصادفی تقسیم شدند. حیوانات با تزریق کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی-گرم/کیلوگرم) بصورت درون صفاقی تحت بیهوشی قرار گرفتند. القاء مدل واریکوسل به روش Turner انجام گردید که برگرفته از پدیده فندق‌شکن (Nutcracker Phenomenon) است (۳۳). حیوانات در حالت سوپاین قرار گرفتند و یک برش در خط وسط بصورت عمودی در شکم در حدود ۴-۳ سانتیمتر ایجاد شد. پس از باز کردن، احشای شکمی به آرامی با یک گاز خیس به طرف راست بدن انتقال یافتند. ورید کلیوی چپ و محل ورود ورید اسپرماتیک داخلی به آن مشخص شد سپس اطراف ورید کلیوی چپ از بافت همبند و چربی باز گردید. یک سرسوزن به قطر ۰/۸۵ میلیمتر به موازات ورید کلیوی قرار داده شد و به وسیله نخ سیلک ۴ صفر روی ورید کلیوی چپ گره زده شد به طوریکه محل گره بعد از محل ورود اسپرماتیک داخلی به ورید کلیوی باشد. بعد از اینکه گره ایجاد شد، سر سوزن خارج گردیده تا ورید به حالت اولیه خود برگردد. با این کار، قطر ورید کلیوی تا ۵۰ درصد

کاهش می‌دهد و باعث می‌شود که فشار داخل وریدی افزایش یابد و به ورید اسپرماستیک چپ انتقال یابد و واریکوسل ایجاد گردد. احشای شکمی به آرامی به محل خود باز گردانده شدند و محل برش شکمی بوسیله نخ ۴ صفر سیلک بخیه زده شد و آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین به محل بخیه زده شد. پس از اطمینان از القا واریکوسل (شکل‌های ۱ و ۲)، حیوانات بصورت تصادفی در گروه‌های مورد مطالعه زیر قرار گرفتند: ۱- گروه کنترل سالم (حیوانات هیچ گونه درمان و مداخله ای دریافت نکردند). ۲- گروه شم (حیوانات در این گروه تحت عمل جراحی قرار گرفتند ولی القای واریکوسل در آنها صورت نگرفت و در طی دوره مطالعه روغن آفتابگردان دریافت کردند). ۳-۵- گروه‌های تجربی سالم (موش‌های سالم با کارواکول در دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تیمار شدند). ۶- گروه کنترل واریکوسل (القای واریکوسل در این گروه صورت گرفت). ۷-۹- گروه‌های تجربی واریکوسل (حیواناتی که القای واریکوسل در آن انجام شد و کارواکول در دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تیمار شدند). کارواکول به مدت ۳۰ روز و بصورت گاوآژ تیمار گردید. دوز کارواکول بر اساس مطالعه Güvenç و همکارانش در سال ۲۰۱۹ بود (۲). حلال کارواکول روغن آفتابگردان بود. تیمار روز بعد از جراحی القا واریکوسل انجام گردید. پس از پایان دوره ۳۰ روزه حیوانات بیهوش شدند (۷) و برای جمع‌آوری نمونه‌های اسپرم، اپی دیدیم چپ در شرایط استریل جدا شد و درون فالكون حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول T6 + حاوی ۱۰ درصد BSA ۱۵ درصد که از قبل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و اپی دیدیم به قطعاتی تقسیم شد. با مشاهده محلول همگن اطمینان از استخراج اسپرم‌ها حاصل شد. برای تخلیه کامل اسپرم‌ها درون محلول، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۵ درصد CO₂ قرار داده شدند. ۱۰ میکرولیتر از محلول حاصل بر روی لام گذاشته شد (۴۳). برای بررسی تعداد اسپرم از لام هموسیتمومتر استفاده شد. دو شیار عمود بر هم وجود دارد که داخل لام قابل مشاهده است. یک منطقه H شکل بوسیله شکاف‌ها ایجاد می‌شود و از طریق فشرده‌سازی فاصله ۰/۱ میلی‌متر

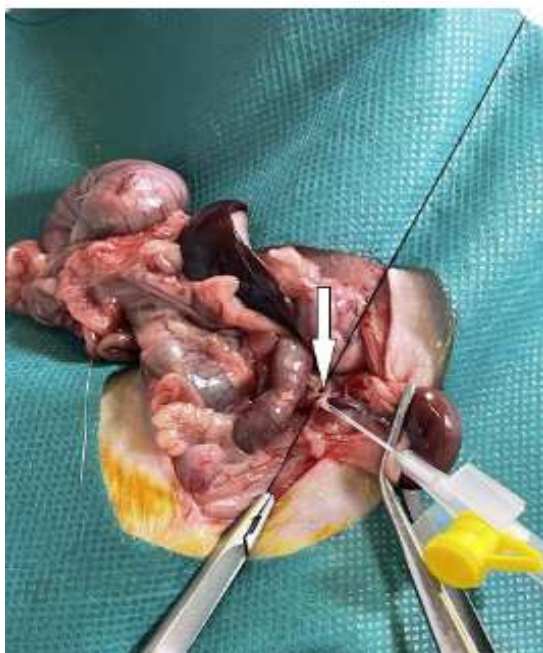
ایجاد می‌شود. هم چنین دو صفحه در لام یافت می‌شود. در بالا و پایین لام شبکه‌های قابل مشاهده وجود دارد. لام از ۹ مربع بزرگ تشکیل شده و این مربع‌ها با اندازه‌شان مشخص می‌شوند. علاوه بر این، مرکز این لام متشکل از ۲۵ مربع است. هر یک از این مربع‌های میانی علاوه بر این، شامل ۱۶ مربع کوچک است. در نتیجه تعداد کل این مربع‌های کوچک به ۴۰۰ می‌رسد. حجم هر مربع بزرگ از حاصل ضرب سطح صفحه در عمق شیار بعد از لامل گذاری ۰/۱ mm³ است. محلولی حاوی ۵ میکرولیتر فرمالین (شامل NaHCO₃ ۵ درصد و ۰/۲۵ درصد تریپان بلو) با ۹۵ میکرولیتر محلول اسپرم مخلوط شد. این مخلوط، در لام بارگذاری شد. ۴ مربع ۱۶ خانه‌ای (متوسط) از لام هماسیتومتر با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ مورد شمارش قرار گرفت (۴۳). برای بررسی میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها، از خاصیت نفوذپذیری غشای سلول‌ها به رنگ حیاتی اتوزین استفاده شد. رنگ اتوزین سلول‌های مرده را رنگ می‌کند، اما در غشای سلول‌های زنده قبل از فیکس شدن (ثابت شدن) نفوذ نمی‌کند. بنابراین سلول‌های زنده رنگ نشده باقی می‌مانند و به رنگ سفید خواهند بود و اسپرم‌های مرده به رنگ صورتی تیره دیده می‌شوند. نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده توسط میکروسکوپ نوری (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan) با بزرگنمایی ۱۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفت و ۲۰۰ اسپرم در یک زمان شمارش گردید. به این صورت که اسپرم‌های مرده به رنگ صورتی تا قرمز در می‌آیند و اسپرم‌های زنده بدون رنگ می‌مانند (۱۳). جهت بررسی تحرک اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم بر روی لامی که از قبل گرم شده بود گذاشته شد. ۱۰ میدان میکروسکوپی با استفاده از یک میکروسکوپ معمولی با بزرگنمایی ۴۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. سه نوع حرکت رو به جلو (progressive motility)، تحرک آهسته‌به‌جلو (non-progressive motility) و بدون تحرک (immotile) مورد بررسی قرار گرفت. درصد تحرک اسپرم با کمک میکروسکوپ کنتراست فاز معکوس ثبت گردید (۲۷). برای بررسی مورفولوژی اسپرم یک قطره از سوسپانسیون اسپرم بر روی لام گذاشته شد و در هوا خشک شد. اسلاید

با الکل ۹۵ درصد تثبیت شد و سپس طبق پروتکل رنگ-آمیزی Sperm Blue انجام گرفت. ۳۰۰ اسپرم در هر حیوان از نظر شکل با بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی شد و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی ثبت شد (۴۳). تست‌سترون با استفاده از کیت تست ایمونواسی آنزیمی ELISA (شرکت USA Mybiosource) و هورمون‌های LH و FSH (شرکت Finetest, China) مورد سنجش قرار گرفتند. با استفاده از دستگاه الایزا میزان جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. حساسیت سنجش ۰/۰۵ نانوگرم/میلی‌لیتر بود. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شدند. به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف و جهت مقایسه آماری داده‌های کمی، روش ANOVA دوطرفه انجام شد و از تست تعقیبی Tukey استفاده گردید. $p < ۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

تیمار حیوانات سالم با کارواکول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، تغییر معنی‌داری در تعداد، زنده‌مانی، حرکت پیش رونده، حرکت درجا، مورفولوژی اسپرم و همچنین در اسپرم‌های بدون حرکت در مقایسه با

حیوانات گروه کنترل سالم ایجاد نکرد. نتایج این بررسی گویای آن است که پارامترهای ذکر شده در حیوانات گروه کنترل واریکوسل در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش معنی‌داری ایجاد کرد ($p < ۰/۰۰۱$). از طرفی، این پارامترها در حیوانات گروه تجربی واریکوسل تیمار شده با کارواکول در دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن در مقایسه با گروه کنترل واریکوسل افزایش معنی‌داری داشته است ($p < ۰/۰۰۱$) (نمودارهای ۱ تا ۶). تیمار حیوانات سالم با کارواکول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، تغییر معنی‌داری بر سطح هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل سالم ایجاد نکرد. از طرفی، سطح هورمون تستوسترون در گروه کنترل واریکوسل در مقایسه با کنترل سالم کاهش معنی‌داری نشان داد ($p < ۰/۰۰۱$). تیمار کارواکول در دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن موجب افزایش سطح هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل واریکوسل گردید (نمودارهای ۷ تا ۹).

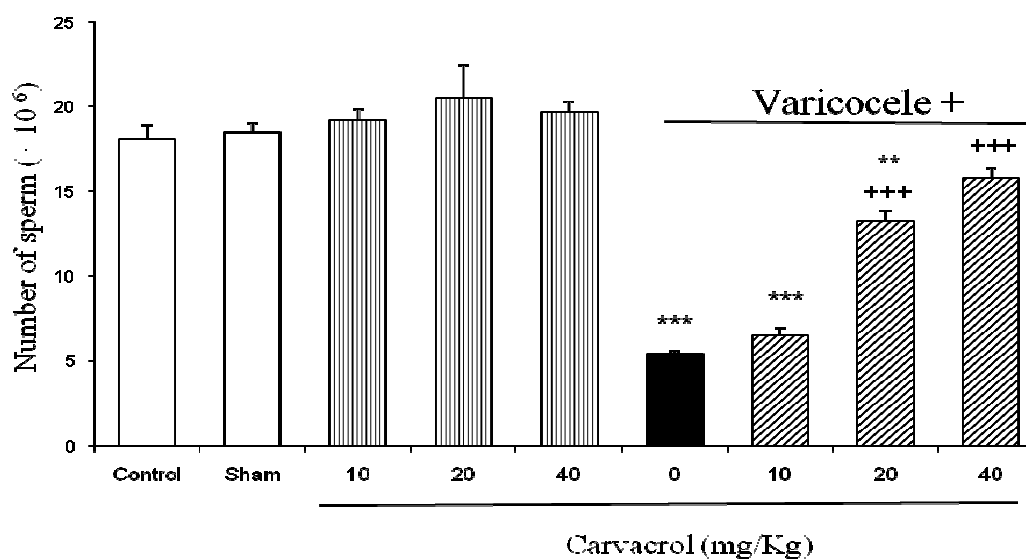


شکل ۱- اتساع و پیچ خوردگی شبکه وریدی طناب اسپرماتیک در گروه کنترل واریکوسلی شده با فلش نشان داده شده است.

Fig. 1. Dilation and tortuosity of the venous network of the spermatic cord in the varicocele control group is indicated by arrows.

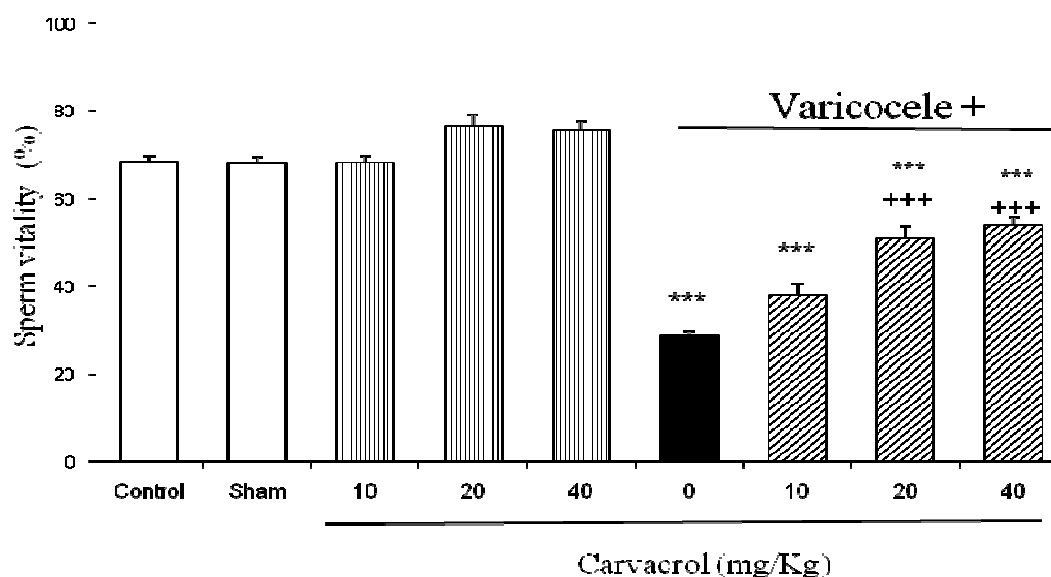


شکل ۲- آسیب بیضه سمت چپ در گروه کنترل واریکوسلی شده با فلش نشان داده شده است.
Fig. 2. Left testicular injury in the varicocele control group is indicated by the arrow.



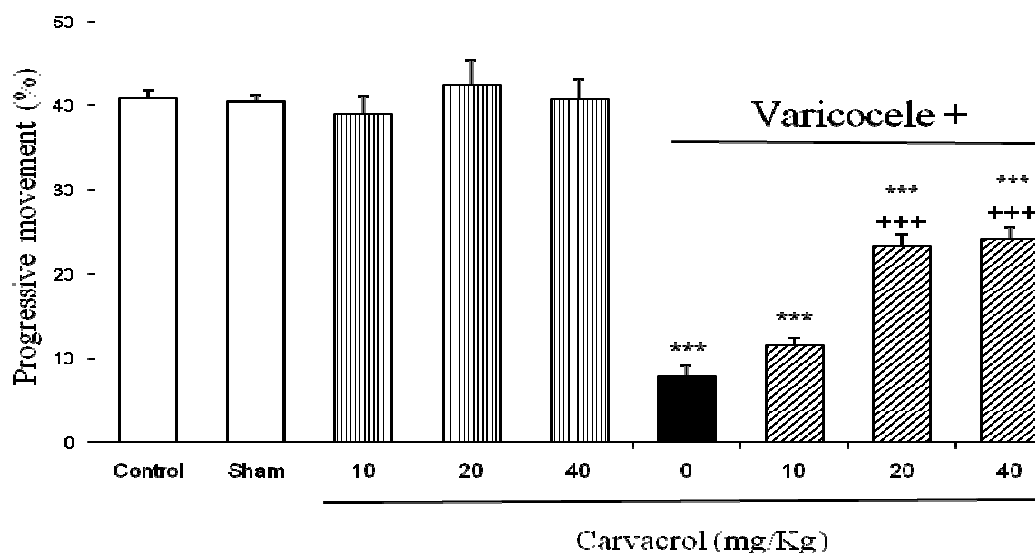
نمودار ۱- بررسی اثر تیمار خوراکی کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر تعداد اسپرم در رت‌های نر سالم و واریکوسلی شده. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار برای شش سر رت در هر گروه ارائه شده است. $***p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$.
اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $+++p < 0.001$ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

Fig. 3. Study of the effect of oral carvacrol treatment at doses of 10, 20 and 40 mg/kg body weight on sperm count in healthy and varicocele-affected male rats. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. $***p < 0.001$, $**p < 0.01$ indicates difference from healthy control group. $+++p < 0.001$ indicates difference from varicocele control group.



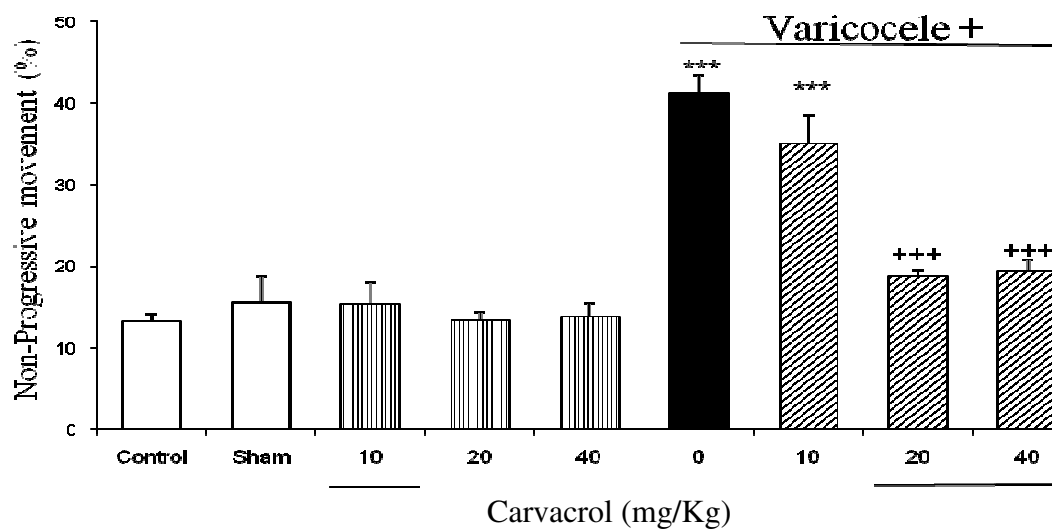
نمودار ۲- بررسی اثر تیمار خوراکی کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر زنده‌مانی اسپرم در رت‌های نر سالم و واریکوسلی شده. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ خطای معیار برای شش سر رت در هر گروه ارائه شده است. $p < 0.001$ *** اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $p < 0.001$ +++ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

Fig. 4. Study of the effect of oral carvacrol treatment at doses of 10, 20 and 40 mg/kg body weight on sperm viability in healthy and varicocele-affected male rats. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. *** $p < 0.001$ indicates difference from the healthy control group. +++ $p < 0.001$ indicates difference from the varicocele control group.



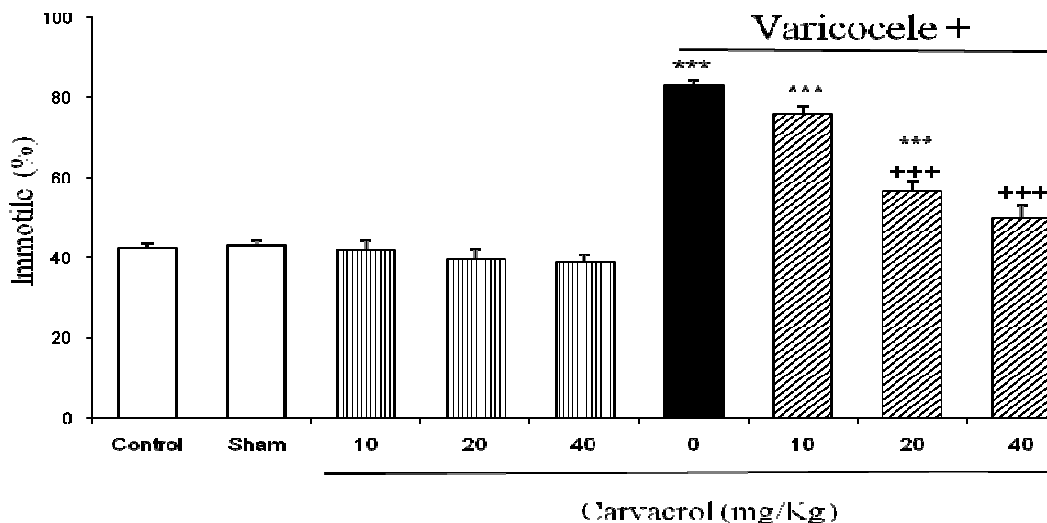
نمودار ۳- بررسی اثر تیمار خوراکی کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر حرکت پیش‌رونده اسپرم در رت‌های نر سالم و واریکوسلی شده. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ خطای معیار برای شش سر رت در هر گروه ارائه شده است. $p < 0.001$ *** اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $p < 0.001$ +++ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

Fig. 5. Study of the effect of oral carvacrol treatment at doses of 10, 20 and 40 mg/kg body weight on sperm motility in healthy and varicocele-affected male rats. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. *** $p < 0.001$ indicates difference from the healthy control group. +++ $p < 0.001$ indicates difference from the varicocele control group.



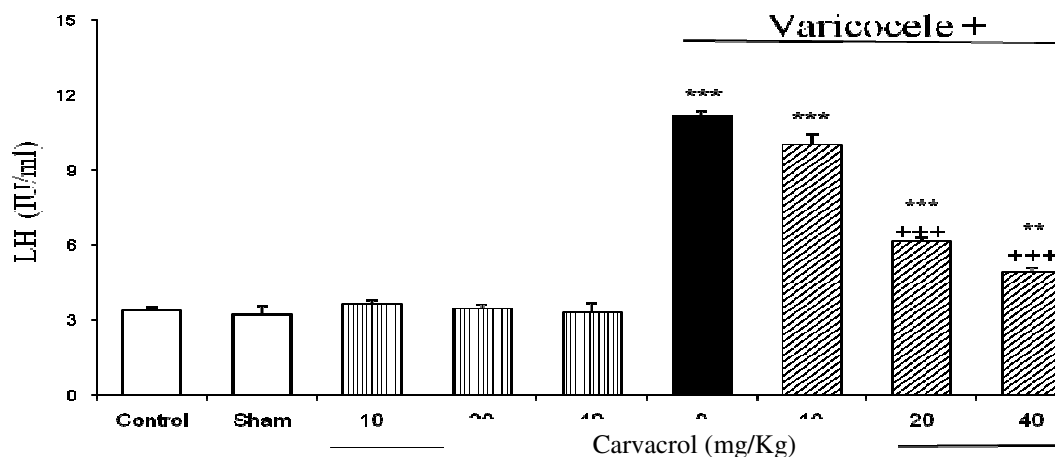
نمودار ۴- بررسی اثر تیمار خوراکی کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر حرکت غیرپیش‌رونده در رت‌های نر سالم و واریکوسلی شده. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ خطای معیار برای شش سر رت در هر گروه ارائه شده است. $p < 0.001$ *** اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $p < 0.001$ +++ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

Fig. 6. Study of the effect of oral carvacrol treatment at doses of 10, 20 and 40 mg/kg body weight on non-progressive movement in healthy and varicocele-affected male rats. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. *** $p < 0.001$ indicates difference from the healthy control group. +++ $p < 0.001$ indicates difference from the varicocele control group.



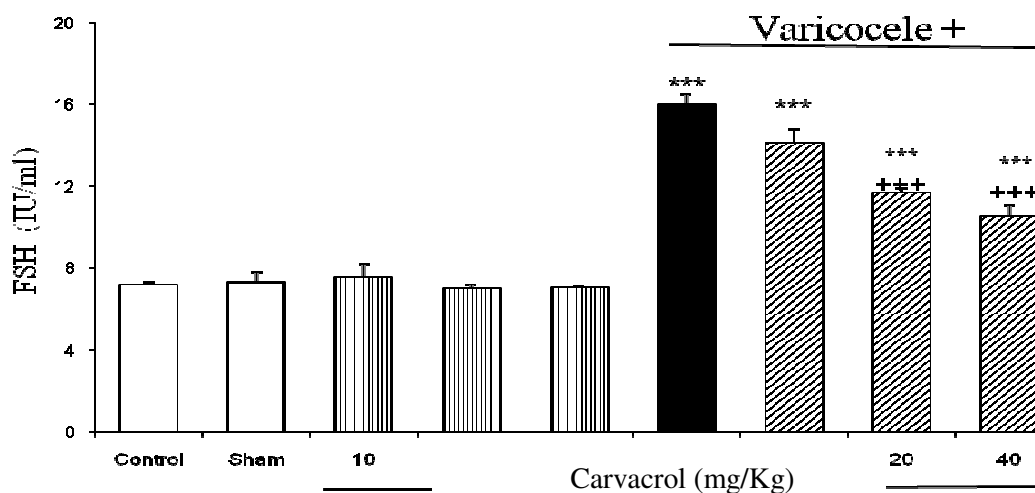
نمودار ۵- بررسی اثر تیمار خوراکی کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر تعداد اسپرم‌های بدون حرکت در رت‌های نر سالم و واریکوسلی شده. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ خطای معیار برای شش سر رت در هر گروه ارائه شده است. $p < 0.001$ *** اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $p < 0.001$ +++ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

Fig. 7. Study of the effect of oral carvacrol treatment at doses of 10, 20 and 40 mg/kg body weight on the number of non-motile sperm in healthy and varicocele-affected male rats. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. *** $p < 0.001$ indicates difference from the healthy control group. +++ $p < 0.001$ indicates difference from the varicocele control group.



نمودار ۸- بررسی اثر تیمار خوراکی کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر سطح سرمی LH در رت‌های نر سالم و واریکوسلی شده. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار برای شش سر رت در هر گروه ارائه شده است. $p < 0.001$ ، ***، $p < 0.01$ ، ** اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $p < 0.001$ ، +++ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

Fig. 10. Study of the effect of oral carvacrol treatment at doses of 10, 20 and 40 mg/kg body weight on serum LH levels in healthy and varicocele-affected male rats. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ indicates difference from the healthy control group. +++ $p < 0.001$ indicates difference from the varicocele control group.



نمودار ۹- بررسی اثر تیمار خوراکی کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر سطح سرمی FSH در رت‌های نر سالم و واریکوسلی شده. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار برای ۶ سر رت در هر گروه ارائه شده است. $p < 0.001$ ، *** اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $p < 0.001$ ، +++ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

Fig. 11. Study of the effect of oral carvacrol treatment at doses of 10, 20 and 40 mg/kg body weight on serum FSH levels in healthy and varicocele-affected male rats. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. *** $p < 0.001$ indicates difference from the healthy control group. +++ $p < 0.001$ indicates difference from the varicocele control group.

بحث

یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که القای واریکوسل در موش‌های صحرایی منجر به کاهش معنی‌دار در پارامترهای اسپرم از جمله تعداد، زنده‌مانی، مورفولوژی و همچنین حرکت پیش‌رونده اسپرم گردیده و حرکت غیرپیش‌رونده و همچنین بی‌حرکتی اسپرم را نیز به طور معنی‌داری افزایش داده است. تحقیقات، نشان دهنده ارتباط مثبت بین سطوح ROS و تحرک اسپرم‌ها است. این رابطه مستقیم است و در مطالعات مختلف نشان داده شده است (۲۹). تجزیه و تحلیل تطبیقی کیفیت اسپرم و یکپارچگی DNA در دو گروه متشکل از افراد سالم و بیمار نشان داد که رابطه معکوس معنی‌دار بین کیفیت اسپرم، به ویژه تعداد اسپرم، و یکپارچگی DNA وجود دارد. علاوه بر این، تحرک اسپرم و تولید ROS به صورت معنی‌داری با اختلال DNA مرتبط است. در نتیجه، سطح بالای ROS ممکن است طیف وسیعی از پیامدها را برای اسپرماتوزن ایجاد کند، به ویژه موجب کاهش اثربخشی درمان برای مردان نابارور با استفاده از فناوری کمکی تولید مثل (Assisted reproductive technology, ART) می‌شود (۹، ۴۳). بنابراین، واریکوسل می‌تواند به کاهش تحرک اسپرم‌ها و در نتیجه کاهش احتمال باروری منجر شود (۳۰). شاخص‌های التهابی دخیل در بیماری واریکوسل سبب افزایش میزان تولید نیتریک اکساید می‌شوند که تحرک اسپرم را کاهش می‌دهند (۲۵). مطالعه Missassi و همکاران نشان داد که واریکوسل باعث کاهش تحرک اسپرم می‌شود و همچنین نشان داد تعداد اسپرم‌های با شکل غیرطبیعی در گروه واریکوسل بیشتر است (۳۱). طبق مطالعات، درصد حرکت پیش‌رونده اسپرم، زنده‌مانی اسپرم، اسپرم با شکل طبیعی و تعداد اسپرم در گروه واریکوسل کاهش یافته است (۲۷، ۳۷). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تیمار کارواکرول موجب تغییر معنی‌داری در پارامترهای اسپرم در حیوانات واریکوسلی در مقایسه با حیوانات گروه کنترل واریکوسل شده است به‌طوری‌که منجر به افزایش پارامترهای اسپرم از جمله تعداد، زنده‌مانی، مورفولوژی و همچنین حرکت پیش‌رونده اسپرم گردید، از طرفی حرکت

غیرپیش‌رونده و همچنین بی‌حرکتی اسپرم را به طور معنی‌داری کاهش داد. کارواکرول به طور کلی برای مصرف، بی‌خطر شناخته شده و تأیید سازمان غذا و دارو دریافت کرده است. از طرفی، فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع آن از جمله خواص ضدقارچی، ضدباکتری، ضدویروسی، تقویت‌کننده سیستم ایمنی و همچنین نقش آنتی‌اکسیدانی این ماده، آن را به یک کاندید امیدوارکننده برای استفاده بالینی تبدیل کرده است (۳۸، ۴۱). کارواکرول دارای خواص ضد التهابی است و می‌تواند به کاهش التهاب در بافت‌های درگیر در واریکوسل کمک کند. التهاب نیز یکی از عوامل مهم آسیب به عملکرد اسپرم در واریکوسل است (۴۲). این ماده دارای اثرات محافظتی بر روی غشای سلول‌های اسپرم است که می‌تواند به بهبود ریخت‌شناسی و تحرک اسپرم‌ها کمک کند. در مجموع، به نظر می‌رسد ترکیب اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، تنظیم هورمونی و حفاظت از سلول‌های اسپرم، از جمله مکانیسم‌های احتمالی کارواکرول در بهبود پارامترهای اسپرم در واریکوسل باشد (۱۶). هم راستا با نتایج مطالعه حاضر، طی مطالعه‌ای که Aksu و همکارانش در سال ۲۰۱۶ به منظور بررسی اثرات سودمند و مفید کارواکرول بر روی سمیت تولیدمثلی ناشی از سیس پلاتین در موش‌های صحرایی نر انجام دادند، به این مهم رسیدند که تیمار خوراکی کارواکرول توانست پارامترهای اسپرمی از جمله حرکت و تعداد اسپرم را افزایش دهد (۲). Arkali و همکارانش گزارش نمودند که تیمار کارواکرول موجب بهبود پارامترهای اسپرم در موش‌های دیابتی گردیده است (۶). Uyar و همکارانش دریافتند که تیمار کارواکرول موجب بهبود پارامترهای اسپرم در موش‌های مسموم شده با بیسفنول برای مدت ۲۸ روز توانست پارامترهای اسپرم را بهبود ببخشد (۴۲). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که القای واریکوسل موجب کاهش معنی‌دار سطح هورمون تستوسترون گردیده است. واریکوسل از طریق افزایش پروستاگلاندین‌ها، تعداد سلول‌های لیدیگ و میزان هورمون تستوسترون را کاهش می‌دهد. تستوسترون نقش مهمی در

توسعه مجاری اسپرم ایفا می‌کند، زیرا آزاد شدن آن باعث افزایش و تکثیر این مجاری می‌شود (۴۴). از طرفی دیگر، بیماری واریکوسل می‌تواند سطح هورمون تستوسترون را از طریق چندین مکانیسم کاهش دهد از جمله: افزایش دمای بیضه، کاهش جریان خون به بیضه‌ها، افزایش استرس اکسیداتیو، تغییر در متابولیسم هورمونی. در بیماری واریکوسل، وریدهای بزرگ در ناحیه بیضه متسع می‌شوند که این امر باعث افزایش دمای بیضه نسبت به دمای طبیعی بدن می‌شود و در نتیجه می‌تواند تولید تستوسترون را مختل کند و سطح آن را کاهش دهد (۱۵). در بیماری واریکوسل، افزایش دما و کاهش جریان خون باعث افزایش استرس اکسیداتیو در بیضه شده و می‌تواند عملکرد سلول‌های لیدیگ را مختل کرده و تولید تستوسترون را کاهش دهد (۱۴). بیماری واریکوسل ممکن است متابولیسم و کلیانس هورمون تستوسترون را تغییر دهد و این امر می‌تواند منجر به کاهش سطح تستوسترون در گردش خون شود (۳۴). همراه با نتایج حاضر، مشخص شده که سطح هورمون تستوسترون به صورت معنی‌داری در مردان واریکوسلی در مقایسه با مردان بدون این عارضه کاهش یافت و در نتیجه غلظت اسپرم در این افراد به حد پایین خود رسید (۱). نتایج حاضر نشان داد که تیمار کارواکرویل سطح هورمون تستوسترون را در حیوانات واریکوسلی شده در مقایسه با گروه کنترل واریکوسل بصورت معنی‌داری افزایش داد. کارواکرویل می‌تواند از طریق مهار استرس اکسیداتیو، افزایش بیان آنزیم‌های استروئیدوژنز سطح تستوسترون را در بیماری واریکوسل افزایش دهد. کاهش استرس اکسیداتیو باعث بهبود عملکرد و بازسازی سلول‌های لیدیگ و افزایش تولید تستوسترون می‌شود (۲۳). تیمار کارواکرویل به موش‌های دیابتی توانسته سطح تستوسترون را به صورت معنی‌داری افزایش دهد. تیمار کارواکرویل با افزایش سطح هورمون تستوسترون و بیان ژن‌های کلیدی در فرآیند اسپرماتوژنز مانند SF-1، LHCGR و FSHR توانایی مقابله با اثرات مضر دیابت بر سلول‌های زایای بیضه را دارد. کارواکرویل ممکن است بر روی سطوح هورمون‌های جنسی مؤثر باشد و به بهبود تولید اسپرم کمک کند و احتمالاً اختلالات ایجادشده در

محور هیپوتالاموس-هیپوفیزی-گنادی در بیماری واریکوسل را بهبود می‌بخشد (۳۹). پژوهش حاضر نشان داد که القای واریکوسل توانست سطح هورمون LH را به صورت معنی‌داری افزایش دهد. بیماری واریکوسل می‌تواند سطح هورمون LH را از طریق بازخورد منفی کاهش تستوسترون، آسیب به سلول‌های لیدیگ، اختلال در بازخورد هیپوتالاموس-هیپوفیزی-گنادی افزایش دهد. کاهش سطح هورمون تستوسترون باعث کاهش بازخورد منفی به هیپوفیز می‌شود. در نتیجه، هیپوفیز ترشح هورمون LH را افزایش داده تا سطح تستوسترون را بالا ببرد (۳). افزایش دما و استرس اکسیداتیو در بیماری واریکوسل می‌تواند باعث آسیب و اختلال عملکرد سلول‌های لیدیگ شود. این آسیب به سلول‌های لیدیگ که تستوسترون را تولید می‌کنند، منجر به کاهش تستوسترون می‌شود. در پاسخ به این کاهش تستوسترون، هیپوفیز ترشح LH را افزایش می‌دهد (۴). مکانیسم‌های اصلی افزایش LH در بیماری واریکوسل شامل بازخورد منفی کاهش تستوسترون، آسیب به سلول‌های لیدیگ و اختلال در مسیر بازخورد هیپوتالاموس-هیپوفیزی-گنادی است (۱۸). کارواکرویل با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود می‌تواند استرس اکسیداتیو ناشی از القای واریکوسل را کاهش دهد که خود منجر به بهبود عملکرد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد و کاهش ترشح LH می‌شود (۱۹). کارواکرویل می‌تواند بیان گیرنده‌های GnRH در هیپوفیز را کاهش دهد. این امر باعث کاهش پاسخ هیپوفیز به GnRH و در نتیجه کاهش ترشح LH می‌شود (۲۶). کارواکرویل ممکن است بیان SOCS را در هیپوفیز افزایش دهد. این افزایش بیان SOCS می‌تواند مانع از انتقال سیگنال‌های محرک ترشح LH شود و ترشح LH را کاهش دهد (۱۲). Shoorei و همکارانش گزارش نمودند تیمار کارواکرویل در موش‌های دیابتی توانست غلظت هورمون LH را بالا ببرد. بعلاوه، تجویز کارواکرویل منجر به افزایش سطوح mRNA و بیان پروتئین‌های SF-1، LHCGR و همچنین FSHR گردید (۳۹). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که القای واریکوسل توانست سطح هورمون FSH را به صورت معنی‌داری افزایش دهد. واریکوسل معمولاً با کاهش عملکرد بیضه‌ها

کاهش التهاب، بهبود عملکرد سلول‌های سرتولی و لیدیگ، افزایش تولید اینهیبین B به کاهش سطح FSH در واریکوسل کمک کند. کارواکول دارای خواص ضدالتهابی است که می‌تواند التهاب ناشی از واریکوسل را کاهش دهد. التهاب مزمن در بیضه‌ها می‌تواند به آسیب سلول‌های بیضه و اختلال در تولید هورمون‌های مختلف منجر شود. کاهش التهاب می‌تواند به بهبود سلامت سلول‌های بیضه و عملکرد آنها کمک کند، که این امر می‌تواند به کاهش سطح FSH منجر شود (۲۸). با بهبود عملکرد سلول‌های سرتولی، تولید اینهیبین B نیز ممکن است افزایش یابد. اینهیبین B هورمونی است که بازخورد منفی بر ترشح FSH از هیپوفیز دارد. افزایش سطح اینهیبین B می‌تواند به کاهش ترشح FSH کمک کند. این مکانیسم‌ها نشان می‌دهند که کارواکول می‌تواند از طریق تأثیرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی خود به بهبود سلامت بیضه‌ها و کاهش سطح هورمون FSH در بیماران مبتلا به واریکوسل کمک کند (۱۱).

نتیجه‌گیری

واریکوسل باعث کاهش پارامترهای اسپرم و اختلال در سطح هورمون‌های تستوسترون و گنادوتروپین گردید. تیمار کارواکول احتمالاً از طریق اثرات آنتی‌اکسیدانی، بهبود عملکرد سلول‌های سرتولی و لیدیگ و افزایش تولید اینهیبین B باعث بهبود این پارامترها گردید.

منابع

1. Abdel-Meguid TA, Farsi HM, Al-Sayyad A, Tayib A, Mosli HA, Halawani AH. 2014. Effects of varicocele on serum testosterone and changes of testosterone after varicolectomy: a prospective controlled study. *Urology*, 84(5):1081-1087.
2. Aksu EH, Kandemir FM, Altun S, Küçükler S, Çomaklı S, Ömür AD. 2016. Ameliorative effect of carvacrol on cisplatin-induced reproductive damage in male rats. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*, 30(10):513-520.

همراه است و می‌تواند منجر به تغییراتی در سطح هورمون‌های جنسی از جمله FSH شود. اگرچه موارد کاهش سطح FSH نیز دیده می‌شود، در بسیاری از موارد، واریکوسل می‌تواند منجر به افزایش سطح FSH شود. مکانیسم‌هایی از جمله اختلال در تولید اسپرم، کاهش تولید اینهیبین B، اختلال در عملکرد سلول‌های لیدیگ می‌تواند این افزایش را توضیح دهند. واریکوسل باعث افزایش دما و استرس اکسیداتیو در بیضه‌ها می‌شود که این موارد به تخریب سلول‌های سرتولی منجر می‌شوند. این امر می‌تواند به کاهش تولید اسپرم و در نتیجه کاهش مهار بازخورد منفی به هیپوفیز و هیپوتالاموس شود. در پاسخ، هیپوفیز شروع به ترشح بیشتر FSH می‌کند تا تولید اسپرم را تحریک کند (۱۰). اینهیبین B هورمونی است که توسط سلول‌های سرتولی در بیضه‌ها تولید می‌شود و معمولاً بازخورد منفی بر ترشح FSH از هیپوفیز دارد. در صورت آسیب به سلول‌های سرتولی ناشی از واریکوسل، سطح اینهیبین B کاهش می‌یابد و این کاهش منجر به افزایش ترشح FSH می‌شود (۳۲). اگرچه نقش اصلی سلول‌های لیدیگ تولید تستوسترون است، اختلال در عملکرد این سلول‌ها می‌تواند به تغییر در سطح هورمون‌های دیگر نیز منجر شود. کاهش تولید تستوسترون می‌تواند به اختلال در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد و افزایش سطح FSH بیانجامد. واریکوسل می‌تواند از طریق کاهش بازخورد منفی به هیپوفیز و افزایش نیاز به تحریک تولید اسپرم، منجر به افزایش سطح FSH در خون شود (۴۰). Camoglio و همکارانش نشان دادند که القای واریکوسل منجر به افزایش سطح هورمون FSH در موش‌های واریکوسلی گردید که پس از انجام جراحی و بهبود واریکوسل سطح این هورمون کاهش معنی‌داری را منجر شد (۸). از طرفی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار کارواکول موجب کاهش معنی‌داری در سطح هورمون FSH در موش‌های واریکوسل شده در مقایسه با گروه کنترل واریکوسل گردید. خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی کارواکول می‌تواند نقش مهمی در کاهش سطح هورمون FSH در بیماران مبتلا به واریکوسل داشته باشد. کارواکول از طریق کاهش استرس اکسیداتیو،

- Gregorio A, Micillo A, Francavilla F, Francavilla S, Barbonetti A. 2015. Embolization of left spermatic vein in non-obstructive azoospermic men with varicocele: role of FSH to predict the appearance of ejaculated spermatozoa after treatment. *Journal of Endocrinological Investigation*, 38(7):785-790.
11. Dehghan S, Akbarpour B, Kamghar MH. 2016. Investigating the effects of shirazi thyme extract on plasma levels of testosterone, Dihydrotestosterone, LH and FSH in adult male wistar Rats: an study. *Journal of Alternative Veterinary Medicine*, 18(3):517-530.
12. Dinc K, Ozyurt R, Coban TA, Yazici GN, Suleyman Z, Yavuzer B, Suleyman H. 2023. The effect of carvacrol on the proinflammatory cytokines, histology, and fertility outcome of cisplatin-related ovarian change in a rat model. *Taiwan Journal of Obstetrics and Gynecology*, 62(2):256-263.
13. Erfani Majd N, Sadeghi N, Tavalae M, Tabandeh MR, Nasr-Esfahani MH. 2019. Evaluation of Oxidative Stress in Testis and Sperm of Rat Following Induced Varicocele. *Urology Journal*, 16(3):300-306.
14. Finelli R, Leisegang K, Kandil H, Agarwal A. 2022. Oxidative Stress: A Comprehensive Review of Biochemical, Molecular, and Genetic Aspects in the Pathogenesis and Management of Varicocele. *World Journal of Mens Health*, 40(1):87-103.
15. Fraczek M, Kamieniczna M, Budzinska M, Kurpisz M. 2018. Hyperthermia and sperm quality – a risk factor for male infertility OR contraceptive target. *Postępy Andrologii Online*, 5(2):48-61.
16. Gur C, Akarsu SA, Akaras N, Tuncer SC, Kandemir FM. 2023. Carvacrol reduces abnormal and dead sperm counts by attenuating sodium arsenite-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis,
3. Alizadeh M, Nasebakht A, Valizadeh R, Mohammadi Fallah M, Taghizadeh Afshari A, Rahimi MM, Daneshyar C. 2018. A preliminary evaluation of serum level of testosterone, LH, and FSH in patients with varicocele after varicocelectomy as a kidney-related disease. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 14:1585-1590.
4. Andò S, Giacchetto C, Colpi G, Beraldi E, Panno ML, Lombardi A, Sposato G. 1984. Physiopathologic aspects of Leydig cell function in varicocele patients. *Journal of Andrology*, 5(3):163-170.
5. Aristatile B, Al-Numair KS, Al-Assaf AH, Veeramani C, Pugalendi KV. 2015. Protective effect of carvacrol on oxidative stress and cellular DNA damage induced by UVB irradiation in human peripheral lymphocytes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 29(11):497-507.
6. Arkali G, Aksakal M, Kaya ŞÖ. 2021. Protective effects of carvacrol against diabetes-induced reproductive damage in male rats: Modulation of Nrf2/HO-1 signalling pathway and inhibition of Nf-kB-mediated testicular apoptosis and inflammation. *Andrologia*, 53(2):e13899.
7. Asghari A, Akbari G, Galustanian G. 2017. Magnesium sulfate protects testis against unilateral varicocele in rat. *Animal Reproduction*, 14:442-451.
8. Camoglio FS, Zampieri N, Corroppo M, Chironi C, Dipaola G, Giacomello L, Ottolenghi A. 2004. Varicocele and retrograde adrenal metabolites flow. An experimental study on rats. *Urology International*, 73(4):337-342.
9. Castellini C, Lattaioli P, Dal Bosco A, Minelli A, Mugnai C. 2003. Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary vitamin E, C and n-3 fatty acids. *Reproduction Nutrition Development*, 43(1):91-103.
10. D'Andrea S, Giordano AV, Carducci S, Sacchetti L, Necozone S, Costanzo M, De

Crescent Journal of Medical and Biological Sciences, 10(4):182-187.

24. Koksall IT, Usta M, Orhan I, Abbasoglu S, Kadioglu A. 2003. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian Journal Andrology*, 5(2):95-99.

25. Lampiao F, du Plessis SS. 2008. TNF-alpha and IL-6 affect human sperm function by elevating nitric oxide production. *Reproductive BioMedicine Online*, 17(5):628-631.

26. Lehimcioğlu NC, Öztürkler Y, YILDIZ S, ARI UÇ. 2019. The effect of intrauterine infusion of carvacrol after insemination on conception rate in repeat breeder cows subjected to progesteron based estrus synchronization protocol. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 25(5):633-638.

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

28. Mahran YF, Badr AM, Aldosari A, Bin-Zaid R, Alotaibi HN. 2019. Carvacrol and Thymol Modulate the Cross-Talk between TNF- α and IGF-1 Signaling in Radiotherapy-Induced Ovarian Failure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019:3173745.

29. Marchesi DE, Biederman H, Ferrara S, Hershlag A, Feng HL. 2010. The effect of semen processing on sperm DNA integrity: comparison of two techniques using the novel Toluidine Blue Assay. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 151(2):176-180.

30. Marmar JL. 2001. The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. *Human Reproduction Update*, 7(5):461-472.

and autophagy in the testicular tissues of rats. *Environmental Toxicology*, 38(6):1265-1276.

17. Güvenç M, Cellat M, Gökçek İ, Yavaş İ, Yurdagül Özsoy Ş. 2019. Effects of thymol and carvacrol on sperm quality and oxidant/antioxidant balance in rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 125(5):396-403.

18. Han L, Xiang S, Rong B, Liang Y, Zhao S. 2021. Verbascoside attenuates experimental varicocele-induced damage to testes and sperm levels through up-regulation of the hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis. *Pharmaceutical Biology*, 59(1):715-722.

19. Ibrahim DE, Lebda MA, Hashem AE, Elfeky MS. 2023. The Antioxidative effect of Carvacrol on Methotrexate induced testicular damage in rats. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 76(2):6.

20. Imran M, Aslam M, Alsagaby SA, Saeed F, Ahmad I, Afzaal M, Arshad MU, Abdelgawad MA, El-Ghorab AH, Khames A, Shariati MA, Ahmad A, Hussain M, Imran A, Islam S. 2022. Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review. *Food Science and Nutrition*, 10(11):3544-3561.

21. Janghorban-Laricheh E, Ghazavi-Khorasgani N, Tavalae M, Zohrabi D, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. 2016. An association between sperm PLC ζ levels and varicocele? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(12):1649-1655.

22. Jin F, Wu Q, Lu YF, Gong QH, Shi JS. 2008. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *European Journal of Pharmacology*, 600(1-3):78-82.

23. Khatami A, Rahmanifar G, Khaki A, Teymoori A, Rezaii A. 2023. Preservation of testicular tissue and alleviation of oxidative stress by carvacrol following torsion/detorsion in adult male rats.

- Contreras M, Salehi B, Soltani-Nejad A, Rajabi S, Tajbakhsh M, Sharifi-Rad J. 2018. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 32(9):1675-1687.
39. Shoorei H, Khaki A, Shokoohi M, Khaki AA, Alihemmati A, Moghimian M, Abtahi-Eivary SH. 2020. Evaluation of carvacrol on pituitary and sexual hormones and their receptors in the testicle of male diabetic rats. *Human and Experimental Toxicology*, 39(8):1019-1030.
40. Tian D, Huang W, Yan H, Zong H, Zhang Y. 2018. Effect of Varicocele on Serum FSH and LH Levels for Patients with Varicocele: a Systematic Review and Meta-analysis. *Indian Journal of Surgery*, 80(3):233-238.
41. Ultee A, Kets EP, Smid EJ. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10):4606-4610.
42. Uyar A, Cellat M, Kanat Ö, Etyemez M, Kutlu T, Deveci MYZ, Yavaş İ, Kuzu M. 2023. Carvacrol showed a curative effect on reproductive toxicity caused by Bisphenol AF via antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic properties. *Reproductive Toxicology*, 121:108456.
43. van der Horst G, Maree L. 2009. SpermBlue: a new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis. *Biotechnology and Histochemistry*, 84(6):299-308.
44. Walczak-Jedrzejowska R, Slowikowska-Hilczer J, Marchlewski K, Oszukowska E, Kula K. 2007. During seminiferous tubule maturation testosterone and synergistic action of FSH with estradiol support germ cell survival while estradiol alone has pro-apoptotic effect. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 45(1):S59-S64.
31. Missassi G, Dos Santos Borges C, de Lima Rosa J, Villela E Silva P, da Cunha Martins A Jr, Barbosa F Jr, De Grava Kempinas W. 2017. Chrysin Administration Protects against Oxidative Damage in Varicocele-Induced Adult Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017:2172981.
32. Ozden C, Ozdal OL, Bulut S, Guzel O, Koyuncu HH, Memis A. 2008. Effect of varicocele on serum inhibin B levels in infertile patients with varicocele. *Scandinavian Journal of Urology*. 42(5):441-443.
33. Oztürk H., Tander B., Aydin A., Okumus Z., Cetinkursun S. 2001. The effects of chemical sympathectomy on testicular injury in varicocele. *BJU International*, 87(3):232-234.
34. Panach-Navarrete J, Morales-Giraldo A, Ferrandis-Cortés C, García-Morata F, Pastor-Lence JC, Martínez-Jabaloyas JM. 2020. Is there a relationship between varicocele and testosterone levels? *Aging Male*, 23(5):592-598.
35. Romeo C, Santoro G. 2014. Free radicals in adolescent varicocele testis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014:912878.
36. Saleh RA, Agarwal A. 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*, 23(6):737-752.
37. Shafie A, Kianian F, Ashabi G, Kadkhodae M, Ranjbaran M, Hajiaqaei M, Lorian K, Abdi A, Seifi B. 2022. Beneficial effects of combination therapy with testosterone and hydrogen sulfide by reducing oxidative stress and apoptosis: Rat experimental varicocele model. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 20(11):941-954.
38. Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martorell M, Setzer WN, Del Mar

Research Article

Synthesis and Characterization of Liposomal Nanocarriers Containing Pomegranate Flower Extract to Investigate Its Toxicity on the MCF-7 Breast Cancer Cell Line

Ayda Shafigh¹, Lida Eftekharivash^{1*}, Ali Akbar Seifi Ashkezari²

1- Department of Microbiology, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran

2- Medical Student, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding author: lidaeftekharivash@yahoo.com

Received: 2 September 2024

Accepted: 23 December 2024

DOI: 10.60833/ascij.2025.1151606

Abstract

Although pomegranate flower extract has anticancer properties, it requires carriers to improve its efficacy by delivering it to the target cells. Therefore, this study focuses on the development of pomegranate flower extract-loaded nanoliposomes and investigates their effects on MCF-7 breast cancer cells. In this study, after extracting the pomegranate flower extract and determining properties such as the maximum wavelength and standard curves, the extract-loaded nanoliposomes were synthesized using the thin-film method. The physicochemical characteristics of the nanoliposomes, including encapsulation efficiency, drug release, size, and zeta potential, were evaluated using spectrophotometry and DLS, while their morphology was studied using Fe-SEM and AFM microscopy. Finally, the antitumor activity of the nanoliposomes containing the extract and the free extract was assessed on MCF-7 cancer cells using the MTT assay. The results showed that the encapsulation efficiency of the synthesized nanostructure was $73.2 \pm 2.6\%$, and the maximum release of the extract under normal and cancerous cell conditions was $51.3 \pm 1.4\%$ and $67.2 \pm 2.6\%$, respectively. The nanoparticle size was 155.7 ± 4.1 nm, their polydispersity index was 0.345, and the zeta potential was -17.1 ± 3.4 mV. Microscopic images indicated that the nanoparticles had a spherical and uniform shape with no aggregation or precipitation. The nanoliposomes containing the extract showed higher toxicity on MCF-7 cells compared to the free extract, exhibiting a lower IC₅₀, while the blank system showed minimal toxicity to healthy fibroblast cells. The nanostructure developed in this study not only demonstrated favorable physicochemical properties but also effectively loaded the pomegranate flower extract and significantly enhanced its antiproliferative effects, making it a promising candidate for breast cancer research.

Keywords: Breast cancer, Pomegranate flower extract, Liposome, MCF-7, MTT.



مقاله پژوهشی

سنتز و مشخصه‌یابی نانوحامل‌های لیپوزومی حاوی عصاره گل انار به منظور بررسی سمیت آن بر روی رده‌ی سلولی MCF-7 سرطان پستان

آیدا شفیق^۱، لیدا افتخاری‌وش^{۱*}، علی اکبر سیفی اشکذری^۲

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران

۲- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: lidaeftekharivash@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۲

DOI: 10.60833/ascij.2025.1151606

چکیده

اگرچه عصاره گل انار دارای خواص ضدسرطانی است، اما برای کارایی بهتر نیازمند حامل‌هایی است که آن را به سلول هدف برساند. بنابراین این مطالعه به ساخت نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گل انار و بررسی اثرات آن بر سلول‌های MCF-7 سرطان پستان می‌پردازد. در این بررسی، پس از استخراج عصاره گل انار و تعیین خصوصیات مانند طول موج ماکسیمم و منحنی‌های استاندارد، نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره با روش فیلم نازک سنتز گردید. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانولیپوزوم‌ها، از جمله میزان انکپسولاسیون، میزان رهائش دارو، اندازه و پتانسیل زتا، با اسپکتروفتومتری و DLS بررسی شد و مورفولوژی آن‌ها با میکروسکوپ‌های AFM و Fe-SEM مورد مطالعه قرار گرفت. در نهایت، ویژگی ضدتوموری نانولیپوزوم‌ها حاوی عصاره و عصاره آزاد بر روی سلول‌های سرطانی MCF-7 با روش MTT ارزیابی شد. نتایج نشان می‌دهد که راندمان انکپسولاسیون نانوسامانه سنتز شده $2/6 \pm 73/2$ درصد و حداکثر میزان رهاسازی عصاره در شرایط سلولی نرمال و سرطانی به ترتیب $1/4 \pm 51/3$ و $2/6 \pm 67/2$ درصد است. اندازه نانوذرات $4/7 \pm 155/1$ نانومتر، شاخص پراکندگی آنها $0/345$ و بار الکتریکی نانوذرات $3/4 \pm 17/1$ میلی‌ولت می‌باشد. تصاویر میکروسکوپی نشان داده که نانوذرات دارای شکل کروی و یکنواخت بوده و تجمع یا رسوبی ندارند. نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره نسبت به عصاره آزاد از سمیت بالاتری بر سلول‌های MCF-7 برخوردار بوده و IC50 پایین‌تری را نشان دادند در حالیکه سامانه بدون عصاره، سمیت ناچیزی را برای سلول‌های سالم فیروبلاستی ایجاد نموده است. نانوسامانه سنتز شده در این مطالعه علاوه بر داشتن خواص فیزیکوشیمیایی مناسب، توانست به طور موثری عصاره گل انار را بارگیری و به طور چشمگیری خواص ضد تکثیری آن را افزایش دهد، بنابراین می‌تواند در تحقیقات مرتبط با سرطان پستان مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، عصاره گل انار، لیپوزوم، MCF-7، MTT.

مقدمه

در زنان محسوب می‌شود. سرطان پستان از لحاظ خصوصیات پاتولوژیک بسیار ناهمگن است (۴۱). در برخی موارد رشد آهسته با پیش آگاهی بالا و در برخی موارد دیگر تومورهای تهاجمی دارد (۴۸). پیش‌بینی‌ها

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین انواع سرطان‌ها در سراسر جهان است که با نرخ پنج برابری نسبت به سرطان‌های درگیر در حال رشد است. به عبارت دیگر سرطان پستان دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان بعد از سرطان ریه

نشان می‌دهد که نه تنها شیوع سرطان پستان در سراسر جهان بلکه مرگ‌ومیر ناشی از آن نیز در حال افزایش است، به طوری‌که بر اساس آمار جهانی تا سال ۲۰۵۰ نرخ ابتلا به سرطان پستان به ۳/۲ میلیون مورد جدید در سال می‌رسد که نیاز مبرم به اقدامات پیشگیرانه و درمانی را در حوزه‌ی سلامت جامعه لازم شمرده است (۹). در سال ۲۰۱۵، تقریباً ۶۰۰ هزار مورد فوتی ناشی از آن گزارش شده است. هر سال، بیش از ۱٫۵ میلیون زن، معادل ۲۵ درصد از کل زنان مبتلا به انواع سرطان‌ها، به سرطان پستان دچار می‌شوند (۱۰). در ایالات متحده در سال ۲۰۲۵، تخمین زده می‌شود که ۳۱۶۹۵۰ مورد جدید سرطان پستان مهاجم در زنان و ۲۸۰۰ مورد در مردان تشخیص داده شود (۵). فاکتورهای متعددی از جمله جنسیت، افزایش سن، هورمون‌های استروژن، سابقه خانوادگی، جهش‌های ژنتیکی و سبک زندگی ناسالم وجود دارند که می‌توانند احتمال ابتلا به سرطان پستان را افزایش دهند (۱۸، ۲۷). گزینه‌های فعلی درمانی سرطان شامل جراحی، شیمی درمانی و پرتودرمانی و یا ترکیبی از این گزینه‌ها است (۴) در شیمی درمانی از داروهایی استفاده می‌شود که با تداخل در سنتز DNA و اختلال در تقسیم میتوز، از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌شود. این فرایند می‌تواند علاوه بر سلول‌های سرطانی، به سلول‌های سالم بدن نیز آسیب برساند و عوارض جانبی ناخواسته و نامطلوبی از جمله کاهش اشتها، تهوع، ریزش مو، بیماری‌های قلبی و غیره، ایجاد نماید (۳۲، ۴۷). علاوه بر این، از آنجا که دسترسی زیستی این داروها به بافت‌های تومور نسبتاً ضعیف است، دوزهای بیشتری لازم است که منجر به سمیت زیاد در سلول‌های طبیعی و افزایش بروز مقاومت چندانکه به داروها می‌شود (۲۹). بنابراین، مطلوب است که از روشی استفاده کنیم که بتواند سلول‌های سرطانی را بطور فعال هدف قرار دهد و از این طریق عوارض جانبی را درحین درمان، کاهش دهد. ظهور فناوری نانو در دو دهه گذشته تأثیر عمیقی بر روی درمان‌های بالینی داشته است. در مقایسه با عوامل شیمی درمانی معمولی، ناقلین مواد دارویی نانومقیاس با بهبود اثربخشی درمان، ضمن جلوگیری از سمیت در سلول‌های طبیعی به دلیل ویژگی‌هایی مانند

تجمع انتخابی بالا در تومورها از طریق افزایش نفوذپذیری و احتباس پتانسیل مقابله با برخی از این چالش‌ها را نشان داده‌اند (۱۶، ۴۲). لیپوزوم نوعی نانو حامل لیپیدی است که در سال‌های اخیر توجه بسیاری از پژوهشگران حوزه رسانش هدفمند دارو را به خود جلب نموده است که با توجه به شباهت آن به سیستم‌های بیولوژیکی، از زیست سازگاری بالایی برخوردار است. این مهم نشان دهنده یک پتانسیل امیدوار کننده به عنوان عاملی برای تحویل دارو است. طیف وسیعی از مواد نشان داده شده است که می‌توانند به‌طور مؤثر در لیپوزوم‌ها برای دستیابی به درمانی بهتر کپسوله شوند (۳۴، ۶). گیاهان دارویی و مشتقات آنها مانند عصاره و اسانس آنها از جمله ترکیباتی هستند که می‌توانند درون نانوذرات دارو رسان بارگذاری گردند و تحقیقات زیادی نشان داده است که استفاده از آنها می‌تواند در درمان بیماری‌هایی چون دیابت، بیماری‌های عصبی، بیماری‌های قلبی عروقی و سرطان مفید باشد (۳، ۱۳) این مواد به دلیل ماهیت طبیعی‌شان، زیست‌سازگاری بالایشان با بدن انسان، عوارض جانبی ناچیز و قیمت مناسبشان می‌توانند به عنوان داروهای جایگزین یا مکمل برای داروهای شیمیایی معرفی گردند. انار (*Punica granata*) از قدیمی‌ترین میوه‌های خوراکی است که بخش‌های مختلف آن شامل، پوست، دانه، گل و آب دارای ترکیبات فلاونوئیدی، آلکالوئیدی، اسیدهای آلی و غیره با خواص آنتی‌اکسیدانت، ضد میکروبی، ضد التهابی و ضد سرطانی است (۱۳، ۳۸). عصاره میوه‌ی انار توانایی مهار سیکلین کینازها را دارد که منجر به مهار رشد سلول سرطان و به دنبال آن آپوپتوز سلول‌های سرطانی انسانی می‌شود که با تغییر سطح Bax و Bcl-2 با آپوپتوز سلول سرطانی همراه است (۸) در همین راستا، هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه‌ی خواص ضد سرطانی عصاره هیدروالکلی گل انار لیپوزومال بر روی رده ی سلولی MCF-7 سرطان پستان است.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد: فسفاتیدیل کولین ۸۰ (SPC80)، کلسترول و قرص Phosphate Buffered Saline (PBS) متعلق به

شرکت Sigma آمریکا، ایزوپروپیل، کلروفرم و اتانول متعلق به شرکت Merck آلمان تهیه و خریداری شد. همچنین مواد شیمیایی استفاده شده در آنالیزهای سلولی شامل محیط کشت آماده DMEM، سرم جنین گاوی (FBS) و تریپسین به همراه آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین متعلق به شرکت GIBCO ایالات متحده آمریکا خریداری و آماده‌سازی شده‌اند.

جمع‌آوری و عصاره‌گیری گل انار: در ابتدا گل انار جمع‌آوری و نوع و گونه‌ی آن به تایید متخصصان گیاه‌شناسی دانشگاه یزد رسید. این گل‌ها سپس در سایه خشک گردیدند و بعد از پودر شدن به وسیله‌ی آسیاب برقی، سایر مراحل به وسیله‌ی پودرهای حاصله انجام شد. برای عصاره‌گیری از دستگاه سوکسله استفاده گردید که خود متشکل از چهار بخش اصلی بالن، هیتز، کندانسور و لوله‌ی خروجی است. برای شروع عصاره‌گیری، ۵۰ گرم از پودر حاصله درون کاغذ کارتوش فشرده و در داخل ستون کندانسور قرار گرفت و با اضافه کردن ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ به بالن سوکسله و اتصال آن به دستگاه فرایند عصاره‌گیری ادامه پیدا کرد. بعد از آن با اتصال منبع ورودی آب و خروجی کندانسور این فرآیند کامل گردید. عصاره‌گیری در شش سیکل انجام گرفت و در آخر عصاره حاصله به وسیله کاغذ صافی واتمن تخلیص گردید. در آخرین مرحله به منظور تبخیر حلال عصاره درون ظروف شیشه‌ای و در دمای محیط قرار گرفتند و بعد، تا زمان استفاده در یخچال نگهداری گشتند (۲).

بررسی طول موج جذبی ماکزیموم عصاره (λ_{max}) و رسم نمودارهای استاندارد در بافر فسفات‌سالین و ایزوپروپیل: به منظور به دست آوردن طول موج جذبی ماکزیموم عصاره در محدوده‌ی نور مرئی از عصاره، محلول استوک به غلظت ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در ایزوپروپیل و بافر PBS ساخته شد. با استفاده از این محلول‌ها و روش سری رقت‌های متوالی، غلظت‌های مختلفی از عصاره در محدوده‌ی ۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تهیه و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Epoch، آمریکا) طول موج جذبی عصاره در محدوده‌ی نور مرئی (۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر) در تمامی غلظت‌های تهیه شده، خوانده شد. در

آخر طول موجی که بیشتر میزان جذب در همه‌ی غلظت‌ها را داشت به عنوان طول موج جذبی ماکزیموم عصاره گل انار انتخاب گردید. این مرحله با سه بار تکرار صورت گرفت. برای رسم منحنی استاندارد عصاره در حلال ایزوپروپیل و PBS نیز با بهره‌گیری از جذب‌های به دست آمده در غلظت‌های مختلف عصاره در هر یک از بافرها و با بهره‌گیری از نرم‌افزار Excel منحنی استاندارد عصاره در بافرهای مذکور رسم و منحنی خط آنها به دست آمد. آزمایشات این مرحله نیز مانند مرحله‌ی قبل با سه بار تکرار صورت گرفت (۲)

روش فیلم نازک و ساخت نانولیپوزوم‌های حاوی

عصاره گل انار: در این مطالعه برای سنتز نانوذرات لیپیدی حاوی عصاره از روش فیلم نازک استفاده گردید که خود شامل چندین مرحله است (۲): مرحله‌ی اول: سنتز فیلم نازک: در مرحله اولیه، SPC80 و کلسترول با نسبت مولی ۷۰:۳۰، وزن‌بندی شده و سپس درون بالن مناسبی که با مقداری کلروفرم پر شده است، حل گردید. غلظت مشخصی از عصاره به مخلوط لیپیدی در بالن افزوده شد. سپس، بالن را روی دستگاه روتاری ایواپراتور (هیلدوف، آلمان) با دمای تنظیم شده ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه قرار دادیم تا طی ۲۰ دقیقه، مخلوط به صورت یکدست و همگن درآید. در ادامه در شرایط خلا، حلال آلی را حذف می‌کنیم و در نهایت، یک لایه نازک لیپیدی در ته بالن تشکیل گردید. مرحله‌ی دوم کاهش سایز با سونیکاسیون حمامی: در این مرحله برای کوچک‌سازی ذرات، از روش سونیکاسیون به حمامی به مدت ۴۰ دقیقه استفاده شد. مرحله سوم همگن سازی با فیلتراسیون: در مرحله فیلتراسیون، برای حذف ناخالصی‌ها و ذرات با اندازه نامطلوب، از فیلترهایی با قطرهای ۰/۴۵ میکرومتر و ۰/۲۲ میکرومتر استفاده شد تا سوسپانسیون نهایی از آن‌ها عبور داده شود. مرحله چهارم: جداسازی عصاره آزاد و بارگیری نشده با روش کیسه دیالیز: برای حذف دارویی که در لیپوزوم‌ها جای نگرفته، از روش دیالیز استفاده شد. کیسه‌های دیالیز با وزن مولکولی ۱۲ تا ۱۴ کیلودالتون به کار رفتند تا داروی آزاد را جدا کنند و میزان رهایش دارو را مورد بررسی قرار دهند. کیسه‌های

و بر اساس منحنی استاندارد عصاره در بافر PBS، نمودار آزادسازی عصاره از نانوذرات ترسیم شد (۲).

تعیین بار الکتریکی سطحی و اندازه نانوذرات: برای تعیین قطر ذرات نانو و بار الکتریکی سطحی آن‌ها (پتانسیل زتا)، از دستگاه زتا سایزر (مدل HORIBA) استفاده شد. اندازه‌گیری‌ها با استفاده از نور لیزر با طول موج ۶۵۷ نانومتر و در زاویه ۹۰ درجه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انجام پذیرفت (۲).

بررسی مورفولوژی نانوذرات: برای تحلیل و مطالعه بار سطحی نانوسیستم لیپوزومی که در این تحقیق ساخته شده است، حجمی معادل ۲۵ میکرولیتر از محلول لیپوزومی بر روی یک شیشه میکروسکوپی قرار گرفت و در معرض هوا خشک شد. سپس نمونه‌ها به مدت کوتاهی با طلا پوشانده شدند تا هدایت الکتریکی پیدا کنند. در نهایت، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی Fe-SEM و با توان ۱۰۰ وات، ویژگی‌های سطحی نانوحامل‌ها از جمله زبری، شکل، همواری و تجمع‌یافتگی مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش، از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) برای مطالعه ویژگی‌های سطحی نانوذرات از جمله زبری، شکل‌گیری و تجمع استفاده شد. میکروسکوپ نیروی اتمی، که یک ابزار دقیق برای تحلیل سطوح با دقت نانومتری است، به ما امکان می‌دهد تا توپوگرافی سطحی نمونه‌ها را با استفاده از یک نوک بسیار تیز با طولی معادل ۲ میکرون و قطری کمتر از ۱۰ نانومتر بررسی کنیم (۲).

رده‌ی سلولی: در این مطالعه از سلول‌های سرطانی سرطان پستان رده‌ی MCF-7 به عنوان سلول‌های سرطانی که از انستیتو پاستور تهران تهیه شدند استفاده گردید. همچنین از سلول‌های سالم فیبروبلاستی پوست ختنگاه انسان رده‌ی HFF که از مرکز ناباروری (IVF) یزد به دست آمدند به عنوان رده سالم و نرمال استفاده گردید. هر دو سلول در محیط DMEM و مطابق با پروتکل کشت سلولی ATCC (American Type Culture Collection) کشت داده شدند.

آماده‌سازی محیط کشت: محلول کشت DMEM طبق دستورالعمل موجود در جدول ۱، با استفاده از ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه و استریل شده تهیه شد. پس از اینکه

دیالیز پیش از استفاده، بین ۲ تا ۱۲ ساعت در آب مقطر ۷۰ درجه سانتی‌گراد خیسانده شدند. سپس، محلول دارویی به درون کیسه دیالیز انتقال یافت و به بشری که حاوی ۱۵۰ برابر حجم نمونه محلول بافر PBS منتقل شد. بشر دارای نمونه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در حمام یخ قرار گرفت و همزن کار گذاشته شد. فرآیند دیالیز در دو مرحله ۳۰ دقیقه‌ای انجام شد و در هر مرحله، بافر تازه جایگزین بافر قدیمی شد.

بررسی راندمان انکپسولاسیون نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره: لیپوزوم‌های حاوی عصاره را با نسبت‌های ۱ به ۱۰، ۱ به ۲۰ و ۱ به ۴۰ با ایزوپروپیل مخلوط کردیم تا دیواره لیپیدی آن‌ها شکسته شود و عصاره محبوس در داخل آزاد گردد. در نهایت، میزان جذب عصاره آزاد شده در رقت‌های مختلف و در طول موج ماکسیمم مشخص شده را با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری کردیم و با بهره‌گیری از منحنی استاندارد عصاره در ایزوپروپیل و رابطه زیر، درصد بارگذاری عصاره در لیپوزوم‌ها را محاسبه کردیم (۲):

$$\text{لیپوزوم‌ها را محاسبه کردیم (۲):} \frac{\text{مقدار عصاره محصور شده}}{\text{مقدار عصاره اولیه}} \times 100 = \text{راندمان عصاره بارگذاری شده}$$

بررسی روند رهایش عصاره از نانوسامانه: مطالعه‌ای بر فرآیند آزادسازی عصاره از نانولیپوزوم‌های تهیه‌شده انجام شد که در آن از تکنیک دیالیز استفاده گردید. در این تکنیک، حجمی معادل ۲۰ میلی‌لیتر از لیپوزوم‌های دارای عصاره در داخل کیسه دیالیز قرار داده شد و برای مدت زمان ۴۸ ساعت در کنار ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر PBS با نسبت ۱ به ۱۰، در شرایط دمایی و اسیدیته متفاوت (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH معادل ۷/۴) (مطابق با شرایط فیزیولوژیک بدن) و (دمای ۴۲ درجه و pH ۵/۴) (شرایط سلول سرطانی) نگهداری گردید. در فواصل زمانی مشخص و دوره‌ای (۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت)، ۱ میلی‌لیتر از محلول بافر اطراف کیسه دیالیز برداشته شده و مقدار مشابهی (۱ میلی‌لیتر) از بافر تازه با دما و pH برابر جایگزین گردید. سپس، میزان جذب نمونه‌های برداشته شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ماکزیموم عصاره اندازه‌گیری

محلول به طور کامل همگن شد، ۵۰۰ میکرولیتر از داروی ضد قارچ آمفوتریسین-B با غلظت ۱ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به محیط اضافه گردید. سپس، محیط کشت با افزودن ۱۰ درصد سرم FBS غنی‌سازی شده و pH آن در محدوده ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم گردید. در نهایت، با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری و رعایت شرایط استریل، محیط کشت زیر هود لامینار استریلیزه شد.

بررسی سمیت سلولی نانوذرات: آزمایش MTT، که بر اساس رنگ‌سنجی عمل می‌کند، بر پایه تبدیل کریستال‌های تترازولیوم زردرنگ (MTT) به فرمازان توسط آنزیم‌های ردوکتاز میتوکندریایی در سلول‌های زنده استوار است. با استفاده از آزمایش MTT، میزان بقای سلول‌ها پس از تماس با نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره در پلیت‌های ۹۶ خانه با تراکم سلولی 1×10^4 برای هر چاهک (۱۰۰ میکرولیتر کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین) سنجیده شد. پس از انتقال سلول‌ها به چاهک‌ها، برای اطمینان از چسبندگی آن‌ها، ۲۴ ساعت انکوباسیون انجام شد. سپس، محیط فوقانی چاهک‌ها خارج و با محیط کشت جدید حاوی فرم آزاد عصاره، عصاره لیپوزومال (غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) و لیپوزوم‌های خالی (با سری رقت-های مشخص) تیمار شدند. پس از ۷۲ ساعت، ۲۰

میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در PBS با pH برابر ۷ به هر چاهک اضافه و ۴ ساعت دیگر انکوباسیون داده شد تا سلول‌های زنده فرصت متابولیسم کردن MTT را داشته باشند. پس از این مدت، محلول داخل چاهک‌ها خارج و ۱۶۰ میکرولیتر DMSO برای حل کردن کریستال‌های فورمازان به هر چاهک افزوده شد. محلول درون چاهک‌ها به خوبی مخلوط و ۳۰ دقیقه دیگر انکوبه شد. در نهایت، جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (مدل Synergy HTX، شرکت Bio Tek، آمریکا) در طول موج‌های ۵۷۰ و ۶۳۰ نانومتر خوانده و درصد بقای سلول‌ها با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (۲).

$$\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت - میانگین جذب نوری در گروه آزمون} \\ = 100 \times \frac{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت - میانگین جذب نوری در گروه کنترل}}{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت - میانگین جذب نوری در گروه کنترل}} \\ \text{میزان زنده‌مانی سلول‌ها (\%)}$$

آنالیز آماری: برای تحلیل داده‌های آماری و تهیه چارت‌ها، از نسخه ششم نرم‌افزار پریسم بهره گرفته شد. تست ANOVA برای مقایسه گروه‌ها با در نظر گرفتن سطح خطای معناداری ۰/۵٪ به کار رفت. مقادیر P که از ۰/۵٪ بیشتر بودند، نادیده گرفته شدند. برای تجزیه و تحلیل نتایج آزمون MTT، از نرم‌افزار مایکروسافت اکسل ورژن ۲۰۱۳ استفاده شد. همچنین، برای بررسی داده‌های FE-SEM، از نرم‌افزار ImageJ استفاده گردید.

جدول ۱- مواد مصرفی به همراه وزن مورد استفاده شده برای ساخت محیط کشت DMEM

Table 1. Ingredients and weight used to make DMEM culture medium

L-Glutamine (g)	Streptomycin (g)	Penicillin (g)	NaHCO ₃ (g)	DMEM (g)
0.146	0.006	0.005	1.85	4.995

نتایج

طول موج ماکزیموم عصاره گل انار: بر اساس روشی که در بخش پیشین آورده شده، نمودار طیفی جذب عصاره گل انار در سطوح متفاوت غلظت، مشابه با نمایش داده شده در شکل ۱ می‌باشد. بیشینه جذب این عصاره در طول موج ۲۲۰ نانومتر رخ می‌دهد. لذا این طول موج به عنوان

طول موج جذبی ماکزیموم در نظر گرفته شد و در سایر تحلیل‌ها از آن استفاده گردید. نمودارهای استاندارد عصاره گل انار در بافرهای فسفات سالین و ایزوپروپانول: با بهره‌گیری از طول موج بیشینه جذبی عصاره گل انار، نمودارهای استاندارد برای این عصاره در محلول‌های ایزوپروپیل و PBS ترسیم شد. در

محلول ایزوپروپیل (شکل ۲)، نمودار استاندارد به صورت خط مستقیم با فرمول $Y=0.0028X-0.0054$ و ضریب رگرسیون (R^2) برابر با ۰٫۹۹۹۸ مشاهده می‌شود. در محلول PBS (شکل ۳) نیز، نمودار به صورت خط مستقیم با فرمول $Y=0.01118X-0.003406$ و ضریب رگرسیون ۰٫۹۹۹۶ است.

اندازه و بار الکتریکی سطحی نانوسامانه ستر شده حاوی عصاره گل انار: جهت بررسی سایز نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره از دستگاه زتا سایز استفاده گردید. نتایج نشان داد که سایز نانوذرات برابر با $155/1 \pm 4/7$ نانومتر است، که از نظر عددی در محدوده‌ی مناسبی قرار می‌گیرد. همچنین شاخص پراکندگی (PDI) برابر با ۰٫۳۴۵ است. بار سطحی نانوذرات نیز به وسیله‌ی دستگاه DLS اندازه‌گیری گردید. بر اساس آن داده‌ها می‌توان اینگونه استنباط کرد که پتانسیل زتای نانوذرات برابر با $3/4 \pm 17/1$ و نانو ذرات آنیونی هستند. نتایج اندازه ذرات و پتانسیل زتای نانو حامل‌ها در جدول ۲ گزارش شده است.

میزان درونگیری نانو سامانه و میزان رهائش عصاره: در نانوسیستم تولید شده، میزان بارگیری عصاره گل انار با بهره‌گیری از منحنی کالیبراسیون مربوطه در محیط ایزوپروپیل و با استفاده از فرمولاسیون مشخص، محاسبه شده و به طور میانگین $73/2$ درصد با انحراف معیار $2/6$ درصد به دست آمده است. تحلیل روند آزادسازی عصاره در شرایط متغیر دما و pH و در بازه‌های زمانی متفاوت با استفاده از داده‌های استاندارد عصاره این گیاه در محلول PBS انجام پذیرفته و در نمودار مربوطه (شکل ۴) نمایش داده شده است. مطالعه الگوی آزادسازی عصاره از نانوسیستم حاکی از آن است که سیستم مورد نظر دارای آزادسازی تدریجی و دو مرحله‌ای می‌باشد و در برابر عوامل محرک مختلف مانند دما و pH واکنش‌های متفاوتی را نشان می‌دهد. بالاترین میزان آزادسازی، که در طی ۴۸ ساعت در شرایط فیزیولوژیک بدن به میزان $51/3$ درصد با انحراف معیار $1/4$ درصد رخ داده، در حالی که در شرایط سرطانی با دمای بیشتر و pH پایین‌تر، این میزان به $67/2$ درصد با انحراف معیار $2/4$ درصد می‌رسد. بر اساس نمودار به دست آمده، آزادسازی عصاره از سیستم در دو مرحله

انجام می‌شود؛ مرحله اول با آزادسازی سریع‌تر که در ۸ ساعت اولیه رخ می‌دهد، ناشی از تفاوت قابل توجه در غلظت عصاره درون سیستم و محیط اطراف آن است، در حالی که مرحله دوم با کاهش شیب نمودار مشخص می‌شود که به دلیل کاهش تفاوت غلظت ایجاد شده است. نمودار شکل ۴ الگوی رهائش عصاره از سامانه لیپوزومی در شرایط مشابه سلول‌های سرطانی و سالم نشان می‌دهد. **مورفولوژی نانوذرات حاوی عصاره:** تصویر حاصل میکروسکوپ FE-SEM (شکل ۵) نشان می‌دهد که نانو ذرات حاوی عصاره تشکیل گردیده و از مورفولوژی کروی و سطح صاف برخوردار هستند. نتایج حاصل از بررسی سه بعدی نانوذرات حاوی عصاره گل انار به وسیله‌ی AFM نیز در شکل ۶ نشان داده شده است. بر اساس این تصاویر می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات دارای توپولوژی مناسب، کروی شکل و فاقد تجمع ناخواسته هستند که صحتی دیگر بر مورفولوژی مناسب نانو وزیکول‌های لیپیدی سنتز شده در این مطالعه است.

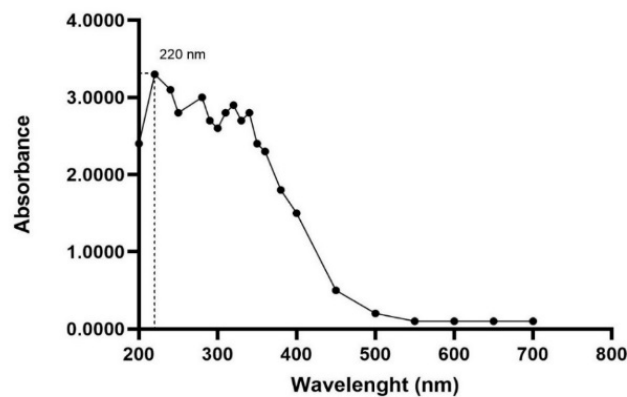
سمیت نانوسامانه سنتز شده بر سلول‌های سرطانی با روش MTT: تست سمیت سلولی نشان می‌دهد که لیپوزوم‌های فاقد عصاره سمیت ناچیزی بر سلول‌های سالم فیبروبلاست (HFF) داشته‌اند، این یافته‌ها امیدوارکننده است که عوارض جانبی ناخواسته بر سلول‌های طبیعی بدن نیز کاهش خواهند یافت، که این امر زیست‌سازگاری نانولیپوزوم‌ها را تأیید می‌کند (شکل ۷). بر اساس نتایج آزمون MTT که پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون بر روی سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های متفاوت لیپوزومی و آزاد عصاره گل انار انجام شد، مشخص شد که سمیت لیپوزوم-های حاوی عصاره پس از این مدت به طور قابل توجهی ($p < 0/005$) بیشتر از حالت آزاد عصاره است (شکل ۸). این آزمایش نه تنها خاصیت ضد تکثیر عصاره گل انار را بر روی سلول‌های سرطانی سرطان پستان تأیید می‌کند، بلکه نشان می‌دهد که عصاره در حالت لیپوزومی اثر سمی قوی‌تری بر سلول‌های سرطانی دارد (شکل ۸). علاوه بر این، نتایج نشان می‌دهند که سمیت عصاره در حالت انکپسوله شده در تمامی غلظت‌ها به طور معناداری ($0/005$) $p <$ بیشتر از حالت آزاد است و باعث مرگ‌ومیر بیشتری

در این سلول‌های سرطانی می‌شود. همچنین مشاهده شده که با افزایش غلظت عصاره، در هر دو حالت، سمیت آن بر روی سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد. مقایسه میزان IC_{50} عصاره‌های آزاد و انکپسوله شده در شکل ۹ نشان می‌دهد که لیپوزوم‌های حاوی عصاره در غلظت‌ها و دوزهای کمتر می‌توانند سمیت بیشتری نسبت به حالت آزاد ایجاد کنند، چرا که IC_{50} عصاره در حالت آزاد برابر با $426/6 \pm 8/2$ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و در حالت انکپسوله برابر با $164/3 \pm 4/1$ میلی‌گرم/میلی‌لیتر است، که این دو مقدار به طور معناداری متفاوت هستند.

جدول ۲- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوسامانه سنتز شده

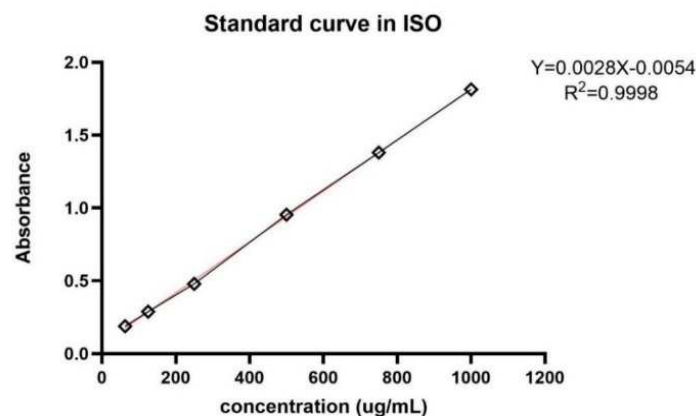
Table 2. Physicochemical characteristics of the synthesized nanosystem

Encapsulation efficiency (%)	Maximum release within 48 hours under normal conditions (%)	Maximum release within 48 hours in cancer conditions (%)	Size (nm)	zeta potential (mV)	Polydispersity index (PDI)
73.2 ± 2.6	51.3 ± 1.4	67.2 ± 2.6	155.1 ± 4.7	-17.1 ± 3.4	0.345



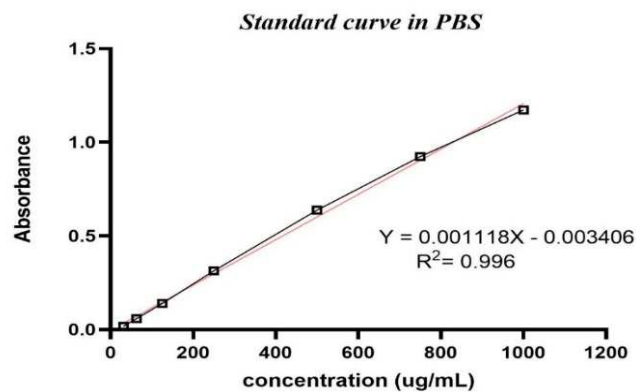
شکل ۱- طول موج جذبی عصاره در بازه ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر. بیشترین میزان جذب در طول موج ۲۲۰ نانومتر مشاهده شد.

Fig. 1. Absorption wavelength of the extract in the range of 200 to 800 nm. The highest amount of absorption was observed at the wavelength of 220 nm.



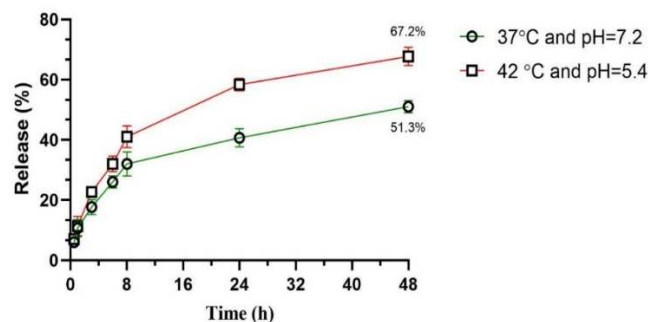
شکل ۲- نمودار استاندارد عصاره‌ی گل انار در بافر ایزوپروپیل

Fig. 2. Standard curve of pomegranate flower extract in isopropyl



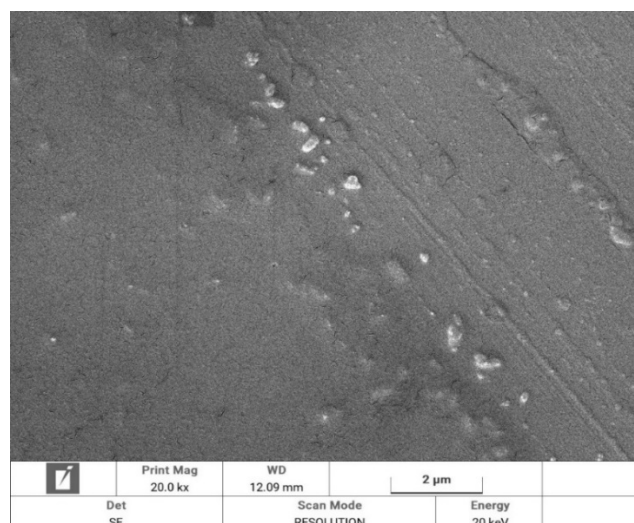
شکل ۳- نمودار استاندارد عصاره‌ی گل انار در بافر PBS

Fig. 3. Standard curve of pomegranate flower extract in PBS buffer



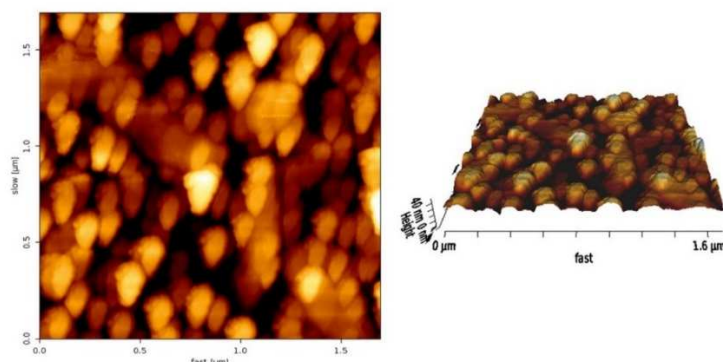
شکل ۴- بررسی روند رهاسازی عصاره از نانوسامانه لیپوزومی در پاسخ به محرک‌های مختلف دما و pH. شکل نشان می‌دهد که نانوسامانه لیپیدی دارای رهایشی کنترل شده و آهسته است. براساس این شکل مشخص می‌شود که بیشترین میزان رهایش در ۴۸ در شرایط نرمال ۵۱/۳ ± ۱/۴ و در شرایط سلول‌های سرطانی برابر است با ۶۷/۲ ± ۲/۴ درصد است.

Fig. 4. Examining the release process of the extract from the liposomal nanosystem in response to different stimuli of temperature and pH. The figure shows that the lipid nanosystem has a controlled and slow release. Based on this figure, it is clear that the highest release rate at 48 is 51.3 ± 1.4 in normal conditions and 67.2 ± 2.4 percent in cancer cells.



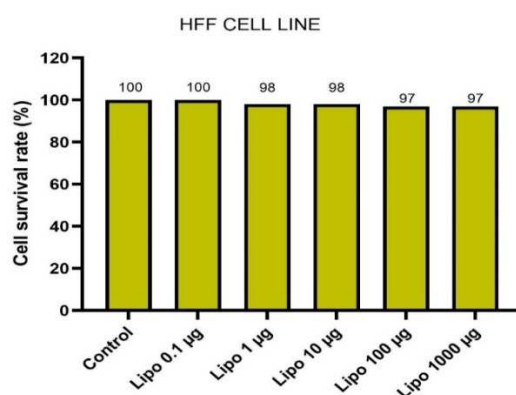
شکل ۵- تصویر به دست آمده از آنالیز نانولیپوزومهای حاوی عصاره با میکروسکوپ FE-SEM

Fig. 5. Image obtained from the analysis of nano-liposomes containing extract with FE-SEM microscope



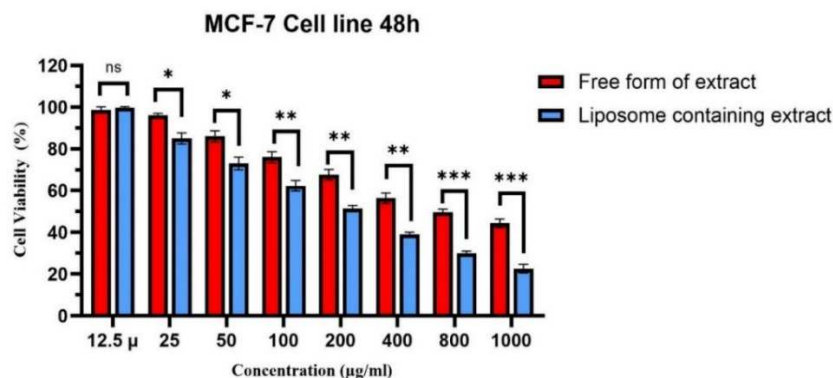
شکل ۶- تصویر به دست آمده از بررسی نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره به وسیله‌ی میکروسکوپ AFM

Fig. 6. Image obtained from examining nanoliposomes containing extract using AFM microscopy



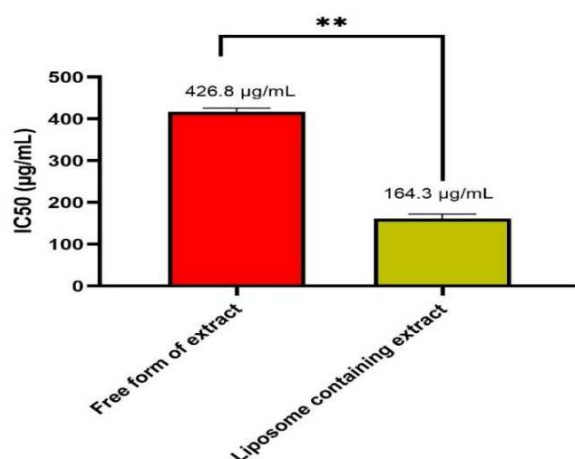
شکل ۷- بررسی سمیت نانولیپوزوم‌های فاقد عصاره بر روی سالم HFF. نتایج حاصل از این آنالیز در طی ۴۸ ساعت با استفاده از روش MTT نشان می‌دهد این نانوذرات سمیت بسیار کمی بر روی سلول فیبروبلاست (HFF) دارند.

Fig. 7. Toxicity study of extract-free nanoliposomes on healthy HFF. The results of this analysis over 48 hours using the MTT method show that these nanoparticles have very low toxicity on fibroblast cells (HFF).



شکل ۸- بررسی سمیت سلولی نانوسامانه سنتز شده با روش MTT. با توجه به نمودار، اثر سمیت با افزایش غلظت در هر دو حالت آزاد و انکپسوله رابط مستقیم دارد و با افزایش غلظت سمیت افزایش می‌یابد. همچنین سمیت عصاره انکپسوله در همه غلظت‌ها نسبت به عصاره آزاد به طور معناداری بیشتر است. NS: فاقد اختلاف معنادار، **: $P < 0.005$ و ***: $P < 0.005$.

Fig. 8. Evaluation of the cytotoxicity of the synthesized nanosystem by MTT method. According to the graph, the toxicity effect has a direct relationship with the increase in concentration in both free and encapsulated states, and the toxicity increases with the increase in concentration. Also, the toxicity of the encapsulated extract is significantly higher than the free extract in all concentrations. NS: No significant differences. **and***: $p < 0.005$.



شکل ۹- بررسی میزان IC₅₀ عصاره گل انار در حالت آزاد و انکپسوله با استفاده از آنالیز MTT. بر اساس این نمودار می‌توان اینگونه استنباط کرد که سمیت عصاره انکپسوله نسبت به عصاره آزاد، بر روی سلول‌های رده‌ی MCF-7 سرطان پستان به طور معناداری افزایش پیدا کرده است. **: $P < 0.005$

Figure 9. Checking the IC₅₀ value of pomegranate flower extract in free and encapsulated state using MTT analysis. Based on this graph, it can be concluded that the toxicity of the encapsulated extract compared to the free extract has significantly increased on MCF-7 breast cancer cells. **: $p < 0.005$

بحث

ایمن با عوارض جانبی کم برای مبارزه با سرطان تایید می‌کند (۲۰). عصاره گل انار به دلیل برخورداری از ترکیبات فعال زیستی نظیر پانیکلاژین، الازیک اسید و گالیک اسید از ویژگی‌های ضدتکثیری علیه سلول‌های سرطانی برخوردار است. این ترکیبات با افزایش مسیرهای مرتبط با آپوپتوز سلولی از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کنند (۴۵). نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که عصاره لیپوزومال گل انار نسبت به عصاره آزاد، خاصیت ضد تکثیری بیشتری علیه سلول‌های سرطانی MCF-7 پستان داشته است و سامانه بدون عصاره سمیت ناچیزی برای سلول‌های سالم فیبروبلاست ایجاد نموده است. کریمی مقدم و همکاران در ۲۰۱۹، طالعی اردکانی و همکاران در ۲۰۲۰ و پرریان و همکاران در ۲۰۲۰ در پژوهش‌های خود همانند پژوهش حاضر اثرات ضد تکثیری بیشتری را برای سامانه‌های لیپیدی حاوی دارو نسبت به داروی آزاد علیه سلول‌های سرطانی گزارش نموده‌اند (۱۹، ۴۶، ۳۱). برای مثال طائب‌پور و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان دادند که با انکپسولاسیون عصاره خارمریم در لیپوزوم‌ها، خاصیت ضدسرطانی آن افزایش و

استفاده از ترکیبات ضد تکثیری علیه سلول‌های سرطانی که دارای اثرات درمانی بالا و عوارض جانبی اندک باشد، لازم و ضروری است و در این بین ترکیبات گیاهی گزینه مناسبی برای این منظور است. ولی استفاده از آنها با چالش‌هایی روبرو است که استفاده از نانوذرات بویژه حامل‌های لیپیدی نظیر لیپوزوم می‌تواند در کاهش این مشکلات موثر باشند. در این مطالعه نانو حامل‌های لیپوزومی حاوی عصاره گل انار را سنتز نموده و ضمن سنجیدن ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن، اثرات ضد تکثیری آن را بر رده سلولی MCF-7 سرطان پستان بررسی نمودیم. آمار و ارقام حاکی از ناکارآمدی روش‌های درمانی کنونی در درمان سرطان پستان است. افزایش روز افزون تعداد مبتلایان به این بدخیمی در سرتاسر جهان و همچنین تعداد بالای مرگ‌ومیر گزارش شده در میان مبتلایان از یک سو و مقاومت سلول‌های توموری در برابر شیمی‌درمانی و عوارض جانبی شدید ناشی از سوی دیگر، نیاز به یک استراتژی درمانی جدید را برای درمان این بدخیمی روشن می‌کند (۲۶). بسیاری از مطالعات کارآمدی استفاده از گیاهان و عصاره‌های آنها را به عنوان عوامل ضد سرطان

اثر کشندگی آن بر روی سلول‌های سرطانی سرطان استخوان رده‌ی SAOS-2 افزایش می‌یابد (۴۴). در پژوهش حاضر نیز ما نشان دادیم که بارگذاری عصاره گل انار درون نانولیپوزوم سبب افزایش خاصیت ضدسرطانی آن بر روی سلول‌های سرطانی سرطان پستان می‌گردد. به طوریکه IC₅₀ عصاره از ۴۲۶/۸ میکروگرم/میلی‌لیتر در حالت آزاد به ۱۶۴/۳ میکروگرم/میلی‌لیتر در حالت انکپسوله کاهش می‌یابد که نشان از افزایش خاصیت ضدسرطانی و کاهش دوز مصرفی عصاره برای ایجاد سمیتی یکسان نسبت به حالت آزاد است. راندمان انکپسولاسیون دارو یا توانایی در بارگیری حداکثر میزان دارو از جمله‌ی این ویژگی‌ها است. این عامل به فاکتورهای مختلفی از جمله نوع و میزان مواد به کار رفته در سنتز نانوذرات و روش‌های ساخت آنها بستگی دارد. راندمان انکپسولاسیون نانوذرات ساخته شده در این مطالعه برابر با $2/6 \pm 73/2\%$ بود که کارآمدی این نانوذرات را اثبات می‌کند. در این مطالعه از SPC80 به جای SPC60 استفاده گردید که درجه‌ی اشباع بالاتری نسبت به SPC60 دارد و سبب کاهش سیالت غشای نانوذرات می‌گردد که به نوبه‌ی خود می‌تواند میزان درون‌گیری را در نانولیپوزوم‌ها به دلیل کاهش سختی آنها، افزایش دهد (۱۴). کلسترول نیز از جمله مواد دیگر در سنتز این نانوذرات بوده است. استفاده از کلسترول در سنتز نانوذرات بسیار مهم است چرا که یک اثر دوگانه و متناقض را در میزان درون‌گیری نانوذرات ایجاد می‌کند. استفاده از نسبت مولی صحیح کلسترول در سنتز نانولیپوزوم‌ها سبب پایداری غشای آنها و در نتیجه افزایش راندمان انکپسولاسیون در آنها می‌گردد. اما استفاده‌ی بیش از اندازه با کمتر از اندازه از کلسترول سبب اختلال در ثبات و سیالیت غشای نانوذرات لیپیدی و در نتیجه کاهش میزان درون‌گیری آنها می‌گردد (۱۵، ۳۳). میزان بارگذاری عصاره در این پژوهش نسبت به پژوهش‌های سال‌های اخیر از جمله پژوهش مجدی زاده و همکاران در ۲۰۱۸، میرزایی و همکاران در ۲۰۲۱، طائب پور و همکاران در ۲۰۲۱ و افتخاری و همکاران در ۲۰۲۴ بیشتر می‌باشد (۴۵، ۲۳، ۲۴، ۱۱). این تفاوت می‌تواند ناشی از نوع و ماهیت ماده بارگذاری شده و

درصد مولی مواد تشکیل دهنده سامانه‌های مورد استفاده در این پژوهش‌ها باشد. اندازه نانوذرات نیز در انتخاب یک نانوحامل دارورسان نقش بسیار کلیدی بازی می‌کند. چرا که اندازه‌ی نانوذرات سبب پایداری و توزیع مناسب آنها در دستگاه گردش خون انسان و در نتیجه رسانش دارو به بافت هدف می‌شود. نانوذرات با اندازه‌ی بیشتر از ۲۵۰ نانومتر به راحتی توسط سیستم ایمنی شناسایی و به عنوان عامل بیگانه حذف می‌گردند. همچنین نانوذرات در این محدوده‌ی سایز قادر نیستند تا توسط سیستم اندوتلیال پاکسازی گردند که موجب تجمع آنها در بافت‌های بدن مانند کبد و کلیه و ایجاد اثرات ثانویه ناخواسته گردند (۱۷). میزان کلسترول و فسفولیپید به کار رفته در سنتز نانوذرات لیپیدی اساسی‌ترین نقش را در تعیین اندازه آنها بازی می‌کند. به طور کلی کاهش میزان فسفولیپید تا حدی که پایداری غشای نانوذرات را بر هم نزند می‌تواند سبب کاهش سایز نانوذرات گردد. به عبارت دیگر لیپوزوم‌ها با محتوی کمتر از فسفولیپید اندازه‌ی کوچکتر از لیپوزوم با محتوی فسفولیپیدی بیشتر دارد. افزایش کلسترول درون لیپوزوم‌ها نیز با قرارگیری این مولکول در بین غشای دولایه نانوذرات پاسخ داده می‌شود که به نوبه‌ی خود سبب افزایش سایز نانوذرات می‌گردد (۲۸). اندازه‌ی نانوذرات در این مطالعه برابر با $4/7 \pm 155/1$ نانومتر است که عددی مطلوب به حساب می‌آید. بارالکتریکی سطحی نانوذرات نیز در انتخاب آنها به عنوان نانوحامل‌های دارو رسان بسیار فاکتور مهمی است. اگرچه نظر می‌رسد که ذرات با بار خیلی زیاد $< 30 \pm$ سبب پایداری کلئید می‌گردد چرا که این بار قوی سبب ایجاد نیروی دافعه‌ی نیرومند بین ذرات تشکیل دهنده کلئید و جلوگیری از رسوب آنها و در نتیجه پایداری آن می‌گردد اما در عمل و در سیستم گردش خون این ادعا صحیح نیست و دلیل آن سیستم ایمنی بدن میزبان است. سیستم ایمنی بدن انسان به سرعت مولکول‌هایی که بار یکسانی با سلول‌های خونی ندارند را شناسایی و به آنها پاسخ می‌دهد که این پاسخ به شکل بلعیده شدن و پاکسازی به وسیله‌ی ماکروفاژها یا مونوسیت‌های خونی است. لذا ذراتی با بار خیلی مثبت یا خیلی منفی به راحتی در بدن حذف می‌گردند (۴۰). نانوسامانه سنتز شده در این

مطالعه از نوع آنیونی و برابر با $3/4 \pm 17/1$ میلی ولت است که مطلوب و سازگار به حساب می‌آید. Majdizadeh و همکاران در ۲۰۲۵، Nafisi-Moghadam و همکاران در ۲۰۲۴، ساسانی و همکاران در ۲۰۲۱، شاهی و همکاران در ۲۰۱۹ و بهرامی بنان در ۲۰۱۸، در سال‌های اخیر برای سامانه‌های لیپیدی مورد استفاده در پژوهش‌های خود، همانند پژوهش حاضر، پتانسیل زتای منفی را گزارش نموده و از آن به عنوان نوعی ویژگی مطلوب یاد کرده‌اند (۷، ۲۲، ۲۵، ۳۵، ۳۷). ره‌ایش دارو از نانوسامانه نیز از جمله فاکتورهای مهم دیگر در انتخاب نانوذرات است. نانولیپوزوم‌های ساخته شده در این مطالعه دارای ره‌ایش آهسته و کنترل شده بودند. درجه آزادسازی دارو از نانوذرات تولیدی به فاکتورهای گوناگونی چون نوع و مقدار مواد مورد استفاده در ساختار نانوذرات وابسته است. به عنوان نمونه، افزایش مقدار کلسترول می‌تواند به افزایش درجه آزادسازی دارو از نانوذرات منجر شود، زیرا بالا رفتن سطح کلسترول در ساختار لیپوزوم‌ها موجب تشدید رقابت میان دارو و کلسترول برای قرار گرفتن در لایه‌های دوگانه فسفولیپیدی می‌شود، که این خود می‌تواند به افزایش درجه آزادسازی دارو کمک کند. از سوی دیگر، افزایش کلسترول می‌تواند به کاهش سیالیت غشای لیپوزومی منجر شود، که این نیز به نوبه خود، میزان آزادسازی دارو را از نانولیپوزوم‌ها بیشتر می‌کند (۲۱، ۳۰). نانوذرات سنتز شده می‌تواند به محرک‌های محیطی پاسخ دهند و این پاسخ با تغییر در میزان ره‌اسازی دارو صورت می‌گیرد به طوریکه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و $pH 7/2$ یا شرایط سلول نرمال میزان ره‌اسازی عصاره از نانوسامانه برابر با $1/4 \pm 51/3$ درصد است در حالیکه با افزایش دما به ۴۲ درجه سانتی-گراد و کاهش pH به ۵/۴ که شرایط شبیه به شرایط سلول سرطانی است میزان ره‌ایش به $2/6 \pm 67/2$ درصد افزایش می‌یابد. که این افزایش پاسخ در حقیقت دستاورد این مطالعه به حساب می‌آید چرا که با استفاده از این ویژگی می‌توان از ایجاد عوارض ناخواسته بر روی سلول‌های نرمال کاست. افزایش دما در اطراف نانوذرات سبب افزایش نفوذپذیری غشای لیپوزوم و در نتیجه افزایش

میزان ره‌اسازی دارو می‌شود. کاهش pH نیز با ایجاد یک گرادیان پروتون در طول غشا به وسیله پروتونیزاسیون گروه‌های آمینی موجود در عصاره باعث افزایش نفوذپذیری غشا و در نتیجه افزایش میزان ره‌اسازی دارو می‌گردد (۱). ساسانی و همکاران در ۲۰۱۹، طائب پور و همکاران در ۲۰۲۱، Siyadatpanah در ۲۰۲۳ و زارع زاده مهریزی در ۲۰۲۳ همانند پژوهش حاضر، ره‌ایش دارو از سامانه‌های لیپیدی مورد استفاده از پژوهش خود را آهسته ره‌ش گزارش نموده‌اند (۳۶، ۴۳، ۴۹). ما در این مطالعه موفق به سنتز نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گل انار با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسب و ره‌ایش آهسته و کنترل شده شدیم که توانستند به طور موثر سبب افزایش خاصیت ضدتکثیری عصاره بر روی سلول‌های سرطانی پستان نسبت به حالت آزاد آن گردند. همچنین نانوسامانه سنتز شده در این مطالعه توانست میزان ره‌اسازی عصاره را در پاسخ به محرک‌های محیطی مانند افزایش دما و اسیدیته محیط افزایش دهد.

نتیجه‌گیری

نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره انار با میزان انکپسولاسیون $2/6 \pm 73/2$ درصد، سایز $4/7 \pm 155/1$ نانومتر، شاخص پراکندگی $0/345$ و بار الکتریکی $3/4 \pm 17/1$ میلی‌ولت سنتز شده که دارای ره‌ایش آهسته، پیوسته و کنترل شده $1/4 \pm 51/3$ درصد در شرایط سلول نرمال و $2/6 \pm 67/2$ درصد در شرایط سلول سرطانی بودند، سنتز گردید که توانستند به طور چشمگیری سبب افزایش خاصیت ضدسرطانی عصاره بر روی سلول‌های سرطانی رده‌ی MCF-7 سرطان پستان شوند و IC_{50} عصاره را از $426/8$ میکروگرم/میلی‌لیتر در حالت آزاد به $164/3$ میکروگرم/میلی‌لیتر در حالت انکپسوله کاهش دهند. همچنین نانولیپوزوم‌های سنتز شده در این مطالعه از نوع زیست‌سازگار بوده و از سمیت ناچیزی بر سلول‌های سالم بدن انسان برخوردار بودند.

منابع

1. Akbari, P., Taebpour M., Akhlaghi M., Hasan S.H., Shahriyari S., Parsaeian M., Haghirosadat B.F., Rahdar A., Pandey S. 2024.

CA: A Cancer Journal for Clinicians, 69(6):438-451.

10. DeSantis, C.E., Ma, J., Goding Sauer, A., Newman, L.A., Jemal, A. 2017. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 67(6):439-448.

11. Eftekhari-Vash, L., Majdizadeh, M. 2024. Fabrication and physicochemical characterization of liposome systems containing Glycyrrhiza glabra hydroalcoholic extract and evaluation of toxicity of free and liposomal extract on healthy human fibroblast cell line (HFF) and MCF-7 breast cancer cell line. *Journal of Knowledge and Health in Basic Medical Sciences*, 18(4):59-69.

12. Faria, A., Calhau, C. 2011. The bioactivity of pomegranate: impact on health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(7):626-634.

13. Filipczak, N., Pan, J., Yalamarty, S.S.K., Torchilin, V.P. 2020. Recent advancements in liposome technology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 156:4-22.

14. Ghafari, M., Haghirsadat, F., Khanamani Falahati-pour, S., Zavar Reza, J. 2020. Development of a novel liposomal nanoparticle formulation of cisplatin to breast cancer therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(7):3584-3592.

15. Kirby, C. J., Gregoriadis, G. 2019. A simple procedure for preparing liposomes capable of high encapsulation efficiency under mild conditions. In *Liposome Technology* (pp. 19-27). CRC Press.

16. Ghashghaei, M., Akhlaghi, M. 2021. Investigation of nanoniosomal formulation containing doxorubicin effect on ovarian cancer cell line (OVCAR-3 cell line). *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 11(43):46-62.

17. Harashima, H., et al. 1994. Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharmaceutical Research*, 11:402-406.

18. Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P., Starosławska, E. 2015. Breast cancer risk factors. *Menopause Review/Przegląd Menopauzalny*, 14(3):196-202.

19. Karimi-Moghddam, A., Nikounahad-Lotfabadi, N., Haghirsadat, B.F., Majdizadeh, M. 2019. Investigating the effect of lipid

Regulation of the P53 tumor suppressor gene and the Mcl-2 oncogene expression by an active herbal component delivered through a smart thermo-pH-sensitive PLGA carrier to improve osteosarcoma treatment. *Medical Oncology*, 41(3):68.

2. Akhlaghi, M., Eftekharivash, L., Parnian, F., Taebpour, M., Rostamian, T., Zarezadeh Mehrizi, M., Haghirosadat, B.F. 2021. Synthesis and study of cellular and physicochemical properties of nanoliposomes containing aqueous extract of Hedera Helix. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 12(45):97-112.

3. Akhlaghi, M., Eftekharivash, L., Taebpour, M., Afereydoon, S., Ebrahimpour, M., Mehrizi, M.Z., fatemeh Haghirosadat, B. 2022. Improving the therapeutic performance of glycyrrhiza glabra hydroalcoholic extract using liposomal nano-carriers and their characterization. *Disease and Diagnosis*, 11(2):39-48.

4. Akhlaghi, M., Taebpour, M., Lotfabadi, N. N., Naghib, S. M., Jalili, N., Farahmand, L., Tofghi, D. 2022. Synthesis and characterization of smart stimuli-responsive herbal drug-encapsulated nanoniosome particles for efficient treatment of breast cancer. *Nanotechnology Reviews*, 11(1):1364-1385.

5. American cancer society. 2025. cancer facts and figures 2025. Atlanta american cancer.

6. Baghiani, M., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F. 2019. Experimental study: experimental evaluation of phospholipid system containing doxorubicin HCL for use in chemotherapy. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 26(11):945-956.

7. Bahrami-Banan, F., Sheikhha, M.H., Ghasemi, N., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F. 2018. Preparation and study of nanoniosomes containing doxorubicin and evaluation of its toxicity on acute myeloblastic leukemia cell line KG-1. *Journal of Payavard Salamat*, 12(4):309-323.

8. Deng, Y., Li, Y., Yang, F., Zeng, A., Yang, S., Luo, Y., Yin, W. 2017. The extract from *Punica granatum* (pomegranate) peel induces apoptosis and impairs metastasis in prostate cancer cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 93:976-984.

9. DeSantis, C.E., Ma, J., Gaudet, M.M., Newman, L. A., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Siegel, R.L. 2019. Breast cancer statistics.

- affects their targeting efficiency to tumors and the therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 40(1-2):75-87.
29. Oun, R., Moussa, Y.E., Wheate, N.J. 2018. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Transactions*, 47(19): 6645-6653.
30. Pande, S. 2023. Liposomes for drug delivery: Review of vesicular composition, factors affecting drug release, and drug loading in liposomes. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 51(1):428-440.
31. Parnian, F., Hekmati-Moghadam, S.H., Majdizadeh, M., Jebali, A., Haghirsadat, B.F. 2020. Fabrication of niosomal nano-carriers containing aqueous extract of heder helix and comparison of toxicity of free extract and niosome extract on HT29 colorectal cancer cell line. *Journal of Knowledge and Health in Basic Medical Sciences*, 15(3):31-45.
32. Pearce, A., Haas, M., Viney, R., Pearson, S. A., Haywood, P., Brown, C., Ward, R. 2017. Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. *PloS one*, 12(10):e0184360.
33. Pornsunthorntawe, O., Chavadej, S., Rujiravanit, R. 2011. Characterization and encapsulation efficiency of rhamnolipid vesicles with cholesterol addition. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(1):102-106.
34. Rabani, E., Behzadi, R., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F. 2022. Fabrication of liposomal formulation containing paclitaxel and comparison of its toxicity with non-liposomal paclitaxel on MCF-7 breast cancer cell line. *Pars Journal of Medical Sciences*, 18(2):26-40.
35. Sasani, E., Shahi Malmir, H., Daneshmand, F., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F. 2020. Synthesis and physiochemical characterization of liponiosomal hybrid nano-carriers as carriers for doxorubicin HCl anti-cancer drug. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*, 27(1):35-47.
36. Sasani, E., Shahi Malmir, H., Daneshmand, F., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F. 2018. A new study on synthesis and optimization of PEGylated liponiosomal nanocarriers containing curcumin for use in cancer chemotherapy. *SSU Journals*, 26(6):528-541.
- nanoparticles containing silibinin anti-cancer drug on the growth of breast cancer MCF-7 cell line. *Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences*, 6(4):1-12.
20. Li, K., Xiao K., Zhu S., Wang Y., Wang W. 2022. Chinese herbal medicine for primary liver cancer therapy: Perspectives and challenges. *Frontiers in Pharmacology*, 13:889799.
21. Lindner, L.H., Hossann, M. 2010. Factors affecting drug release from liposomes. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 13(1):111-123.
22. Majdizadeh, M., Akbarzadeh, S., Al-Turnachy, H.H., Hemati, M., Akhlaghi, M., Haghirsadat, B.F., Oroojalian, F. 2025. Synthesis of nano-liposomes containing Mentha piperita essential oil and investigating their stability, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative properties. *Nanomedicine Journal*, 12(1):122-139.
23. Majdizadeh, M., Rezaei-Zarchi, S., Movahedpour, A.A., Shahi Malmir, H., Sasani, E., Haghirsadat, B.F. 2018. A new strategy in improving therapeutic indexes of medicinal herbs: Preparation and characterization of nano-liposomes containing Mentha piperita essential oil. *SSU Journals*, 25(11):853-864.
24. Mirzaei, F., Majdizadeh, M., Fatahi-Bafghi, A., Ehsani, R., Haghirsadat, B. F. 2021. Fabrication and characterization of liposomal nano-carriers containing essential oils of Trachyspermum ammi to counteract Trichomonas vaginalis. *Koomesh*, 23(2):283-290.
25. Moghadam, R.N., Majdizadeh, M., Golbashi, M., Haghirsadat, F., Hemati, M. 2024. Laboratory study: Synthesis and optimization of nano-niosomes containing Bunium persicum essential oil and investigating its toxicity on Trichomonas vaginalis parasite and HFF cell line. *Heliyon*, 10(16):e35967.
26. Mohseni, M. 2021. A new therapeutic approach for the treatment of breast cancer using synthesis of liposomes containing silybinin and their characterization. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 11(44):57-70.
27. Momenimovahed, Z., Salehiniya, H. 2019. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 11:151-164.
28. Nagayasu, A., Uchiyama, K., Kiwada, H. 1999. The size of liposomes: A factor that

43. Taebpour, M., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F., Akhlaghi, M. 2021. Fabrication of liposomal nanoparticles containing hydroalcoholic extract of *Silybum marianum* and evaluation of its toxicity on human osteosarcoma cancer cell line (SAOS-2) and evaluation effect of free hydroalcoholic extract of *Silybum marianum* and empty liposomes on healthy human fibroblast cell (HFF). *Journal of Knowledge and Health in Basic Medical Sciences*, 16(1):61-73.
44. Taebpour, M., Majdizadeh, M., Nodoushan, F.S., Akhlaghi, M., Haghirsadat, B.F. 2023. Evaluation and Comparison of *Punica Granatum* Peel and Flower Extract Toxicity on MCF-7 Breast Cancer Cell Line and Comparison of Antioxidant Activity of *Punica Granatum* Peel and Flower Extract. *Journal of Knowledge and Health in Basic Medical Sciences*, 18(1):9-16.
45. Talei-Ardakani, N., Daneshmand, F., Mirhoseini, M., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F. 2020. Fabrication and characterization of physicochemical niosomal nanocarriers containing quercetin flavonoids for therapeutic purposes. *Journal of Knowledge and Health in Basic Medical Sciences*, 15(1):fa32-fa40
46. van den Boogaard, W.M., Komninos, D.S., Vermeij, W.P. 2022. Chemotherapy side-effects: not all DNA damage is equal. *Cancers*, 14(3):627.
47. Waks, A.G., Winer, E.P. 2019. Breast cancer treatment: a review. *Jama*, 321(3):288-300.
48. Zarehzadeh-Mehrizi, M., Majdizadeh, M., Zarehzadeh-Mehrizi, M., Afshoun, A., Zhian-Mehrizi, M., Haghirsadat, B.F. 2023. Investigating the performance of liposomal formulations containing clove essential oil made by thin layer and heat method in temperature and pH conditions similar to the mouth in order to be used in the research of oral and dental diseases. *Experimental Animal Biology*, 12(46):15-26.
37. Shahi Malmir, H., Kalantar, S.M., Sasani, E., Asgari, M., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F. 2019. Synthesis and optimization of niosomal carriers containing doxorubicin in order to achieve a final formulation with high potential in cancer cells' temperature and acidity. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 26(10):879-894.
38. Sharma, P., McClees, S.F., Afaq, F. 2017. Pomegranate for prevention and treatment of cancer: an update. *Molecules*, 22(1):177.
39. Siyadatpanah, A., Norouzi, R., Mirzaei, F., Haghirosadat, B.F., Nissapatorn, V., Mitsuwan, W., Nawaz, M., Lourdes, M., Hosseini, S. A., Montazeri, M., Majdizadeh, M., Almeida, R. S., Hemati, M., Wilairatana, P., Douglas, H. 2022. Green synthesis of nano-liposomes containing *Bunium persicum* and *Trachyspermum ammi* essential oils against *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 56(1):150-162.
40. Smith, M.C., Crist R.M., Clogston J.D., McNeil S.E., 2017. Zeta potential: A case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409:5779-5787.
41. Sun, Y.S., Zhao, Z., Yang, Z.N., Xu, F., Lu, H.J., Zhu, Z.Y., Zhu, H.P. 2017. Risk factors and preventions of breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(11):1387.
42. Taebpour, M., Akhlaghi, M., Shahriary, S., Hajihosseini, S., Haghirsadat, F., Oroojalian, F., Tofighi, D. 2022. Synthesis, physicochemical characterization and pharmaceutical function of niosomal nanoparticles-encapsulated bioactive compound for osteosarcoma treatment. *Nanomedicine Journal*, 9(3):205-215.
- Taebpour, M., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F. 2021. Fabrication and characterization of liposomal nanoparticles containing hydroalcoholic extract of *Artemisia absintium* and its toxicity on MCF-7 breast cancer cell line. *Iranian Journal of Breast Diseases*, 14(1):64-77.

Research Article

The Effect of Bentonite and Aflatoxin Absorbing Compounds on the Liver and Blood Parameters of Ross Breed Broiler Chickens

Mahsa Mohareri, Reza Vakili*, Nafiseh Rahmanian Sharif Abad

Department of Animal Science, Kashmar Branch, Islamic Azad University, Kashmar, Iran

*Corresponding author: reza.vakili@iau.ac.ir

Received: 28 April 2024

Accepted: 1 July 2024

DOI: 10.60833/ascij.2025.1118471

Abstract

The purpose of this research was to investigate the effects of bentonite and some aflatoxin absorbing compounds on the liver and blood parameters in Ross broiler chickens. The experiment was conducted in the form of a completely randomized design using 280 one-day-old broilers in 7 treatments and 4 replications. The experimental treatments included 7 groups including the control sample and the sample containing corn contaminated with aflatoxin and treatments with different percentages of bentonite and other compounds. In three phases of 10, 24, and 42 days, one sample was randomly selected from each treatment, slaughtered, and blood sampling was done. Then, the level of liver enzymes, cholesterol, triglyceride, uric acid, and glucose were measured by an auto-analyzer and the livers were checked for damage. Results showed that the enzyme aspartate aminotransferase and trans amino and glucose had a significant difference ($p < 0.05$). No significant difference was observed in the factors of cholesterol, triglycerides, and uric acid. Liver in The second treatment (infected corn) suffered from inflammation, bleeding and necrosis in all three sampling periods, and the rest of the treatments except one sample in the fifth treatment (1.5% bentonite and 5% copper sulfate) were healthy at 42 days. In general, in this research, the greatest effect of bleeding and necrosis of the liver was observed in the second treatment containing contaminated corn, while in other treatments with processed bentonite, the positive effect of absorbing toxins by bentonite was observed.

Keywords: Bentonite, Aflatoxin, Liver damage, Blood parameters, Broilers.



مقاله پژوهشی

اثر بنتونیت و ترکیبات جاذب آفلاتوکسین بر کبد و فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی

نژاد راس

مهسا محرری، رضا وکیلی^{*}، نفیسه رحمانیان شریف‌آباد

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

^{*}مسئول مکاتبات: reza.vakili@iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۹

DOI: 10.60833/ascij.2025.1118471

چکیده

هدف از این تحقیق، بررسی اثرات بنتونیت و برخی ترکیبات جاذب آفلاتوکسین بر کبد و فراسنجه‌های خونی در جوجه‌های گوشتی نژاد راس بود. آزمایش در قالب یک طرح به صورت کاملاً تصادفی و با استفاده از ۲۸۰ قطعه جوجه گوشتی یک روزه در هفت تیمار و چهار تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل ۷ گروه شامل نمونه شاهد و نمونه حاوی ذرت آلوده به آفلاتوکسین و تیمارهایی با درصدهای مختلف بنتونیت و سایر ترکیبات بود. در سه فاز ۱۱، ۲۴ و ۴۲ روزگی از هر تیمار یک نمونه به صورت تصادفی انتخاب، کشتار و خون‌گیری و نمونه‌گیری از کبد انجام شد. سپس میزان آنزیم‌های کبدی و میزان کلسترول و تری‌گلیسرید و اوریک اسید و گلوکز توسط دستگاه اتوانالایزر اندازه‌گیری و کبدها از لحاظ داشتن ضایعات بررسی شدند. نتایج نشان داد که آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز و ترانس‌آمینو و گلوکز اختلاف معنی‌داری داشتند ($p < 0/05$). در فاکتورهای کلسترول و تری‌گلیسرید و اوریک اسید اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و همین‌طور بافت کبد در تیمار دوم (ذرت آلوده) در هر سه دوره نمونه‌گیری دچار التهاب و خونریزی و نکروز شده و بقیه تیمارها به جز یک نمونه در تیمار پنجم (۱/۵ درصد بنتونیت و ۵ درصد سولفات مس) در ۴۲ روزگی سالم بودند. بطور کلی در این تحقیق بیشترین اثر خونریزی و نکروز کبد در تیمار دوم حاوی ذرت آلوده مشاهده شد که در سایر تیمارهای دارای بنتونیت فرآوری شده اثر مثبت جذب سموم توسط بنتونیت مشاهده شد.

کلمات کلیدی: بنتونیت، آفلاتوکسین، آسیب‌های کبدی، فراسنجه‌های خونی، جوجه‌های گوشتی.

مقدمه

در ایران نیز به دلیل تنوع شرایط محیطی، زراعی و همچنین شرایط نامناسب ذخیره و حمل‌ونقل به‌ویژه برای محصول دانه ذرت کاملاً صادق می‌باشد. از میان انواع سموم قارچی شناخته شده، تعداد کمی از آنها در صنعت مرغداری مطرح بوده که می‌توان به آفلاتوکسین‌ها، اکراتوکسین‌ها، تریکوتسین‌ها،

با توجه به اهمیت منابع دامی در تغذیه انسان و مزایای تامین پروتئین از طریق فرآورده‌های دامی، لزوم توجه هرچه بیشتر به صنعت پرورش دام و طیور و عوامل موثر در آن، اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. برطبق برآوردهای انجام شده، بیش از ۲۵ درصد غله دنیا به سموم قارچی شناخته شده آلوده هستند (۴). این امر

زرالنون‌ها و سیتربین‌ها اشاره کرد. آفلاتوکسین بسیار سمی بوده و از بیش‌ترین میزان بیماری‌زایی برخوردار می‌باشد که توسط *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و *آسپرژیلوس فلاووس* تولید می‌شوند. از جمله مهم‌ترین آفلاتوکسین‌ها، انواع B1، B2، G1 و G2 بوده که سمی‌ترین آنها آفلاتوکسین B1 می‌باشد و این قارچ‌ها، قارچ غالب در دانه ذرت کپک‌زده می‌باشد (۲، ۱۷). کاهش میزان ویتامین D در فرم ۲۵ هیدروکسی در گردش خون می‌تواند ناشی از مهار سنتز این هورمون در کبد باشد و کاهش ویتامین D در فرم ۱/۲۵ دی هیدروکسی در پلاسما ممکن است ناشی از کاهش سنتز ۲۵ هیدروکسی ویتامین D در کبد و یا کاهش سنتز ۲۵ و ۱ دی هیدروکسی ویتامین D در کلیه باشد (۱۸). برای مقابله با اثرات مخرب مایکوتوکسین‌ها تاکنون روش‌های مختلفی ارائه شده است که برخی از آنها برای مراحل برداشت مطمئن‌ترین روش برای کاهش اثرات سموم قارچی، افزودن مواد جاذب به خوراک‌های آلوده، جهت پیوند با سموم قارچی و کاهش جذب آنها از دستگاه گوارش می‌باشد. عمده‌ترین این مواد شامل بنتونیت‌ها، زئولیت‌ها، آلومینوسیلیکات‌ها و گلوکومانان‌های حاصل از مخمرها می‌باشد که به‌صورت تجاری در دسترس می‌باشند (۱۱). میزان اتصال سموم به ترکیبات فوق به‌طور قابل ملاحظه‌ای متغیر می‌باشد. بعضی از این مواد از قبیل مواد رسی، تنها با آفلاتوکسین‌ها اتصال ایجاد نموده و سموم دیگر را در دستگاه گوارش بدون تغییر باقی می‌گذارند ولی بعضی از این مواد از جمله دیواره سلولی مخمر یا همان گلوکومانان استریفیه شده بر علیه محدوده‌ی وسیعی از سموم قارچی مؤثر می‌باشد (۲). بنتونیت ماده‌ای معدنی از دسته رس‌ها یا شبه‌رس‌هاست و از کانی‌های متورم شونده تشکیل شده است که عموماً حاوی مونتموریلونیت و به مقدار کم بیدلایت است

محصولات تا حمل و انبارداری قابل توصیه است و نیز برخی روش‌ها در مدیریت تغذیه مزارع پرورش دام و طیور کاربرد دارند (۱۳). اخیراً در خصوص رفع این مشکل، از مواد جذب کننده خنثی، به صورت تغذیه‌ای در جیره غذایی جهت جدا کردن مایکوتوکسین‌ها و کاهش جذب آنها از مجاری معده‌ای، روده‌ای (گوارشی)، استفاده کرده‌اند که باعث کاهش اثرات سمی در طیور و چهارپایان و خارج کردن این متابولیت‌های قارچی از داخل تولیدات حیوانات شده‌اند. روش‌های متنوعی جهت کنترل و کاهش اثرات سموم قارچی از قبیل غیرفعال کردن سموم با میکروب یا دما، جداسازی فیزیکی مواد خوراکی آلوده، اشعه دادن، آمونیاکی کردن و تجزیه با اوزون وجود دارند ولی جهت استفاده کاربردی توسعه نیافته‌اند چرا که این روش‌ها نیاز به هزینه بالایی دارد (۱۴).

(۱۳). بنتونیت رسی آب زیادی جذب می‌کند و با افزایش تورم به ماده‌ای ژلاتینی تبدیل می‌شود که ذرات خوراک را به هم می‌چسباند و طبیعت خوراک پلت شده را بهبود می‌بخشد (۲۰). با افزودن رس‌ها و از جمله بنتونیت‌ها به خوراک طیور سرعت عبور مواد مغذی از دستگاه گوارش کاهش و بدین وسیله هضم و جذب مواد مغذی افزایش می‌یابد (۲۴). علاوه بر این، استفاده از بنتونیت باعث جذب فلزات سنگین، آفلاتوکسین، باکتری، عوامل سمی و ضد تغذیه‌ای می‌شود و میزان دسترسی آنها را برای جذب در دستگاه گوارش کاهش می‌دهد (۲۱). افزودن بنتونیت به جیره، قابلیت هضم مواد مغذی و رشد در جوجه‌های گوشتی را بهبود می‌بخشد (۱۵). هدف از این مطالعه اثرات بنتونیت و برخی ترکیبات جاذب آفلاتوکسین بر کبد و فراسنجه‌های خونی جوجه گوشتی نژاد راس مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه جیره‌های آزمایشی: جیره‌های غذایی برای دوره‌های مورد بررسی ۱۰، ۲۴ و ۴۲ بر اساس احتیاجات غذایی جوجه‌های گوشتی NRC (۱۹۹۴) تهیه و تنظیم گردید (۱۳). میزان آفلاتوکسین در جیره شاهد پایین‌تر از حد قابل تشخیص آن (کمتر از یک میکروگرم در هر کیلوگرم جیره) بود. دانه ذرت کپک زده از کارخانجات محلی خوراک دام تهیه و به منظور افزایش رشد کپک، به مدت دو ماه در رطوبت نسبی ۲۰ درصد ذخیره و سپس جهت توقف رشد کپک، به طور کامل خشک گردید. جیره‌های غذایی حاوی ذرت کپک زده یا آفلاتوکسین با جایگزینی ذرت آلوده به قارچ با ذرت سالم تهیه گردید. جهت اجرای آزمایش تعداد ۲۸۰ قطعه جوجه گوشتی نر یک روزه سویه راس ۳۰۸ از شرکت مرغ فریمان خریداری شد و در یک طرح آزمایشی با ۷ تیمار شامل: (۱) جیره بدون آفلاتوکسین (گروه شاهد)؛ (۲) جیره شاهد به همراه ذرت آلوده به آفلاتوکسین (۳) جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بتونیت (۴) جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بتونیت + ۷۵ درصد زغال فعال (۵) جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بتونیت + ۰/۵ درصد سولفات مس (۶) جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بتونیت + ۱ درصد دیواره سلولی مخمر (۷) جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بتونیت فرآوری شده با سولفات مس + ۷۵ درصد زغال فعال + ۱ درصد دیواره سلولی مخمر تهیه گردید. جوجه‌ها پس از ورود به سالن و توزین به ۲۸ گروه ۱۰ قطعه‌ای با میانگین وزنی مشابه تقسیم و در داخل پن‌ها قرار داده شدند. جیره‌های مربوط به هر واحد آزمایشی در سینی‌های مخصوص دانخوری ریخته شد و این سینی‌ها در پن‌های مربوط به خود گذاشته شدند. در

هفته اول روزانه دو مرتبه آب آبخوری‌ها تعویض و فضولات داخل سینی‌های دانخوری تخلیه و دان تازه در سینی‌ها ریخته شد. از هفته دوم تا آخر دوره روزانه سه مرتبه آب آبخوری‌ها تعویض و دان به دانخوری‌ها اضافه شد. آب و غذا به صورت آزاد در دسترس جوجه‌ها قرار داده شد. برنامه واکسیناسیون با توجه به توصیه دامپزشک اجرا شد (جدول ۱). جهت مصرف بهتر واکسن‌های آشامیدنی حدود ۲-۱/۵ ساعت قبل از تجویز آنها، آب آشامیدنی جوجه‌ها قطع می‌شد و سپس محلول واکسن و آب در اختیار جوجه‌ها قرار می‌گرفت. به منظور تهیه نمونه خون، در انتهای ۱۱، ۲۴ و ۴۲ روزگی و پس از ۸ ساعت گرسنگی از هر تکرار ۱ قطعه جوجه با میانگین وزنی مشابه، انتخاب شدند و به کمک سرنگ‌های ۲ میلی لیتری از ورید بال پرنده، نمونه خون تهیه و جهت تعیین مقدار گلوکز، تری گلیسرید، کلسیم، فسفر، اسید اوریک و کلسترول و سدیم و پتاسیم و آنزیم‌های کبدی به آزمایشگاه فرستاده شد. بعد از خوگیری از تمام نمونه‌ها که از هر تکرار یک نمونه گرفته شد، لوله‌ها را داخل دستگاه سانتریفیوژ گذاشته و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ قرار داده و پس از گذشت زمان و تمام شدن کار دستگاه با نوک سمپلر لخته چسبیده شده به دیوار لوله‌ها رو جدا کرد و بعد سرم هارو از داخل لوله با سمپلر تخلیه کرده و داخل میکروتیوپ ریخته و بلافاصله داخل یخ قرار داده تا سرم‌ها فاسد نشوند. سپس این سرم‌ها را در داخل دستگاه اتوآنالایزر مدل A. Biosystem ۱۵ قرار داده شد (۲).

کشتار و تجزیه لاشه: در روزهای ۱۱، ۲۴ و ۴۲ پرورش مرغ، از هر قفس ۱ قطعه جوجه که نزدیک به میانگین کل قفس بودند انتخاب و ذبح گردید. پس از کشتار پوست را جدا کرده و تک تک اجزاء و بافت‌ها را جدا کرده و بوسیله ترازوی ۰/۱ وزن گیری شدند و بصورت درصدی از کل وزن بدن ثبت گردید و

به قطر ۵ میکرون تهیه شده و با روش هماتوکسیلین-اؤزین جهت آزمایش‌های هیستوپاتولوژیک رنگ-آمیزی شدند (۷).

تجزیه و تحلیل آماری: طرح آزمایشی مورد استفاده در این تحقیق کاملاً تصادفی و به هر تیمار ۳ تکرار اختصاص داده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و به روش آنالیز مدل‌های خطی و مقایسه میانگین به روش دانکن انجام گرفت

بوسیله فرمول درصد وزن هریک از اجزاء اندازه‌گیری شد. در مرحله کشتار و تجزیه لاشه، پس از وزن‌گیری کبد با ترازوی ۱۰درصد گرمی، قطعه‌ای از کبد به اندازه ۲×۲ سانتی متر جدا شد و در فرمالین ۱۰درصد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت و بعد از گذشت ۱ روز دوباره فرمالین را عوض کرده و در فرمالین ۱۰درصد مجدد قرار داده شد، سپس قطعاتی از بافت‌های پایدار شده انتخاب و پس از برش دادن و گذراندن مراحل آماده سازی بافتی و تهیه بلوک‌های پارافینی، مقاطعی

جدول ۱- برنامه واکسیناسیون جوجه‌های گوشتی در دوره پرورش

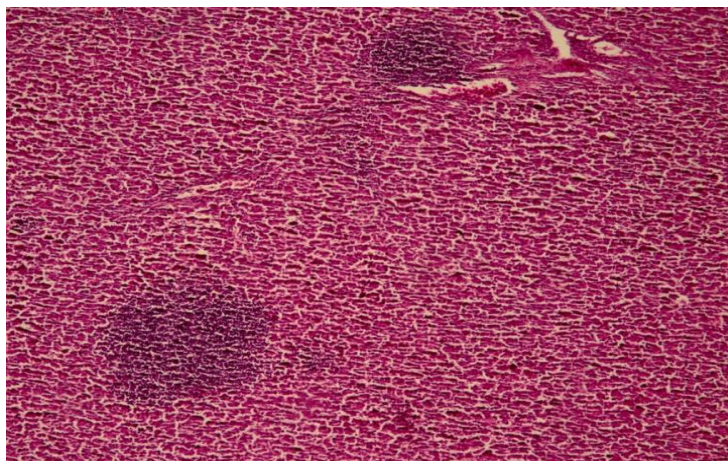
Table 1- Vaccination schedule for broiler chickens during the breeding period

Type of vaccine	Prescription age	Vaccination method
Bronchitis	3 days old	Eye
Newcastle Oily	3 days old	Injection
Oily flu	3 days old	Injection
Newcastle B1	9 days old	Beverage
Gambro	12 days old	Beverage
Bronchitis	16 days old	Eye

نتایج

تیمار دوم نکروز یا مرگ سلول‌های کبدی با فقدان هسته‌های آن و تغییرات هسته در آنها مشاهده شده که بیشترین و شدیدترین حالت در روز ۴۲ روزگی بوده است (شکل‌های ۱ تا ۵). نتایج حاصل از بررسی فاکتورهای خونی کلسیم و گلوکز در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است. جداول ۳ تا ۸ به ترتیب اثر جاذب‌های مختلف آفلاتوکسین B1 بر میزان غلظت تری‌گلیسیرید، کلسترول، آنزیم‌های AST، ALT، و اسید اوریک پرنده در دوره‌های مخلف پرورش را نشان می‌دهند.

در بررسی بافت کبد از نظر ظاهری، اندازه کبد و نوزن کبدها در گروه‌های مورد مورد مطالعه به جزء گروه ۲ که شامل سم آفلاتوکسین B1 بوده تفاوت قابل توجهی با یکدیگر نداشتند. در سن ۱۱ روزگی و ۲۴ روزگی و ۴۲ روزگی پرورش، کبد تیمار دوم که جیره غذایی حاوی آفلاتوکسین B1 بوده و هیچ گونه جاذب آفلاتوکسین در جیره نبوده، کانون‌های خونریزی شدید در بافت کبد و آسیب سلولی کبد یا دژنراسیون و التهاب شدید سلول‌ها دیده شده همچنین واکوئل‌های توخالی در داخل سلول‌های کبدی مشاهده شد. در سن ۲۴ روزگی و ۴۲ روزگی در



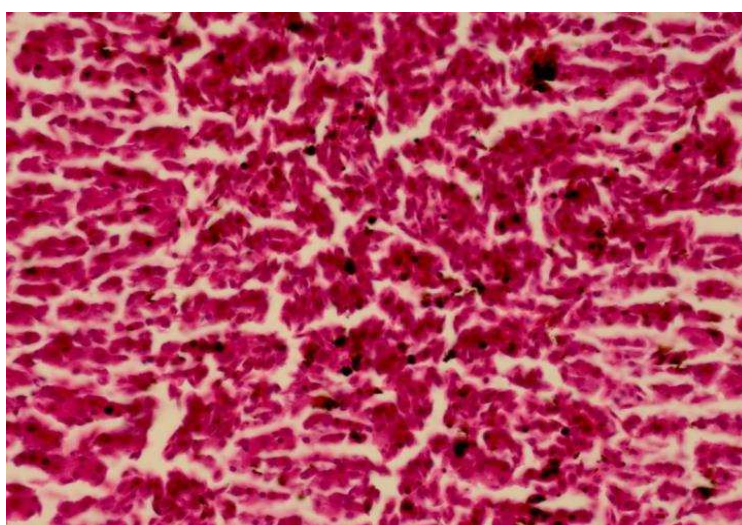
شکل ۱- نفوذ سلول‌های لنفوسیت به صورت ۲ کانون با اندازه‌های مختلف در بافت کبد در گروه ۲ تیمار آفلاتوکسین در روز ۴۲ روزگی

Fig. 1. Lymphocyte infiltration in the form of 2 foci with different sizes in the liver tissue in group 2 of aflatoxin-containing treatment on day 42 of age



شکل ۲- جایگزینی لنفوسیت‌ها در نواحی نکروزی در تیمار ۲

Fig. 2. Replacement of lymphocytes in necrotic areas in treatment 2



شکل ۳- خونریزی شدید و نکروز سلول‌های کبدی در بافت کبد در تیمار ۲ در ۴۲ روزگی

Fig. 3. Severe hemorrhage and necrosis of liver cells in liver tissue in treatment 2 at 42 days of age



شکل ۴- خونریزی در بافت کبد، در بخشی از مناطق هسته از سلول خارج شده و در یک ناحیه کوچک جمع شده در تیمار ۲ در ۲۴ روزگی
Fig. 4. Hemorrhage in liver tissue, in part of the nuclear regions removed from the cell and concentrated in a small area in treatment 2 at 24 days of age



شکل ۵- آسیب سلول‌های کبدی با واکوئل‌های روشن در داخل سیتوپلاسم سلول‌های کبدی در تیمار ۲ در سن ۱۱ روزگی
Fig. 5. Hepatocyte damage with bright vacuoles within the cytoplasm of hepatocytes in treatment 2 at 11 days of age.

جدول ۲- اثر جاذب‌های مختلف آفلاتوکسین B1 بر میزان غلظت کلسیم پرنده در دوره‌های مخلف پرورش

Table 2. Effect of different aflatoxin B1 adsorbents on the calcium concentration of birds in breeding periods

Breeding period	Treatment1	Treatment2	Treatment3	Treatment4	Treatment5	Treatment6	Treatment7	SEM	p
Phase 1 (Beginning)	1.22 ^a	1.14 ^a	1.22 ^a	1.19 ^a	1.18 ^a	1.22 ^a	1.22 ^a	0.097	0.995
Phase 2 (Growth)	1.21 ^a	1.07 ^c	1.21 ^{ab}	1.06 ^{cd}	1.09 ^{abc}	1.09 ^{abc}	0.93 ^d	0.227	0.00
Phase 3 (Final)	1.31 ^a	1.22 ^b	1.23 ^b	1.23 ^b	1.26 ^{ab}	1.21 ^{bc}	1.15 ^c	0.014	0.00

حروف مختلف در هر ردیف نشان دهنده اختلاف میانگین‌ها در سطح احتمالی ۰.۰۵ می‌باشد. تیمار عبارتند از (۱) جیره بدون آفلاتوکسین (گروه شاهد)؛ (۲) جیره شاهد به همراه ذرت آلوده به آفلاتوکسین (۳) جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت (۴) جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت + ۷۵ درصد زغال فعال (۵) جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت + ۰/۵ درصد سولفات مس (۶) جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت + ۱ درصد دیواره سلولی مخمر (۷) جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت فرآوری شده با سولفات مس + ۷۵ درصد زغال فعال + ۱ درصد دیواره سلولی مخمر می‌باشد.

Different letters in each row indicate the difference between the means at the 5% probability level. Treatments were (1) aflatoxin-free diet (control group); (2) Control diet with aflatoxin-contaminated corn (3) Control diet + aflatoxin-contaminated corn + 1.5% bentonite (4) Control diet + aflatoxin-contaminated corn + 1.5% bentonite + 75% activated charcoal (5) Control diet + aflatoxin-contaminated corn + 1.5% bentonite + 0.5% copper sulfate (6) Control diet + aflatoxin-contaminated corn + 1.5% bentonite + 1% yeast cell wall (7) Control diet + aflatoxin-contaminated corn + 1.5% bentonite processed with copper sulfate + 75% activated charcoal + 1% yeast cell wall.

جدول ۳- اثر جاذب‌های مختلف آفلاتوکسین B1 بر میزان غلظت گلوکز پرنده در دوره‌های مخلف پرورش

Table 3. Effect of different aflatoxin B1 adsorbents on the glucose concentration of birds in different breeding periods

Breeding period	Treatment1	Treatment2	Treatment3	Treatment4	Treatment5	Treatment6	Treatment7	SEM	p
Phase 1	251.09 ^a	262.27 ^a	265.09 ^a	233.81 ^a	256.12 ^a	243.25 ^a	238.69 ^a	7.651	0.073
Phase 2	229.09 ^b	243.41 ^{ab}	242.04 ^{ab}	247.79	266.87 ^a	269.68 ^a	251.13 ^{ab}	7.93	0.027
Phase 3	223.94 ^{ab}	216.88 ^{ab}	222.71 ^{ab}	222.71 ^{ab}	212.38 ^{ab}	207.59 ^b	237.75 ^a	6.080	0.022

جدول ۴- اثر جاذب‌های مختلف آفلاتوکسین B1 بر میزان غلظت تری‌گلیسرید پرنده در دوره‌های مخلف پرورش

Table 4. Effect of different aflatoxin B1 adsorbents on bird triglyceride concentration in different rearing periods

Breeding period	Treatment1	Treatment2	Treatment3	Treatment4	Treatment5	Treatment6	Treatment7	SEM	p
Phase 1	46.67 ^b	58.88 ^b	57.60 ^{ab}	103.97 ^{ab}	134.19 ^{ab}	58.31 ^a	72.08 ^{ab}	18.24	0.028
Phase 2	58.23 ^{ab}	70.52 ^a	39.35 ^{bc}	47.96 ^{abc}	31.70 ^{bc}	31.17 ^a	65.37 ^a	5.46	0.000
Phase 3	64.33 ^a	28.71 ^a	70.67 ^a	54.48 ^a	40.21 ^a	35.60 ^a	57.94 ^a	13.97	0.319

جدول ۵- اثر جاذب‌های مختلف آفلاتوکسین B1 بر میزان غلظت کلسترول پرنده در دوره‌های مخلف پرورش

Table 5. Effect of different aflatoxin B1 adsorbents on bird cholesterol concentration in breeding periods

Breeding period	Treatment1	Treatment2	Treatment3	Treatment4	Treatment5	Treatment6	Treatment7	SEM	p
Phase 1	161.61 ^{ab}	159.8 ^{ab}	136.05 ^b	155.05 ^{ab}	183.64 ^a	158.22 ^{ab}	144.88 ^{ab}	9.831	0.073
Phase 2	134.12 ^a	141.86 ^a	131.27 ^a	126.74 ^a	133.34 ^a	106.87 ^a	162.70 ^a	12.83	0.170
Phase 3	131.55 ^a	135.31 ^a	129.98 ^a	131.34 ^a	129.98 ^a	131.34 ^a	133.83 ^a	8.55	0.985

جدول ۶- اثر جاذب‌های مختلف آفلاتوکسین B1 بر میزان غلظت AST پرنده در دوره‌های مخلف پرورش

Table 6. Effect of different aflatoxin B1 adsorbents on bird AST concentration during breeding periods

Breeding period	Treatment1	Treatment2	Treatment3	Treatment4	Treatment5	Treatment6	Treatment7	SEM	p
Phase 1	233.41 ^a	246.30 ^a	214.88 ^b	217.07 ^a	244.12 ^a	214.71 ^a	207.97 ^a	10.76	0.099
Phase 2	190.99 ^a	236.75 ^a	245.38 ^a	245.52 ^a	235.30 ^a	246.61 ^a	246.06 ^a	17.69	0.118
Phase 3	301.78 ^a	315.86 ^a	337.87 ^a	287.53 ^a	256.71 ^a	331.85 ^a	307.82 ^a	37.75	0.776

جدول ۷- اثر جاذب‌های مختلف آفلاتوکسین B1 بر میزان غلظت ALT پرنده در دوره‌های مخلف پرورش

Table 7. Effect of different aflatoxin B1 adsorbents on bird ALT concentration during breeding periods

Breeding period	Treatment1	Treatment2	Treatment3	Treatment4	Treatment5	Treatment6	Treatment7	SEM	p
Phase 1	92.01 ^{abc}	98.27 ^a	81.91 ^{abc}	78.39 ^{ab}	96.47 ^{ab}	79.27 ^{abc}	73.37 ^{bc}	4.14	0.001
Phase 2	44.45 ^a	42.69 ^a	46.66 ^a	43.01 ^a	40.78 ^a	39.33 ^a	43.72 ^a	3.47	0.818
Phase 3	16.01 ^a	18.60 ^a	18.82 ^a	23.66 ^a	21.71 ^a	21.57 ^a	18.52 ^a	4.17	0.879

جدول ۸- اثر جاذب‌های مختلف آفلاتوکسین B1 بر میزان غلظت اوریک اسید پرنده در دوره‌های پرورش

Breeding period	Treatment1	Treatment2	Treatment3	Treatment4	Treatment5	Treatment6	Treatment7	SEM	p
Phase 1	96.99c	93.78c	96.07c	106.51ab	107.35a	99.93bc	98.05c	1.58	0.000
Phase 2	107.48a	115.18a	100.47a	105.23a	115.38a	107.51a	109.8a	3.86	0.128
Phase 3	108.19a	109.61a	104.40ab	96.75bc	63.75d	100.12ab	88.07c	2.19	0.000

بحث

نشان داده شده در فاز اول پرورش (آغازین) غلظت-های مختلف کلسیم تاثیر معنی‌داری بر تیمارها با جیره‌های مختلف نداشته و در تمامی تیمارها یکسان بود. هر چند که تیمار دوم (جیره شاهد به همراه ذرت آلوده به آفلاتوکسین) نسبت به سایر تیمارها کلسیم کمتری داشته ولی باز هم از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. در فاز دوم پرورش (رشد) که در روز ۲۴ طرح نمونه‌گیری شد، کمترین مقدار کلسیم در تیمار هفت (جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت فراوری شده با سولفات مس + ۷۵ درصد زغال فعال + ادرصد دیواره سلولی مخمر) دیده شد در حالیکه در این فاز بالاترین مقدار کلسیم در تیمار شاهد مشاهده گردید هرچند که اختلاف آن با تیمارهای ۳ (جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت)، و ۶ (جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت + ادرصد دیواره سلولی مخمر) معنی‌دار نبود. داده‌های بدست آمده در این فاز نشان داد که جیره‌های حاوی آفلاتوکسین تاثیر منفی بر غلظت کلسیم سرم خون داشته اند ولی افزودن بنتونیت چه بصورت معمولی و چه فراوری شده (تیمارهای ۳ و ۵) تا حدی باعث بهبود افزایش کلسیم و یا جبران آن در خون شده است. بهترین نتیجه در تیمار ۳ (جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت) بوده که به لحاظ عددی با تیمار شاهد و تیمار پنجم برابر و اختلاف معنی‌داری نداشته است. در فاز سوم (پایانی)

در نتایج بافت‌شناسی، کانون‌های دژنره شده در سلول‌های کبدی جوجه‌های مسموم بیشتر مشاهده شد. تیمارهای دیگر هسته درشت و سیتوپلاسم یکنواخت و سلول کبدی نرمال دیده شد و اثری از نکروز کبد یا خونریزی و تغییرات هسته‌ای و سلولی نبود به جز یک مورد در تیماری که بنتونیت با سولفات مس فراوری شده و در روز ۴۲ پرورش خونریزی خفیف مشاهده شد. کبد اندام هدف اثرات سمی آفلاتوکسین بوده و در دوزهای پایین آفلاتوکسین اندازه و وزن کبد سریعتر از اندام‌های دیگر تحت تاثیر قرار می‌گیرد. بر اساس مشاهدات ضایعات هیستوپاتولوژیک در بافت کبد در جوجه‌های ۴۲ روزه که هیچ گونه جاذبی در جیره آنها استفاده نشده بود گزارش شد که سلول‌های کبدی دچار تغییر چربی بسیار شدیدی بودند به طوری که در اغلب سلول‌ها، واکوئل‌های درشت چربی تمام سیتوپلاسم سلول را فرا گرفته است. بافت کبد منظره توری ماندی پیدا کرده است. در سن ۲۴ روزگی در کبد جوجه‌ها نکروز و خونریزی وجود نداشت. ضایعات مشاهده شده در جوجه‌های با سن ۲۴ روزگی بسیار شبیه به ضایعات جوجه‌های ۴۲ روزه بود اما وسعت و تعداد کانون‌های در حال رژنره شدن سلول‌های کبدی کمتر بود. مواد جاذب آفلاتوکسین B1 که در جیره غذایی تیمارها قرار گرفته موجب کاهش و خشی-سازی اثر آفلاتوکسین شده و آفلاتوکسیکوزیس در بافت کبدی مشاهده نشد. همانطور که در جدول ۲

روندی مشابه فاز ۲ گزارش گردید بطوریکه داده‌های بدست آمده در این فاز نیز نماینگر آن است که وجود آفلاتوکسین در جیره سبب کاهش غلظت کلسیم سرمی می‌گردد (تیمار شاهد) ولیکن افزودن توکسین بایندر بویژه بنتونیت این اثر را تقلیل داده است. تیمار حاوی بنتونیت فراوری شده نسبت به سایر توکسین بایندها اثر بالاتری از خود نشان داد و تیمار ۵ (جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت + ۰/۵ درصد سولفات مس) با تیمار ۱ (جیره بدون آفلاتوکسین یا گروه شاهد) از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نداشت، در حالیکه سایر تیمارها با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. نتایج جدول ۲ نشان داد که وجود آفلاتوکسین در جیره درفازهای مختلف پرورشی نیمچه‌های گوشتی سبب کاهش غلظت کلسیم در سرم شد. نتایج نشان داد که افزایش آفلاتوکسین در جیره سبب تغییر متابولیسم ویتامین D می‌شود و به دنبال آن متابولیسم کلسیم نیز در بدن دچار اختلال می‌شود. در پی این اختلالات چرخه پتاسیم و کلسیم در بدن مختل می‌گردد. افزودن آفلاتوکسین باعث نرمی استخوان پرندگان شده است. از طرفی افزودن آفلاتوکسین در جیره باعث تغییر در ویژگی‌های استخوان تپا می‌شود هر چند که بررسی وضعیت استخوان فوق در آزمایش ما صورت نگرفت ولی به طور کل محققین دلیل تاثیر آفلاتوکسین را بر روی تغییر شکل استخوان تپا به واسطه تاثیر این سم بر روی متابولیسم کلسی فلور و سنتز استخوان‌های بدن مرتبط دانسته اند. اطلاعاتی که از سایر مطالعات بدست آمده نشان داد که افزایش آفلاتوکسین در جیره سبب کاهش قابلیت هضم کلسیم و فسفر می‌شود (۲۴). برخی از داده‌ها نشانگر آنست که افزایش سم در جیره غذایی پرنده رابطه منفی بر سیستم دفعی گذاشته و ازین رو متابولیسم کلسیم و فسفر تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۱۷). جدول

۳ تاثیر آفلاتوکسین بر گلوکز را نشان می‌دهد. در فاز اول پرورش افزایش آفلاتوکسین در جیره تاثیر خاصی در غلظت گلوکز سرمی خون نداشته و در بین تیمارها مختلف که حاوی توکسین بایندهای مختلفی نیز بودند اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. ولیکن تاثیرات معنی‌داری سم بر روی غلظت گلوکز در فاز دوم پرورش (۱۱ و ۲۴ روزگی) کاملاً محسوس بود. بیشترین غلظت گلوکز در این فاز متعلق به تیمار ۶ (جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت + ۱ درصد دیواره سلولی مخمر) و کمترین آن در تیمار ۱ (شاهد) مشاهده شده است. در فاز سوم پرورش تیمار ۷ که ترکیبی از همه توکسین بایندها را دریافت کرده مشکلی در دریافت گلوکز نداشت، کمترین مقدار مربوط به تیمار ۶ (جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت + ۱ درصد دیواره سلولی مخمر) که حاوی دیواره سلولی مخمر بوده مشاهده شد که باعث افزایش نفوذپذیری گلوکز به داخل سلول شد. بنابر جدول ۲ عوامل باندکننده سم در تیمارهای حاوی آفلاتوکسین سبب کاهش اثر سم و افزایش نفوذپذیری گلوکز به درون سلول گردید. جدول ۴ نشان داد در فاز اول در گروه ۱ (شاهد) کمترین مقدار تری‌گلیسرید و گروه ۵ (جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت + ۰/۵ درصد سولفات مس) بالاترین مقدار گزارش شد و افزودن آفلاتوکسین تاثیر معنی‌داری بر تری‌گلیسرید داشت به طوری که افزودن آفلاتوکسین به جیره منجر به افزایش تری‌گلیسرید در سرم خون شد. در فاز دوم پرورش (رشد) بیشترین غلظت تری‌گلیسرید در تیمار ۷ که ترکیبی از بایندها بود، دیده شد و کمترین مقدار در تیمار ۶ (جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت + ۱ درصد دیواره سلولی مخمر) بود. گروه شاهد و تیمار ۲ (جیره شاهد به همراه ذرت آلوده به

آفلاتوکسین (۳) جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت) که حاوی آفلاتوکسین بود معنی‌دار نبود ($p > 0.05$) و در فاز سوم پرورش (پایانی) تیمار ۲ (جیره شاهد به همراه ذرت آلوده به آفلاتوکسین (۳) جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت) کمترین مقدار تری گلیسرید و بیشترین مقدار در گروه‌های دارای جیره حاوی بنتونیت گزارش شد. نتایج جدول ۵ نشان داد که در فاز اول بالاترین غلظت کلسترول در تیمار ۴ (جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت + ۷۵ درصد زغال فعال) و کمترین مقدار در تیمار ۳ (بنتونیت معمولی دریافت کرده) مشاهده شد. به طور کل افزودن بنتونیت به جیره‌های حاوی آفلاتوکسین در فاز دوم (رشد) و سوم (پایانی) پرورش تاثیر معنی‌داری بر غلظت کلسترول جیره نداشت و فاز دوم به بعد آفلاتوکسین و توکسین بایندر مختلف اثر معنی‌داری بر کلسترول نشان نداد و همینطور در فاز سوم همین نتایج مشاهده گردید. کلسترول سرم جوجه‌ها از فاز دوم به بعد تحت تاثیر سموم و یا توکسین بایندها قرار گرفت. اختلاف در فاز دوم و سوم معنی‌دار نبود. افزایش فعالیت آنزیم‌های کبدی به عنوان شاخص حساس سرولوژیکی در مسمومیت‌های کبد و کلیه گزارش شده است. افزایش سطوح ALT، AST و ALP ممکن است نشانه تغییرات دژنراتیو در بافت کبد باشد (۶). در مقابل عدم تغییر در فعالیت آنزیم‌های مربوطه در مسمومیت خوراک‌ها به آفلاتوکسین نیز گزارش شده است. به طور کلی این آنزیم‌ها مختص پلاسما نبوده، بلکه بیشتر درون سلول‌ها وجود دارند و در اثر آسیب دیدن سلول‌ها وارد پلاسما می‌شوند. یکی از دلایل افزایش فعالیت این آنزیم‌ها می‌تواند آسیب‌های وارده به هپاتوسیت‌ها باشد. طبق نتایج حاضر، AST هیچ تغییر معنی‌داری نداشت ولی از لحاظ عددی با

مصرف آفلاتوکسین غلظت آنزیم افزایش یافت و باعث افزایش تخریب بافت کبدی می‌شود. این آنزیم بعنوان شاخص حساس به بیماری‌های کبدی است که در مواردی هم چون التهابات و ضایعات کبدی و نیز به دنبال انسداد مجاری صفراوی غلظت آن در خون افزایش میابد. از این آنزیم بعنوان یک شاخص در اندازه‌گیری مسمومیت با آفلاتوکسین در جوجه‌ها استفاده می‌گردد. در فاز اول پرورش افزودن عوامل باندکننده سم باعث کاهش غلظت این آنزیم شده و اثر مفیدی داشت اما در فاز دوم تفاوت بین گروه کنترل و گروهی که آفلاتوکسین در جیره قرار داده نشد از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نداشت اما از لحاظ عددی افزایش داشت. تیمار ۵ (جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت + ۰/۵ درصد سولفات مس) در فاز سوم پرورش که دارای بنتونیت فراوری شده بود باعث کاهش غلظت این آنزیم در سرم خونی جوجه‌ها شد (۱۹). طبق جدول ۷، بیشترین تفاوت معنی‌دار در فاز اول پرورش مشاهده شد به طوری که تیمار ۲ (جیره شاهد به همراه ذرت آلوده به آفلاتوکسین) که حاوی توکسین بودند بیشترین غلظت ALT در سرم خون نشان داد و کمترین مقدار آنزیم در تیمار ۷ (جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت فراوری شده با سولفات مس + ۷۵ درصد زغال فعال + ۱ درصد دیواره سلولی مخمر) که مخلوطی از توکسین بایندها و آفلاتوکسین بود، مشاهده گردید. افزایش فعالیت‌های آنزیم‌های ALT و AST در فاز اول پرورش احتمالاً به دلیل مسموم شدن حیوان در این دوره پرورش بود و در حقیقت دژنراسیون کبدی که در نتیجه مصرف سم آفلاتوکسین در این دوره منجر به انتشار آنزیم‌ها به درون جریان خون گردید. نتایج مشابهی گزارش گردیده است (۳، ۱۸). غلظت این آنزیم در تیمارهای مختلف از لحاظ عددی اختلاف

جوجه‌های گوشتی در قالب ذرت آلوده به آن، اثرات زیان‌آوری بر عملکرد رشد، شاخص‌های بیوشیمیایی خون، آنزیم‌های کبدی جوجه‌های گوشتی داشته و بدین ترتیب خسارات اقتصادی مهمی را به عملکرد گله وارد می‌نماید.

منابع

1. Abas, I., Bilal, T., Eseceli, H. 2011. The effect of organic acid, zeolite, or their combination on performance, some serum indices, and ileum pH values in broilers fed with different phosphorus. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 35:337-344.
2. Abdelhamid, A.M., Salem, M.F.I., Mehrim, A.I., ElSharawy, M.A.M. 2007. Nutritious attempts to detoxify aflatoxin diets of tilapia fish: 1. Fish performance, feed and nutrients utilization, organs indices, residues and blood parameters. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, 10:205-223.
3. Azimi, J., Karimi Torshizi, M.A., Allameh, A. 2013a. Comparison of effectiveness of some mycotoxin absorbents on alteration of biochemical and hematological parameters in broiler chickens. *Journal of Animal Science Research*, 22(3):49-62. (In Persian).
4. Azimi, J., Karimi Torshizi, M.A., Allameh, A., Ahari, H. 2013b. Effect of adding two commercial absorbent materials and natural zeolite in feeds contaminated with aflatoxin B1 on broiler performance and immune system. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 4(4):292-297. (In Persian).
5. Azizpour, A., Moghadam, N. 2015. Assessment of serum biochemical parameters and pathological changes in broilers with chronic aflatoxicosis fed glucomannan-containing yeast product (Mycosorb) and sodium bentonite. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 59:205-211.

معنی‌داری را از خود نشان ندادند. در فاز آفلاتوکسین و بایندها تاثیر خاصی بر غلظت این آنزیم‌ها در سرم نداشت (۹). طبق جدول ۸ در فاز اول پرورش (آغازین) بالاترین غلظت اسید اوریک مربوط به تیمار ۵ (جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت + ۰/۵ درصد سولفات مس) و کمترین مقدار مربوط به تیمار ۲ (جیره شاهد به همراه ذرت آلوده به آفلاتوکسین) گزارش شد. در فاز ۲ پرورش (رشد) غلظت اسید اوریک خون در تیمارهای مختلف اختلاف معناداری را نشان نداد، فاز سوم پرورش تیمار ۷ (جیره شاهد + ذرت آلوده به آفلاتوکسین + ۱/۵ درصد بنتونیت فرآوری شده با سولفات مس + ۷۵ درصد زغال فعال + ۱ درصد دیواره سلولی مخمر) استفاده از جیره حاوی مخلوط توکسین بایندها کمترین غلظت اسید اوریک در سرم خون و در تیمار ۱ (شاهد) بیشترین غلظت اسید اوریک را نشان داد. آفلاتوکسین سبب کاهش غلظت پروتئین کل، آلبومین، کلسترول، اسید اوریک و افزایش آنزیم‌های کبدی همچون آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینو ترانسفراز می‌گردد.

نتیجه‌گیری

در دوره آغازین بین گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، اما در فاز دوم و کل دوره با افزودن ۱/۵ درصد بنتونیت به جیره، مقدار کلسیم خون و آنزیم‌های کبدی کاهش یافت. همچنین افزودن بنتونیت به جیره اثر معنی‌داری روی فراسنجه‌های خونی داشت. استفاده از بنتونیت به مقدار ۱/۵ درصد در بهبود عملکرد موثر بوده و آفلاتوکسین سبب کاهش غلظت پروتئین کل، آلبومین، کلسترول، اسید اوریک و افزایش آنزیم‌های کبدی همچون آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین ترانسفراز می‌گردد. حضور آفلاتوکسین در جیره غذایی

13. Mahmoodtbar, A., Karimi Torshizi, M.A., Sharafi, M., Mojgani, N. 2018. The effect of some poultry probiotics produced in Iran on performance parameters, economic indices and small intestinal morphology of broilers. *Iranian Journal of Animal Science*, 49(3):415-425.
14. Mahmoodtabar, A., Karimi Torshizi, M.A., Sharafi, M., Mojgani, N. 2017. Comparing the effects of antibiotic growth promoter, some Iranian probiotics and similar imported products on performance, economic indicators and small intestinal morphology of broilers. *Iranian Journal of Animal Science*, 48(3):321-334.
15. Manafi, M. 2018. Impact of application of natural toxin binder on performance, humoral immune response, cecal microbial population and changes in small intestine morphology of broilers fed with diet contaminated with aflatoxin B1. *Journal of Veterinary Research*, 73(3):273-282.
16. Manafi, M. (2012). Counteracting effect of high grade sodium bentonite during aflatoxicosis in broilers. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14:539-547.
17. Osweiler, G.D., Jagannatha, S., Trampel, D.W., Imerman, P.M., Ensley, S.M., Yoon, I., Moore D.T. 2010. Evaluation of XPC and prototypes on aflatoxin-challenged broilers. *Poultry Science*, 89:1887-1893.
18. Ramos, A.J., Hernandez, E. 1997. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 65:197-206.
19. Rawal, S., Kim, J.E., Coulombe, J.R. 2010. Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science*, 89:325-331.
20. Rehulka, J., Minarik, B., Adamec, V., Rehulkova, E. 2005. Investigations of physiological and pathological levels of total plasma protein in rainbow trout,
6. Bagherzadeh Kasmani, F., Karimi Torshizi, M.A., Allameh, A.A., Sharitmadari, F. 2012. A novel aflatoxin binding *Bacillus* probiotic: performance, serum biochemistry and immunological parameters in Japanese quail. *Poultry Science*, 91:1846-1853.
7. Barati, M., Chamani, M., Mousavi, S. N., Hoseini, S.A., Taj Abadi Ebrahimi, M. 2018. Effects of biological and mineral compounds in aflatoxin-contaminated diets on blood parameters and immune response of broiler chickens. *Journal of Applied Animal Research*, 46:707-713.
8. Bovo, F., Franco, L.T., Kobashigawa, E., Rottinghaus, G.E., Ledoux, D.R., Oliveira, C.A.F. 2015. Efficacy of beer fermentation residue containing *Saccharomyces cerevisiae* cells for ameliorating aflatoxicosis in broilers. *Poultry Science*, 94:934-942.
9. Cheema, M., Qureshi, M., Havenstein. G. 2003. A comparison of the immune response of a 2001 commercial broiler with a 1957 random bred broiler strain when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science*, 82:1519-1529.
10. Chen, X., Horn, N., Applegate, T.J. 2014. Efficiency of hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the adverse effects of graded levels of aflatoxin B1 in broiler chicks. *Poultry Science*, 93:2037-2047.
11. Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpaa, P.E., Salminen, S., Ahokas, J.T. 2001. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:3086-3091.
12. Khanian, M., Karimi Torshizi, M.A., Allameh, A. 2019. Alleviation of aflatoxin-related oxidative damage to liver and improvement of growth performance in broiler chickens consumed *Lactobacillus plantarum* 299v for entire growth period. *Toxicon*, 158:57-62.

138-148.

23. Taherpour, K., Moravej, H., Shivazad, M., Adibmoradi, M., Yakhchali, B. 2009. Effects of dietary probiotic, prebiotic and butyric acid glycerides on performance and serum composition in broiler chickens. *African Journal of Biotechnology*, 8:2329-2334

24. Yunus, A.W., Razzazi-Fazeli, E., Bohm, J. 2011. Aflatoxin B1 in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: A review of history and contemporary issues. *Toxins*, 3:566-590.

Oncorhynchus mykiss (Walbaum). *Aqua Research*, 36:22-32.

21. Safari, M.H., Shams Shargh, M., Amini, A., Tatyar, A. 2014. Effects of different levels of natural glauconite and zeolite on performance, tibia bone characteristics and blood parameters of broiler chicken. *Animal Science Journal*, (Pajouhesh-Va-Sazandegi), 105:167-178. (In Persian).

22. Shi, Y.H., Xu, Z.R., Feng, J.L., Wang, C.Z. 2006. Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology*, 129:

Research Article

The Effect of Hydroalcoholic Extract of the Aerial Parts of *Malva Parviflora* Plant on Growth Inhibition and Apoptosis Induction in Lung Cancer Cell Line A549

Farideh Rahimi, Zohreh Valizadeh*

Department of Biology, Dezfoul Branch, Islamic Azad University, Dezfoul, Iran

*Corresponding author: z.valizadeh@iau.ac.ir

Received: 11 August 2024

Accepted: 26 November 2024

DOI: 10.60833/ascij.2025.1128825

Abstract

lung cancer is one of the major cancers in the world that can be caused by the genetic changes in a series of important genes. *Malva parviflora* is a very valuable medicinal plant in traditional medicine. This plant is rich in vitamins A, B and C and is useful in treating respiratory infections. In this study, the effect of *Malva* hydroalcoholic extract on growth inhibition and apoptosis induction on A549 cancer cell line and HFF cell line was investigated. A549 and human HFF cell line were cultured in DMEM culture. Then, concentrations (100, 500 and 1000 µg/ml) of the extract were added to A549 and HFF cells in the culture medium, and after 24 hours, the MTT test was used to check the toxicity of the extract. To investigate the rate of proliferation or induction of apoptosis, the cells were stained with trypan blue. The results of the MTT test showed that the extract significantly decreased cell survival at concentrations of 100 ($p \leq 0.01$), 500 and 1000 µg/ml ($p \leq 0.0001$) in A549 cancer cells compared to the control group. The results of the trypan blue test showed that the extract caused a significant decrease in the growth rate of A549 cells compared to the HFF cell line at concentrations of 100 ($p \leq 0.05$), 500 and 1000 µg/ml ($p \leq 0.0001$). The proliferation rate of A549 cell line was statistically significant compared to HFF cell line at concentrations of 500, 100, 1000 µg/ml ($p \leq 0.05$). results showed that the hydroalcoholic extract of *Malva* inhibited the proliferation of A549 cancer cells by inducing apoptosis. hydroalcoholic extract of *Malva* had a significant effect in reducing the growth rate of A549 cells compared to HFF cell line. hydroalcoholic extract of *Malva* with cytotoxic effects on A549 cancer cells caused the death of these cells through the induction of apoptosis.

Keywords: *Malva parviflora*, Lung cancer, A549 cell line, HFF cell line, Apoptosis.

اثر عصاره هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه پنیرک (*Malva parviflora*) بر مهار رشد و القای آپوپتوز در رده سلولی سرطان ریه A549

فریده رحیمی، زهره ولی‌زاده*

گروه زیست‌شناسی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران

*مسئول مکاتبات: z.valizadeh@iaud.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۱

DOI: 10.60833/ascij.2025.1128825

چکیده

سرطان ریه یکی از عمده‌ترین سرطان‌های دنیا است که می‌تواند در اثر تغییرات ژنتیکی در ژن‌های مهم ایجاد می‌شود. گیاه پنیرک (*Malva parviflora*) یک گیاه دارویی ارزشمند در طب سنتی می‌باشد که غنی از ویتامین‌های A، B و C است و در درمان التهابات تنفسی سودمند است. در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی پنیرک بر مهار رشد و القای آپوپتوز بر رده سلولی سرطانی A549 و رده سلولی HFF مورد بررسی قرار گرفت. رده سلولی A549 و HFF انسانی در محیط کشت DMEM کشت داده شدند. سپس غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره بر روی سلول‌های A549 و HFF در محیط کشت اضافه شد و بعد از ۲۴ ساعت جهت بررسی سمیت عصاره از آزمون MTT استفاده شد. برای بررسی نرخ تکثیر و القای آپوپتوز، سلول‌ها با تریپان بلو رنگ‌آمیزی شدند. نتایج آزمون MTT نشان داد که عصاره باعث کاهش معنادار بقای سلولی در غلظت‌های ۱۰۰ ($p \leq 0/01$)، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ($p \leq 0/0001$) در سلول‌های سرطانی A549 در مقایسه با گروه کنترل شد. نتایج آزمون تریپان بلو نشان داد که عصاره باعث کاهش معنادار نرخ رشد سلول‌های A549 نسبت به رده سلولی HFF در غلظت‌های ۱۰۰ ($p \leq 0/05$)، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ($p \leq 0/0001$) شد. نرخ تکثیر رده سلولی سرطانی ریه A549 نسبت به رده سلولی HFF در غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ($p \leq 0/05$) از نظر آماری معنادار بود. نتایج نشان داد عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک با القاء آپوپتوز بر سلول‌های سرطانی A549 مانع تکثیر این سلول‌ها شده و اثر معناداری در کاهش نرخ رشد سلولی A549 نسبت به رده سلولی HFF دارد. عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک با اثرات سایتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی ریه A549 باعث مرگ این سلول‌ها از طریق القای آپوپتوز شد.

کلمات کلیدی: سرطان ریه، *Malva parviflora* رده سلولی A549، رده سلولی HFF، آپوپتوز.

مقدمه

سرطانی‌ها قادرند طی فرآیند متاستاز به بیرون از ریه گسترش پیدا کرده و به بافت‌ها و اندام‌های دیگر بدن برسند (۱۳). منشأ رده سلولی A549، بافت ریه می‌باشد و به عنوان نماینده پنوموسیت‌های آلوئولار نوع II ریه انسان شناخته شده است. به همین علت، به

سرطان ریه یکی از عمده‌ترین سرطان‌ها در سرتاسر جهان و یکی از شایع‌ترین دلایل مرگ و میر سرطانی می‌باشد (۱۷). مشخصه اصلی بیماری سرطان ریه، رشد کنترل نشده سلول در بافت ریه است. اگر این بیماری در مراحل اولیه درمان نشود، سلول‌های

نمود (۱۰). عصاره گیاه پنیرک شامل مقادیر مختلفی از گلوکورونیک اسید، اسید آمینه ضروری سرین و آلانین، هیدروکسی پرولین، کلسیم، منیزیم، گالاکتورونیک اسید، یورونیک اسید، آنتوسیانین، فرولیک اسید و گالاکتوز می‌باشد (۳). با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی این گیاه در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی پنیرک *Malva parviflora* بر مهار رشد و القای آپوپتوز بر رده سلولی سرطانی A549 و رده سلولی نرمال HFF مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

روش تهیه عصاره: در این مطالعه گیاه پنیرک از شهر شوش دانیال (ع) تهیه و توسط دپارتمان گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه چمران اهواز با شماره هرباریوم (Species= *Malva*) |060405-7385 voucher060405-7378 تایید شد. اندام‌های هوایی گیاه شامل ساقه، برگ و گل، با آب مقطر شستشو و به طور مناسب و علمی خشک شده و با آسیاب برقی به اندازه کافی خرد شد. ۱۰۰ گرم پودر در بشر ریخته و ۲۵۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد (حلال آب و الکل) به آن افزوده شد. عمل عصاره‌گیری در مکانی که از تابش مستقیم خورشید محفوظ بود، انجام و با پوشاندن دهانه بشر توسط کاغذ آلومینیومی از تبخیر حلال جلوگیری شد. عمل عصاره‌گیری ضمن هم زدن مکرر ۵ روز تمام در حرارت اتاق ادامه داشت. سپس با کاغذ صافی صاف گردید. سپس محلول مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردید. محلول غلیظ شده پس از ریختن روی سطح شیشه‌ای در محیطی عاری از گرد و غبار نگهداری و خشک شد. سپس، ماده قهوه‌ای تیره حاصل، با کاردک از سطح شیشه برداشته شد و با ترازوی دیجیتال توزین گردید (۱/۲۶ گرم پودر عصاره از ۱۰۰ گرم پودر).

مدت تقریباً چهار سال، عنوان اصلی تحقیقات تنفسی را به خود اختصاص داده است (۹). واژه آپوپتوز شامل یکسری از واکنش‌های درون سلولی، برنامه‌ریزی شده است که منجر به مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌گردد. این مکانیسم یکی از مهم‌ترین روش‌های حذف سلول‌های ناخواسته در بدن است. فرآیند آپوپتوز شامل تغییر شکل مورفولوژیک سلول، چروکیدگی سلول و هسته، تکه‌تکه شدن کروماتین و از دست دادن چسبندگی که با حمله ماکروفاژها از بین می‌رود، می‌باشد. آپوپتوز در سطح سلولی به وسیله پروتئین پروآپوپتوتیک Bax و پروتئین آنتی-آپوپتوتیک Bcl-2 تنظیم می‌شود (۱). استفاده از داروهای شیمی درمانی و افزودنی‌های مصنوعی باعث اختلال در عملکرد سلول‌های سالم شده است. مطالعات انجام شده در مورد سمیت سلولی نشان داده است که این مواد مصنوعی باعث آپوپتوز شدید و شکستگی DNA می‌شوند (۴). پنیرک *Malva parviflora* یک گیاه دارویی بسیار ارزشمند در طب سنتی می‌باشد. این گیاه غنی از ویتامین‌های A، B و C است و در درمان التهابات تنفسی سودمند است. علاوه بر این عصاره پنیرک حاوی موادی مانند ترکیبات فنولی، آنتوسیانین‌ها، کارتنوئیدها و توکوفرول است که به عنوان یک ماده با خاصیت آنتی‌اکسیدانی طبیعی می‌تواند با رادیکال‌های حاصل از اکسیداسیون لیپیدها واکنش داده و باعث افزایش زمان اکسیداسیون و قطع واکنش‌های زنجیری گردد (۲). گل پنیرک با افزایش تعداد و اندازه غدد موکوسی و فعالیت مژک‌ها و در نتیجه افزایش میزان ترشحات موکوسی و سرعت انتقال آن‌ها، به عنوان یک عامل ضد عفونی کننده عمل می‌کند. این گیاه اثر آنتی‌باکتریال بالایی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا از جمله استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوک آگالاکتیه دارد که می‌توان از آن برای ضد عفونی کردن، استفاده

سلول‌ها پس از آماده‌سازی با غلظت‌های مختلف عصاره به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس نرخ تکثیر و درصد سلول‌های زنده محاسبه شد (۱۱).

کشت سلول: رده سلولی A549 و HFF انسانی از انستیتو پاستور ایران خریداری گردید و در پاساژهای سلولی بین ۲۶ تا ۳۱ در محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و یک درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین- استرپتومایسین، در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه و میزان ۵ درصد CO₂ و رطوبت ۹۵ درصد و در فلاسک استریل کشت سلول کشت داده شدند و پس از ۲ تا ۳ روز، تعویض محیط صورت گرفت و بعد از یک هفته، سلول‌ها پاساژ داده شدند. زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند، توسط تریپسین - اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (خریداری شده از شرکت GIBCO) از ته فلاسک جدا شده و در دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی در یک cc محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌ها با مخلوط کردن آن‌ها با نسبت مساوی از تریپان بلو ۰/۴ درصد و شمارش آن با کمک لام نئوبار و میکروسکوپ اینورت تعیین شد. پس از اطمینان از آمادگی سلول‌ها، برای آزمایش از سلول‌های با درصد زنده بودن بالای ۹۰ درصد استفاده شد (۱۹).

آزمون MTT: به منظور سنجش سمیت یک ترکیب شیمیایی یا هر ماده دیگر بر روی سلول از این آزمون استفاده می‌شود. معرف MTT (۳- (۴- و ۵ دی‌متیل- تiazول)-۲ و ۵ دی‌فنیل‌تترازولیوم بروماید) که یک نمک تترازولیوم زرد رنگ است. برای هر نوع سلول با رسم منحنی استاندارد خطی منحنی متناسب از تعداد سلول و رنگ تولید شده بدست می‌آید. شمارش سلول‌ها و سنجش درصد سلول‌های سالم باقی‌مانده با رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو، بوسیله لام نئوبار و

میکروسکوپ Invert صورت گرفت. از یک پلیت ۹۶ خانه برای رده سلولی A549 و یک پلیت ۹۶ خانه برای رده سلولی HFF استفاده شد. در هر خانه ۱۰۰۰۰ سلول A549 (گروه آزمایش) و ۶۰۰۰ سلول HFF (گروه کنترل)، با حجم نهایی ۱۰ سی‌سی محیط کشت DMEM تزریق شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO₂ دار قرار داده شدند. بعد از چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت با غلظت‌های مختلف عصاره به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. مراحل انجام کار طبق پروتکل انجام گردید. جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه ELIZA Reader در طول موج ۵۹۰ نانومتر خوانده شد (۱۹).

آزمون رنگ‌سنجی تریپان بلو جهت بررسی میزان نرخ تکثیر (القای آپوپتوز): در این تست از یک پلیت ۹۶ خانه‌ای برای رده سلولی A549 و یک پلیت ۹۶ خانه‌ای برای رده سلولی HFF استفاده شد. در هر چاهک ۱۰۰۰۰ سلول A549 و ۶۰۰۰ سلول HFF و ۱۰ سی‌سی محیط کشت DMEM تزریق شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور Co دار قرار داده شدند. سپس با غلظت‌های مختلف عصاره به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. پنج خانه اول هر پلیت را به عنوان شاهد در نظر گرفته شد (شاهد شامل ۱۰ سی-سی محیط کشت خالص و بدون عصاره بود). برای هر غلظت ۵ خانه در نظر گرفته شد. بعد از ۲۴ ساعت، توسط سر سمپلر، محیط رویی چاهک‌ها برداشته شد. با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر تریپسین ۰/۲۵ درصد سلول‌ها از کف پلیت جدا شدند و به بالای سطح کشت منتقل شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول درون پلیت را با سمپلر برداشته و گوشه لام نئوبار قرار داده شد و ۱۰ میکرولیتر تریپان بلو ۰/۴ درصد به آن اضافه کرده و مخلوط شدند. سپس با توجه به اینکه سلول‌های زنده بی‌رنگ و سلول‌های مرده به دلیل از دست دادن غشای خود به رنگ آبی هستند،

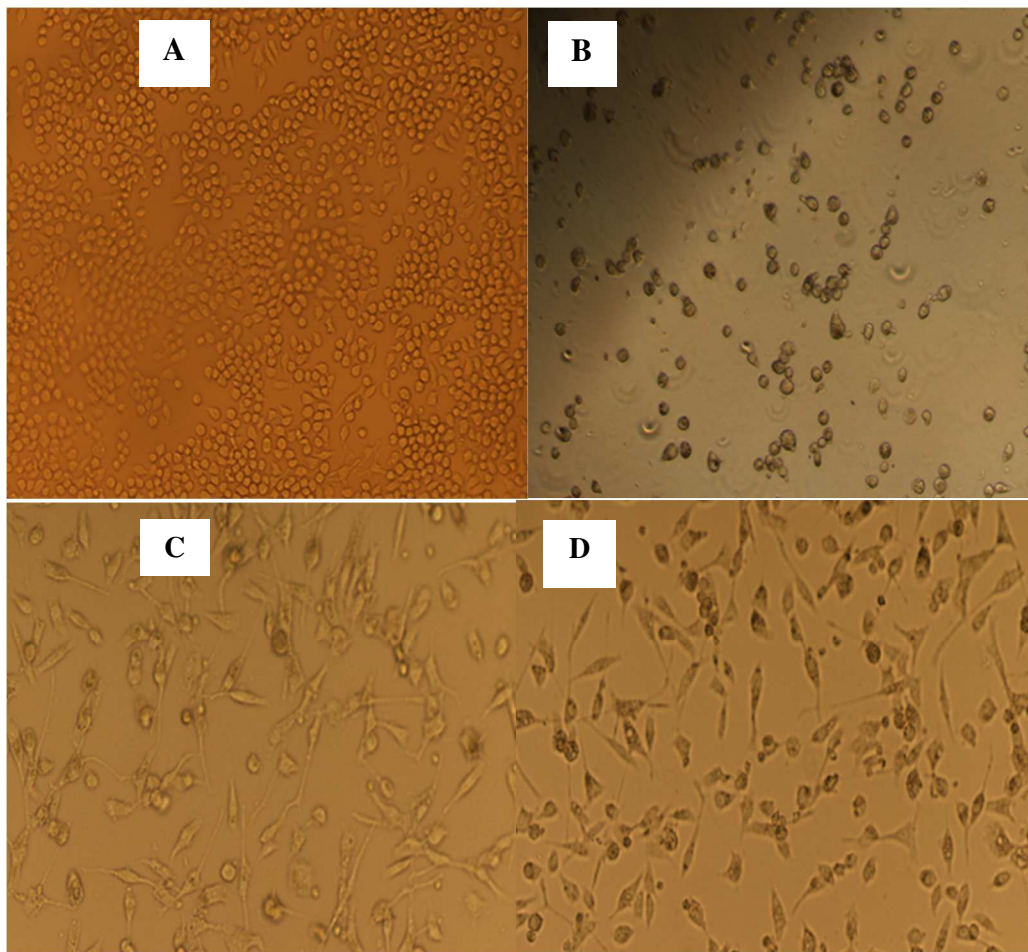
تعداد سلول‌های زنده و مرده را با استفاده از میکروسکوپ اینورت شمارش شدند (۱۹).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: با آزمون آنالیز واریانس یک-طرفه و به دنبال آن آزمون Tukey با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد. نمودارها با برنامه Graphpad prism 5 ترسیم شدند.

نتایج

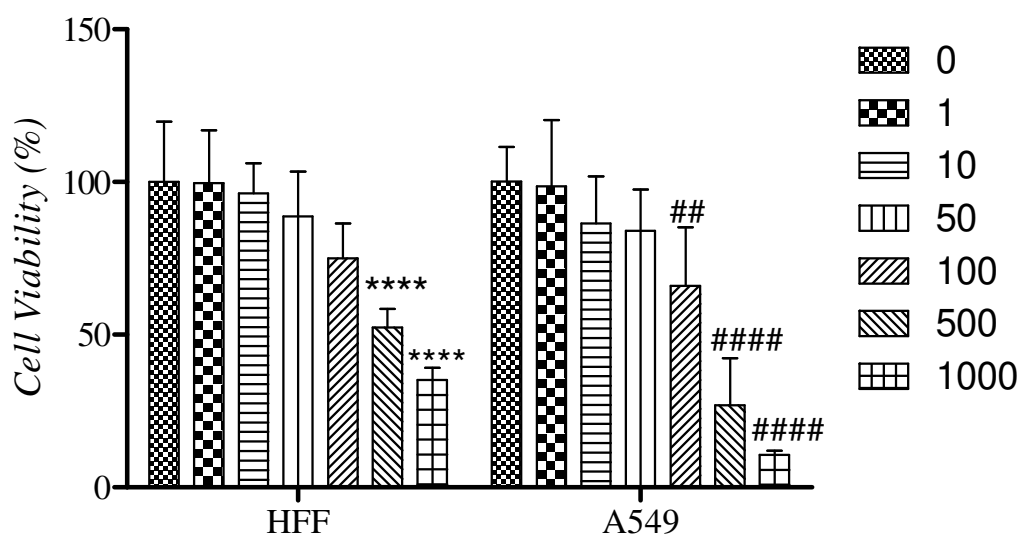
کاهش تعداد سلول‌ها و ظاهر حباب مانند غشا سلول‌ها نشان‌دهنده وقوع آپوپتوز در سلول‌های سرطانی رده A549 بود. سلول‌های رده A549 و HFF قبل از تیمار کشیده و چسبیده بودند اما بعد از تیمار سلول‌ها از کف بستر خود کنده شدند و از حالت دوکی شکل به حالت کروی و کوتاه‌تر درآمدند. شکل ظاهری سلول‌ها توسط میکروسکوپ اینورت ($\times 10$) مشاهده و عکس‌برداری شد (شکل ۱). نتایج سمیت سلولی غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک بر روی رده سلولی سرطانی ریه A549 و رده سلولی نرمال HFF در نمودار ۱ و ۲ نشان داده شده است. اثر هر غلظت از عصاره بر روی رده سلولی A549 و HFF در پنج آزمایش مستقل از یکدیگر مورد بررسی قرار گرفته شد. همان‌طور که نمودارها نشان می‌دهند به دنبال انکوباسیون ۲۴ ساعته غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک گونه parviflora با سلول‌های سرطانی ریه A549 و سلول‌های HFF، بیشترین میزان سمیت سلولی توسط غلظت میکروگرم/میلی‌لیتر ۱۰۰۰ از عصاره مشاهده شد ($p \leq 0/0001$). میزان بقای سلولی برای غلظت فوق در رده سلولی A549 ۱۰/۷۲ درصد و در رده سلولی HFF ۳۵/۱۴ درصد بود. نتایج به دست

آمده از آزمون نشان‌دهنده‌ی تاثیر عصاره‌ی هیدروالکلی پنیرک بر کاهش رشد هر دو رده سلولی در مقایسه با گروه کنترل (غلظت صفر) بود. لازم به ذکر است میزان سمیت عصاره وابسته به غلظت است. به طوری که با افزایش غلظت عصاره میزان بیشتری از سلول‌ها از بین رفتند. IC50 غلظتی از عصاره است که باعث زنده ماندن نیمی از سلول‌ها می‌شود. IC50 به دست آمده در رده سلولی A549، ۱۸۶/۱ میکروگرم/میلی‌لیتر و در رده سلولی HFF، ۰/۴۸۶ میکروگرم/میلی‌لیتر بود. نتایج نرخ تکثیر غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک بر روی رده سلولی سرطانی ریه A549 و HFF در نمودار ۳ و ۴ نشان داده شده است. به دنبال انکوباسیون ۲۴ ساعته غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک با سلول‌های سرطانی A549 و HFF کمترین میزان نرخ تکثیر توسط غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر در رده سلولی A549 ۱/۰۸۹ و در رده سلولی HFF ۱/۵۸۴ مشاهده شد. تحلیل آماری نشان داد میزان نرخ تکثیر با افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی در هر دو رده سلولی کاهش پیدا کرده است، به طوری که نرخ تکثیر سلول‌های A549 و HFF از ۲/۲۸۱ و ۲/۳۸۴ در غلظت ۱ به ۱/۰۸۹ و ۱/۵۸۴ میکروگرم/میلی‌لیتر در غلظت ۱۰۰۰ رسید. کاهش نرخ تکثیر سلول‌های رده A549 و HFF در مقایسه با گروه کنترل در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از نظر آماری معنادار بود ($p \leq 0/0001$). همچنین در سلول‌های رده A549 در غلظت ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر نیز کاهش نرخ تکثیر از نظر آماری معنادار بود ($p \leq 0/01$).



شکل ۱- (A, C) سلول‌های سرطانی رده A549 و HFF (در گروه کنترل بدون تیمار با عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک). (B, D) سلول‌های سرطانی رده A549 و HFF بعد از ۲۴ ساعت تیمار با عصاره گیاه پنیرک در غلظت (۱۰۰۰ میکروگرم/میلی لیتر).

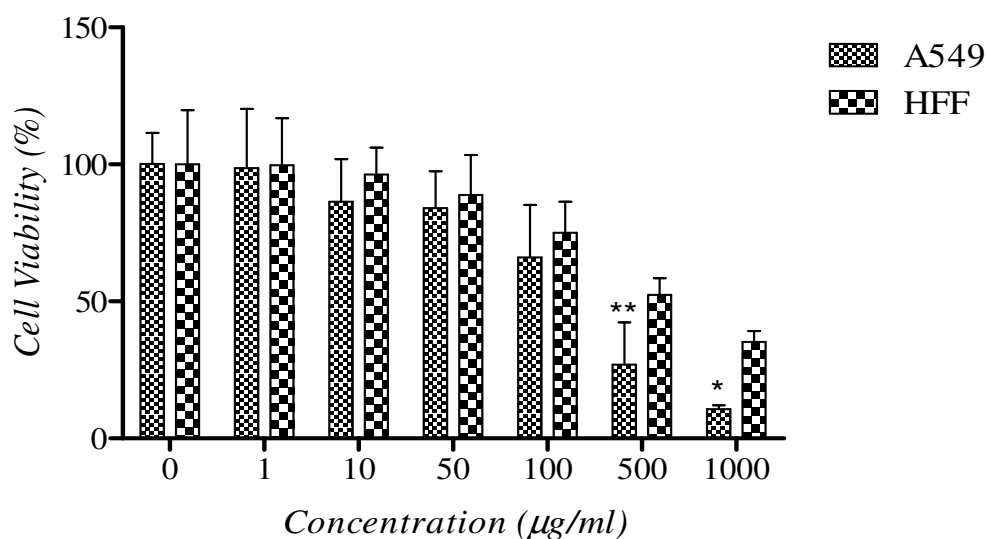
Fig. 1. (A, C) A549 and HFF cancer cells (in the control group without treatment with the hydroalcoholic extract of *Malva*). (B, D) A549 and HFF cancer cells after 24 hours of treatment with the extract of fennel plant at a concentration of (1000 $\mu\text{g/ml}$).



نمودار ۱- بررسی میزان بقای سلولی (درصد) رده A549 و HFF در غلظت‌های مختلف نسبت به گروه کنترل، طی زمان ۲۴ ساعت تیمار.

****: $p \leq 0.00001$, ####: $p \leq 0.0001$, ##: $p \leq 0.01$

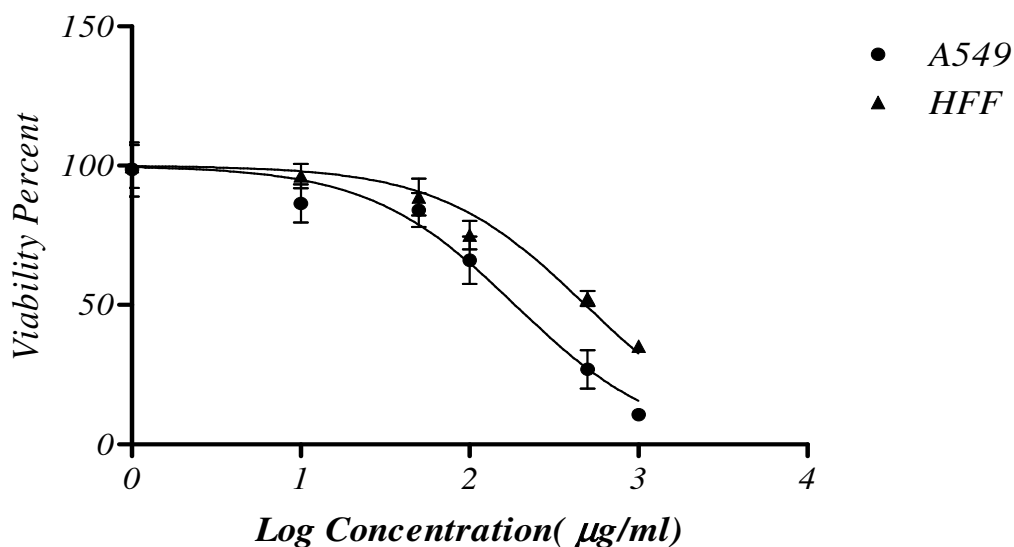
Fig. 2. Examining the cell survival rate (percentage) of A549 and HFF in different concentrations compared to the control group, during 24 hours of treatment. ****: $p \leq 0.00001$, ####: $p \leq 0.0001$, ##: $p \leq 0.01$



نمودار ۲- بررسی مقایسه‌ای اثر عصاره گیاه پنیرک بر روی رده سلول‌های A549 و HFF. نتایج نشان دادند که این عصاره اثر معناداری در کاهش بقای سلولی رده A549 نسبت به رده سلولی HFF در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر دارد.

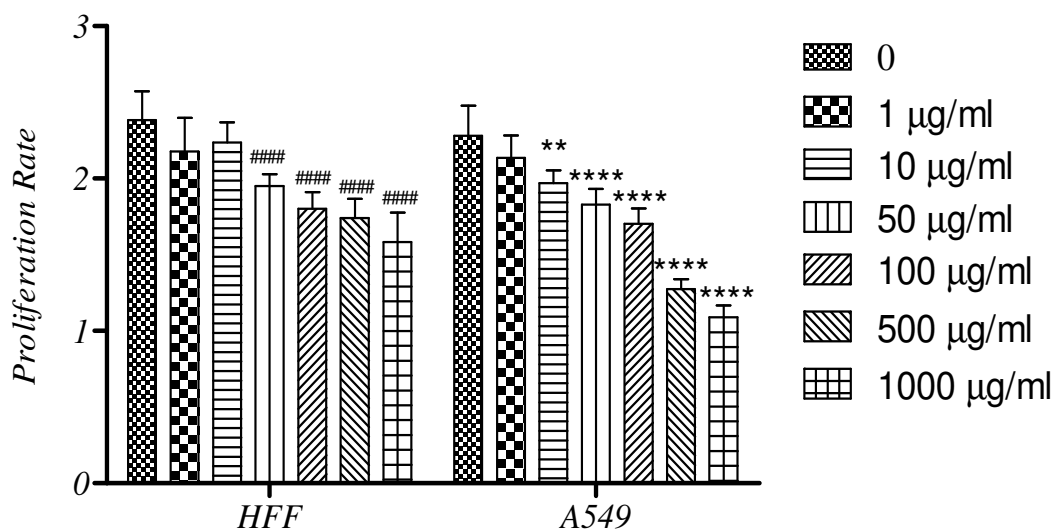
** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$

Fig. 3. Comparative investigation of the effect of the extract of the *Malva* on A549 and HFF cell lines. The results showed that this extract has a significant effect in reducing the cell survival of A549 strain compared to HFF cell strain at concentrations of 500 µg/ml ($p \leq 0.01$) and 1000 µg/ml ($p \leq 0.05$). **: $p \leq 0.01$, *: $p \leq 0.05$



نمودار ۳- درصد بقای سلولی تحت تاثیر لگاریتم غلظت‌های مختلف عصاره پنیرک بر روی سلول‌های رده A549 و HFF به وسیله آزمون MTT. نتایج نشان دادند با افزایش غلظت عصاره درصد بقای سلول کاهش می‌یابد.

Fig. 4. Percentage of cell survival under the effect of the logarithm of different concentrations of *Malva* extract on A549 and HFF cells by MTT test. The results showed that the percentage of cell survival decreases with the increase in the concentration of the extract.



A

نمودار ۴- بررسی نرخ تکثیر. A: نرخ تکثیر رده A549 و HFF در غلظت‌های مختلف نسبت به گروه کنترل، طی زمان ۲۴ ساعت تیمار. ****: $p \leq 0.0001$; **: $p \leq 0.01$; ####: $p \leq 0.0001$; B: بررسی مقایسه‌ای نرخ تکثیر رده سلول‌های A549 و HFF در غلظت‌های مختلف عصاره گیاه پنیرک. نتایج نشان دادند که این عصاره اثر معناداری در کاهش تکثیر رده A549 نسبت به رده سلولی HFF در غلظت‌های ۱۰ ($p \leq 0.05$)، ۵۰۰ ($p \leq 0.0001$) و ۱۰۰۰ ($p \leq 0.0001$) دارد. ****: $p \leq 0.0001$; *: $p \leq 0.05$.

Fig. 5. investigation of the reproduction rate. (A) The proliferation rate of A549 and HFF strains in different concentrations compared to the control group, during 24 hours of treatment. ****: $p \leq 0.0001$, **: $p \leq 0.01$, #####: $p \leq 0.0001$. (B) A comparative study of the proliferation rate of A549 and HFF cell lines in different concentrations of the extract of *Malva*. The results showed that this extract has a significant effect in reducing the proliferation of A549 cell lines compared to HFF cell lines at concentrations of 10 ($p \leq 0.05$), 500 ($p \leq 0.0001$) and 1000 $\mu\text{g/ml}$ ($p \leq 0.0001$) ****: $p \leq 0.0001$, *: $p \leq 0.05$.

انجام شده است مثلاً در ژاپن گیاه *juzen-taiho-to* در درمان سرطان بسیار مورد استفاده قرار گرفته است (۵، ۱۴). در این گیاه اسید گلوکورونیک، فلاونوئیدها، مشتقات ترپنوئیدی و فنولی، کلروفیلها، کاروتنوئیدها، آسپارژین، آلئین، تانن‌ها، روغن‌های فرار، آنتوسیانین‌های مالونات و مقدار کمی مادهٔ رنگی به نام مالوین وجود دارد (۱۶). از آنجا که عصاره پینرک حاوی ترکیبات فنولی، کاروتنوئیدها، توکوفرول و آنتوسیانین‌ها می‌باشد و دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است، می‌توان نتیجه گرفت که این عصاره به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی توانایی واکنش با رادیکال‌های حاصل از اکسیداسیون لیپیدها (LOO·L،

221

LO, OH, O₂) را دارد (۸). بسیاری از گیاهان دارای خاصیت فارماکولوژیک و بیوشیمیایی شامل خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی هستند که به نظر می‌رسد موجب فعالیت‌های ضد بدخیمی و ضد جهش‌زایی سلولی می‌شود (۶). در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک بر روی رده‌ی سلولی سرطانی A549 و رده سلولی HFF مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان دادند عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ و ۱۰۰۰ باعث کاهش رشد سلول‌های رده سلولی A549 نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری بعد از ۲۴ ساعت تیمار شد. این نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک با اثرات سایتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی رده A549 باعث مرگ این سلول‌ها شده است. کاهش نرخ تکثیر سلول‌های رده A549 و HFF در مقایسه با گروه کنترل در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از نظر آماری معنادار بود. نرخ تکثیر رده سلولی سرطانی ریه A549 نسبت به رده سلولی HFF در غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ از نظر آماری معنادار بود. این نتایج نشان داد عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک با القاء آپوپتوز بر سلول‌های سرطانی A549 مانع تکثیر این سلول‌ها شد. Khalaf و همکاران در سال ۲۰۲۱ در پژوهشی به بررسی تاثیر عصاره آویشن بر رده سرطانی MCF-7 پرداختند که نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر همسو و نشان‌دهنده موثر بودن عصاره گیاهی بر درمان سرطان بود (۷). Kis و همکاران در سال ۲۰۲۱ در مطالعه‌ای همسو با نتایج گزارش کردند که عصاره جوانه‌های گیاه *Populus nigra L.* دارای سمیت سلولی روی سلول‌های سرطانی MCF-7 است (۱۵). مطالعات Shadid و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان‌دهنده خواص بازدارنده آنتی‌اکسیدانی این گیاه می‌باشد که با یافته‌های پژوهش حاضر همخوانی دارد. این تحقیق

نشان داد که افزایش غلظت عصاره همراه با افزایش میزان مرگ سلولی است. ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها خواص بیولوژیکی متعددی مانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی، به دام انداختن رادیکال‌های آزاد و خاصیت ضد التهابی دارند. این ترکیبات همچنین باعث جلوگیری یا به تأخیر انداختن آسیب‌های اکسیداتیو در چربی‌ها و دیگر مولکول‌های مهم و مانع به وجود آمدن سرطان و بیماری‌های کرونر قلب می‌شوند (۱۵). نتایج این تحقیقات گامی ابتدایی در بررسی و شناسایی ترکیبات ضد سرطانی است. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که ترکیبات گیاهی و مشتقات آن‌ها می‌توانند بخشی از پروتکل‌های استاندارد درمان سرطان به حساب آیند و سلاح کارایی برای پیشگیری و درمان سرطان باشند. با توجه به گستره و تنوع زیاد گیاهان، محققان راه درازی برای تحقیق در این زمینه در پیش رو دارند.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک باعث کاهش رشد سلول‌های سرطانی رده سلولی A549 نسبت به گروه کنترل شد. عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک با اثرات سایتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی رده A549 باعث مرگ این سلول‌ها شده و با القاء آپوپتوز مانع تکثیر این سلول‌ها شد. به این ترتیب ترکیبات گیاهی و مشتقات آن‌ها می‌توانند بخشی از پروتکل‌های استاندارد درمان سرطان به حساب آیند.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر حاصل تلاش رساله کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی می‌باشد. مولفان مراتب قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دزفول که در انجام این طرح ما را یاری فرمودند اعلام می‌دارند.

منابع

- Surendran P, Drenos F., Cook J.P., Auer P.L., Chu A.Y., Giri A., Zhao W., Jakobsdottir J., Lin L.A., Stafford J.M., Amin N., Mei H., Yao J., Voorman A. 2016. Meta-analysis identifies common and rare variants influencing blood pressure and overlapping with metabolic trait loci. *Nature Genetics*, 48(10):1162-1170.
9. Nardone L.L., Andrews S.B., 1979. Cell line A549 as a model of the type II pneumocyte: Phospholipid biosynthesis from native and organometallic precursors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Lipids and Lipid Metabolism*, 573(2):276-295.
10. Noohizadeh Z., Parivar K., Hayati R., 2015. The effects of *Malva sylvestris* leaves on sperm and spermatogenesis of the C-57 Mice-*Journal of Animal Biology*, 7(2):81-88.
11. Parto N., Valizadeh Z., Sarkaki A.R., Nasri S., 2018. Evaluation of the effect of *Malva parviflora* hydro-alcoholic extract on pain in male rat. *Jundishapur Scientific Medical Journal*, 17(1):95-105.
12. Qi F., Zhao L., Zhou A., Zhang B., Li A., Wang Z., Han J., 2015. The advantages of using traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy in the whole course of cancer treatment instead of only terminal stage of cancer. *Bioscience Trends*, 9(1):16-34.
13. Rosell R., Carcereny E., Gervais R., Vergnenegre A., Massuti B., Felip E., Palmero R., Garcia-Gomez R., Pallares C., Sanchez J.M., Porta R., Cobo M., Garrido P., Longo F., Moran T., Insa A., De Marinis F., Corre R., Bover I., Illiano A., Dansin E., de Castro J., Milella M., Reguart N., Altavilla G., Jimenez U., Provencio M., Moreno M.A., Terrasa J., Muñoz-Langa J., Valdivia J., Isla D., Domine M., Molinier O., Mazieres J., Baize N., Garcia-Campelo R., Robinet G., Rodriguez-Abreu D., Lopez-Vivanco G., Gebbia V., Ferrera-Delgado L., Bombaron P., Bernabe R., Bearz A., Artal A., Cortesi E., Rolfo C., Sanchez-Ronco M., Drozdowskyj A., Queralt C., de Aguirre I., Ramirez J.L., Czabotar P.E., Lessene G., Strasser A., Adams J.M., 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1):49-63.
2. Dadeche C.H., Bouzid H., 2021. Les propriétés de *Malva sylvestris* L. *Année Universitaire*, p: 4.
3. Elguea A.Í., Serrano M.A., Chrysostomou D., Inziarte H.I., Bøgh S., Arana A.N., 2023, A review on reinforcement learning for contact-rich robotic manipulation tasks. *Robotics and Computer Integrated Manufacturing*, 81:102517.
4. Goto K., Ohtsubo T., Kitazono T., 2018. Endothelium-dependent hyperpolarization (EDH) in hypertension: the role of endothelial ion channels. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1):315.
5. Hassanpour H., 2015. Effect of *Aloe vera* gel coating on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activities and decay in raspberry fruit. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1):495-501.
6. Khalaf A.N., Abed I.J., 2021. Evaluating the in vitro cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil on MCF-7 and HeLa cancer cell lines. *Iraqi Journal of Science*; 62(9):2862-2871.
7. Kis B., Pavel I.Z., Avram S., Moaca E.A., Herrero S.J.M., Schwiebs A., Radeke H.H., Muntean D., Diaconeasa Z., Minda D., Oprean C., Bojin F., Dehelean C.A., Soica C., Danciu C., 2022. Antimicrobial activity, in vitro anticancer effect (MCF-7 breast cancer cell line), antiangiogenic and immunomodulatory potentials of *Populus nigra* L. buds extract. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 22(1):74.
8. Liu C., Kraja A.T., Smith J.A., Brody J.A., Franceschini N., Bis J.C., Rice K., Morrison A.C., Lu Y., Weiss S., Guo X., Palmas W., Martin LW, Chen YD,

Gb/s/wire 0.94 pJ/bit forwarded clock CNRZ-5-coded SerDes up to 12mm for MCM packages in 28nm CMOS. 2016 IEEE International Solid-State Circuits Conference (ISSCC); IEEE.

17. Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet T.J., Jemal A., 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2):87-108.

18. Wang H., Luo Y., 2024. Green mediated of nanoparticles by plant extract: Investigation of its performance to treat the human renal cell carcinoma. *Journal of Engineering Research*, 12(2):11-16.

19. Zafari J., Zadehmodares Sh., Javani J.F., Bagher H.Z., Najjar N., Asnaashari M., 2020. Investigation into the effect of photodynamic therapy and cisplatin on the cervical cancer cell line (A2780). *lasers Medical Science*, 11(1):85-91

Sanchez J.J., Molina M.A., Taron M., Paz-Ares L., 2012. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The lancet Oncology*, 13(3):239-246.

14. Saiki I., 2000. A Kampo Medicine Juzen-taiho-to: Prevention of malignant progression and metastasis of tumor cells and the mechanism of action. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*; 23(6):677-88.

15. Shadid K.A., Shakya A.K., Naik R.R., Jaradat N., Farah H.S., Shalan N., et al., 2021. Phenolic content and antioxidant and antimicrobial activities of *Malva sylvestris* L., *Malva oxyloba* Boiss., *Malva parviflora* L., and *Malva aegyptia* L. leaves extract. *Journal of Chemistry*, 2021:1-10.

16. Shokrollahi A., Carnelli D., Fox J., Hofstra K., Holden B., Hormati A., et al., editors., 2016.10.1 A pin-efficient 20.83

Research Article

Preparation of Decellularized Bovine Vein Scaffolds and Evaluation of Hyperelastic Models for Use in Vascular Tissue Engineering

Mehrdad Sheikhlou^{1*}, Arash Abdolmaleki², Abbas Sabahi Namini³

1- Department of Engineering Sciences, Faculty of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, Namin, Iran

2- Department of Biophysics, Faculty of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, Namin, Iran

*Corresponding author: sheikhlou@uma.ac.ir

Received: 10 January 2025

Accepted: 14 March 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1196098

Abstract

Coronary artery disease (CAD) is responsible for approximately 30% of deaths worldwide. The purpose of this research was to prepare a decellularized bovine vein scaffold and compare it with the control sample and evaluate its mechanical behavior. Modeling and selection of structural equations is of vital importance for analyzing the mechanical behavior of tissues. It is common to use hyperelastic structural models to predict the nonlinear behavior of soft tissues, however, hyperelastic models depend on a set of material constants that must be calculated experimentally. In this study, a computational/laboratory method was used to study the nonlinear mechanical behavior of vessel and scaffold tissues under uniaxial tension. Material constants were calculated for three different hyperelastic material models through inverse methods. The search for an optimal value for each set of material constants was performed using the sum of squared error minimization method. The accuracy of the fitted theoretical stress-stretch ratio relationship was evaluated with the experimental results. It was observed that the tissue of the vessel shows more resistance to tension compared to the scaffold; the higher mechanical properties of the vessel are due to the elastin and collagen content in the vessel wall. For the vessel, the Yeo and Ogden models fit well with the laboratory results, but for the scaffold, the best results were obtained with the Yeo model. All of the investigated material models showed less accuracy in the area of small tension ratios. It was observed that three material parameters and in some cases two material parameters are needed to model the mechanical behavior of vessels and scaffolds. The results show that scaffolds obtained from decellularization are an ideal model for vascular tissue engineering applications, considering the preservation of the main components of the desired tissue as well as appropriate mechanical strength.

Keywords: Mechanical properties, Hyperelastic, Cardiovascular tissue engineering, Regenerative medicine, Scaffold.



مقاله پژوهشی

تهیه داربست‌های سلول‌زدایی‌شده‌ی رگ گاو و ارزیابی مدل‌های هایپرالاستیک به منظور کاربرد در مهندسی بافت عروق

مهرداد شیخلو^{۱*}، آرش عبدالملکی^۲، عباس صباحی نمینی^۱

۱- گروه علوم مهندسی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، نمین، ایران

۲- گروه بیوفیزیک، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، نمین، ایران

* مسئول مکاتبات: sheikhloo@uma.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۲۱

DOI: 10.60833/ascij.2025.1196098

چکیده

بیماری عروق کرونر مسئول تقریباً ۳۰ درصد از کل مرگ‌ومیرها در سراسر جهان است. هدف از این پژوهش تهیه داربست سلول‌زدایی‌شده رگ گاو و مقایسه آن با نمونه کنترل و همچنین ارزیابی رفتار مکانیکی آن بود. مدل‌سازی و انتخاب صحیح معادلات ساختاری برای تحلیل رفتار مکانیکی بافت‌ها از اهمیت حیاتی برخوردار است. استفاده از مدل‌های ساختاری هایپرالاستیک برای پیش‌بینی رفتار مکانیکی غیرخطی بافت‌های نرم رایج است، با این حال، مدل‌های هایپرالاستیک به مجموعه‌ای از ثابت‌های مواد بستگی دارند که باید به صورت آزمایشگاهی محاسبه شوند. در این مطالعه از یک روش محاسباتی/آزمایشگاهی برای مطالعه رفتار مکانیکی غیرخطی بافت‌های رگ و داربست تحت کشش تک‌محوری استفاده شد. ثابت‌های ماده برای سه مدل مختلف مواد هایپرالاستیک از طریق روش‌های معکوس محاسبه شد. جستجو برای یک مقدار بهینه برای هر مجموعه از پارامترهای مواد با استفاده از روش مینیمم کردن مجموع مربعات خطا انجام شد. دقت برازش رابطه تنش - نسبت کشش تئوری با نتایج آزمایشگاهی ارزیابی شد. مشاهده شد که بافت رگ در مقایسه با داربست در مقابل کشش مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهد، خواص مکانیکی بالاتر رگ به خاطر الاستین و محتوای کلاژن موجود در دیواره رگ می‌باشد. برای رگ مدل‌های یئو و آگدن به خوبی با نتایج آزمایشگاهی برازش کردند ولی برای داربست بهترین نتایج با مدل یئو به دست آمد. تمام مدل‌های مواد بررسی شده دقت کمتری در ناحیه کشش‌های کوچک نشان دادند. برای مدل‌سازی رفتار مکانیکی رگ و داربست به سه پارامتر ماده و در برخی موارد به دو پارامتر ماده نیاز است. نتایج نشان می‌دهد که داربست‌های حاصل از سلول‌زدایی با توجه به حفظ ترکیبات اصلی بافت مورد نظر و همچنین مقاومت مکانیکی مناسب، مدلی ایده‌آل برای کاربردهای مهندسی بافت عروق می‌باشد.

کلمات کلیدی: خصوصیات مکانیکی، هایپرالاستیک، مهندسی بافت قلبی عروقی، پزشکی ترمیمی، داربست.

مقدمه

بیماری‌های قلبی عروقی و آترواسکلروز همچنان از علل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر جهان هستند (۳۸). جراحی‌های بای پس به عنوان بهترین راه حل شناخته می‌شوند. با این حال، به دلیل عدم وجود پیوندهای اتولوگ مناسب و محدودیت در استفاده از پیوندهای مصنوعی مانند درد، التهاب و ترومبوز، جایگزین‌های دیگری مورد نیاز است (۱۳، ۲۱). مهندسی بافت به عنوان یک رویکرد امیدوارکننده برای غلبه بر این

موانع در نظر گرفته می‌شود. در عمل، داربست‌های مناسب با سلول‌های اتولوگ کاشته می‌شوند و در محیط تنظیم‌شده کشت می‌شوند. جایگزین زیست تخریب پذیر و کاربردی به دست آمده به عنوان یک پیوند در بدن بیمار برای بازسازی بافت کاشته می‌شود. اثربخشی این رویکرد تا حد زیادی به استفاده از یک منبع سلولی قابل اعتماد و یک داربست سه بعدی مناسب بستگی دارد (۱۲، ۳۹). داربست شامل پروتئین‌ها، فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها است و همچنین سیگنال‌های ماتریکس را برای تسهیل بازسازی بافت بدون ایجاد پاسخ‌های التهابی ارائه می‌دهد (۳، ۳۵). در پرداختن به این موضوع، طیف وسیعی از داربست‌ها بررسی شده است. داربست‌های مصنوعی شکل پذیری خوبی دارند اما شبیه ساختار اصلی بافت نیستند و نمی‌توانند با سلول‌ها تعامل داشته باشند یا سیگنال‌های کافی برای افزایش چسبندگی و تکثیر سلولی ارائه دهند. علاوه بر این، اثربخشی آنها می‌تواند به دلیل واکنش‌های سمی و التهابی محدود شود (۴۳). از سوی دیگر داربست‌های طبیعی از مواد بیولوژیکی طبیعی ساخته می‌شوند و به دلیل زیست سازگاری بالا از واکنش‌های التهابی جلوگیری می‌کنند (۱، ۲، ۳۱). این داربست‌ها همچنین می‌توانند با سلول‌زدایی بافت‌های مختلف با حفظ معماری ماتریکس خارج سلولی (ECM) برای حفظ اثرات القایی آن بر چسبندگی، مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولی آماده شوند (۱۱، ۲۵). ماتریکس خارج سلولی همچنین برای سیگنال‌دهی ضروری است و می‌تواند بازسازی بافت را هدایت کند. این ویژگی‌ها منجر به کاربرد گسترده این گروه از داربست‌های طبیعی در مهندسی بافت شده است (۴۲). از طرفی یکی از ویژگی‌های ضروری برای داربست‌های زیستی دارا بودن استحکام مکانیکی کافی است تا بتواند در برابر تنش‌های ناشی از حرکت اندام‌ها و فشار وارده

بر بافت‌های بدن مقاومت کند. رفتار و خواص مکانیکی برخی بافت‌های نرم با رفتار معمول بافت‌های دیگر تفاوت دارد، یکی از مهمترین ویژگی‌های بافت‌های نرم رفتار غیرخطی آنها می‌باشد. برخی از بافت‌های نرم رفتار غیرخطی و پیچیده‌ای بین تنش و کرنش (حتی در کمترین کرنش‌ها) از خود نشان می‌دهند و در کرنش‌های بالا خواص الاستیک خود را حفظ می‌کنند. برای مدل کردن این رفتار غیرخطی، بافت‌های نرم به صورت ماده هایپرالاستیک در نظر گرفته می‌شوند (۲۷). در هنگام مطالعه پاسخ و تکامل اندام‌ها در شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیک، به دست آوردن مدل‌های ساختاری قابل اعتماد برای رفتار بافت‌ها تحت بارها از اهمیت بالایی برخوردار است. به علت اهمیت این موضوع، تا به امروز مدل‌سازی‌های گوناگونی روی بافت‌های نرم و مواد مشابه نظیر انواع پلیمرها، مواد عروقی و موادی که از خود رفتار هایپرالاستیک نشان می‌دهند، صورت گرفته است (۲۳، ۲۴، ۳۳). هایاشی و همکاران بیان کردند که یک رابطه ساختاری ساده، مانند خواص مکانیکی نمایی یا لگاریتمی بافت‌های بیولوژیکی نرم، سودمندتر از روابط پیچیده‌تر مبتنی بر توابع انرژی کرنش است (۱۸). در این فرمول‌های ساده تعداد ضرایب کاهش می‌یابد، در حالی که معنای فیزیکی آنها حفظ می‌شود. از نقطه نظر عملی، بیان خواص الاستیک توسط یک پارامتر واحد مفیدتر از یک عبارت کامل اما ترکیبی بر اساس چندین پارامتر است (۳۷، ۱۵). با این حال، باید توجه داشت که چنین خواص مکانیکی خطی نمی‌تواند رفتار مکانیکی غیرخطی اکثر بافت‌های نرم را پیش‌بینی کند و استفاده از مدل‌های مواد غیرخطی بر اساس توابع چگالی انرژی کرنشی برای شبیه‌سازی دقیق و نتایج مدل‌سازی مهم تلقی می‌شود (۱۹). از این رو هدف از این پژوهش ارزیابی بافتی و استحکام مکانیکی

پس از پارافین‌زدایی با محلول زایلن و آبدهی‌شدن با درجات نزولی از اتانول، نمونه‌ها با همتوکسیلین و ائوزین و DAPI برای بررسی کیفیت سلول‌زدایی رنگ‌آمیزی شدند (۶).

مدل‌های هایپیرالاستیکی: رونالد ریولین (۳۲) و ملوین مونی (۸) برای اولین بار مدل‌های هایپیرالاستیک نئو هوک و و مونی ریولین را ارائه دادند. از آن زمان تا به حال مدل‌های بسیاری برای مواد هایپیرالاستیک ارائه گردیده است که می‌توان به مدل‌های معروف اگدن (۲۸) و آرودا-بویس (۵) و یئو (۴۱) اشاره کرد. روش معمول در مدل‌سازی ساختاری، برازش داده‌های تک محوری به دست‌آمده تحت فشردگی یا کشش کنترل‌شده، با مدل‌های مواد استاندارد است. این به دلیل محدودیت‌های کلی تجربی (و تا حدی تحلیلی) برای انجام ارزیابی مناسب تنش‌ها و تغییر شکل‌ها در موقعیت‌های بارگذاری متعدد است. در این تحقیق برای انتخاب کردن بهترین مدل ساختاری که بتواند رفتار الاستیک غیرخطی بافت رگ و داربست را پیش بینی کند، از جعبه ابزار بهینه‌سازی متلب استفاده شد. با استفاده از روش مینیمم کردن مجموع مربعات خطا (Minimizing the sum of square errors)، برای هر یک از مدل‌های رفتاری فوق برازش منحنی غیرخطی بر داده‌های آزمایشگاهی بدست آمده از تست کشش اعمال گردید و ضرایب تابع چگالی انرژی کرنشی محاسبه شد.

تئوری هایپیرالاستیک و معادلات ساختاری: رفتار تنش-کرنش مواد هایپیرالاستیک غیرخطی است و برای توصیف رفتار آنها یک مدول الاستیسیته ساده دیگر کافی نمی‌باشد. بنابراین، توصیف رفتار الاستیک مواد غیرخطی بسیار قابل انبساط (Highly extensible) از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۶). رفتار ساختاری ماده هایپیرالاستیک از تابع چگالی انرژی کرنش (میزان انرژی الاستیک ذخیره شده در

داربست‌های حاصل از سلول‌زدایی رگ گاو می‌باشد. همچنین، در این تحقیق مطالعه آزمایشگاهی و عددی رفتار مکانیکی غیرخطی بافت رگ و داربست و مقایسه آنها انجام شد و خواص هایپیرالاستیک دقیق بافت رگ و داربست ارائه شد که می‌تواند در مدل‌های بیومکانیکی استفاده شود.

مواد و روش‌ها

عروق تازه گاو از کشتارگاه محلی تهیه شده و در بافر فسفات سالین (PBS) سرد حاوی 100 U/ml پنی سیلین و 100 گرم/لیتر استرپتومایسین به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها در آزمایشگاه به منظور حذف آثار خون، چربی و بافت همبند تمیز شده و سپس جهت سلول‌زدایی در PBS استریل در دمای 20°C - درجه سانتیگراد نگهداری شدند. این پژوهش مطابق با اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه محقق اردبیلی و با کد اخلاقی IR.UMA.REC.1401.089 به تصویب رسیده است.

سلول‌زدایی: عروق گاو در فلاسک‌های استاندارد با Triton X-100 و TnBP در دمای 37°C درجه سانتی-گراد سلول‌زدایی شدند. به طور خلاصه، عروق در محلول $1\% \text{ Triton X-100 (v/v)}$ غوطه‌ور شده و به آرامی به مدت ۱۵ ساعت تکان داده شدند. پس از شستشو با آب مقطر، نمونه‌ها در محلول $1\% \text{ TnBP (v/v)}$ به مدت ۴ ساعت به طور مداوم تکان داده شدند. پس از شستشوی نمونه‌ها با آب مقطر با $1\% \text{ Triton X-100}$ به مدت ۸ ساعت دیگر انکوبه شدند. در نهایت، نمونه قبل از نگهداری در PBS حاوی آنتی‌بیوتیک به مدت ۲۴ ساعت در PBS شستشو داده شدند (۱۰، ۳۴).

ارزیابی‌های بافتی داربست‌های رگ سلول‌زدایی شده: نمونه‌ها پس از فیکس‌شدن، آبگیری و قالب‌گیری با پارافین، از برش‌هایی به قطر ۵ میکرون تهیه شدند.

واحد حجم ماده) بر اساس سه نامتغیر کرنش I_1, I_2 و I_3 به صورت زیر به دست می‌آید (۴):

$$W = W(I_1, I_2, I_3)$$

که در آن I_1, I_2 و I_3 سه نامتغیر تانسور تغییر شکل گرین هستند که برحسب نسبت‌های کشش اصلی λ_1, λ_2 و λ_3 به صورت زیر تعریف می‌شوند:

$$\begin{aligned} I_1 &= \lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2 \\ I_2 &= \lambda_1^2 \lambda_2^2 + \lambda_2^2 \lambda_3^2 + \lambda_1^2 \lambda_3^2 \\ I_3 &= \lambda_1^2 \lambda_2^2 \lambda_3^2 \end{aligned}$$

نسبت‌های کشش اصلی (Stretch ratio) مطابق رابطه زیر تعریف می‌شوند: $\lambda = \frac{L_f}{L_0}$

که در رابطه فوق L_f طول نهایی و L_0 طول اولیه هر یک از وجوه نمونه می باشد. بنابراین مقادیر λ_i به وسیله عبارت $(\lambda_i = 1 + \varepsilon_i)$ قابل تعریف است. برای یک ماده تراکم ناپذیر، I_3 برابر صفر بوده و تنها دو نامتغیر دیگر I_1 و I_2 باقی خواهند ماند. به همین دلیل چگالی انرژی کرنشی تابعی از I_1 و I_2 خواهد بود:

$$W = W(I_1 - 3, I_2 - 3)$$

مدل‌های هایپرالاستیک مختلفی وجود دارند که می‌توانند رابطه بین تنش و کرنش را مشخص کنند.

مدل یئو: مدل یئو (۳۰) یک مدل پدیدار شناختی برای تغییر شکل مواد الاستیک تقریباً غیرقابل تراکم و غیرخطی است. تابع چگالی انرژی کرنش فقط به نامتغیر اول کرنش، I_1 بستگی دارد. به آن مدل چند جمله ای کاهش یافته نیز می‌گویند و به صورت زیر

$$W = \sum_{i=1}^n C_{i0} (I_1 - 3)^i$$

نوشته می‌شود: C_{i0} ثابت‌های ماده هستند. استفاده از جمله‌های مرتبه بالاتر I_1 در تابع چگالی انرژی کرنش یئو، در پیش‌بینی رفتار تنش-کرنش برای موده‌های مختلف تغییر شکل یعنی تک محوری، دو محوری و برشی در کرنش‌های متوسط تا بزرگ مفید است (۹).

مدل آگدن: مدل آگدن یک مدل هایپرالاستیک عمومی است که در آن چگالی انرژی کرنشی به جای نامتغیرهای کرنش بر حسب کشش‌های اصلی بیان می‌شود. تابع چگالی انرژی کرنش آن به صورت زیر بیان می‌شود: $W = \sum_{i=1}^n \frac{\mu_i}{\alpha_i} (\lambda_1^{\alpha_i} + \lambda_2^{\alpha_i} + \lambda_3^{\alpha_i} - 3)$

که در آن μ_i ثابت‌های ماده و α_i ضرایب بی‌بعد هستند ($\mu_i \alpha_i > 0$). این مدل قابلیت استفاده در تغییر شکل‌های بزرگ را دارد که اندازه‌گیری مقادیر کشش-های اصلی یکی از مزیت‌های مدل آگدن محسوب می‌شود (۲۹).

مدل آرودا-بویس: مدل آرودا-بویس (۲۹) بر اساس زنجیره‌های شبکه‌ی مولکولی تعریف شده است و در آن تابع چگالی انرژی کرنشی بر حسب نامتغیر اول کرنش I_1 به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$\begin{aligned} W &= \mu \sum_{i=1}^5 \frac{C_i}{\lambda_m^{2i-2}} (I_1^i - 3^i) \\ C_1 &= \frac{1}{2}, C_2 = \frac{1}{20}, C_3 = \frac{11}{1050}, C_4 = \frac{19}{7000}, C_5 = \frac{519}{673750} \end{aligned}$$

که در آن μ مدول برش و λ_m کشش قفل شدگی است.

محاسبه تنش‌ها در مواد هایپرالاستیک: علت تعریف تابع چگالی انرژی کرنشی این است که روابط تنش-کرنش می‌توانند با دیفرانسیل‌گیری از این تابع نسبت به اندازه کرنش‌ها حاصل گردند. تنش مهندسی را می‌توان از مشتق تابع چگالی انرژی کرنشی نسبت به

$$\sigma_i = \frac{\partial W}{\partial \lambda_i} \quad (۷):$$

کشش محاسبه کرد (۷): که در آن σ_i و λ_i به ترتیب تنش مهندسی و نسبت کشش در جهت‌های اصلی هستند. علاوه بر این، بسیاری از مدل‌های ساختاری بر حسب نامتغیرها نوشته شده‌اند. بنابراین، اگر W تابعی از I_1 و I_2 باشد،

می‌توان تنش مهندسی در جهت i را از رابطه زیر بدست آورد:

$$\sigma_i = \frac{\partial W}{\partial I_1} \frac{\partial I_1}{\partial \lambda_i} + \frac{\partial W}{\partial I_2} \frac{\partial I_2}{\partial \lambda_i}$$

برای تست کشش تک محوری نسبت‌های کشش اصلی به ترتیب برابر $\lambda_1 = \lambda$ ، $\lambda_2 = \lambda_3 = 1/\sqrt{\lambda}$ هستند و نامتغیرهای غیر صفر کرنش از روابط بدست

$$\text{می‌آید: } I_2 = 2\lambda + 1/\lambda^2 \text{ و } I_1 = \lambda^2 + 2/\lambda$$

با جایگذاری نامتغیرهای کرنش برای بارگذاری تک محوری از روابط بالا در تابع چگالی انرژی کرنشی مدل‌های ساختاری مواد هایپرالاستیک و مشتق‌گیری نسبت به λ تنش مهندسی در جهت اصلی کشش بدست می‌آید. تنش مهندسی محاسبه شده برای هر مدل در جدول ۱ لیست شده است.

روش برازش منحنی و تحلیل خطا: برای برازش سه مدل ساختاری هایپرالاستیک بر روی نتایج آزمایشگاهی تست کشش تک محوری از روش حداقل مربعات استفاده شد. روش حداقل مربعات یک روش عددی استاندارد است که در آن معادلات پیچیده‌ای مانند توابع غیرخطی بر اساس حداقل مجموع خطاها یا حداقل مجموع مربعات خطاها

برآزش می‌شوند. با در نظر گرفتن مجموعه‌ای از داده‌های تنش و نسبت کشش تجربی به صورت (σ_1, λ_1) ، (σ_2, λ_2) ، ...، (σ_n, λ_n) ، مجموع مربعات خطا به صورت زیر تعریف می‌شود:

$sse = \sum_{j=1}^n (\sigma_j - f(\lambda_j, p))^2$ که در آن تابع f به مدل ساختاری انتخاب شده برای مدلسازی رفتار هایپرالاستیک ماده بستگی دارد و برای تست کشش تک محوری از توابع ارائه شده در جدول ۱ استفاده خواهد شد. این تابع علاوه بر نسبت کشش متغیر (λ) در راستای نیروی کششی تک محوری به پارامترهای برداری (p) نیز بستگی دارد. در واقع درایه‌های p ضرایب مدل ساختاری هایپرالاستیک است. هدف یافتن مقداری برای p هست به طوری که به ازای آن sse به حداقل مقدار خود برسد (۲۲). برای ارزیابی بهتر تطابق بین نتایج تئوری $\sigma_t(\lambda)$ و آزمایشگاهی $\sigma_e(\lambda)$ ، داده‌های بافت رگ و داربست را با استفاده از یک خطای نرمالیزه شده (۲۶) در نظر می‌گیریم که نزدیکی بین نتایج تئوری و آزمایشگاهی را در هر سطح کشش نشان می‌دهد. این مانده خطا به صورت درصدی با رابطه زیر تعریف می‌شود:

$$\text{Error residual percent}(\lambda) = \frac{|\sigma_e(\lambda) - \sigma_t(\lambda)|}{\sigma_e(\lambda)} \times 100$$

جدول ۱- تابع تنش مهندسی بر حسب نسبت کشش برای مدل‌های ساختاری استفاده شده

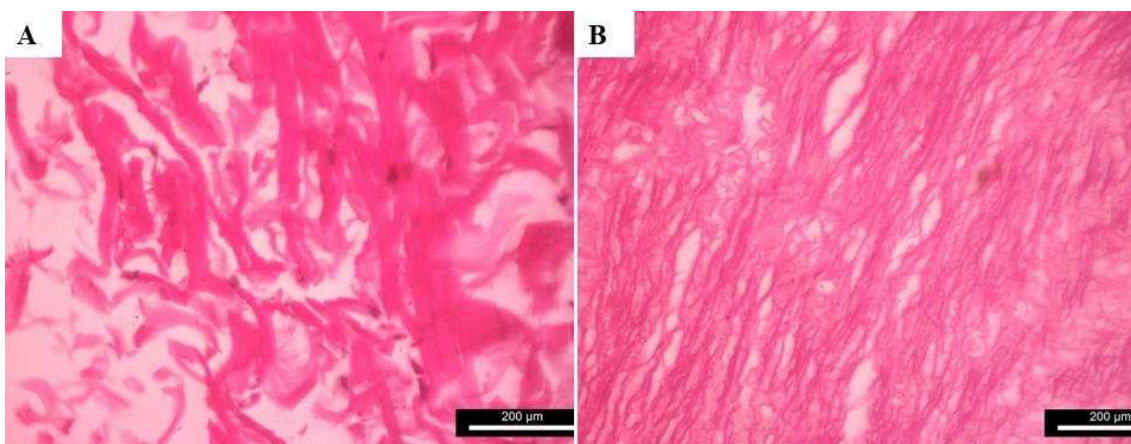
Table 1 - Engineering stress function in terms of tension ratio for the structural models used

Hyperelastic models	Calculated engineering stress for uniaxial tension
Yeoh	$\sigma_1 = \sum_{i=1}^n 2iC_{i0}(\lambda - 1/\lambda^2)(\lambda^2 + 2/\lambda - 3)^{i-1}$
Ogden	$\sigma_1 = \sum_{i=1}^n \mu_i(\lambda^{\alpha_i-1} - \lambda^{-0.5\alpha_i-1})$
Arruda-Boyce	$\sigma_1 = 2\mu(\lambda - 1/\lambda^2) \sum_{i=1}^5 \frac{iC_i}{\lambda_m^{2i-2}}(\lambda^2 + 2/\lambda)^{i-1}$

نتایج

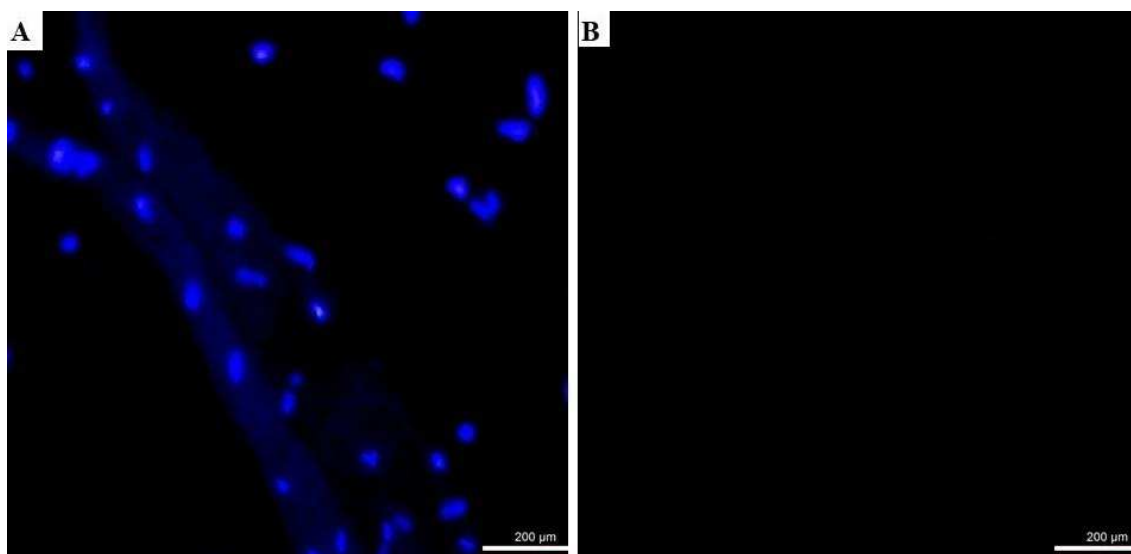
رگ و داربست محاسبه شده‌اند و می‌توان از آنها برای پیش‌بینی پاسخ مکانیکی بافت رگ و داربست تحت شرایط بارگذاری کلی استفاده کرد. ثابت‌های مواد برای هر مدل تابع چگالی انرژی کرنشی در جدول ۲ فهرست شده است. از مجموع مربعات خطا به عنوان معیار انتخاب مدل مناسب برای پیش‌بینی رفتار مواد هایپرالاستیک استفاده شده است. شکل‌های ۳ و ۴(الف) پاسخ‌های تنش برحسب نسبت کشش تک محوری را برای مدل‌های بررسی‌شده در مقایسه با نتایج آزمایشگاهی به ترتیب برای رگ و داربست نشان می‌دهند. نتیجه آزمایشگاهی رسم شده میانگین مقادیر تولید شده از همه نمونه‌ها است. در شکل‌های ۳ و ۴ (ب) تجزیه و تحلیل خطا برای هر یک از مدل‌های هایپرالاستیک نشان داده شده است.

مقایسه نتایج بافت‌شناسی داربست سلول‌زدایی شده در مقایسه با رگ دست نخورده با استفاده از رنگ-آمیزی H&E و DAPI. حذف اجزا و هسته‌های سلولی را تایید کرد. در رنگ‌آمیزی H&E، برخلاف عروق دست نخورده که هسته‌های سلولی به رنگ بنفش و سیتوپلاسم به رنگ صورتی مشاهده می‌شود (شکل ۱)، در داربست سلول‌زدایی شده هیچ‌گونه هسته سلولی قابل مشاهده نیست (شکل ۱). علاوه بر این، نتایج رنگ‌آمیزی DAPI تأیید کرد که هسته‌های سلولی در عروق سلول‌زدایی شده قابل مشاهده نیستند. در مقابل در عروق دست نخورده هسته‌ها به رنگ آبی فلورسانت دیده می‌شوند (شکل ۲). ضرایب تابع چگالی انرژی مدل‌های هایپرالاستیک پیشنهادی با استفاده از روش برازش منحنی غیرخطی بر روی نتایج آزمایشگاهی تست کشش تک محوری بافت



شکل ۱- نتایج حاصل از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئاوزین برای نمونه رگ (A) و برای نمونه داربست (B). همانطور که در تصویر دیده می‌شود در نمونه داربست هسته سلول‌ها حذف شده است.

Fig. 1. Results of hematoxylin-eosin staining for the vessel sample (A) and for the scaffold sample (B). As can be seen in the image, the cell nuclei have been removed in the scaffold sample.

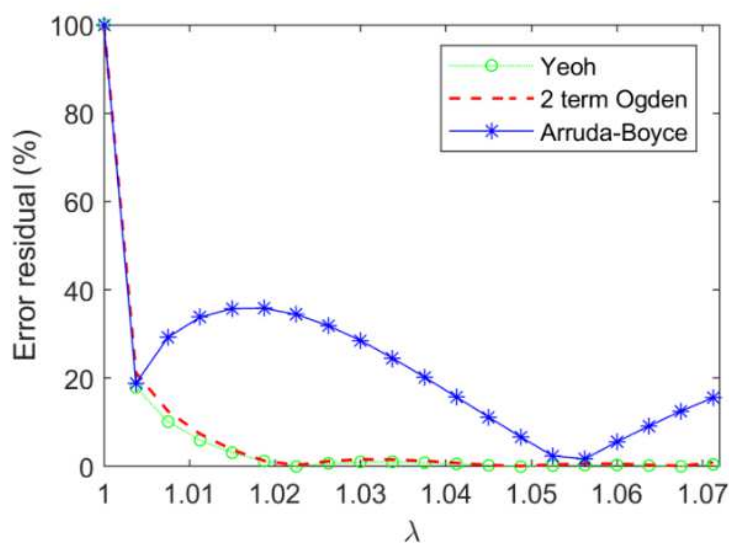


شکل ۲- نتایج حاصل از رنگ آمیزی DAPI برای نمونه رگ (A) و برای نمونه داربست (B). همانطور که در تصویر دیده می‌شود در نمونه داربست هسته‌های درخشان آبی رنگ سلول‌ها حذف شده است.

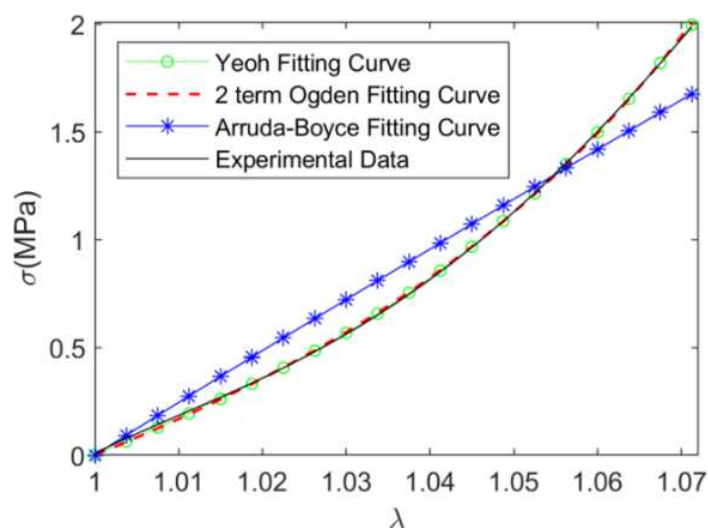
Fig. 2. Results of DAPI staining for the vessel sample (A) and for the scaffold sample (B). As can be seen in the image, the bright blue nuclei of the cells have been removed in the scaffold sample.

جدول ۲- مقدار ضرایب مدل‌های هایپرالاستیک برای رگ و داربست

Table 2. The values of the coefficients of hyperelastic models for the vessel and scaffold			
Hyperelastic models	Parameters	Vessel	Scaffold
3-Parameter Yeoh	C_{10}	2.8343	0.0443
	C_{20}	78.7228	0.0108
	C_{30}	-200.4872	-2.928×10^{-4}
	sse	0.0051	0.0023
2-Parameter Ogden	μ_1	200	4.7707×10^{-12}
	α_1	0.011	1.9119×10^{-10}
	μ_2	0.3105	0.0694
	α_2	27.3750	3.2584
	sse	0.0093	3.3348
Arruda Boyce	μ	1.6166×10^{-17}	0.1755
	λm	0.0058	2.5530
	sse	1.6620	18.7250



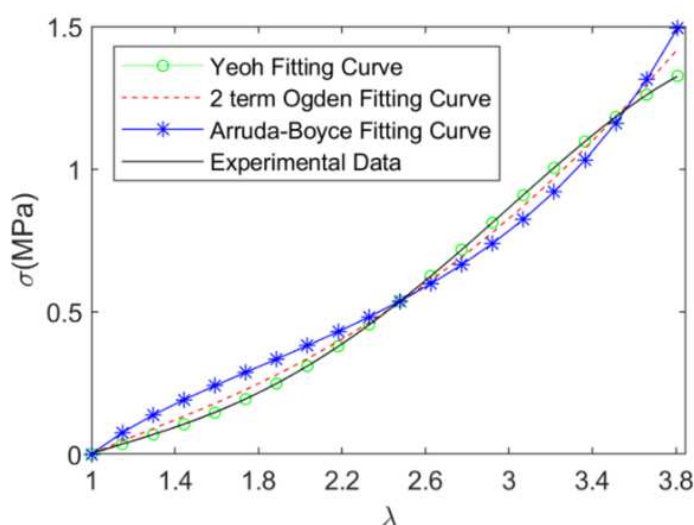
(A)



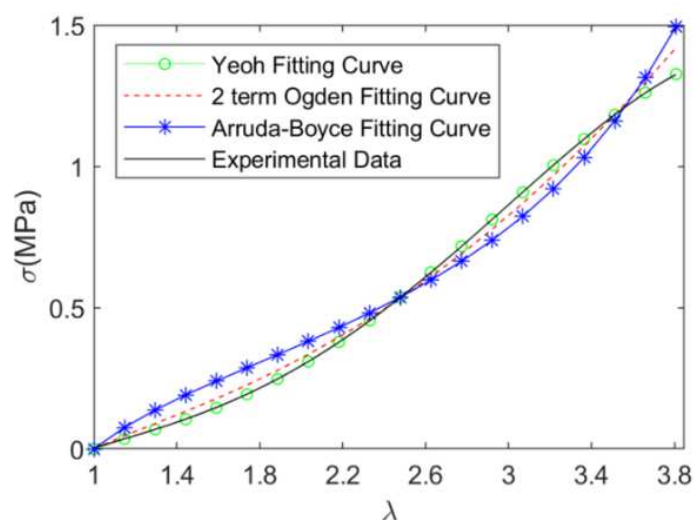
(B)

شکل ۳- مقایسه نتایج تئوری و آزمایشگاهی بدست آمده از تست کشش تک محوری و مدل‌های ساختاری هایپر الاستیک برازش شده بر آن برای رگ: A: درصد مانده خطا برای مدل‌های ساختاری، B: نمودار تنش مهندسی بر حسب نسبت کشش.

Fig. 3. Comparison of theoretical and experimental results obtained from uniaxial tensile testing and hyperelastic structural models fitted to it for the vessel: A: Residual error percentage for structural models, B: Engineering stress graph in terms of tensile ratio.



(A)



(B)

شکل ۴- مقایسه نتایج تئوری و آزمایشگاهی بدست آمده از تست کشش تک محوری و مدل‌های ساختاری هاپر الاستیک برازش شده بر آن برای داریست: A: درصد مانده خطا برای مدل‌های ساختاری، B: نمودار تنش مهندسی بر حسب نسبت کشش.

Fig. 4. Comparison of theoretical and experimental results obtained from uniaxial tensile testing and hyperelastic structural models fitted to it for scaffolding: A: Residual error percentage for structural models, B: Engineering stress diagram in terms of tensile ratio

بحث

قابلیت آن برای ادغام با بافت میزبان ضروری است. در غیر این صورت یک التهاب حاد می‌تواند باعث رد ایمپلنت شود (۴۰). در اینجا، مفهوم بازسازی بافت پدیدار می‌شود، که یک ریزمحیط ۳ بعدی بیومیمتیک نفوذ سلول‌ها، اتصال آنها و تکثیر را با کشت یک اندام مهندسی شده آسان می‌کند. طی سال‌های گذشته،

به دلیل افزایش تعداد افرادی که از بیماری‌های عروقی رنج می‌برند، از این رو، تحقیقات بر روی ایمپلنت-های عروقی مصنوعی در حال رونق می‌باشد (۳۰). با این حال، همچنان برای بیماری‌های قلبی عروقی پیشرفته، جراحی بای پس شریان درمان اولیه می‌باشد (۱۷). علاوه بر ابعاد، زیست‌سازگاری ایمپلنت و

محققان زمان و تلاش زیادی را برای ایجاد داربست‌های مناسب برای مهندسی بافت عروق خونی صرف کرده‌اند. با این حال، ساختار چند لایه ظریف و پیچیده و تنش‌های چرخه‌ای پیوسته، آن را به‌ویژه در نقاط شریان‌های کوچک چالش‌برانگیز کرده است. انواع پلیمرهای مصنوعی و طبیعی ایجاد شده با روش‌های مختلف تاکنون آزمایش شده‌اند، اما هنوز فاقد شرایط شیمیایی یا فراساختار مناسب هستند، بنابراین معمولاً نمی‌توانند مسیرهای سیگنالینگ و ریزمحیط مناسب برای اتصال و تکثیر سلولی را فراهم کنند (۱۴، ۳۶). داربست‌های سلول‌زدایی شده اخیراً با توجه به ریزساختار طبیعی خود، مورد توجه بسیاری قرار گرفته‌اند. دو روش اصلی شیمیایی و فیزیکی برای سلول‌زدایی بافت وجود دارد (۳۰). در بین تمامی روش‌های سلول‌زدایی، پروتکل‌های سلول‌زدایی شیمیایی با استفاده از مواد شوینده یکی از ساده‌ترین، ارزان‌ترین و پرکاربردترین روش‌ها هستند. مواد شوینده می‌توانند غشای سلولی و بخش‌های سلولی را مختل کنند و همچنین DNA را از پروتئین‌ها جدا کنند (۲۰). در این مطالعه، با استفاده از روش سلول‌زدایی شیمیایی، نتایج رنگ‌آمیزی H&E و DAPI حذف هسته‌های سلولی و اجزای سلولی از عروق سلول‌زدایی شده را تأیید کردند. همچنین Zhiwen Cai و همکاران در مطالعه خود، از Triton X-100 و SDS با غلظت‌های مختلف برای سلول‌زدایی عروق خوک استفاده کرده‌اند و یافته‌های آن‌ها حاکی از این بوده است که رویکرد سلول‌زدایی Triton X-100 ۰/۵ درصد برای ۲۴ ساعت همراه با SDS ۰/۲۵ درصد برای ۷۲ ساعت می‌تواند به دستیابی به عروق سلول‌زدایی با حداقل تخریب کمک کند (۱۰). با توجه به شکل‌های ۳ و ۴ (ب) می‌توان مشاهده کرد که برای هر مدل، خطاها همیشه در ناحیه کشش‌های کوچک بیشتر است. مطابق شکل‌ها مدل

آرودا-بویس قادر به پیش‌بینی رفتار غیرخطی بافت رگ و داربست تحت شرایط بارگذاری کشش تک محوری نمی‌باشد. با توجه به شکل ۳ می‌توان مشاهده کرد که تابع‌های چگالی انرژی کرنشی آگدن و یئو رفتار مشابهی دارند و هر دو تابع توانایی کافی برای پیش‌بینی رفتار بافت رگ را برای محدوده داده‌های آزمایش از خود نشان می‌دهند، چون مقدار تغییر شکل‌ها برای رگ کوچک است. با توجه به شکل ۴ می‌توان مشاهده کرد که تابع‌های چگالی انرژی کرنشی آگدن و یئو برای تغییر شکل‌های کوچک رفتار مشابهی دارند ولی برای تغییر شکل‌های بزرگ تابع یئو رفتار بهتری دارد و می‌توان گفت که مدل یئو توانایی عالی برای مدل‌سازی رفتار داربست برای کل محدوده داده‌های آزمایش از خود نشان می‌دهد. با توجه به شکل‌ها می‌توان مشاهده کرد که داربست نسبت به رگ تغییر شکل‌های بزرگتری دارد و بنابر این رفتار غیر خطی بیشتری نسبت به رگ خواهد داشت و مدل یئو که شامل ترم‌های غیرخطی مرتبه بالاتر است رفتار هایپرالاستیک غیر خطی داربست را بهتر می‌تواند پیش‌بینی کند. با توجه به نتایج ارائه شده می‌توان نتیجه گرفت که تابع چگالی انرژی کرنشی یئو برای مدل‌سازی رفتار هایپرالاستیک رگ و داربست مدل رفتاری مناسبی می‌باشد. علیرغم نتایج امیدوارکننده، مطالعه کنونی ما همچنان محدودیت‌هایی، همچون عدم ارزیابی اثرات غلظت‌های مختلف تریتون و TnBP را بر سلول‌زدایی عروق دارد. نتایج روش سلول‌زدایی شیمیایی مورد استفاده در مطالعه کنونی نشان داد که می‌تواند با موفقیت عروق گاو را سلول‌زدایی کند. در این مقاله خواص مکانیکی رگ و داربست با استفاده از ابزار تست کششی تک محوری بررسی گردید و خواص مکانیکی این مواد هایپرالاستیک مشخص شد. برای این منظور، توابع چگالی انرژی کرنش آگدن، یئو و آرودا-بویس

3. Agnieray, H., Glasson, J., Chen Q., Kaur, M., Domigan, L. 2021. Recent developments in sustainably sourced protein-based biomaterials. *Biochemical Society Transactions*, 49(2):953-964.
4. Ali, A., Hosseini, M., Sahari, B. 2010. A review of constitutive models for rubber-like materials. *American Journal of Engineering and Applied Sciences*, 3(1):232-239.
5. Arruda, E.M., Boyce, M.C. 1993. A three-dimensional constitutive model for the large stretch behavior of rubber elastic materials. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 41(2):389-412.
6. Arzanipur, Y., Abdolmaleki, A., Asadi, A., Zahri, S. 2021. Synthesis, Characterization, Evaluation of Supportive Properties, and Neuroprotective Effects of Cerium Oxide Nanoparticles as a Candidate for Neural Tissue Engineering. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*, 9(3):55-63.
7. Attard, M.M., Hunt, G.W. 2004. Hyperelastic constitutive modeling under finite strain. *International Journal of Solids and Structures*, 41(18-19):5327-5350.
8. Boulanger, P., Hayes, M. 2001. Finite-amplitude waves in Mooney-Rivlin and Hadamard materials. *Topics in finite elasticity*: Springer; p:131-167.
9. Boyce, M.C., Arruda, E.M. 2000. Constitutive models of rubber elasticity: a review. *Rubber Chemistry and Technology*, 73(3):504-23.
10. Cai, Z., Gu, Y., Xiao, Y., Wang, C., Wang, Z. 2021. Porcine carotid arteries decellularized with a suitable concentration combination of Triton X-100 and sodium dodecyl sulfate for tissue engineering vascular grafts. *Cell and Tissue Banking*, 22:277-286.
11. Celikkin, N., Rinoldi, C., Costantini, M., Trombetta, M., Rainer, A., Świąszkowski, W. 2017. Naturally derived proteins and glycosaminoglycan scaffolds

استفاده شد. از مزایای این مدل‌ها می‌توان به کلی بودن آنها و تعداد نسبتاً کم پارامترهای مواد اشاره کرد. از مجموع مربعات خطاها (SSE) به عنوان شاخصی برای تعیین مناسب‌ترین مدل استفاده شد. مشاهده شد که بافت رگ در مقایسه با داربست در مقابل کشش مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهد، خواص مکانیکی بالاتر رگ به خاطر الاستین و محتوای کلاژن موجود در دیواره رگ می‌باشد. برای رگ مدل‌های یئو و آگدن به خوبی با نتایج آزمایشگاهی برازش کردند ولی برای داربست بهترین نتایج با مدل یئو به دست آمد. تمام مدل‌های ساختاری بررسی شده در ناحیه کشش‌های کوچک دقت کمتری داشتند. مشاهده شد که برای مدل‌سازی رفتار مکانیکی رگ و داربست به سه پارامتر ماده و در برخی موارد دو پارامتر ماده نیاز است.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج نشان می‌دهد که داربست‌های حاصل از سلول‌زدایی با توجه به حفظ ترکیبات اصلی بافت مورد نظر و همچنین مقاومت مکانیکی مناسب، مدلی ایده‌آل برای کاربردهای مهندسی بافت بوده و امکان استفاده بالینی از این داربست‌ها را برای اختلالات عروق محیطی فراهم می‌کند.

منابع

1. Abbaszadeh, S., Asadi, A., Zahri, S., Abdolmaleki, A., Mahmoudi, F. 2020. Does phenytoin have neuroprotective role and affect biocompatibility of decellularized sciatic nerve scaffold? *Gene, Cell and Tissue*, 8(1):e108726.
2. Abdolmaleki, A., Ghayour, M.B., Zahri, S., Asadi, A., Behnam-Rassouli, M. 2019. Preparation of acellular sciatic nerve scaffold and its mechanical and histological properties for use in peripheral nerve regeneration. *Tehran University Medical Journal*, 77(2):115-122.

- venosus and umbilical vein. *Heart and Vessels*, 13(4):175-180.
20. Hrebikova, H., Diaz, D., Mokry, J. 2015. Chemical decellularization: a promising approach for preparation of extracellular matrix. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 159(1):12-17.
 21. Huang, H., Hsu, S. 2013. Current advances of stem cell-based approaches to tissue-engineered vascular grafts. *OA Tissue Engineering*, 1(1):2.
 22. Kelley, C.T. 1999. Iterative methods for optimization. In SIAM (Society for Industrial and Applied Mathematics Philadelphia) *Frontiers in Applied Mathematics* (Vol. 19). Philadelphia, PA: Society for Industrial and Applied Mathematics.
 23. Khajehsaeid, H., Arghavani, J., Naghdabadi, R. 2013. A hyperelastic constitutive model for rubber-like materials. *European Journal of Mechanics-A/Solids*, 38:144-151.
 24. Khalil, A.S., Bouma, B.E., Kaazempur Mofrad, M.R. 2006. A combined FEM/genetic algorithm for vascular soft tissue elasticity estimation. *Cardiovascular Engineering*, 6(3):93-102.
 25. Lee, E., Milan, A., Urbani, L., De Coppi, P., Lowdell, M.W. 2017. Decellularized material as scaffolds for tissue engineering studies in long gap esophageal atresia. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 17(5):573-584.
 26. Meaney, D.F. 2003. Relationship between structural modeling and hyperelastic material behavior: application to CNS white matter. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 1(4):279-293.
 27. Mehrabian, H., Samani, A., 2008. An iterative hyperelastic parameters reconstruction for breast cancer assessment. *Proc. SPIE 6916, Medical Imaging 2008: Physiology, Function, and Structure from* for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 78:1277-1299.
 12. Chan, X.Y., Elliott, M.B., Macklin, B., Gerecht, S. 2017. Human pluripotent stem cells to engineer blood vessels. *Engineering and Application of Pluripotent Stem Cells*, 147-168.
 13. Chen, S.G., Ugwu, F., Li W.C., Caplice, N.M., Petcu, E., Yip, S.P. 2021. Vascular tissue engineering: advanced techniques and gene editing in stem cells for graft generation. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 27(1):14-28.
 14. Dimopoulos, A., Markatos, D.N., Mitropoulou, A., Panagiotopoulos, I., Koletsis, E., Mavrilas, D. 2021. A novel polymeric fibrous microstructured biodegradable small-caliber tubular scaffold for cardiovascular tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 32:1-12.
 15. Fung, Y., Fronek, K., Patitucci, P. 1979. Pseudoelasticity of arteries and the choice of its mathematical expression. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 237(5):H620-H631.
 16. Gent, A.N. 2012. *Engineering with rubber: how to design rubber components*: Carl Hanser Verlag GmbH Co KG, 3rd Edition, 451 p.
 17. Hannan, E.L., Racz, M.J., Walford, G., Ryan, T.J., Isom, O.W., Bennett, E., 2003. Predictors of readmission for complications of coronary artery bypass graft surgery. *Jama*, 290(6):773-80.
 18. Hayashi, K. 1993. Experimental approaches on measuring the mechanical properties and constitutive laws of arterial walls. *Journal of Biomechanical Engineering*, 115(4B):481-488.
 19. Hellevik, L.R., Kiserud, T., Irgens, F., Stergiopulos, N., Hanson, M. 1998. Mechanical properties of the fetal ductus

- biomaterials. *Tissue Engineering*, 13(11):2601-2613.
36. Su, Z., Xing, Y., Wang, F., Xu, Z., Gu, Y. 2022. Biological small-calibre tissue engineered blood vessels developed by electrospinning and in-body tissue architecture. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 33(10):67.
37. Vaishnav, R.N., Young, J.T., Patel, D.J. 1973. Distribution of stresses and of strain-energy density through the wall thickness in a canine aortic segment. *Circulation Research*, 32(5):577-583.
38. Virani, S.S., Alonso, A., Aparicio, H.J., Benjamin, E.J., Bittencourt, M.S., Callaway C.W., et al. 2021; Heart disease and stroke statistics—2021 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 143(8):e254-e743.
39. Wang, L., Hu, J., Sorek ,C.E., Chen, E.Y., Ma, P.X., Yang, B. 2016; Fabrication of tissue-engineered vascular grafts with stem cells and stem cell-derived vascular cells. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 16(3):317-330.
40. Williams, D.F. 2008. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20):2941-2953.
41. Yeoh, O.H. 1993. Some forms of the strain energy function for rubber. *Rubber Chemistry and Technology*, 66(5):754-771.
42. Yi, S., Ding, F., Gong, L., Gu, X. 2017. Extracellular matrix scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Current Stem Cell Research and Therapy*, 12(3):233-246.
43. Zhao, P., Gu, H., Mi, H., Rao, C., Fu, J., Turng, L.S. 2018. Fabrication of scaffolds in tissue engineering: A review. *Frontiers of Mechanical Engineering*, 13(1):107-119.
- Medical Images, 69161C (12 March 2008), <https://doi.org/10.1117/12.770971>.
28. Ogden, R.W. 1972. Large deformation isotropic elasticity—on the correlation of theory and experiment for incompressible rubberlike solids. *Proceedings of the Royal Society of London A Mathematical and Physical Sciences*, 326(1567):565-84.
29. Ogden R.W. 1997. Non-Linear Elastic Deformations. Courier Corporation, Chelmsford.
30. Omid, H., Abdollahi, S., Bonakdar, S., Haghighipour, N., Shokrgozar, M.A., Mohammadi, J. 2023. Biomimetic vascular tissue engineering by decellularized scaffold and concurrent cyclic tensile and shear stresses. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 34(3):12.
31. Rajab, T.K., O'Malley, T.J., Tchanchaleishvili, V. 2020. Decellularized scaffolds for tissue engineering: Current status and future perspective. *Artificial Organs*, 44(10):1031-1043.
32. Rivlin, R.S., Barenblatt, G.I. 2013. Collected papers of RS Rivlin. Springer New York, 2829 p.
33. Sasso, M., Palmieri, G., Chiappini, G., Amodio, D. 2008. Characterization of hyperelastic rubber-like materials by biaxial and uniaxial stretching tests based on optical methods. *Polymer Testing*, 27(8):995-1004.
34. Schneider, K.H., Enayati, M., Grasl, C., Walter, I., Budinsky, L., Zebic, G., 2018. Acellular vascular matrix grafts from human placenta chorion: Impact of ECM preservation on graft characteristics, protein composition and in vivo performance. *Biomaterials*, 177:14-26.
35. Stegemann, J.P., Kaszuba, S.N., Rowe, S.L. 2007. Advances in vascular tissue engineering using protein-based

Research Article

The Effect of Different Doses of Organic Selenium on the Expression of Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor-Alpha Genes, and Antioxidant Status in Male Wistar Rats Under Heat Stress

Hamid Ashrafi*

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

*Corresponding author: ashrafihamid1071395@gmail.com

Received: 16 December 2024

Accepted: 6 February 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1199571

Abstract

Heat stress is one of the most significant environmental stressors negatively affecting the health and immune system performance of living organisms. Selenium, an essential nutrient, acts as a cofactor for antioxidant enzymes, providing protective effects on cells. This study aimed to investigate the effects of organic selenium on the expression of interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) genes, as well as oxidative stress markers, including malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (TAC), in laboratory rats under heat stress. In a completely randomized design, 30 male Wistar rats were randomly divided into five groups, with six rats per group. Six rats were kept at a standard temperature throughout the experiment, while the remaining rats were subjected to heat stress ($38 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 6 hours daily). The negative control group (no heat stress) and positive control group (heat stress) received a standard pellet diet without additives, while the other three groups received a standard pellet diet supplemented with 0.15, 0.30, and 0.45 mg/kg of selenium from selenium-methionine for 30 days. The results showed that heat stress significantly reduced IL-10 and TAC levels and significantly increased TNF- α and MDA levels ($p < 0.05$). Selenium supplementation significantly increased IL-10 and decreased TNF- α levels ($p < 0.05$). Additionally, selenium supplementation significantly increased TAC and reduced MDA concentrations ($p < 0.05$). Selenium doses of 0.30 and 0.45 mg/kg effectively enhanced anti-inflammatory responses by increasing IL-10 gene expression and reducing TNF- α gene expression. These doses also reduced oxidative stress by decreasing MDA concentrations and increasing TAC, thereby improving antioxidant defense. Based on these findings, selenium doses of 0.30 to 0.45 mg/kg appear optimal for improving inflammatory and antioxidant status in rats under heat stress.

Keywords: Selenium, Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor-alpha, Malon dialdehyde, Total antioxidant capacity.

اثر دوزهای مختلف سلنیوم آلی بر بیان ژن‌های اینترلوکین-۱۰، فاکتور نکروز تومور آلفا و وضعیت آنتی‌اکسیدانی در موش‌های نر نژاد ویستار تحت تنش گرمایی

حمید اشرفی*

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

*مسئول مکاتبات: ashrafihamid1071395@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۲۶

DOI: 10.60833/ascij.2025.1199571

چکیده

تنش گرمایی یکی از مهم‌ترین عوامل استرس‌زای محیطی است که تأثیرات منفی بر سلامت و عملکرد سیستم ایمنی در موجودات زنده دارد. سلنیوم یکی از عناصر ضروری در تغذیه است که به عنوان کوفاکتور آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی عمل کرده و از این طریق می‌تواند اثرات محافظتی بر سلول‌ها داشته باشد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر سلنیوم آلی بر بیان ژن‌های IL-10، TNF- α ، شاخص‌های استرس اکسیداتیو شامل مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) در موش‌های آزمایشگاهی تحت تنش گرمایی بود. در طرح کاملاً تصادفی، ۳۰ سر موش نر نژاد ویستار به طور تصادفی به پنج گروه شش‌تایی تقسیم شدند. تعداد ۶ سر موش در دمای استاندارد و بقیه موش‌ها در تنش گرمایی (دمای 38 ± 2 درجه سلسیوس به مدت ۶ ساعت در روز) قرار داده شدند. موش‌های گروه کنترل منفی (بدون تنش گرمایی) و کنترل مثبت (تنش گرمایی) پلت استاندارد بدون افزودنی و سه گروه دیگر به ترتیب پلت استاندارد به اضافه ۰/۱۵، ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم از مکمل سلنیوم-متیونین به مدت ۳۰ روز دریافت کردند. نتایج نشان داد که تنش گرمایی باعث کاهش معنی‌دار IL-10 و TAC و افزایش معنی‌دار TNF- α و MDA شد ($p < 0/05$). تیمار جیره‌ها با سلنیوم به ترتیب موجب افزایش و کاهش معنی‌دار IL-10 و TNF- α شد ($p < 0/05$). همچنین افزودن مکمل سلنیوم به جیره‌ها موجب افزایش معنی‌دار TAC و کاهش معنی‌دار غلظت MDA شد ($p < 0/05$). مکمل سلنیوم در دوزهای ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی‌گرم به‌طور موثری پاسخ‌های ضدالتهابی را از طریق افزایش بیان ژن IL-10 و کاهش بیان ژن TNF- α تقویت می‌کند. همچنین، این دوزها با کاهش غلظت MDA و افزایش TAC، استرس اکسیداتیو را کاهش داده و دفاع آنتی‌اکسیدانی را بهبود می‌بخشند. بنابر نتایج، دوزهای ۰/۳۰ تا ۰/۴۵ میلی‌گرم سلنیوم برای بهبود وضعیت التهابی و آنتی‌اکسیدانی در موش‌های تحت تنش گرمایی بهینه به نظر می‌رسد.

کلمات کلیدی: سلنیوم، اینترلوکین-۱۰، فاکتور نکروز تومور آلفا، مالون‌دی‌آلدئید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل.

مقدمه

می‌شود، بلکه با ایجاد استرس اکسیداتیو، آسیب‌های سلولی را نیز به دنبال دارد (۲۲). در شرایط تنش گرمایی، تولید رادیکال‌های آزاد افزایش یافته و سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن تحت فشار قرار می‌گیرد. این

تنش گرمایی یکی از مهم‌ترین چالش‌های محیطی است که می‌تواند تأثیرات منفی قابل توجهی بر سلامت و عملکرد حیوانات داشته باشد. این شرایط نه تنها موجب کاهش کارایی سیستم ایمنی و افزایش التهاب

وضعیت می‌تواند منجر به آسیب به DNA، پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی شود که در نهایت عملکرد طبیعی سلول‌ها و بافت‌ها را مختل می‌کند (۲۶). در این میان، اینترلوکین-۱۰ (IL-10) و فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α) دو سیتوکین کلیدی هستند که نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های التهابی ایفا می‌کنند. IL-10 به‌عنوان یک سیتوکین ضدالتهابی، موجب کاهش التهاب و تعدیل پاسخ ایمنی می‌شود، در حالی که TNF- α یک سیتوکین پیش‌التهابی است که در شرایط استرس‌زا، مانند تنش گرمایی، افزایش می‌یابد و می‌تواند به آسیب‌های بافتی و التهاب سیستمیک منجر شود. تعادل میان این دو سیتوکین برای حفظ سلامت و عملکرد طبیعی بدن حیاتی است (۷). از سوی دیگر، سلیوم یک عنصر کمیاب ضروری است که نقش مهمی در عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی و تنظیم بیان ژن‌ها ایفا می‌کند. سلیوم به‌عنوان یکی از اجزای کلیدی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر گلوکاتیون پراکسیداز و تیوردوکسین ردوکتاز، به خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و کاهش استرس اکسیداتیو کمک می‌نماید (۱۸). افزون بر این، سلیوم از طریق تعدیل مسیرهای سیگنالینگ التهابی نظیر NF- κ B و MAPK قادر به تنظیم بیان ژن‌های التهابی است (۱۴). با توجه به نقش سلیوم در تعدیل التهاب و کاهش استرس اکسیداتیو، این مطالعه به بررسی تأثیر سلیوم آلی بر بیان ژن‌های IL-10 و TNF- α و نیز وضعیت آنتی‌اکسیدانی در موش‌های تحت تنش گرمایی پرداخته است. هدف اصلی این تحقیق، ارزیابی توانایی سلیوم آلی در کاهش التهاب و بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در شرایط تنش گرمایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در حیوان‌خانه آزمایشگاه رازی، واقع در واحد علوم و تحقیقات، انجام شد. تمامی مراحل

جابجایی، مراقبت، آزمایش و نمونه‌برداری از حیوانات مطابق با دستورالعمل‌های آزمایشگاه رازی و با تأیید معاونت پژوهشی واحد علوم و تحقیقات صورت گرفت.

حیوانات مورد استفاده: این مطالعه به‌صورت تجربی و با استفاده از مدل حیوانی (موش صحرایی) انجام شد. موش‌های نر نژاد ویستار از مؤسسه سرم‌سازی کرج تهیه شدند و در قفس‌های بزرگ (۶ موش در هر قفس) با بستر پوسته برنج اتوکلاو شده نگهداری شدند. برای سازگاری با محیط، موش‌ها به‌مدت یک هفته در حیوان‌خانه نگهداری شدند و دسترسی آزاد به غذای پلت استاندارد و آب آشامیدنی داشتند. شرایط محیطی در دوره سازگاری شامل دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰ درصد و چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود.

در یک طرح کاملاً تصادفی، ۳۰ سر موش نر نژاد ویستار ۸ هفته‌ای با وزن 22 ± 2 گرم به‌صورت تصادفی به پنج گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه اول (شاهد منفی) در شرایط طبیعی و بدون تنش گرمایی نگهداری شد. گروه دوم (شاهد مثبت) تحت تنش گرمایی (دمای 38 ± 2 درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶ ساعت در روز) قرار گرفت، اما مکمل سلیوم دریافت نکرد. سه گروه دیگر، علاوه بر تنش گرمایی، به‌ترتیب دوزهای ۰/۱۵، ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی‌گرم سلیوم آلی از طریق خوراک دریافت کردند. شاخص دما-رطوبت با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۴).

$$THI = T - (0.55 - 0.0055 \times RH) \times (T - 14.5)$$

که در این فرمول T دما بر حسب درجه سلسیوس و RH رطوبت نسبی بر حسب درصد است. طی مدت تنش گرمایی شاخص دما-رطوبت $31/54$ بود که نشان دهنده شرایط تنش گرمایی شدید بود.

گروه‌های آزمایشی: موش‌های گروه کنترل منفی و کنترل مثبت، پلت استاندارد بدون افزودنی دریافت

اکسیدانی کل سرم نیز به روش FRAP تعیین گردید (۶).

آنالیز بیان ژن‌های اینترلوکین ۱۰ و فاکتور نکروز تومور آلفا: نمونه‌های خون جمع‌آوری‌شده از موش‌های صحرایی بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان استخراج mRNA کل در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. استخراج mRNA کل با استفاده از کیت (Qiagen RNeasy® Mini, Germany, Hilden) و مطابق دستورالعمل سازنده انجام شد. تمامی مراحل مولکولی در شرایط استریل و زیر هود بیولوژیک صورت گرفت. mRNA استخراج‌شده در دمای ۷۵- درجه سلسیوس ذخیره شد تا برای سنتز cDNA استفاده شود. سنتز cDNA با بهره‌گیری از کیت سنتز cDNA شرکت BioNeer (سئول، کره جنوبی) و طبق پروتکل ارائه‌شده توسط سازنده انجام شد. این کیت شامل تمام مواد لازم برای سنتز cDNA بود. توالی ژن‌های IL-10, TNF- α و GAPDH از پایگاه داده‌های ژنی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) و با استناد به توالی‌های گزارش‌شده قبلی استخراج شد (۲۵). ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع (خانه‌دار) برای نرمال‌سازی استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار Primer Express طراحی و توسط شرکت BioNeer (سئول، کره جنوبی) سنتز شدند. مشخصات پرایمرهای سیتوکین‌ها و ژن مرجع در جدول ۱ ارائه شده است. تجزیه و تحلیل تولید و منحنی ذوب با استفاده از یک سیستم Real-Time PCR (Applied Bio systems, Foster City, CA) انجام شد. شرایط چرخه حرارتی شامل فعال سازی آنزیم در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ چرخه واسرشتی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس برای ۱۵ ثانیه و در دمای ۵۶ درجه سلسیوس برای ۲۰ ثانیه ذوب پرایمری و

کردند و سه گروه دیگر، به ترتیب پلت استاندارد همراه با ۰/۱۵، ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی گرم سلیوم به ازای هر کیلوگرم ماده خشک از مکمل سلیوم-متیونین را به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند. پلت استاندارد حاوی ۰/۰۵ میلی گرم عنصر سلیوم در هر کیلوگرم ماده خشک بود. برای تهیه پلت حاوی مکمل سلیوم-متیونین، ابتدا پلت‌های استاندارد آسیاب شد و پس از تعیین مقدار ماده خشک، مقدار مورد نیاز از مکمل سلیوم-متیونین به آن افزوده شد. سپس مخلوط به وسیله دستگاه پلت‌ساز سرد، مجدداً به شکل پلت درآمد. برای دو گروه کنترل نیز پلت‌ها به همان روش آسیاب و دوباره تهیه شدند تا اثرات احتمالی فرآیند تهیه خوراک بر بافت فیزیکی و ترکیب شیمیایی، در بین تمام گروه‌ها یکنواخت باشد (۲).

نمونه‌گیری خون: در پایان مطالعه، نمونه‌گیری خون از بزرگ سیاهرگ زیرین موش‌های صحرایی انجام شد. موش‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. پس از باز کردن حفره شکمی، ۱۰ میلی لیتر خون از بزرگ سیاهرگ زیرین با استفاده از سرنگ استریل جمع‌آوری شد. از این مقدار، ۵ میلی لیتر در لوله‌های بدون ماده ضد انعقاد ریخته شد و سرم آن با سانتریفیوژ (۱۵۰۰ x g به مدت ۱۰ دقیقه) جدا شد. سرم‌های حاصل در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی نگهداری شدند. باقیمانده نمونه خون (۵ میلی لیتر) در لوله‌های استریل حاوی هپارین جمع‌آوری و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد، سپس تا زمان انجام آزمایش‌های بیان ژن در دمای ۷۰- درجه سلسیوس ذخیره شد (۱۶).

اندازه‌گیری فراسنج‌های بیوشیمیایی خون: سطوح سرمی مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدی با استفاده از روش تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری شد (۸). ظرفیت آنتی

انجام شد. پیش از آنالیز واریانس، برای ارزیابی نرمال بودن داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده گردید. در صورت لزوم، نرمال‌سازی داده‌ها با استفاده از تبدیل Box-Cox انجام شد. داده‌های نرمال‌شده در قالب طرح کاملاً تصادفی، با استفاده از آنالیز واریانس مناسب جهت تعیین اثر تیمارها بر متغیرهای مورد بررسی، تحلیل شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن صورت گرفت. تفاوت‌ها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار تلقی شدند.

گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه انجام شد. برای نرمال سازی، GADPH به عنوان ژن خانه دار و از بیان ژن هدف در گروه شاهد به عنوان شاهد خارجی استفاده شد. نسبت بیان نسبی ژن‌های IL-10 و TNF- α به عنوان ژن‌های هدف به ژن GADPH بر اساس روش Livak and Schmittgen (2001) نرمال شد (۱۵).

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از رویه مدل خطی تعمیم‌یافته در نرم‌افزار SAS برای ویندوز، نسخه ۹/۴ (SAS Institute Inc., Cary, NC)

جدول ۱- مشخصات پرایمر سیتوکین‌ها و ژن مرجع برای Real-time PCR در موش‌ها

Table 1. Primer characteristics of cytokines and reference gene for real-time PCR amplification

Genes	Primer Sequence (5' - 3')	Amplicon size (bp)
Interleukin-10	F: ATGGGAAGGAATTTTGGGC R: TCAGCGTTTATGTCTCTGAG	150
Tumor necrosis factor alpha	F: AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC R: TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC	180
GADPH	F: ATCACTGCCACCCAGAAGACT R: CATGCCAGTGAGCTTCCCGTT	140

F=Forward, R=Reverse, GADPH=Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase

نتایج

بیان در تیمار حاوی ۰/۱۵ میلی‌گرم سلینیوم ثبت شد. به‌طور کلی، نتایج نشان‌دهنده روند افزایشی بیان ژن IL-10 با افزایش سطح مکمل سلینیوم بود. بیان ژن فاکتور نکروز تومور آلفا: داده‌های مربوط به بیان ژن TNF- α در جدول ۲ ارائه شده است. تحلیل آماری نشان داد که بین تیمارهای مختلف از نظر بیان ژن TNF- α این ژن تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p < 0/05$). بیان ژن TNF- α در گروه شاهد مثبت به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد منفی بود ($p < 0/05$). موش‌های دریافت‌کننده مکمل سلینیوم در مقایسه با گروه شاهد مثبت، بیان پایین‌تری از این ژن و در مقایسه با گروه شاهد منفی، بیان بالاتری داشتند ($p < 0/05$). همچنین، بین تیمارهای حاوی مکمل سلینیوم تفاوت معنی‌داری در بیان ژن TNF- α مشاهده شد ($p < 0/05$). بالاترین میزان بیان این ژن در تیمار حاوی ۰/۱۵ میلی‌گرم

بیان ژن اینترلوکین-۱۰: داده‌های مربوط به بیان ژن IL-10 در جدول ۲ ارائه شده است. تحلیل آماری نشان داد که بین تیمارهای مختلف از نظر بیان ژن IL-10 تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p < 0/05$). بیان IL-10 در گروه شاهد مثبت به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد منفی بود ($p < 0/05$). افزودن مکمل سلینیوم باعث افزایش بیان این ژن شد، به‌طوری‌که دوزهای ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم خوراک بیشترین افزایش را نشان دادند. بیان ژن IL-10 در موش‌های تغذیه‌شده با سطوح مختلف مکمل سلینیوم به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد مثبت و پایین‌تر از گروه شاهد منفی بود ($p < 0/05$). همچنین، بین تیمارهای حاوی مکمل سلینیوم تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0/05$), به‌گونه‌ای که بالاترین بیان ژن در تیمار حاوی ۰/۳۰ میلی‌گرم سلینیوم و کمترین

MDA شد، به گونه‌ای که کمترین غلظت MDA در تیمار حاوی ۰/۴۵ میلی گرم سلیوم مشاهده شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: داده‌های مربوط به TAC سرم در جدول ۳ ارائه شده است. تحلیل آماری نشان داد که بین تیمارهای مختلف از نظر ظرفیت TAC تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p < 0/05$). بالاترین ظرفیت TAC در گروه شاهد منفی و پایین‌ترین آن در گروه شاهد مثبت مشاهده شد. موش‌های دریافت‌کننده مکمل سلیوم ظرفیت TAC بالاتری نسبت به گروه شاهد مثبت داشتند ($p < 0/05$)، به طوری که تیمار حاوی ۰/۴۵ میلی گرم سلیوم بالاترین ظرفیت را نشان داد. به طور کلی، نتایج حاکی از روند افزایشی TAC با افزایش سطح مکمل سلیوم بود.

سلیوم و کمترین میزان در تیمار حاوی ۰/۴۵ میلی گرم سلیوم ثبت شد. به طور کلی، نتایج نشان‌دهنده روند کاهشی بیان ژن TNF- α با افزایش سطح مکمل سلیوم بود. غلظت مالون‌دی‌آلدئید سرم: داده‌های مربوط به غلظت MDA سرم در جدول ۳ ارائه شده است. تحلیل آماری نشان داد که غلظت MDA در گروه شاهد مثبت به طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد منفی و سایر تیمارهای آزمایشی بود ($p < 0/05$). در میان تیمارهای دریافت‌کننده سلیوم، موش‌های تیمار ۰/۱۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم خوراک، غلظت MDA سرم بالاتری نسبت به تیمارهای ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی گرم داشتند ($p < 0/05$). به طور کلی، افزودن مکمل سلیوم به جیره باعث کاهش معنی‌دار غلظت

جدول ۲- بیان نسبی ژن‌های IL-10 و TNF- α در موش‌های دریافت‌کننده دوزهای مختلف سلیومTable 2. The relative gene expression of IL-10 and TNF- α of Mice receiving different doses of selenium

Parameters	Negative control	Positive control	Selenium supplement (mg/kg diet dry matter)			SEM
			0.15	0.30	0.45	
Relative gene expression of IL-10	1 ^b	0.61 ^d	0.88 ^c	1.29 ^a	1.23 ^a	0.024
Relative gene expression of TNF- α	1 ^d	2.56 ^a	2.04 ^b	1.47 ^c	1.38 ^c	0.029

a-d در هر سطر، مقادیر میانگین که دارای حروف مشترک هستند، تفاوت معنی‌داری ندارند ($p > 0/05$)a-d Within rows, mean values with common letter(s) are not different ($p > 0.05$)

جدول ۳- غلظت مالون‌دی‌آلدئید سرم و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل موش‌های دریافت‌کننده دوزهای مختلف سلیوم

Table 3. The concentration of malondialdehyde and total antioxidant capacity in mice receiving different doses of selenium

Parameters	Negative control	Positive control	Selenium supplement (mg/kg diet dry matter)			SEM
			0.15	0.30	0.45	
Malondialdehyde, nmol/dL	2.33 ^d	3.89 ^a	3.33 ^b	2.79 ^c	2.71 ^c	0.031
Total antioxidant capacity, mmol Trolox equivalent/L	2.71 ^a	1.31 ^d	2.06 ^c	2.43 ^b	2.49 ^b	0.025

a-d در هر سطر، مقادیر میانگین که دارای حروف مشترک هستند، تفاوت معنی‌داری ندارند ($p > 0/05$)a-d Within rows, mean values with common letter(s) are not different ($p > 0.05$)

بحث

پاسخ‌های التهابی و پیشگیری از آسیب‌های ناشی از التهاب ایفا می‌کند (۱). افزایش بیان این ژن در گروه‌های دریافت‌کننده سلیوم احتمالاً به دلیل توانایی سلیوم در فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ

نتایج این مطالعه نشان داد که سلیوم آلی به طور معنی‌داری موجب افزایش بیان ژن IL-10 در موش‌های تحت تنش گرمایی شد. IL-10 یک سیتوکین ضدالتهابی است که نقش کلیدی در تعدیل

ضدالتهابی، به‌ویژه مسیر JAK-STAT است (۱۰). در این مسیر، فسفریلاسیون STAT3 منجر به افزایش رونویسی ژن IL-10 می‌شود (۲۳). بنابراین، این مکانیسم می‌تواند توضیح دهد که چرا مصرف سلنیوم آلی سبب افزایش بیان این ژن در شرایط تنش گرمایی شده است. Liu و همکاران (۲۰۲۰) نیز گزارش کردند که سلنیوم آلی باعث افزایش بیان IL-10 در موش‌های تحت تنش گرمایی می‌شود (۱۴). نتایج مطالعه‌ی حاضر با یافته‌های آنان هم‌راستا بوده و بیانگر آن است که سلنیوم می‌تواند به‌عنوان یک عامل ضدالتهابی مؤثر عمل کند. عملکرد ضدالتهابی سلنیوم ممکن است به واسطه‌ی وجود سلنوپروتئین‌هایی نظیر گلوکاتینون پراکسیداز باشد که با کاهش فرآیندهای اکسیداتیو ناشی از التهاب در بافت کبد، از بروز آسیب‌های التهابی جلوگیری می‌کنند (۱۸). از سوی دیگر، نتایج این مطالعه نشان داد که سلنیوم آلی به‌طور معناداری موجب کاهش بیان ژن TNF- α در موش‌های تحت تنش گرمایی شد. TNF- α یک سیتوکین پیش‌التهابی است که در شرایط تنش گرمایی افزایش می‌یابد و می‌تواند منجر به بروز التهاب سیستمیک و آسیب‌های بافتی شود (۹). افزایش بیان این ژن در گروه شاهد مثبت احتمالاً به دلیل قرار گرفتن موش‌ها در شرایط تنش گرمایی و نبود مکمل سلنیوم در جیره غذایی آن‌ها بوده است. در این شرایط، وقوع تنش اکسیداتیو، بیان سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند TNF- α را تحریک می‌کند (۱، ۲۰). در گروه‌هایی که جیره آن‌ها با سلنیوم آلی مکمل شده بود، بیان ژن TNF- α کاهش یافت. این کاهش می‌تواند ناشی از توانایی سلنیوم در مهار مسیرهای سیگنال‌دهی التهابی نظیر مسیر NF- κ B باشد (۱۴). سلنیوم با مهار فعال‌سازی NF- κ B از افزایش بیان ژن TNF- α جلوگیری می‌کند. NF- κ B یک فاکتور رونویسی کلیدی است که در پاسخ به محرک‌های التهابی فعال شده و موجب افزایش بیان

ژن‌های التهابی از جمله TNF- α می‌شود (۱۱). در شرایط طبیعی این فاکتور توسط پروتئینی به نام I κ B مهار می‌شود. اما در پاسخ به سیگنال‌های التهابی، I κ B فسفریله شده و تخریب می‌شود و در نتیجه NF- κ B آزاد شده و به هسته سلول منتقل می‌شود. سلنیوم با مهار فسفریلاسیون و تخریب I κ B از انتقال NF- κ B به هسته ممانعت کرده و در نتیجه بیان TNF- α کاهش می‌یابد (۹). Liu و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که سلنیوم آلی با مهار فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی MAPK و NF- κ B از افزایش بیان TNF- α در موش‌های تحت تنش گرمایی جلوگیری می‌کند (۱۳). همچنین Zheng و همکاران (۲۰۲۲) نیز کاهش بیان TNF- α را در پاسخ به سلنیوم آلی در شرایط تنش گرمایی گزارش کردند (۲۴). یافته‌های حاضر با این نتایج هم‌راستا بوده و مؤید آن است که سلنیوم می‌تواند نقش مؤثری در مهار پاسخ‌های التهابی ایفا کند. به‌طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که مصرف مکمل سلنیوم موجب کاهش سیتوکین‌های پیش‌التهابی TNF- α و افزایش سیتوکین‌های ضدالتهابی نظیر IL-10 در موش‌های تحت تنش گرمایی می‌شود. نتایج مشابهی توسط Tsuji و همکاران (۲۰۱۵) نیز گزارش شد؛ آن‌ها دریافتند که افزایش سطوح مکمل سلنیوم در جیره غذایی باعث کاهش TNF- α و افزایش بیان IL-10 می‌شود (۲۱). این اثرات احتمالاً ناشی از نقش سلنیوم در پیشگیری از آسیب اکسیداتیو به سلول‌های ایمنی است. تنش گرمایی با تحریک سلول‌های ایمنی، موجب افزایش تولید TNF- α می‌شود که بر عملکرد ایمنی تأثیر منفی می‌گذارد (۱). مطالعات همچنین نشان داده‌اند که مکمل سلنیوم آلی می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی بیان ژن سلنوفسفات سنتتاز ۲ را در بخش‌های مختلف روده‌ی خوک افزایش دهد. این سلنوپروتئین عمدتاً در سنتز سلنیوم فسفات نقش داشته و در ساخت سایر سلنوپروتئین‌ها

مشارکت دارد. در نتیجه، بیان سایر سلنوپروتئین‌ها نیز افزایش یافته، که این امر منجر به کاهش سطح التهاب سیستمیک و بهبود عملکرد ایمنی می‌شود (۱۲). نتایج این مطالعه نشان داد که سطح MDA به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در گروه شاهد مثبت به طور معنی‌داری افزایش یافته است که نشان‌دهنده وقوع تنش اکسیداتیو در این گروه می‌باشد. در مقابل، میزان MDA در گروه‌های دریافت‌کننده سلنیوم آلی به طور معنی‌داری کاهش یافت. MDA محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها است و افزایش آن نشان‌دهنده آسیب به غشای سلولی ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۲۴). کاهش سطح این ترکیب در گروه‌های مکمل‌شده با سلنیوم احتمالاً ناشی از افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر گلوکاتایون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز بوده است (۱۷). سلنیوم به عنوان یک عنصر ضروری در ساختار گلوکاتایون پراکسیداز، نقش کلیدی در خنثی‌سازی پراکسید هیدروژن و پراکسیدهای لیپیدی ایفا می‌کند. همچنین، این عنصر با افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز موجب تبدیل سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و سپس بی‌اثر شدن آن توسط گلوکاتایون پراکسیداز می‌گردد (۲۰). مطالعات قبلی از جمله تحقیق Staneviciene و همکاران (۲۰۲۲) نیز کاهش سطح MDA در پاسخ به سلنیوم آلی در شرایط تنش گرمایی را تأیید کرده‌اند (۱۹). این نتایج هم‌راستا با یافته‌های ما نشان می‌دهند که سلنیوم می‌تواند با تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در برابر تنش اکسیداتیو از سلول‌ها محافظت کند. همچنین، در این مطالعه، میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (FRAP) در گروه‌های دریافت‌کننده سلنیوم به طور معنی‌داری افزایش یافت. FRAP به عنوان شاخصی برای ارزیابی توانایی کلی بدن در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد مطرح است (۲۴). افزایش FRAP می‌تواند نشان‌دهنده بهبود وضعیت

آنتی‌اکسیدانی بدن در نتیجه مصرف سلنیوم باشد. این افزایش احتمالاً به دلیل بالا رفتن سطح گلوکاتایون و سایر آنتی‌اکسیدان‌های درون‌سلولی در اثر تحریک آنزیم‌های سنتزکننده آن‌ها توسط سلنیوم می‌باشد (۳). گلوکاتایون یکی از مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی داخل سلولی است که نقش حیاتی در حفظ تعادل اکسیداتیو دارد. سلنیوم با فعال‌سازی آنزیم‌هایی مانند گلوکاتایون پراکسیداز، تیوردوکسین ردوکتاز و سایر سلنوپروتئین‌ها، از طریق مکانیسم‌های دفاعی ذاتی تشکیل رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی را مهار می‌کند (۱۸). مطالعه Aderao و همکاران (۲۰۲۳) نیز نشان داد که مصرف سلنیوم آلی موجب افزایش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در موش‌های تحت تنش گرمایی می‌شود (۱). این یافته‌ها نیز با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی داشته و بر نقش محافظتی سلنیوم به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مؤثر تأکید دارند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تنش گرمایی با کاهش معنی‌دار بیان ژن اینترلوکین-۱۰ و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، و افزایش بیان ژن فاکتور نکروز تومور آلفا و غلظت مالون‌دی‌آلدئید، موجب بروز پاسخ‌های التهابی و استرس اکسیداتیو در موش‌های نر نژاد ویستار شد. استفاده از سلنیوم آلی در دوزهای ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی‌گرم/کیلوگرم ماده خشک جیره، با افزایش بیان ژن اینترلوکین-۱۰ و کاهش بیان فاکتور نکروز تومور آلفا، به طور مؤثری پاسخ‌های ضدالتهابی را تقویت نمود. همچنین، این دوزها با کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به تعدیل استرس اکسیداتیو و بهبود توان دفاع آنتی‌اکسیدانی کمک کردند. بر این اساس، مکمل‌یاری با سلنیوم آلی در دوزهای ۰/۳۰ تا ۰/۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به عنوان یک راهکار تغذیه‌ای مؤثر برای

supplementation on antioxidant indices and metabolism-related hormones in rats exposed to heat stress. *Iranian Journal of Biological Sciences*, 17(4):35-47.

6. Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1):70-76.

7. Boshtam, M., Asgary, S., Kouhpayeh, S., Shariati, L., Khanahmad, H., 2017. Aptamers against pro- and anti-inflammatory cytokines: A review. *Inflammation*, 40(1):340-349.

8. Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 186:421-431.

9. Guo, H., Li, M., Liu, H., 2022. Selenium-rich yeast peptide fraction ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in mice by inhibiting inflammation via MAPK and NF- κ B signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4):2112.

10. He, K., Tang, Q., Gong, M., Yang, S., Chen, X., Zhu, H., Liu, D., Huang, B., 2020. A transcriptomic study of selenium against liver injury induced by beta-cypermethrin in mice by RNA-seq. *Functional and Integrative Genomics*, 20(3):343-353.

11. Komáromyová, M., Mravčáková, D., Petrič, D., Kucková, K., Babják, M., Dolinská, M.U., Königová, A., Maďarová, M., Pruszyńska-Oszmałek, E., Cieslak, A., Čobanová, K., Váradyová, Z., Várady, M., 2021. Effects of medicinal plants and organic selenium against ovine haemonchosis. *Animals*, 11(5):1319.

12. Li, Z., Dong, Y., Chen, S., Jia, X., Jiang, X., Che, L., Lin, Y., Li, J., Feng, B., Fang, Z., Zhuo, Y., Wang, J., Xu, H., Wu, D., Xu, S., 2021. Organic selenium increased gilts antioxidant capacity, immune function, and changed intestinal

کاهش اثرات منفی تنش گرمایی و ارتقاء عملکرد سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی در شرایط تنش‌زا پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، به پاس تصویب طرح پژوهشی و فراهم نمودن امکانات آزمایشگاه رازی برای انجام این تحقیق، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Aderao, G.N., Jadhav, S.E., Pattanaik, A.K., Gupta, S.K., Ramakrishnan, S., Loksha, E., Chaudhary, P., Vaswani, S., Singh, A., Panigrahi, M., Dutta, N., Singh, G., 2023. Dietary selenium levels modulates antioxidant, cytokine and immune response and selenoproteins mRNA expression in rats under heat stress condition. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 75:127105.
2. Almeida, L.M., Bassi, L.S., Santos, R.O., Orlando, U.A., Maiorka, A., Oliveira, S.G., 2021. Effect of feed form and heat processing on the growth performance of growing and finishing pigs. *Livestock Science*, 245:104430.
3. Antunović, Z., Novoselec, J., Klir Šalavardić, Ž., Steiner, Z., Šperanda, M., Jakobek Barron, L., Ronta, M., Pavić, V., 2022. Influence of red corn rich in anthocyanins on productive traits, blood metabolic profile, and antioxidative status of fattening lambs. *Animals*, 12(5):612.
4. Asghari, M., Ghalhari, G.F., Pirposhteh, E.A., Dehghan, S.F., 2022. Spatio-temporal evolution of the thermo-hygro-metric index (THI) during cold seasons: A trend analysis study in Iran. *Sustainability*, 14(24):16774.
5. Ashrafi, H., Sadeghi, A.A., Chamani, M., 2023. Effect of selenium

20. Surai, P.F., 2021. Organic selenium vs. its combination with sodium selenite in poultry nutrition: Food for thoughts. *Poultry Science*, 100(10):101311.
21. Tsuji, P.A., Carlson, B.A., Anderson, C.B., Seifried, H.E., Hatfield, D.L., Howard, M.T., 2015. Dietary selenium levels affect selenoprotein expression and support the interferon- γ and IL-6 immune response pathways in mice. *Nutrients*, 7(8):6529-6549.
22. Wang, W., Kang, R., Liu, M., Wang, Z., Zhao, L., Zhang, J., Huang, S., Ma, Q., 2022. Effects of different selenium sources on the laying performance, egg quality, antioxidant, and immune responses of laying hens under normal and cyclic high temperatures. *Animals*, 12(8):1006.
23. Yang, J., Li, H., Hao, Z., Jing, X., Zhao, Y., Cheng, X., Ma, H., Wang, J., Wang, J., 2022. Mitigation effects of selenium nanoparticles on depression-like behavior induced by fluoride in mice via the JAK2-STAT3 pathway. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 14(3):3685-3700.
24. Zheng, Y., Zhao, Y., He, W., Wang, Y., Cao, Z., Yang, H., Wang, W., Li, S., 2022. Novel organic selenium source hydroxy-selenomethionine counteracts the blood-milk barrier disruption and inflammatory response of mice under heat stress., *Frontiers in Immunology*, 13:1054128.
25. Zhu, X., Liu, Y., Xu, N., Ai, X., Yang, Y., 2023. Molecular characterization and expression analysis of IL-10 and IL-6 in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Pathogens*, 12(7):886.
26. Zoidis, E., Seremelis, I., Kontopoulos, N., Danezis, G.P., 2018. Selenium-dependent antioxidant enzymes: Actions and properties of selenoproteins. *Antioxidants*, 7(5):66.
13. Liu, J., Wang, S., Zhang, Q., Li, X., Xu, S., 2020. Selenomethionine alleviates LPS-induced chicken myocardial inflammation by regulating the miR-128-3p-p38 MAPK axis and oxidative stress. *Metallomics*, 12(1):54-64.
14. Liu, K., Ding, T., Fang, L., Cui, L., Li, J., Meng, X., Zhu, G., Qian, C., Wang, H., Li, J., 2020. Organic selenium ameliorates *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in rats by inhibiting the activation of NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Frontiers in Veterinary Science*, 7:443.
15. Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4):402-408.
16. Luan, Y., Zhao, J., Yao, H., Zhao, X., Fan, R., Zhao, W., Zhang, Z., Xu, S., 2016. Selenium deficiency influences the mRNA expression of selenoproteins and cytokines in chicken erythrocytes. *Biological Trace Element Research*, 171(2):427-436.
17. Meng, T., Liu, Y.L., Xie, C.Y., Zhang, B., Huang, Y.Q., Zhang, Y.W., Yao, Y., Huang, R., Wu, X., 2019. Effects of different selenium sources on laying performance, egg selenium concentration, and antioxidant capacity in laying hens. *Biological Trace Element Research*, 189(2):548-555.
18. Pecoraro, B.M., Leal, D.F., Frias-De-Diego, A., Browning, M., Odle, J., Crisci, E., 2022. The health benefits of selenium in food animals: A review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13(1):58.
19. Staneviciene, I., Sulinskiene, J., Sadauskiene, I., Liekis, A., Ruzgaite, A., Naginiene, R., Baranauskiene, D., Simakauskiene, V., Krusnauskas, R., Viezeliene, D., 2022. Effect of selenium on the iron homeostasis and oxidative damage in brain and liver of mice. *Antioxidants*, 11(7):1216.



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

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

Content

Effect of Different Levels of Dietary Guanidinoacetic Acid Supplementation on Carcass Traits, Some Blood Biochemical, Liver Enzyme Activities, Intestinal Microbial Population and Morphology in Broiler Japanese Quails	1
Reza Alipour Filabadi, Mostafa Faghani, Farshid Kheiri	
Study of Secretory Urography and Anatomy of the Urinary Tract in Sarabi Dog	11
Sajad Khoda ve Ghanon, Siamak Alizadeh, Moahammadreza Hosseini	
Recognition the Appearance and Production Characteristics of Native Lorestan Goats	25
Alireza Chegeni, Behrouz Yarahmadi, Mohsen Mohammadi Saei	
Study of Heavy Metals in Farmed Rainbow Trout in Sousan-e Sorkhab Andika	35
Valid Chenaneh, Reza Salighehzadeh, Mohsen Pournia, Marjan Mosafer	
The Role of miR-143 in Regulating Inflammation and Pulmonary Fibrosis Induced by Mustard Gas: Therapeutic Potential and Clinical Applications	45
Atieh Tavakoli, Nasrin Karimi, Mohammad Valizadeh, Mohadeseh Valizadeh	
Investigating the Effect of Prosopis juliflora Pods Processing on Performance, Digestibility and Blood Parameters of Japanese Quail	55
Jawad Nawaser , Ali Aghaei, Mohammad Reza Ghorbani, Tahereh Mohammadabadi, Saleh abatabaei Vakili	
Comparison of the Effects of Camellia Oil and Soybean Oil in the Diet on the Immune System, Lipid Profiles, and Liver Enzymes of Arian Broiler Chickens	67
Karim Ghorbani, Mohsen Mohammadi Saei, Behroz Yarahmadi, Hassan Norouzian, Amin Kazmizadeh	

The Effect of Replacing Gammarus Powder Instead of Flower Pollen in Feeding Bee Colonies on Their Performance and Behavioral Indicators	77
Kaveh Jafari Khorshidi, Esmaeil Ganji Jamehshooran, Moniolsadat Salavatian	
Sonographic Evaluation of Ovulation Process in Native Breed Bitches Induced by Exogenous hCG and GnRH Administration at the Time of LH Surge with a 12-Hour Interval	91
Erfan Khodadadi, Sakineh Asadzadeh, Eisa Fallah	
Histomorphology of Kidney and Hematological Indices of Nile tilapia, <i>Oreochromis niloticus</i> on Replacement of Blood Powder Instead of Fish Meal in the Diet	101
Amal Moshashai, Rahim Abdi, Rahim Peyghan	
Study of the Amount of Bony Fish Caught on the Southern Coast of the Caspian Sea in the Cities of Mazandaran Province from 2019 to 2022	115
Mehran Moslemi, Mehdi Sahabi, Abdolghafar Ebadi, Somaye Ghasemi Cherati	
Examining the <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> Effects of the HL-10 Peptide on the Immune System Modulation and Anticancer Activities of Hela Cancer Cells	127
Maryam Rezavand, Zahra Setayesh-Mehr, Fatemeh Hadad	
Zoonotic Diseases Caused By Dogs in Iran: A Review of the Current Situation, Health Challenges, and Prevention Strategies	141
Mahboubeh Sadat Hosseinzadeh	
Investigating the Effect of Soil and Fodder Macro Elements on the Serum Levels of Macro Elements of Sheep Grazing in Pastures of Golestan Province	155
Jalal-e-din Khallizadeh, Mohammad Asadi	
Effect of Carvacrol on Sperm Profile on Varicocele-Induced Testicular Damage in Rats	167

Elham Ghahraman, Akram Eidi, Pejman Mortazavi, Ahmad Asghari, Masoumeh Asle Roust

Synthesis and Characterization of Liposomal Nanocarriers Containing Pomegranate Flower Extract to Investigate Its Toxicity on the MCF-7 Breast Cancer Cell Line

183

Ayda Shafigh, Lida Eftekharivash, Ali Akbar Seifi Ashkezari

The Effect of Bentonite and Aflatoxin Absorbing Compounds on the Liver and Blood Parameters of Ross Breed Broiler Chickens

199

Mahsa Mohareri, Reza Vakili, Nafiseh Rahmanian Sharif Abad

The Effect of Hydroalcoholic Extract of the Aerial Parts of Malva Parviflora Plant on Growth Inhibition and Apoptosis Induction in Lung Cancer Cell Line A549

213

Farideh Rahimi, Zohreh Valizadeh

Preparation of Decellularized Bovine Vein Scaffolds and Evaluation of Hyperelastic Models for Use in Vascular Tissue Engineering

225

Mehrdad Sheikhlou, Arash Abdolmaleki, Abbas Sabahi Namini

The Effect of Different Doses of Organic Selenium on the Expression of Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor-Alpha Genes, and Antioxidant Status in Male Wistar Rats Under Heat Stress

239

Hamid Ashrafi



Journal of Animal Biology
Azad University, Damghan Branch

17, winter (2025) . Vol

ISSN: 1735-9724

Publisher License Holder:

Islamic Azad University, Damghan Branch
Deputy of Research and Development

Chairman:

Dr. Hooman Shajiee

Editor in Chief:

Dr. Gholamhassan Vaezi

Executive Editor:

Dr. Vida Hojati

Editorial Board:

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

Editor:

Dr. Vida Hojati

Layout:

Samaneh Marvizadeh

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

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

E-mail: faslnameh.zist@gmail.com

Website: <https://sanad.iau.ir/journal/ascij/>

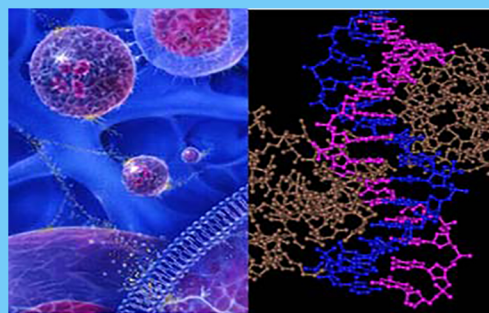
Journal of Animal Biology



Damghan Branch

Vol. 17, Winter 2025, Available online

ISSN:1735-9724



sanad.iau.ir/journal/ascij