



- | صفحه | فهرست مطالب | عنوان |
|------|--|-------|
| ۲ | از تباط مسمومیت به‌وسیله کادمیوم با بیان ژن‌های NF-kB/MAPK و CD163 در غده فوق کلیوی موش عطیه غلامی، زهرا مرجانی، سعید حصارکی | • |
| ۱۰ | اثرات عصاره الکلی برگ گل لاله عباسی (<i>Mirabilis jalapa</i>) بر روی روند ترمیم زخم باز پوستی القابی در مدل رت و خاصیت ضدقارچی آن بهران زمانی‌راد، سیدحسین مرجانمهر، فرهنگ ساسانی، علیرضا خسروی، محمد جواد فراگزلو | • |
| ۲۲ | مقایسه دوروش الایزای آنتی‌بادی سرم و Nested-PCR مدفوع جهت تشخیص عفونت مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس در گاو علی کولیوند، محمدرحیم حاجی‌حاجیکلاتی، محمد نوری، محمد خسروی، داریوش غربی | • |
| ۳۲ | ارزیابی رادیوگرافی شاخص‌های کمی مؤثر در تشخیص بیماری لامینایتیس قبل و بعد از اصلاح سم در اسب‌های سالم سارنگ سروری، امیر توکلی، حسام‌الدین اکبرین، مجتبی بنیادی، بنفشه شاطری‌امیری | • |
| ۴۰ | بررسی آناتومی و اوروگرافی ترشعی کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه در خوکچه هندی صبا عظیم‌زاده، سیامک علیزاده، محمدرضا حسینچی | • |
| ۵۲ | تحلیل مقایسه‌ای ژنوم کروناویروس‌های بیمارهای انسان و دام ترانه رجائی، غلامرضا نیکبخت‌بروجنی، فاطمه فروتن، جلیل مهرزاد، پویا هوشمند | • |
| ۶۸ | ارزیابی تأثیر ضدباکتریایی کارواکروول به‌تنهایی و در ترکیب با آنتی‌بیوتیک سفکسیم در برابر باکتری اشریشیا کلی $O_{157}: H_7$ سپیده اسدی، بهار نیری‌فسایی، تقی زهرایی‌صالحی، رامک یحیی‌رعیت، نعمت شمس | • |

Journal of Veterinary Research (JVR) is Indexed/Abstracted in:

SCOPUS



Veterinary Bulletin
Index Veterinarius



World Health
Organization



Available online at: <http://jvr.ut.ac.ir>

به نام خدا

- زمان متوسط از هنگام ارسال مقاله تا تصمیم گیری نهایی در حدود دو تا پنج ماه ممکن است به طول بیانجامد.

- با توجه به آنکه کلیه مقالات مجله تحقیقات دامپزشکی بدون کسب هزینه به صورت آزاد در دسترس عموم قرار دارد از نویسندگان مسئول درخواست میشود به منظور تأمین هزینههای انتشار مقالات پس از کسب پذیرش برای مقاله علمی پژوهشی و مقالات مروری مبلغ ۴/۸۰۰/۰۰۰ ریال و برای مقالات پژوهشی کوتاه، گزارش موردی و گزارشات درمانگاهی مبلغ ۲/۴۰۰/۰۰۰ ریال به حساب مجله واریز شود.

۳- دستورالعمل تدوین نوشتارها

- نوشتارها باید در برنامه Word در ابعاد A4 با رعایت فاصله ۲ سانتی متر از هر طرف و فاصله خطوط ۱/۵ با فونت B Nazanin سایز ۱۴ برای نوشته‌های فارسی و فونت Times New Roman سایز ۱۲ برای نوشته‌های لاتین تایپ شده باشند. تعداد جداول و تصاویر (اعم از تصاویر یا نگاره‌ها و غیره) به حداقل (حداکثر تعداد تصاویر ۸ عدد) میزان در نظر گرفته شود.

- **۱-۳- نوشتارهای پژوهشی:** نوشتارهای پژوهشی نباید حداکثر از ۱۵ صفحه مجله (با احتساب منابع) تجاوز نماید. این نوشتارها شامل **صفحه عنوان، خلاصه، مقدمه، مواد و روش کار، نتایج، بحث و منابع** می‌باشد.

- **۱-۱-۳ صفحه عنوان:** این صفحه شامل موارد ذیل می‌باشد:

- **عنوان:** عنوان نوشتارها باید کوتاه، گویا و بیانگر محتویات نوشتار باشد. همچنین هر مقاله بایستی دارای یک **short running title (عنوان کوتاه)** باشد. تعداد حروف عنوان کوتاه مقاله نباید از **۴۰ حرف** بیشتر باشد.

- **نام نویسنده یا نویسندگان:** (به‌طور کامل هم فارسی و هم انگلیسی)، محل کار نویسندگان با ذکر گروه و نام دانشکده و نام دانشگاه و شهر و کشور (هم فارسی و هم لاتین)، مورد استفاده باشد. ذکر شماره تلفن ثابت، همراه، نامبر و **E-mail** نویسندگان به‌منظور مکاتبات بعدی در سامانه ضروری است.

- تمام منابع مورد استفاده در متن باید در فهرست متن به آن‌ها اشاره شده باشد. متن نوشتارهایی که به آن استناد می‌شود در صورتی که به‌وسیله یک نفر نوشته شده باشد نام

مجله تحقیقات دامپزشکی مجله ایست که در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، به زبان فارسی و با خلاصه فارسی و انگلیسی منتشر می‌شود. این مجله به صورت فصلی و سالانه در چهار نوبت انتشار می‌یابد. مقالات این مجله پس از آنکه از مراحل داوری دقیق عبور کردند، با رعایت موارد اخلاق در نشر بر روی سایت منتشر می‌شوند و به صورت رایگان در دسترس همگان قرار خواهند گرفت.

۱- حوزه مقالات

این مجله مقالات علمی پژوهشی، گزارش موردی و گزارشات درمانگاهی، مقالات مروری و مقالات پژوهشی کوتاه را در زمینه علوم دامپزشکی شامل اپیدمیولوژی و بهداشت عمومی؛ انگل‌شناسی و بیماری‌های انگلی؛ آسیب‌شناسی تشریحی و بالینی؛ بهداشت خوراک دام، طیور و آبزیان؛ بهداشت مواد غذایی؛ بهداشت و بیماری‌های آبزیان؛ بهداشت و بیماری‌های پرندگان؛ بهداشت و بیماری‌های دام‌های بزرگ؛ بهداشت و بیماری‌های دام‌های کوچک؛ تکنیک‌های تصویربرداری تشخیصی؛ جراحی، هوشبری و بیماری‌های اندام حرکتی؛ علوم پایه (بیوشیمی، آناتومی، جنین، بافت‌شناسی و فیزیولوژی)؛ فارماکولوژی و سم‌شناسی؛ مامایی و بیماری‌های تولید مثل؛ میکروبیشناسی و ایمنی شناسی؛ هماتولوژی و بیوشیمی درمانگاهی و سایر زمینه‌های علوم دامی مورد بررسی و داوری قرار می‌هد.

۲- فرایند پذیرش مقالات

- **ارسال نوشتارها:** نوشتارها و مقالات باید به صورت On-line از طریق سامانه نشریات الکترونیک دانشگاه تهران به آدرس اینترنتی <http://jvr.ut.ac.ir> ارسال شوند و از ارسال مقالات به آدرس پستی و الکترونیکی مجله خودداری شود.

- کلیه مکاتبات جهت اعمال هر گونه تغییر صرفاً با نویسنده مسئول به عمل خواهد آمد.

- **داوری مقالات:** مجله تحقیقات دامپزشکی در راستای همگامی با استانداردهای نشر بین‌المللی بنا بر داوری هم‌تراز و دسترسی آزاد گذاشته شده است. در همین راستا این نشریه رویه داوری دوسوکور توسط ۳ داور را برگزیده است. بدین شکل که نه نویسنده از هویت داوری مطلع می‌شود و نه داور از نام و نشان نویسنده (گان) آگاهی می‌یابد.



خانوادگی نویسنده به زبان انگلیسی و به شکل **Smith** در سال ۲۰۱۹ نگاشته شود. در صورتی که نویسندگان نوشتار دو نفر باشند نام هر دو به صورت فوق نوشته می‌شود. مقاله‌هایی که بیش از دو نویسنده داشته باشند، ذکر منبع بدین صورت خواهد بود **Smith و همکاران در سال ۱۹۹۷** (اسم حتماً به لاتین نوشته شود، سال حتماً ذکر شود و به میلادی باشد). در پایان هر پاراگراف در صورت ضرورت می‌توان به شماره مأخذ اشاره نمود. مقالات منتشر نشده، کنفرانس، کنفرانس، سایت، پایان نامه، پروتکل، سخنرانی SAS به‌عنوان رفرنس قابل پذیرش نیستند.

۳-۱-۲ خلاصه: خلاصه نوشتار شرح مختصر و جامعی از محتویات نوشتار است. این بخش باید به‌تنهایی بیانگر کارهای انجام شده و نتایج به‌دست آمده باشد به‌طوری که خواننده مجبور نشود برای درک مطلب به متن مراجعه نماید.

- خلاصه فارسی و خلاصه انگلیسی باید براساس الگوی ذکر شده در دوره ۷۵ شماره ۱ (سال ۱۳۹۹) به بعد و واجد قسمت‌های: **زمینه مطالعه، هدف، روش کار، نتایج و نتیجه‌گیری نهایی** باشد.

- در خلاصه انگلیسی **Background, Objectives, Methods, Results, Conclusions** تنظیم شود.

- خلاصه‌های فارسی و انگلیسی نباید از ۳۰۰ کلمه تجاوز نمایند.

- متن خلاصه فارسی و انگلیسی باید منطبق باهم باشد.
- در پایان صفحه مربوط به خلاصه مقاله واژه‌های کلیدی فارسی و انگلیسی (۵ کلمه) نوشته شود. بهتر است واژه‌های کلیدی تا حد امکان متفاوت از کلمات بکار رفته در عنوان مقاله باشند و شهر و کشور نباشند.

- در صورت استفاده از کلمه مخفف در خلاصه، بایستی در اولین مورد استفاده نام کامل و به‌دنبال آن مخفف در پرانتز ذکر شود.

۳-۱-۳ مقدمه: این بخش ارایه کننده مسئله مورد پژوهش و منظور پژوهشگر از کار پژوهشی و یا گزارش آن است. بدین منظور در مقدمه باید زمینه‌های قبلی پژوهش به‌طور مختصر بیان شده و ارتباط آن با موضوع نوشتار بیان گردد و در پایان به‌انگیزه کار انجام شده اشاره شود. ذکر هدف مطالعه حاضر در انتهای مقدمه ضروری می‌باشد.

۳-۱-۴ مواد و روش کار: در بخش مواد و روش کار بایستی مواد، لوازم و دستگاه‌هایی که اختصاصاً برای کار پژوهشی به‌کار رفته است نام برده شده و از ذکر مواد و لوازم عمومی آزمایشگاهی خودداری گردد. در مورد مواد و دستگاه‌ها و لوازم اختصاصی لازم است نام شرکت سازنده و شهر و کشور مربوطه نام برده شود. روش کار باید طوری ارایه گردد که امکان انجام مجدد آن توسط پژوهشگران دیگر میسر بوده و به‌طور خلاصه بیانگر چگونگی و روند کار انجام شده باشد. در این بخش لازم است از ذکر روش‌هایی که قبلاً انجام شده و در نشریه‌های دیگر چاپ شده است خودداری نموده و تنها به ذکر منبع مورد نظر اکتفا شود. در مورد آنالیز آماری روش‌های به‌کار گرفته شده باید به شیوه قابل درک و با استناد به مأخذ معتبر ذکر شود. بیان حجم نمونه، تعداد تکرارهای مستقل هر آزمایش و تعداد تکرارهای داخل هر آزمایش ضروری می‌باشد.

۳-۱-۵ نتایج: نتایج به‌دست آمده از یک کار پژوهشی در این بخش نگاشته می‌شود. داده‌ها و نتایج به دست آمده باید به گونه‌ای منطقی و مفید که روشنگر بحث و نتیجه‌گیری باشد ارایه گردد و بدین منظور می‌تواند همراه با جدول، نمودار و تصویر باشد. در این مورد باید دقت کافی به‌عمل آید که برای بیان یک منظور فقط از یکی از آن‌ها برای مثال نمودار یا جدول استفاده شود نه از هر دو. لازم است از توضیح کامل جداول در متن پرهیز شود و تنها به بیان اهم مطالب پرداخته شود.

- **جداول:** جهت ارائه **جداول** توجه شود که خطوط جداول حذف نشوند و جداول فارسی و تمام خانه‌ها راست به چپ (Right to Left) نوشته شوند. **جداول** مقاله باید با فونت فارسی با فونت Nazanin B سایز ۱۲ و تنظیمات Right To Left کشیده شود. اعداد داخل جداول باید به فارسی باشند. **جداول** از یک صفحه A4 تجاوز نکند و در صفحه Portrait کشیده شوند. جداول طوری کشیده شوند که وقتی با Tab از خانه‌ای به خانه دیگر می‌رویم، از سمت راست به چپ خانه‌ها تغییر کنند. جهت مقایسه آماری اعداد جدول از حروف انگلیسی Superscript استفاده شود و به‌صورت مناسب در زیر جدول توضیح داده شود. جداول بایستی دارای عنوان مختصر و گویا بوده و به‌ترتیب قرارگیری در متن شماره گذاری گردد. جداول بایستی در انتهای فایل اصل مقاله آورده شده و از قرار دادن جداول در متن یا در فایل دیگر پرهیز شود.



• **نمودارها و تصاویر:** بایستی به صورت فایل مجزا با پسوند JPEG و سایز ۸ در ۶ و رزولیشن ۶۰۰ dpi ارسال شوند. اعداد و نوشته‌های موجود در تصاویر و نمودارها به لاتین و کاملاً واضح باشند. اعداد و نوشته‌های تصاویر و نمودارهایی که بی کیفیت هستند در برنامه فتوشاپ بازنویسی شوند. شماره نگاره‌ها و تصاویر، به ترتیبی که در متن به آن اشاره می‌شود برای هر مورد در زیر آن نوشته شود. **عنوان تصاویر و نمودارها** هم به زبان فارسی و هم به زبان لاتین باید در انتهای فایل اصل مقاله، بعد از منابع، به ترتیب و حتی‌الامکان به صورت **خلاصه و کوتاه ولی کاملاً گویا** باشد.

۳-۱-۶-**بحث:** قسمت بحث بایستی جدا از قسمت نتایج و به صورت مجزا آورده شود. در این بخش نتایج به دست آمده مورد بحث و تفسیر قرار می‌گیرند و شرح و بسط داده می‌شوند. همچنین حاصل کار پژوهشی در مقایسه با کار سایر پژوهشگران مورد بحث و توجه قرار می‌گیرد. در کل به مواردی که به حل مسئله مورد پژوهش کمک کرده و نتیجه‌گیری از آن حاصل شده است اشاره گردد. در آخر قسمت بحث نیز در یک پاراگراف نتیجه‌گیری نهایی به صورت کاملاً واضح بیان شود.

۳-۱-۷-**سپاسگزاری:** در این بخش نویسنده راهنمایی و کمک‌های دیگران را یادآوری کرده و به طور خلاصه از آن‌ها سپاسگزاری می‌نماید. به منظور ارسال مطالب مربوط به این بخش از فایل مشخصات نویسندگان ارسال شود و در فایل اصلی مقاله نباشد.

۳-۱-۸-**تعارض منافع:** در این بخش نویسنده بایستی تمام ارتباطات مالی (اعم از سود و یا ضرر حاصل از نتایج تحقیق) و غیر مالی (مثل ارتباطات دولتی، فردی یا شغلی) که می‌تواند به نحوی در یافته‌های تحقیق اثرگذار باشد را ذکر نماید. در صورت عدم وجود تعارض بایستی ذکر شود "نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را در این پژوهش شناسایی نکردند".

مسئولیت مقاله

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

۳-۱-۹-**منابع مورد استفاده:** تمام منابع مورد استفاده باید به زبان انگلیسی نوشته شود که لیست منابع باید در صفحه‌ای جداگانه که شماره ترتیب آن بعد از صفحات بحث، شماره‌گذاری

می‌شود تایپ گردد. فهرست منابع می‌باید به ترتیب استفاده آن‌ها در متن و به صورت اعداد داخل پرانتز مشخص گردد (VANCOUVER). در خصوص منابع فارسی معادل انگلیسی آن آورده شده و در انتهای آن در درون پرانتز (In Persian) آورده شود. استفاده از **پایان‌نامه، کنگره، کنفرانس، پروتکل، سایت، سخنرانی SAS در منابع قابل قبول نمی‌باشند.** بایستی ۵۰ درصد منابع جدید و حداقل مربوط به پنج سال قبل باشند.

• در مورد خلاصه نام مجله می‌توانید به نوشتارهای مجله مراجعه نموده و یا آن را به صورت مخفف از Pubmed یا Web of Science استخراج نمایید. در انتهای تمام منابعی که دارای PMID و DOI می‌باشند، لینک نسخه آنلاین (PMID و DOI) آورده شود و حتماً مطابق مثال ذیل لینک دهی شود.

Ghamsari SM, Dehghan MM, Raii Dahaghi M, Nowrouzian I. Clinical Evaluation of Two Surgical Treatment Methods for Exuberant Granulation Tissue of Lower Limb Open Wounds in Horses. J Vet Res. 2020; 73(1): 1-9. doi: [10.4103/2153-3539.120729](https://doi.org/10.4103/2153-3539.120729) PMID: [24392243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24392243/)

• در مورد **کتاب‌ها** نام نویسندگان، سال انتشار، موضوع، چندمین چاپ، مکان و نام ناشر و صفحه (مطابق با مثال) باید ذکر گردد.

Petrie A, Waston P. Statistic for Veterinary and Animal Sciences. 1st ed. Blackwell Sciences Ltd. London, UK; 2019.

• در صورت رجوع به **فصلی** از کتاب به عنوان ماخذ:

Bergston C. Infectious diseases of the digits. In: Greenough, P.R., Weaver, A.D. editors. 3rd ed. Lameness in Cattle. WB. Saunders Company. Philadelphia, USA. 2020. p. 89-99.

۴-۲- گزارش موردی و گزارشات درمانگاهی:

این گزارش‌ها، موارد نادر و آموزنده درمانگاهی و آزمایشگاهی را در بر گرفته و و نباید از ۴ صفحه مجله تجاوز نمایند. در این دست گزارشات نکات زیر در نظر گرفته شود: **عنوان** فارسی و انگلیسی، **خلاصه** فارسی و انگلیسی (سابقه، یافته‌های بالینی، آزمایشات تشخیصی و ارزیابی نهایی)، **کلمات کلیدی** فارسی و انگلیسی، **سابقه** (چگونگی گزارش بیماری مورد نظر)، **یافته‌های بالینی** (تاریخ شروع بیماری، علائم بیماری و تمامی یافته‌های بالینی مرتبط)، **آزمایشات تشخیصی** (کلیه



آزمایشات انجام شده در جهت تایید تشخیص بیماری)، **ارزیابی نهایی** (بیان استنتاجی در خصوص مورد گزارش شده)، **فهرست منابع**.

۳-۴- مقالات مروری

نوشتن این گونه مقالات توسط افراد با تجربه و صاحب نظری انجام می شود که در زمینه مقاله نگارش شده دارای تعداد کافی با همان عنوان مقاله باشند. در مقالات مروری نتایج بررسی های منتشر شده قبلی توسط نویسندگان مورد ارزیابی قرار گرفته، نقاط قوت و ضعف آن ها بررسی می شوند و پیشنهاداتی مبنی بر بهبود انجام آن ها در مطالعات بعدی آورده می شود. مجله تحقیقات دامپزشکی از ارسال این نوع مقالات استقبال می کند، با این حال قبل از ارسال لازم است با نویسنده مقاله در خصوص عنوان و حجم مقاله ارسالی هماهنگی به عمل آید.

در این دست گزارشات نکات زیر در نظر گرفته شود:
عنوان فارسی و انگلیسی، **خلاصه** فارسی و انگلیسی (زمینه مطالعه و تشریح بخش های مختلف تشکیل دهنده مقاله در حد یک جمله و نتیجه گیری نهایی باشد، باید در زمان حال نوشته شود. همچنین به دلیل کوتاه بودن آن باید خیلی سریع به اهدافی که در مقاله وجود دارد اشاره شود) **کلمات کلیدی** فارسی و انگلیسی، **مقدمه**، **بدنه اصلی** یا **نتایج**، **نتیجه گیری نهایی**.

۴-۴- مقالات پژوهشی کوتاه

این مقاله از جهت نوع کار و نحوه تدوین همانند مقاله پژوهشی است ولی با توجه به اهمیت و نتایج حاصل از پژوهش، مقاله به صورت فشرده و حداکثر در ۵ صفحه (بدون احتساب منابع) مجله ارائه گردد.

در این دست گزارشات نکات زیر در نظر گرفته شود:
عنوان فارسی و انگلیسی، **خلاصه** فارسی و انگلیسی، **کلمات کلیدی** فارسی و انگلیسی، **مقدمه**، **مواد و روش کار**، **نتایج**، **بحث**، **فهرست منابع** باشد.

چنانچه مقاله خارج از ضوابط راهنمای تهیه نوشتارهای علمی مجله باشد قبل از ارائه به هیئت تحریریه و داوران به نویسنده مسئول جهت انجام اصلاحات عودت داده خواهد شد.

اهداف و چشم انداز

هدف مجله تحقیقات دامپزشکی چاپ به روزترین مقالات به منظور بهبود و پیشرفت آگاهی در زمینه های مختلف علوم دامپزشکی با رعایت تمام موازین چاپ و نشر بین المللی است. در همین راستا از همه محققین و فرهیختگان و دانشمندان می خواهد که آن را در این مسیر همراهی کنند. مجله تحقیقات دامپزشکی مقالات محققین عزیز را در زمینه های اپیدمیولوژی و بهداشت عمومی؛ انگل شناسی و بیماری های انگلی؛ آسیب شناسی تشریحی و بالینی؛ بهداشت خوراک دام، طیور و آبزیان؛ بهداشت مواد غذایی؛ بهداشت و بیماری های آبزیان؛ بهداشت و بیماری های پرندگان؛ بهداشت و بیماری های دام های بزرگ؛ بهداشت و بیماری های دام های کوچک؛ تکنیک های تصویربرداری تشخیصی؛ جراحی، هوشبری و بیماری های اندام حرکتی؛ علوم پایه (بیوشیمی، آناتومی، جنین، بافت شناسی و فیزیولوژی)؛ فارماکولوژی و سم شناسی؛ مامایی و بیماری های تولید مثل؛ میکروشناسی و ایمنی شناسی؛ هماتولوژی و بیوشیمی درمانگاهی و سایر زمینه های علوم دامی مورد بررسی و داوری قرار می دهد. بدیهی است در صورت مناسب بودن مقاله در اسرع وقت به چاپ خواهد رسید.

داوران

داوران مجله از بین بهترین افرادی که در زمینه مقاله ارسالی دارای تجربه کافی باشند انتخاب خواهند شد، با این حال لحاظ چنین مسئولیتی برای هر یک از داوران ممکن است نیاز به صرف زمان کافی داشته باشد از این رو اعضا هیئت تحریریه "مجله تحقیقات دامپزشکی" از مولفین خواستار آن هستند که به این مسئولیت پذیری ارزش گذاشته و از بردباری شما تشکر می نمایند. داوری مقالات در مجله تحقیقات دامپزشکی با رعایت انصاف و در حداقل مدت زمانی به صورتی که هیچ یک از داوران از اسامی مولفین اطلاع نداشته باشند صورت خواهد گرفت تا این اطمینان به وجود آید که مقالاتی با کیفیت مناسب در این مجله به چاپ برسد. برای این منظور مجله تحقیقات دامپزشکی نیاز به داورانی دارد که نکته بین بوده و نظرات مفید آن ها در خصوص مقاله ارسالی پس از قبول انجام داوری در طی چهار تا شش هفته به دفتر مجله ارسال شود. اینکه مجله تحقیقات دامپزشکی به عنوان یک مجله علمی با کیفیت بالا باقی بماند نیازمند همکاری داورانی با تجربه کافی، نکته بین و با انصاف در ارزیابی مقالات ارسالی خواهد بود.



درباره نشریه

را اعمال نمایند. مقاله اصلاح شده به همان داوران به همراه تغییرات اعمال شده توسط نویسنده ارسال خواهد شد. این روند تا هنگام اتخاذ تصمیم نهایی مبنی بر پذیرش یا عدم پذیرش مقاله ارسال شده ادامه خواهد یافت. در صورت پذیرش مقاله پس از انجام کلیه اصلاحات طبق فرمت مجله و پس از پرداخت هزینه مربوطه در شماره‌های آتی در سایت مجله قرار خواهد گرفت. زمان متوسط از هنگام ارسال مقاله تا تصمیم گیری نهایی در حدود دو تا پنج ماه ممکن است به طول بیانجامد. بدیهی است هرچه مقاله سریع تر پذیرش شود در زمان کوتاه‌تری منتشر خواهد شد.

متون ثبت شده در سیستم در صورت هم‌راستا بودن با حوزه تخصصی مجله و متناسب بودن با غالب استاندارد تعیین شده از سوی مجله برای داوری ارسال می‌گردد و در صورت تایید نهایی سردبیر وارد روند چاپ می‌شود.

اصول اخلاقی انتشار مقاله

• در باب اصول اخلاقی انتشار مقاله، مجله، از یک سو، خود را موظف به پاسداری از حقوق مؤلفان، صاحبان آثار و تولیدکنندگان محتوا می‌داند و از سوی دیگر باور دارد که باید حافظ حقوق مخاطبان و خوانندگان خویش باشد. لذا برای رعایت این مهم و در راستای همگامی با جامعه علمی بین‌المللی بنای عملکرد خود را قوانین اخلاق در نشر جهانی قرار داده است و سیاست‌های خود را بر همین اساس پایه‌ریزی کرده است.

• به باور مجله تحقیقات دامپزشکی تمام افرادی که در روند چاپ یک مقاله درگیر هستند (نویسنده، کادر مجله و داوران) باید قوانین و منشور اخلاقی مجله را پذیرفته و بر مبنای آن عمل کنند. نشریه از قوانین کمیته بین‌المللی اخلاق در نشر (COPE) پیروی می‌کند.

• کلیه مقالات از نظر اصالت توسط اعضا هیات تحریریه کنترل خواهند شد. مقالاتی که دارای شباهت قابل توجهی با نوشتارهای چاپ شده در مجلات دیگر داشته باشند و یا به شکلی در جای دیگر به چاپ رسیده است، به نویسنده مسئول عودت داده خواهند شد.

• نویسنده مسئول باید تعهد نامه‌ای مبنی بر اینکه مقاله ارسالی به شکل کامل یا بخشی از آن در مجله‌ای دیگر به چاپ نرسیده است و یا در جای دیگر برای داوری ارسال نشده باشد، ارسال نماید. لازم است نویسنده مسئول در نامه‌ای که به سردبیر

مجله تحقیقات دامپزشکی مجله ایست که در دانشکده

دامپزشکی دانشگاه تهران، به زبان فارسی و با خلاصه فارسی و انگلیسی منتشر می‌شود. این مجله مقالات علمی پژوهشی، گزارش موردی و مروری را در زمینه علوم دامپزشکی به چاپ می‌رساند و مفتخر است که اعلام دارد این کار با رعایت تمام موازین استاندارد نشر بین‌المللی انجام می‌شود. این مجله بصورت فصلی و سالانه در چهار نوبت انتشار می‌یابد. مقالات این مجله پس از آنکه از مراحل داوری دقیق عبور کردند، با رعایت موارد اخلاق در نشر بر روی سایت منتشر می‌شوند و به صورت رایگان در دسترس همگان قرار خواهند گرفت. این مجله از تمام عزیزیانی که آن را همراهی می‌کنند سپاسگزار است و از داشتن همراهانی چون آن‌ها به خود می‌بالد.

فرایند پذیرش مقالات

مجله تحقیقات دامپزشکی نشریه ایست که در راستای

همگامی با استانداردهای نشر بین‌المللی بنای آن بر داوری هم‌تراز و دسترسی آزاد گذاشته شده است. در همین راستا این نشریه رویه داوری دوسوکور را برگزیده است. بدین شکل که نه نویسنده از هویت داوری مطلع می‌شود و نه داور از نام و نشان نویسنده (گان) آگاهی می‌یابد. این امر موجب می‌شود که داوری صرفاً به شکل علمی و به دور از هرگونه پیش‌داوری و غرض‌ورزی صورت بگیرد. در صورت ارسال مقاله به مجله پس از بررسی اجمالی و در صورت رعایت چهارچوب مربوط به چاپ مقاله سه داور بنابه تصمیم‌گیری دبیر تخصصی یا اعضا هیات تحریریه جهت داوری انتخاب می‌شوند. در طی زمان متعارف نتیجه داوری به یکی از چهار شکل به نویسنده مقاله ارسال خواهد شد.

۱. پذیرش مقاله به صورت ارسال شده و بدون نیاز به

تغییر.

۲. پذیرش مقاله پس از تغییرات جزئی.

۳. پذیرش مقاله در صورت انجام تغییرات کلی.

۴. عدم پذیرش.

در مواردی که توافق بین نویسنده و داوران وجود نداشته باشد سردبیر در خصوص پذیرش یا رد مقاله تصمیم گیری خواهد کرد. در مواردی که تصمیم بر چاپ مقاله گرفته شود لازم است نظرات داوران توسط نویسنده در مقاله گنجانده شود. به نویسندگان چهارده روز زمان خواهد شد تا تغییرات خواسته شده



مجله تحقیقات دامپزشکی ارسال می‌کند این موارد را به طور شفاف توضیح دهد.

• بر مبنای مقررات مجله تحقیقات دامپزشکی دانشجویان نمی‌توانند نویسنده مسئول مقالات ارسالی باشند.

• بایستی اسامی تمامی افرادی که همکاری فعال در خصوص طراحی و تبیین پژوهش، جمع‌آوری، تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها دارند به‌عنوان مؤلفین ذکر شود.

• اسامی افرادی که فقط در تأمین مالی پژوهش نقش داشتند نبایستی در اسامی مؤلفین ذکر شود و بایستی در سپاسگزاری آورده شود.

• تمامی نویسندگان بایستی نسخه نهایی مقاله را خوانده و با ثبت آن در مجله موافقت نمایند.

• تمام مقالات پذیرش شده در مجله به‌عنوان مالکیت معنوی بخشی یا تمام مجله تحقیقات دامپزشکی محسوب می‌شود.

شرایط و ضوابط ارسال مقالات

• ارسال و پیگیری مقالات صرفاً از طریق سامانه به نشانی <https://jvr.ut.ac.ir/contacts> امکان‌پذیر است. از همین رو خواهشمند است از هرگونه ارسال نسخه کتبی مقاله به دفتر

مجله یا ارسال ایمیل‌های محتوی مقاله به آدرس ایمیل مجله خودداری شود.

• مقالات ارسالی تنها در قالب تعیین شده نشریه مورد بررسی اولیه قرار می‌گیرند.

• مسئولیت، صحت مطالب و منابع مندرج در مقاله به عهده نویسنده یا نویسندگان است.

• فصلنامه در پذیرش، رد و ویرایش مقالات آزاد است.

• دانشجویان الزاماً بایستی همراه با یکی از استادان عضو هیات علمی مقاله ارائه نمایند.

• مقاله قبلاً چاپ نشده و هم‌اکنون در نشریه‌ای دیگر تحت بررسی برای چاپ نیست.

• از آنجا که زبان مجله فارسی است، لازم است آیین نگارش زبان فارسی کاملاً رعایت گردد.

متن پیش فرض برای نامه به سردبیر (تعهد نامه)

این مقاله تا کنون در نشریه‌ی دیگری به چاپ نرسیده و یا همزمان جهت انتشار به نشریه‌ی دیگری ارسال نشده است.

اینجانب متعهد می‌شوم که مقاله ارسالی به رؤیت نویسندگان مقاله رسیده و نظر موافق آن‌ها برای انتشار مقاله در شکل حاضر در این نشریه اخذ گردیده باشد.





Effects of Cadmium Poisoning on the Expression of NF- κ B/MAPK and CD163 Genes in Rat Adrenal Gland

Atieh Gholami¹✉, Zahra Marjani¹✉, Saeed Hesaraki²✉¹ Graduated from the Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran² Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 24 December 2022, Accepted: 26 February 2023

[10.22059/jvr.2023.349449.3304](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.349449.3304)[20.1001.1.20082525.1402.78.1.1.3](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1402.78.1.1.3)

Abstract

BACKGROUND: Cadmium is a heavy metal harmful to animals and humans. Exposure to it causes inflammation, apoptosis, or necrosis in numerous tissues, including the adrenal.

OBJECTIVES: The present research investigates the effect of cadmium toxicity on the expression of genes involved in inflammation and fibrosis. Inflammation increases the rate of parenchymal cell death, and fibrosis will only fill the place of dead cells without being able to perform the function of the primary parenchyma.

METHODS: In this research, cadmium chloride with a concentration of 20 mg/kg was added to the diet of ten mice in two groups of five. On the 30th day of the study, the adrenal glands were quickly sent to the laboratory. The expression of NF- κ B/MAPK, hematoxylin, eosin tissue staining, and immunohistochemistry (CD163) were performed.

RESULTS: The inflammation mentioned in others' research can also be associated with the activation of the nuclear factor kappa (NF- κ B) pathway. NF- κ B gene products initiate mitogen-activated protein kinase (MAPK) and p38 pathways. Previous studies indicate that MAPK induces necrosis or apoptosis in tissues. In histopathology, dense and possibly pyknosis nuclei are more common in the cadmium group. The higher expression of the CD163 molecule in the cadmium group reveals the beginning of the fibrosis process after chronic inflammation.

CONCLUSIONS: This report provides more basic data to investigate the mechanism of adrenal damage in cadmium poisoning. Cadmium causes the death of cells by affecting the inflammatory pathways. Additionally, the stimulation of the fibrosis process causes greater irreparable damage to the damaged tissue of the adrenal gland.

Keywords: Adrenal, Cadmium, Fibrosis, MAPK, NF- κ B

Copyright © Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).

Publisher: University of Tehran

Corresponding author: Saeed Hesaraki, Tel/Fax: 021-44864663 / 021-44864356

How to cite this article:

Gholami, A., Marjani, Z., Hesaraki, S. Effects of Cadmium Poisoning on the Expression of NF- κ B/MAPK and CD163 Genes in Rat Adrenal Gland. J Vet Res, 2023; 78(1): 1-8. doi: 10.22059/jvr.2023.349449.3304

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Gene-specific primers used in quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).

Figure 1. A. Microscopic view of the healthy adrenal gland of the control group with hematoxylin and eosin staining (100x). B. Immunohistochemistry for the marker CD163, representing the presence of fibrotic macrophages (line represents 50 μ m). As the figure depicts, the number of macrophages is small and normal.

Figure 2. A. Microscopic view of the adrenal gland with an increase in the population of dark nuclei within the tissue of the cadmium group with hematoxylin and eosin staining (100 times). B. In immunohistochemistry for the marker CD163, the number of fibrosing macrophages is larger than that in the control group (line represents 50 μ m).



ارتباط مسمومیت به وسیله کادمیوم با بیان ژن های NF-kB/MAPK و CD163 در غده فوق کلیوی موش

عطیه غلامی^۱، زهرا مرجانی^۱، سعید حصارکی^۲

^۱ دانش آموخته واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

تاریخ دریافت: ۳ دی ماه ۱۴۰۱، تاریخ پذیرش: ۹ اسفند ماه ۱۴۰۱

doi 10.22059/jvr.2023.349449.3304



20.1001.1.20082525.1402.78.1.1.3

چکیده

زمینه مطالعه: کادمیوم یک فلز سنگین است که برای حیوانات و انسان مضر است. قرار گرفتن در معرض آن باعث التهاب، آپوپتوز یا نکروز در بسیاری از بافت‌ها از جمله آدرنال می‌شود.

هدف: بررسی تأثیر مقادیر مسمومیت‌زای کادمیوم بر میزان بیان ژن‌های دخیل در التهاب و فیبروز بود. التهاب بر میزان مرگ سلول‌های پارانشیم می‌افزاید و فیبروز نیز بدون این که بتواند کارکرد پارانشیم اولیه را داشته باشد، فقط محل سلول‌های مرده را پر خواهد کرد.

روش کار: در مطالعه حاضر، کلرید کادمیوم با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به جیره ده سر موش سوری در دو گروه پنج‌تایی اضافه شد. در روز سی‌ام مطالعه، بافت‌های غده آدرنال به سرعت جهت بررسی بیان NF-kB/MAPK، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین بافت و انجام ایمونوهیستوشیمی (CD163) به آزمایشگاه فرستاده شد.

نتایج: التهاب ذکر شده در مطالعات دیگر می‌تواند با فعال شدن مسیر فاکتور هسته‌ای کاپا (NF-kB) نیز مرتبط باشد. محصولات ژنی NF-kB مسیر پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن (MAPK) و p38 را آغاز می‌کند. در مطالعات گذشته نشان داده شد که MAPK باعث ایجاد نکروز یا آپوپتوز در بافت‌ها می‌شود. در هیستوپاتولوژی، هسته‌های متراکم و احتمالاً پیکنوز شده در گروه کادمیوم بیشتر بود. بیان بیشتر مولکول CD163 در گروه کادمیوم نشان‌دهنده شروع فرآیند فیبروز پس از التهاب مزمن می‌باشد.

نتیجه‌گیری نهایی: مطالعه حاضر داده‌های اساسی‌تری را برای بررسی مکانیسم آسیب آدرنال در مسمومیت با کادمیوم ارائه داد. در واقع کادمیوم با تأثیر بر روی مسیرهای التهابی موجب مرگ سلول‌ها شده و از طرفی با تحریک روند فیبروز موجب آسیب جبران‌ناپذیر بیشتری در بافت آسیب‌دیده غده آدرنال می‌شود.

کلمات کلیدی: غده فوق کلیه، کادمیوم، فیبروز، MAPK، NF-kB

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: سعید حصارکی، گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مقدمه

کادمیوم فلزی سنگین است که در لحیم و باتری به کار برده می‌شود و به عنوان آلیاژ در آبکاری و پوشش‌های فلزی کاربرد دارد. راه‌های ورود کلرید کادمیوم (CdCl₂) به بدن انسان و حیوانات بیشتر از طریق استنشاق و دستگاه گوارش می‌باشد. قرار گرفتن مکرر و طولانی مدت در معرض این فلز باعث ایجاد اثرات سمی متعدد از جمله بیماری‌های ریوی، کبدی، کلیوی و قلبی-عروقی می‌شود. اندام‌های هدف کادمیوم بیضه‌ها، کبد، کلیه‌ها و حتی ادرنال است. اندام‌های غدد درون ریز هنگام مواجهه با کادمیوم آسیب می‌بینند (۱). کادمیوم می‌تواند باعث التهاب لوزالمعده موش صحرایی شود. در واقع کادمیوم در پانکراس موش‌ها انباشته شده و از طریق بیان بیش از حد نیتریک اکسید سنتاز (iNOS)، فاکتور هسته‌ای-کب (NF-kB)، اینترلوکین-۶ (IL-6) و فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α)، همراه با

تغییرات هیستوپاتولوژی التهاب پانکراس را تحریک می‌کند (۲). Monaco و همکاران در سال ۲۰۱۷ مشاهده کردند که کاهش قابل توجه سطح هورمون‌های تیروئید و کاهش بیان ژن‌های دخیل در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تیروئید در دو نسل لارو گورخرماهی (*Danio rerio*) با قرار گرفتن والدین با کادمیوم همراه با تریبوتیلین (که یک ضدحیات است معمولاً به عنوان رنگ روی بدنه کشتی‌های اقیانوس پیما به کار می‌رود تا جلبک‌ها رشد نکنند (tributyltin)) اتفاق افتاده است (۳). افزودن طولانی مدت کادمیوم به جیره غذایی موش‌ها موجب تجمع آن به صورت مزمن و گسترده در کلیه‌ها شده است. اختلال در عملکرد کلیه زمانی رخ می‌دهد که میزان محتوای کادمیوم در قشر کلیه به آستانه بحرانی ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم برسد (۴). Imam و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که کادمیوم موجب خودخوری سلولی در قشر غده فوق کلیه می‌شود. طولانی و مزمن شدن نارسایی کلیه موجب استئومالاسیا (Osteomalacia) خواهد شد. دفع کادمیوم عمدتاً توسط کلیه‌ها صورت می‌گیرد اما این روند بسیار کند و ناکافی است، از طرفی این فلز نیمه عمر طولانی دارد، پس با این حساب اثرات مخرب زیادی دارد (۵). Pearson و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که کینازی به نام MAPK در مسیرهای انتقال سیگنال مشارکت دارد که رویدادهای درون سلولی از جمله پاسخ‌های هورمونی و رشد در موجودات ارگانسمی مختلف را کنترل می‌کند (۶). Tak و همکاران در سال ۲۰۰۱ ثابت کردند که فاکتور هسته‌ای تقویت کننده زنجیره سبک کاپا NF-κB، در نفوسیت‌های B فعال شده در حال رونویسی DNA دیده می‌شود. این فاکتور تقریباً در تمام سلول‌ها و گونه‌های پستانداران یافت می‌شود و نقش کلیدی در تنظیم پاسخ ایمنی دارد. تنظیم نادرست آن با سرطان و بیماری‌های خود ایمنی مرتبط است (۷). در مطالعه حاضر تأثیر کادمیوم روی بیان ژن‌های MAPK و NF-κB در غده فوق کلیه موش بررسی شد. Antan و همکاران در سال ۲۰۲۲ در یک مطالعه نشان دادند که کلرید کادمیوم می‌تواند گلوتاتیون، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را در بیضه‌ها کاهش دهد و هم‌زمان موجب افزایش بروز TNFα و فاکتور هسته‌ای کاپای B (NF-κB) شود. TNFα عامل اصلی ایجاد رادیکال‌های اکسیداتیو، التهاب، بروز ژن‌های LC3B، Beclin-1 و کاسپاز-۳ هم‌زمان با تغییرات هیستوپاتولوژی است. پروتئین‌های LC3B و Beclin-1 مسئول خودخوری سلولی و کاسپاز-۳ مسئول آپوپتوز می‌باشند. درمان با ملاتونین می‌تواند اثرات سمی ناشی از کادمیوم را در بیضه کاهش دهد (۸). در آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو، وجود MAPK برای سیگنال دهی آپوپتوز لازم است. فعالیت آن بیان ژن و مسیرهای آپوپتوز را تحت کنترل دارد. خانواده MAPK از سه پروتئین کیناز اصلی به نام‌های ERK، JNK و p38 تشکیل شده است که ارتباط نزدیکی با رشد و تمایز سلولی دارند. این پروتئین‌ها مرتبط با التهاب، آپوپتوز و مرگ سلولی می‌باشند. مسیر ERK نقش اساسی در انتقال سیگنال‌های میتوزن‌ها مانند فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) دارد که باعث رشد و تکثیر سلولی می‌شود. JNK از طریق یک سری مواد واسطه، p53 را فعال می‌کند و آن نیز پروتئین Bax را فعال می‌کند که شروع آپوپتوز است. قوی‌ترین فعال کننده ژن p38 استرس اکسیداتیو است. P38 می‌تواند باعث فعالیت زیاد فاکتور رونویسی NF-κB شود. این فاکتور رونویسی معمولاً سیستم ایمنی و التهاب را تحریک می‌کند (۹). Tian و همکاران در سال ۲۰۲۰ بیان داشتند که گورخرماهی‌های بالغ که در معرض ۱ میکرومول در لیتر کلرید کادمیوم قرار داشتند، فرزندان با درجات مختلف ناهنجاری تولید کردند. به‌عنوان نمونه سطح تری یدوتیرونین و تیروکسین در بالغین و نیز لاروها کاهش یافته بود (۱۰). Yang و همکاران در سال ۲۰۲۱ گزارش کردند که کادمیوم باعث فعال شدن مسیر پروتئین کینازهای تنظیم شده خارج سلولی (ERK) در غده تیروئید موش و آسیب غده تیروئید می‌شود (۱۱). تجمع کادمیوم در پانکراس موش‌ها می‌تواند باعث فعال سازی فاکتورهای التهابی TNFα، iNO و IL6 در خارج سلول و NF-κB در داخل هسته لکوسیت‌ها و در نتیجه ضایعات پانکراس در رت‌ها شود (۱۲). Leal و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثبات کردند که کادمیوم باعث تحریک MAPKها و فسفوریلاسیون Hsp27 در سلول‌های کرومافین آدرنال گاو می‌شود. بنابراین، سلول‌های کرومافین آدرنال یک هدف برای کادمیوم می‌باشند. و هر دو ERK1/2 و p38 فعال می‌شوند. علاوه بر این، Hsp27 در پاسخ به فعال شدن p38، بسیار فسفریله می‌شود. این اثرات بیوشیمیایی کادمیوم ممکن است عملکرد ترشحی طبیعی این سلول‌ها را مختل کند (۱۳). به طور مشابه، قرار گرفتن در معرض کادمیوم در بافت مغز جوجه‌ها باعث افزایش سطح بیان ژن‌های RIPK1، RIPK3 و MLKL و کاهش سطح کاسپاز ۸ می‌شود. در نتیجه کادمیوم در جوجه‌ها بیش از آپوپتوز باعث ایجاد نکروپتوز (Necroptosis) می‌شود (۱۴). در مطالعه حاضر برای مشخص شدن تأثیرات کادمیوم روی غده فوق کلیوی موش‌ها از سنجش بیان ژن‌های مربوط به التهاب استفاده شد.

مواد و روش کار

مدل‌ها و گروه‌های حیوانات: ده سر موش نژاد بلب سی نر با وزن ۲۰ گرم به عنوان حیوانات آزمایشی مورد استفاده قرار گرفتند. قوانین اخلاقی دانشگاه مربوط به نحوه نگهداری حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به دو گروه پنج سری کادمیوم و کنترل تقسیم شدند. موش‌ها در دمای کنترل شده 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت 50 ± 15 درصد و دوره نوری نرمال (۱۲ ساعت شب و ۱۲ ساعت روز) نگهداری شدند. گروه کادمیوم با یک رژیم غذایی پایه مکمل همراه با تزریق زیر پوستی ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم کلرید کادمیوم در هر روز به مدت چهار هفته نگهداری شدند (۱۵) و گروه کنترل با یک رژیم غذایی پایه تغذیه شدند. در طول فرایند تغذیه، غذا و آب آزادانه در اختیار حیوانات بود. موش‌ها بعد از چهار هفته از شروع آزمایش با فنوباریتال ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی مہرین کشی (euthanasia) شدند. سپس بافت غده آدرنال موش‌ها به سرعت جمع‌آوری و در نیتروژن مایع ذخیره شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی در زمان واقعی (qRT-PCR): برای این کار، RNA کل از بافت غده آدرنال استخراج شد و سپس به cDNA رونویسی شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است. مجموع واکنش حدود ۱۰ میکرولیتر به‌صورت دو محلول سایبرگرین میکس (SYBR Green mix) هر کدام ۵ میکرولیتر، یک میکرولیتر cDNA، ۰/۳ میکرولیتر پرایمر فوروارد، ۰/۳ میکرولیتر پرایمر معکوس و ۳/۴ میکرولیتر آب دوبار تقطیرشده (ddH₂O) بدون RNase صورت گرفت. در ادامه از دستگاه LightCycler[®]480 (BIOER، چین) استفاده شد. بتا اکتین به عنوان یک ژن مرجع برای سایر ژن‌ها استفاده شد. نتیجه نهایی با روش $2^{-\Delta\Delta C_t}$ پردازش گردید (۱۶).

بررسی هیستوپاتولوژیک (H&E): در روز پایانی مطالعه بافت‌های غدد فوق کلیوی به سرعت در فرمالدئید ۱۰ درصد حداقل به مدت ۲۴ ساعت ثابت شدند و در بلوک‌های پارافینی تهیه شده، مقاطع (ضخامت ۵ میکرومتر) برش داده شده، به دست آمد و با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) برای مشاهده میکروسکوپی رنگ‌آمیزی شد و از آنتی بادی ضد CD163 (خرگوشی ضد انسانی شرکت سما تشخیص، کد EP324) برای ایمونوهیستوشیمی استفاده شد.

بررسی آماری: داده‌ها به‌وسیله نرم افزار گراف‌پد پریسم ۹ با آزمون واریانس یک طرفه و تست توکی (Tukey) انجام شد. نمودارها نیز توسط همین نرم افزار (GraphPad Prism version 9.0) ترسیم شد.

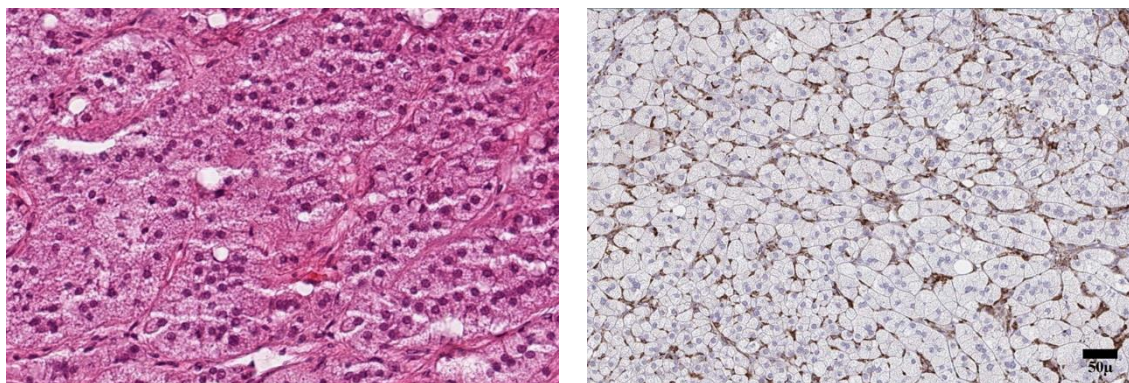
نتایج

فعال شدن مسیرهای NF-κB و MAPK پس از مواجهه با کادمیوم: ضمن یادآوری این‌که مشخصه فعال شدن MAPK فعال شدن مولکول P38 است، به منظور اثبات این‌که آیا مسیرهای NF-κB و P38 نقش تنظیمی در بافت آدرنال موش‌های گروه کادمیوم ایفا می‌کنند، سطوح بیان ژن‌های مرتبط با مسیر سیگنالینگ NF-κB و P38 بررسی شد. در مقایسه با گروه کنترل، سطح بیان NF-κB و P38 در گروه کادمیوم به‌طور قابل توجهی به ترتیب ۳/۳ و ۱/۸ برابر افزایش یافت ($P < 0.05$). نتایج نشان داد که مسیرهای P38 از مسیر NF-κB و MAPK در بافت آدرنال موش‌های آلوده به کادمیوم فعال می‌شوند.

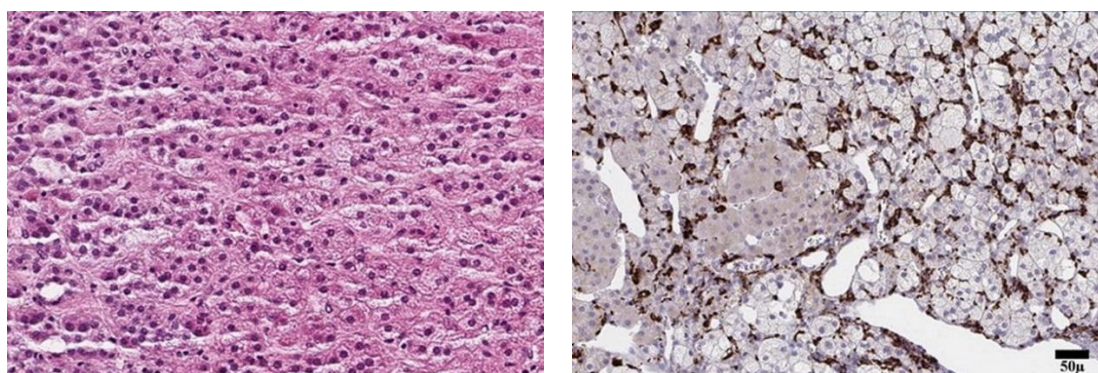
تغییرات پاتولوژیک: مشخص شد که ماکروفاژهای CD163 مثبت سایتوکاین‌های فیبروزدهنده بیشتری ترشح می‌کنند. بافت غده آدرنال گروه کنترل در تصویر ۱ A و B نشان داده شد. غدد فوق کلیوی در گروه کنترل گرد و پر از آسینوس بودند. غدد آدرنال در گروه کادمیوم دچار آتروفی آسینار و پیکنوز بودند. اکثر آسینارها پس از آتروفی فاقد شکل گرد بودند. مشاهدات ایمونوهیستوشیمی با بیشتر بودن ماکروفاژهای CD163 مثبت درون سینوزوئیدها بیانگر فیبروز ناشی از تأثیرات مهلک کادمیوم در غده فوق کلیوی بود (تصویر ۲ A و B).

جدول ۱. پرایمرهای مخصوص ژن استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی در زمان واقعی (qRT-PCR) (۱۷، ۱۸).

Reverse 5'to'3	Forward 5'to'3	ژن
AGGGTTGGTACTAGCAACGC	TGGCAGAAGCTATGAAACGA	NF-κB
UGUAUAUACUUCAGCCCUCTT	GAGGGCUGAAGUAUAUACATT	P38



تصویر ۱. A: نمای میکروسکوپی غده آدرنال سالم گروه کنترل با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (۱۰۰ برابر). B: ایمونوهیستوشیمی برای نشانگر CD163 که معرف میزان حضور ماکروفاژهای عامل فیبروز است (خط نشان دهنده ۵۰ میکرومتر است). همان طور که مشاهده می شود، تعداد ماکروفاژها اندک و طبیعی است.



تصویر ۲. A: نمای میکروسکوپی غده آدرنال با افزایش جمعیت هسته های تیره درون بافت گروه کادمیوم با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (۱۰۰ برابر). B: در ایمونوهیستوشیمی برای نشانگر CD163، تعداد ماکروفاژهای فیبروز دهنده بیشتری نسبت به گروه کنترل مشاهده می شود (خط نشان دهنده ۵۰ میکرومتر است).

بحث

گزارش های بسیاری بیان کرده اند که کادمیوم می تواند باعث التهاب و نکروپتوز (حالتی بین نکروز و آپوپتوز) در بافت های مختلف شود. Hesaraki و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که تحت شرایط تجربی غلظت های بالای کادمیوم در جیره (۵۰ و ۱۰۰ ppm) اثرات نکروز دهنده، آپوپتوز دهنده و دژنره کننده در کلیه ها و کبد جوجه های گوشتی ۸ هفته دارد (۱۹). Gharagozlou و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که غلظت های بالای کادمیوم در جیره (۵۰ و ۱۰۰ ppm) اثرات آپوپتوز دهنده و دژنره کننده در بورس فابریسیوس جوجه های گوشتی ۸ هفته دارد (۲۰). Xin و همکاران در سال ۲۰۲۰ نتیجه گرفتند که قرار گرفتن در معرض کادمیوم مسیر سیگنالینگ ALK4/5 را برای القای نکروپتوز در سلول های اپیتلیال لوله کلیوی فعال کرد. علاوه بر این، قرار گرفتن در معرض کادمیوم همچنین باعث فعال شدن مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT در لنفوسیت های خون محیطی مرغ می شود که منجر به نکروپتوز خواهد شد (۲۱). نتایج مطالعه حاضر تأیید کرد که قرار گرفتن در معرض کادمیوم مسیر NF-kB را فعال و باعث افزایش بیان عوامل التهابی شد. علاوه بر این، قرار گرفتن در معرض کادمیوم باعث فعال شدن مسیر MAPK شد که با افزایش بیان P38 نیز مشخص و منجر به نکروپتوز آدرنال شد. تغییرات زیادی مانند یوبیکوئیتین در فرآیند ترجمه پروتئین وجود داشت که منجر به تخریب جزئی پروتئین شد. بنابراین بیان mRNA با بیان پروتئین متناسب نیست. Lv و همکاران در سال ۲۰۲۱ بیان کردند که التهاب و نکروپتوز به طور جدایی ناپذیری مرتبط می باشند. گزارش شده است که در مطالعه استئاتوپاتیت غیرالکلی (NASH)، فرآیند التهاب در کبد باعث بروز نکروپتوز کبدی می شود و دلیل آن افزایش بیان گیرنده شماره یک TNF بود (۲۲). Nicolè و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان دادند که مسیر NF-kB اغلب به عنوان یک مسیر التهابی کلاسیک شناخته می شود و توانایی القای نکروپتوز را دارد. مسیر انتقال سیگنال پیش التهابی NF-kB منجر به فعال سازی RIPK1/RIPK3 شده و تحریک نکروپتوز سلولی را تحریک می نماید (۲۳). Zhang و همکاران در سال ۲۰۲۱ گزارش کردند که آلودگی لنفوسیت های مرغ با سرب باعث می شود سلول ها از طریق مسیر

MAPK/NF- κ B دچار نکروپتوز شوند (۲۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزایش بیان NF- κ B در گروه کادمیوم در روند ایجاد نکروپتوز نقش دارند. Ramesh و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که قرار گرفتن در معرض سرب، ژن‌های مسیر MAPK/NF- κ B (ERK, JNK, P38, NF- κ B و TNF- α) را برای ایجاد نکروپتوز تحریک می‌کند (۲۵). Liu و همکاران در سال ۲۰۲۲ گزارش کردند که آلودگی جگر مرغ با کادمیوم موجب بیان بیشتر ژن‌های MLKL, RIPK1, RIPK3, ERK, JNK و P38 و در نتیجه ایجاد نکروپتوز شده است (۲۶). در نتایج تجربی مطالعه حاضر روی کادمیوم بیان پروتئین‌های P38 به طور قابل توجهی در غدد فوق کلیوی افزایش یافت، که نشان داد مسیر سیگنالینگ MAPK فعال شده بود. سطوح چندین سایتوکاین و کموکاین در بیماری‌های مختلف کبدی، به ویژه در نارسایی شدید کبدی افزایش می‌یابد. ماکروفاژهای فعال ممکن است در تولید این تعدیل‌کننده‌های ایمنی نقش داشته باشند. CD163 عضوی از خانواده گیرنده‌ها است و عمدتاً روی ماکروفاژهای فعال بیان می‌شود و یک فرم محلول (sCD163) نیز دارد که از ماکروفاژهای فعال آزاد می‌شود. Hiraoka و همکاران در سال ۲۰۰۵ و Kazankov و همکاران در سال ۲۰۲۲ مشخص کردند که سطح sCD163 در سرم بیماران مبتلا به نارسایی شدید کبدی، هیپاتیت حاد با استفاده از روش الیزا اندازه‌گیری شد و بالاتر از افراد طبیعی بود. سطوح sCD163 در سرم بیماران مبتلا به نارسایی شدید کبدی از همه بالاتر بود. همچنین همبستگی خوبی بین سطوح سرمی sCD163 و زمان پروترومبین وجود داشت ($r = -0.677$; $P < 0.001$). این مطالعه گذشته نشان داد که محصولات ماکروفاژهای فعال ممکن است در پاتوژنز نارسایی شدید کبدی نقش داشته باشند و نقش sCD163 ممکن است دارای اهمیت پیش‌آگهی در فیبروز باشد که در نارسایی شدید کبدی شاهد هستیم (۲۷). نتیجه مطالعه حاضر با یافته‌های بسیاری از نکروپتوزهای مشاهده شده در نتایج رنگ‌آمیزی H&E مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کادمیوم با فعال کردن مسیرهای NF- κ B و MAPK و ضایعات پاتولوژیک باعث نکروپتوز در غده فوق کلیوی می‌شود. این یافته‌ها مبنایی نظری برای مطالعه بر روی مکانیسم مسمومیت با کادمیوم فراهم می‌کند که بیانگر التهاب و نکروپتوز در بافت غده آدرنال است.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر در مورد ارتباط مسمومیت به‌وسیله کادمیوم با بیان ژن‌های NF- κ B/MAPK و CD163 در غده فوق کلیوی موش توسط واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران حمایت شده است. از مهندس محمد عابدی (کارشناس آزمایشگاه دامپزشکی) برای تهیه برش‌ها و رنگ‌آمیزی بافتی قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

- Zhang Y, Liu Q, Yin H, Li S. Cadmium exposure induces pyroptosis of lymphocytes in carp pronephros and spleens by activating NLRP3. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020;202:110903. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110903 PMID: 32800238
- Aja PM, Izekwe FI, Famurewa AC, Ekpono EU, Nwite FE, Igwenyi IO, et al. Hesperidin protects against cadmium-induced pancreatitis by modulating insulin secretion, redox imbalance and iNOS/NF- κ B signaling in rats. *Life Sci.* 2020;259. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118268 PMID: 32800830
- Monaco A, Capriello T, Grimaldi MC, Schiano V, Ferrandino I. Neurodegeneration in zebrafish embryos and adults after cadmium exposure. *Eur J Histochem.* 2017;61(4):2833. doi: 10.4081/ejh.2017.2833
- Osukoya OA, Oyinloye BE, Ajiboye BO, Olokode KA, Adeola HA. Nephroprotective and anti-inflammatory potential of aqueous extract from *Persea americana* seeds against cadmium-induced nephrotoxicity in Wistar rats. *Biometals.* 2021;34(5):1141-53. doi: 10.1007/s10534-021-00333-w PMID: 34365580
- Imam RA, Motawei AG, Abd Algaleel W. Cadmium-induced adrenal cortical autophagy in rats: possible modulation by sildenafil. *Folia Morphol.* 2020;79(4):709-19. doi: 10.5603/FM.a2019.0126 PMID: 31777946

6. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B-e, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22(2):153-83. [doi: 10.1210/edrv.22.2.0428](https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428) [PMID: 11294822](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11294822/)
7. Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Investig.* . 2001;107(1):7-11. [doi: 10.1038/s41392-020-00312-6](https://doi.org/10.1038/s41392-020-00312-6)
8. Antar SA, El-Gammal MA, Hazem RM, Moustafa YM. Etanercept mitigates cadmium chloride-induced testicular damage in rats "an insight into autophagy, apoptosis, oxidative stress and inflammation". *Environ Sci Pollut Res.* . 2022;29:28194–207. [doi: 10.1007/s11356-021-18401-6](https://doi.org/10.1007/s11356-021-18401-6) [PMID: 34993805](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34993805/)
9. Ye W, Yan Y, Tang Y, Dong X, Chen G, Kang J, et al. Orexin-a attenuates inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced neural stem cells by regulating NF-KB and phosphorylation of MAPK/P38/Erk pathways. *J Inflamm Res.* 2021;14:2007-17. [doi: 10.2147/JIR.S308078](https://doi.org/10.2147/JIR.S308078)
10. Tian J, Hu J, He W, Zhou L, Huang Y. Parental exposure to cadmium chloride causes developmental toxicity and thyroid endocrine disruption in zebrafish offspring. *Comp Biochem Physiol.* 2020;234:108782. [doi: 10.1016/j.cbpc.2020.108782](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108782) [PMID: 32339758](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32339758/)
11. Yang H, Xing R, Liu S, Li P. Effect of fucoxanthin administration on thyroid gland injury induced by cadmium in mice. *Biol Trace Elem Res.* . 2021;199(5):1877-84. [doi: 10.1007/s12011-020-02291-9](https://doi.org/10.1007/s12011-020-02291-9) [PMID: 32691210](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32691210/)
12. Aja PM, Izekwe FI, Famurewa AC, Ekpono EU, Nwite FE, Igwenyi IO, et al. Hesperidin protects against cadmium-induced pancreatitis by modulating insulin secretion, redox imbalance and iNOS/NF- κ B signaling in rats. *Life Sci.* 2020;259:118268. [doi: 10.1016/j.lfs.2020.118268](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118268) [PMID: 32800830](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32800830/)
13. Leal RB, Posser T, Rigon AP, Oliveira CS, Gonçalves CA, Gelain DP, et al. Cadmium stimulates MAPKs and Hsp27 phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. *Toxicol.* 2007;234(1):34-43. [doi: 10.1016/j.tox.2007.01.023](https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.01.023) [PMID: 17335952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17335952/)
14. Liu L, Liu Y, Cheng X, Qiao X. The alleviative effects of quercetin on cadmium-induced necroptosis via inhibition ROS/iNOS/NF- κ B pathway in the chicken brain. *Biol Trace Elem Res.* 2021;199(4):1584-94. [doi: 10.1007/s12011-020-02563-4](https://doi.org/10.1007/s12011-020-02563-4) [PMID: 33398654](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33398654/)
15. Liu Q, Wang W, Zhang Y, Cui Y, Xu S, Li S. Bisphenol a regulates cytochrome P450 1B1 through miR-27b-3p and induces carp lymphocyte oxidative stress leading to apoptosis. *Fish Shellfish Immunol.* 2020;102:489-98. [doi: 10.1016/j.fsi.2020.05.009](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.009) [PMID: 32430284](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32430284/)
16. Hesaraki S, Gharagozlou M, Amoli JS, Bokae S, Vaighan AJ. Histopathological and ultrastructural changes of kidneys in response to cadmium chloride toxicity in broiler chickens. *J Vet Res.* 2010;65(4):281-8.
17. Gharagozlo MJ, Gharagozlou MJ, Nikbakht Broujeni GR, Salar Amoli J, Bokae S, Hesaraki S. the effect of different levels of cadmium on histopathological changes and the rate of lymphoid cells apoptosis of bursa of fabricius in broiler chickens. *J Vet Res.* 2011;66(3):193-201.
18. Xin C, Guangliang S, Qing Z, Qingqing L, Hang Y, Yiming Z, et al. Astilbin protects chicken peripheral blood lymphocytes from cadmium-induced necroptosis via oxidative stress and the PI3K/Akt pathway. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020;190:110064. [doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.110064](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110064) [PMID: 31838230](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31838230/)
19. Lv F, Yang L, Wang J, Chen Z, Sun Q, Zhang P, et al. Inhibition of TNFR1 attenuates LPS induced apoptosis and inflammation in human nucleus pulposus cells by regulating the NF-KB and MAPK signalling pathway. *Neurochem Res.* 2021;46(6):1390-9. [doi: 10.1007/s11064-021-03278-1](https://doi.org/10.1007/s11064-021-03278-1) [PMID: 33713325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33713325/)
20. Nicolè L, Sanavia T, Cappellesso R, Maffei V, Akiba J, Kawahara A, et al. Necroptosis-driving genes RIPK1, RIPK3 and MLKL-p are associated with intratumoral CD3+ and CD8+ T cell density and predict prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Immunother Cancer.* 2022;10(3):e004031. [doi: 10.1136/jitc-2021-004031](https://doi.org/10.1136/jitc-2021-004031)
21. Zhang J, Hao X, Xu S. Selenium prevents lead-induced necroptosis by restoring antioxidant functions and blocking MAPK/NF- κ B pathway in chicken lymphocytes. *Biol Trace Elem Res.* 2020;198(2):644-53. [doi: 10.1007/s12011-020-02094-y](https://doi.org/10.1007/s12011-020-02094-y) [PMID: 32279190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32279190/)

22. Ramesh GT, Manna SK, Aggarwal BB, Jadhav AL. Lead exposure activates nuclear factor kappa B, activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase and caspases in the rat brain. *Toxicol Lett.* 2001;123(2-3):195-207. [doi: 10.1016/S0378-4274\(01\)00395-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00395-2) [PMID: 11641047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11641047/)
23. Liu L, Zhao L, Liu Y, Yu X, Qiao X. Rutin ameliorates cadmium-induced necroptosis in the chicken liver via inhibiting oxidative stress and MAPK/NF- κ B pathway. *Biol Trace Elem Res.* 2022;200(4):1799-810. [doi: 10.1007/s12011-021-02764-5](https://doi.org/10.1007/s12011-021-02764-5) [PMID: 34091842](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34091842/)
24. Hiraoka A, Horiike N, Akbar SMF, Michitaka K, Matsuyama T, Onji M. Soluble CD163 in patients with liver diseases: very high levels of soluble CD163 in patients with fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol.* 2005;40(1):52-6. [doi: 10.1007/s00535-004-1493-8](https://doi.org/10.1007/s00535-004-1493-8) [PMID: 15692789](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15692789/)
25. Kazankov K, Bojsen-Møller KN, Møller HJ, Madsbad S, Grønbæk H. Macrophage activation marker sCD163 is associated with liver injury and hepatic insulin resistance in obese patients before and after Roux-en-Y gastric bypass. *Physiol Rep.* 2022;10(2):e15157. [doi: 10.14814/phy2.15157](https://doi.org/10.14814/phy2.15157)
26. Hettinghouse A, Fu W, Liu C-J. Monitoring Atsttrin-Mediated Inhibition of TNF α /NF- κ B Activation through in Vivo Bioluminescence Imaging. *Methods Mol Biol.* 2021;2248:201-10. [doi: 10.1007/978-1-0716-1130-2_14](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1130-2_14)
27. Zhu J, Wang Y, Cao Z, Du M, Hao Y, Pan J, et al. Irisin promotes cementoblast differentiation via p38 MAPK pathway. *Oral Dis.* 2020;26(5):974-82. [doi: 10.1111/odi.13307](https://doi.org/10.1111/odi.13307) [PMID: 32068933](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32068933/)



Evaluation of Skin Repairing and Antifungal Properties of Alcoholic Extract of *Laleh abbasi* (*Mirabilis jalapa*) Leaf on Induced Wounds in Laboratory White Rat Model

Behran Zamani Raad¹, Seyed Hossein Mardjanmehr², Farhang Sasani²,
Alireza Khosravi³, Mohammad Javad Gharagozlou²

¹ Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

² Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 15 March 2023, Accepted: 26 December 2022



[10.22059/jvr.2022.340558.3247](https://doi.org/10.22059/jvr.2022.340558.3247)



[20.1001.1.20082525.1402.78.1.2.4](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1402.78.1.2.4)

Abstract

BACKGROUND: Based on the historical and recently published documents, it has been demonstrated that *Mirabilis jalapa* as a herbal medicine may be used as remedies for various health problems included wound healing purposes.

OBJECTIVES: The present study aimed to investigate the effect of ethanolic extract of *Laleh abbasi* green leaf on healing open wounds induced by skin puncture in the back of rats.

METHODS: Collecting and drying *Laleh abbasi* leaves, leaf extracting through Soxhlet procedure, analyzing the extract via gc/ms method, and preparing eucerin-based extract ointment were done according to recommended routine procedures. Herein, we recruited 40 male rats that were randomly divided into five groups of eight, namely the control, phenytoin treatment, eucerin, 5% eucerin extract, and 7.5% eucerin extract ointment treatment groups. Skin puncture and application of ointments on the induced wounds were carried out. Subsequently, tissue samples were taken on days 3, 7, 10, and 14, followed by which histological slides were prepared and stained with H&E and Masson's trichrome staining methods. In vitro mycological studies were conducted using opportunistic fungi, including *Candida*, *Mucor*, and *Aspergillus* species.

RESULTS: Based on the macroscopic evaluations of the wound healing process and microscopic assessments of tissue samples stained with Harris H&E and Masson's trichrome methods, the groups treated with eucerin-based ointments containing ethanolic extract of *Laleh abbasi* leaf had statistically significant positive wound healing responses compared to the other groups. However, the 7.5% ointment group showed statistically better responses compared to the 5% ointment group. The data obtained in the present preliminary experiment on rat model indicated that the extract could facilitate the wound healing process in terms of healing parameters, such as accelerating epithelium repair, creating a favorable inflammatory reaction, angiogenesis, fibroplasia, and collagen precipitation. The antifungal effects of ethanolic extract of *Laleh abbasi* leaves on *Aspergillus fumigatus*, *fusarium*, *Candida albicans* and *Candida cruzei* were demonstrated in vitro using saboro dextrose agar medium.

CONCLUSIONS: According to the findings of this experimental study and the findings of other researchers, it can be concluded that ethanolic extract from *Laleh abbasi* leaves is of healing and antifungal properties.

Keywords: Antifungal effects, Ethanolic extract, histopathology study, Induced skin wound healing, *Laleh abbasi* flower leaf

Copyright © Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s)
Publisher: University of Tehran

Corresponding author: Mohammad Javad Gharagozlou, Tel/Fax: 021-66933222



How to cite this article:

Zamani Raad, B., Mardjanmehr, S. H., Sasani, F., Khosravi, A., Gharagozlou, M. J. Evaluation of Skin Repairing and Antifungal Properties of Alcoholic Extract of *Laleh abbasi* (*Mirabilis jalapa*) Leaf on Induced Wounds in Laboratory White Rat Model. J Vet Res, 2023; 78(1): 9-19. doi: 10.22059/jvr.2022.340558.3247

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Extraction and analysis of specimens with gas chromatography/mass spectrometry method.

Table 2. Effect of different treatments on the inflammatory reaction, neovascularization, fibroplasia, collagen precipitation, and epithelial tissue formation (mean ± standard deviation) on the 10th day of the experiment.

Table 3. Effect of different treatments on the inflammatory reaction, neovascularization, fibroplasia, collagen precipitation, and epithelial tissue formation (mean ± standard deviation) on the 14th day of the experiment.

Table 4. Effect of different treatments on wound diameters (mean ± standard deviation) and wound area (mean ± standard deviation) during the experiment.

Diagram 1. The effect of ointment treatment on the average ± standard deviation of wound area size (mm²) on different days of the experiment.

Figure 1. A. Photomicrograph of the group treated with 7.5% ointment group, B. From the healing ulcer treated with 7.5% ointment on day 7, C. From the group treated with the 7.5% ointment, D. From the group treated with the 7.5% ointment on day 14.

Figure 2. A. The treatment group with 5% ointment on day 14, B. The treatment group with eucerin on day 14, C. The phenytoin treatment group on day 14, D. The control group on day 14.



اثرات عصاره الکلی برگ گل لاله عباسی (*Mirabilis jalapa*) بر روی روند ترمیم زخم باز پوستی القایی در مدل رت و خاصیت ضدقارچی آن

بهران زمانی راد^۱، سیدحسین مرجانمهر^۲، فرهنگ ساسانی^۲، علیرضا خسروی^۳، محمد جواد قراگزلو^۲

^۱ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲ گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۳ گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۵ دی ماه ۱۴۰۱، تاریخ پذیرش: ۲۴ اسفند ماه ۱۴۰۱



[10.22059/jvr.2022.340558.3247](https://doi.org/10.22059/jvr.2022.340558.3247)



[20.1001.1.20082525.1402.78.1.2.4](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1402.78.1.2.4)

چکیده

زمینه مطالعه: بر اساس مدارک و مستندات تاریخی و مقالاتی که اخیراً به چاپ رسیده است نشان داده شده که گیاه گل لاله عباسی به عنوان یک گیاه دارویی ممکن است برای مقاصد درمانی از جمله ترمیم زخم مورد استفاده قرار گیرد.

هدف: مطالعه تجربی چگونگی اثر عصاره اتانولی برگ گل لاله عباسی بر روی ترمیم زخم باز ایجاد شده به وسیله پانچ پوستی در ناحیه پشت رت و خاصیت ضدقارچی آن در خارج از بدن در آزمایشگاه.

روش کار: جمع آوری گیاه و خشک نمودن برگ گل لاله عباسی، عصاره گیری به روش سوکسله، آنالیز عصاره به روش Gas chromatography/Mass spectrometry (GC/MS)، تهیه پماد از عصاره بر پایه اوسرین، فراهم آوری ۴۰ سر رت نر، تقسیم اتفاقی رت‌ها به ۵ گروه ۸ تایی شامل گروه کنترل، گروه درمان با فنی‌توئین ۱ درصد، گروه‌های اوسرین شامل گروه‌های درمان با پماد اوسرین به تنهایی و اوسرین حاوی ۵ درصد و ۷/۵ درصد عصاره اتانولی برگ گل لاله عباسی. ایجاد پانچ پوستی و کاربرد پمادها در طول دوره مطالعه بر زخم‌های پوستی، نمونه برداری از زخم‌ها در روز ۳، ۷، ۱۰ و ۱۴، تهیه لام و رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین و ائوزین و ماسون تری کروم، بررسی آسیب‌شناسی نمونه‌های اخذ شده و بررسی اثر عصاره گیاه بر روی قارچ‌های فرصت طلب به روش Minimum inhibitory concentration (MIC).

نتایج: بررسی‌های میکروسکوپی روند ترمیم زخم‌ها و مشاهده نمونه‌های بافتی رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین هاریس و ماسون تری کروم نشان داد که درمان با عصاره اتانولی برگ گل لاله عباسی در اوسرین از لحاظ پارامترهای التیامی از قبیل تسریع در ترمیم اپیتلیوم، ایجاد شرایط مطلوب رگ‌زایی، فیبروپلازی و ترسیب کلاژن و واکنش التهابی تأثیر مثبتی در ترمیم زخم دارد. به ویژه در روز ۱۰ و ۱۴ درمان، تأثیر عصاره ۷/۵ درصد از نظر آماری در مقایسه با گروه ۵ درصد و سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری مطلوب‌تر بود. به علاوه اثر ضدقارچی عصاره اتانولی برگ گل لاله عباسی بر روی گونه‌های اسپریژیلوس فومیگاتوس، فوزاریوم، کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا کروزی در کشت روی سابورو دکستروز آگار نشان داده شد.

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر تجربی و یافته‌های سایر محققین می‌توان به این نتیجه رسید که عصاره اتانولی برگ گل لاله عباسی علاوه بر داشتن خاصیت ضدالتهابی و ضد میکروبی می‌تواند شرایط مطلوب‌تری را برای ترمیم زخم‌های پوستی فراهم کند.

کلمات کلیدی: اثرات ضدقارچی، برگ گل لاله عباسی، ترمیم زخم القایی پوستی، عصاره اتانولی، مطالعه آسیب‌شناسی

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: محمد جواد قراگزلو، گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

ترمیم زخم از دیرباز یکی از مهم‌ترین و اساسی‌ترین مشکلاتی است که بشر از ابتدای خلقت با آن مواجه بوده است. امروزه برای این معضل از داروها و پمادهای بسیاری برای ترمیم زخم‌های باز استفاده می‌شود که هر کدام از آن‌ها ممکن است عوارض و نقایصی را به همراه داشته باشند

(۱، ۲). گیاه لاله عباسی از جمله گیاهانی است که در طب سنتی موارد کاربرد بسیاری داشته و به عنوان مسهل، درمان بیماری‌های انگلی کرمی، التیام زخم و زخم‌های ناشی از سوختگی، رسانیدن دمل و تحلیل ورم و رفع التهاب، جوش و کورک، فلگمون، درمان عوارض بیماری‌های ادراری تناسلی مانند سوزاک، اسپاسم عضلانی، رفع کبودی، استفاده می‌شود. همچنین در برخی کشورهای آمریکای جنوبی عصاره برگ‌های این گیاه را برای درمان التهاب به کار می‌برند. در کشور برزیل بومی‌های این منطقه از جوشانده ریشه این گیاه جهت شستشوی زخم‌ها و درمان ضایعات پوستی استفاده می‌کنند (۳-۵).

امروزه مطالعات بسیاری بر روی استفاده از روش‌های درمانی نوین صورت گرفته است، تا به کمک این روش‌ها بتوان به اهدافی از قبیل تسریع روند ترمیم زخم، جلوگیری از عفونی شدن زخم و کم کردن بار میکروبی زخم، افزایش قدرت کشسانی بستر زخم، کاهش اندازه اسکار زخم، ایجاد ضمایم پوستی در موضع ترمیم و کاهش درد و آلام بیمار دست یافت (۶).

هم اکنون در بسیاری از کشورها برای درمان جراحات پوستی از محلول‌های ضد عفونی کننده نظیر بتادین، سرم فیزیولوژیک، اسید استیک، کلرهگزیدین، پمادهای آنتی‌بیوتیک و کورتیکواستروئیدها از جمله هیدروکورتیزون استفاده می‌شود که مطالعات اخیر از احتمال سمی بودن و نامناسب بودن بسیاری از این مواد برای عوامل اصلی دخیل در روند ترمیم زخم به خصوص آنژیوبلاست‌ها، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های آماسی از جمله نوتروفیل‌ها، سلول‌های دودمان منوسیت-ماکروفاژ و لنفوسیت‌ها حکایت می‌کند. مطالعات بسیاری بر روی روند ترمیم زخم صورت گرفته که حاصل آن مواد متفاوتی است که به صورت مرهم برای زخم‌ها تهیه و به بازار عرضه شده‌اند که اغلب این مواد به صورت ترکیبات گیاهی و گاهی شیمیایی بوده‌اند، اما تا کنون هیچ کدام از این مواد به صورت یک داروی کاملاً رضایت‌بخش مورد توجه و تأیید قرار نگرفته است (۷).

گل لاله عباسی با نام علمی میرابیلیس جالپا گیاهی از خانواده *Nyctaginaceae* که با نام‌های دیگری چون لاله چولاغاسی، لاله مقرایی، *Marvilha*, *Bonina* و گل عباس شناخته می‌شود. آنالیز ترکیبات شیمیایی قسمت‌های مختلف گیاه لاله عباسی حضور عواملی از قبیل آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، فنل‌ها، استروئیدها، تربیتین‌ها، گلیکوزیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها و لیگنین‌ها را ثابت کرده است (۸).

مرور نوشته‌های قدیمی و مطالعات اخیر حاکی از این است که بخش‌های مختلف گیاه لاله عباسی با داشتن ترکیبات مفید و بی‌ضرر دارای خواص طبی متعددی می‌باشد (۹، ۱۰). با توجه به اهمیت بهبود و تسهیل روند ترمیم زخم‌های باز پوستی پماد متشکل از مخلوطی از اوسرین به‌عنوان حامل و عصاره اتانولی برگ سبز گل لاله عباسی بر روی زخم پوستی تجربی در موش سفید آزمایشگاهی با استفاده از روش‌های آسیب‌شناسی مورد آزمایش قرار گرفت. به علاوه نظر به این‌که عوامل میکروبی از جمله قارچ‌های فرصت طلب ممکن است زخم باز را مورد تهاجم قرار دهند، اثرات ضد قارچی این عصاره در شرایط برون تنی ارزیابی شد (۱۰).

مواد و روش کار

برگ‌های سبز گیاه لاله عباسی از باغ‌ها و باغچه‌ها جمع‌آوری شد. این گیاه به شماره ۲۱۳۴۹ در هرباریوم دانشگاه تهران به ثبت رسیده است. برگ‌های جمع‌آوری شده را به هرباریوم انتقال داده و بعد از اطمینان حاصل نمودن از گیاه با نمونه ثبت شده در این هرباریوم ادامه روند مطالعه آغاز گردید. برگ‌های جمع‌آوری شده توسط آب مقطر شستشو و به مدت ۲ هفته در دمای اتاق خشک شدند. میزان ۲۰۰ گرم از برگ خشک شده را کاملاً آسیاب کرده سپس پودر را در یک بشر مناسب ریخته و اتانول ۷۰ درصد به اندازه‌ای به آن اضافه شد که پس از مخلوط کردن به ماده خمیری شکلی تبدیل شود. سپس آن را در کیسه‌های متقالی که متناسب با حجم سوکسله تهیه شده بود ریخته تا نصف ظرف پر شود ست سوکسله را روی بالن که در جایگاه اجاق الکتریکی قرار دارد گذاشته و با گیره تثبیت شد. از بالای محفظه سوکسله اتانول ۷۰ درصد را کم‌کم اضافه کرده تا نصف حجم بالن را پر کند. میرد را بر روی سوکسله قرار داده و جریان آب سرد بر قرار شد. سپس اجاق الکتریکی را روشن کرده و درجه آن طوری تنظیم گردید تا حلال درون بالن به طور متعادل بجوشد. عمل عصاره‌گیری تا ۵۰ ساعت به طول انجامید. پس از پایان عصاره‌گیری دستگاه خاموش، تفاله‌های گیاه که فاقد عصاره است را دور ریخته و عصاره مایع درون بالن را با قیف و کاغذ صافی صاف نموده و بر حسب دستورالعمل مورد استفاده قرار گرفت. در پایان جهت ساخت پمادهای درمانی، مقدار ۵ گرم یا ۷/۵ گرم از عصاره خشک شده برگ لاله عباسی را به ترتیب به ۹۵ گرم و ۹۲/۵ گرم پماد پایه (اوسرین) به شکل وزنی - وزنی اضافه شد، تا به ترتیب پمادهای ۵ درصد

و ۷/۵ درصد به دست آید (۱۱).

حیوانات مورد مطالعه: در مطالعه حاضر از ۴۰ سر رت نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. دو هفته قبل از مطالعه این رت‌ها به حیوان خانه منتقل و در قفس‌های استاندارد تحت شرایط نوردی کنترل شده ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ثابت 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در حین مطالعه تمام حیوانات آزادانه به پلت و آب تازه دسترسی داشتند. مطالعه حاضر تمام ملاحظات اخلاقی و پروتوکول‌های کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی، مورد تأیید کمیته نظارت بر روی حقوق حیوانات آزمایشگاهی انجام شد (۱۲).

روش القاء بیهوشی و ایجاد زخم: القاء بیهوشی با تزریق زایلازین هیدروکلراید ۲ درصد با دز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کتامین هیدروکلراید ۵ درصد با دز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۱۳) به صورت داخل صفاقی انجام شد. هر رت روی میز جراحی در وضعیت شکمی قرار گرفته و پس از موچینی پشت حیوان توسط اتانول ۷۰ درصد و محلول صابونی پویدن آیدواین، ضد عفونی و سپس با کمک پانچ بیوپسی ۸ میلی‌متری شرکت KAI ژاپن زخم‌هایی با تمام ضخامت بر روی پشت حیوان ایجاد گردید. در روزهای ۳، ۷، ۱۰ و ۱۴ قطر زخم اندازه‌گیری و به منظور بررسی آسیب‌شناسی نمونه بافتی از زخم در حال ترمیم برداشته شد. برای جلوگیری از ایجاد مداخله در روند مطالعه هر رت پس از برداشت نمونه بافتی، از روند مطالعه کنار گذاشته شد.

روش کاربرد پماد: در مطالعه حاضر ۴ نوع پماد موضعی مورد استفاده قرار گرفت. رت‌ها به صورت اتفاقی به ۵ گروه ۸ تایی تقسیم شدند: گروه اول به عنوان شاهد هیچ گونه درمانی دریافت نکردند، گروه دوم به عنوان دارونما فقط با شم دارو یعنی اوسرین مورد تیمار قرار گرفتند، گروه سوم پماد اوسرین حاوی ۵ درصد عصاره اتانولی برگ گل لاله عباسی، گروه چهارم پماد اوسرین حاوی ۷/۵ درصد عصاره اتانولی برگ گل لاله عباسی و گروه پنجم به عنوان گروه کنترل مثبت با پماد فنی‌توئین ۱ درصد ساخت شرکت داروسازی کیش مدیفارم که به صورت تجاری در دسترس بود مورد تیمار قرار گرفتند. به استثنای گروه کنترل تمام گروه‌ها روزانه یک بار پماد را دریافت کردند (۱۴).

بررسی آسیب‌شناسی: در روزهای ۳، ۷، ۱۰ و ۱۴ پس از ایجاد زخم و بعد از القاء بیهوشی عمومی قطعه‌ای از زخم در حال ترمیم با تمام ضخامت همراه با ۲ میلی‌متر از حاشیه پوست سالم از حیوان مورد مطالعه جدا و بلافاصله در داخل ظرف حاوی فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار داده شد. سپس فرمالین نمونه‌های پوستی بعد از ۲۴ ساعت تعویض گردید. نمونه‌های پایدار شده در دستگاه هیستوپیکت فرآوری، قالب‌گیری در پارافین، تهیه مقاطع با ضخامت ۵ میکرون با دستگاه میکروتوم و در انتها با روش هماتوکسیلین و ائوزین هاریس و ماسون تری‌کروم به منظور مطالعه روند ترمیم از جمله مراحل آماسی، تشکیل بافت جوانه‌گوشتی، اپیتلیالیزاسیون و ترسیب کلاژن رنگ‌آمیزی شدند. شمار سلول‌های آماسی پلی‌مورفونوکلیر، عروق خونی تازه تشکیل، فیبروبلاست‌ها، فیبروسیت‌ها و حضور الیاف چسبگن در هر میلی‌متر مربع زخم در حال ترمیم توسط نرم افزار ANIX با بزرگ‌نمایی ۴۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ مورد ارزیابی قرار گرفت.

تحلیل آماری داده‌ها: اطلاعات به دست آمده با استفاده از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA)، مورد واکاوی آماری قرار گرفتند. تفاوت در ($P < 0.05$) معنی‌دار در نظر گرفته شد. یافته‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار (mean \pm S.D) نشان داده شد.

شناسایی مواد موجود در عصاره الکی برگ گل لاله عباسی به روش GC/MS: با بهره‌گیری از دستگاه کروماتوگرافی گازی طیف‌سنجی جرمی عصاره الکی برگ گل لاله عباسی آنالیز شد.

بررسی اثر ضد قارچی عصاره: به منظور انجام مطالعه حاضر از ۱۰ رقت عصاره الکی برگ سبز لاله عباسی (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر) استفاده گردید که شامل ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ بودند.

جدایه‌های قارچی رشته‌ای شامل اسپریژیلوس فومیگاتوس، فوزاریوم، کاندیدا آلبیکانس و کاندیدا کروزه‌ای در محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شده و در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته انکوبه شدند. بعد از یک هفته به میزان ۵ میلی‌لیتر از محلول Physiology serum + tween80 (PST) (حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی نرمال + ۱۰ میکرولیتر توئین ۸۰ و سپس اتوکلاو محلول) روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار اضافه و با لوپ استریل کاملاً سطح کلنی‌ها شست‌وشو، تهیه سوسپانسیون قارچی و ورتکس آن به مدت ۱۵ ثانیه و قرار دادن آن به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در آزمایشگاه تا میسیلیوم‌ها ته نشین و اسپورها در تعلیق قارچی باقی بماند. در ادامه،

این سوسپانسیون به وسیله سمپلر به لوله دیگر منتقل و به وسیله لام نئوبار تعداد اسپورها شمارش شدند. تعداد استاندارد کونیدی‌های قارچی باید $5 \times 10^6 - 2$ کونیدی بر میلی‌لیتر باشد و طبق پروتوکول قارچ‌های رشته‌ای، برای به دست آوردن تعداد $5 \times 10^5 - 2$ کونیدی بر میلی‌لیتر و غلظت نهایی، دوباره با آب مقطر استریل رقت یک دهم تهیه، تا سوسپانسیون نهایی برای انجام آزمون حساسیت دارویی و انجام آزمون MIC آماده شود. در مورد قارچ‌های مخمری، رقت $5 \times 10^6 - 2$ کونیدی بر میلی‌لیتر در محیط سابورو براث تهیه شد (۱۵).

تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد یا MIC: برای سنجش MIC از روش میکرودايلوشن استفاده شد. برای این منظور میکروپلیت‌های ۹۶ خانه ته صاف استریل به همراه محیط سابورو دکستروزبراث به کار گرفته شد. پایین‌ترین غلظتی که از رشد قارچ جلوگیری کند به عنوان MIC ماده ضد قارچی در نظر گرفته می‌شود که بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد (۱۶).

یکصد میکرولیتر از هر یک از رقت‌های تهیه شده عصاره الکلی برگ سبزل لاله عباسی در محیط سابورو دکستروز براث در میکروپلیت‌های مسطح ۹۶ خانه‌ای به هر چاهک اضافه شد. بدین ترتیب چاهک اول حاوی بیشترین غلظت و چاهک دهم حاوی کمترین غلظت بود. به گوده‌های ۱۱ و ۱۲ به عنوان کنترل مثبت و منفی هیچ‌گونه عصاره‌ای اضافه نشد. به دنبال آن به هر یک از گوده‌ها به میزان ثابت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون استاندارد قارچی اضافه نموده تا حجم نهایی مخلوط برابر با ۲۰۰ میکرولیتر شود. گوده ۱۱ حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچی به عنوان کنترل مثبت یا Growth control (GC) و گوده ۱۲ که فقط حاوی محیط کشت بود به عنوان کنترل منفی Sterility control (SC) در نظر گرفته شد. این آزمون برای هر جدایه قارچی در ردیف افقی مجزا و به صورت دوبار تکرار انجام شد (۱۷).

در این آزمون بیشترین غلظت در گوده اول معادل ۱۰۰۰۰ و کمترین غلظت در گوده دهم برابر با ۶۲/۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر بود. این پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه و بعد از گذشت دوره انکوباسیون میکروپلیت‌ها از انکوباتور خارج و به صورت چشمی قرائت شدند. گوده‌ای که مانع رشد قارچ گردیده به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

جدول ۱. عناصر جدا شده و آنالیز عصاره به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی/ طیف سنجی جرمی.

شماره	دور (دقیقه)	محل	نام	کیفیت	شماره جداسازی	درصد
۱	۲۱/۷۲	۶۰۹۰۳۰۷	نئوفیتادین	۹۱	۰۰۰۱۵۰-۸۶-۷	۱۸/۷۳
۲	۲۲/۳۴۸	۲۴۵۲۳۵۶	۲-هگزادکان-۱-ال-۱-۱-۳،۷،۱۱،۱۵-تترامیتیل	۵۱	۰۰۰۰۰۰-۰۰۰-۰	۷/۵۴
۳	۲۲/۹۸۶	۱۰۲۸۶۸۴	متیل پالمیتات	۴۶	۰۰۰۱۱۲-۳۹-۰	۳/۱۶
۴	۲۴/۶۵۷	۱۲۹۹۰۵۹	پالمیتیک اسید، تریمتیل سیلیل استر	۵۲	۰۱۸۶۰۳-۱۷-۳	۳/۹۹
۵	۲۵/۵۱۳	۹۸۳۰۴۶۵	فیتول	۹۰	۰۰۰۱۵۰-۸۶-۷	۳۰/۲۳
۶	۲۶/۳۴۸	۱۴۶۹۰۳۲	سیلان [۱۵،۱۱،۷،۳]-تترامیتیل-۲-هگزادکانیل(اکسی) تریمتیل	۹۰	۰۵۷۳۹۷-۳۹-۴	۴/۵۲
۷	۳۷/۶۴۴	۵۰۴۲۴۸۹	ویتامین ای	۹۸	۰۱۰۱۹۱-۴۱-۰	۱۵/۵۱
۸	۴۰/۴۸۷	۱۴۳۵۹۴۳	(اس)-(ای)-(-)-۴-استوکسی-۱-فنیل-۲-دودکان-۱-یک	۴۳	۰۰۰۰۰۰-۰۰۰-۰	۴/۴۲
۹	۴۱/۲۹۲	۳۸۷۲۲۲۳	(۲۳ اس)-اتیل سوکست-۵-ای ان-۳-بتا، او ال	۹۹	۱۱۳۸۴۵-۲۸-۶	۱۱/۹۱

جدول ۲. اثر تیمارهای مختلف بر سلول‌های ایمنی، نوزایش عروقی، فیبروپلازی، محتوای کلاژنی و تشکیل بافت پوششی (میانگین \pm انحراف معیار) در روز دهم آزمایش.

تیمارهای آزمایش	سلول‌های ایمنی	نوزایش عروقی	فیبروپلازی	محتوای کلاژنی	تشکیل بافت پوششی
کنترل	3 ± 0.35^a	3 ± 0.5^a	3 ± 0.61^a	3 ± 0.5^b	2 ± 0.35^c
اوسرین	2 ± 0.71^b	2 ± 0.5^b	2 ± 0.79^{ab}	2 ± 0.61^c	2 ± 0.79^c
فنی توئین	2 ± 0.79^b	2 ± 0.35^b	1 ± 0.35^b	3 ± 0.71^b	1 ± 0.35^d
عصاره ۵ درصد	2 ± 0.35^b	2 ± 0.79^b	1 ± 0.11^b	3 ± 0.79^b	3 ± 0.79^b
عصاره ۷/۵ درصد	1 ± 0.35^c	1 ± 0.79^c	1 ± 0.79^b	4 ± 0.71^b	4 ± 0.61^b

a: عدم اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل در سطح اطمینان ۰/۹۵ است ($P < 0.05$). b: اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه‌های درمانی در سطح اطمینان ۰/۹۵ می‌باشد ($P < 0.05$).

جدول ۳. اثر تیمارهای مختلف بر سلول‌های ایمنی، نوزایش عروقی، فیبروپلازی، محتوای کلاژنی و تشکیل بافت پوششی (میانگین \pm انحراف معیار) در روز چهاردهم آزمایش.

تیمارهای آزمایش	سلول‌های التهابی	نوزایش عروقی	فیبروپلازی	محتوای کلاژنی	تشکیل بافت پوششی
کنترل	2 ± 0.35^a	2 ± 0.5^a	2 ± 0.35^a	2 ± 0.5^c	1 ± 0.35^d
اوسرین	2 ± 0.71^a	2 ± 1.1^a	2 ± 0.71^a	2 ± 0.61^c	2 ± 0.79^c
فنی توئین	1 ± 0.79^b	1 ± 0.35^b	1 ± 0.35^b	3 ± 0.71^b	2 ± 0.35^a
عصاره ۵ درصد	0 ± 0^c	1 ± 0.79^b	2 ± 0.5^a	3 ± 0.79^b	3 ± 0.79^b
عصاره ۷/۵ درصد	0 ± 0^c	0 ± 0^c	1 ± 0.35^b	4 ± 0.71^b	4 ± 0.61^c

a: عدم اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل در سطح اطمینان ۰/۹۵ است ($P < 0.05$). b: اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه‌های درمانی در سطح اطمینان ۰/۹۵ می‌باشد ($P < 0.05$).

جدول ۴. اثر تیمارهای مختلف بر اندازه قطر زخم (میانگین \pm انحراف معیار) و مساحت زخم (میانگین \pm انحراف معیار) در طول دوره آزمایش.

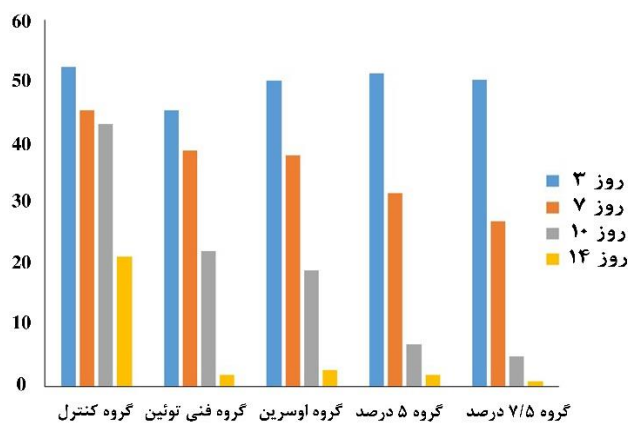
تیمار های آزمایش	قطر زخم (میلی متر)	مساحت زخم (میلی متر مربع)
کنترل	$4/45 \pm 2/86^a$	$21/6 \pm 22/53^a$
اوسرین	$4/86 \pm 2/69^a$	$23/95 \pm 21/84^a$
فنی توئین	$4/41 \pm 3/03^a$	$22/08 \pm 23/09^a$
عصاره ۵ درصد	$4/14 \pm 2/79^b$	$19/29 \pm 19/45^b$
عصاره ۷/۵ درصد	$3/97 \pm 3/18^b$	$19/95 \pm 24/08^{bc}$

a: بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه‌های درمانی در هر ستون در سطح اطمینان ۰/۹۵ می‌باشد ($P < 0.05$). b: اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه‌های درمانی در سطح اطمینان ۰/۹۵ می‌باشد ($P < 0.05$).

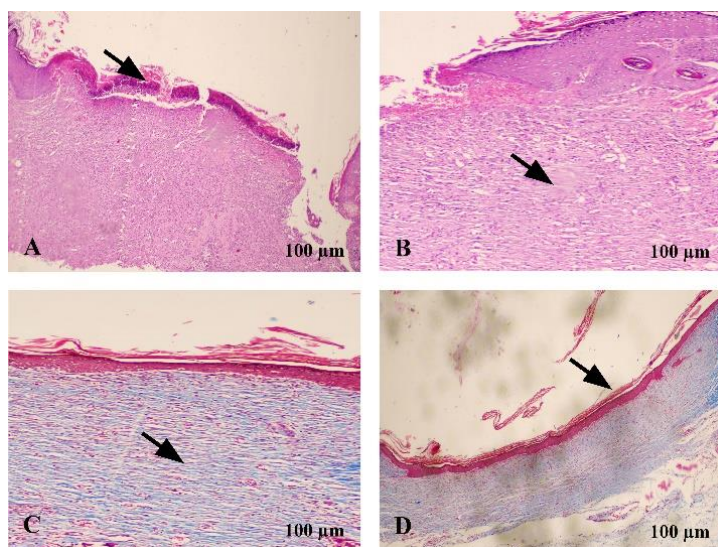
نتایج

ارزیابی اندازه زخم: کاربرد موضعی عصاره اتانولی برگ سبز لاله عباسی، از روز هفتم بعد از ایجاد زخم تجربی سبب کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) اندازه سطح زخم در مقایسه با گروه دارونما شد به طوری که، اندازه مساحت زخم در روز چهاردهم در گروه دارونما برابر $2/73 \pm 0/79$ میلی متر مربع بود، در حالی که این میزان در گروه درمانی با پماد ۵ درصد برگ گیاه سبز لاله عباسی برابر $1/98 \pm 0/76$ میلی متر مربع و در گروه درمانی با پماد ۷/۵ درصد برگ سبز لاله عباسی $0/87 \pm 0/39$ میلی متر مربع بود ($P < 0.05$). نکته قابل توجه این که از روز هفتم به بعد، بین دو گروه درمانی نیز این اختلاف معنی‌دار شد ($P < 0.05$). تغییرات اندازه مساحت زخم و روند ترمیم آن در **جدول ۳** نشان داده شده است.

یافته‌های آسیب‌شناسی: در نمونه‌های اخذ شده در روز سوم پس از جراحی، شدت حضور سلول‌های التهابی از جمله نوتروفیل‌ها در گروه کنترل و دارونما (شم دارو)، در مقایسه با هر دو گروه درمانی، از میزان بالاتری برخوردار بود. این حضور در تمام گروه‌ها در روزهای بعدی نمونه برداری (هفتم، دهم و چهاردهم) کاهش یافته بود. در گروه درمانی با پماد با دوز درمانی ۷/۵ درصد، در روز سوم پس از ایجاد زخم، میانگین سلول‌های آماسی 2 ± 0.35 و در روزهای نمونه برداری دهم 1 ± 0.35 و در روز چهاردهم هیچ‌گونه سلول آماسی مشاهده نشد. نوزایش عروقی در تمام گروه‌ها تا روز هفتم یک روند افزایشی مشاهده شد به گونه‌ای که در روزهای سوم و هفتم نمونه‌گیری به خصوص در گروه درمانی با دوز بالاتر به ترتیب 3 ± 0.79 و 4 ± 0.79 بود در حالی که در گروه شم دارو و گروه کنترل به ترتیب $2 \pm 1/11$ ، $1 \pm 0/5$ بود (**جدول ۲**). در روز چهاردهم نمونه‌برداری، میزان نوزایش عروقی به دلیل ساخت و رسوب کلاژن در تمام گروه‌های مورد آزمایش کاهش یافته بود. در گروه درمانی توسط پماد با دوز درمانی بالاتر، در روز چهاردهم پس از ایجاد زخم، میزان نوزایش عروقی روند کاهشی قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. در روز سوم مهاجرت سلول‌های فیبروبلاست از حواشی زخم به داخل بافت جوانه گوشتی عروقی تازه تشکیل در تمام گروه‌ها ناچیز، اما در روزهای نمونه‌برداری دهم و چهاردهم افزایش چشمگیر فیبروپلازی، تشکیل الیاف چسبگن و ناپدید شدن عروق خونی تازه تشکیل (فیبروپلازی $4 \pm 0/71$ در گروه ۵ درصد، $4 \pm 0/75$ در گروه ۷/۵ درصد) مشهود بود، در حالی که در نمونه‌های گروه دارونما و کنترل در نمونه‌های گروه درمانی، در روزهای نمونه‌برداری دهم و چهاردهم $3 \pm 0/5$ و $2 \pm 0/61$ برای دارونما و $2 \pm 0/5$ و $2 \pm 0/61$ برای کنترل محاسبه شد. در بررسی روز سوم، بازسازی بافت پوششی در گروه کنترل آشکار نشده بود اما در گروه‌های درمانی، به خصوص گروه درمانی با دوز بالاتر، آغاز بازسازی اپیتلیوم از طریق مهاجرت سلول‌های بازال رویت شد. در روز چهاردهم در گروه درمانی با دوز بالاتر، برخلاف ۴ گروه دیگر علاوه بر کامل شدن ترمیم پوست، پردهای پوستی نیز تشکیل گردیده بود. در بررسی آسیب‌شناختی سلول‌های اپیتلیال در روزهای دهم و چهاردهم در گروه درمانی با دوز بالاتر نسبت به دو گروه کنترل و دارونما تکثیر بیشتر این سلول‌ها و کامل شدن لایه‌های سلولی اپیدرم و کراتینیزاسیون اپیدرم مشاهده شد (**جدول ۳**).

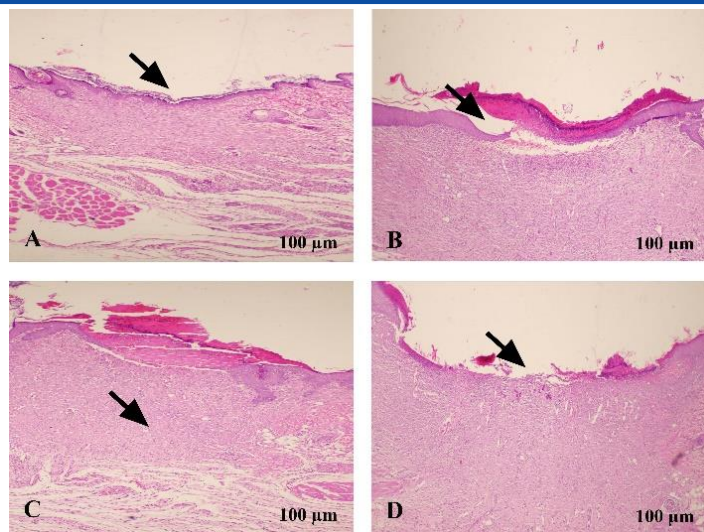


نمودار ۱. اثر پماد درمانی بر میزان میانگین \pm انحراف معیار اندازه مساحت زخم (میلی‌متر مربع) در روزهای مختلف آزمایش.



تصویر ۱. A: گروه درمانی با عصاره ۷/۵ درصد. در محل ایجاد زخم، اسکب، خونریزی و نفوذ سلول‌های التهابی (پیکان) در روز سوم (رنگ آمیزی H&E). تصویر B: گروه درمانی با عصاره ۷/۵ درصد روز ۷. در این تصویر تشکیل بافت جوانه گوشتی پر عروق (پیکان) و آغاز ترمیم بافت پوششی مشهود است (رنگ آمیزی H&E). تصویر C: گروه درمانی با عصاره ۷/۵ درصد روز ۱۰. بلوغ بافت جوانه گوشتی، جهت‌گیری رشته‌های کلاژن به صورت افقی، ترمیم کامل اپیتلیوم (پیکان) مشاهده می‌شود (رنگ آمیزی تری کروم ماسون). تصویر D: گروه درمانی با عصاره ۷/۵ درصد روز ۱۴. ناپدید شدن عمده رگ‌های خونی و جایگزین شدن آن‌ها با فیبروبلاست‌ها و الیاف چسبگن (پیکان) و بافت اپیتلیوم کراتینه‌ی یکپارچه قابل رویت است (رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون).

نتایج در روز دهم حاکی از این بود که نفوذ سلول‌های آماسی و نوزایش عروقی در گروه کنترل نسبت به سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت (۳۱±۳). میزان فیبروپلازی در گروه درمان با پماد اوسرین حاوی ۷/۵ و ۵ درصد عصاره برگ لاله عباسی در تمام طول آزمایش بسیار بیشتر از سایر گروه‌های درمانی بوده و این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$), ولی با گروه درمان با اوسرین تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (۲۱±۲). میزان تشکیل و ترمیم بافت پوششی در گروه درمان با گروه‌های عصاره و فنی‌توئین نسبت به گروه درمان با اوسرین و گروه کنترل بسیار بیشتر بود و تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). در روز ۱۴ آزمایش میزان نفوذ سلول‌های ایمنی در دو گروه درمان با پماد عصاره ۵ درصد و پماد عصاره ۷/۵ درصد نسبت به گروه کنترل بسیار کمتر شده و تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده شد ($P < 0.05$). میزان نوزایش عروقی در گروه کنترل بیشتر از سایر گروه‌ها بود ولی تفاوت معنی‌داری با گروه درمان با اوسرین نداشت ($P < 0.05$). محتوای کلاژنی گروه‌های درمان با اوسرین، پماد حاوی ۵ درصد عصاره و پماد حاوی ۷/۵ درصد عصاره بیشتر از سایر گروه‌ها بوده و تفاوت بین آن‌ها و گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0.05$). در روز ۱۴ میزان تشکیل بافت پوششی در گروه ۷/۵ درصد بسیار کامل‌تر از سایر گروه‌ها بود (تصویر ۱) و تفاوت معنی‌دار با سایر گروه‌های درمانی مشاهده شد ($P < 0.05$).



تصویر ۲. A: گروه درمانی با عصاره ۵ درصد روز ۱۴. اپیدرم کامل تشکیل شده است و بافت کراتینه‌زده مشخص است (پیکان) (رنگ آمیزی H&E) بزرگ نمایی X۱۰۰. **B:** گروه درمانی با اوسرین روز ۱۴. اپیدرم از دو طرف زخم پل ایجاد کرده (پیکان) همچنان اسکب در سطح زخم در حال ترمیم وجود دارد (رنگ آمیزی H&E) بزرگ نمایی X۱۰۰. **C:** گروه درمانی با فنی توئین روز ۱۴. جوانه گوشتی تشکیل شده (پیکان) ولی اپیدرم ترمیم نشده است، (رنگ آمیزی H&E) بزرگ نمایی X۱۰۰. **D:** گروه کنترل روز ۱۴. جوانه گوشتی تشکیل شده، اپیتلیوم ترمیم نشده است (پیکان) (رنگ آمیزی H&E) بزرگ نمایی X۱۰۰.

یافته‌های آزمایشگاهی و آنالیز عصاره به روش GC/MC نشان داد که عصاره اتانولی برگ گل لاله عباسی اثر مہاری بر روی رشد سویه‌های قارچی از قبیل اسپرژیلوس فومیگاتوس، فوزاریوم، کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا کروزه‌ای دارد. بر اساس نتایج به دست آمده، حداقل غلظت مہاری عصاره اتانولی برگ سبز لاله عباسی برای قارچ‌های اسپرژیلوس فومیگاتوس و فوزاریوم ۵۰۰۰، کاندیدا کروزه‌ای ۴۰۰۰ و کاندیدا آلبیکنس ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

آنالیز عصاره اتانولی برگ سبز لاله عباسی توسط روش کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی نشان داد که این عصاره حاوی متیل‌پالمیتات، فیتول، نئوفیتادین، پالمیتیک‌اسید، تریمتیل‌سیلیل‌استر و ویتامین E می‌باشد (جدول ۱).

بحث

مطالعه حاضر به منظور نشان دادن تأثیر عصاره برگ سبز لاله عباسی بر روی ترمیم زخم باز پوستی القا شده در مدل رت انجام گرفت. یافته‌های مکتسبه حاکی از این است که عصاره ۷/۵ درصد برگ سبز لاله عباسی روند ترمیم زخم را بهبود بخشیده و سرعت این روند را به شکل معنی‌داری افزایش می‌دهد.

کاربرد موضعی عصاره اتانولی برگ گیاه لاله عباسی به شکل وابسته به دوز، موجب افزایش میزان انقباض زخم پوست و کاهش مدت زمان روند ترمیم آن در موش صحرائی شد. در مطالعه حاضر میزان نوزایش عروقی، رسوب کلاژن و بازسازی بافت پوششی در حیوانات تحت درمان، به خصوص در دوز درمانی بالاتر (۷/۵ درصد) افزایش یافت. فرآیند ترمیم زخم، با مرحله التهابی آغاز لکن افزایش مدت زمان آن با عوارضی همراه می‌گردد. مرحله التهابی که آغازگر روند ترمیم است با تولید و ترشح فاکتورهای آماسی از جمله انواعی از واسطه‌های شیمیایی وازواکتیو، کموتاکتیک توسط سلول‌های بافت و سلول‌های آماسی مهاجرت کرده به محل زخم شروع می‌شود و تداوم روند ترمیم وابسته به شمار قابل توجهی از فاکتورهایی است که عمدتاً به وسیله ماکروفاژها ساخته و رها می‌شوند. نوتروفیل‌ها که در مرحله آغازین ترمیم متعاقب پاسخ‌های عروقی وارد زخم می‌شوند با عمل فاگوسیتوز و ترشح آنزیم‌های پروتئاز و الاستاز و سایر آنزیم‌ها در محل زخم، عوامل عفونت‌زا را از بین برده و خرده ریزه‌های بافتی را می‌زدایند، اما میزان بالای آنزیم‌های رها شده در موضع زخم به دلیل وجود عفونت محل زخم یا تداوم حضور این سلول‌ها تخریب بافتی و طولانی شدن مدت زمان مرحله التهابی و روند ترمیم را موجب می‌شود (۱۸). بررسی‌های فیتوشیمیایی در مطالعه حاضر و به وسیله سایرین مشخص کرده است که عصاره اتانولی برگ سبز لاله عباسی حاوی مقادیر مشخصی از ترکیبات آلکالوئیدی، فلاونوئیدها، فنل‌ها، استروئیدها، تریترپن‌ها، گلیکوزیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، ترکیبات لیگنینی، نئوفیتادین، متیل‌پالمیتات، فیتول و ویتامین

E است. خواص ضدالتهابی، ترمیمی، ضد میکروبی از جمله ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی و ضدقارچی این عصاره را می‌توان به این ترکیبات نسبت داد (۲۰-۱۷).

در این مطالعه و مطالعات اخیر نشان داده شد که عصاره برگ سبز گل لاله عباسی به دلیل داشتن عناصر فنولی از قبیل ایزوفلاوون و دی‌هیدروروتنوئید دارای خواص ضدقارچی است از این طریق از ابتلای زخم به اجرام قارچی جلوگیری و روند ترمیم زخم را تسریع می‌نماید. کما این که در مطالعه حاضر اثر ضدقارچی به روش MIC بر روی گونه‌های قارچی اسپرژیلوس فومیگاتوس فوزاریوم، کاندیدا کروزه‌ای و کاندیدا آلبیکنس نشان داده شد (۲۱).

Kaladhar و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که عصاره متانولی ریشه و گل لاله عباسی در برابر اسپرژیلوس نایجر، کاندیدا آلبیکنس و دئادلا اثر ضدقارچی دارد (۲۲). این نتایج از جنبه‌هایی با یافته‌های این مطالعه همخوانی دارد زیرا نشان داده شد که عصاره اتانولی برگ گل لاله عباسی روی رشد گونه‌های اسپرژیلوس فومیگاتوس، فوزاریوم، کاندیدا کروزه‌ای و کاندیدا آلبیکنس اثر مهاری دارد.

در این مطالعه با توجه به جداسازی مواد مختلف از جمله ویتامین E به وسیله دستگاه GC/MS می‌توان اذعان نمود که این ویتامین با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و سایر خواص مفید می‌تواند در بهبود کیفیت روند ترمیم زخم تأثیرگذار باشد (۲۳).

در بررسی اخیر مشخص گردید که از حضور سلول‌های آماسی به ویژه نوتروفیل‌ها در زخم‌های گروه‌های درمان شده توسط پماد حاوی عصاره اتانولی برگ سبز لاله عباسی، به شکل قابل ملاحظه‌ای کاسته شده است. این یافته را می‌توان به وجود ترکیبات ضد میکروبی عصاره مذکور (۲۴، ۲۵) و همچنین اثرات ضدالتهابی (۲۶) آن نسبت داد. به دنبال آن مرحله دوم ترمیم زخم با فرآیند نوزایش عروقی، مهاجرت فیبروبلاست‌ها به محل زخم آغاز می‌گردد. نوزایش عروقی فرآیندی است که از طریق ایجاد بستر مناسب جهت تکثیر سلولی و بهبود زخم مورد نیاز است (۲۷)، بنابراین، ارزیابی سیرافزایی و کاهش نوزایش عروقی می‌تواند در کیفیت و کمیت میزان سرعت ترمیم زخم تأثیرگذار باشد. بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، روند تشکیل و سیر قهقرایی بافت جوانه گوشتی عروقی و جایگزین شدن آن توسط فیبروبلاست‌ها و فیبروسیت‌ها و ترسیب کلاژن در هر یک از گروه‌های درمانی، به خصوص دوز درمانی بالاتر یعنی ۷/۵ درصد در مقایسه با سایر گروه‌ها از نظر آماری بهتر ارزیابی شد.

از سوی دیگر، فیبروبلاست‌ها مسئول ساخت و ترشح کلاژن، الاستین و پروتئوگلیکان‌ها می‌باشند. کلاژن پروتئین عمده ماتریکس خارج سلولی است که مقاومت در برابر کشش لبه‌های زخم را افزایش می‌دهد (۲۷). از این رو، ارزیابی میزان رسوب کلاژن در بافت (پس از تشکیل جوانه گوشتی) می‌تواند نشان‌گر افزایش میزان سرعت روند ترمیم زخم باشد. از سوی دیگر، اکسیژن مولکولی نقش اصلی را در پاتوژنز و درمان زخم‌ها ایفا می‌کند. تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال منجر به استرس اکسیداتیو و تخریب سلولی و تأخیر در فرآیند بهبود زخم می‌گردد (۲۴). بنابراین حذف گونه‌های اکسیژن فعال توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدان از جمله فلاونوئیدها، می‌تواند یک راهکار مهم در بهبود زخم‌ها باشد (۲۵، ۲۶). در بررسی حاضر مشخص گردید که شرایط برای مهاجرت فیبروبلاست‌ها، بلوغ و تبدیل آن‌ها به فیبروسیت و ظهور ایاف چسبگن در زخم‌های حیوانات تحت درمان با پماد حاوی عصاره اتانولی برگ سبز لاله عباسی، به خصوص در دوز درمانی بالاتر به شکل معنی‌داری بهبود حاصل کرده است. این اثر را می‌توان به وجود ترکیبات فلاونوئیدی و اثرات آنتی‌اکسیدانی آن‌ها در عصاره اتانولی برگ سبز لاله عباسی نسبت داد (۲۰، ۲۷).

با افزایش محتوای کلاژن بافت جوانه‌ای و همچنین رشد سلول‌های بافت پوششی از سمت لبه‌های زخم به سوی مرکز آن، روند التیام زخم وارد مرحله سوم یا بلوغ می‌گردد. در مطالعه حاضر کاربرد موضعی عصاره اتانولی برگ سبز لاله عباسی، به خصوص در دوز درمانی بالاتر، موجب بهبود مهاجرت سلول‌های بازال بافت پوششی و کامل شدن سایر لایه‌های بافت پوششی از جمله تشکیل لایه کراتینه، محتوا و موج کلاژن، بازسازی و انقباض زخم گردید.

مطالعه آسیب‌شناسی از افزایش سرعت ترمیم زخم به وسیله دز بالا یا عصاره ۷/۵ درصد حکایت می‌کند که این افزایش از نظر آماری در مقایسه با سایر گروه‌ها معنی‌دار است، به گونه‌ای که در این گروه در روز ۱۰ درمانی بلوغ بافت جوانه گوشتی، تشکیل کامل بافت اپیتلیوم (۵ لایه بافت پوششی) و حتی تشکیل آخرین لایه بافت پوششی یعنی بافت کراتینه کاملاً مشهود بود که بر سرعت بالاتر روند ترمیم زخم دلالت

می‌کند. نتایج آسیب‌شناسی نشان می‌دهد که پماد عصاره‌های درمانی ۵ درصد و ۷/۵ درصد در روزهای ۱۰ و ۱۴ نمونه‌برداری در مقایسه با گروه کنترل از نظر پارامترهای ترمیم زخم شامل رگ‌زایی، تشکیل محتوای کلاژنی، اپیتلیوم‌زایی، سلول‌های آماسی و فیبروپلازی دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند.

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به نتایج مکتسبه، به دلیل حضور عوامل مختلف ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدقارچی و ضدالتهابی، عصاره این گیاه سبب تسریع در روند ترمیم زخم تجربی در مدل رت گردید. به علاوه آزمایشات برون‌تنی بر اثرات ضدقارچی عصاره اتانولی برگ گل لاله عباسی دلالت دارد. نتایج مطالعه حاضر و مطالعات سایر محققین به این موضوع اشاره می‌کند که عصاره اتانولی برگ سبز لاله عباسی می‌تواند یک گزینه مناسب برای بهبود روند ترمیم در زخم‌های پوستی باشد.

سپاسگزاری

با سپاس از جناب آقای مهندس بالال کارشناس محترم بخش قارچ‌شناسی و جناب آقای رضا آقابراهیمی سامانی کارشناس گرامی گروه آموزشی پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که مطالعه حاضر جز با همکاری و همت این عزیزان میسر نمی‌گردید.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

- Behfarnia P, Khorasani MM, Birang R, Abbas FM. Histological and histomorphometric analysis of animal experimental dehiscence defect treated with three bio absorbable GTR collagen membrane. Dent Res J. 2012;9(5):574. doi: 10.4103/1735-3327.104876 PMID: 23559922
- Estevão LRM, Mendonça FdS, Baratella-Evêncio L, Simões RS, Barros MEGd, Arantes RME, Rachid Ma, Evencio-neto J. Effects of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. Acta Cirurgica Brasileira. 2013;28(3):202-9.
- Eseyin OA. Hypoglycemic effect of the seed extract of *Telfairia occidentalis* in rat. Pak J Biol Sci, 10(3),498-501. doi: 10.3923/pjbs.2007.498.501 PMID: 19069524
- Rozina R. Pharmacological and biological activities of *Mirabilis jalapa* L. Int J Pharmacol Res. 2016;6:160-8. doi: 10.7439/ijpr.v6i5.2725
- Yang S-W, Ubillas R, McAlpine J, Stafford A, Ecker DM, Talbot MK, Rogers B. Three new phenolic compounds from a manipulated plant cell culture, *Mirabilis jalapa*. J Nat Prod. 2001;64(3):313-7. doi: 10.1021/np0004092 PMID: 11277746Ro
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nature Med. 1995;1(1):27-30. doi: 10.1038/nm0195-27 PMID: 7584949
- Prudente AS, Loddi AM, Duarte MR, Santos AR, Pochapski MT, Pizzolatti MG, Hayashi SS, Campos FR, Pontarolo R, Cabrini DA, Otuki MF. Pre-clinical anti-inflammatory aspects of a cuisine and medicinal millennial herb: *Malva sylvestris* L. Food Chem Toxicol, 2013;58:324-31. doi: 10.1016/j.fct.2013.04.042 PMID: 23684757
- Hajji M, Jarraya R, Lassoued I, Masmoudi O, Damak M, Nasri M. GC/MS and LC/MS analysis, and antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts from *Mirabilis jalapa* tubers. Process Biochemistry. 2010;45(9):1486-93. doi: 10.1016/j.procbio.2010.05.027
- Thomas P, Sekhar AC, Upreti R, Mujawar MM, Pasha SS. Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. Biotechnol Rep (Amst). 2015;8:45-55. doi: 10.1016/j.btre.2015.08.003 PMID: 28352572
- Purohit S, Solanki R, Soni M, Mathur V. Experimental evaluation of Aloe vera leaves pulp as topical medicament on wound healing. Pharmacol Res. 2012;2(3):110-2.
- Farahpour M, Sedaghat S. Effect of *malva sylvestris* hydroethanolic leaf extract on the healing of full-thickness, excisional skin wounds in the rat. Vet Clin Pathol Sci J. 2015;9(1(33) Spring):73-81.
- Behfarnia P, Khorasani MM, Birang R, Abbas FMJDRJ. Histological and histomorphometric analysis of animal experimental dehiscence defect treated with three bio absorbable GTR collagen membrane. Dent Res J (Isfahan). 2012;9(5):574. doi: 10.4103/1735-3327.104876

13. Farahpour MR, Mirzakhani N, Doostmohammadi J, Ebrahimzadeh M. Hydroethanolic Pistacia atlantica hulls extract improved wound healing process; evidence for mast cells infiltration, angiogenesis and RNA stability. *Int J Surg*. 2015;17:88-98. doi: [10.1016/j.jisu.2015.03.019](https://doi.org/10.1016/j.jisu.2015.03.019) PMID: [25849027](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25849027/)
14. Mahalingam R, Bhirathidasan R, Ambikapathy V, Panneerselvam A. GC-MS determination of bioactive compounds of Mirabilis jalapa. *Asian J Plant Sci Res*. 2012;2(3):224-7.
15. Kakad S, Dhembare A, Ruchita C. Evaluation of antifungal activities of some selected plant species against fungal pathogen. *J Microbiol Biotechnol*. 2015;5(1):24-7. .
16. Maurya VK, Kachhwaha D, Bora A, Khatri PK, Rathore L. Determination of antifungal minimum inhibitory concentration and its clinical correlation among treatment failure cases of dermatophytosis. *J Family Med Prim Care*. 2019;8(8):2577. doi: [10.4103/jfmpe.jfmpe.483.19](https://doi.org/10.4103/jfmpe.jfmpe.483.19) PMID: [31548935](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31548935/)
17. Eneji S, Inuwa H, Ibrahim S, Ibrahim A, Abdulfattah A. In vitro assessment of bioactive components of Mirabilis jalapa ethanolic extract on clinical isolates of Salmonella typhi and Bacillus cereus. *Afr J Biotechnol*. 2011;10(71),16006-16011. doi: [10.5897/AJB11.1135](https://doi.org/10.5897/AJB11.1135)
18. Kaladhar D, Nandikolla SK. Antimicrobial studies, biochemical and image analysis in Mirabilis jalapa. *Int J Pharm*. 2010;2(3):683-93.
19. Rumzhum NN, Rahman MM, Islam MS, Chowdhury SA, Sultana R, Parvin MN. Cytotoxicity and antioxidant activity of extractives from Mirabilis jalapa. *Stamford J Pharm Sci*. 2008;1(1):85-8. doi: [10.3329/sjps.v1i1.1814](https://doi.org/10.3329/sjps.v1i1.1814)
20. Shetty S, Udupa S, Udupa L. Evaluation of antioxidant and wound healing effects of alcoholic and aqueous extract of Ocimum sanctum Linn in rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008;5(1):95-101. doi: [10.1093/ecam/nem004](https://doi.org/10.1093/ecam/nem004) PMID: [18317555](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18317555/)
21. Walker CI, Trevisan G, Rossato MF, Franciscato C, Pereira ME, Ferreira J, Manfron MP. Antinociceptive activity of Mirabilis jalapa in mice. *J Ethnopharmacol*. 2008;120(2):169-75. doi: [10.1016/j.jep.2008.08.002](https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.002) PMID: [18761072](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18761072/)
22. McDaniel JC, Massey K, Nicolaou A. Fish oil supplementation alters levels of lipid mediators of inflammation in microenvironment of acute human wounds. *Wound Repair Regen*. 2011;19(2):189-200. doi: [10.1111/j.1524-475X.2010.00659.x](https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00659.x) PMID: [21362086](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21362086/)
23. Beldon P. Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*. 2010;28(9):409-12. doi: [10.1016/j.mpsur.2010.05.007](https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2010.05.007)
24. George Broughton I, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7S):1e-S. doi: [10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9](https://doi.org/10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9) PMID: [16801750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16801750/)
25. Dissemond J, Goos M, Wagner S. The role of oxidative stress in the pathogenesis and therapy of chronic wounds. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. 2002;53(11):718-23. doi: [10.1007/s00105-001-0325-5](https://doi.org/10.1007/s00105-001-0325-5) PMID: [12402133](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12402133/)
26. Russell A. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: Food additives and food and pharmaceutical preservatives. *J Applied Bacteriol*. 1991;71(3):191-201. doi: [10.1111/j.1365-2672.1991.tb04447.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb04447.x) PMID: [1955413](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1955413/)
27. Pirbalouti AG, Yousefi M, Nazari H, Karimi I, Koohpayeh A. Evaluation of burn healing properties of Arnebia euchroma and Malva sylvestris. *J Biol*. 2009;5(3):62-6.



Comparison to Methods; Serum Antibody ELISA and Fecal Nested-PCR to Diagnose *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* Subspecies Infection in Cattle

Ali Kolivand^{1✉}, Mohammad Rahim Haji Hajikolaei^{2✉}, Mohammad Nouri^{2✉},
Mohammad Khosravi^{3✉}, Dariush Gharibi^{3✉}

¹ Graduate from the Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

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

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

Received: 13 February 2023, Accepted: 25 May 2023



[10.22059/jvr.2023.348764.3299](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.348764.3299)



[20.1001.1.20082525.1402.78.1.3.5](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1402.78.1.3.5)

Abstract

BACKGROUND: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is the cause of a common disease in dairy herds. Early diagnosis of *paratuberculosis* infection can improve Johne's disease control programs.

OBJECTIVES: This study aimed to compare the sensitivity, and specificity to methods; blood serum ELISA and stool Nested-PCR for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle.

METHODS: A commercial ELISA kit was used to perform the absorbed ELISA test, which was conducted after exposing serum samples to *Mycobacterium phlei* antigens to limit cross-reactions. Nested-PCR test was performed using nucleotide sequences related to specific MAP gene fragments, i.e. IS900.

RESULTS: As a result of the ELISA antibodies kit, out of the total 2203 serum samples, 112 samples were positive (5.08 %) and 2091 samples were negative (94.92 %). The results of Nested-PCR tests of rectal feces showed that out of 59 cows with the positive results in serum ELISA, 47 (79.66 %) samples were positive and 12 (20.34 %) samples were negative. Moreover, out of 31 cattle with a negative result on the ELISA test, 15 (48.38%) and 16 cattle (51.62 %) had positive and negative results, respectively, on the nested PCR tests of the feces samples.

CONCLUSIONS: Due to the low sensitivity of PCR compared to ELISA, the positive and negative predictive values, and the accuracy of ELISA test, as well as the high cost and time-consuming nature of PCR and the need for more and more complex facilities than ELISA, the authors concluded that ELISA is a more suitable method for screening and epidemiological studies than PCR.

Keywords: Cattle, ELISA, Johne's, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, Nested-PCR

Copyright © Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s)
Publisher: University of Tehran

Corresponding author: Mohammad Nouri, Tel/Fax: 061-33330073



How to cite this article:

Kolivand, A., Haji Hajikolaei, M. R., Nouri, M., Khosravi, M., Gharibi, D. Comparison to Methods; Serum Antibody ELISA and Fecal Nested-PCR to Diagnose *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* Subspecies Infection in Cattle. J Vet Res, 2023; 78(1): 21-29. doi: 10.22059/jvr.2023.348764.3299

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Sequence of primers and temperature conditions of PCR reactions.

Table 2. Comparing the results of Johne's disease diagnostic tests.

Figure 1. Gel electrophoresis results of Nested-PCR product performed using IS900 specific primers. M column: bp50 gene ladder, + column: positive control, - column: negative control, 5, 4 and 2 columns: infected and positive samples, 1 and 3 columns: negative samples.



دوره ۷۸، شماره ۱، ۱۴۰۲، ۲۹-۲۱

مقایسه دو روش الایزای آنتی بادی سرم و Nested-PCR مدفوع جهت تشخیص عفونت مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس در گاو

علی کولیوند^۱، محمدرحیم حاجی حاجیکلائی^۲، محمد نوری^۲، محمد خسروی^۳، داریوش غریبی^۳

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

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

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

تاریخ دریافت: ۲۴ بهمن ماه ۱۴۰۱، تاریخ پذیرش: ۵ اردیبهشت ماه ۱۴۰۲



10.22059/jvr.2023.348764.3299



20.1001.1.20082525.1402.78.1.3.5

چکیده

زمینه مطالعه: مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس عامل ایجاد بیماری شایع یون در گله‌های شیروار است. تشخیص زود هنگام عفونت پاراتوبرکلوزیس می‌تواند سبب بهبود برنامه‌های کنترلی بیماری شود.

هدف: مطالعه حاضر با هدف مقایسه حساسیت و ویژگی دو روش الایزای آنتی بادی سرم و Nested-PCR مدفوع جهت تشخیص آلودگی به باکتری مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس انجام شد.

روش کار: به منظور جستجوی پادتن ضد مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس از آزمون الایزای جذبی با استفاده از یک کیت تجاری، پس از مجاورسازی نمونه‌های سرم با آنتی‌ژن مایکوباکتریوم فلئو جهت کاهش واکنش‌های متقاطع انجام شد. جهت جستجوی ژنوم باکتری در مدفوع از روش Nested-PCR و با استفاده از توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به قطعات ژنی اختصاصی MAP یعنی IS900 بهره‌گیری شد.

نتایج: از مجموع ۲۲۰۳ نمونه سرمی آزمایش شده با الایزا، ۱۱۲ مورد مثبت (۵/۰۸ درصد) و ۲۰۹۱ مورد منفی (۹۴/۹۲ درصد) بود. نتایج آزمون Nested-PCR مدفوع رکتوم نشان داد از ۵۹ رأس گاو با نتیجه مثبت در الایزای سرم، ۴۷ رأس (۷۹/۶۶ درصد) نتایج PCR مدفوع رکتوم آن‌ها مثبت و در ۱۲ رأس (۲۰/۳۴ درصد) نتایج PCR مدفوع رکتوم آن‌ها منفی بود. همچنین از ۳۱ رأس گاو با نتیجه منفی در آزمون الایزا، در ۱۵ رأس (۴۸/۳۸ درصد) نتایج PCR مدفوع رکتوم آن‌ها مثبت و در ۱۶ رأس (۵۱/۶۲ درصد) نتایج PCR مدفوع رکتوم آن‌ها منفی بود.

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به حساسیت پائین PCR در مقایسه با ELISA، ارزش اخباری مثبت و منفی و صحت تست ELISA و همچنین هزینه‌بر و زمان‌بر بودن و نیاز به امکانات آزمایشگاهی بیشتر و پیچیده‌تر PCR نسبت به ELISA، می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که آزمون ELISA نسبت به PCR روش مناسب‌تری برای بررسی‌های غربالگری و مطالعات اپیدمیولوژیک می‌باشد.

کلمات کلیدی: الایزا، گاو، مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس، یون، PCR Nested.

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: محمد نوری، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

مقدمه

مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس عامل ایجاد بیماری یون می‌باشد. این بیماری در گله‌های شیروار شیوع بالایی دارد (۱). میزبان دائمی این ارگانسیم گاو، گوسفند و دیگر نشخوارکنندگان می‌باشد (۲). راه اصلی انتقال عامل بیماری یون مدفوعی - دهانی است، باکتری از طریق مدفوع دام‌های درگیر به شکل بالینی و تحت بالینی بیماری دفع می‌شود و در تماس با آب، غذا و سرپستانک‌ها قرار می‌گیرد (۳، ۴). بیماری یون از جنبه شیوع از گسترده‌ترین و از لحاظ اهمیت اقتصادی از مهم‌ترین بیماری‌ها در صنعت دامپروری محسوب می‌شود (۵). بیماری

در کشورهای در حال توسعه آندمیک است (۶). در بسیاری از کشورها وقوع بیماری باید به مقامات بهداشتی و دامپزشکی گزارش گردد (۷). علائم بالینی بیماری پس از ۵-۲ سال آشکار می‌گردد (۹). شباهت‌های موجود در علائم بالینی و نیز علائم کالبدگشایی بیماری یون در دام‌ها و بیماری کرون در انسان، احتمال نقش داشتن بیماری فوق در ابتلا به بیماری کرون در انسان را قوت می‌بخشد (۱۰، ۱۱). کنترل پاراتوبرکلوزیس با توجه به خسارات اقتصادی و همچنین نقش آن در بیماری کرون در انسان مهم است (۱۲). تشخیص زودهنگام عفونت پاراتوبرکلوزیس امکان‌پذیر بوده و می‌تواند برنامه‌های کنترلی را تحت تأثیر قرار دهد (۱۳).

از روش‌های متفاوتی برای تشخیص بیماری و آلودگی مانند کشت مدفوع، آزمایش میکروسکوپی مدفوع یا بافت، الایزا، PCR و غیره استفاده می‌شود. حساسیت و ویژگی هر کدام از روش‌های فوق با یکدیگر متفاوت است (۱، ۳). کشت و جداسازی مایکوباکتریوم *اویوم* تحت گونه پاراتوبرکلوزیس از مدفوع، روش قطعی اثبات حضور این باکتری در گله می‌باشد و روش مناسبی برای تشخیص دام‌های آلوده متوسط یا دفع‌کننده‌های خفیف باکتری است (۱۴). از اشکالات این روش می‌توان به اشتباه در حین نمونه‌گیری، رشد سایر باکتری‌های موجود در نمونه یا آلودگی قارچی و طولانی شدن نتیجه کشت به دلیل رشد آهسته این باکتری اشاره کرد. با توجه به سیر بیماری، با پیشرفته‌تر شدن ضایعات مخاط روده، میزان دفع باکتری نیز افزایش می‌یابد. لذا آزمایش رنگ‌آمیزی مستقیم گسترش مدفوع به خصوص طی دوره‌ای که دام دچار اسهال است، به دلیل دفع بیش‌تر سلول‌های اپی‌تلیالی دارای باکتری، با ارزش است (۱۵).

برای تشخیص آلودگی و غربالگری، سرم بهترین نمونه و الایزا مطمئن‌ترین و سریع‌ترین روش می‌باشد (۱۶، ۱۷). آزمون الایزای جذبی با یک کیت تشخیص تجاری، قابل دسترس است و با استفاده از آن استاندارد شدن کار در بین آزمایشگاه‌ها آسان‌تر انجام می‌گیرد (۱۸). الایزای سرمی معمولاً به عنوان یک آزمایش سرولوژیک سریع و کم‌هزینه مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما در حیواناتی که در مرحله عفونت تحت بالینی با انتشار باکتری از طریق مدفوع به میزان کم یا متوسط هستند نیز حساسیت این روش کم (۱۵ درصد) می‌باشد (۱۹). طبق مطالعات انجام شده، واکنش زنجیره پلیمرز روش مناسبی برای تشخیص موارد تحت بالینی آلودگی به مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس می‌باشد (۲۰). محبوبیت واکنش زنجیره پلی‌مرز برای تشخیص مایکوباکتریوم *اویوم* تحت گونه پاراتوبرکلوزیس در سال‌های اخیر افزایش یافته است. این روش سریع و حساس است و می‌تواند برای طیف گسترده‌ای از ارگانیسم‌های مختلف با ویژگی بسیار بالا طراحی شود. از سوی دیگر، واکنش زنجیره پلی‌مرز بسیار حساس به حضور مواد مهارکننده در نمونه‌ها می‌باشد و در صورت استفاده مستقیم، حساسیت آن بسیار پایین خواهد بود (۲۱).

مطالعه حاضر با هدف مقایسه نتایج آزمون‌های الایزای سرم خون و Nested-PCR مدفوع جهت تشخیص آلودگی به باکتری مایکوباکتریوم *اویوم* زیرگونه پاراتوبرکلوزیس انجام شد.

مواد و روش کار

روش نمونه‌گیری: در مطالعه حاضر با مراجعه به یکی از گاوداری‌های صنعتی که سابقه بیماری یون در پرونده بهداشتی آن گاوداری در ۲-۳ سال گذشته ثبت شده بود از ۲۲۰۳ رأس گاو شکم اول نمونه‌گیری شد. نمونه خون از ورید دمی با استفاده از ونوجکت در شرایط استریل اخذ شد و به آزمایشگاه ارسال شد. سرم نمونه‌های خون با سانتریفیوژ در دور ۴۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جدا شد و تا زمان انجام آزمایش الایزا در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

روش انجام تست الایزای سرم خون: آزمون الایزای غیر مستقیم جذبی با استفاده از کیت محصول شرکت ID.VET فرانسه، مطابق با دستورالعمل کیت، انجام شد. به صورت خلاصه، در روش الایزای جذبی به منظور حذف آنتی‌بادی‌های ضد مایکوباکتریوم فلنی دارای واکنش متقاطع با مایکوباکتریوم *اویوم* زیرگونه پاراتوبرکلوزیس، ابتدا مجاورسازی نمونه‌های سرم مورد آزمون با آنتی‌ژن محلول مایکوباکتریوم فلنی انجام می‌شود. در ادامه نمونه‌های رقیق شده همراه با کنترل‌های مثبت و منفی به گوده‌های پلیت اضافه شد و پس از ۴۵ دقیقه قرارگیری در دمای آزمایشگاه و شستشو، کونژوگه به تمام گوده‌ها اضافه گردید. در نهایت، پس از ۳۰ دقیقه قرارگیری در دمای آزمایشگاه و شستشو، به گوده‌ها، کروموزن - سوبسترا افزوده شد و پس از ۱۵ دقیقه و اضافه کردن محلول متوقف‌کننده، در طول موج ۴۵۰ نانومتر، جذب نوری هر چاهک با دستگاه اسپکتروفتومتر الایزا (Accureader, Taiwan) خوانش گردید. جهت تفسیر برای هر نمونه، درصد S/P طبق فرمول زیر محاسبه و با توجه به دستورالعمل کیت موارد مثبت، مشکوک و منفی تفکیک شدند.

درصد S/P = [(جذب نوری کنترل مثبت - جذب نوری کنترل منفی) / (جذب نوری نمونه - جذب نوری کنترل منفی)] × ۱۰۰

به صورت تصادفی ۵۹ رأس دام الایزا مثبت و ۳۱ رأس دام منفی در آزمون الایزای سرم، حدود ۱۵-۱۰ گرم نمونه‌های مدفوع از رکتوم جمع‌آوری شده به منظور استخراج DNA و انجام Nested-PCR جدا و در یک فالكون استریل قرار داده شد. نمونه‌های مدفوع رکتوم تا زمان جداسازی DNA در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

روش انجام تست Nested-PCR مدفوع (استخراج DNA): با استفاده از کیت تجاری (سیناژن، ایران) استخراج DNA از مدفوع انجام شد. برای این کار طبق دستورالعمل کیت، ابتدا ۱۵۰ میلی‌گرم مدفوع را به یک میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری انتقال داده و به آن ۲ میلی‌لیتر PBS استریل اضافه کرده سپس مدفوع رقیق شده با PBS را ۱ تا ۲ دقیقه ورتکس نموده و سپس با ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی را به یک میکروتیوب جدید انتقال داده و با ۱۳ تا ۱۴ هزار دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده سپس مایع رویی را دور ریخته، رسوب حاصل را در ۱۹۰ میکرولیتر بافر لیز GP مخلوط نموده، به آن ۱۰ میکرولیتر لیزوزیم اضافه کرده و پس از مخلوط کردن به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. ۲۰ میکرولیتر پروتیناز K به نمونه اضافه شد و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، در طی این مدت هر ۱۵ دقیقه نمونه به مدت ۵ ثانیه ورتکس شد. ۱ میلی‌لیتر بافر لیز TNG به نمونه افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. میکروتیوب حاوی نمونه را ۱ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ نموده و مایع روی رسوب در دو مرحله به شرح زیر از یک ستون فیلتر عبور داده شد: ابتدا ۶۵۰ میکرولیتر از محتوای میکروتیوب را به یک ستون فیلتر فعال شده انتقال داده و با ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کرده بعد از تخلیه مایع عبور کرده از فیلتر سپس باقی نمونه را به ستون فیلتر منتقل و دوباره به مدت ۱ دقیقه با ۷۰۰۰ دور در دقیقه و سپس بلافاصله ۱ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کرده و پس از تخلیه مایع عبور کرده از فیلتر ۲۵۰ میکرولیتر بافر washing1 به ستون فیلتر اضافه نموده و پس از ۱ دقیقه نگهداری در دمای محیط به مدت ۲ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ و تخلیه مایع داخل لوله جمع‌کننده ۲ بار شستشو با بافر washing انجام شد. در هر بار شستشو ۷۵۰ میکرولیتر بافر washing به ستون فیلتر اضافه شد و پس از ۱ دقیقه نگهداری در دمای محیط به مدت ۲ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از تخلیه بافر washing مرحله دوم، ستون فیلتر برای خشک شدن به مدت ۲ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. ستون فیلتر همراه با درپوش لوله جمع‌کننده در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری استریل قرار داده شد و ۵۰ میکرولیتر بافر Elution گرم (به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد) در آن ریخته و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. ستون فیلتر به مدت ۲ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع خارج شده از آن به عنوان DNA تخلیص شده به یک میکروتیوب جدید انتقال داده شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

مواد و برنامه انجام Nested-PCR: جهت انجام PCR از توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به قطعات ژنی اختصاصی MAP یعنی IS900 که در برخی مطالعات استفاده شده است، بهره‌گیری شد (۲۲). در تمام آزمایشات PCR از کنترل مثبت و کنترل منفی استفاده شد. در هر واکنش، جهت کنترل منفی از آب مقطر و از DNA استخراج شده از MAP (مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، ایران) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده شده و شرایط دمایی واکنش‌های PCR در جدول ۱ گزارش شده است.

PCR مرحله اول: برای انجام مرحله اول PCR از پرایمرهای 5'-GAA GGG TGT TCG GGG CCG TCG CTT AGG-3 و 3'-GGC GTT GAG GTC GAT CGC CCA CGT GAC-5 p91 استفاده شد. اجزای مورد استفاده در هر واکنش، در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس (آمپلیکون، دانمارک)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها، ۳ میکرولیتر از هر یک از DNAهای استخراج شده و ۵ میکرولیتر آب مقطر بود. واکنش‌های PCR روی یخ با هم مخلوط شد و بلافاصله نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Mastecycler Gradient, Eppendorf, Germany) قرار داده شدند و برنامه حرارتی زیر استفاده گردید:

۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (۱ چرخه)؛ ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، ۶۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه (۳۰ چرخه)؛ ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه (۱ چرخه).

جدول ۱. توالی آغازگرها و شرایط دمایی واکنش‌های PCR.

توالی هدف	نام آغازگر	توالی	شرایط دمایی واکنش	طول محصول (bp)
IS900	P90	5'-GAA GGG TGT TCG GGG CCG TCG CTT AGG-3'	۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (۱ چرخه)؛ ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، ۶۲ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳ دقیقه (۳۰ چرخه)؛ ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه (۱ چرخه).	۴۱۳
	P91	5'-GGC GTT GAG GTC GAT CGC CCA CGT GAC-3'		
IS900 (nested)	AV1	5'-ATG TGG TTG CTG TGT TGG ATG G-3'	۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه (۱ چرخه).	۲۹۸
	AV2	5'-CCG CCG CAA TCA ACT CCA G-3'		

جدول ۲. مقایسه نتایج آزمون‌های تشخیصی بیماری یون.

روش آزمایش	Nested-PCR مدفوع رکتوم		جمع کل
	موارد مثبت	موارد منفی	
الایزای سرم	موارد مثبت	۱۲	۵۹
	موارد منفی	۱۶	۳۱
جمع کل	۶۲	۲۸	۹۰

PCR مرحله دوم: برای انجام مرحله دوم PCR از پرایمرهای '5'-ATG TGG TTG CTG TGT TGG ATG G-3' و AV2 و '5'-CCG CCG CAA TCA ACT CCA G-3' استفاده شد. در این مرحله همه شرایط مانند مخلوط واکنشگرهای PCR و برنامه زمانی و دمایی مطابق مرحله اول بود با این تفاوت که DNA الگوی مورد استفاده شامل ۳ میکرولیتر از محصول PCR مرحله اول می‌باشد که به مخلوط واکنش اضافه می‌شود. در نهایت مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی رنگ ایمن (سیناژن، ایران)، در کنار نردبان ژنی ۵۰ bp (سیناژن، ایران) الکتروفورز شد. نمونه نتایج ژل الکتروفورز محصول Nested-PCR در تصویر ۱ نشان داده شده است.

روش آنالیز آماری: با استفاده از روش‌های آماری محاسباتی و نرم افزار اکسل آنالیز آماری داده‌ها مورد ارزیابی و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و جهت تعیین حساسیت و ویژگی از فرمول‌های زیر استفاده شد:

$$(\text{تعداد موارد مثبت حقیقی} + \text{تعداد موارد منفی کاذب}) / \text{تعداد موارد مثبت حقیقی} = \text{حساسیت}$$

$$(\text{تعداد موارد منفی حقیقی} + \text{تعداد موارد مثبت کاذب}) / \text{تعداد موارد منفی حقیقی} = \text{ویژگی}$$

همچنین ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی و صحت تست به روش‌های زیر محاسبه شد.

$$(\text{مثبت حقیقی} + \text{مثبت کاذب}) / \text{مثبت حقیقی} = \text{ارزش اخباری مثبت}$$

$$(\text{منفی حقیقی} + \text{منفی کاذب}) / \text{منفی حقیقی} = \text{ارزش اخباری منفی}$$

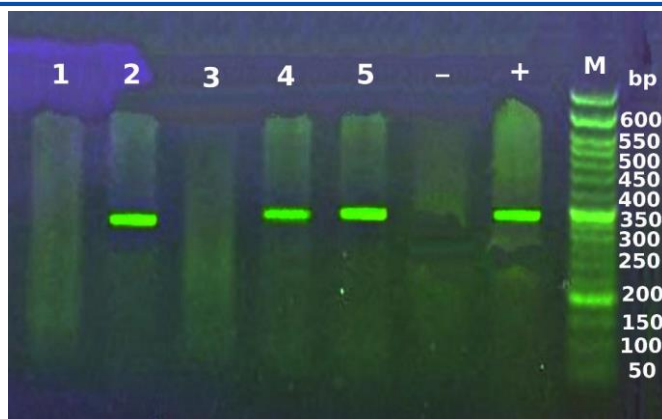
$$\text{کل نمونه} / (\text{منفی حقیقی} + \text{مثبت حقیقی}) = \text{صحت تست}$$

نتایج

نتایج آزمون الایزای: از مجموع ۲۲۰۳ نمونه سرمی آزمایش شده با الایزای، ۱۱۲ مورد مثبت (۵/۰۸ درصد) و ۲۰۹۱ مورد منفی (۹۴/۹۲ درصد) بود.

نتایج آزمون Nested-PCR: همچنین نتایج آزمون Nested-PCR مدفوع رکتوم نشان داد از ۵۹ رأس گاو با نتیجه مثبت در آزمون الایزای، در ۴۷ رأس (۷۹/۶۶ درصد) مثبت و ۱۲ رأس (۲۰/۳۴ درصد) نتایج PCR منفی بودند. همچنین از ۳۱ رأس گاو الایزای منفی در ۱۵ رأس (۴۸/۳۸ درصد) نتایج PCR مدفوع رکتوم آن‌ها مثبت و در ۱۶ رأس (۵۱/۶۲ درصد) نتایج PCR مدفوع رکتوم آن‌ها منفی بود.

حساسیت و ویژگی Nested-PCR: بر اساس نتایج حاصل حساسیت و ویژگی Nested-PCR به ترتیب ۷۵/۸ درصد و ۵۱/۶ درصد بود.



تصویر ۱: نتایج ژل الکتروفورز محصول Nested-PCR انجام شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *IS900* ستون M: نردبان ژنی ۱۰۰ bp، ستون +: کنترل مثبت، ستون -: کنترل منفی، ستون ۵ و ۴ و ۲: نمونه‌های آلوده و مثبت، ستون ۳ و ۱: نمونه‌های منفی.

حساسیت و ویژگی الایزا: بر اساس نتایج حاصل حساسیت و ویژگی الایزا به ترتیب ۷۹/۶ درصد و ۵۷/۱۴ درصد بود.

ارزش اخباری مثبت و منفی: با در نظر گرفتن Nested-PCR به عنوان تست استاندارد و ارزش اخباری مثبت و منفی الایزا به ترتیب ۷۹/۶۶ و ۵۱/۶۱ درصد محاسبه گردید.

صحت تست: با توجه به تعداد موارد مثبت و منفی حقیقی صحت تست برابر با ۷۰ درصد محاسبه شد.

بحث

یون یک بیماری واگیردار بوده که گاو و دیگر نشخوارکنندگان را در بسیاری از مناطق دنیا مبتلا می‌کند. این بیماری دارای اثرات اقتصادی بر تولیدات گاوهای شیری است و امروزه، بیماری یون به صورت یکی از پرضررترین بیماری‌ها در گاوهای شیری در آمده است. کنترل مؤثر پاراتوبرکلوزیس به دلیل عدم وجود آزمایش‌های تشخیصی سریع و صحیح، دوره کمون طولانی، حضور موارد تحت‌بالینی تشخیص داده نشده و عدم وجود دانش کافی در مورد تنوع سویه‌های MAP مشکل بوده و تفسیر نتایج آزمایشگاهی، چالش برانگیز می‌باشد (۲۳).

مسئله اصلی که استفاده از روش‌های تشخیصی مبتنی بر PCR را محدود کرده و حساسیت آن‌ها را کاهش می‌دهد کیفیت نامناسب DNA استخراج شده در اثر مقاومت دیواره سلولی مایکوباکتریایی و نیز حضور ممانعت‌کننده‌های متعدد PCR می‌باشد (۲۴) بنابراین بهینه کردن فرآیندهای استخراج DNA در این مسیر اهمیت فراوانی می‌یابد. به این منظور، آماده سازی اولیه نمونه برای به دست آوردن DNA با کیفیت ضروری است (۲۵). برخی از مطالعات صورت گرفته در سال‌های اخیر نشان داده که روش PCR ساده و یک مرحله‌ای در برخی موارد قادر به تشخیص دقیق عامل عفونی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس به ویژه در شرایط مقدار کم DNA الگو نیست. به همین دلیل برای تشخیص این عامل عفونی در مطالعه حاضر از روش مطمئن‌تر و حساس‌تر Nested-PCR به دلیل توانایی جستجو و تکثیر مقادیر بسیار اندک DNA، استفاده شد. از طرفی تشخیص مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در مدفوع از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است زیرا مهم‌ترین راه انتشار این باکتری، پخش مدفوع حیوانات آلوده در محیط می‌باشد. یکی از مزایای روش به کار رفته در مطالعه حاضر این است که، به صورت مستقیم و بدون نیاز به کشت و یا اطلاع از وضعیت بالینی و کلینیکی دام می‌توان به بررسی نمونه‌های مدفوعی گرفته شده از دام پرداخت و با اطمینان زیادی سلامت و یا آلودگی دام مربوطه را نسبت به مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس گزارش نمود. با توجه به این که حیوان آلوده علائم بالینی خاصی از خود بروز نمی‌دهد، لذا تشخیص سریع و دقیق این باکتری با استفاده از روش Nested-PCR اهمیت زیادی برخوردار است.

همان گونه که در بخش نتایج نشان داده شد، برآورد میزان فراوانی موارد عفونت با مایکوباکتریوم/ویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس در دو روش تشخیصی سریع استفاده شده در مطالعه حاضر منتهی به ارائه دو میزان فراوانی متفاوت برای این بیماری گردید. از ۵۹ رأس گاوی که نتایج الایزای سرم آن‌ها مثبت بود، ۴۷ مورد نتیجه مثبت در آزمون Nested-PCR مدفوع رکتوم را نشان دادند. بر اساس نتایج مطالعات

مختلف آزمون‌های سرولوژی تنها قادر به تشخیص موارد پیشرفته بیماری هستند، زیرا پاسخ ایمنی هومورال آهسته توسعه یافته و به شدت وابسته به تعداد کل مایکوباکتریوم می‌باشد (۲۶، ۲۷). همچنین الایزا در تشخیص بیماری در دام‌های جوان و تازه آلوده شده، حساسیت کمی دارد زیرا در این دام‌ها به علت عدم تولید آنتی بادی، الایزا قادر به تشخیص عفونت از سرم خون آن‌ها نیست؛ با پیشرفت بیماری و افزایش تولید آنتی بادی، قدرت تشخیصی الایزا نیز افزایش می‌یابد (۲۸).

بر اساس نظر برخی محققین، جهت تشخیص آلودگی به مایکوباکتریوم/اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس به وسیله آزمون‌های سرولوژیکی نظیر الایزا، احتمال بروز واکنش متقاطع با باکتری‌های مشابه و حصول نتیجه مثبت کاذب وجود دارد (۲۶). استفاده از الایزای جذبی در مطالعه کنونی سبب بهبود نسبی نتایج آزمون الایزا در مقایسه با PCR شده است. یک فرضیه دیگر این است که سیر بیماریزایی مایکوباکتریوم/اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس ممکن است که روند افزایشی نداشته، بلکه افزایش و کاهش متناوب در میزان باکتری و آنتی‌بادی در خون در اثر آلودگی مجدد و عود پی‌درپی صورت گیرد (۲۹). به نظر می‌رسد که آزمون‌های تشخیصی سریع، هر کدام شکل یا مرحله متفاوتی از عفونت با مایکوباکتریوم/اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (باکتری و آنتی بادی) را تشخیص می‌دهند. حساسیت پایین و ویژگی بالای روش الایزا جهت تشخیص آلودگی به مایکوباکتریوم/اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس در مطالعات بسیاری گزارش شده است، در این مطالعات میزان ویژگی آزمون الایزا در محدوده ۹۷ تا ۹۹ درصد و میزان حساسیت آن در گله‌های با کشت مدفوع مثبت، کمتر از ۵۰ درصد (۳۰، ۳۱) و در گله‌های با شیوع کم در حدود ۲۰ درصد (۲۷) گزارش شده است.

بر اساس مطالعات Mihajlovic و همکاران در سال ۲۰۱۱، روش PCR در تشخیص آلودگی به مایکوباکتریوم/اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس دارای ویژگی بالایی است و میزان حساسیت آن با پیشرفت بیماری افزایش می‌یابد (۲۷). Clark و همکاران در سال ۲۰۰۸، جهت تشخیص بیماری یون در گاو حساسیت و ویژگی آزمون PCR مستقیم بر روی مدفوع را به ترتیب ۷۰/۲ و ۸۵/۳ درصد و حساسیت و ویژگی آزمون الایزای سرم را به ترتیب ۳۱/۳ و ۹۷/۸ درصد بیان نمودند (۳۲). این محققین در مجموع آزمون PCR مدفوع را در مقایسه با الایزای سرم، روش مناسب‌تری در تشخیص آلودگی به مایکوباکتریوم/اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس معرفی نمودند که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

نتیجه گیری نهایی: در مطالعه حاضر از Nested PCR جهت ارزیابی نتایج حاصل از آزمون الایزای جذبی استفاده شد. گرچه روش کشت یک روش استاندارد برای تعیین آلودگی به مایکوباکتریوم/اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس می‌باشد ولی به دلیل زمان‌بر بودن و عدم تفاوت معنی‌دار بین کشت و PCR در مطالعات صورت گرفته، استفاده از PCR به عنوان یک روش جایگزین کشت برای بررسی شیوع آلودگی تشخیص بیماری یون توصیه شده است (۳۲). با توجه به دفع متناوب باکتری مایکوباکتریوم/اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس در مدفوع دام‌های آلوده، به نظر می‌رسد که PCR دارای نتایج منفی کاذب بالا باشد زیرا امکان ردیابی باکتری در هر مرحله از نمونه‌برداری مدفوع به دلیل عدم دفع مستمر حتی در دام‌های آلوده وجود ندارد. در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد حساسیت PCR (۷۵/۸ درصد) در مقایسه با ELISA (۷۹/۶۶ درصد) کمتر بوده است. از طرف دیگر علاوه بر ارزش اخباری مثبت و منفی بالا (به ترتیب ۷۹/۶۶ و ۵۱/۶۱ درصد) و صحت آزمون (۷۰ درصد) ELISA و همچنین هزینه‌بر و زمان‌بر بودن و نیاز به امکانات آزمایشگاهی بیشتر و پیچیده‌تر PCR نسبت به ELISA، می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که آزمون ELISA نسبت به PCR جهت بررسی‌های غربال‌گری و مطالعات اپیدمیولوژیکی مناسب‌تر بوده و پیشنهاد می‌گردد از این روش برای مشخص نمودن دام‌های آلوده به مایکوباکتریوم/اویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس در گاوداری‌های صنعتی استفاده گردد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که از این مطالعه در قالب تسهیلات پژوهشی حمایت نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

- Nielsen SS, Toft N. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Vet Microbiol.* 2008;129(3-4):217-35. doi: [10.1016/j.vetmic.2007.12.011](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.011) PMID: [18255239](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18255239/)
- Abubakar I, Myhill D, Aliyu SH, Hunter PR. Detection of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14(3):401-10. doi: [10.1002/ibd.20276](https://doi.org/10.1002/ibd.20276) PMID: [17886288](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17886288/)
- Whittington RJ, Taragel CA, Ottaway S, Marsh I, Seaman J, Fridriksdottir V. Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. *Vet Microbiol.* 2001;79(4):311-22. doi: [10.1016/S0378-1135\(00\)00364-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00364-3) PMID: [11267791](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11267791/)
- Fischer OA, Matlova L, Dvorska L, Svastova P, Bartos M, Weston RT, et al. Potential risk of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* spread by syrphid flies in infected cattle farms. *Med Vet Entomol.* 2005;19(4):360-6. doi: [10.1111/j.1365-2915.2005.00585.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2005.00585.x) PMID: [16336300](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16336300/)
- Douarre PE, Cashman W, Buckley J, Coffey A, O'Mahony JM. Isolation and detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) from cattle in Ireland using both traditional culture and molecular based methods. *Gut Pathog.* 2010;2(1):11. doi: [10.1186/1757-4749-2-11](https://doi.org/10.1186/1757-4749-2-11) PMID: [20875096](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20875096/)
- Wells SJ, Collins MT, Faaberg KS, Wees C, Tavoranpanich S, Petrini KR, et al. Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in dairy cattle. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13(10):1125-30. doi: [10.1128/CVI.00236-06](https://doi.org/10.1128/CVI.00236-06) PMID: [16928884](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16928884/)
- Sharma G, Jeevanandam P. Synthesis of self-assembled prismatic iron oxide nanoparticles by a novel thermal decomposition route. *RSC Adv.* 2013;3(1):189-200. doi: [10.1039/C2RA22004K](https://doi.org/10.1039/C2RA22004K)
- Smith RL, Grohn YT, Pradhan AK, Whitlock RH, Van Kessel JS, Smith JM, et al. A longitudinal study on the impact of *Johne's disease* status on milk production in individual cows. *J Dairy Sci.* 2009;92(6):2653-61. doi: [10.3168/jds.2008-1832](https://doi.org/10.3168/jds.2008-1832) PMID: [19447998](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19447998/)
- Collins MT. Diagnosis of *paratuberculosis*. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2011;27(3):581-91. doi: [10.1016/j.cvfa.2011.07.013](https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.013) PMID: [22023836](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22023836/)
- Harris NB, Barletta RG. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(3):489-512. doi: [10.1128/CMR.14.3.489-512.2001](https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.489-512.2001) PMID: [11432810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11432810/)
- Klanicova B, Slana I, Roubal P, Pavlik I, Kralik P. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* survival during fermentation of soured milk products detected by culture and quantitative real time PCR methods. *Int J Food Microbiol.* 2012;157(2):150-5. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.021](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.021) PMID: [22591549](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22591549/)
- Puerto-Parada M, Arango-Sabogal JC, Pare J, Dore E, Cote G, Wellemans V, et al. Risk factors associated with *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* herd status in Quebec dairy herds. *Prev Vet Med.* 2018;152:74-80. doi: [10.1016/j.prevetmed.2018.02.010](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.02.010) PMID: [29559108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29559108/)
- Vilar AL, Santos CS, Pimenta CL, Freitas TD, Brasil AW, Clementino IJ, et al. Herd-level prevalence and associated risk factors for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in cattle in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. *Prev Vet Med.* 2015;121(1-2):49-55. doi: [10.1016/j.prevetmed.2015.06.003](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.06.003) PMID: [26092721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26092721/)
- Slana I, Kralik P, Kralova A, Pavlik I. On-farm spread of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *Int J Food Microbiol.* 2008;128(2):250-7. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.013](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.013) PMID: [18824269](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18824269/)
- Kupper J, Brandt H, Donat K, Erhardt G. Heritability estimates for *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* status of German Holstein cows tested by fecal culture. *J Dairy Sci.* 2012;95(5):2734-9. doi: [10.3168/jds.2011-4994](https://doi.org/10.3168/jds.2011-4994) PMID: [22541503](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22541503/)
- Anna Rita A, Victor NN, Silvia P, Luciana P, Anastasia D, Vincenzo C. Ovine paratuberculosis: a seroprevalence study in dairy flocks reared in the marche region, Italy. *Vet Med Int.* 2011;2011:782875. doi: [10.4061/2011/782875](https://doi.org/10.4061/2011/782875) PMID: [21876850](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21876850/)
- Pruvot M, Forde TL, Steele J, Kutz SJ, De Buck J, van der Meer F, Orsel K. The modification and evaluation of an ELISA test for the surveillance of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in wild ruminants. *BMC Vet Res.* 2013;9:5. doi: [10.1186/1746-6148-9-5](https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-5) PMID: [23302439](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23302439/)

18. Slana I, Paolicchi F, Janstova B, Navratilova P, Pavlik I. Detection methods for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Vet Med-Czech*. 2008;53(6):283-306. [doi: 10.17221/1859-VETMED](https://doi.org/10.17221/1859-VETMED)
19. Chui LW, King R, Sim J. Development of an immunocapture-polymerase chain reaction assay using IgY to detect *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. *Can J Vet Res*. 2010;74(2):102-7. [PMID: 20592839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20592839/)
20. Munster P, Volkel I, Wemheuer W, Petschenka J, Wemheuer W, Steinbrunn C, et al. Detection of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in ileocaecal lymph nodes collected from elderly slaughter cows using a semi-nested IS900 polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*. 2011;154(1-2):197-201. [doi: 10.1016/j.vetmic.2011.06.033](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.06.033) [PMID: 21775077](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21775077/)
21. Leite TS, Mather JA. A new approach to octopuses' body pattern analysis: a framework for taxonomy and behavioral studies. *Am Malacol Bull*. 2008;24(1):31-41. [doi: 10.4003/0740-2783-24.1.31](https://doi.org/10.4003/0740-2783-24.1.31)
22. Pillai SR, Jayarao BM. Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* directly from raw milk. *J Dairy Sci*. 2002;85(5):1052-7. [doi: 10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74165-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74165-9) [PMID: 12086038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12086038/)
23. Sohal JS, Singh SV, Subhodh S, Singh AV, Singh PK, Sheoran N, et al. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* diagnosis and strain typing--present status and future developments. *Indian J Exp Biol*. 2007;45(10):843-52. [PMID: 17948732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17948732/)
24. Rapp D. DNA extraction from bovine faeces: current status and future trends. *J Appl Microbiol*. 2010;108(5):1485-93. [doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04606.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04606.x) [PMID: 19912432](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19912432/)
25. Sting R, Hrubenja M, Mandl J, Seemann G, Salditt A, Waibel S. Detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in faeces using different procedures of pre-treatment for real-time PCR in comparison to culture. *Vet J*. 2014;199(1):138-42. [doi: 10.1016/j.tvjl.2013.08.033](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.033) [PMID: 24280588](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24280588/)
26. Cocito C, Gilot P, Coene M, de Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. Paratuberculosis. *Clin Microbiol Rev*. 1994;7(3):328-45. [doi: 10.1128/CMR.7.3.328](https://doi.org/10.1128/CMR.7.3.328) [PMID: 7923053](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7923053/)
27. Lavers CJ, Barkema HW, Dohoo IR, McKenna SL, Keefe GP. Evaluation of milk ELISA for detection of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in dairy herds and association with within-herd prevalence. *J Dairy Sci*. 2014;97(1):299-309. [doi: 10.3168/jds.2013-7101](https://doi.org/10.3168/jds.2013-7101) [PMID: 24239088](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24239088/)
28. Sweeney RW, Whitlock RH, Buckley CL, Spencer PA. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest*. 1995;7(4):488-93. [doi: 10.1177/104063879500700411](https://doi.org/10.1177/104063879500700411) [PMID: 8580170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8580170/)
29. Juste RA, Garrido JM, Geijo M, Elguezal N, Aduriz G, Atxaerandio R, Sevilla I. Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in cattle and sheep. *J Vet Diagn Invest*. 2005;17(4):354-9. [doi: 10.1177/104063870501700409](https://doi.org/10.1177/104063870501700409) [PMID: 16130994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16130994/)
30. Collins MT. Interpretation of a commercial bovine paratuberculosis enzyme-linked immunosorbent assay by using likelihood ratios. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(6):1367-71. [doi: 10.1128/cdli.9.6.1367-1371.2002](https://doi.org/10.1128/cdli.9.6.1367-1371.2002) [PMID: 12414776](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12414776/)
31. McKenna SL, Keefe GP, Barkema HW, Sockett DC. Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* using tissue and fecal culture as comparison standards. *Vet Microbiol*. 2005;110(1-2):105-11. [doi: 10.1016/j.vetmic.2005.07.010](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.07.010) [PMID: 16125880](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16125880/)
32. Clark DL Jr, Koziczkowski JJ, Radcliff RP, Carlson RA, Ellingson JL. Detection of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. *J Dairy Sci*. 2008;91(7):2620-7. [doi: 10.3168/jds.2007-0902](https://doi.org/10.3168/jds.2007-0902) [PMID: 18565921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18565921/)



Radiographic Evaluation of Effective Quantitative Criteria in Diagnosis of Laminitis before and after Trimming in Healthy Horses

Sarang Soroori^{1✉}, Amir Tavakoli^{2✉}, Hesameddin Akbarein^{3✉}, Mojtaba Bonyadi^{2✉}, Banafsheh Shateri Amiri^{2✉}

¹ Department of Surgery and Radiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

² Graduate from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 24 December 2022, Accepted: 1 March 2023



[10.22059/jvr.2022.337408.3228](https://doi.org/10.22059/jvr.2022.337408.3228)



[20.1001.1.20082525.1402.78.1.4.6](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1402.78.1.4.6)

Abstract

BACKGROUND: Horses are economically and emotionally valuable animals in various activities, especially sports. Thus, paying attention to their limb's health and conformation is vital. One of the most common diseases in the limbs of horses is laminitis. Horses with this condition suffer from lameness because it affects laminar tissue. In addition to clinical signs, radiographic criteria are essential for identifying this disease.

OBJECTIVES: It is predicted that examining the effectiveness of quantitative radiographic criteria of the hoof can be helpful in the diagnosis of laminitis. Therefore, in this study, five quantitatively effective factors were investigated before and after hoof trimming to determine the changes in the radiographic diagnosis of laminitis.

METHODS: A total of 11 clinically healthy horses were used in the current study. Using Marco DICOM Viewer software, lateral and dorsopalmar radiographs from the hoofs of both forelimbs were evaluated for the diagnosis of laminitis using effective quantitative criteria. Using SPSS version 24, paired T-tests were used to analyze quantitative data. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS: According to the results of this study, there were no significant differences between the right and left forelimbs after hoof trimming. On the other hand, significant differences were observed in the four following criteria: dorsal thickness between the dorsal surface of the third phalanx and the dorsal surface of the hoof, the angle between the dorsal surface of the third phalanx and the dorsal surface of the hoof, sole thickness, and the ratio of the third phalanx dorsal surface thickness to its maximum length in each forelimb before and after hoof trimming.

CONCLUSIONS: During the radiographic examination, the hoof should be positioned in a standard way to diagnose laminitis accurately. However, if the hoof is not trimmed or not trimmed properly, it can interfere with laminitis diagnosis.

Keywords: Hoof trimming, Horse, Laminitis, Quantitative criteria, Radiography

Copyright © Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s)
Publisher: University of Tehran

Corresponding author: Sarang Soroori, Tel/Fax: 021-61117124 / 021-66438327



How to cite this article:

Soroori, S., Tavakoli, A., Akbarein, H., Bonyadi, M., Shateri Amiri, B. Radiographic Evaluation of Effective Quantitative Criteria in Diagnosis of Laminitis Before and After Trimming in Healthy Horses. *J Vet Res*, 2023; 78(1): 31-37. doi: [10.22059/jvr.2022.337408.3228](https://doi.org/10.22059/jvr.2022.337408.3228)

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Mean \pm SEM of effective quantitative criteria in diagnosing laminitis before and after trimming hooves in healthy horses.

Graph 1. Mean \pm SEM of effective quantitative criteria in diagnosing laminitis before and after trimming hooves in healthy horses.

Figure 1. Radiographic measurements of the hoof.

A and B indicate the dorsal surface of the hoof and dorsal surface of the third phalanx, which in the lack of hoof trimming, these lines form an angle that may be misdiagnosed as chronic laminitis, D: Dorsal thickness, L: Maximum length of the third phalanx, E: Sole thickness, F: D-founder.

Figure 2. Radiographic measurements before hoof trimming.

Figure 3. Radiographic measurements after hoof trimming. Note that after hoof trimming, the heel location of the third phalanx showing its normal angle relative to the toe location.



دوره ۷۸، شماره ۱، ۱۴۰۲، ۳۷-۳۱

ارزیابی رادیوگرافی شاخص‌های کمی مؤثر در تشخیص بیماری لامینایتیس قبل و بعد از اصلاح سم در اسب‌های سالم

سارنگ سروری^۱، امیر توکلی^۲، حسام‌الدین اکبرین^۳، مجتبی بنیادی^۲، بنفشه شاطری‌امیری^۲

^۱ گروه جراحی و رادیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۳ گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۳ دی ماه ۱۴۰۱، تاریخ پذیرش: ۱۰ اسفند ماه ۱۴۰۱

doi 10.22059/jvr.2022.337408.3228



20.1001.1.20082525.1402.78.1.4.6

چکیده

زمینه مطالعه: اسب از دیدگاه اقتصادی و عاطفی حیوانی ارزشمند می‌باشد و در فعالیت‌های مختلف خصوصاً فعالیت‌های ورزشی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین توجه به سلامت و ارزیابی عملکرد اندام‌های حرکتی حیوان بسیار حائز اهمیت می‌باشد. یکی از بیماری‌های شایع در اندام حرکتی اسب لامینایتیس است. لامینایتیس یکی از بیماری‌های بسیار مهم بافت لامینای سم در اسب‌ها می‌باشد که منجر به لنگش می‌شود. در تشخیص این بیماری در کنار علائم بالینی، ارزیابی شاخص‌های رادیوگرافی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

هدف: پیش‌بینی می‌شود که بررسی میزان اثرگذاری اصلاح سم بر روی شاخص‌های کمی رادیوگرافی سم در تشخیص بیماری لامینایتیس کمک‌کننده باشد، بنابراین در مطالعه حاضر به ارزیابی تغییرات پنج شاخص کمی مؤثر در تشخیص رادیوگرافی بیماری لامینایتیس قبل و بعد از اصلاح سم پرداخته شده است.

روش کار: در مطالعه حاضر از ۱۱ نمونه اسب که از نظر بالینی سالم هستند به منظور تهیه رادیوگراف استفاده شد. از سم هر دو اندام قدامی اسب‌های مورد مطالعه دو رادیوگراف با نماهای جانبی-میانی و پشتی-کف دستی قبل و بعد از اصلاح سم تهیه شد و شاخص‌های کمی مؤثر در تشخیص لامینایتیس با استفاده از نرم‌افزار Marco DICOM Viewer در رادیوگراف‌های قبل و بعد از اصلاح سم اندازه‌گیری و مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های کمی از آزمون (Paired T test) استفاده و $P \leq 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج: براساس یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر در مورد شاخص D-founder اندام قدامی راست و چپ قبل و پس از اصلاح سم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و در مورد چهار شاخص دیگر مورد مطالعه که شامل ضخامت بین سطح پشتی بند سوم تا سطح پشتی سم، زاویه بین سطح پشتی بند سوم و سطح پشتی سم، ضخامت کف سم و نسبت بین ضخامت سطح پشتی بند سوم با بیشترین طول بند سوم انگشت در هر اندام قبل و پس از اصلاح سم اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شد.

نتیجه‌گیری نهایی: برای تشخیص و قضاوت درست در مورد عارضه لامینایتیس به وضعیت سم در هنگام تهیه تصاویر رادیوگرافی باید توجه ویژه‌ای شود زیرا در صورتی که بافت شاخی سم در وضعیت نامناسبی باشد امکان اختلال در تشخیص رادیوگرافی وجود خواهد داشت به عبارت دیگر اگر اصلاح سم انجام نشده باشد و یا به‌صورت نادرست انجام شده باشد می‌تواند در تشخیص دقیق رادیوگرافی اختلال ایجاد کند.

کلمات کلیدی: اسب، اصلاح سم، رادیوگرافی، شاخص‌های کمی، لامینایتیس

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: سارنگ سروری، گروه جراحی و رادیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

از اسب به عنوان یک حیوان نجیب در زمینه‌های مختلفی مانند فعالیت‌های ورزشی، تفریحی، اقتصادی، کشاورزی، پلیسی و نظامی استفاده می‌شود. در حال حاضر نگهداری و تربیت اسب بسیار گسترش یافته است. در این ارتباط، سلامت اسب و به‌ویژه اندام‌های حرکتی در اسب‌ها

بسیار حائز اهمیت می‌باشد به طوری که امروزه اسب‌هایی که دارای مشکلات اندام حرکتی هستند به ندرت برای فروش به عنوان اسب ورزشی ارائه می‌شوند. مشکلات اندام حرکتی شامل آزرده‌گی و شکستگی‌های استخوانی، بیماری‌های مفصلی و مشکلات مربوط به انگشتان و سم که در اسب بسیار رایج هستند باید به کمک تصویربرداری تشخیصی به طور کامل بررسی شده و پس از تشخیص، برنامه درمانی مناسب برای آن اتخاذ شود. امروزه با پیشرفت علم دامپزشکی و همچنین دانش تصویربرداری تشخیصی از جمله علم رادیوگرافی، مشکلات اندام حرکتی اسب با سرعت و دقت بیشتری بررسی می‌شود (۵-۱). یکی از بیماری‌های شایع در اندام حرکتی اسب لامینیتیس می‌باشد. لامینیتیس یکی از بیماری‌های بسیار مهم بافت لامینای سم در اسب‌ها می‌باشد که باعث لنگش می‌شود. در تشخیص این بیماری در کنار علائم بالینی، ارزیابی شاخص‌های رادیوگرافی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۶-۱۰). از آنجایی که بررسی میزان اثرگذاری اصلاح سم بر روی شاخص‌های کمی رادیوگرافی در تشخیص عارضه لامینیتیس کمک کننده می‌باشد، لذا در مطالعه حاضر به ارزیابی تغییرات پنج شاخص کمی مؤثر در تشخیص رادیوگرافی بیماری لامینیتیس قبل و بعد از اصلاح سم پرداخته شده است (۱۱-۱۳). در این راستا ۱۱ اسب که از نظر بالینی سالم بوده‌اند تحت مطالعه رادیوگرافی قرار گرفتند. به منظور تصویربرداری، از سم هر دو اندام قدامی اسب‌های مورد مطالعه دو رادیوگراف با نماهای لترومدیال و دورسوپالمار قبل و بعد از اصلاح سم تهیه شد و شاخص‌های کمی مؤثر در تشخیص لامینیتیس با استفاده از نرم افزار Marco DICOM Viewer در رادیوگراف‌های قبل و بعد از اصلاح سم اندازه‌گیری و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ مورد ارزیابی آماری قرار گرفت. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی تغییرات پنج شاخص کمی مؤثر در تشخیص رادیوگرافی بیماری لامینیتیس قبل و بعد از اصلاح سم می‌باشد. به نظر می‌رسد از آنجایی که در طی روند نعل‌بندی و اصلاح بافت شاخی سم، نعل بند اقدام به سمباده زدن سطح پشتی بافت شاخی سم می‌نماید و برای اصلاح کف سم اقدام به قیاب و کوتاه کردن بافت شاخی کف سم می‌کند، تغییر بافت شاخی سم می‌تواند فاکتورهای مورد ارزیابی در تشخیص رادیوگرافی لامینیتیس را تحت تأثیر قرار دهد (۱۴-۱۷).

مواد و روش کار

در مطالعه حاضر از ۱۱ رأس اسب پرشی موجود در اسب‌داری‌های اطراف تهران به منظور مطالعه و بررسی استفاده شد. در ابتدا وضعیت سلامتی اسب‌ها با معاینات بالینی مورد ارزیابی قرار گرفت و عدم وجود عارضه و بیماری خاص در حیوانات مورد مطالعه تأیید شد. در مطالعه حاضر، رادیوگرافی با استفاده از تیوب اشعه ایکس شرکت Poskom و با فاکتورهای تابشی ۶۵ کیلوولت و ۳/۵ میلی آمپر ثانیه انجام شد. به منظور رادیوگرافی در مطالعه حاضر از کاست ده در دوازده اینچ شرکت konica Minolata مدل Aerodr 2 1417s استفاده شد. برای تهیه رادیوگراف ابتدا سم‌ها به طور کامل تمیز شدند تا هرگونه عوامل خارجی که می‌تواند موجب اختلال در تصاویر رادیوگرافی شود برطرف گردد. در ادامه از سم هر دو اندام قدامی اسب‌های مورد مطالعه دو رادیوگراف با نماهای جانبی-میانی و پشتی-کف دستی قبل و بعد از اصلاح سم تهیه شد و شاخص‌های کمی مؤثر در تشخیص لامینیتیس که شامل D-founder، ضخامت بین سطح پشتی بند سوم و سطح پشتی سم، زاویه بین سطح پشتی بند سوم و سطح پشتی سم، ضخامت کف سم و نسبت بین ضخامت سطح پشتی بند سوم با بیشترین طول بند سوم انگشت می‌باشند مورد بررسی و مذاقه قرار گرفتند. لازم به ذکر است که برای به دست آوردن شاخص D-founder با توجه به کیفیت بالای تصاویر رادیوگرافی دیجیتال، حد واسط بافت شاخی سم تا پوست (coronary band) که به صورت یک فرورفتگی کوچک در تصاویر رادیوگرافی مشخص می‌باشد مبنای اندازه‌گیری قبل و بعد از اصلاح سم قرار گرفت. در رادیوگراف‌های قبل و بعد از اصلاح سم و با استفاده از نرم افزار Marco DICOM Viewer اندازه‌گیری شده و تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار (Mean \pm SEM) توصیف شدند. برای اطمینان از نرمال بودن داده‌ها از آزمون تک‌نمونه‌ای کولموگوروف-اسمیرنوف (One-Sample Kolmogorov-Smirnov) استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های کمی از آزمون زوجی (Paired T test) استفاده و $P < 0/005$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

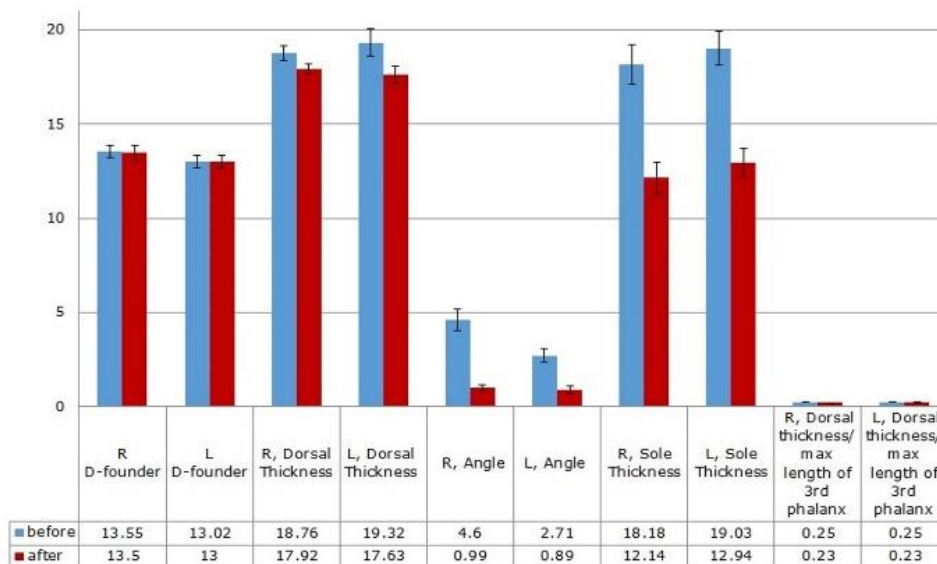
نتایج

در مطالعه حاضر نتایج حاصل از اندازه‌گیری پارامترهای مختلف مورد آنالیز تحلیلی (جدول ۱) و توصیف قرار گرفتند که به شرح ذیل می‌باشند.

آنالیز تحلیلی: آنالیز تحلیلی پارامترهای کمی اندازه‌گیری شده در مطالعه حاضر به شرح زیر می‌باشد (نمودار ۱).

جدول ۱. میانگین \pm خطای معیار (Mean \pm SEM) شاخص های کمی مؤثر در لامینایتیس قبل و بعد از اصلاح سم.

خطای معیار	میانگین برحسب میلی متر	پارامترهای اندازه گیری شده
۰/۳۵	۱۳/۵۵	D-founder دست راست قبل از اصلاح سم
۰/۳۸	۱۳/۵۰	D-founder دست راست پس از اصلاح سم
۰/۳۴	۱۳/۰۲	D-founder دست چپ قبل از اصلاح سم
۰/۳۳	۱۳/۰۰	D-founder دست چپ پس از اصلاح سم
۰/۴۰	۱۸/۷۶	ضخامت بین سطح پشتی بند سوم تا سطح پشتی سم دست راست قبل از اصلاح سم
۰/۲۶	۱۷/۹۲	ضخامت بین سطح پشتی بند سوم تا سطح پشتی سم دست راست پس از اصلاح سم
۰/۷۲	۱۹/۳۲	ضخامت بین سطح پشتی بند سوم تا سطح پشتی سم دست چپ قبل از اصلاح سم
۰/۴۷	۱۷/۶۳	ضخامت بین سطح پشتی بند سوم تا سطح پشتی سم دست چپ پس از اصلاح سم
۰/۵۷	۴/۶۰	زاویه بین سطح پشتی بند سوم و سطح پشتی سم دست راست قبل از اصلاح سم
۰/۱۸	۰/۹۹	زاویه بین سطح پشتی بند سوم و سطح پشتی سم دست راست پس از اصلاح سم
۰/۳۶	۲/۷۱	زاویه بین سطح پشتی بند سوم و سطح پشتی سم دست چپ قبل از اصلاح سم
۰/۲۰	۰/۸۹	زاویه بین سطح پشتی بند سوم و سطح پشتی سم دست چپ پس از اصلاح سم
۱/۰۶	۱۸/۱۸	فاصله نوک بند سوم تا کف سم دست راست قبل از اصلاح سم
۰/۸۳	۱۲/۱۴	فاصله نوک بند سوم تا کف سم دست راست پس از اصلاح سم
۰/۸۹	۱۹/۰۳	فاصله نوک بند سوم تا کف سم دست چپ قبل از اصلاح سم
۰/۷۷	۱۲/۹۴	فاصله نوک بند سوم تا کف سم دست چپ پس از اصلاح سم
۰/۰۱	۰/۲۵	نسبت بین ضخامت سطح پشتی بند سوم با بیشترین طول بند سوم انگشت دست راست قبل از اصلاح سم
۰/۰۰	۰/۲۳	نسبت بین ضخامت سطح پشتی بند سوم با بیشترین طول بند سوم انگشت دست راست پس از اصلاح سم
۰/۰۱	۰/۲۵	نسبت بین ضخامت سطح پشتی بند سوم با بیشترین طول بند سوم انگشت دست چپ قبل از اصلاح سم
۰/۰۱	۰/۲۳	نسبت بین ضخامت سطح پشتی بند سوم با بیشترین طول بند سوم انگشت دست چپ پس از اصلاح سم

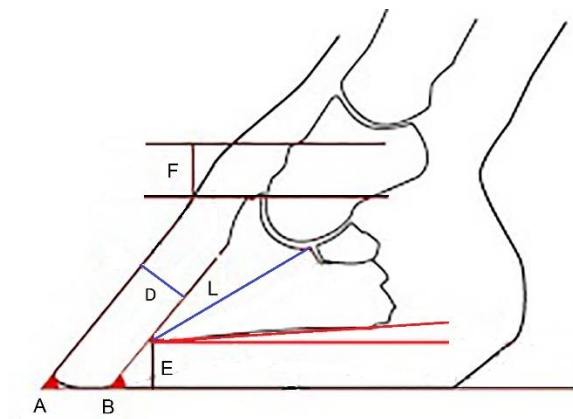


نمودار ۱. نمودار میانگین \pm خطای معیار (Mean \pm SEM) شاخص های کمی مؤثر در لامینایتیس قبل و بعد از اصلاح سم.

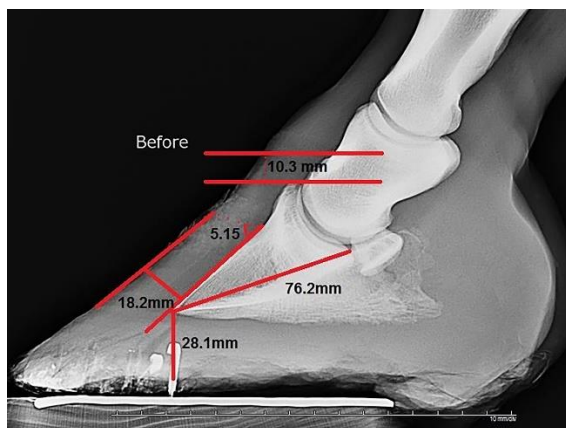
مطالعه حاضر نشان داد که مقایسه پارامترهای اندازه گیری شده بجز پارامتر D Founder قبل و بعد از اصلاح سم و در هر دو اندام قدامی راست و چپ همگی دارای تفاوت معنی داری بودند که این تفاوت معنی دار نقش و اهمیت تأثیرگذار اصلاح سم در تشخیص دقیق رادیوگرافی را به خوبی متذکر شد. تفاوت آماری و سطح معنی داری پارامترهای اندازه گیری شده قبل و بعد از اصلاح سم در هر دو اندام قدامی راست و چپ عبارت بودند از: ضخامت سطح پشتی بند سوم تا سطح پشتی سم در اندام قدامی راست ($P=0/002$) و چپ ($P=0/001$)، زاویه بین سطح پشتی بند سوم و سطح

پشتی سم در اندام قدامی راست ($P < 0/001$) و چپ ($P < 0/001$)، ضخامت کف سم در اندام قدامی راست ($P < 0/001$) و چپ ($P < 0/001$) و نسبت بین ضخامت سطح پشتی بند سوم با ماکزیمم طول بند سوم انگشت در اندام قدامی راست ($P = 0/002$) و چپ ($P = 0/025$).

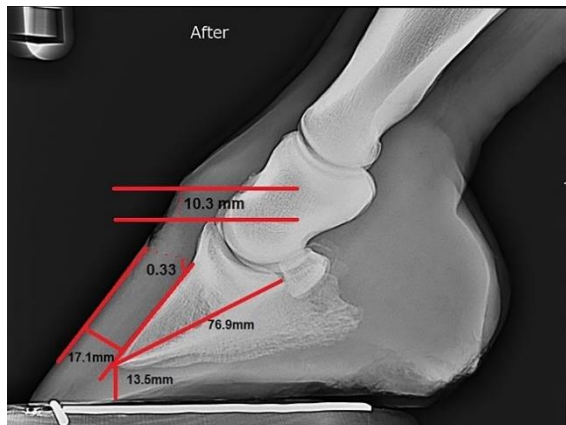
این در حالی بود که پارامترهای اندازه‌گیری شده قبل از اصلاح سم و مقایسه آن در اندام‌های قدامی راست و چپ با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند. همچنین مقایسه این پارامترها بعد از اصلاح سم و مقایسه آن در اندام‌های قدامی راست و چپ تفاوت معنی‌دار نشان ندادند (تصویر ۲، ۳).



تصویر ۱. اندازه‌گیری‌های کمی سم، A و B: به ترتیب بیانگر خطوط سطح پشتی سم و سطح پشتی بند سوم انگشت می‌باشند که به دلیل عدم اصلاح سم با یکدیگر زاویه تشکیل داده‌اند که می‌تواند باعث اشتباه در تشخیص عارضه لمینایتیس مزمن شود. D: ضخامت بین سطح پشتی بند سوم تا سطح پشتی سم، E: ضخامت کف سم، L: بیشترین طول بند سوم، F: D-founder.



تصویر ۲. اندازه‌گیری‌های کمی پارامترهای ذکر شده قبل از اصلاح سم.



تصویر ۳. اندازه‌گیری پارامترهای ذکر شده بعد از اصلاح سم. توجه شود که پس از اصلاح سم، موقعیت ناحیه پاشنه بند سوم در داخل سم نسبت به موقعیت ناحیه پنجه زاویه طبیعی خود را نشان می‌دهد.

بحث

یکی از بیماری‌های شایع در اندام حرکتی اسب لامینایتیس می‌باشد. لامینایتیس یکی از بیماری‌های بسیار مهم بافت لامینای سم در اسب‌ها می‌باشد که منجر به لنگش می‌شود. به نظر می‌رسد بررسی میزان اثرگذاری اصلاح سم بر روی شاخص‌های کمی رادیوگرافی سم در تشخیص بیماری لامینایتیس کمک کننده باشد. با توجه به اهمیت این موضوع در راستای مطالعات به عمل آمده می‌توان به موارد ذیل اشاره و با مطالعه حاضر مقایسه نمود. Kummer و همکاران در سال ۲۰۰۶ به منظور بررسی شاخص‌های رادیوگرافی مرتبط با جایگاه بند سوم در سم، ۴۰ رأس اسب سالم و بدون تاریخچه ابتلا به لامینایتیس را دو بار و به فاصله هشت هفته قبل و بعد از اصلاح سم تحت مطالعه رادیوگرافی قرار دادند. در مطالعه حاضر در نمای جانبی ۲۲ پارامتر و در نمای پشتی - کف دستی ۱۶ پارامتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتیجه مطالعه حاضر تأثیر قابل توجه اصلاح سم بر conformation آن و خصوصاً شاخص‌های موجود در ناحیه پنجه گزارش گردید. در بین تمام معیارهای اندازه‌گیری شده موقعیت قرارگیری بند سوم در ارتباط با جعبه شاخی سم، فاصله بین انتهای پایینی بند سوم انگشت در ناحیه پنجه تا کف سم، فاصله نوک بند سوم تا نقطه break over (ناحیه‌ای در پنجه سم اسب است که در هنگام بلند شدن پاشنه به این قسمت فشار وارد می‌شود و آخرین قسمتی از سم است که در زمان گام برداشتن اسب از زمین بلند می‌شود). بیشترین تغییر را قبل و بعد از اصلاح سم نشان دادند. با مقایسه یافته‌های به دست آمده از مطالعه Kummer و همکاران در سال ۲۰۰۶ با مطالعه حاضر شاخص‌های مورد مطالعه به جز D-founder قبل و بعد از اصلاح سم اختلاف معنی‌داری را نشان دادند.

Cripps و همکاران در سال ۱۹۹۹ از ۲۵ اسب سالم رادیوگراف جانبی تهیه کردند و طول و عرض هر سم و قد هر اسب از ناحیه جدوگاه تا سطح زمین نیز اندازه‌گیری شد. در این مطالعه به علت اهمیت شاخص D-founder در تشخیص بیماری لامینایتیس، به این شاخص توجه ویژه شد. در بین نژادهای مختلف در رابطه با D-founder و ضخامت دیواره سم تفاوت معنی‌داری وجود داشت. میزان D-founder در طی ۶ هفته مطالعه تغییر معنی‌داری نشان نداد. همچنین خطاهای ناشی از زاویه‌دار بودن اشعه ایکس فاقد اهمیت بالینی گزارش گردید. در مطالعه حاضر در مورد شاخص D-founder قبل و بعد از اصلاح سم در یک نژاد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (۱۴). Kummer و همکاران در سال ۲۰۰۴ مطالعه‌ای بر روی روش استاندارد به منظور تهیه رادیوگراف از سم انجام دادند. در این مطالعه ۱۰ رادیوگراف از هر دو نمای جانبی - میانی و پشتی - کف دستی از هر دو اندام حرکتی قدامی یک اسب در حال وزن‌گیری به منظور تکرار پذیری تکنیک رادیوگرافی تهیه شد. رادیوگراف‌های دیجیتال توسط نرم افزار Metron PX ارزیابی شدند و ۱۳ پارامتر در نمای جانبی - میانی و ۱۰ پارامتر در نمای پشتی - کف دستی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که استفاده از این تکنیک‌های استاندارد میزان دقت و تکرار پذیری رادیوگرافی از سم را افزایش می‌دهد (۴). Kummer و همکاران در سال ۲۰۰۹ اثر روند اصلاح سم که توسط شش نعل بند مختلف انجام شده بود را بر روی شاخص‌های رادیوگرافی سم بررسی کردند. در این مطالعه از ۴۰ اسب با سن ۶ تا ۱۲ سال استفاده شد و بیان شد که اصلاح سمی که توسط نعل بندهای مختلف انجام می‌شود و همچنین اصلاح سمی که توسط یک نعل بند در زمان‌های مختلف انجام می‌شود تفاوت معنی‌دار بر روی شاخص‌های مورد مطالعه در رادیوگرافی دارد. در مطالعه حاضر با توجه به این که اصلاح سم و سپس تهیه تصاویر رادیوگرافی توسط یک فرد انجام می‌شد بنابراین به نظر می‌رسید که تأثیر نقش عامل اصلاح کننده سم در حداقل ممکن باشد (۱۶). Vali و همکاران در سال ۲۰۱۸ مطالعه‌ای با هدف بررسی اثرات اصلاح سم بر ارزیابی تعادل سم از دیدگاه رادیوگرافی در سم اندام‌های قدامی تعدادی اسب نژاد دره - شوری انجام دادند و با تهیه رادیوگراف از نمای جانبی قبل و بعد از اصلاح سم و براساس نتایج حاصل از اندازه‌گیری پارامترهای مختلف بیان نمودند که مقادیر ضخامت دیواره پشتی سم و همین‌طور ضخامت کف سم در اندام سمت چپ بیشتر از همین شاخص‌ها در اندام سمت راست بوده است و همین‌طور زوایای مورد اندازه‌گیری در این مطالعه (زاویه محور سم، زاویه محور بند سوم انگشت، زاویه محور بند دوم انگشت) پس از اصلاح سم افزایش یافته است (۱۰). در مطالعه حاضر براساس یافته‌ها، ضخامت بین سطح پشتی بند سوم و سطح پشتی سم اندام راست و چپ قبل و بعد از اصلاح سم اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد و همین‌طور در مورد ضخامت نوک بند سوم تا ناحیه شاخی شده کف سم اندام قدامی راست و چپ قبل و بعد از اصلاح سم اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. برای تشخیص و قضاوت درست در مورد عارضه لامینایتیس باید توجه ویژه‌ای به وضعیت سم در هنگام تهیه تصاویر رادیوگرافی نمود تا چنانچه بافت شاخی سم در وضعیت نامناسبی باشد امکان اختلال در تشخیص رادیوگرافی وجود خواهد داشت به عبارت دیگر اگر اصلاح سم انجام نشده باشد و یا به صورت نادرست انجام شده باشد می‌تواند در تشخیص دقیق رادیوگرافی مداخله تأثیرگذار داشته باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان از جناب آقای دکتر احسان ترکی، متخصص بیماری‌های داخلی دام‌های بزرگ و شاغل در فیلد اسب به دلیل همکاری در انجام مطالعه حاضر تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Al-Agele R, Paul E, Dvojmoc VK, Sturrock C J, Rauch C, Rutland C S. The anatomy, histology and physiology of the healthy and lame equine hoof. In: Rutlan CS, Kubale V. editors. 1st ed. Veterinary Anatomy and Physiology. UK. 2019.p.19-32.
2. Cripps PJ, Eustace RA. Radiological measurements from the feet of normal horses with relevance to laminitis. Equine Vet J. 2020;31(5):427-432. doi: 10.1111/j.2042-3306.1999.tb03844.x
3. Pollitt CC. Equine laminitis. Clinical techniques in equine practice. Equine Prac J. 2004;3(1):34-44. doi: 10.1053/j.ctep.2004.07.003
4. Thomason JJ, McClinchey HL, Faramarzi B, Jofriet JC. Mechanical behavior and quantitative morphology of the equine laminar junction. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2005;283(2):366-79. doi: 10.1002/ar.a.20173 PMID: 15747348
5. Weaver M. Hand Book of Equine Radiography. 1st ed. Elsevier Saunders. UK; 2010.p.189-299.
6. Baxter GM. Adams and Stashak's lameness in horses. 7th ed. Wiley Blackwell, USA; 2008.p.67-188.
7. Kummer M, Geyer H, Imboden I, Auer J, Lischer C. The effect of hoof trimming on radiographic measurements of the front feet of normal Warmblood horses. Vet J. 2006;172(1):58-66. doi: 10.1016/j.tvjl.2005.03.008 PMID: 16772132
8. Pollitt CC. Clinical anatomy and physiology of the normal equine foot. Equine Vet E. 1992;4(5):219-224. doi: 10.1111/j.2042-3292.1992.tb01623.x
9. Ross MW, Dyson SJ. Diagnosis and Management of Lameness in the Horse. 2^{ed} ed. Elsevier Health Sciences. USA; 2010. .
10. Vali R, Bazyari A. The effects of hoof trimming on radiographic measurements of hoof balance in front feet of normal dareh-shori horses. Iran J Vet Sur. 2018;13(2):58-64. doi: 10.22034/ivsa.2018.147486.1157
11. Kalka K, Pollard D, Dyson SJ. An investigation of the shape of the hoof capsule in hindlimbs, its relationship with the orientation of the distal phalanx and comparison with forelimb hoof capsule conformation. Equine Vet E. 2020;33(8):422-429. doi: 10.1111/eve.13341
12. Balch OK, Butler D, Collier MA. Balancing the normal foot: hoof preparation, shoe fit and shoe modification in the performance horse. In: Raul B, Scott B. editors. 1st ed. The equine foot Equine Veterinary Education. Philadelphia, USA. 1997.p.591-617.
13. Kainer RA. Clinical anatomy of the equine foot. Vet Clin North Am Equine Pract. 1989;5(1):1-27. doi: 10.1016/s0749-0739(17)30601-6 PMID: 2650825
14. Baxter GM. Manual of Equine Lameness. 2^{ed} ed. John Wiley & Sons, USA. 2011.p.14-38.
15. Kroekenstoel AM, Heel AN MCV, Van Weeren PR, Back W. Developmental aspects of distal limb conformation in the horse: the potential consequences of uneven feet in foals. Equine Vet J. 2006;38(7):652-656. doi: 10.2746/042516406x159089 PMID: 17228581
16. Kummer M, Lischer C, Ohlerth S, Vargas J, Auer J. Evaluation of a standardised radiographic technique of the equine hoof: Evaluation einer standardisierten röntgentechnik zur untersuchung des pferdehufes. Schweiz Arch Tierheilkd. 2004;146(11):507-514. doi: 10.1024/0036-7281.146.11.507 PMID: 15581285
17. Kummer M, Gygax D, Lischer C, Auer J. Comparison of the trimming procedure of six different farriers by quantitative evaluation of hoof radiographs. Vet J. 2009;179(3):401-406. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.10.029 PMID: 18314359



Anatomic and Excretory Urography Investigation of the Kidneys, Ureters and Urinary Bladder in Guinea Pig

Saba Azimzadeh^{1✉}, Siamak Alizadeh^{2✉}, Mohammad Reza Hosseinchi^{3✉}¹ Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran² Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran³ Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

Received: 18 January 2023, Accepted: 19 March 2023

[10.22059/jvr.2023.348776.3300](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.348776.3300)[20.1001.1.20082525.1402.78.1.5.7](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1402.78.1.5.7)

Abstract

BACKGROUND: Excretory urography is a method of imaging the kidneys, ureters, and urinary bladder which uses contrast medium containing the iodine compounds.

OBJECTIVES: This study aimed to evaluate the anatomical structures of urinary tract in the nephrogram, pilogram, and cystogram phases, and determine the exact standard for the size of kidneys, ureters and urinary bladder in guinea pigs to be used to interpret the results, and clinical decisions.

METHODS: This study was carried out on 10 guinea pigs with a mean age of 12±1.33 months and average weight of 1.12±0.18 kg. Before to the administration of contrast medium, each guinea pig was fast and Dimethicone 20 mg/kg was given orally. At the time of administration of contrast agent, each animal was sedated by using Ketamine 30 mg/kg and diazepam 5 mg/kg cocktail, and then 1500 mgI/kg of meglumine compound 60 % was injected subcutaneously over the shoulder area. Ventrodorsales and lateral abdominal X-rays were taken, thereafter every 5 minutes up to 60 minutes to complete the pyelogram phase. In lateral radiographs of each guinea pig, the length of the body of the second lumbar vertebra was measured to be used as an indicator in determining the standard size of the kidneys.

RESULTS: Based on the results of this study, the average length, width, and thickness of the right kidney compared to the length of the second lumbar vertebra were 2.19, 1.64, and 1.33 cm, and in the left kidney of 2.09, 1.53, and 1.41 cm and this average in right and left ureter was 6.41 and 6.22 cm, respectively.

CONCLUSIONS: The exact standards can be used in the interpretation of results, and clinical decisions to determine the normal and abnormal size of kidneys, ureters and bladder in the guinea pigs.

Keywords: Anatomy, Excretory urography, Guinea pig, Kidney, Ureter

Copyright © Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s)

Publisher: University of Tehran

Corresponding author: Siamak Alizadeh, Tel/Fax: 044-33461731

How to cite this article:

Azimzadeh, S., Alizadeh, S., Hosseinchi, M. R. Anatomic and Excretory Urography Investigation of the Kidneys, Ureters and Urinary Bladder in Guinea Pig. J Vet Res, 2023; 78(1): 39-49. doi: 10.22059/jvr.2023.348776.3300

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Body length of the second lumbar vertebra in the male, and female guinea pigs (cm).

Table 2. Length, thickness, and width of the right kidney, and the length of the right ureter (cm).

Table 3. Length, thickness, and width of the left kidney, and the length of the left ureter (cm).

Table 4. The ratio of the length, thickness, and width of the right kidney to the length of the second lumbar vertebra (cm).

Table 5. The ratio of length, thickness, and width of the left kidney to the length of the second lumbar vertebra (cm).

Figure 1. Lateral view of guinea pig. 0 minute following injection of contrast material, and observation of nephrogram phase. RK: right kidney, LK: left kidney.

Figure 2. Lateral views of a guinea pig. (A) The ureters are visible up to the caudal, end of the last lumbar vertebra. (B) The ureters originate from pelvis, and descend posteriorly. RK: right kidney, LK: left kidney, BL: bladder.

Figure 3. Lateral (A), and ventrodorsal (B) views of a guinea pig. 15 minutes after the injection of contrast material, and the observation of cystography stage. RK: right kidney, LK: left kidney, BL: bladder.

Figure 4. Ventral view and (B) dorsal view of kidneys in a female guinea pig.

Figure 5. Ventral view of kidneys in a male guinea pig.

Figure 6. Abdominal view of right kidney and hepatorenal ligament.

Figure 7. The bladder of a male guinea pig when it contains urine.



بررسی آناتومی و اوروگرافی ترشعی کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه در خوکچه هندی

صبا عظیم‌زاده^۱، سیامک علیزاده^۲، محمدرضا حسینچی^۳^۱ دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران^۲ گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران^۳ گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۲۸ دی ماه ۱۴۰۱، تاریخ پذیرش: ۲۸ اسفند ماه ۱۴۰۱

doi 10.22059/jvr.2023.348776.3300



20.1001.1.20082525.1402.78.1.5.7

چکیده

زمینه مطالعه: اوروگرافی ترشعی روشی برای تصویربرداری از کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه می‌باشد که در آن از مواد حاجبی که حاوی ترکیبات یددار غیریونی است، استفاده می‌شود.

هدف: ارزیابی ساختارهای آناتومیکی سیستم ادراری به روش اوروگرافی ترشعی در فازهای نفروگرام، پیلوگرام و سیستوگرام و همچنین تعیین استاندارد دقیق برای اندازه کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه در خوکچه‌های هندی می‌باشد تا در تفسیر نتایج و تصمیم‌گیری‌های بالینی استفاده شود.

روش کار: در مطالعه حاضر از ۱۰ خوکچه هندی با میانگین سنی $12\pm 1/33$ ماه و میانگین وزنی $1/12\pm 0/18$ کیلوگرم استفاده شد. قبل از تجویز ماده حاجب، به هر یک از خوکچه‌های هندی محرومیت از غذا و آب داده شد و داروی دایمیتکون با دوز ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی تجویز گردید و در هنگام تجویز ماده حاجب برای تسکین حیوان کوکتل داروی کتامین با دوز ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و دیازپام با دوز ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تهیه گردید و به صورت عضلانی تزریق شد. پیش از مطالعه با ماده حاجب، رادیوگراف‌های ساده تهیه گردید سپس ماده حاجب مگلوئین کامپند ۶۰ درصد با دوز ۱۵۰۰ میلی‌گرم ید به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت زیر جلدی بر روی ناحیه مفصل شانه تزریق شد، سپس رادیوگرافی در حالت گماری‌های جانبی و شکمی-پشتی هر ۵ دقیقه یک‌بار تا دقیقه ۶۰ انجام گرفت تا فاز پیلوگرام پایان یابد. در رادیوگراف‌های جانبی هر یک از خوکچه‌های هندی، طول بدنه دومین مهره کمری اندازه‌گیری شد تا از آن به عنوان شاخصی در تعیین اندازه استاندارد کلیه‌ها استفاده شود.

نتایج: بر اساس نتایج مطالعه حاضر میانگین طول، عرض و ضخامت کلیه راست نسبت به طول بدنه دومین مهره کمر به ترتیب $2/19$ ، $1/64$ و $1/33$ سانتی‌متر و در کلیه چپ به ترتیب $2/09$ ، $1/53$ و $1/41$ سانتی‌متر بود و این میانگین در حالب راست و چپ نیز به ترتیب $6/41$ و $6/22$ سانتی‌متر بود.

نتیجه‌گیری نهایی: استانداردهای دقیق به دست آمده در مطالعه حاضر می‌تواند در تفسیر نتایج و تصمیم‌گیری‌های بالینی برای تعیین اندازه طبیعی و غیرطبیعی کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه در خوکچه‌های هندی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: اوروگرافی ترشعی، آناتومی، حالب، خوکچه هندی، کلیه

کی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: سیامک علیزاده، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

مقدمه

خوکچه هندی از جوندگان بزرگ و هیستریکومورف بوده و وزن آن بین ۱۳۰۰-۸۵۰ گرم متغیر می‌باشد و طول آن نیز به ۱۹ الی ۲۶ سانتی‌متر می‌رسد. فاقد دم بوده و گوش‌های بدون مو، گرد و کوچکی دارند. در اندام‌های حرکتی قدیمی آن‌ها چهار انگشت و در اندام‌های حرکتی خلفی سه انگشت وجود دارد و سر هر یک از انگشتان نیز به چنگال پهنی ختم می‌شود. معمولاً به‌طور میانگین چهار تا پنج سال عمر می‌کنند اما اگر در شرایط خوب محیطی و تغذیه‌ای قرار گیرند ممکن است بیش از آن نیز عمر کنند (۱). مطالعات آناتومیکی محققین مختلف نشان می‌دهد که دستگاه ادراری خوکچه‌های هندی متشکل از دو کلیه لوبیایی شکل، دو حالب، یک مثانه و یک مجرای خروجی ادرار می‌باشد. کلیه‌ها به

رنگ صورتی متمایل به قرمز بوده و در فضای رتروپیتونال و در قسمت خلفی محوطه شکمی در طرفین ستون مهره‌ها جای می‌گیرند. میانگین وزن کلیه چپ و راست در حدود ۲/۲ گرم بوده و متوسط طول، عرض و ضخامت کلیه راست به ترتیب ۲۰/۳۵، ۱۴/۳۹ و ۸/۱۹ میلی‌متر و در کلیه چپ ۱۸/۲۹، ۱۳/۷۷ و ۸/۱۹ میلی‌متر می‌باشد (۲). 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 به پاپیلای کلیه ختم می‌شوند. میانگین عرض بخش قشری و میانی کلیه راست به ترتیب ۵/۵۵ و ۵/۵۰ میلی‌متر بوده و همین مقادیر برای کلیه چپ به ترتیب ۵/۷۸ و ۵/۴۹ میلی‌متر می‌باشد (۳). اوروگرافی ترشحي روشی برای تصویربرداری تشخیصی از مجاری ادراری می‌باشد 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 گلوومرول‌های کلیوی شده و از طریق کلیه‌ها فیلتر شده و بدین ترتیب در بافت کلیه تجمع یافته و سبب روشن‌تر دیده شدن بافت پارانشیم کلیه، مجاری ادراری، حالب‌ها و مثانه می‌شوند (۴). همچنین این یک روش تصویربرداری تشخیصی از سیستم ادراری است که به رادیولوژیست کمک می‌کند تا به خوبی آناتومی و عملکرد کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه را بررسی کند و در صورتی که از تغییرات مایعات بدن و دهیدراتاسیون بتوان جلوگیری به عمل آورد انجام اوروگرافی با مقادیر بیشتر ماده حاجب مورد قبول بوده و به صورت روتین در معاینات تشخیصی دام‌های کوچک انجام می‌گیرد (۵، ۶). با روش اوروگرافی می‌توان برخی از اختلالات و ناهنجاری‌های سیستم ادراری نظیر سنگ‌های کلیوی، وجود پارگی در مجاری ادراری، تومورها یا توده‌های مربوط به کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه، تأثیرات جراحی بر روی سیستم ادراری، اختلالات مادرزادی مثل حالب نابجا را تشخیص داد (۷).

مطالعاتی که در رابطه با اوروگرافی در رت صورت گرفته نشان داد که کلیه و لگنچه ۱۵ الی ۶۰ ثانیه بعد از تجویز ماده حاجب و جزئیات حالب نیز ۵ الی ۱۰ دقیقه بعد از آن قابل رویت خواهد بود و ظرف مدت ۱ الی ۵ دقیقه هم ماده حاجب به مثانه می‌رسد (۸). مطالعه‌ای دیگر نشان داد که ۵ دقیقه بعد از تزریق زیرجلدی ماده حاجب یددار به سنجاب ایرانی، کلیه‌ها به صورت مشخص در رادیوگراف‌های جانبی و شکمی-پشتی قابل رؤیت بوده و شکل کلیه‌ها به صورت لوبیایی بدشکل (Atypical bean) بودند. 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 تقریباً دو برابر طول بدنه دومین مهره کمری بودند. مثانه متسع شده به شکل گلابی بوده و تا پنجمین مهره کمری نیز می‌رسید. در این مطالعه فاز پیلوگرام، فاز اوروتروگرام (Ureterogram) و 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 (۹). در مطالعه‌ای که اوروگرافی ترشحي در گربه‌ها و کوالاها صورت گرفته نشان داد که در دقایق ۵ الی ۹۰ فازهای نفروگرام، پیلوگرام و سیستوگرام قابل مشاهده بوده و اندازه کلیه چپ هم ۲/۶ برابر دومین مهره کمری بوده است (۱۰-۱۲). در گزارش دیگری اوروگرافی ترشحي در خرگوش برای ارزیابی آناتومی کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه روش مناسبی بوده و بر اساس این مطالعه 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 داشت (۱۳).

با توجه به این که تا کنون مطالعه‌ای در خصوص ارزیابی سیستم ادراری به روش اوروگرافی ترشحي با تزریق زیرجلدی ماده حاجب در خوکچه‌های هندی انجام نگرفته است، ما در صدد انجام مطالعه حاضر برآمدیم و هدف از آن ارزیابی ساختارهای آناتومیکی سیستم ادراری در فازهای نفروگرام و پیلوگرام بوده و همچنین تعیین استاندارد دقیق برای اندازه کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه در خوکچه‌های هندی بود تا در تفسیر نتایج و تصمیم‌گیری‌های بالینی برای تعیین اندازه طبیعی و غیرطبیعی این ارگان‌ها استفاده شود.

مواد و روش کار

طرح مطالعه و حیوانات: در مطالعه حاضر مقطعی-عرضی از ۱۰ خوکچه هندی با میانگین سنی $12 \pm 1/33$ ماه و میانگین وزنی $11/12 \pm 0/11$ کیلوگرم که مطابق با معیارهای پژوهش، سالم تشخیص داده شده بودند استفاده شد. این حیوانات در طول مطالعه از تغذیه مناسب برخوردار بودند و در اتاقی ایزوله که دمای آن ۲۵ درجه سانتی‌گراد با رطوبت نسبی ۶۵ درصد و مدت روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعت بود نگهداری شدند. در حیوانات تحت مطالعه آزمایشات خونی ۷ روز قبل از مطالعه انجام شد و هیچ مورد غیر طبیعی در عوامل خونی (RBC, Hgb, MCV, MCH, Hct, MCHC) و بیوشیمیایی (BUN, Creatinine, Total Protein, Albumin, Total bilirubin) مشاهده نشد (۱۴).

جدول ۱. طول بدنه مهره دوم کمر در خوکچه‌های هندی نر و ماده (بر حسب سانتی‌متر).

شماره حیوان	۱	۲	۳	۴	۵	میانگین ماده	۶	۷	۸	۹	۱۰	میانگین نر	میانگین کل
طول بدنه مهره دوم کمر	۰/۹۸	۰/۹۸	۰/۹۹	۰/۹۸	۰/۹۹	۰/۹۸	۱/۰۱	۰/۹۹	۰/۹۸	۰/۹۲	۱/۰۳	۰/۹۸	۰/۹۸

جدول ۲. طول، ضخامت و عرض کلیه سمت راست و طول حالب سمت راست (بر حسب سانتی‌متر).

شماره حیوان	طول کلیه راست	ضخامت کلیه راست	عرض کلیه راست	طول حالب راست
۱	۲/۰۳	۰/۹۱	۱/۴۳	۶/۱۷
۲	۱/۹۹	۰/۸۸	۱/۴۲	۶/۲۴
۳	۲/۰۱	۰/۸۹	۱/۴۲	۶/۲۳
۴	۲/۰۵	۰/۹۲	۱/۴۵	۶/۱۱
۵	۲/۰۴	۰/۹۲	۱/۴۳	۶/۰۰
میانگین ماده	۲/۰۲	۰/۹۰	۱/۴۳	۶/۱۵
۶	۲/۲۵	۱/۳۹	۱/۶۸	۷/۱۶
۷	۲/۴۳	۱/۴۲	۱/۵۶	۷/۲۳
۸	۲/۳۱	۱/۳۸	۱/۵۵	۷/۲۲
۹	۲/۱۰	۱/۲۰	۱/۷۲	۷/۰۰
۱۰	۲/۰۵	۱/۴۳	۱/۷۴	۶/۹۸
میانگین نر	۲/۲۲	۱/۳۶	۱/۶۵	۷/۷۲
میانگین کل	۲/۱۲	۱/۱۳	۱/۵۴	۶/۶۳

جدول ۳. طول، ضخامت و عرض کلیه سمت چپ و طول حالب سمت چپ (بر حسب سانتی‌متر).

شماره حیوان	طول کلیه چپ	ضخامت کلیه چپ	عرض کلیه چپ	طول حالب چپ
۱	۲/۰۱	۰/۹۰	۱/۴۲	۵/۹۱
۲	۱/۹۱	۰/۸۷	۱/۴۰	۶/۰۳
۳	۱/۹۹	۰/۸۸	۱/۴۱	۶/۰۵
۴	۲/۰۳	۰/۹۰	۱/۴۳	۶/۱۳
۵	۲/۰۳	۰/۹۰	۱/۴۲	۶/۱۱
میانگین ماده	۱/۹۹	۰/۸۹	۱/۴۱	۶/۰۴
۶	۲/۱۴	۱/۷	۱/۶۱	۶/۹۸
۷	۲/۳۱	۱/۶۷	۱/۴۸	۷/۱۱
۸	۲/۳۳	۱/۴۵	۱/۶۱	۷/۲۱
۹	۲/۰۱	۱/۴۹	۱/۶۲	۶/۷۶
۱۰	۱/۹۲	۱/۶۴	۱/۵۸	۶/۸۰
میانگین نر	۲/۱۴	۱/۵۹	۱/۵۸	۷/۵۷
میانگین کل	۲/۰۶	۱/۲۴	۱/۴۹	۶/۶۱

قبل از تجویز ماده حاجب، به هر یک از خوکچه‌های هندی ۶ ساعت محرومیت از غذا (Off feed) و آب داده شد و ۸ ساعت قبل از آن نیز داروی دایمتیکون با دوز ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی تجویز گردید و در هنگام تجویز ماده حاجب برای تسکین حیوان و گرفتن رادیوگراف‌هایی با کیفیت مناسب، کوکتل داروی کتامین با دوز ۳۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و دیازپام با دوز ۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تهیه گردید و به صورت عضلانی تزریق شد.

پردازش و تکنیک رادیوگرافی: پیش از مطالعه با ماده حاجب، رادیوگراف‌هایی ساده با حالت گماری‌های جانبی و شکمی-پشتی تهیه گردید. سپس ماده حاجب مگلوومین کامپند ۶۰ درصد با دوز ۱۵۰۰ میلی گرم ید به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت زیرجلدی بر روی ناحیه مفصل شانه تزریق گردید (۱۵). متعاقب تزریق ماده حاجب، رادیوگرافی در حالت گماری‌های جانبی و شکمی-پشتی هر ۵ دقیقه یکبار تا دقیقه ۶۰ انجام گرفت 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 مدل (GXR-SD 152 DDR (Varian N.V. Co, Made in USA) بود. فاصله کانونی فیلم (Focus-film distance) ۱۰۰ سانتی‌متر و پیک کیلوولتاژ و میلی‌آمپر ثانیه نیز به ترتیب ۴۲ و ۵ در نظر گرفته شد. دکتور مورد استفاده از نوع فلت پنل SCI با سایز ۲۴ در ۳۰ سانتی‌متر بوده و نرم افزار مورد استفاده برای پردازش تصاویر و اندازه‌گیری ساختارهای بافتی Varian و Drgem بود.

جدول ۴. نسبت طول، ضخامت و عرض کلیه سمت راست و نسبت طول حالب سمت راست در مقایسه با طول مهره دوم کمر (بر حسب سانتی‌متر).

شماره حیوان	نسبت طول کلیه راست	نسبت ضخامت کلیه راست	نسبت عرض کلیه راست	نسبت طول حالب راست
۱	۲/۲۳	۱/۲۹	۱/۷۲	۶/۲۱
۲	۲/۲۹	۱/۳۰	۱/۴۹	۶/۰۱
۳	۲/۱۹	۱/۳۱	۱/۵۵	۶/۱۳
۴	۲/۳۱	۱/۳۲	۱/۷۹	۶/۴۹
۵	۲/۲۶	۱/۵۲	۱/۸۳	۶/۸۲
میانگین نر	۲/۲۵	۱/۳۴	۱/۶۷	۶/۳۳
۶	۲/۱۱	۱/۲۸	۱/۵۹	۶/۳۹
۷	۲/۱۶	۱/۲۷	۱/۴۲	۶/۱۳
۸	۲/۱۳	۱/۲۸	۱/۴۶	۶/۳۴
۹	۲/۱۲	۱/۲۶	۱/۷۶	۶/۶۷
۱۰	۲/۱۰	۱/۵۰	۱/۸۰	۶/۹۸
میانگین ماده	۲/۱۲	۱/۳۱	۱/۶۰	۶/۵۰
میانگین کل	۲/۱۹	۱/۳۳	۱/۶۴	۶/۴۱

جدول ۵. نسبت طول، ضخامت و عرض کلیه سمت چپ و نسبت طول حالب سمت چپ در مقایسه با طول مهره دوم کمر (بر حسب سانتی‌متر).

شماره حیوان	نسبت طول کلیه چپ	نسبت ضخامت کلیه چپ	نسبت عرض کلیه چپ	نسبت طول حالب چپ
۱	۲/۱۷	۱/۲۹	۱/۷۱	۵/۹۸
۲	۲/۱۸	۱/۳۳	۱/۳۹	۵/۹۲
۳	۲/۰۴	۱/۳۲	۱/۵۶	۶/۱۱
۴	۲/۱۰	۱/۳۵	۱/۷۴	۶/۲۵
۵	۲/۱۱	۱/۴۵	۱/۷۷	۶/۳۹
میانگین نر	۲/۱۲	۱/۳۴	۱/۶۳	۶/۱۳
۶	۲/۰۳	۱/۵۰	۱/۴۵	۶/۲۳
۷	۲/۰۸	۱/۳۱	۱/۳۳	۶/۰۲
۸	۲/۱۷	۱/۴۴	۱/۳۰	۶/۳۲
۹	۲/۰۸	۱/۵۳	۱/۵۴	۶/۴۴
۱۰	۲/۰۲	۱/۵۸	۱/۵۹	۶/۵۴
میانگین ماده	۲/۰۷	۱/۴۷	۱/۴۴	۶/۳۱
میانگین کل	۲/۰۹	۶/۲۲	۱/۵۳	۶/۲۲

تعیین اندازه طول بدنه دومین مهره کمری: از آنجایی که برای ارزیابی اندازه کلیه‌ها از اندازه بدنه دومین مهره کمری استفاده می‌شود (۱۶) لذا در رادیوگراف‌های جانبی هر یک از خوکچه‌های هندی، طول بدنه دومین مهره کمری اندازه‌گیری شد تا از آن به عنوان شاخصی در تعیین اندازه استاندارد کلیه‌ها استفاده شود.

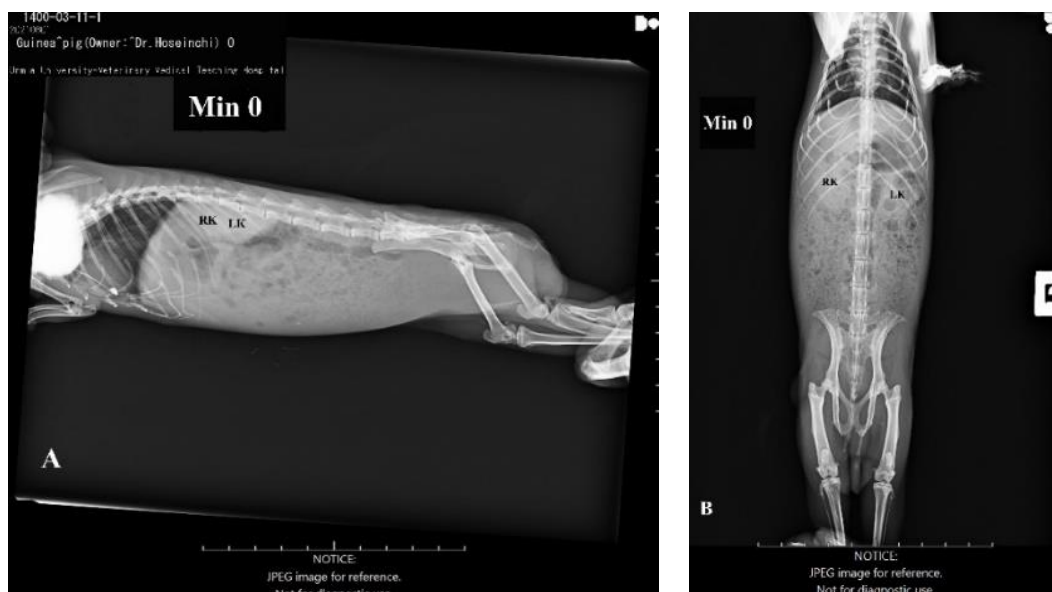
لاپاراتومی اکتشافی برای مطالعه آناتومیکی: برای مطالعه آناتومیکی ابتدا هر یک از خوکچه‌های هندی با هیدروکلراید زایلانین ۲ درصد با دوز ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و کتامین هیدروکلراید ۱۰ درصد با دوز ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن با تزریق عضلانی بی‌هوش شدند و سپس با تجویز سدیم تیوپنتال ۲/۵ درصد با دوز ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن با تزریق داخل وریدی اتانازی شدند و بعد از آن محوطه شکمی حیوانات باز شدند. بدین ترتیب که ابتدا یک برش طولی بر روی خط سپید بدن ایجاد و پوست ناحیه کنار زده شد. سپس در محل خط سپید آپونروز عضلات دیواره شکم برش داده شد و دیواره عضلانی شکم و صفاق جداره کنار زده شد. بعد از شکاف صفاق احشایی، مزاتر و روده‌ها به همراه معده مشاهده شدند. با کنار زدن احشاء داخل حفره شکم که شامل روده‌های بزرگ و کوچک، کبد، طحال و معده بودند کلیه‌ها ظاهر شدند که پس از اندازه‌گیری و بررسی ویژگی‌های کلیه، با پاکسازی چربی‌هایی که حالب را احاطه کرده بودند، حالب‌ها نیز ظاهر شدند که این ساختارها هم مطالعه و اندازه‌گیری شدند. در امتداد حالب‌ها به سمت خلف در مدخل لگن، مثانه مشاهده شد که ویژگی‌های مثانه یادداشت و اندازه‌های مربوط به آن ثبت گردید.

آنالیز آماری: برای تعیین اندازه طبیعی قسمت‌های مختلف سیستم ادراری از تکنیک Confidence Interval و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۱ استفاده شد. P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

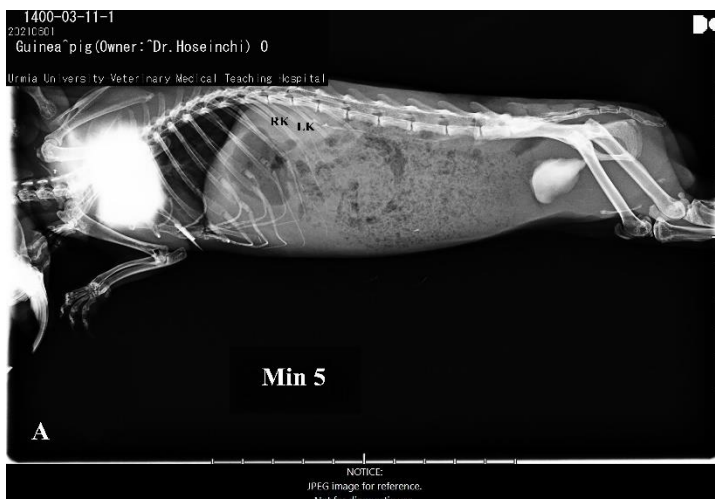
نتایج

مطالعه اوروگرافی ترشچی در خوکچه‌های هندی در حالت گماری‌های جانبی و شکمی-پشتی انجام گردید. در مطالعه حاضر مشخص گردید که کلیه راست کمی جلوتر از کلیه سمت چپ قرار داشت. در واقع کلیه راست در محازات قسمت انتهایی مهره آخر سینه تا قسمت قدامی سومین مهره کمر قرار داشته و کلیه سمت چپ نیز در محازات مهره اول کمر تا انتهای خلفی مهره سوم کمر قرار داشت. در دقیقه صفر پس از استفاده از ماده حاجب، فاز نفروگرام مشاهده شد به عبارتی ماده حاجب در گلوبومول‌های کلیوی پخش گردیده و دانسیته کلیه‌ها افزایش یافته بودند و وضوح تصویر کلیه‌ها در رادیوگراف بیشتر شده بود که در واقع نمایان شدن فاز نفروگرام (Nephrogram) بود و در دقایق بعدی ماده حاجب از کیسول بومن به داخل لوله‌های هنله فیلتر شده و وارد لگنچه شد و بعد به حالب‌ها و مثانه رسیده بود که نشان دهنده فاز پیلوگرام (Pyelogram) بود. در بررسی نفروگرام‌های جانبی مشخص شد که کلیه سمت چپ نسبت به کلیه راست در موقعیت خلفی-شکمی قرار داشت. مطالعه شکمی پشتی کلیه‌ها نشان داد که ناف کلیه‌ها به سمت داخل قرار دارند. در این مرحله هر دو کلیه به صورت ساختارهای بافت نرم و متراکمی شناسایی شدند. کلیه‌ها مرزهای مشخصی را نسبت به ساختارهای مجاور نشان دادند. پارانشیم کلیه با مرزهای قابل تشخیص بین قسمت‌های قشر و مدولا در نفروگرام شکمی-پشتی و بدون مرز مشخص در نفروگرام جانبی مشاهده شد. دستگاه زهکشی (لگن، ابتدای حالب) مشاهده نشد. تماس بین کلیه راست و لوب دمی کبد به صورت راه راه با افسیتی نسبتاً کم مشاهده شد (تصویر ۱).

در دقیقه پنج پس از استفاده از ماده حاجب، لگنچه کلیه‌ها به همراه مقداری از قطعه شکمی حالب‌ها (مرحله پیلوگرافی) مشاهده شد. حالب از لگنچه منشأ گرفت و به سمت خلف و پایین نزول پیدا کرد و به سمت مثانه حرکت نمود. طول حالب سمت راست مقداری طولی‌تر از حالب سمت چپ مشاهده شد که به دلیل موقعیت قدامی‌تر کلیه سمت راست بود. در نمای جانبی، حالب‌ها تا انتهای خلفی آخرین مهره کمری قابل مشاهده بود و بعد از آن با استخوان‌های لگن همپوشانی داشتند. مثانه پر در جلوی لبه قدامی استخوان عانه به صورت بیضی شکل بود. در اوروگرام‌های شکمی-پشتی انتهای خلفی حالب‌ها در کنار مثانه مشخص نبود (تصویر ۲).



تصویر ۱. نمای جانبی (A) و شکمی-پشتی (B) از خوکچه هندی. دقیقه صفر متعاقب تزریق ماده حاجب. RK: کلیه راست، LK: کلیه چپ و L: سمت چپ.



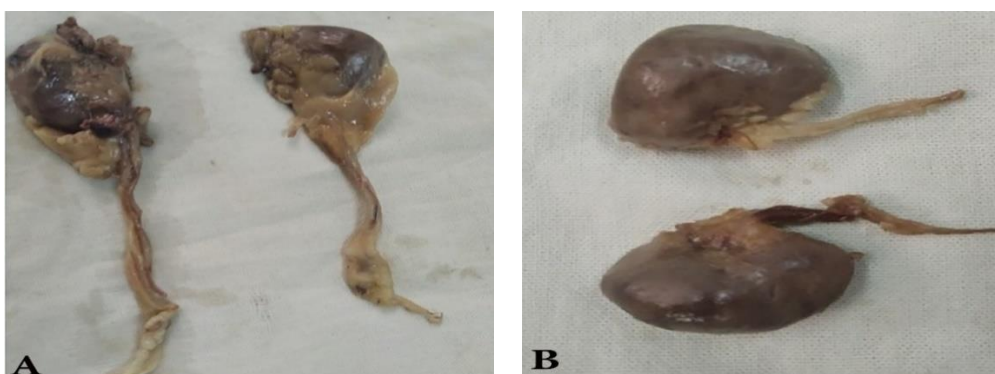
تصویر ۲. نمای جانبی (A) و نمای شکمی پشتی (B) از خوکچه هندی. دقیقه پنج متعاقب تزریق ماده حاجب. RK: کلیه راست، LK: کلیه چپ، BL: مثانه و L: سمت چپ.



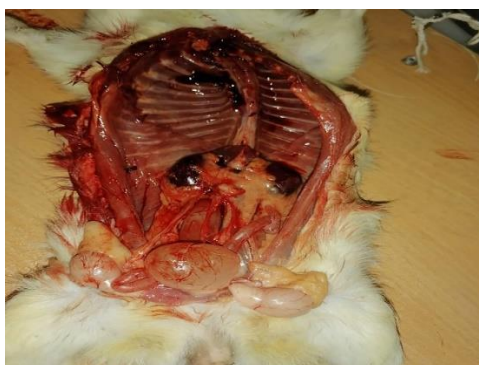
تصویر ۳. نمای جانبی (A) و شکمی-پشتی (B) از خوکچه هندی. دقیقه پانزده متعاقب تزریق ماده حاجب. RK: کلیه راست، LK: کلیه چپ، BL: مثانه و L: سمت چپ.

در دقیقه ده پس از استفاده از ماده حاجب، ساختارهای لوله‌ای حالب بدون مرز مشخص بین دیواره‌ها و لومن مشخص شد. در دقیقه پانزده بعد از تزریق ماده حاجب کل مثانه با ماده حاجب پر شد و به شکل گلابی درآمد. بدنه و گردن مثانه کاملاً مشخص بودند و گردن دانسیته کمتری نشان داد (مرحله سیستوگرافی). در نمای جانبی و شکمی-پشتی، اتساع مثانه مشخص بود، زیرا این اندام در قسمت خلفی شکم قرار داشته و قدام مثانه در محل انتهایی خلفی آخرین مهره کمر قرار داشت (تصویر ۳). داده‌های رادیومورفومتریک نشان داد که طول کلیه راست بیش از طول کلیه چپ بوده (اندازه کرانیوکودال) اما عرض و ضخامت کلیه راست کمتر از کلیه چپ بود. ارتفاع مثانه پر شده (اندازه پشتی-شکمی) و به دنبال آن طول (اندازه جلویی-خلفی) و عرض (اندازه جانبی) مثانه و طول مهره دوم کمری (اندازه کرانیوکودال) در جدول ۱ بیان شده است. طول، عرض، ضخامت کلیه‌های سمت راست و چپ، طول حالب‌ها نیز به صورت مقایسه با اندازه کرانیوکودال طول مهره دوم کمری در خوکچه‌های هندی نر و ماده در جداول ۴، ۵ بیان شده است. مشاهدات آناتومیکی نشان داد که کلیه راست و چپ در خوکچه هندی لوبیایی شکل می‌باشند و سطح شکمی کلیه‌ها کاملاً محدب بوده و در مقایسه با سطح پشتی دارای تحدب بیشتری می‌باشند. سطوح کلیه‌ها حالت صاف و به رنگ قرمز متمایل به تیره بودند (تصویر ۴). کلیه‌ها در ناحیه زیر مهره‌های سینه و کمر قرار داشته و کلیه راست کمی جلوتر از کلیه سمت چپ بود. در واقع کلیه راست در کنار قسمت انتهایی مهره ماقبل آخر سینه تا قسمت قدامی دومین مهره کمر قرار داشت و کلیه سمت چپ نیز در کنار مهره آخر سینه تا انتهایی خلفی مهره دوم کمر قرار داشت (تصویر ۵). کلیه‌ها در خوکچه‌های هندی موقعیت خارج صفاقی داشتند. لبه داخلی کلیه چپ مقعر بوده و در کنار آنورت بود و لبه داخلی کلیه راست که مقعر بود در کنار ورید اجوف خلفی قرار گرفته بود. قطب قدامی کلیه راست در گودی کلیوی بر روی کبد قرار داشت. در محل اتصال کلیه راست به کبد، لیگامنت کبدی-

کلیوی قابل تشخیص بود (تصویر ۶). در قطب قدامی هر یک از کلیه‌ها غده فوق کلیه قابل مشاهده بود که به رنگ زرد روشن تا نارنجی کم رنگ دیده شد. کلیه راست از سطح پشتی در تماس با عضله زیرکمری و از سطح شکمی با دوازدهه در ارتباط بود و قسمت قدامی و سطح شکمی آن نیز با کبد در تماس بود. سطح پشتی کلیه سمت چپ در تماس با عضلات زیرکمر بوده و سطح شکمی آن نیز در تماس با کولون نزولی بود. طحال با سطح جانبی کلیه چپ نیز در تماس بود. میانگین طول، عرض و ضخامت کلیه راست به ترتیب ۲/۱۲، ۱/۵۴ و ۱/۱۳ سانتی‌متر بود (جدول ۲) و در کلیه چپ به ترتیب ۲/۰۶، ۱/۴۹ و ۱/۲۴ سانتی‌متر بود (جدول ۳). ناف کلیه در قسمت میانی لبه داخلی کلیه دیده می‌شد که به‌طور وسیعی در ارتباط با حالب، عروق و اعصاب کلیه بود. حالب در ناف کلیه به لگنچه تبدیل شده بود. حالب از لگنچه منشأ گرفته بود و به سمت خلف و پایین در موازات عضله خاصره‌ای مازویی به سمت مثانه نزول پیدا کرده بود. میانگین طول حالب راست و چپ به ترتیب ۶/۶۳ و ۶/۶۱ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد (جدول ۲، ۳). حالب سمت راست مقداری طویل‌تر از حالب سمت چپ بود که به دلیل موقعیت قدامی‌تر کلیه سمت راست می‌باشد. وقتی مثانه پر بود، گردن مثانه در کنار لبه قدامی استخوان عانه و خود مثانه نیز در قسمت خلفی حفره شکم در تماس با سطح داخلی شکم (مزوگاستریوم) قابل مشاهده بود. مثانه عملاً توسط صفاق پوشیده شده بود (تصویر ۷). میانگین اندازه طول مثانه، عرض مثانه و ارتفاع مثانه به ترتیب ۲/۷۶، ۱/۹۵ و ۱/۸۸ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد.



تصویر ۴. (A) نمای شکمی و (B) نمای پشتی کلیه‌ها در خوکچه هندی ماده.



تصویر ۵. نمای شکمی کلیه‌ها در خوکچه هندی نر.



تصویر ۶. نمای شکمی کلیه راست و لیگامنت کبدی-کلیوی.



تصویر ۷. مثانه خوکچه هندی نر محتوی ادرار.

بحث

در مطالعه حاضر، پارامترهای مورفومتریک و رادیولوژیک کلیه‌های طبیعی در خوکچه هندی بررسی شد که می‌تواند به تشخیص موارد غیرطبیعی کلیه‌ها در این گونه از حیوانات کمک کند. در مطالعات رادیوگرافیک حاضر مشخص گردید که کلیه راست کمی جلوتر از کلیه سمت چپ قرار داشت و در کنار قسمت انتهایی مهره آخر سینه تا قسمت قدامی سومین مهره کمر قرار می‌گیرد و کلیه سمت چپ نیز در کنار مهره اول کمر تا انتهای خلفی مهره سوم کمر قرار می‌گیرد. بررسی نمای جانبی نشان داد که کلیه چپ نسبت به کلیه راست حالت Caudoventral داشته و در نمای شکمی-پشتی ناف کلیه‌ها به سمت داخل قرار دارند. 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 در وضعیت قدامی‌تر قرار داشته ولی با این وجود محل قرار گرفتن کلیه‌های حیوانات مختلف در شماره‌های مختلف مهره‌های کمر و نیز دنده‌ها قرار می‌گیرد که این حالت به دلیل تفاوت‌های گونه حیوان است (۱۷). مطالعه رادیوگرافیک ساده دستگاه ادراری در خوکچه‌ها نشان داد که کلیه راست و چپ به صورت بافت نرم و با اویسیتی کم مشخص می‌شوند که فقط قسمت خلفی شکمی آن‌ها قابل شناسایی است. نقطه تماس زایده دمی کبد و کلیه راست قابل شناسایی نبوده و لبه داخلی کلیه راست که محل قرارگیری ناف می‌باشد به صورت نسبی قابل شناسایی بود و هر دو لبه داخلی و خارجی کلیه‌ها هم تا حدود کمی قابل شناسایی بودند. اویسیتی هر دو کلیه به طور قابل توجهی از اندام‌های دارای بافت 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 مثانه 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 اویسیتی کم مشاهده شد. مطالعه حاضر نشان داد که تفاوت کمی بین 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 (۱۸-۲۰). نتایج مربوط به نسبت طول، عرض و ضخامت کلیه‌ها در خوکچه‌های هندی نشان داد، میانگین نسبت طول کلیه سمت راست به طول مهره L۲ در خوکچه‌های هندی نر ۲/۲۵ و در حیوان ماده ۲/۱۲ برابر می‌باشد. میانگین نسبت عرض کلیه سمت راست به طول L۲ در خوکچه‌های هندی نر ۱/۶۷ و در حیوان ماده نیز ۱/۶۰ برابر می‌باشد. میانگین نسبت ضخامت کلیه سمت راست به طول L۲ در خوکچه‌های هندی نر ۱/۳۴ و در حیوان ماده ۱/۳۱ برابر می‌باشد. میانگین نسبت عرض کلیه سمت چپ به طول L۲ در خوکچه‌های هندی نر ۱/۱۲ و در حیوان ماده ۲/۰۷ برابر می‌باشد. میانگین نسبت عرض کلیه سمت چپ به طول L۲ در خوکچه‌های هندی نر ۱/۶۳ و در حیوان ماده نیز ۱/۴۷ برابر می‌باشد. میانگین نسبت ضخامت کلیه سمت چپ به طول L۲ در خوکچه‌های هندی نر ۱/۳۴ و در حیوان ماده ۱/۴۷ برابر می‌باشد. میانگین نسبت طول حالب سمت راست به طول L۲ در خوکچه‌های هندی نر ۶/۳۳ برابر و در حیوان ماده ۶/۵۰ برابر می‌باشد. میانگین نسبت طول حالب سمت چپ به طول L۲ در خوکچه‌های هندی نر ۶/۱۳ و در حیوان ماده ۶/۳۱ برابر 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 خوکچه‌های هندی نر بزرگ‌تر از حیوان 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 L₂ در خوکچه‌های هندی نر ۶/۳۳ و در حیوان ماده ۶/۵۰ برابر می‌باشد. میانگین نسبت طول حالب سمت چپ به طول L₂ در خوکچه‌های هندی نر ۶/۱۳ و در حیوان ماده ۶/۳۱ برابر می‌باشد و این داده‌ها نشان می‌دهند که طول حالب سمت راست طولی‌تر 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 ماده در مقایسه با حیوان جنس نر طولی‌تر می‌باشد. این برای اولین بار است که طول حالب بر مبنای نسبت طول حالب به طول L₂ در خوکچه هندی بیان می‌شود و در سایر جوندگان نیز تاکنون این مقایسه صورت نگرفته بود، بنابراین نسبت اعداد به‌دست آمده در سایر جوندگان می‌تواند متفاوت باشد.

نتیجه‌گیری نهایی: بر اساس نتایج مطالعه حاضر، تفاوت‌هایی در اندازه طول، عرض و ضخامت کلیه‌های سمت چپ و راست و همچنین طول حالب‌ها در یک حیوان وجود داشت و این تفاوت‌ها در بین جنس‌های نر و ماده نیز معنی‌دار بود. به دلیل موقعیت قدامی‌تر کلیه راست، طول حالب سمت راست طولی‌تر 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. استانداردهای دقیق به دست آمده در مطالعه حاضر می‌تواند در تفسیر نتایج و تصمیم‌گیری‌های بالینی برای تعیین اندازه طبیعی و غیرطبیعی کلیه‌ها، حالب‌ها و مثانه در خوکچه‌های هندی مورد استفاده قرار گیرد.

سیاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی و تمام دستیاران محترم بخش رادیولوژی و آناتومی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه به دلیل همکاری در انجام مطالعه حاضر تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Edell AS. Retrospective analysis of risk factors, clinical features, and prognostic indicators for urolithiasis in guinea pigs: 158 cases (2009–2019). *J Am Vet Med Assoc.* 2022;1:1-6. doi: 10.2460/javma.21.09.0421 PMID: 35333752
2. Yousif RR. Anatomical and histological study of kidney, ureter and urinary bladder in male guinea pig (*Cavia porcellus*): Rasha Raad Yousif and Farhan Ouda Rabea. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine.* 2019;43(1):75-84. doi: 10.30539/iraqijvm.v43i1.476
3. Kreilmeier T. Remission of diabetes mellitus after ovariohysterectomy in a guinea pig with ovarian cysts. *Tierärztl Prax Ausg K: Kleintiere/Heimtiere.* 2019;47(01):55-59. doi: 10.1055/a-0828-6657 PMID: 30808039
4. Meyer J, Schmiderer C, Richter B. Foreign body cystitis in a male guinea pig due to a sedge (*Carex* species) leaf. *Vet Rec Case Reports.* 2020;8(1):102-112. doi: 10.1136/vetreccr-2019-001029
5. Reavill DR, Lennox AM. Disease overview of the urinary tract in exotic companion mammals and tips on clinical management. *Vet Clin: Exot Anim Pract.* 2020;23(1):169-193. doi: 10.1016/j.cvex.2019.09.003
6. Carneiro RK. Excretory urographic, ultrasonographic, and cystoscopic characteristics of urinary bladder abscesses in a dog. *Vet Radiol Ultrasound.* 2022;63(4):E7-E10. doi: 10.1111/vru.13095 PMID: 35452146
7. Stieger-Vanegas SM, Mckenzie E. Imaging of the urinary and reproductive tract in small ruminants. *Vet Clin: Food Anim Pract.* 2021;37(1):75-92. doi: 10.1016/j.cvfa.2020.10.002 PMID: 33358313
8. Knotek Z, Wildneroval L, Jeki V. Diagnostic urography of renal disorders in rats. *Acta Vet Brno.* 2004;73:187-194.
9. Veshkini A, Tavana M, Haghdoost I, Masouleh M, Savjbolaghi S. Excretory urography by subcutaneous injection of Iodixanol in Persian Squirrel (*Sciurus Anomalous*). *Pak Vet J.* 2011;31:17-22.

10. Ajdari R, Adetunji A, Omoerah V, Okih J. Influence of dosage and chemical resistants on feline excretory urography. J S Afr Vet Assoc. 2006;77:202-204. [doi: 10.4102/jsava.v77i4.370](https://doi.org/10.4102/jsava.v77i4.370) PMID: 17458345
11. Carlisle C, Brown A, Filippich L, Reynold K, Reynold W. Intravenous urography in the Koala (*Phascolarctoscinereus*). Vet Radiol Ultrasound. 1989;30:34-40. [doi: 10.1111/j.1740-8261.1989.tb00750.x](https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.1989.tb00750.x)
12. Kaya M, Bumin A, Senel O. Perirenal pseudocyst in a cat. Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg. 2010;5:147-153.
13. Dimitrov R, Chaprazov T. An anatomic and contrast enhanced radiographic investigation of the rabbit kidneys, ureters and urinary bladder. Revue de Médecine Vétérinaire. 2012;163(10):469-474.
14. Genzer SC, Huynh T, Coleman-McCray JD, Harmon JR, Welch SR, Spengler JR. Hematology and clinical chemistry reference intervals for inbred strain 13/N guinea pigs (*Cavia porcellus*). J Am Assoc Lab Anim Sci. 2019;58(3):293-303. [doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-18-000118](https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-18-000118) PMID: 31010455
15. Kealy JK, Mcallister H, Graham JP. Diagnostic Radiology and Ultrasonography of the Dog and Cat-E-Book. 5th ed Elsevier Health Sciences. United States, America; 2010.
16. Stan F. Topographical anatomy of guinea pigs kidneys. Scientific Papers Veterinary Medicine Timisoara. 2014;45:114-123.
17. Drost WT, Henry GA, Meinkoth JH, Woods JP, Lehenbauer TW. Quantification of hepatic and renal cortical echogenicity in clinically normal cats. American J Vet Res. 2000;61:1016-1020. [doi: 10.2460/ajvr.2000.61.1016](https://doi.org/10.2460/ajvr.2000.61.1016) PMID: 10976729
18. Maurya H, Kumar T, Kumar S. Anatomical and physiological similarities of kidney in different experimental animals used for basic studies. J Clin Exp Nephrol. 2018;3(09). [doi: 10.21767/2472-5056.100060](https://doi.org/10.21767/2472-5056.100060)
19. Paul C, Didia B. The effect of methanolic extract of *Moringa oleifera* lam roots on the histology of kidney and liver of guinea pigs. Asian J Med Sci. 2012;4(1):55-60.
20. Hargaden M, Singer L. Anatomy, physiology, and behavior, in The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents. Elsevier. 2012;575-602. [doi: 10.1016/B978-0-12-380920-9.00020-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00020-1)



Comparative Genome Analysis of Infectious Human and Domestic Animal *Coronaviruses*

Taraneh Rajaei¹, Gholamreza Nikbakht Brujeni², Fateme Frootan³, Jalil Mehrzad², Pouya Houshmand¹¹ Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran² Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran³ Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

Received: 17 December 2022, Accepted: 1 March 2023

[10.22059/jvr.2022.346341.3289](https://doi.org/10.22059/jvr.2022.346341.3289)[20.1001.1.20082525.1402.78.1.6.8](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1402.78.1.6.8)

Abstract

BACKGROUND: *Coronaviruses*, which mainly cause gastrointestinal and respiratory infections, have been identified in various species. Among the extensive genomic data of disease-causing *Coronaviruses* in humans and animals, some similarities can be analyzed by in-silico methods.

OBJECTIVES: In the present study, comparative genome analysis of medical and veterinary medicine *Coronaviruses* was performed to obtain more accurate information about the genetic similarities and differences of different members of this family.

METHODS: The genomic sequences were retrieved from NCBI and Virus Pathogen Resource databases. Using the NCBI database blast algorithm, all sequences were aligned with the SARS-CoV-2 genome sequence, and similarity was obtained. Amino acid sequences of structural and non-structural proteins associated with coding regions (CDS) were aligned separately with the SARS-CoV-2, and their similarities were calculated. The 3D structure from each protein was compared with the corresponding protein in SARS-CoV-2, and Template Modeling Scores (TM-Score) were obtained. A phylogenetic tree of different species of the *Coronaviridae* family was drawn based on nucleotide and amino acid sequence data.

RESULTS: Nonstructural coding gene sequences detected the highest interspecies similarities in nucleotide, amino acid sequence, and 3D structure (nsp12, nsp13, nsp14, and nsp16). The ORF1ab, encoding non-structural proteins, carries essential functions for viral replication.

CONCLUSIONS: This study showed that the transcription complex is highly conserved among human and animal *Coronaviruses*. A comparison and analysis of the *Coronaviridae* transcription complex can be considered a key target for diagnosing, developing antiviral therapies, and designing vaccines.

Keywords: *Coronavirus*, Domestic, Genome, Phylogenetic, Transcription complex

Copyright © Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s)
Publisher: University of Tehran

Corresponding author: Gholamreza Nikbakht Brujeni, Tel/Fax: 021-61117057



How to cite this article:

Rajaei, T., Nikbakht Brujeni, G., Frootan, F., Mehrzad, J., Houshmand, P. Comparative Genome Analysis of Infectious Human and Domestic Animal *Coronaviruses*. *J Vet Res*, 2023; 78(1): 51-65.
doi: 10.22059/jvr.2022.346341.3289

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The hosts and accession numbers of the studied coronaviruses.

Table 2. 3D models of the non-structural proteins of coronaviruses and their PDB IDs.

Table 3. Percentage of similarity of amino acid sequences of different *Coronaviruses* compared to their corresponding sequences in SARS-CoV-2.

Table 4. Results of the nucleotide sequence alignment of the ORF1ab region of important members of the *Coronaviridae* family and the SARS-CoV-2 genome.

Table 5. Results of the pairwise structure alignment analyses of encoded proteins by the ORF1ab gene region.

Figure 1. Composition and structure of SARS-CoV-2 (WH-Human 1 CoV) genome in comparison with the genome of veterinary coronaviruses.

Figure 2. The percentage of similarity of amino acid sequences of proteins encoded by ORF1ab region in different coronaviruses compared to the corresponding sequences in SARS-CoV-2.

Figure 3. Comparison of the 3D structures of (A) nsp12 and (B) nsp13 proteins in SARS-CoV-2 (brown structures) and IBV (blue structures).

Figure 4. Comparison of the 3D structures of (A) nsp12 and (B) nsp13 proteins in SARS-CoV-2 (brown structures) and FCoV (blue structures).

Figure 5. Comparison of the 3D structures of (A) nsp12 and (B) nsp13 proteins in SARS-CoV-2 (brown structures) and CCoV (blue structures).

Figure 6. Comparison of the 3D structures of (A) nsp12 and (B) nsp13 proteins in SARS-CoV-2 (brown structures) and BCoV (blue structures).

Figure 7. The phylogenetic tree that obtained from the comparison of the complete genome of SARS-CoV-2 and other members of the *Coronaviridae* family.

Figure 8. The phylogenetic tree was obtained by comparing the amino acid sequences encoded by the ORF1ab gene region in SARS-CoV-2 and other members of the *Coronaviridae* family.



تحلیل مقایسه‌ای ژنوم کروناویروس‌های بیماری‌زای انسان و دام

ترانه رجائی^۱، غلامرضا نیکبخت بروجنی^۲، فاطمه فروتن^۳، جلیل مهرزاد^۲، پویا هوشمند^۱^۱ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران^۲ گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران^۳ پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲۶ آذر ماه ۱۴۰۱، تاریخ پذیرش: ۱۰ اسفند ماه ۱۴۰۱

doi 10.22059/jvr.2022.346341.3289

20.1001.1.20082525.1402.78.1.6.8

چکیده

زمینه مطالعه: کروناویروس‌هایی که عمدتاً عامل عفونت‌های گوارشی و تنفسی هستند، در طیف وسیعی از میزبانان شناسایی شده‌اند. در بین انبوه داده‌های ژنومی به دست آمده از این خانواده تفاوت‌ها و تشابهاتی دیده می‌شود که قابل تحلیل با روش‌های مجازی می‌باشد.

هدف: در مطالعه حاضر مقایسه ژنومی کروناویروس‌های مهم در حوزه پزشکی و دامپزشکی با هدف دستیابی به اطلاعات بیشتر و دقیق‌تر از تشابهات و تفاوت‌های ژنتیکی اعضای مختلف این خانواده صورت گرفته است.

روش کار: توالی‌های ژنومی گونه‌های مهم بیماری‌زای کرونا ویروس از پایگاه‌های داده NCBI و VPR استخراج شد. در ادامه، با استفاده از الگوریتم بلاست توالی‌های سایر گونه‌ها با توالی ژنوم ویروس SARS-CoV-2 هم‌ردیف و درصد تشابهات محاسبه شد. توالی‌های اسیدآمین پروتئین‌های ساختاری و غیرساختاری مرتبط با نواحی کدشونده (CDS) به صورت جداگانه هم‌ردیف شدند و میزان شباهت آن‌ها محاسبه شد. ساختارهای فضایی هر پروتئین با پروتئین متناظر در ویروس SARS-CoV-2 مقایسه شدند و میزان تشابهات به صورت مدل امتیاز دهی قالبی (TM-Score) به دست آمد. در پایان، درخت سلسله‌تبار گونه‌های کروناویروس بر مبنای داده‌های توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمین رسم شد.

نتایج: بیشترین تشابهات بین گونه‌ای، از لحاظ توالی نوکلئوتیدی، آمینواسیدی و اشکال فضایی، در پروتئین‌های غیرساختاری nsp12، nsp13، nsp14 و nsp16 مشاهده شد. ژن‌های کدکننده این پروتئین‌ها در ناحیه ژنی ORF1ab قرار دارند که در رونوشت برداری ویروس نقشی حیاتی دارد.

نتیجه‌گیری نهایی: بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر مجتمع رونوشت برداری شباهت‌های زیادی در بین کروناویروس‌های انسانی و دامی دارد. داده‌های تطبیقی و تحلیلی مجتمع رونوشت برداری ویروس‌های خانواده کروناویروس را می‌توان به عنوان یک هدف مهم جهت توسعه روش‌های تشخیص، انواع درمان‌های ضد ویروسی و طراحی واکسن مورد استفاده قرار داد.

کلمات کلیدی: دامی، ژنوم، سلسله‌تبار، کروناویروس، مجتمع رونوشت برداری

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: غلامرضا نیکبخت بروجنی، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

اعضای خانواده کرونا (*Coronaviridae*)، ویروس‌هایی پوشش‌دار با ژنوم RNA تک رشته‌ای مثبت می‌باشند. در بین ویروس‌های RNA، کروناویروس‌ها (*Coronaviruses*) با دارا بودن ژنومی به طول ۲۵ تا ۳۲ کیلوباز، طول‌ترین توالی ژنومی را دارند (۱-۳). ویروس‌های این خانواده قادرند طیف وسیعی از میزبانان شامل پرندگان، دوزیستان، جوندگان، پستانداران وحشی و اهلی و انسان را آلوده کنند (۴-۶). تعدادی از اعضای این خانواده در اوایل دهه ۱۹۳۰ به عنوان عامل ایجاد برونشیت عفونی پرندگان، گاستروانتریت خوک، هیپاتیت حاد و عوارض عصبی در موش شناخته شدند (۶، ۷). کرونا ویروس‌های عامل بیماری انسان مدتی بعد و در دهه ۱۹۶۰ از میان پاتوژن‌های تنفسی انسان جداسازی و تشخیص داده شدند (۸، ۹). در اواخر سال ۲۰۰۲ میلادی، شیوع یکی از گونه‌های این خانواده با نام سارس (SARS-CoV) باعث بروز

عوارض تنفسی شدید (سندرم حاد تنفسی) در انسان شد. مرگ و میر ناشی از ابتلا به این ویروس حدود ۱۵ درصد اعلام شد (۱۰). تاکنون بیش از ۳۰ گونه جانوری مختلف از جمله خفاش نعل اسبی و انواعی از سیکوت‌ها به عنوان مظنونین انتقال ویروس به انسان معرفی شده‌اند (۱۱). ده سال پس از آن، در سال ۲۰۱۲ کرونا ویروس دیگری در منطقه خاورمیانه شیوع یافت که مرس (MERS-CoV) نام گرفت و مرگ و میر حدود ۳۷ درصدی را ثبت نمود (۱۰). در مورد ویروس MERS مطالعات متعدد نشان داد که شتر عامل اصلی انتقال آن به انسان بوده است (۱۲-۱۴). در سال ۲۰۱۹ میلادی، بیماری دیگری با علائم نسبتاً مشابه در کشور چین ظاهر شد و مطالعات بعدی ثابت کرد که عامل این بیماری از نظر ژنتیکی شباهت بسیار زیادی به ویروس سارس دارد. به همین دلیل ویروس نوظهور را سارس کوو-۲ (SARS-CoV-2) و بیماری ناشی از آن را کووید-۱۹ (COVID-19) نامیدند (۱۵، ۱۶). در مورد منشأ پیدایش بیماری همچنان فرضیه‌های متعددی مطرح است اما به نظر می‌رسد خفاش‌ها همانند اپیدمی ناشی از ویروس SARS-CoV یکی از عوامل اصلی انتقال این ویروس به انسان بوده‌اند (۱۷، ۱۸). بیماری کووید ۱۹ برخلاف اپیدمی‌های SARS و MERS زمانی شناسایی شد که تعداد زیادی از افراد آلوده به ویروس SARS-CoV-2 به مناطق مختلف جهان سفر کرده بودند. این مسئله سبب شد تا موارد متعددی از این بیماری به سرعت از سرتاسر جهان گزارش شود. به همین دلیل سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۲۰ برای این بیماری وضعیت همه‌گیری جهانی اعلام کرد (۱۹). بر اساس اطلاعات پایگاه Worldometer تا لحظه نگارش این مطالعه بیش از پانصد و شصت میلیون مورد از این بیماری در جهان گزارش شده است و بیش از ۶ میلیون نفر بر اثر این بیماری جان خود را از دست داده‌اند.

بر اساس طبقه‌بندی جدید، خانواده *Coronaviridae* را به دو زیر خانواده *Orthocoronavirinae* و *Letovirinae* تقسیم می‌کنند. زیرخانواده *Orthocoronavirinae* شامل چهار جنس آلفاکروناویروس، بتاکروناویروس، گاما کروناویروس و دلتاکروناویروس است (۶). به طور کلی آلفا و بتا کروناویروس‌ها عمدتاً پستانداران را آلوده کرده و موجب درگیری تنفسی در انسان و گوارشی در حیوانات می‌شوند (۲۰). گاما کروناویروس‌ها و دلتا کروناویروس‌ها عمدتاً پرندگان را آلوده می‌کنند؛ با این حال بعضی از آن‌ها می‌توانند پستانداران را نیز آلوده کنند (۲۱). تاکنون هفت کرونا ویروس انسانی شناسایی شده است که دو مورد آن یعنی Human coronavirus 229E (HCoV-229E) و Human coronavirus NL63 NL-63 (HCoV-NL63) در جنس آلفا کرونا ویروس و پنج مورد دیگر یعنی Human coronavirus HKU1 (HCoV-HKU1)، Human coronavirus OC43 (HCoV-OC43)، MERS-CoV، SARS-CoV و SARS-CoV-2 در جنس بتا کرونا ویروس قرار دارند. با مشخص شدن توالی ژنومی SARS-CoV-2، این ویروس نیز در جنس بتا کروناویروس قرار داده شده است (۲۲، ۲۳).

در میزبان‌های مستعد، کرونا ویروس‌ها بیشتر از راه تنفسی و یا مدفوعی-دهانی منتقل می‌شوند و عموم آن‌ها اولین تکثیر خود را در یاخته‌های اپی‌تلیال انجام می‌دهند (۲۴، ۲۵). برخی نظیر HCoV-229E، HCoV-OC43 و Porcine respiratory coronavirus (PRCoV) اغلب در یاخته‌های اپی‌تلیال سیستم تنفسی تکثیر می‌شوند (۲۶). مابقی کرونا ویروس‌ها نظیر Transmissible gastroenteritis virus (TGEV)، Bovine coronavirus (BCoV)، Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (PHEV)، Canine coronavirus (CCoV)، Feline coronavirus (FCoV) و سویه گوارشی Mouse hepatitis virus (MHV) یاخته‌های اپی‌تلیال لوله گوارش را آلوده می‌کنند (۲۷).

علائم ناشی از عفونت‌های کرونا ویروسی بسیار متنوع است. برخی از این ویروس‌ها عفونت‌های روده‌ای بی‌علامت ایجاد می‌کنند که در حیوانات بالغ موجب بقا ویروس در جمعیت می‌شود. از طرف دیگر برخی از این ویروس‌ها ممکن است باعث بروز بیماری شدید در میزبانان خود شوند. TGEV منجر به ایجاد اسهال در حیوانات جوان می‌شود و معمولاً کشنده است (۲۷، ۲۸). همچنین، SARS-CoV پس از ایجاد عفونت در مسیر هوایی فوقانی، باعث عفونت شدید مسیر تنفسی تحتانی شده و یا Feline infectious peritonitis virus (FIPV) به صورت سیستمیک گسترش می‌یابد و منجر به بیماری‌های تحلیل‌برنده در گربه‌سانان می‌شود (۲۹، ۳۰). گونه‌های کروناویروس موشی نیز موجب عفونت‌های تنفسی یا غدد اشکی و بزاقی می‌شوند و در صورت تداخل با سیستم ادراری-تناسلی ماده در تولید مثل نیز اختلال ایجاد می‌کنند. PHEV در خوک عمدتاً عفونت روده‌ای ایجاد می‌کند ولی می‌تواند نوروتروپیک هم باشد. عفونت حاصل از این ویروس اعصاب معده را درگیر کرده و مانع از تخلیه معده می‌شود که حاصل آن استفراغ و بیماری تحلیل‌برنده است (۳۱-۳۳).

ژنوم کرونا ویروس‌ها دو ناحیه UTR در دو سمت 3' و 5' دارد که شامل 7 تا 11 قاب خوانش (ORF) می‌شود. اولین ORF از سمت 5' UTR، ORF1ab است که دو سوم ژنوم ویروس را تشکیل می‌دهد و شانزده پروتئین غیر ساختاری را کد می‌کند که در فعالیت‌های رونوشت‌برداری و همانندسازی ژنوم نقش دارند. یک سوم باقی مانده ژنوم، پروتئین‌های ساختاری شامل گلیکوپروتئین اسپایک (S)، پروتئین ماتریکس (M)، پروتئین پوششی (E)، پروتئین نوکلئوکپسید (N) و هم چنین تعدادی پروتئین فرعی را تولید می‌کند که در بین کروناویروس‌های مختلف متفاوت است (۲۲، ۳۴، ۳۵).

با توجه به این که SARS-CoV-2 سومین کرونا ویروسی می‌باشد که پس از دو ویروس SARS-CoV و MERS-CoV در طول دو دهه اخیر توانسته است با عبور از گونه‌های حیوانی، انسان را آلوده کند، زنگ خطر توجه بیشتر به روند شیوع و بیماری‌زایی کرونا ویروس‌ها به صدا در آمده است. نظر به نقش مهم حیوانات در انتقال گونه‌های مختلف کروناویروس به انسان و احتمال بروز اپیدمی‌های زئونوتیک مشابه در دهه‌های آینده، مقایسه ژنومی و پروتئومی گونه‌های مختلف کروناویروسی و دستیابی به توالی حراست شده (Conserved) در بین اعضای این خانواده برای اهداف تشخیصی و یا درمانی و همچنین تولید واکسن کارآمد بسیار مفید است. در مطالعه حاضر مقایسه ژنومی، پروتئینی و سلسله تبار کروناویروس‌های مهم در حوزه پزشکی و دامپزشکی با هدف دستیابی به اطلاعات بیشتر و دقیق‌تر از تشابهات و تفاوت‌های ژنتیکی اعضای مختلف این خانواده صورت گرفته است.

مواد و روش کار

جمع‌آوری داده‌ها و مقایسه توالی‌ها: توالی کامل ژنوم و پروتئین‌های گونه‌های ویروسی مهم از لحاظ دامپزشکی از بانک ژن NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) استخراج شد (جدول ۱). هر توالی با توالی متناظر خود در ویروس SARS-CoV-2 با استفاده از الگوریتم بلاست NCBI مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج به صورت درصد شباهت (Similarity) گزارش شد (جدول ۳). همچنین، توالی نوکلئوتیدی ژنوم هر یک از ویروس‌ها از پایگاه داده Virus Pathogen Resource (ViPR) دریافت و با استفاده از الگوریتم بلاست از نظر هومولوژی با ژنوم ویروس SARS-CoV-2 مورد مقایسه قرار گرفت (جدول ۴). در ادامه درصد شباهت توالی پروتئین‌های غیرساختاری در گونه‌های مختلف این خانواده در مقایسه با توالی متناظر آن‌ها در ویروس SARS-CoV-2 مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن در تصویر ۲ قابل مشاهده است.

پیش‌بینی شکل فضایی پروتئین‌ها: پس از مقایسه توالی‌های خطی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی، جهت ترسیم و پیش‌بینی شکل فضایی پروتئین‌ها، از سرور Robetta استفاده شد. این سرور جهت ترسیم ساختار سه بعدی پروتئین‌ها از مدل‌سازی‌های هومولوژی و *ab initio* به صورت ترکیبی استفاده می‌کند. در مدل‌سازی هومولوژی، اشکال سه بعدی پروتئینی که ساختاری نامشخص دارد را بر اساس تشابه توالی با پروتئین‌های واجد اشکال مشخص ترسیم می‌کنند. در مدل‌سازی *ab initio* ساختار سه بعدی مد نظر محققین فقط بر اساس اطلاعات مربوط به توالی پروتئین ترسیم می‌شود. لازم به ذکر است که برخی از مدل‌های سه بعدی پروتئین‌های غیرساختاری کرونا ویروس‌ها قبلاً در سایر مطالعات گزارش شده است. این مدل‌ها از پایگاه RCSB (<https://www.rcsb.org/>) استخراج گردید. لیست این مدل‌ها و PDB ID هر کدام از آن‌ها در جدول ۲ قابل مشاهده است.

جدول ۱. میزبان و شماره دسترسی به مرجع اخذ داده برای گونه‌های کرونا ویروسی مورد مطالعه در پژوهش حاضر.

Accession Number (NC)	میزبان	گونه
۰۴۵۵۱۲/۲	انسان	SARS-COV-2
۰۰۴۷۱۸/۳	انسان	SARS CoV Tor2
۰۱۹۸۴۳/۳	انسان	MERS
۰۰۵۸۳۱/۲	انسان	HCoV-NL63
۰۰۶۵۷۷/۲	انسان	HCoV-HKU1
۰۰۳۰۴۵/۱	گاو	BCoV
۰۰۱۴۵۱/۱	طیور	IBV
۹۸۱۶۴۴/۱	سگ	CCoV
۰۰۲۳۰۶/۳	گره	FCoV

جدول ۲. مدل‌های سه بعدی مربوط به پروتئین‌های غیرساختاری کرونا ویروس‌ها و PDB ID هرکدام از آن‌ها.

PDB ID	نوع ویروس	نوع پروتئین	ردیف	PDB ID	نوع ویروس	نوع پروتئین	ردیف
7E6R	NL63HCoV-	nsp5	۱۱	K7P7	CoV-2SARS-	nsp1	۱
3D23	HCoV-HKU1	nsp5	۱۲	2HSX	SARS-CoV	nsp1	۲
6WXD	CoV-2SARS-	nsp9	۱۳	6W9C	CoV-2SARS-	nsp3	۳
1QZ8	SARS-CoV	nsp9	۱۴	7LFU	SARS-CoV	nsp3	۴
5C94	IBV	nsp9	۱۵	4RNA	MERS-CoV	nsp3	۵
6ZCT	CoV-2SARS-	nsp10	۱۶	7NTT	CoV-2SARS-	nsp5	۶
2GA6	SARS-CoV	nsp10	۱۷	7K0H	SARS-CoV	nsp5	۷
6W01	CoV-2SARS-	nsp15	۱۸	4RSP	MERS-CoV	nsp5	۸
2H85	SARS-CoV	nsp15	۱۹	2Q6D	IBV	nsp5	۹
5YVD	MERS-CoV	nsp15	۲۰	4ZRO	FCoV	nsp5	۱۰

جدول ۳. درصد شباهت توالی‌های اسیدآمینة کرونا ویروس‌های مختلف درمقایسه با توالی‌های متناظر آن‌ها در SARS-CoV-2.

HKU1	SARS-CoV	BCoV	IBV	MERS	NL۶۳	FCoV	CCoV	
۴۸/۸۵	۸۶/۰۹	۴۹/۰۸	۴۴/۴۱	۵۰/۸۵	۴۷/۰۰	۴۵/۳۷	۴۵/۸۳	ORF1ab
۵۵/۴۳	۷۵/۹۶	۳۷/۶۸	۳۵/۹۱	۳۵/۱۰	۳۰/۷۸	۳۱/۹۵	۳۲/۰۷	S
۳۶/۳۶	۹۰/۵۴	۳۹/۰۷	۳۴/۳۸	۴۲/۸۶	۳۱/۱۰	۳۱/۵۸	۳۲/۰۸	M
۳۶/۷۴	۹۰/۵۲	۳۸/۹۴	۲۹/۶۶	۴۸/۴۹	۴۸/۲۸	۳۱/۸۸	۳۰/۵۶	N
۳۱/۵۱	۹۴/۷۴	۳۰/۷۷	۲۱/۳۳	۳۶/۰۰	۱۸/۴۶	۲۸/۹۵	۳۳/۳۳	E
-	۱۱/۶۱	-	NS	-	NS	NS	NS	ORF3a
-	۸۲/۲۵	-	-	-	۳۸/۸۹	NS	-	ORF3b
-	۸۱/۴۰	-	-	-	-	NS	NS	ORF7a
-	۸۱/۴۰	-	-	-	-	NS	NS	ORF7b
-	۶۸/۸۵	-	-	-	-	-	-	ORF6
-	۳۱/۷۱	-	-	-	-	-	-	ORF8a
-	۴۰/۴۰	-	-	-	-	-	-	ORF8b

-: این ناحیه ژنی در این ویروس کد نمی‌شود. NS: شباهت معنی‌داری یافت نشد.

تحلیل دو به دو تشابهات ساختاری: از میان مدل‌های سه بعدی موجود در پایگاه RCSB و همچنین براساس نتایج پیش‌بینی و ترسیم اشکال پروتئین‌هایی که مدل سه بعدی آن‌ها در دسترس نبود، مجموعه‌ای از مدل‌ها با ۳ شرط جهت ورود به تحلیل‌های بعدی انتخاب شدند: ۱- در رابطه با مدل‌هایی که ساختار آن‌ها با سرور Robetta پیش‌بینی شد، تنها مدل‌هایی انتخاب شدند که سطح اطمینان سرور از دقت کلی ساختار فضایی آن‌ها بالاتر از ۷۰ درصد بود. ۲- مدل‌های فضایی مربوط به توالی‌های اسیدآمینة که کمتر از ۳۰ درصد شباهت با توالی متناظر خود در ویروس SARS-CoV-2 داشتند از مجموعه کنار گذاشته شدند. ۳- توالی‌های اسیدآمینة که با توالی متناظر خود در ویروس SARS-CoV-2 کمتر از ۹۰ درصد هم‌پوشانی (Covariance) داشتند از مجموعه حذف شدند. در ادامه با استفاده از روش "تحلیل دو به دو تشابهات ساختاری" (Pairwise structure alignment analysis) که در پایگاه RCSB موجود است (www.rcsb.org/alignment)، میزان شباهت ساختاری و ترکیبی (Conformation) پروتئین‌های ویروس SARS-CoV-2 با پروتئین‌های متناظر موجود در سایر کرونا ویروس‌ها (پروتئین‌های حائز ۳ شرط مطرح شده) محاسبه شد. بدین منظور برای مقایسه‌ها از الگوریتم jFATCAT (rigid) استفاده شد. از این الگوریتم معمولاً هنگام مقایسه ساختار فضایی پروتئین‌هایی که از نظر تکاملی قرابت زیادی دارند استفاده می‌شود. نتایج این مرحله با شاخص مدل امتیازدهی قالبی یا (Template modeling score (TM-score) گزارش شده است. امروزه این شاخص یکی از مهم‌ترین شاخص‌های بررسی میزان شباهت ساختار فضایی دو پروتئین می‌باشد. میزان TM-score می‌تواند بین مقادیر صفر و یک متغیر باشد و هر چه TM-score به عدد یک نزدیک‌تر باشد، آن دو پروتئین از نظر ساختار فضایی به هم شبیه‌تر هستند (۳۶، ۳۷).

جدول ۴. نتایج حاصل از هم‌ردیفی توالی نوکلئوتیدی ناحیه ORF1ab اعضای مهم خانواده *Coronaviridae* و ژنوم ویروس SARS-CoV-2.

Identity(درصد)	Score(bits)	Protein sequence	Blast Report (nt)	Query
۸۱	۷۵/۸	ORF 1Ab	۲۰۸۷۲-۲۰۷۱۵	BCoV
۸۴	۶۱/۹	polyprotein	۱۵۰۰۴-۱۴۹۲۲	
۸۲	۶۰/۰		۱۵۷۶۰-۱۵۶۶۳	
۹۰	۶۰/۰		۱۹۱۷۴-۱۹۱۲۵	
۸۸	۵۸/۰		۱۷۳۲۳-۱۷۲۷۱	
۸۹	۵۴/۰		۱۵۱۹۰-۱۵۱۴۴	
۸۹	۵۲/۰		۱۴۳۴۴-۱۴۲۹۹	
۹۱	۵۰/۰		۱۴۶۵۵-۱۴۶۱۹	
۸۷	۴۶/۱		۱۷۴۸۲-۱۷۴۳۶	
۹۷	۸۱/۸	ORF 1Ab	۱۴۲۱۸-۱۴۱۷۴	IBV
۹۰	۵۲/۰	polyprotein	۱۳۷۱۴-۱۳۶۷۳	
۸۴	۴۶/۱		۱۸۱۲۴-۱۸۰۶۶	
۸۵	۱۲/۵	ORF 1Ab	۱۹۴۳۰-۱۹۲۸۴	HKU2
۸۰	۸۱/۸	polyprotein	۱۵۲۶۳-۱۵۰۶۷	
۸۱	۷۵/۸		۲۱۱۱۹-۲۰۹۷۴	
۸۳	۶۵/۹		۱۶۰۲۵-۱۵۹۲۵	
۱۰۰	۶۰/۰		۱۵۴۳۲-۱۵۴۰۳	
۹۱	۶۰/۰		۱۵۵۷۷-۱۵۵۳۲	
۸۸	۵۰/۰		۱۷۵۸۲-۱۷۵۳۳	
۹۱	۵۰/۱		۱۷۰۹۸-۱۷۰۶۲	
۸۵	۴۸/۱		۱۴۲۴۹-۱۴۱۹۴	
۸۴	۱۱/۹		۱۹۴۳۰-۱۹۲۷۹	
۹۵	۷۹/۸	ORF 1Ab	۱۴۲۸۶-۱۴۲۳۹	Human coronavirus NL63
۸۷	۶۳/۹	polyprotein	۱۳۰۶۱-۱۲۹۹۸	
۸۷	۶۰/۰		۱۴۰۴۷-۱۳۹۹۰	
۸۵	۵۶/۰		۱۸۲۸۶-۱۸۲۲۳	
۸۹	۵۴/۰		۱۹۸۲۵-۱۹۷۷۹	
۹۵	۷۹/۸		۱۴۲۸۶-۱۴۲۳۹	
۸۹	۸۹/۷	ORF 1Ab	۱۵۰۷۸-۱۵۰۰۲	MERS
۸۶	۷۵/۸	polyprotein	۱۶۰۱۴-۱۵۹۲۹	
۷۹	۷۱/۹		۱۴۸۱۵-۱۴۶۲۸	
۹۳	۶۹/۹		۱۵۲۹۴-۱۵۲۴۸	
۹۲	۵۸/۰		۲۰۸۳۲-۲۰۷۹۲	
۸۶	۵۶/۰		۱۶۷۸۵-۱۶۷۲۶	
۹۰	۵۴/۰		۱۵۵۰۰-۱۵۴۵۸	
۹۴	۵۴/۰		۱۷۷۶۹-۱۷۷۳۵	
۹۲	۵۲/۰		۱۵۸۰۷-۱۵۷۷۰	
۹۲	۵۲/۰		۱۷۰۸۵-۱۷۰۴۸	
۹۰	۵۰/۱		۱۴۳۱۰-۱۴۲۷۰	
۹۱	۴۶/۱		۱۷۸۲۹-۱۷۷۹۵	
۸۵	۹۰/۱۰	ORF 1Ab	۲۱۴۸۵-۱۱۰۸۶	SARS-CoV
۸۲	۷۳/۳	polyprotein	۱۰۹۰۲-۹۶۹۴	
۸۱	۴۴/۲		۱۰۹۱-۲۶۵	
۷۹	۴۱/۴		۸۴۹۴-۷۲۷۶	
۷۷	۲۷/۶		۶۴۱۳-۴۸۹۳	
۸۲	۲۵/۰		۹۲۶۳-۸۸۲۷	
۸۱	۱۴/۹		۳۰۶۲-۲۷۶۱	
۸۱	۹۷/۶		۶۸۷۰-۶۶۹۴	
۸۴	۹۱/۷		۸۷۲۴-۸۶۰۷	

۸۷	۷۳/۸		۴۳۴۲-۴۲۸۶	
۸۶	۶۲/۹		۱۵۴۷-۱۴۸۰	
۸۳	۶۰/۱۰		۱۳۱۰-۱۲۲۵	
۹۰	۶۰/۱۰		۱۷۲۱-۱۶۷۲	
۹۶	۵۶/۱۰		۳۳۱۱-۳۲۸۰	
۸۷	۵۲/۱۰		۴۱۵۵-۴۱۰۲	
۹۰	۴۸/۱		۹۵۵۷-۹۵۱۸	
۱۰۰	۶۹/۹	ORF 1Ab	۱۸۴۷۰-۱۸۴۳۶	CCoV
۸۹	۶۱/۹	polyprotein	۱۸۱۶۹-۱۸۱۱۵	
۸۴	۶۰/۱۰		۱۷۷۶۱-۱۷۶۸۰	
۸۹	۴۶/۱		۱۶۷۹۳-۱۶۷۵۵	
۹۲	۷۷/۸	ORF 1Ab	۱۸۲۵۰-۱۸۱۹۶	FCoV
۸۵	۶۱/۹	polyprotein	۱۷۸۳۵-۱۷۷۶۱	
۹۳	۴۸/۱		۱۸۵۴۸-۱۸۵۱۷	

جدول ۵. نتایج بررسی تشابهات دوبه دو ساختاری پروتئین‌های کدشونده توسط ناحیه ژنی ORF1ab.

۱۶	۱۵	۱۴	۱۳	۱۲	۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	nsp1	-----
nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	
۰/۹۹	۰/۹۹	۰/۹۸	۰/۹۹	۰/۹۹	۰/۹۳	۰/۹۴	*	۰/۹۸	۰/۷۱	۰/۹۷	*	۰/۹۵	*	۰/۷۷	SARS
۰/۹۶	۰/۹۵	۰/۹۷	۰/۹۸	۰/۹۹	۰/۸۳	۰/۸۶	*	۰/۸۳	*	۰/۹۴	*	۰/۸۴	-	-	MERS
۰/۹۵	۰/۸۹	۰/۹۷	۰/۹۷	۰/۹۸	۰/۸۵	۰/۷۶	*	۰/۷۵	-	۰/۸۸	-	-	-	-	IBV
۰/۹۷	۰/۹۰	۰/۹۵	۰/۹۵	۰/۹۸	۰/۸۷	۰/۸۵	*	۰/۶۸	-	۰/۹۲	-	-	-	-	FCoV
۰/۹۷	۰/۸۹	۰/۹۴	۰/۹۵	۰/۹۸	۰/۸۷	۰/۸۶	*	۰/۶۶	*	۰/۸۸	-	-	-	-	CCoV
۰/۹۸	۰/۸۷	۰/۹۷	۰/۹۸	۰/۹۸	۰/۸۷	۰/۸۶	*	۰/۷۲	۰/۶۱	۰/۹۳	*	-	-	-	B CoV
۰/۹۴	۰/۸۹	۰/۹۲	۰/۹۷	۰/۹۸	۰/۸۷	۰/۸۴	*	۰/۶۶	۰/۵۰	۰/۹۲	-	-	-	-	NL63HCoV-
۰/۹۷	۰/۸۶	۰/۹۸	۰/۹۷	۰/۹۸	۰/۸۳	۰/۸۸	*	۰/۷۶	۰/۵۶	۰/۹۳	*	-	-	-	HKU1HCoV-

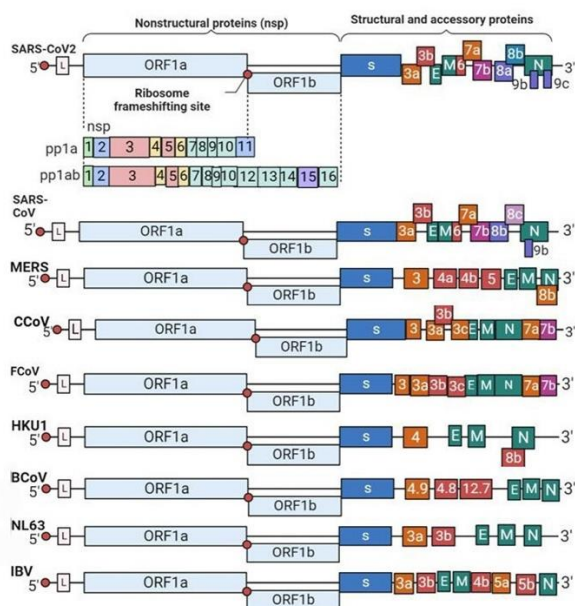
*عدم دقت کافی (کمتر از ۷۰ درصد) مدل‌های سه بعدی پیش بینی شده توسط سرور *Robetta* - خطوط تیره نشان‌دهنده شباهت کمتر از ۳۰ درصد توالی‌های اسیدآمینه ویروس SARS-CoV-2 با سایر کرونا ویروس‌ها است. همچنین، اعداد گزارش شده نشان‌دهنده میزان شاخص TM-score حاصل از مقایسه ساختار فضایی پروتئین غیرساختاری مربوطه در ویروس SARS-CoV-2 و سایر اعضای خانواده *Coronaviridae* است.

تحلیل سلسله تبار: به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، درخت سلسله تبار بر اساس توالی نوکلئوتیدی مربوط به ژنوم کامل و همچنین توالی‌های اسیدآمینه و با استفاده از متد Neighbor-joining با کمک روش Clustal W و با Bootstrap 1000 رسم شد. برای ترسیم درخت سلسله تبار از نرم‌افزار MEGA Version 7 استفاده شد.

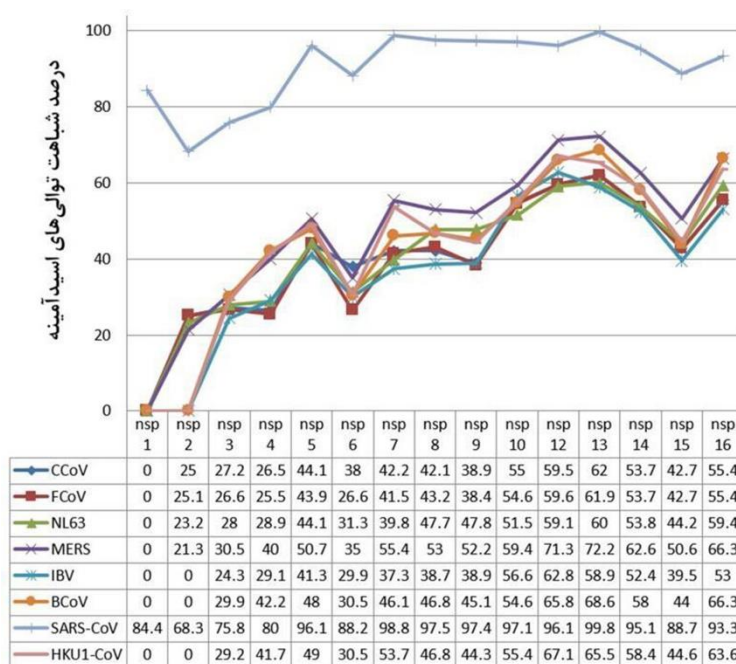
نتایج

نتایج تحلیل همسانی (هومولوژی): در تصویر ۱ ساختار ژنوم ویروس SARS-CoV-2 با ژنوم سایر کروناویروس‌های مهم بیماریزا در دام مقایسه شده است. نتایج بررسی توالی پروتئین‌ها نشان داد که پروتئین‌های ساختاری S, M, N و E در گونه SARS-CoV درصد شباهت بالایی با SARS-CoV-2 دارد ولی در سایر گونه‌ها شباهت پایین‌تر از ۵۰ درصد است (جدول ۳). همچنین، یافته‌های حاصل از هم‌ریدی سازی ژنوم کامل کرونا ویروس‌ها و ویروس SARS-CoV-2 نشان‌دهنده نواحی مشترک حراست شده در توالی پروتئینی ناحیه ORF1ab است (جدول ۴). با توجه به نتایج به‌دست آمده ناحیه ORF1ab برای تحلیل هم‌ریدی انتخاب شد. این ناحیه در بین گونه‌های مختلف بررسی و داده‌های مربوط به هر توالی (nt) با مشابهت بالاتر از ۸۰ درصد گزارش شدند (جدول ۴).

هومولوژی پروتئین‌های کد شده توسط ناحیه ژنومی ORF1ab در گونه‌های مهم بیماریزای کرونا ویریده به تفکیک با پروتئین مترادف آن‌ها در SARS-CoV-2 بررسی شد. نتایج این مقایسه نشان داد که پروتئین غیر ساختاری nsp1 به غیر از گونه SARS-CoV که هومولوژی بالایی با SARS-CoV-2 دارد (۸۴/۴۴ درصد)، در سایر گونه‌ها از تنوع زیادی برخوردار است که در مقایسه با SARS-CoV-2 درصد شباهت قابل ارزیابی ندارد.

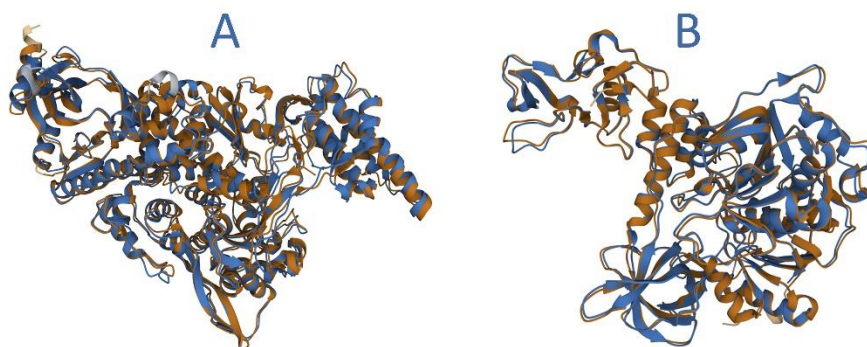


تصویر ۱. ترکیب و ساختار ژنوم کروناویروس SARS-CoV-2 (strain WH-Human 1 CoV) در مقایسه با کرونا ویروس‌های مهم دامپزشکی. در ساختار ژنوم کرونا ویروس‌ها ORF1ab اولین قاب خوانش از سمت 5'UTR است که دو سوم ژنوم ویروس را تشکیل می‌دهد و شانزده پروتئین غیر ساختاری را کد می‌کند. یک سوم باقی مانده ژنوم، پروتئین‌های ساختاری شامل گلیکوپروتئین اسپایک (S)، ماتریکس (M)، پوشش ویروس (E) و نوکلئوکپسید (N) را کد می‌کند.

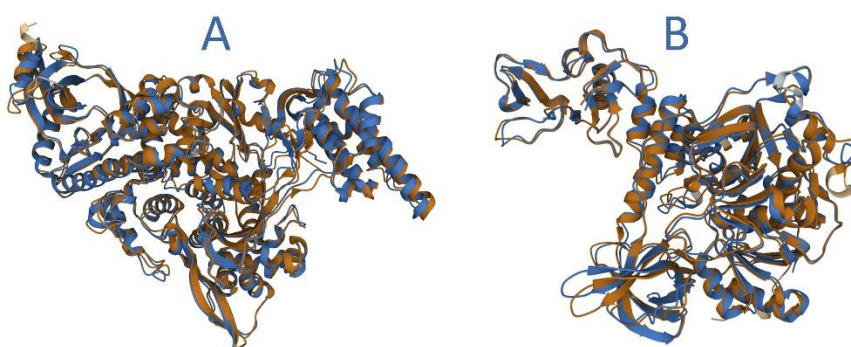


تصویر ۲. درصد شباهت توالی‌های اسیدآمینه پروتئین‌های کد شونده توسط ORF1ab در کرونا ویروس‌های مختلف در مقایسه با توالی‌های متناظر در ویروس SARS-CoV-2.

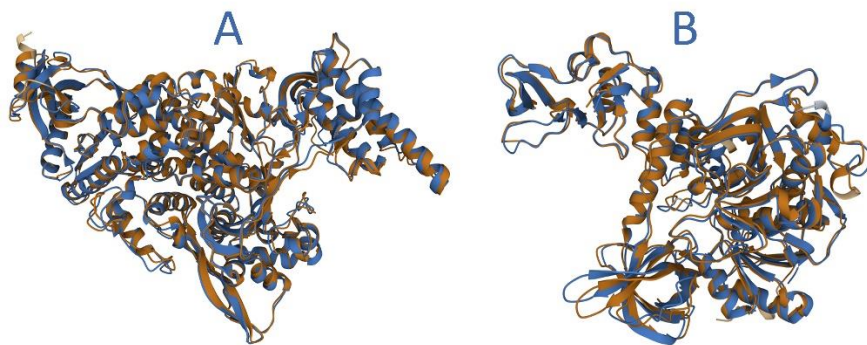
همچنین، بررسی هومولوژی سایر پروتئین‌های غیر ساختاری نشان داد که پروتئین‌های غیر ساختاری nsp2، nsp3، nsp4، nsp5، nsp6، nsp7، nsp8، nsp9 و nsp15 در کرونا ویروس‌های انتخاب شده درصد شباهت پایینی به پروتئین متناظر خود در SARS-CoV-2 دارند و از این بین nsp2، nsp3 و nsp4 درصد شباهت بسیار پایینی داشتند، به استثنای SARS-CoV که در تمام پروتئین‌های ساختاری و غیر ساختاری درصد شباهت بالایی با SARS-CoV-2 داشت.



تصویر ۳. مقایسه ساختار سه بعدی پروتئین‌های (A) nsp12 و (B) nsp13 در ویروس SARS-CoV-2 (ساختار قهوه‌ای) و ویروس IBV (ساختار آبی).



تصویر ۴. مقایسه ساختار سه بعدی پروتئین‌های (A) nsp12 و (B) nsp13 در ویروس SARS-CoV-2 (ساختار قهوه‌ای) و ویروس FCoV (ساختار آبی).



تصویر ۵. مقایسه ساختار سه بعدی پروتئین‌های (A) nsp12 و (B) nsp13 در ویروس SARS-CoV-2 (ساختار قهوه‌ای) و ویروس CCoV (ساختار آبی).

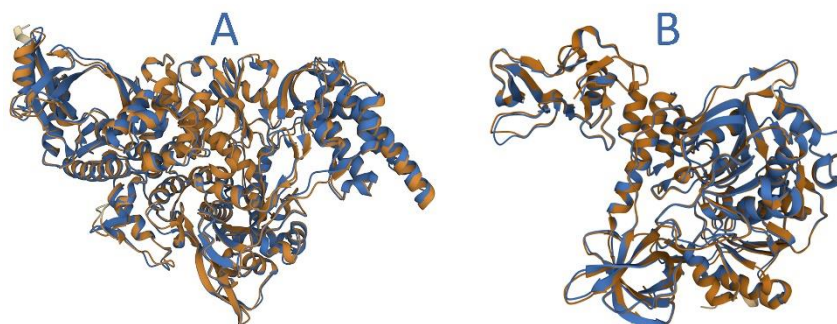
در بین پروتئین‌های ساختاری و غیر ساختاری، نواحی مربوط به پروتئین‌های غیر ساختاری nsp12، nsp13، nsp14 و nsp16 بیشتر حراست شده‌اند و در این بین پروتئین‌های nsp12 و nsp13 بالاترین درصد شباهت بین گونه‌ای را دارا بودند (تصویر ۲).

نتایج بررسی دو به دو تشابهات ساختاری: به طور کلی به نظر می‌رسد نتایج این بخش با نتایج ذکر شده در بخش تحلیل همولوژی توالی‌ها مطابقت داشت. همان طور که در جدول ۵ قابل مشاهده است، TM-score حاصل از مقایسه ساختار فضایی پروتئین‌های nsp12، nsp13، nsp14 و nsp16 در ویروس SARS-CoV-2 و دیگر اعضای کروناوبریده از سایر پروتئین‌های غیرساختاری بیشتر بود. در رابطه با پروتئین‌های nsp12 و nsp13 مقدار TM-score در تمام گونه‌ها بزرگ‌تر یا مساوی با ۰/۹۵ بود که نشان‌دهنده وجود نوعی ساختار فضایی حراست شده در این پروتئین‌ها می‌باشد. مقدار TM-score حاصل از مقایسه ساختار فضایی پروتئین nsp12 در ویروس SARS-CoV-2 و ویروس‌های IBV، FCoV، CCoV و BCoV برابر با عدد ۰/۹۸ بود (به ترتیب تصاویر ۳-۶). مقدار این شاخص در مقایسه ساختار فضایی پروتئین nsp13 در ویروس‌های پیش‌تر ذکر شده نیز به ترتیب برابر ۰/۹۷، ۰/۹۵، ۰/۹۵ و ۰/۹۸ بود که نتایج آن در تصاویر ۳ تا ۶ قابل مشاهده

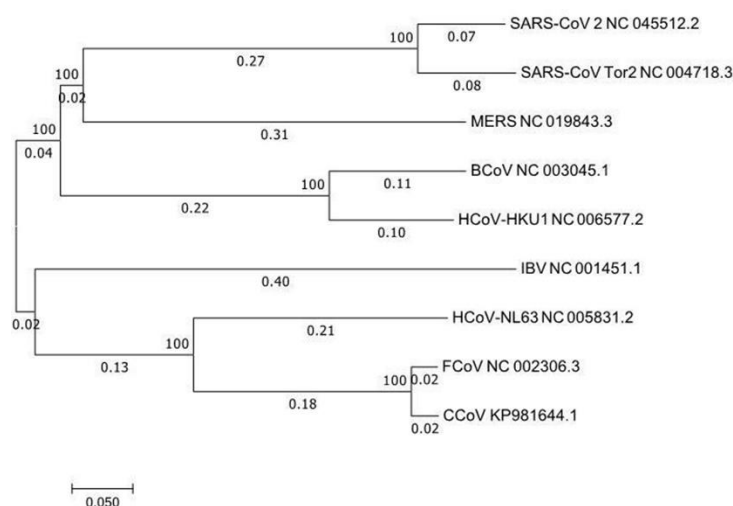
می‌باشد. همچنین مقدار TM-score پروتئین‌های nsp14 و nsp16 در تمام گونه‌ها به ترتیب از عدد ۰/۹۴ و ۰/۹۲ بیشتر بود. در رابطه با TM-score سایر پروتئین‌ها یک یا چند عدد کوچک‌تر از ۰/۹ وجود داشت.

نتایج تحلیل سلسله‌تبار: مطابق با نتایج به دست آمده از تحلیل ژنوم کامل ویروس‌ها، گونه‌های SARS-CoV، SARS-CoV-2، MERS-CoV، BCoV و HCoV-HKU1 نیای مشترکی داشتند. کرونا ویروس گاو (BCoV) و انسان (HKU1) قرابت ژنتیکی بیشتری داشتند و همچنین ویروس‌های SARS-CoV و SARS-CoV-2 در یک زیرشاخه قرار گرفته و به هم نزدیک‌تر بودند. این دو با یک شاخه از MERS-CoV جدا شده‌اند. کرونا ویروس‌های FCoV و CCoV نیز قرابت ژنتیکی بیشتری داشتند و با کرونا ویروس انسانی NL63 دارای یک نیای مشترک بودند و همچنین کروناویروس IBV از طریق یک شاخه بلند با این سه گونه نیای مشترکی داشت (تصویر ۷).

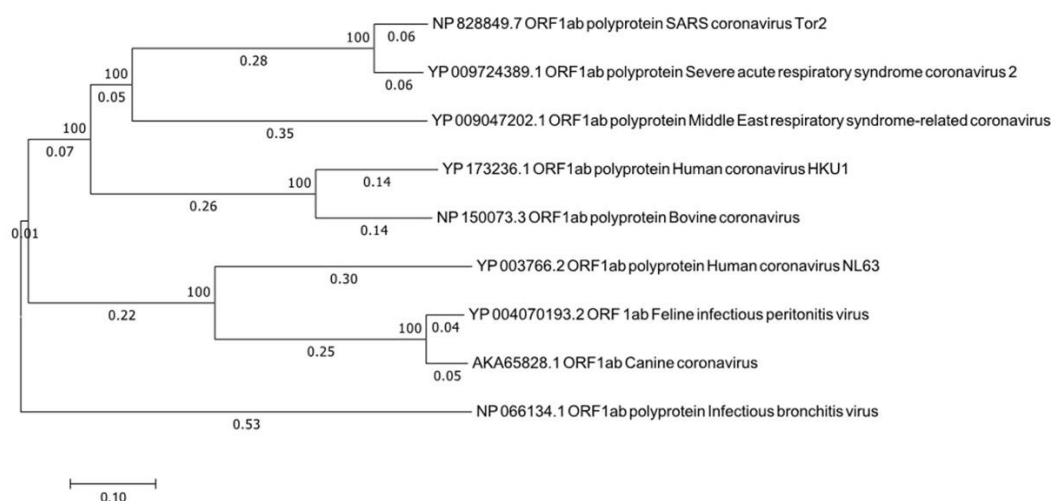
در ادامه، توالی ORF1ab مبنای رسم درخت سلسله‌تبار در نظر گرفته شد. همانند تحلیل قبل، نتایج این تحلیل نیز نشان داد که گونه‌های SARS-CoV، SARS-CoV-2، MERS-CoV، BCoV و HCoV-HKU1 نیای مشترکی داشتند. بر اساس نتایج حاصل، قرابت ژنتیکی بالایی میان SARS-CoV و SARS-CoV-2 و همچنین FCoV و CCoV مشاهده شد. گونه HCoV-NL63 و دو گونه CCoV و FCoV نیز دارای نیای مشترکی بودند. کرونا ویروس IBV نیز از طریق یک شاخه بلند از سایر گونه‌ها جدا شده بود. نتایج این تحلیل در تصویر ۸ قابل مشاهده است.



تصویر ۶. مقایسه ساختار سه بعدی پروتئین‌های (A) nsp12 و (B) nsp13 در ویروس SARS-CoV-2 (ساختار قهوه‌ای) و ویروس BCoV (ساختار آبی).



تصویر ۷. درخت سلسله‌تبار حاصل از تحلیل و مقایسه ژنوم کامل ویروس SARS-CoV-2 و سایر گونه‌های کروناویروس. این درخت بر اساس توالی ژنوم کامل مرتبط با ۹ کروناویروس انسانی و دامی رسم شد. درخت با مجموع طول شاخه ۲/۲۰۴۹۲۲۴۸ نشان داده شده است. طول شاخه‌ها در کنار شاخه‌ها نمایش داده شده است. برای محاسبه فاصله تکاملی از متد Maximum Composite Likelihood و با Bootstrap 1000 استفاده شده است.



تصویر ۸. درخت سلسله تبار بر اساس توالی پروتئینی ORF1ab مرتبط با ۹ کروناویروس انسانی و دامی رسم شد. درخت با مجموع طول شاخه ۲/۸۱۰۹۲۹۲۰ نشان داده شده است. طول شاخه‌ها در کنار شاخه‌ها نمایش داده شده است. برای محاسبه فاصله تکاملی از متد Maximum Composite Likelihood و با Bootstrap 1000 استفاده شده است.

بحث

کروناویروس‌ها طیف وسیعی از میزبانان را آلوده کرده و برخی از گونه‌های جانوری در انتقال بیماری‌های ناشی از این خانواده ویروسی به انسان نقش مهمی دارند. با توجه به این موارد، امکان انتقال بین گونه‌ای از حیوانات به انسان و بروز اپیدمی‌ها و همه‌گیری‌های مشابه در آینده دور از انتظار نیست. این مسئله لزوم توجه به کروناویروس‌های جانوری را بیش از پیش برجسته می‌سازد. بنابراین، بررسی تشابهات و تفاوت‌های بین گونه‌ای اعضای خانواده کرونا در سطح نوکلئوتید، اسیدآمینه و ساختار فضایی پروتئین‌ها با هدف دستیابی به نواحی حراست شده می‌تواند برای تشخیص ویروس و طراحی واکسن‌هایی که قادر به تحریک ایمنی سلولی هستند و همچنین تولید پادتن‌های خنثی کننده متقاطع (Cross-neutralizing antibodies) بسیار مفید باشد. اثر این پادتن‌ها اگر بر علیه طیف وسیعی از کروناویروس‌ها مؤثر باشند از اهمیت زیادی در پزشکی و دامپزشکی و به‌ویژه سلامت واحد برخوردار است.

در مطالعه حاضر، یافته‌های حاصل از هم‌ردیفی توالی ژنوم برخی از ویروس‌های کروناویروس (دارای اهمیت از نظر دامپزشکی و پزشکی) و ویروس SARS-CoV-2 نشان داد که نواحی حراست شده عمدتاً در ناحیه ORF1ab قرار گرفته‌اند. این یافته در برخی از مطالعات پیشین برای سایر گونه‌ها نیز گزارش شده است (۳۸، ۳۹). به عنوان مثال در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ (قبل از شیوع ویروس‌های MERS-CoV و SARS-CoV-2) توسط Woo و همکاران به چاپ رسیده است نیز از ORF1ab به عنوان محل قرارگیری عمده توالی‌های حراست شده برخی از اعضای خانواده *Coronaviridae* یاد شده است (۴۰). در ادامه، بررسی دقیق‌تر ORF1ab مشخص کرد که از میان پروتئین‌های کد شونده توسط این ناحیه، nsp12، nsp13، nsp14 و nsp16 بیشترین شباهت بین گونه‌ای را دارا هستند و گونه‌های مختلف این خانواده از نظر توالی اسیدآمینه مربوط به این ۴ پروتئین حداقل ۵۰ درصد شباهت با توالی‌های متناظر SARS-CoV-2 دارند. این شباهت سبب شد تا در مرحله بعد با استفاده از سرور Robetta ساختار فضایی پروتئین‌های کدشونده توسط ناحیه ژنی ORF1ab پیش‌بینی شود تا علاوه بر مقایسه توالی‌های خطی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی، بتوان ساختار فضایی پروتئین‌های مربوطه را در ویروس SARS-CoV-2 و سایر کرونا ویروس‌ها مقایسه کرد (۴۱).

همان‌طور که ذکر شد، امروزه به فراوانی از شاخص TM-score در مطالعات ایمونوبیوانفورماتیک استفاده می‌شود. بنا بر نتایج مطالعات پیشین، TM-score کمتر از ۰/۲ معمولاً نشان‌دهنده عدم وجود شباهت ساختاری میان دو پروتئین است، حال آن‌که در صورتی که این شاخص از عدد ۰/۵ بزرگ‌تر باشد در اغلب موارد نشان‌دهنده نحوه تاخوردگی (Folding) یکسان دو پروتئین است (۳۶، ۳۷). اعداد موجود در **جدول ۵** نشان‌دهنده آن است که شاخص TM-score مربوط به همه پروتئین‌های غیرساختاری بالاتر از عدد ۰/۵ است. این موضوع نشان داد

که اساس ساختار فضایی مربوط به پروتئین‌های غیرساختاری در همه گونه‌های کرونا ویروسی یکسان می‌باشد و شباهت غیرقابل انکاری میان آن‌ها مشاهده می‌شود. میزان این شباهت‌ها در پروتئین‌های nsp12، nsp13، nsp14 و nsp16 به حداکثر می‌رسد و این نتیجه‌گیری با نتایج حاصل از تحلیل هومولوژی توالی‌ها کاملاً مطابقت دارد.

نتایج حاصل از تحلیل سلسله تبار بر مبنای ORF1ab نشان داد که گونه‌هایی که قرابت بیشتری داشتند، درصد شباهت بالاتری نیز در توالی ORF1ab دارند. در مطالعات پیشین نیز از بخشی از پروتئین‌های کدشونده توسط ناحیه ژنی ORF1ab جهت انجام تحلیل سلسله تبار استفاده شده است. به عنوان مثال در مطالعه‌ای از RNA پلیمرز وابسته به RNA جهت ترسیم درخت سلسله تبار اعضای خانواده *Coronaviridae* استفاده شد. نتایج این مطالعه مطابقت بالایی با نتایج مطالعه حاضر دارد (۴۰). لازم به ذکر است که nsp12 و nsp13 برخی از کرونا ویروس‌های جدا شده از خفاش‌ها شباهت بالایی با SARS-CoV-2 دارند. این یافته یکی از دلایل مطرح بودن خفاش‌ها به عنوان عامل انتقال ویروس SARS-CoV-2 به انسان است (۴۲).

مطابق با نتایج مطالعات پیشین، nsp12 یک RNA پلیمرز وابسته به RNA است و nsp13 هم نقش هلیکازی دارد. همچنین، عملکرد nsp14 غلطگیری (proofreading) است و nsp16 به عنوان یک ریبوز متیل ترانسفراز فعالیت می‌کند. به بیان دقیق‌تر، نقش اصلی این ۴ پروتئین غیرساختاری، تنظیم فعالیت‌های مرتبط با رونوشت برداری ویروس می‌باشد (۴۳-۴۶). بنابراین، به نظر می‌رسد سازوکارهای مرتبط با رونوشت برداری ویروس‌های این خانواده تا حد زیادی میان اعضای آن حفظ شده است.

برخلاف ORF1ab، پروتئین‌های ساختاری مهم این خانواده نظیر گلیکوپروتئین اسپایک، پروتئین ماتریکس، پروتئین پوششی و پروتئین نوکلئوکسپید تنوع بالایی در میان اعضای مختلف دارند و به نظر می‌رسد توالی‌های حراست شده قابل توجهی در مقایسه با پروتئین‌های کدشونده توسط ناحیه ژنی ORF1ab در آن‌ها وجود ندارد. البته در رابطه با وجود یا عدم وجود ساختار فضایی حراست شده در پروتئین‌های ساختاری نیاز است تا مطالعات بیشتری انجام شود.

همان‌طور که در جدول ۳ مشخص است، شباهت فضایی بالایی میان پروتئین‌های غیرساختاری اعضای خانواده کروناویریده وجود دارد. این شباهت فضایی می‌تواند سبب ایجاد نتایج مثبت کاذب در تشخیص مبتنی بر شناسایی پروتئین شود. در این صورت می‌توان بخش‌هایی از ژن را که اختصاصی هر ویروس است با استفاده از روش‌هایی نظیر PCR هدف قرار داد. البته در مورد داروها و واکسن‌ها عکس این موضوع صادق است. پروتئین‌های غیرساختاری به دلیل شباهت ساختار فضایی خود می‌توانند اهداف بسیار مناسبی برای توسعه و تولید انواع داروها و واکسن‌های ضد کروناویروس‌ها باشند. عوامل هدف قرار دهنده این پروتئین‌ها می‌توانند به‌طور همزمان بر علیه طیف وسیعی از کروناویروس‌ها مؤثر باشند. به عنوان مثال، داروی Remdesivir که در عفونت‌های ویروسی به فراوانی از آن استفاده می‌شود، کمپلکس رونویسی ویروس را هدف قرار می‌دهد (۴۷). با استراتژی مشابهی، می‌توان به تولید انواع داروهای ضد ویروس که کمپلکس رونویسی را هدف قرار می‌دهند پرداخت. همچنین از مناطق حراست شده در پروتئین‌های غیر ساختاری می‌توان برای روش‌های تشخیصی مبتنی بر تفکیک افراد بیمار از واکسینه (DIVA) نیز بهره برد.

برخی از مطالعات پیشین با استفاده از ابزارهای ایمونوفورماتیک به بررسی قابلیت تحریک پاسخ ایمنی سلولی پروتئین‌های غیرساختاری کدشونده توسط ناحیه ژنی ORF1ab در سطح *in silico* پرداخته‌اند. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که توسط Gustiananda و همکاران در سال ۲۰۲۱ به چاپ رسیده است گزارش شده است که برخی از اپی‌توپ‌های پروتئین‌های غیرساختاری ویروس SARS-CoV-2 می‌تواند به خوبی توسط مولکول‌های MHC کلاس ۱ و ۲ به گیرنده‌های یاخته‌های T عرضه شود و آن‌ها را تحریک کند (۴۸). در رابطه با قابلیت پروتئین‌های غیرساختاری در تحریک پاسخ ایمنی هومورال مطالعه‌ای تا به امروز به چاپ نرسیده است.

نتیجه‌گیری نهایی: پیش از این نیز مقایسه ژنومی برای کروناویروس‌ها انجام شده است اما در مرور این یافته‌ها به کرونا ویروس‌های انسانی و دامی یا به عبارتی مهم از نظر دامپزشکی اشاره‌ای نشده است. مطالعه حاضر اولین بررسی بیوانفورماتیک برای مقایسه و تحلیل توالی و ساختارهای کروناویروس‌های مهم بیماریزا در دامپزشکی است که به پیشینی ساختار سه بعدی پروتئین‌های کدشونده توسط ناحیه ژنی حراست شده ORF1ab پرداخته است. با توجه به مواردی که ذکر شد و نظر به چالش‌های توسعه واکسن و دارو علیه ویروس‌های رنا (به دلیل نرخ بالای وقوع جهش در این ویروس‌ها)، استفاده از پروتئین‌های دخیل در رونوشت برداری ویروس‌های خانواده *Coronaviridae* می‌تواند به

عنوان یک راهکار مناسب جهت توسعه دارو و واکسن‌های مؤثر بر ویروس‌های این خانواده در نظر گرفته شود. توجه به این موضوع می‌تواند از بروز اپیدمی‌های ناشی از کروناویروس‌های انسانی و دامی در آینده پیشگیری کند.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و دانشکده دامپزشکی جهت تأمین اعتبار و امکانات مطالعه حاضر قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

- Alexandersen S, Chamings A, Bhatta TR. SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNAs in diagnostic samples are not an indicator of active replication. *Nat Commun.* 2020;11:1-13. doi: [10.1038/s41467-020-19883-7](https://doi.org/10.1038/s41467-020-19883-7) PMID: [33247099](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33247099/)
- Cao C, Cai Z, Xiao X, Rao J, Chen J, Hu N, et al. The architecture of the SARS-CoV-2 RNA genome inside virion. *Nat Commun.* 2021;12:1-14. doi: [10.1038/s41467-021-22785-x](https://doi.org/10.1038/s41467-021-22785-x) PMID: [34168138](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34168138/)
- Viehweger A, Krautwurst S, Lamkiewicz K, Madhugiri R, Ziebuhr J, Hölzer M, et al. Direct RNA nanopore sequencing of full-length coronavirus genomes provides novel insights into structural variants and enables modification analysis. *Genome Res.* 2019; 29: 1545-1554. doi: [10.1101/gr.247064.118](https://doi.org/10.1101/gr.247064.118) PMID: [31439691](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31439691/)
- Fung TS, Liu DX. Human coronavirus: Host-pathogen interaction. *Annu Rev Microbiol.* 2019;73:529-557. doi: [10.1146/annurev-micro-020518-115759](https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115759) PMID: [31226023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31226023/)
- de Wilde AH, Snijder EJ, Kikkert M, van Hemert MJ. Host factors in coronavirus replication. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2018;419:1-42. doi: [10.1007/82_2017_25](https://doi.org/10.1007/82_2017_25) PMID: [28643204](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28643204/)
- Zhou Z, Qiu Y, Ge X. The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the Nidovirales order. *Anim Dis.* 2021;1:5. doi: [10.1186/s44149-021-00005-9](https://doi.org/10.1186/s44149-021-00005-9)
- Peiris JSM. Coronaviruses. *Medical microbiology: eighteenth edition.* 2012;2:587-593.
- Hu B, Ge X, Wang L-F, Shi Z. Bat origin of human coronaviruses. *Virology.* 2015;12:1-10. doi: [10.1186/s12985-015-0422-1](https://doi.org/10.1186/s12985-015-0422-1)
- Kahn JS, McIntosh K. History and recent advances in coronavirus discovery. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24:223-227. doi: [10.1007/7653_2020_47](https://doi.org/10.1007/7653_2020_47)
- Abdelghany TM, Ganash M, Bakri MM, Qanash H, Al-Rajhi AMH, Elhussieny NI. SARS-CoV-2, the other face to SARS-CoV and MERS-CoV: Future predictions. *Biomed J.* 2021;44:86-93. doi: [10.1016/j.bj.2020.10.008](https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.10.008) PMID: [33602634](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33602634/)
- Shi Z, Hu Z. A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus. *Virus Res.* 2008;134:74-87. doi: [10.1016/j.virusres.2007.03.012](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.03.012) PMID: [17451830](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17451830/)
- Mohd HA, Al-Tawfiq JA, Memish ZA. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) origin and animal reservoir. *Virology.* 2016; 13:87. doi: [10.1186/s12985-016-0544-0](https://doi.org/10.1186/s12985-016-0544-0) PMID: [27255185](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27255185/)
- Reusken CEM, Haagmans BL, Koopmans MPG. [Dromedary camels and Middle East respiratory syndrome: MERS coronavirus in the 'ship of the desert']. *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde.* 2014;158:1-15. PMID: [25248734](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25248734/)
- Adney DR, Letko M, Ragan IK, Scott D, van Doremalen N, Bowen RA, et al. Bactrian camels shed large quantities of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) after experimental infection*. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8:717-723. doi: [10.1080/22221751.2019.1618687](https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1618687) PMID: [31119984](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31119984/)

15. Petersen E, Koopmans M, Go U, Hamer DH, Petrosillo N, Castelli F, et al. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20: 238-244. [doi: 10.1016/S1473-3099\(20\)30484-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30484-9) PMID: 32628905
16. Chen Z, Boon SS, Wang MH, Chan RWY, Chan PKS. Genomic and evolutionary comparison between SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *J Virol Methods.* 2021;289:1-12. [doi: 10.1016/j.jviromet.2020.114032](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.114032) PMID: 33290786
17. Latinne A, Hu B, Olival KJ, Zhu G, Zhang L, Li H, et al. Origin and cross-species transmission of bat coronaviruses in China. *Nat Commun.* 2020;11:1-15. [doi: 10.1038/s41467-020-17687-3](https://doi.org/10.1038/s41467-020-17687-3) PMID: 32843626
18. Wong YC, Lau SY, Wang To KK, Mok BWY, Li X, Wang P, et al. Natural transmission of bat-like severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 without proline-arginine-arginine-alanine variants in Coronavirus disease 2019 patients. *Clin Infect Dis.* 2021;73:437-444. [doi: 10.1093/cid/ciaa953](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa953) PMID: 32649739
19. Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomedica.* 2020;91:157-160. [doi: 10.23750/abm.v91i1.9397](https://doi.org/10.23750/abm.v91i1.9397) PMID: 32191675
20. Monchatre-Leroy E, Boué F, Boucher JM, Renault C, Moutou F, Gouilh MA, et al. Identification of alpha and beta coronavirus in wildlife species in france: bats, rodents, rabbits, and hedgehogs. *Viruses.* 2017;9:364-376. [doi: 10.3390/v9120364](https://doi.org/10.3390/v9120364) PMID: 29186061
21. Milek J, Blicharz-Domańska K. Coronaviruses in avian species-review with focus on epidemiology and diagnosis in wild birds. *J Vet Res.* 2018;62:249-255. [doi: 10.2478/jvetres-2018-0035](https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0035)
22. Brian DA, Baric RS. Coronavirus genome structure and replication. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;12:1-30. [doi: 10.1007/3-540-26765-4_1](https://doi.org/10.1007/3-540-26765-4_1) PMID: 15609507
23. Keshavarz Valian N, Pourakbari B, Asna Ashari K, Hosseinpour Sadeghi R, Mahmoudi S. Evaluation of human coronavirus OC43 and SARS-COV-2 in children with respiratory tract infection during the COVID-19 pandemic. *J Med Virol.* 2022;94:1450-1456. [doi: 10.1002/jmv.27460](https://doi.org/10.1002/jmv.27460) PMID: 34786736
24. Vella F, Senia P, Ceccarelli M, Vitale E, Maltezou H, Taibi R, et al. Transmission mode associated with coronavirus disease 2019: A review. *Eur Rev Med Pharmacol.* 2020; 24: 7889-7904. [doi: 10.26355/eurev_202007_22296](https://doi.org/10.26355/eurev_202007_22296) PMID: 32744718
25. Zhou L, Aye SK, Chidambaram V, Karakousis PC. Modes of transmission of SARS-CoV-2 and evidence for preventive behavioral interventions. *BMC Infect. Dis.* 2021;21:496. [doi: 10.1186/s12879-021-06222-4](https://doi.org/10.1186/s12879-021-06222-4) PMID: 34049515
26. Corman VM, Lienau J, Witznath M. Coronaviruses as the cause of respiratory infections. *Internist.* 2019;60:1136-1145. [doi: 10.1007/s00108-019-00671-5](https://doi.org/10.1007/s00108-019-00671-5) PMID: 31455974
27. Luo X, Zhou GZ, Zhang Y, Peng LH, Zou LP, Yang YS. Coronaviruses and gastrointestinal diseases. *Mil Med Res.* 2020;7:49-56. [doi: 10.1186/s40779-020-00279-z](https://doi.org/10.1186/s40779-020-00279-z) PMID: 33054860
28. Yuan D, Yan Z, Li M, Wang Y, Su M, Sun D. Isolation and Characterization of a Porcine Transmissible Gastroenteritis Coronavirus in Northeast China. *Front Vet Sci.* 2021;8:1-12. [doi: 10.3389/fvets.2021.611721](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.611721)
29. Gu J, Korteweg C. Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Am J Clin Pathol.* 2007;170:1136-1147. [doi: 10.2353/ajpath.2007.061088](https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.061088) PMID: 17392154
30. Tekes G, Thiel HJ. Feline Coronaviruses: Pathogenesis of feline infectious peritonitis. *Adv Virus Res.* 2016;96:193-218. [doi: 10.1016/bs.aivir.2016.08.002](https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.002) PMID: 27712624
31. Hosking MP, Lane TE. The pathogenesis of murine coronavirus infection of the central nervous system. *Crit Rev Immunol.* 2010;30:119-130. [doi: 10.1615/critrevimmunol.v30.i2.20](https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v30.i2.20) PMID: 20370625
32. Cowley TJ, Weiss SR. Murine coronavirus neuropathogenesis: Determinants of virulence. *J NeuroVirology.* 2010;16:427-434. [doi: 10.3109/13550284.2010.529238](https://doi.org/10.3109/13550284.2010.529238) PMID: 21073281
33. Mora-Díaz JC, Piñeyro PE, Houston E, Zimmerman J, Giménez-Lirola LG. Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus: A review. *Front Vet Sci.* 2019;6:1-12. [doi: 10.3389/fvets.2019.00053](https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00053) PMID: 30873421

34. Brant AC, Tian W, Majerciak V, Yang W, Zheng ZM. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell Biosci.* 2021;11:1-17. doi: [10.1186/s13578-021-00643-z](https://doi.org/10.1186/s13578-021-00643-z)
35. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2020;1866:1-16. doi: [10.1016/j.bbadis.2020.165878](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165878) PMID: [32544429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32544429/)
36. Xu J, Zhang Y. How significant is a protein structure similarity with TM-score = 5/0? *Bioinformatics.* 2010;26:889-895. doi: [10.1093/bioinformatics/btq066](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq066) PMID: [20164152](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20164152/)
37. Zhang Y, Skolnick J. TM-align: A protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:2302-2309. doi: [10.1093/nar/gki524](https://doi.org/10.1093/nar/gki524) PMID: [15849316](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15849316/)
38. Mei H, Pond SK, Nekrutenko A. Stepwise evolution and exceptional conservation of ORF1a/b overlap in coronaviruses. *Mol Biol Evol.* 2021;38(12):5678-5684. doi: [10.1093/molbev/msab265](https://doi.org/10.1093/molbev/msab265) PMID: [34505896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34505896/)
39. Velazquez-Salinas L, Zarate S, Eberl S, Gladue DP, Novella I, Borca M V. Positive selection of ORF1ab, ORF3a, and ORF8 genes drives the early evolutionary trends of SARS-CoV-2 during the 2020 COVID-19 pandemic. *Front Microbiol.* 2020;11:1-13. doi: [10.3389/fmicb.2020.550674](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.550674)
40. Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen KY. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses.* 2010;2:1804-1820. doi: [10.3390/v2081803](https://doi.org/10.3390/v2081803) PMID: [21994708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21994708/)
41. Kim DE, Chivian D, Baker D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:526-531. doi: [10.1093/nar/gkh468](https://doi.org/10.1093/nar/gkh468) PMID: [15215442](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15215442/)
42. Tabibzadeh A, Esghaei M, Soltani S, Yousefi P, Taherizadeh M, Safarnezhad Tameshkel F, et al. Evolutionary study of COVID-19, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) as an emerging coronavirus: Phylogenetic analysis and literature review. *Vet Med Sci.* 2021;7:559-571. doi: [10.1002/vms3.394](https://doi.org/10.1002/vms3.394) PMID: [33210477](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33210477/)
43. Wang W, Zhou Z, Xiao X, Tian Z, Dong X, Wang C, et al. SARS-CoV-2 nsp12 attenuates type I interferon production by inhibiting IRF3 nuclear translocation. *Cell Mol Immunol.* 2021;18:945-953. doi: [10.1038/s41423-020-00619-y](https://doi.org/10.1038/s41423-020-00619-y) PMID: [33637958](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33637958/)
44. White MA, Lin W, Cheng X. Discovery of COVID-19 Inhibitors Targeting the SARS-CoV-2 Nsp13 Helicase. *J Phys Chem Lett.* 2020;11:9144-9151. doi: [10.1021/acs.jpcclett.0c02421](https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.0c02421) PMID: [33052685](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33052685/)
45. Ma Y, Wu L, Shaw N, Gao Y, Wang J, Sun Y, et al. Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10 complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015; 112: 9436-9441. doi: [10.1073/pnas.1508686112](https://doi.org/10.1073/pnas.1508686112) PMID: [26159422](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26159422/)
46. Vithani N, Ward MD, Zimmerman MI, Novak B, Borowsky JH, Singh S, et al. SARS-CoV-2 Nsp16 activation mechanism and a cryptic pocket with pan-coronavirus antiviral potential. *Biophys J.* 2021;120:2880-2889. doi: [10.1016/j.bpj.2021.03.024](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.03.024) PMID: [33794150](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33794150/)
47. Kokic G, Hillen HS, Tegunov D, Dienemann C, Seitz F, Schmitzova J, et al. Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir. *Nat Commun.* 2021. doi: [10.1038/s41467-020-20542-0](https://doi.org/10.1038/s41467-020-20542-0) PMID: [33436624](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33436624/)
48. Gustiananda M, Sulisty BP, Agustriawan D, Andarini S. Immunoinformatics analysis of sars-cov-2 orf1ab polyproteins to identify promiscuous and highly conserved t-cell epitopes to formulate vaccine for indonesia and the world population. *Vaccines.* 2021. doi: [10.3390/vaccines9121459](https://doi.org/10.3390/vaccines9121459)



Evaluation of the Antibacterial Effect of Carvacrol Alone and in Combination with the Antibiotic Cefixime Against *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇

Sepideh Asadi^{1✉}, Bahar Nayeri Fasaie^{2✉}, Taghi Zahraei Salehi^{2✉}, Ramak Yahya Rayat^{2✉}, Nemat Shams^{3✉}

¹ Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

² Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Received: 13 Febuary 2023, Accepted: 19 April 2023



[10.22059/jvr.2022.333699.3207](https://doi.org/10.22059/jvr.2022.333699.3207)



[20.1001.1.20082525.1402.78.1.7.9](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1402.78.1.7.9)

Abstract

BACKGROUND: The use of plant compounds and their derivatives, such as extracts and essential oils, for combating infectious agents has attracted a great deal of scientific attention. One of the active antimicrobial compounds with plant origin is carvacrol.

OBJECTIVES: The present study aimed to evaluate the antibacterial activity of carvacrol alone and in combination with the antibiotic cefixime against *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇.

METHODS: The antibacterial properties of carvacrol and cefixime were evaluated by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC), and disk diffusion method. The checkerboard assay was used to evaluate the interaction between the carvacrol and cefixime and to determine the fractional inhibitory concentration.

RESULTS: The results showed that the MIC and MBC of carvacrol and cefixime against *E. coli* O₁₅₇:H₇ were 250, 250 µg/ml (MIC, MBC) and 128, 128 µg/ml (MIC, MBC), respectively. In the checkerboard test, carvacrol was found to have a synergistic interaction with antibiotic cefixime against *E. coli* O₁₅₇:H₇ (FIC index=0.5).

CONCLUSIONS: Due to the significant antibacterial activity of carvacrol, the present study introduced this agent as a new antibacterial drug with a natural origin. In addition, since carvacrol significantly increased the antibacterial potential of cefixime (synergistic properties), it could be considered as an effective compound for increasing the antibacterial power of cefixime antibiotic.

Keywords: Antibacterial, Carvacrol, Cefixime, Checkerboard, *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇

Copyright © Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s)

Publisher: University of Tehran

Corresponding author: Bahar Nayeri Fasaie, Tel/Fax: 021-61117050 / 021-66933222



How to cite this article:

Asadi, S., Nayeri Fasaie, B., Zahraei Salehi, T., Yahya Rayat, R., Shams, N. Evaluation of the Antibacterial Effect of Carvacrol Alone and in Combination with the Antibiotic Cefixime Against *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇. J Vet Res, 2023; 78(1): 67-76. doi: 10.22059/jvr.2022.333699.3207



ارزیابی تأثیر ضدباکتریایی کارواکرول به تنهایی و در ترکیب با آنتی بیوتیک سفکسیم در برابر

باکتری اشیریشیا کلی $O_{157} : H_7$ سپیده اسدی^۱، بهار نیری فسایی^۲، تقی زهرایی صالحی^۲، رامک یحیی رعیت^۲، نعمت شمس^۳^۱ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران^۲ گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران^۳ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۲۴ بهمن ۱۴۰۱، تاریخ پذیرش: ۳۰ فروردین ماه ۱۴۰۲

doi 10.22059/jvr.2022.333699.3207



20.1001.1.20082525.1402.78.1.7.9

چکیده

زمینه مطالعه: امروزه استفاده از ترکیبات گیاهی و مشتقات آن مانند عصاره‌ها و اسانس‌ها جهت مبارزه با عوامل عفونی بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است. یکی از ترکیبات فعال ضد میکروبی با منشأ گیاهی کارواکرول می‌باشد.

هدف: ارزیابی اثر ضدباکتریایی کارواکرول به تنهایی و در ترکیب با آنتی بیوتیک سفکسیم در برابر اشیریشیا کلی $O_{157} : H_7$.

روش کار: خواص ضدباکتریایی کارواکرول و سفکسیم با تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) Minimum Inhibition Concentration، حداقل غلظت کشندگی (MBC) Minimum Bactericidal Concentration و روش انتشار در آگار مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور برهمکنش کارواکرول و سفکسیم و تعیین غلظت بازدارنده افتراقی (FIC شاخص) از روش چکربرد استفاده شد.

نتایج: حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی کارواکرول و سفکسیم علیه باکتری اشیریشیا کلی $O_{157} : H_7$ به ترتیب برابر (MIC, MBC) ۲۵۰، ۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و (MBC, MIC) ۱۲۸، ۱۲۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. در روش چکربرد، در حالت ترکیب کارواکرول با آنتی بیوتیک سفکسیم در برابر $O_{157} : H_7$ *E. coli* اثر سینرژیستی مشاهده شد (FIC=۰/۵ شاخص).

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه کارواکرول، مطالعه حاضر این عامل را به عنوان یک داروی ضدباکتریایی با منشأ طبیعی معرفی می‌کند. همچنین از آن جایی که کارواکرول خواص ضدباکتریایی سفکسیم را به طور معنی‌داری افزایش داد (خواص سینرژیستی)، می‌توان کارواکرول را به عنوان یک ترکیب مؤثر جهت افزایش قدرت ضد باکتریایی آنتی بیوتیک سفکسیم معرفی نمود.

کلمات کلیدی: اشیریشیا کلی $O_{157} : H_7$ ، سفکسیم، چکربرد، ضد میکروبی، کارواکرول

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: بهار نیری فسایی، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های دفاعی در برابر بیماری‌های عفونی، استفاده از آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد. با این حال، سوء استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در زمینه‌های مختلف پزشکی، دامپزشکی و صنعت منجر به ظهور سویه‌های مقاوم به دارو شده است. این امر نگرانی بهداشت عمومی را در سراسر جهان افزایش داده است (۱).

امروزه، گسترش روزافزون مقاومت‌های دارویی در میان باکتری‌ها در کنار سمیت و عوارض جانبی داروهای موجود سبب شده است تا توجه بیشتری به سمت داروهای مناسب‌تر با اثرات سمی و عوارض جانبی کمتر معطوف گردد و برای این منظور گیاهان دارویی نیز مورد توجه

خاصی قرار گرفته‌اند. از زمان‌های قدیم، گیاهان دارویی و ترکیبات آن‌ها مانند کارواکرول در طب سنتی برای اهداف مختلف در سراسر جهان استفاده شده است (۲، ۳).

کارواکرول یا سایموفنول (۵-ایزوپروپیل-۲-متیل فنول) یک ترکیب فنلی مونوترپنوئید است که از اسانس‌های خانواده لامیاسه (Lamiaceae) از جمله آویشن، پونه کوهی و مرزه به‌دست آمده است (۴).

کارواکرول دارای خواص بیولوژیکی مختلف از جمله خواص نظیر آنتی‌اکسیدانی (۵)، ضدالتهاب (۶)، ضدسرطان (۷)، ضدتب (۸) و ضد درد می‌باشد (۹).

سویه *اشریشیا کلی* O₁₅₇:H₇ مهم‌ترین سویه پاتوتایپ انتروهموراژیک *اشریشیا کلی* (Enterohemorrhagic *E. coli*) و پاتوژن با منشأ غذایی مشترک بین انسان و دام در سراسر جهان شناخته شده است (۱۰، ۱۱). عفونت این سویه در انسان می‌تواند به‌صورت کولیت هموراژیک (HC)، سندروم همولیتیک اورمیک (HUS) و پورپورای ترومبوتیک ترمبوسیتوپنیک (TPP) به‌صورت کشنده نیز بروز نماید (۱۲). در بیماران مبتلا به همولیتیک اورمیک مصرف آنتی‌بیوتیک به‌طور کلی محدود است زیرا سلول‌های باکتریایی توسط آنتی‌بیوتیک لیز می‌شوند و مقدار زیادی توکسین مشابه شیگا (Shiga-like Toxin) را آزاد می‌کنند (۱۳).

بیماری‌های یاد شده می‌تواند با بروز ناگهانی، تمام گروه‌های سنی را درگیر کند. اما بیشتر قشرهای آسیب‌پذیر جامعه (کودکان یا سالمندان) در معرض بیشترین خطر ابتلا به عفونت حاد قرار دارند که آن را به یک موضوع مهم در سلامت جامعه و نیز در صنایع غذایی و کشاورزی تبدیل کرده است (۱۴). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر جهت درمان و کنترل بیماری‌های ناشی از این سویه در انسان و حیوانات بهترین اقدام محسوب می‌گردد، اما با این حال مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر *اشریشیا کلی* O₁₅₇:H₇ گزارش گردیده است (۱۵).

امروزه، با تمایل بشر به محصولات ارگانیک اهمیت شناخت علمی این مواد دوچندان شده است، فعالیت‌های ضدباکتریایی هم‌افزایی ترکیبات مختلف گیاهی در حضور آنتی‌بیوتیک‌ها توسط محققین گزارش شده است (۱۶، ۱۷).

مطالعات گذشته بیانگر اثر ضدباکتریایی و ضدیوفیلی کارواکرول می‌باشد (۱۸، ۱۹). همچنین گزارش شده است که کارواکرول حداقل سمیت را روی سلول‌های انسانی اعمال می‌کند (۲۰).

در گذشته بررسی‌هایی در مورد اثر ضد میکروبی کارواکرول روی برخی باکتری‌های پاتوژن گزارش شده است (۲۱، ۲۲). با توجه به مطالب ذکر شده و به دلیل اهمیت بالای مسئله مقاومت آنتی‌بیوتیکی و مقابله با آن و خواص مثبت گزارش شده از ترکیبات مشتق شده از گیاهان، هدف از انجام مطالعه حاضر اثر هم‌افزایی کارواکرول و سفکسیم علیه باکتری *اشریشیا کلی* O₁₅₇:H₇ بود.

مواد و روش کار

سویه باکتریایی: باکتری مورد استفاده در مطالعه حاضر *اشریشیا کلی* انتروهموراژیک (ATCC ۳۵۲۱۸) بود.

تعیین خاصیت ضدباکتریایی کارواکرول و آنتی‌بیوتیک سفکسیم (انتشار در آگار به کمک دیسک): جهت تعیین حساسیت *اشریشیا کلی* O₁₅₇:H₇ از (روش کربی بائر و طبق دستورالعمل آزمایشگاهی و کلینیکی CLSI) استفاده شد. سویه مذکور پس از تعیین هویت نهایی توسط آزمایش‌های بیوشیمیایی به روش انتشار در آگار توسط دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (پادتن طب، ایران) تعیین حساسیت دارویی گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک تجاری سفکسیم (۵ میکروگرم) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) که قبلاً آماده شده، قرار داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری انجام گرفت. پس از ۲۴ ساعت هاله عدم رشد مشاهده گردید، قطر آن اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر اعلام شد (CLSI ۲۰۱۹).

برای ارزیابی خاصیت ضد میکروبی مواد مؤثره کارواکرول (Sigma – Aldrich) از روش انتشار در آگار با استفاده از اندازه‌گیری هاله عدم رشد، استفاده شد. ابتدا سویه *اشریشیا کلی* O₁₅₇:H₇ در سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند تهیه و سپس دیسک‌های بلانک استریل به ۲۰ میکرولیتر مواد مؤثره کارواکرول که حاوی محلول ۱ درصد دی‌متیل سولفو کساید (DMSO) به‌عنوان حلال بود با رقت (۱۰۰۰)،

۵۰۰، ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) آغشته گردید و پس از جذب آن توسط دیسک‌ها، با پنس استریل بر روی محیط‌های کشت شده که از قبل آماده شده بود، قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد ایجاد شده، که ناشی از ممانعت رشد باکتری توسط ماده آنتی‌باکتریال بود، اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر اعلام گردید، تمام آزمون‌ها جهت تأیید آزمایش، به صورت سه بار تکرار انجام شد (۲۳).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC): در مطالعه حاضر حداقل غلظت مهارکنندگی علیه اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ با استفاده از روش میکرودايلوشن براث با ۳ بار تکرار انجام شد. در این روش به هر کدام از چاهک‌های ردیف یک تا هشت پلیت ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت TSB (Trypticas soya Broth) (مرک، آلمان) اضافه گردید. سپس به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی از کارواکرول (۳/۹۰-۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و آنتی‌بیوتیک سفکسیم (۴-۱۰۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) تهیه شد و به محیط کشت TSB براث اضافه شد و سریال رقت تا آخرین چاهک تهیه شد. در چاهک شماره ۱۲ (کنترل مثبت) فقط محیط کشت باکتری اضافه گردید. در این مرحله ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده باکتری با غلظت نهایی معادل نیم مک فارلند به صورت جداگانه به تمام چاهک‌ها به جز چاهک شماره ۱۱ (کنترل منفی) هر ردیف اضافه گردید. در مرحله بعد پلیت‌ها روی شیکر اوربیتال قرار گرفت تا مخلوط یکنواخت گردد. در آخر میکروپلیت در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و بعد از اتمام انکوباسیون کدورت یا عدم کدورت چاهک‌ها توسط جذب نوری توسط الایزا ریدر (USA, Fax ۲۱۰۰Star) در ساعت صفر و با طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت گردید. کمترین غلظتی که کدورتی مشاهده نشود بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر به عنوان (MIC) در نظر گرفته شد. به منظور اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از چاهک‌های فاقد کدورت (غلظت‌های MIC و بالاتر) که رشدی در آن صورت نگرفته بود، مقدار ۱۰ میکرولیتر در شرایط کاملاً استریل و زیر هود میکروبی برداشته و بر روی محیط ژلوز خوندار (مرک، آلمان) کشت داده شد، پس از گذشت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با مشاهده اولین غلظتی که در آن باکتری رشد نکرده بود حداقل غلظت کشندگی (MBC) آنتی‌باکتریال، نیز تعیین گردید (۲۴).

ارزیابی اثر هم‌افزایی کارواکرول و آنتی‌بیوتیک سفکسیم و تعیین شاخص غلظت مهارکنندگی سهمی (FICI): به منظور ارزیابی توأم اثر ضد میکروبی کارواکرول در ترکیب با آنتی‌بیوتیک سفکسیم بر اساس غلظت مهارکنندگی سهمی و از روش مرسوم به تیتراسیون چکریورد استفاده شد. در واقع غلظت مهارتی مشترک کسری از غلظت ماده مهارکننده در حال ترکیب، نسبت به وقتی که همان ماده به تنهایی استفاده می‌شود. در این روش به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از ترکیبات ضد میکروبی افزوده شد. در هر ردیف افقی، آنتی‌بیوتیک سفکسیم از غلظت‌های ۲۵۶ تا غلظت ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و ردیف عمودی در هر ستون از بالا به پایین از غلظت‌های ۵۰۰ تا غلظت ۷/۸۱ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس کارواکرول اضافه شد. در نهایت در میکروپلیت مورد بررسی هر کدام از غلظت‌های کارواکرول در ترکیب با تمام غلظت‌های آنتی‌بیوتیک بود. در ادامه به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با غلظت نهایی معادل نیم مک فارلند افزوده شد. هر پلیت حاوی کنترل مثبت و منفی بود. چاهک کنترل مثبت حاوی سوسپانسیون باکتری و محیط کشت و چاهک کنترل منفی حاوی محیط کشت بدون باکتری بود. پس از آن که محتویات هر چاهک به خوبی مخلوط شد، مطابق بخش قبل میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار قرار داده و گرم‌خانه‌گذاری شد. برای تعیین میزان غلظت مهارتی کسری (FIC) برای ترکیب مواد بر اساس معادلات (۱-۳) استفاده شد.

$$FIC_{AB} = MIC_{AB} CoM / MIC_{AB} A \quad \text{معادله ۱}$$

$$FIC_{Eos} = MIC_{Eos} CoM / MIC A \quad \text{معادله ۲}$$

$$FIC_{index} = FIC_{AB} + FIC_{Eos} \quad \text{معادله ۳}$$

FIC_{AB} - غلظت مهارتی کسری سفکسیم

$MIC_{AB} CoM$ - حداقل غلظت مهارکنندگی ترکیبی سفکسیم

$MIC_{AB} A$ - حداقل غلظت مهارکنندگی سفکسیم به تنهایی

FIC_{Eos} - غلظت مهاری کسری کارواکرول

MIC_{Eos} COM - حداقل غلظت مهارکنندگی ترکیبی کارواکرول

MIC_{Eos} A - حداقل غلظت مهارکنندگی کارواکرول به تنهایی

از مجموع FIC هر عامل ضد میکروبی، شاخص غلظت مهارکننده سهمی (FICI) به دست آمد. پس از محاسبه FICI تفسیر نتایج با استفاده از دستورالعمل کمیته اروپایی آزمون سنجش حساسیت ضد میکروبی (EUCAST) صورت پذیرفت. بر این اساس چنانچه FICI کوچکتر یا مساوی ۰/۵ باشد، برهمکنش از نوع هم افزایی، بزرگتر از ۰/۵ تا ۱ از نوع افزایشی بزرگتر از ۱ تا کوچکتر از ۲ از نوع عدم تأثیر و مساوی یا بزرگتر از ۲ از نوع رقابتی می باشد (۲۶، ۲۵).

نتایج

انتشار در آگار به کمک دیسک: یافته‌های حاصل از تست آنتی بیوگرام سویه استاندارد/شریشیا کلی $O_{157} : H_7$ نسبت به آنتی بیوتیک سفکسیم با میانگین هاله مهار رشد ۲۳ میلی متر نشان دهنده حساسیت سویه مذکور بود.

همچنین بررسی خاصیت ضدباکتریایی کارواکرول نشان داد که سویه مذکور حساس بوده و هیچ گونه مقاومتی مشاهده نگردید. میانگین هاله عدم رشد در مجاورت رقت‌های کارواکرول (۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) به ترتیب برابر ۳۸، ۳۰ و ۱۸ میلی متر بود.

تعیین MIC و MBC: میزان حداقل مهارکنندگی از رشد (MIC) به دست آمده برای کارواکرول و سفکسیم به ترتیب برای /شریشیا کلی $O_{157} : H_7$ ، ۲۵۰ و ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر و حداقل اثر کشندگی (MBC) ۲۵۰ و ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر گزارش شد.

اثر هم افزایی کارواکرول و آنتی بیوتیک سفکسیم و تعیین شاخص غلظت مهارکنندگی سهمی (FICI): نتایج برهمکنش کارواکرول و آنتی بیوتیک سفکسیم به روش چکربرد علیه ایزوله /شریشیا کلی $O_{157} : H_7$ نشان دهنده اثر هم افزایی این دو عامل ضدباکتریایی بود. کارواکرول و آنتی بیوتیک سفکسیم در نقطه سینرژیستی به ترتیب دارای MIC با غلظت‌های ۶۲/۵ و ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر بودند و میزان FIC در ترکیب مذکور به ترتیب برای آنتی بیوتیک و کارواکرول ۰/۲۵ و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد و مقدار FICI برابر با ۰/۵ محاسبه شد.

بحث

امروزه به خوبی نقش و اهمیت استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات آن‌ها جهت درمان بیماری‌های مختلف توسط بشر درک شده است. استفاده از منابع نامحدود و متنوع گیاهی توسط انسان در طول قرن‌های متمادی سابقه‌ای بس طولانی داشته و با توجه به شناخت و تجربه‌ای که در این سالیان بشر از کاربرد گیاهان کسب کرده است به تدریج روش‌های نوینی را برای استفاده از گیاهان و ترکیبات آن‌ها توسعه داده است. در حال حاضر علاقمندی جهت استفاده از درمان طبیعی به وسیله گیاهان دارویی با کمترین اثر جانبی در حال افزایش است (۲۷).

از سوی دیگر به دلیل افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها و بار اقتصادی مقاومت باکتریایی، به علاوه کاهش فعالیت آنتی بیوتیک‌ها تحت تأثیر pH، غیرفعال سازی آنزیمی و حلالیت و ثبات ضعیف داروها، عوارض جانبی نامطلوب و عوامل دیگر همچون عدم توسعه و تولید داروهای ضد میکروبی جدید نیاز حیاتی به طراحی جدید آنتی بیوتیک‌ها با مکانیسم‌های چندگانه وجود دارد (۲۸).

در گذشته، گیاهان دارویی و ترکیبات آن‌ها مانند کارواکرول در طب سنتی برای اهداف مختلفی در سراسر جهان مورد استفاده قرار گرفته است. علاوه بر این به دلیل خواص بیولوژیکی متفاوت به ویژه خواص ضد میکروبی آن‌ها، می توان از آن‌ها برای بهبود کیفیت غذا و افزایش ماندگاری آن‌ها استفاده کرد (۲۹، ۳۰).

کارواکرول یک مشتق فنولی مونوترپنوئید است که در برخی گیاهان از جمله پونه کوهی و آویشن یافت می شود. با توجه به خواص بیولوژیکی مختلف کارواکرول، مطالعات زیادی بر روی این ترکیب برای ارزیابی قابلیت استفاده آن در پزشکی انجام شده است (۳۱).

در مطالعه حاضر، اثرات ضدباکتریایی کارواکرول و سفکسیم را به صورت جداگانه و در ترکیب با هم در برابر عامل بیماریزا با منشأ غذایی و ژئونوتیک / اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ از طریق دیسک دیفیوژن، تعیین میزان MIC، MBC و FIC، بررسی شد.

میزان حداقل مهارکنندگی از رشد (MIC) به دست آمده برای کارواکرول و سفکسیم به ترتیب برای اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ ، ۲۵۰ و ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر و حداقل اثر کشندگی (MBC) ۲۵۰ و ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر بود. همان طور که در مورد روش کیفی دیسک دیفیوژن نیز بیان شد، تأثیرگذاری کارواکرول علیه اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ بیشتر از سفکسیم دیده شد. میزان حداقل غلظت مهارتی کسری (FIC) نیز برای تأیید اثر هم افزایی کارواکرول و سفکسیم علیه اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ به ترتیب $0/25 + 0/25$ میکروگرم در میلی لیتر و FICI برابر با $0/5$ دیده شد، کارواکرول و آنتی بیوتیک سفکسیم در نقطه سینرژیستی به ترتیب دارای MIC با غلظت های $62/5$ و 32 میکروگرم در میلی لیتر بودند. در این آزمون نیز اثر گذاری مواد آنتی باکتریال بر روی سویه مذکور به وضوح مشخص شد.

مقدار MIC و MBC کارواکرول در مطالعه حاضر در برابر اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر بود. این نتیجه کاملاً با آنچه در مطالعه Magi و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مورد خواص ضدباکتریایی کارواکرول در برابر استرپتوکوک های گروه A گزارش شده بود مطابقت دارد. MIC و MBC گزارش شده به ترتیب ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر بود (۳۲).

Sokovic و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر ضدباکتریایی اسانس ها از ده گیاه مختلف که شامل کارواکرول، تیمول و آلفاپینن بودند را در برابر باکتری های اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ ، باسیلوس سوبتیلیس، سودوموناس، پروتئوس میرابلیس با روش دیسک دیفیوژن و میکروداپلوشن برآش بررسی کردند. در نتایج این مطالعه کارواکرول (MIC ۰/۵، MBC ۱/۵ میکروگرم در میلی لیتر) بالاترین فعالیت ضدباکتریایی را داشت و همچنین اسانس آویشن بسیار قوی تر از آنتی بیوتیک استرپتومایسین در برابر سویه های ذکر شده گزارش گردید. تأثیر کارواکرول بر باکتری اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ مشاهده شد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (۳۳).

همچنین در مطالعات انجام شده توسط Ben Arfa و همکاران در سال ۲۰۰۶ خواص ضد باکتریایی دو نوع مولکول مشتق از کارواکرول (کارواکرول متیل اتر و کارواکریل استات) در برابر برخی از باکتری های گرم مثبت، گرم منفی و مخمر شامل *Escherichia coli*، *Pseudomonas fluorescens*، *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* گزارش شد (۳۴).

BURT و همکاران در سال ۲۰۰۵ افزایش فعالیت مواد مؤثره گیاهی شامل کارواکرول، تیمول، y-terpinene و P-Cymene در برابر اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ را مورد ارزیابی قرار دادند که از چهار اسانس گیاهی فقط کارواکرول و تیمول در برابر این سویه تأثیر گذار بودند، MIC تیمول و کارواکرول ۱/۲ میکرومول در لیتر گزارش شد (۲۵).

در مطالعه Helander و همکاران در سال ۱۹۹۸ که اثر اسانس گیاهان بر روی باکتری گرم منفی با استفاده از روش بیولومینسنس بود؛ کارواکرول و تیمول در برابر اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ اثر بازدارندگی نشان داد و باعث از بین رفتن لیپوپلی ساکارید و اختلال در غشاء خارجی این باکتری گردید (۲۶).

در مطالعه ای مشابه Niluni.M. Wijesundara و همکاران در سال ۲۰۲۱ اثر ضد میکروبی کارواکرول را به صورت تنها و همچنین به صورت ترکیب با چهار آنتی بیوتیک در برابر باکتری / استرپتوکوکوس پیوژنز بررسی کردند، MIC و MBC گزارش شده به ترتیب ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر بود که با نتایج آزمایشگاهی حاصل از مطالعه حاضر همخوانی دارد و کارواکرول همچنین اثر هم افزایی با کلیندامایسین و پنی سیلین نشان داد و گزارش گردید که کارواکرول می تواند به عنوان یک اسانس گیاهی بی خطر و فوق العاده قوی با مکانیسم اثر بر غشاء سلولی معرفی گردد (۸).

نتایج مطالعات ذکر شده و همچنین مطالعه حاضر نشان داد که کارواکرول و مشتقات آن دارای خواص ضد میکروبی در برابر باکتری ها و قارچ های مختلف می باشند. مطالعات متعددی در مورد مکانیسم عمل این ترکیب وجود دارد که اکثر آن ها نشان می دهد هدف اصلی کارواکرول غشاء سیتوپلاسمی باکتری ها می باشد (۸، ۲۲). کارواکرول می تواند به ساختار غشاء سلولی نفوذ کرده و قادر به تجزیه غشاء خارجی سلول های میکروبی می باشد. این آسیب غشائی توسط کارواکرول می تواند بر هومئوستاز pH و تعادل یون های معدنی تأثیر بگذارد و متعاقباً منجر به القای

فعالیت ضدباکتریایی این ماده شود (۱۸). علاوه بر این، از آنجا که غشاء سیتوپلاسمی نقش حیاتی در زنده ماندن سلول‌های پروکاریوتی دارد این تخریب غشائی می‌تواند باعث مرگ سلولی شود (۱۶، ۲۷).

مطالعات گذشته ذکر شده نشان داد که ترکیبات فنلی هم‌چون کارواکرول و تیمول، مهم‌ترین ترکیبات ضد میکروبی به‌شمار می‌روند. این اختلاف در میزان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد مطالعات مختلف، می‌تواند تفاوت در میزان ترکیبات ضدباکتریایی و روش استخراج عصاره اساس باشد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر نیز می‌توان بیان کرد که کارواکرول اثر ضد میکروبی علیه باکتری مورد آزمون را نشان داد.

مطالعات اخیر نشان داد که باکتری /شیریشیا کلی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج مانند سفکسیم مقاوم است. در مطالعه‌ای که توسط Ayatollahi و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی /شیریشیا کلی جدا شده از کودکان در بیمارستان شهید صدوقی یزد انجام شد، میزان مقاومت بالایی برای سفکسیم (۵۷/۹ درصد) گزارش گردید (۲۸). در مطالعه دیگری در ایران که بر روی /شیریشیا کلی جدا شده از عفونت‌های مجاری ادراری (UTI) توسط Pourakbari و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شد، مقاومت به سفکسیم (۵۰ درصد) گزارش گردید (۲۹). با توجه به نتایج این مطالعات و سایر مطالعات مشابه (۱۳) می‌توان نتیجه گرفت که سویه‌های /شیریشیا کلی به آنتی‌بیوتیک‌های رایج از جمله سفکسیم مقاوم می‌باشند.

با توجه به این‌که اثر هم‌افزایی کارواکرول و سفکسیم در برابر باکتری /شیریشیا کلی $O_{157} : H_7$ هرگز مورد بررسی قرار نگرفته است، در قسمت دیگر مطالعه حاضر اثر هم‌افزایی کارواکرول و آنتی‌بیوتیک سفکسیم علیه /شیریشیا کلی $O_{157} : H_7$ مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر کارواکرول در ترکیب با سفکسیم هم‌افزایی علیه /شیریشیا کلی $O_{157} : H_7$ نشان داد.

تا کنون مقالات متعددی در زمینه فعالیت‌های ضدباکتریایی هم‌افزایی ترکیبات مختلف گیاهی در حضور آنتی‌بیوتیک‌ها توسط محققین گزارش شده است (۳۰-۳۲).

اثرات هم‌افزایی اسید سینامیک، سینامالدئید، اوژنول، تیمول با چندین آنتی‌بیوتیک قبلاً گزارش شده است (۸). ترکیب این مواد شیمیایی گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند منجر به کاهش حداقل دوز مؤثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد نیاز برای درمان و در نتیجه کاهش عوارض جانبی داروها شود (۳۳).

علاوه بر این، توانایی ترکیبات مشتق شده از گیاهان در تغییر یا مسدود کردن مکانیسم مقاومت می‌باشد، به طوری که باکتری به آنتی‌بیوتیک حساس می‌شود یا آنتی‌بیوتیک در صورت استفاده در غلظت‌های پایین فعال می‌شود (۳۰-۳۲).

اثر هم‌افزایی کارواکرول نه تنها همراه با آنتی‌بیوتیک‌ها بلکه همراه با سایر ترکیبات بیولوژیکی مانند تیمول، اوژنول، نیسین و اسیدهای آلی مانند اسید استیک، اسید لاکتیک و اسید سیتریک گزارش شده است (۸).

مطالعاتی در مورد اثرات هم‌افزایی کارواکرول با آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد. مطالعه دیگری مشابه مطالعه حاضر نشان داد که کارواکرول به‌طور قابل توجهی MIC اریترومایسین را در برابر استرپتوکوک‌های گروه A مقاوم به اریترومایسین کاهش می‌دهد و همچنین کارواکرول اثر هم‌افزایی با اریترومایسین نشان داد. کارواکرول به تنهایی و همچنین در ترکیب با اریترومایسین می‌تواند علیه سویه‌های مقاوم اثر بخش باشد (۲۲).

در مطالعه‌ای که توسط Pol و همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام شد ترکیب کارواکرول و نیسین در برابر دو باکتری گرم مثبت *Listeria monocytogenes* و *Bacillus cereus* مورد ارزیابی قرار گرفت. محققین بیان کردند که کارواکرول ممکن است با افزایش تعداد یا اندازه منافذ غشاء سیتوپلاسمی که توسط نیسین ایجاد شده و همچنین طول عمر منافذ باعث افزایش فعالیت ضدباکتری نیسین شود (۳۴).

در مطالعه Sharifi و همکاران در سال ۲۰۱۸ اثر مهارکنندگی رشد اسانس‌های گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین بررسی شد، نتایج فنوتیپی نشان داد که اسانس گیاهی آویشن، مرزه و پونه با ترکیبات مورد مطالعه کاملاً اثر سینرژیستی دارند و نشان داد که اسانس‌های گیاهی قادرند میزان MIC آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین علیه سویه‌های /ستافیلوکوکوس /اورئوس را به‌صورت معنی‌داری کاهش دهند (۱۸).

در مطالعه حاضر اثر مهارکنندگی کارواکرول با آنتی‌بیوتیک سفکسیم علیه باکتری *E. coli* O₁₅₇:H₇ بررسی شد و بر اساس شاخص FIC مشخص گردید ترکیب کارواکرول و آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه علیه سوبه مذکور از نوع سینرژیستی می‌باشد. بنابراین کارواکرول را می‌توان به‌عنوان یک داروی ضد باکتریایی با منشأ طبیعی معرفی کرد. در این مطالعه هم‌افزایی کارواکرول با آنتی‌بیوتیک سفکسیم گزارش شد. اما برای یافتن این مکانیسم عمل به مطالعات بیشتری نیاز است.

نتیجه‌گیری نهایی: برای مطالعات آتی تأثیر گیاهان بومی ایران و ترکیبات تشکیل‌دهنده آن‌ها به‌صورت مجزا و توأم با دیگر ترکیبات ضد میکروبی همچون اسانس‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، نانوذرات و... علیه باکتری‌های پاتوژن و همچنین بررسی اثر گیاهان بومی ایران و اجزاء تشکیل‌دهنده آن‌ها روی تشکیل بیوفیلم/اشریشیا کلی O₁₅₇:H₇ با استفاده از تکنیک‌های وابسته به کشت سلول، کشت بافت و همچنین مدل حیوان آزمایشگاهی توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران برای تأمین اعتبار مورد نیاز مطالعه حاضر و همچنین از همکاری دکتر مهدی سلطانی، دکتر علیرضا خسروی و دکتر عقیل شریف‌زاده به پاس محبت و مساعدت‌های فراوانی که در انجام مراحل مختلف این مطالعه صورت گرفته است تشکر و قدردانی کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Mobarki N, Almerabi B, Hattan A. Antibiotic resistance crisis. Int J Med Dev Ctries. 2019;40(4):561-4. doi: 10.24911/IJMD.51-1549060699
2. Lee JH, Kim YG, Lee J. Carvacrol-rich oregano oil and thymol-rich thyme red oil inhibit biofilm formation and the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. J Appl Microbiol. 2017;123(6):1420-8. doi: 10.1111/jam.13602 PMID: 28980415
3. Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. Evid Based Complementary Altern Med. 2016; ID 3012462,21. doi: 10.1155/2016/3012462 PMID: 28090211
4. Vinciguerra V, Rojas F, Tedesco V, Giusiano G, Angiolella L. Chemical characterization and antifungal activity of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* essential oils and carvacrol against *Malassezia furfur*. Natural Product Res. 2019;33(22):3273-7. doi: 10.1080/14786419.2018.1468325 PMID: 29726703
5. Baranauskaitė J, Kubiliene A, Marksa M, Petrikaite V, Vitkevičius K, Baranauskas A, Bernatoniene J. The influence of different oregano species on the antioxidant activity determined using HPLC postcolumn DPPH method and anticancer activity of carvacrol and rosmarinic acid. Biomed Res Int. 2017; ID1681392. doi: 10.1155/2017/1681392 PMID: 29181386
6. Barnwal P, Vafa A, Afzal S, Shahid A, Hasan S, Alpashree, Sultana S. Benzo (a) pyrene induces lung toxicity and inflammation in mice: Prevention by carvacrol. Hum Exp Toxicol. 2018;37(7):752-61. doi: 10.1177/0960327117735572 PMID: 29019276
7. Singh P, Prakash O, Chandra M, Patil AR, Pant A, Isidorov VA. Reinvestigation of essential oil of *Rabdosia melissoides*: Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, antifungal and antibacterial activities. J Essent Oil-Bear Plants. 2016;19(8):1859-72. doi: 10.1080/0972060X.2016.1231597
8. Wijesundara NM, Lee SF, Cheng Z, Davidson R, Rupasinghe HV. Carvacrol exhibits rapid bactericidal activity against *Streptococcus pyogenes* through cell membrane damage. Sci Rep. 2021;11(1):1-14. doi: 10.1038/s41598-020-79713-0 PMID: 33452275
9. Kim Y-G, Lee J-H, Gwon G, Kim S-I, Park JG, Lee J. Essential oils and eugenols inhibit biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇. Sci Rep. 2016;6(1):1-11. doi: 10.1038/srep36377 PMID: 27808174
10. Oloketuyi SF, Khan F. Strategies for biofilm inhibition and virulence attenuation of foodborne pathogen-*Escherichia coli* O₁₅₇:H₇. Curr Microbiol. 2017;74(12):1477-89. doi: 10.1007/s00284-017-1314-y PMID: 28744570

11. Fathi J, Ebrahimi F, Nazarian S, Hajizade A, Malekzadegan Y, Abdi A. Production of egg yolk antibody (IgY) against shiga-like toxin (stx) and evaluation of its prophylaxis potency in mice. *Microb Pathog*. 2020;145(1):104199. doi: [10.1016/j.micpath.2020.104199](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104199) PMID: [32320733](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32320733/)
12. Duffy G. Verocytotoxic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *J Appl Microbiol*. 2003;94:94S-103S. doi: [10.1046/j.1365-2672.94.s1.11.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.94.s1.11.x) PMID: [12675941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12675941/)
13. Galland JC, Hyatt DR, Crupper SS, Acheson DW. Prevalence, antibiotic susceptibility, and diversity of *Escherichia coli* O₁₅₇: H₇ isolates from a longitudinal study of beef cattle feedlots. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(4):1619-27. doi: [10.1128/AEM.67.4.1619-1627.2001](https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1619-1627.2001) PMID: [11282614](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11282614/)
14. Silva DM, Costa PA, Ribon AO, Purgato GA, Gaspar D-M, Diaz MA. Plant extracts display synergism with different classes of antibiotics. *An Acad Bras Cienc*. 2019;91(2):e20180117. doi: [10.1590/0001-3765201920180117](https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180117) PMID: [31090789](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31090789/)
15. Trevisan DAC, Silva AFd, Negri M, Abreu BAd, Machinski M, Patussi EV, Campanerut- Sá PAZ, Mikcha JMG. Antibacterial and antibiofilm activity of carvacrol against *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Braz J Pharm Sci*. 2018;54(1):e17229. doi: [10.1590/s2175-97902018000117229](https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000117229)
16. Khan I, Bahuguna A, Kumar P, Bajpai VK, Kang SC. Antimicrobial potential of carvacrol against uropathogenic *Escherichia coli* via membrane disruption, depolarization, and reactive oxygen species generation. *Front Microbiol*. 2017;8:2421. doi: [10.3389/fmicb.2017.02421](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02421) PMID: [29270161](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29270161/)
17. Khampiang T, Wnek GE, Supaphol P. Electrospun DOXY-h loaded-poly (acrylic acid) nanofiber mats: in vitro drug release and antibacterial properties investigation. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2014;25(12):1292-305. doi: [10.1080/09205063.2014.929431](https://doi.org/10.1080/09205063.2014.929431) PMID: [24945329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24945329/)
18. Sharifi A, Ahmadi A, Mohammadzadeh A. *Streptococcus pneumoniae* quorum sensing and biofilm formation are affected by *Thymus daenensis*, *Satureja hortensis*, and *Origanum vulgare* essential oils. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2018;65(3):345-59. doi: [10.1556/030.65.2018.013](https://doi.org/10.1556/030.65.2018.013) PMID: [29471691](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29471691/)
19. Azizi-Lalabadi M, Ehsani A, Divband B, Alizadeh-Sani M. Antimicrobial activity of Titanium dioxide and Zinc oxide nanoparticles supported in 4A zeolite and evaluation the morphological characteristic. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-10. doi: [10.1038/s41598-019-54025-0](https://doi.org/10.1038/s41598-019-54025-0) PMID: [31767932](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31767932/)
20. Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason Sonochem*. 2001;8(3):303-13. doi: [10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2) PMID: [11441615](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11441615/)
21. Percival SL, Hill KE, Williams DW, Hooper SJ, Thomas DW, Costerton JW. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen*. 2012;20(5):647-57. doi: [10.1111/j.1524-475X.2012.00836.x](https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2012.00836.x) PMID: [22985037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22985037/)
22. 1. Magi G, Marini E, Facinelli B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A *Streptococci*. *Front Microbiol*. 2015;6:165. doi: [10.3389/fmicb.2015.00165](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00165) PMID: [25784902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25784902/)
23. Soković M, Glamočlija J, Marin PD, Brkić D, Van Griensven LJ. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*. 2010;15(11):7532-46. doi: [10.3390/molecules15117532](https://doi.org/10.3390/molecules15117532) PMID: [21030907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21030907/)
24. Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett Appl Microbiol*. 2006;43(2):149-54. doi: [10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x) PMID: [16869897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16869897/)
25. Burt SA, Vlieland R, Haagsman HP, Veldhuizen EJ. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O₁₅₇: H₇ by addition of food stabilizers. *J Food Prot*. 2005;68(5):919-26. doi: [10.4315/0362-028X-68.5.919](https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.5.919) PMID: [15895722](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15895722/)
26. Helander IM, Alakomi H-L, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, Wright Av. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem*. 1998;46(9):3590-5. doi: [10.1021/jf980154m](https://doi.org/10.1021/jf980154m)
27. Wang L-H, Wang M-S, Zeng X-A, Zhang Z-H, Gong D-M, Huang Y-B. Membrane destruction and DNA binding of *Staphylococcus aureus* cells induced by carvacrol and its combined effect with a pulsed electric field. *J Agric Food Chem*. 2016;64(32):6355-63. doi: [10.1021/acs.jafc.6b02507](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02507) PMID: [27420472](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27420472/)
28. Ayatollahi J, Shahcheraghi S, Akhondi R, Soluti S. Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from children in Shahid Sadoughi Hospital of Yazd. Iran *J Pediatr Hematol*. 2013;3(2):78. PMID: [24575257](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24575257/)

29. Pourakbari B, Ferdosian F, Mahmoudi S, Teymuri M, Sabouni F, Heydari H, Haghi Ashtiani MT, Mamishi S. Increase resistant rates and ESBL production between *E. coli* isolates causing urinary tract infection in young patients from Iran. *Braz J Microbiol.* 2012;43:766-9. doi: [10.1590/S1517-83822012000200041](https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200041) PMID: 24031888
30. Li S, Mou Q, Xu X, Qi S, Leung PH. Synergistic antibacterial activity between penicillanols and antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *R Soc Open Sci.* 2018;5(5):172466. doi: [10.1098/rsos.172466](https://doi.org/10.1098/rsos.172466) PMID: 29892433
31. Mgbeahuruike EE, Stålnacke M, Vuorela H, Holm Y. Antimicrobial and synergistic effects of commercial piperine and piperlongumine in combination with conventional antimicrobials. *Antibiotics.* 2019;8(2):55. doi: [10.3390/antibiotics8020055](https://doi.org/10.3390/antibiotics8020055) PMID: 31060239
32. Sanhueza L, Melo R, Montero R, Maisey K, Mendoza L, Wilkens M. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PloS one.* 2017;12(2):e0172273. doi: [10.1371/journal.pone.0172273](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172273) PMID: 28235054
33. Ceysens P-J, Van Bambeke F, Mattheus W, Bertrand S, Fux F, Van Bossuyt E, Damée S, Nyssen HJ, Craeye SD, Verhaegen J. Molecular analysis of rising fluoroquinolone resistance in Belgian non-invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates (1995-2014). *PloS one.* 2016;11(5):e0154816. doi: [10.1371/journal.pone.0154816](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154816) PMID: 27227336
34. Pol I, Smid E. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol.* 1999;29(3):166-70. doi: [10.1046/j.1365-2672.1999.00606.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00606.x) PMID: 10530038

In the name of God

Veterinary Research Journal is a journal in Persian with both Persian and English abstracts, published at the Faculty of Veterinary Medicine, University Of Tehran. A quarterly journal, it is published four times a year with articles that have been reviewed accurately and are uploaded on the journal's website, observing all publication ethics issues, so as to be available for the public free of charge.

1. Topic Area of the Articles:

The journal accepts, reviews, and publishes scientific-research articles, case studies, clinical reports, review articles, and short research articles on veterinary science, including epidemiology and public health, parasitology and parasitic diseases, descriptive and clinical pathology, feed health of animals, birds, and fish, nutrients' health, the health and diseases of fish, birds, big or small livestock, diagnostic imaging techniques, surgery, anesthesiology, locomotor organs' diseases, basic sciences (biochemistry, anatomy, embryology, histology, and physiology), pharmacology and toxicology, midwifery and reproduction diseases, microbiology and immunology, hematology and clinical biochemistry, and other animal science areas.

2. Process of Accepting the Articles

• **Submitting the Articles:** The articles should be submitted online via the website of electronic journals at the University of Tehran (<http://jvr.ut.ac.ir>). Authors should avoid sending their articles to the postal and electronic address of the journal.

• All correspondence concerning any change in the text will be sent to the corresponding author only.

• **Reviewing the Articles:** In order to be in line with international publication standards, Veterinary Research Journal is based on peer review and free access. As a result, the journal has selected double-blind procedure by three reviewers. Hence neither the author(s) nor the reviewers are aware of each other's' identity.

• The interval between submitting the article and final decision might last about two to five months.

• Considering the fact that all articles in Journal of Veterinary Research will be available to the public free of charge, the corresponding authors are required to Pay IRR 4,800,000 for Original articles and Review articles in the amount of 2,400,000 Rials for Short research articles, Case studies and Clinical reports to the journal's account after getting accepted in order to cover the expenses of the articles' publication.

3. Instructions for Editing the Articles

• The Articles should be typed in Office Word, in A4 paper size, with a margin of 2 cm on both sides and line spacing of 1.5 cm. The Persian texts should be in B Nazanin, size 14 and the English ones in Times New Roman, size 12. The tables and figure (including the images, pictures, etc.) should be minimized (at most eight tables/figures).

3.1. Research Articles: Research articles should not exceed 15 pages (the reference included). They should include the **Title Page, Abstract, Introduction, Methodology, Results, Discussion, and Reference.**

3.1.1. Title Page: This page includes the following:

• **Title:** The articles' titles should be short, clear, and indicative of the article's contents. In addition, each article should have a **Short Running Title**. The short running title must not exceed 40 characters.

• **Author's Name:** This must be in both Persian and English. The authors' workplace has to include the name of the department, faculty, university, city, and country (both in Persian and English). It is necessary to add the authors' phone number, mobile number, fax number, and email for further correspondence.

3.1.2. Abstract: The abstract is a brief and comprehensive description of the article's contents. This section must indicate the works done as well as the results obtained by itself so that the reader will not be forced to read the text for comprehension.

• Both Persian and English abstracts has to comply with the pattern, mentioned in Volume 75, Issue 1 (Year 2020-21) onwards. It should have **study background, objectives, methods, results, and conclusions.**

• The **Background, Objectives, Methods, Results, and Conclusions** should be present in the English Abstract as well.

• Both Persian and English abstracts must not exceed 300 words.

• The texts of Persian and English abstracts must be coincident.

• At the end of the abstract page, Persian and English keywords (5 keywords) should be written. If possible, it is better to have different keywords than the words, used in the article's title. The keywords are not recommended to be names of cities and countries.



- In case of using abbreviations in the abstract, on the first use the complete name, followed by the abbreviation in parentheses, should be given.

3.1.3. Introduction: This section presents the problem under research as well as the researcher's purpose for the research work or reporting it. Hence, the introduction should feature research background briefly along with their relation with the current article's topic. At the end, the motivation behind the conducted work has to be indicated as well. It is necessary to mention the goal of the current study at the end of the introduction.

3.1.4. Methodology: This section must name all the tools and devices, used specifically for the research, and the author should avoid mentioning general laboratory substances and devices. As for specific substances and devices, the author has to mention the name of the company, producing them, as well as the relevant city and country. The methodology should be presented in a way that it will be possible for other researchers to conduct it again. Briefly, it should indicate the way and the process of the conducted work. The author must avoid mentioning methodologies, previously published in other journals, and must suffice to mentioning the reference only. In case of statistical analysis, the used methods must be mentioned comprehensively, while referring to the valid reference. It is necessary to mention the sample size, number of independent reiterations of each test, and the number of reiterations within each test.

3.1.5. Results: This section includes the results obtained from a research work. The obtained data and the results must be presented in a logical and useful way to clarify the discussion and the conclusion. Therefore, it could be accompanied by tables, charts, and pictures. The author must be careful to use just one of these, for instance the chart or the table, and not both of them, in order to express a purpose. It is necessary not to give complete description of the tables in the text and only bring the important issues.

- All reference, used in the text, must be indicated in the article's index. For those texts, written by one author, use the author's family name in English like "*Smith, 2019*". In case there are two authors for a text, both of their names are written as above. For texts with more than two authors, the reference will be as "*Smith et al., 1997*" (The name must definitely be in English and the year should be definitely mentioned as Gregorian calendar years). If necessary, the reference number can be indicated at the end of each paragraph. Unpublished papers, congress, conferences, websites, theses, protocols, and SAS Speeches are not acceptable as reference.

- **Tables:** When presenting the tables, the author should be aware that the table lines are not removed, the tables are in Persian, and all cells are from Right to Left. The font for the article's Persian tables should be Nazanin B, Size 12. The numbers inside the tables should be in Persian too. The tables must not exceed one A4 page, and must be drawn in Portrait orientation. They have to be drawn in a way that in order to move from one cell to another, pressing the Tab button will move the cursor from right to left. In order to have a statistical comparison of the tables' numbers, superscript English letters must be used, appropriately described at the bottom of the table. The tables, themselves, ought to have brief and clear titles, numbered in accordance to their order within the article. The tables must be given in the end of the article's main file, and the authors should avoid putting them inside the article or in another file altogether.

- **Charts and Pictures:** They should be submitted in a separate file in JPEG format with a size of 8*6 and a resolution of 600 dpi. The numbers and the texts inside the pictures and charts have to be in English and completely clear. Numbers and texts inside pictures and charts with no quality must be rewritten in Photoshop. The figures and images are to be numbered underneath in the order they come in the text. The pictures and charts' titles need to be both in Persian and English. The titles should come at the end of the article's main file, after the reference, in order and, if possible they must be summarized and brief, though completely clear.

3.1.6. Discussion: The discussion section must be separate from the results. This section discusses and interprets the obtained results, elaborating and expanding them. Furthermore, the research outcome is discussed in comparison to other researchers' works. Generally, it mentions the cases that has helped solving the research problem, leading to a conclusion. In the ultimate part of discussion section, the final conclusion is clearly stated.

3.1.7. Acknowledgment: In this section, the author mentions the guidance and help of others and thanks them briefly. To send the contents of this section, the file for authors' identifications must be used and this section should not be in the main file.

3.1.8. Conflict of Interests: In this section, the author needs to mention all financial (including the benefit or the loss from research results) and non-financial connections (like governmental, individual, or occupational connections) that can affect the findings of the research one way or another. In case of no conflict of



interest, the following should be mentioned: “The authors faced no conflict of interest in this research.”

Article Responsibilities: The scientific and ethical responsibility of the article belongs to its author(s).

3.1.9 Reference: All reference used should be written in English. The reference list has to be typed in a separate page, the number of which comes after the discussion pages. The reference list should be specified in the order in which they are used in the text and as numbers in parentheses (VANCOUVER). As for Persian sources, their English translation must be given and at the end of the entry it should be added in parentheses: “In Persian”. Using thesis, congresses, conferences, protocols, websites, and SAS speeches are not acceptable in the reference. Half (50%) of the reference need to be new, being written from five years ago onward.

- As for journal name’s summary, the author could refer to the journal’s text or extract them in abbreviation from Pubmed or Web of Science. At the end of all reference with PMID and DOI, the online link (PMID and DOI) must be given, exactly as the following example:

Ghamsari SM, Dehghan MM, Raii Dahaghi M, Nowrouzian I. Clinical Evaluation of Two Surgical Treatment Methods for Exuberant Granulation Tissue of Lower Limb Open Wounds in Horses. *J Vet Res.* 2020; 73(1): 1-9. doi: [10.4103/2153-3539.120729](https://doi.org/10.4103/2153-3539.120729) PMID: [24392243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24392243/)

- As for books, the authors’ names, publication year, subject, the edition number, the place and name of the publisher, and the pages must be mentioned (like the following example):

Petrie A, Waston P. *Statistic for Veterinary and Animal Sciences.* 1st ed. Blackwell Sciences Ltd. London, UK; 2019.

- In case of referring a chapter of a book, the author should write like the below:

Bergston C. Infectious diseases of the digits. In: Greenough, P.R., Weaver, A.D. editors. 3rd ed. *Lameness in Cattle.* WB. Saunders Company. Philadelphia, USA. 2020. p. 89-99.

4.2. Case Studies and Clinical Reports: These reports deal with rare and educative clinical and laboratory cases and should not exceed 4 pages of the journal. For such reports the following items should be

taken into consideration: Persian and English **Title**, Persian and English **Abstract** (including the background, clinical findings, diagnostic tests, and final evaluation), Persian and English **Keywords**, **Background** (how the considered disease got reported), **Clinical Findings** (the date the disease started, symptoms, and all relevant clinical findings), **Diagnostic Tests** (all tests conducted to confirm diagnosing the disease), **Final Evaluation** (deduced expression concerning the reported case), and **Reference**.

4.3. Review Articles: Such articles are written by experienced people and experts, who already have sufficient number of articles with that title. Review articles evaluate the results from the author’s previous published works and assesses their strengths and weaknesses. Also some suggestions on improving them in later studies are given. The Veterinary Research Journal welcomes this type of articles. However, prior to submitting them, the author is contacted about the title and size of the submitted article.

For such reports the following should be taken into consideration: Persian and English **Title**, Persian and English **Abstract** (the study area and explaining the different sections, composing the article, in one sentence, the final conclusion which should be written in present tense, and the article’s goals, which due to the brevity of the article must be mentioned pretty quickly), Persian and English **Keywords**, **Introduction**, **Main Body or Results**, and **Final Conclusion**.

4.4. Short Research Articles: In terms of methodology and composition, this article is similar to research article. Yet, considering the importance and the results obtained from the research, the article is presented to the journal in a compressed way, in 5 pages at most (excluding the reference).

The following should be considered for such reports: Persian and English **Title**, Persian and English **Abstract**, Persian and English **Keywords**, **Introduction**, **Methodology**, **Results**, **Discussion**, and **Reference**.

In case, the article is outside the terms and conditions of the guideline for preparing scientific articles of the journal, prior to presenting to either the editorial board or the reviewers, it will be returned to the corresponding author for correction.

Goals and Outlook:

The goal of Veterinary Research Journal is to publish the most up-to-date articles in order to improve and advance knowledge in different areas of veterinary



sciences, while observing all criteria of international publishing. As such, all researchers, academics, and scientists are encouraged to cooperate in this path. The journal evaluates and reviews the articles by esteemed researchers in areas of epidemiology and public health, parasitology and parasitic diseases, descriptive and clinical pathology, feed health of animals, birds, and fish, nutrients' health, the health and diseases of fish, birds, big or small livestock, diagnostic imaging techniques, surgery, anesthesiology, locomotor organs' diseases, basic sciences (biochemistry, anatomy, embryology, histology, and physiology), pharmacology and toxicology, midwifery and reproduction diseases, microbiology and immunology, hematology and clinical biochemistry, and other animal areas of animal sciences. Obviously, if the article is suitable, it will be published as soon as possible.

Reviewers

The journal's reviewers are selected from the best figures with sufficient experience in the area of the submitted article. All the same, to burden each of the reviewers with such a responsibility might need to take enough time. Therefore, members of the editorial board of "Veterinary Research Journal" ask the authors to value such responsibility and appreciate their patience. The articles in Veterinary Research Journal are reviewed with fairness and in the minimum period of time possible in a way that none of the reviewers are aware of the authors' names. In this way, it will be guaranteed that the articles are published by the journal with appropriate quality. For this purpose, Veterinary Research Journal needs reviewers who are meticulous, giving their useful opinions about the submitted article to the journal, four to six weeks after accepting its review. For Veterinary Research Journal to remain a high-quality scientific journal needs the cooperation of experienced, meticulous, and fair reviewers for evaluating the submitted articles.

About the Journal

Veterinary Research Journal is a journal in Persian with both Persian and English abstracts, published at the Faculty of Veterinary Medicine, University Of Tehran. This journal publishes scientific research articles, case studies, and reviews in the area of veterinary science and is proud to announce that it does so while observing all standard criteria of international publication. A quarterly journal, it is published four times a year. Once the articles of this journal pass the accurate review stage, they are published on the website, observing ethical issues in publication and will be available to everyone freely. The journal is thankful of

all who cooperate with it, being proud to have their support.

The Process of Accepting the Articles

In order to be in line with international publication standards, Veterinary Research Journal is based on peer review and free access. As such, the journal has selected double-blind procedure. Hence neither the author(s) nor the reviewers are aware of each other's' identity. This will cause the review process to be only scientific without any pre-judgment or prejudice. In the event of submitting the article to the journal, after a brief evaluation and in case of observing the framework relevant to paper publication, the specialized secretary or the members of the editorial board select three reviewers. After a standard period of time, the reviewing result will be sent to the author in one of the four ways below:

1. Accepting the article in its original form, without any need for change
2. Accepting the article after some slight changes
3. Accepting the article on the condition of making some total changes
4. Rejection

In case there is no consensus between the author and the reviewers, the chief editor will decide about accepting or rejecting the article. In case it is decided to publish the article, the reviewers' opinions are included in the article, itself. The authors are given fourteen days to apply the required changes. The amended article will be sent to the same reviewers along with the applied changes. This process will continue until the final decision about accepting or rejecting the article. In case of accepting the article, after applying all amendments in accordance with the journal's format and after paying the relevant fee, the article will be published in future volumes of the journal's website. The average time from submitting the article to the final decision might take two to five months. Obviously, the faster the article is accepted, the sooner it will be published.

If the texts, saved in the system, are in line with the specific area of the journal and are appropriate in accordance with most standards, set by the journal, they will be sent for review and in case of chief editor's final consent, they will enter the publication process.

Ethical Principles of Article Publication

- In terms of ethical principles of article publication, the journal is obliged to watch the rights of



authors, owners of the work, and content producers on the one hand, and has to keep the rights of its audience and readers, on the other. Thus, to observe this issue and in order to be in line with international scientific society, it has based its performance on ethical laws of worldwide publication and has established its policies on this basis.

- Veterinary Research Journal believes that all individuals, involved with the publication process of an article (the author, journal crew, and reviewers) should accept the ethical laws and charters of the journal and act accordingly. The journal follows the rules and regulations of the Committee of Publication Ethics (COPE).

- All papers will be controlled by the members of the editorial board for their authenticity. Articles that have outstanding similarities with published texts in other journals or are already published in a way somewhere else, will be returned to the corresponding author.

- The corresponding author must submit a letter of commitment on the fact that their submitted article has not been published in another journal completely or partially, or has not been submitted somewhere else for review. It is necessary for the corresponding author to explicitly and clearly state these matters in the letter they send to the chief editor of Veterinary Research Journal.

- Based on Veterinary Research Journal's regulations, students could not be corresponding authors of the submitted articles.

- The names of everyone who has actively cooperated in designing and preparing the research and collecting, analyzing, and interpreting the data should be mentioned as authors.

- The names of people who have only played role in financing the research must not be mentioned among the authors and must come in the acknowledgment.

- All authors must have read the final edition of the article and should accept its publication in the journal.

- All accepted articles in the journal are considered the complete or partial intellectual property of Veterinary Research Journal.

Terms and Conditions of Article Submission

- Submitting and tracing the articles is only possible via the journal website (<https://jvr.ut.ac.ir/contacts>). Hence, we hereby ask the authors to avoid submitting any written form of the article to the journal or sending emails that include the article content to journal's email address.

- The submitted articles are subject are primarily evaluated only in the set format of the journal.

- The responsibility for the correctness of the contents and the mentioned reference in the article belongs to the author(s).

- The quarterly is free to accept, reject, or edit the articles.

- Students must necessarily submit an article along with a tenured professor.

- The article has not been published before and is currently in no other journal to be reviewed for publication.

- Since the journal's language is Persian, it is necessary to observe Persian grammatical rules.

Default Text of the (Commitment) Letter to Chief Editor:

The present article has not been published in another journal up to now or is not simultaneously submitted to another journal for future publication.

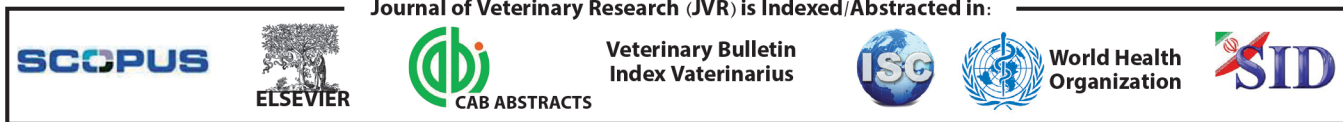
I hereby commit that the submitted article has been viewed by its authors and has received their consent on its publication in this journal with the present form.





Title	Content	Page
• Effects of Cadmium Poisoning on the Expression of NF-kB/MAPK and CD163 Genes in Rat Adrenal Gland	Atieh Gholami, Zahra Marjani, Saeed Hesaraki.....	1
• Evaluation of Skin Repairing and Antifungal Properties of Alcoholic Extract of <i>Laleh abbasi</i> (<i>Mirabilis jalapa</i>) Leaf on Induced Wounds in Laboratory White Rat Model	Behran Zamani Raad, Seyed Hossein Mardjanmehr, Farhang Sasani, Alireza Khosravi, Mohammad Javad Gharagozlou.....	9
• Comparison to Methods; Serum Antibody ELISA and Fecal Nested-PCR to Diagnose <i>Mycobacterium avium</i> Subspecies <i>Paratuberculosis</i> Subspecies Infection in Cattle	Ali Kolivand, Mohammad Rahim Haji Hajikolaei, Mohammad Nouri, Mohammad Khosravi, Dariush Gharibi.....	21
• Radiographic Evaluation of Effective Quantitative Criteria in Diagnosis of Laminitis before and after Trimming in Healthy Horses	Sarang Soroori, Amir Tavakoli, Hesameddin Akbarein, Mojtaba Bonyadi, Banafsheh Shateri Amiri.....	31
• Anatomic and Excretory Urography Investigation of the Kidneys, Ureters and Urinary Bladder in Guinea Pig	Saba Azimzadeh, Siamak Alizadeh, Mohammad Reza Hosseinchi.....	39
• Comparative Genome Analysis of Infectious Human and Domestic Animal <i>Coronaviruses</i>	Taraneh Rajaei, Gholamreza Nikbakht Brujeni, Fateme Frootan, Jalil Mehrzad, Pouya Houshmand.....	51
• Evaluation of the Antibacterial Effect of Carvacrol Alone and in Combination with the Antibiotic Cefixime Against <i>Escherichia coli</i> O₁₅₇:H₇	Sepideh Asadi, Bahar Nayeri Fasaei, Taghi Zahraei Salehi, Ramak Yahya Rayat, Nemat Shams.....	67

Journal of Veterinary Research (JVR) is Indexed/Abstracted in:



Available online at: <http://jvr.ut.ac.ir>