

## تاثیر مصرف رژیم حاوی سویا بر هیستو متری و هیستو شیمی غضروف طبق درشت نی در موش های NMRI ماده پس از القای استئو آرتروز

ریحانه هوشمند عباسی<sup>۱</sup>، زهرا طوطیان<sup>۱\*</sup>، حسن مروتی<sup>۱</sup>، سیمین فاضلی پور<sup>۲</sup>، بهادر شجاعی<sup>۳</sup>، علی کاظمیان<sup>۱</sup>

(۱) گروه علوم پایه، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

(۲) گروه علوم تشریحی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

(۳) گروه علوم پایه، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه باهتر کرمان، کرمان، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۶/۷/۳۰

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۷

### چکیده

**مقدمه:** استئو آرتروز رایج ترین بیماری مفصل زانو در افراد میان سال است که موجب محدود شدن حرکت می شود. هدف از انجام این مطالعه ارزیابی اثرات مصرف رژیم حاوی کنجاله سویا در بهبود نسبی وضعیت غضروف مفصل زانوی موش های سوری مبتلا به استئو آرتروز می باشد.

**مواد و روش ها:** ۵۰ سر موش سوری ماده نا بالغ نژاد NMRI به طور تصادفی به پنج گروه ده تایی تقسیم شدند. گروه کنترل، آب آشامیدنی و رژیم عادی را طی مدت سه ماه دریافت نمود. گروه شام، به عنوان مدل القای استئو آرتروز روزانه به مدت دو هفته سیپرو فلوکسازین را به میزان ۲۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن به صورت گاواژ معدی مورد مصرف قرار داد و در این مدت از رژیم بدون سویا استفاده کرد. گروه تجربی اول، به مدت دو هفته تحت القای استئو آرتروز قرار گرفت و سپس به مدت سه ماه از رژیم بدون سویا استفاده نمود. گروه تجربی دوم، رژیم حاوی ۱۵ درصد سویا را به مدت سه ماه دریافت نمود. گروه تجربی سوم، پس از دو هفته القای استئو آرتروز تا سه ماه رژیم حاوی ۱۵ درصد سویا را مصرف نمود. در پایان، شاخص های ضخامت بخش میانی غضروف طبق درشت نی، غلظت پروتئو گلیکان های ماده زمینه ای و غلظت آکالین فسفاتاز موجود در سرم خون در بین گروه ها مقایسه شد.

**یافته های پژوهش:** مقایسه بین گروه ها نشان داد که ضخامت بخش میانی غضروف طبق درشت نی و هم چنین میزان غلظت پروتئو گلیکان های ماده زمینه ای در گروه های مصرف کننده رژیم حاوی سویا بدون القا و پس از القای استئو آرتروز، افزایش معنا داری نسبت به گروه های مصرف کننده رژیم معمولی داشته است ( $P < 0/05$ ). غلظت آکالین فسفاتاز سرم خون در گروه های مصرف کننده سویا بدون القا و با القای استئو آرتروز در مقایسه با سایر گروه ها افزایش داشت ولی این افزایش معنا دار نبود.

**بحث و نتیجه گیری:** با توجه به مشاهده اثرات مثبت رژیم حاوی سویا بر بافت غضروف، می توان افزودن سویا به رژیم غذایی را به منظور کاهش میزان وقوع مشکلات مفصلی پیشنهاد نمود.

**واژه های کلیدی:** سویا، استئو آرتروز، غضروف طبق درشت نی، هیستو متری

\* نویسنده مسئول: گروه علوم پایه، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

Email: ztotian@ut.ac.ir

Copyright © 2017 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

## مقدمه:

بروز جهانی بیماری های وابسته به افزایش سن در استخوان، مفصل و عضله به طور پیوسته در حال افزایش است و سلامت میلیون ها نفر در سراسر جهان را به طور جدی تهدید می کند. بیماری التهابی استئو آرتريت که در فهرست ناتوانی های جهانی در سطح یازدهم قرار دارد، رایج ترین اختلال مفصلی است که افراد میان سال و مسن را تحت تاثیر قرار داده و توانایی بیماران را برای انجام فعالیت های روزانه کاهش می دهد (۱). به دلایل متعدد زنان در مقایسه با مردان به طور شدید تری در معرض این بیماری هستند (۲). استئو آرتريت می تواند هر مفصلی را درگیر نماید ولی این بیماری اغلب مفاصل تحمل کننده وزن بدن مثل زانو و لگن را درگیر می کند. تظاهرات این بیماری در اغلب ضایعات غضروفی شامل درد، سختی و محدودیت حرکت، التهاب و به ندرت گرم تر بودن ناحیه درگیر است (۱). برجسته ترین ویژگی آناتومیکی این ضایعه تخریب پیش رونده غضروف مفصلی است. با این حال، علائم استئو آرتريت نه تنها ضایعه غضروفی، بلکه ضایعه غشای سینو ویال، استخوان زیر غضروف و بافت نرم اطراف مفصل را نیز در بر دارد. التهاب سینوویوم در مراحل ابتدایی و انتهایی استئو آرتريت رخ می دهد و با تغییرات در غضروف مجاور مرتبط است. واسطه های کاتابولیک و پیش التهابی مانند سیتوکین ها، اکسید نیتریک، پروستا گلاندین E2 و نورو پپتیدها که به وسیله سینو ویوم ملتهب تولید می شوند، تعادل تخریب و بازسازی ماتریکس خارج سلولی غضروف را تغییر می دهند. این عوامل منجر به تولید بیش از حد آنزیم های پروتئو لیتیک مسؤل تخریب غضروف می شوند. تغییرات غضروفی باعث التهاب بیش تر سینو ویال و در نتیجه تولید یک دایره التهابی وخیم می شود. پیشرفت سینوویت علائم بالینی و ضایعه مفصلی را در استئو آرتريت تشدید می نماید (۳). با توجه به این حقیقت که این بیماری اساسا یک بیماری التهابی است، توصیه های دارویی اغلب مصرف دارو های ضد التهابی بوده که عموما متمرکز روی بهبود علائم یا کند کردن پیش روی بیماری است و متاسفانه تا کنون هیچ درمان

دارویی موثری برای بازیابی ساختار و عملکرد اولیه غضروف و سایر بافت های سینو ویال تخریب شده در استئو آرتريت معرفی نگردیده است. نوین ترین دستور العمل های بین المللی توصیه مصرف دارو های ضد التهاب غیر استروئیدی (NSAIDs) خوراکی و موضعی است که در سراسر دنیا مورد استفاده قرار می گیرد. با این حال قابل ذکر است که تاکنون عوارض جانبی گسترده ای در رابطه با درمان با NSAID های خوراکی شناخته شده است که بین آن ها می توان به زخم معده و خونریزی دستگاه گوارش اشاره نمود (۴). محدود بودن قدرت ترمیم و باز سازی در بافت غضروف به علت فقدان رگ های خونی در این بافت، عدم تحرک کندروسیت ها و محدود بودن قدرت تکثیر کندروسیت های بالغ از یک سو (۵) و نا کار آمدی دارو های موجود در ضمن وجود عوارض جانبی آن ها، موجب افزایش تقاضا برای درمان های ایمن و جدید و هم چنین رویه های پیشگیرانه شده است. محققین معتقدند که درمان های گیاهی قابلیت فراهم کردن راه حلی برای این مشکل را دارند. یکی از اهداف تحقیق در مورد دارو های گیاهی و درمان های جایگزین، بهینه سازی سلامت و جلوگیری یا به تاخیر انداختن بیماری است. محققینی که در رابطه با درمان استئو آرتريت تحقیق می کنند، همواره در تلاش بوده اند تا بتوانند موثر ترین و در عین حال ایمن ترین عصاره گیاهی را به منظور بهبود ضایعات غضروفی بیابند. اگرچه مکانیسم عمل محصولات دارویی گیاهی خوراکی در این رابطه به طور کامل روشن نشده است، ولی مطالعات تجربی نشان می دهد که تعامل با واسطه های التهابی و تخریبی غضروف، یک مبنای منطقی برای اثر این محصولات در کاهش آرتروز فراهم می کند. به عنوان مثال فیتواستروژن هایی که به مقدار زیاد در پروتئین سویای خوراکی موجود است میتواند به وسیله فلور میکروبی معدی - روده ای به اکوئول (Equol) تبدیل شود. اکوئول یک استروژن ضعیف است که می تواند از طریق تنظیم التهاب و متابولیسم استخوانی باعث سرکوب پیشرفت ضایعات غضروفی شود (۶). نوین ترین داروی گیاهی ساخته شده تا به امروز که اثرات

مفید آن مورد توافق محققان زیادی هم هست، کپسول های آووکادو سویا غیر صابونی ( Avocado soybean unsaponifiables ) که حاوی یک سوم روغن آووکادو و دو سوم روغن سویا است، می باشد. محققین معتقدند که این داروی گیاهی در مقایسه با سایر دارو های گیاهی که تا کنون مورد مطالعه قرار گرفته اند، اثرات گسترده تر و پایدار تری را ارائه داده است (۷). در سال ۱۹۹۷ یک آزمایش سه ماهه روی ۱۶۳ بیمار استئو آرتریتی انجام شد و ۳۵ روماتو لوژیست اثربخشی این ماده را در کاهش مصرف دارو های ضد التهابی غیر استروئیدی بررسی نمودند (۸). در این آزمایش برخی بیماران کپسول های ۳۰۰ میلی گرمی حاوی ASU و برخی دیگر کپسول های دارو نما را به طور روزانه دریافت نمودند. در ۴۵ روز ابتدایی دارو های ضد التهابی غیر استروئیدی نیز تجویز شد. در ۴۵ روز دوم آزمایش، بیمارانی که کپسول های ASU را دریافت نموده بودند نسبت به گروه دریافت کننده کپسول های دارو نما نیاز کم تری به دارو های تجویزی نشان دادند (۸). در آزمایشی مشابه که محققان دیگر به مدت شش ماه روی ۱۶۴ بیمار انجام دادند، کپسول های حاوی ۱۳۰۰ میلی گرم ASU روزانه توانست علاوه بر کاهش مصرف دارو های ضد التهاب غیر استروئیدی، باعث بهبود درد و هم چنین بهبود حرکت بیماران شود (۹). در مطالعه ای که بر روی گوسفندانی انجام شد که منیسک زانوی آن ها برداشته شده بود مشخص گردید که مصرف کپسول های ASU در مدت سه تا شش ماه می تواند باعث افزایش معنا داری در ضخامت غضروف زانو شود. این یافته ها پیشنهاد می کند که ممکن است مخلوط آووکادو و سویا در درمان استئو آرتريت موثر بوده و از طریق تغییر در متابولیسم کندروسیت ها موجب تغییر در ترکیبات متالو پروتئیناز، سیتوکین ها و پروستا گلاندین ها در غضروف مفصلی شود (۱۰). با این حال تاکنون گزارشاتی مبنی بر وجود اثرات جانبی دارو های خوراکی ASU از قبیل ضایعات پوستی، ضایعات کبدی، ضایعات معدی- روده ای و در موارد محدود تر لخته شدن خون (۱۱) به ثبت رسیده است. لذا محققین مختلفی تلاش نموده اند که رژیم حاوی سویا را جایگزین این کپسول ها نمایند. با این

حال تاکنون این مطالعات در سطح ثبت علائم مربوط به بهبود درد و دامنه حرکت بیماران مبتلا به استئو آرتريت (۱۲) و یا در سطح میکروسکوپی فقط در مورد موش های سالم مصرف کننده رژیم های حاوی مقادیر مختلف سویا بوده است (۱۳، ۱۴). لذا مطالعه ای جامع در سطح هیستولوژی و هیستومتری در رابطه با مقایسه اثرات رژیم های حاوی سویا روی غضروف در بین موش های مبتلا به ضایعه غضروفی و موش های سالم مصرف کننده رژیم های سویا کاملا ضروری به نظر می رسد. به این منظور در مطالعه حاضر اثر سویا به عنوان ماده غذایی بر روی ضخامت وسط غضروف طبق درشت نی، میزان غلظت پروتئو گلیکان های ماده زمینه ای و هم چنین میزان غلظت آلکالین فسفاتاز موجود در سرم خون موش های سالم و مدل استئو آرتريت مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت.

در این مطالعه داروی آنتی بیوتیک سیپرو فلوکسازین به منظور القای استئو آرتريت به کار گرفته شد. این آنتی بیوتیک از رده فلورو کینولون ها (بر پایه کینولون) بوده و مطالعات مختلف حاکی از تاثیر این دارو بر کاهش کندروسیت ها و تخریب ماتریکس و حفره دار شدن غضروف مفصلی است (۱۵).

### مواد و روش ها

این مطالعه تجربی بر روی ۵۰ سر موش سوری ماده نابالغ نژاد NMRI در سن سه هفتگی در دانشکده دام پزشکی دانشگاه تهران طی سال ۱۳۹۵ انجام گرفت. موش ها به منظور سازگاری با محیط به مدت دو هفته در شرایط مناسب آزمایشگاهی (درجه حرارت ۲۲ ± ۲ درجه سانتی گراد، چرخه ۱۲ ساعته روشنایی- تاریکی و دسترسی نا محدود به آب و غذا) در حیوان خانه نگه داری شدند. در طول مدت آزمایش نکات اخلاقی کار بر روی حیوانات رعایت گردید. حیوانات به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند. گروه کنترل فقط آب آشامیدنی و رژیم غذایی معمولی را به مدت سه ماه دریافت نمود. گروه شم به عنوان گروه مدل القای استئو آرتريت به مدت دو هفته سیپرو فلوکسازین را با دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن به صورت گاوژ معدی دریافت نمود. گروه تجربی اول به مدت دو

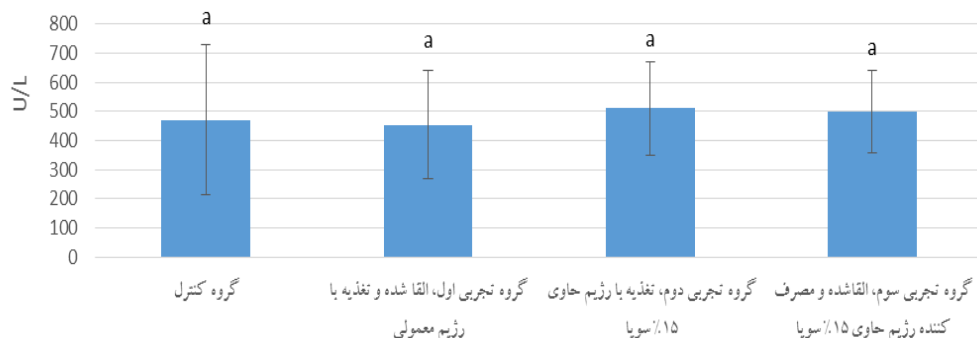
کالیبره شده با میکروسکوپ انجام گرفت. ارزیابی مقاطع هیستو شیمی به روش درجه بندی و کمی سازی نسبی محاسبه گردید. به این ترتیب که برای هر کدام از مقاطع موجود برای یک نمونه، متناسب با شدت رنگ - پذیری یک درجه اختصاص داده شد و نهایتاً میانگین برای یک نمونه ثبت گردید. در تحلیل آماری داده های ثبت شده، از نسخه شماره ۲۴ نرم افزار آماری SPSS استفاده گردید. ابتدا توزیع داده های کمی با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی شد. سپس، در مورد داده های دارای توزیع نرمال از آزمون پارامتریک One-way ANOVA و در صورت وجود اختلاف معنا دار از آزمون تعقیبی Tukey برای مقایسه گروه ها استفاده گردید و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد بیان شد. جهت مقایسه کیفی میزان پروتئو گلیکان های موجود در ماده زمینه ای، شدت رنگ- پذیری تولوئیدین بلو مبنا قرار گرفت و از آزمون کراسکال والیس مورد استفاده قرار گرفت. اختلاف میانگین بین گروه های مختلف در سطح  $P < 0.05$  معنی دار تلقی گردید.

## یافته های پژوهش

### (۱) نتایج بیوشیمی

نتایج حاصل از بررسی غلظت آلکالین فسفاتاز سرم موش های مورد مطالعه که در نمودار ۱ آمده است، نشان داد که علی رغم وجود میزان بالای آلکالین فسفاتاز در گروه های مصرف کننده رژیم حاوی سویا، این افزایش معنا دار نبود.

هفته سیپرو فلوکسازین را مانند گروه شم دریافت نمود و به منظور بررسی احتمال ترمیم خود به خودی ضایعه غضروفی با مصرف رژیم معمولی، تا سه ماه نگه داری شد. گروه تجربی دوم به مدت سه ماه از رژیم غذایی که ۱۵٪ آن را سویا تشکیل داد استفاده نمود. گروه تجربی سوم پس از مصرف سیپرو فلوکسازین به مدت دو هفته، به منظور بررسی احتمالی ترمیم ضایعه غضروفی از رژیم غذایی حاوی ۱۵٪ کنجاله سویا به مدت سه ماه استفاده کرد. پس از پایان دوره تیمار، موش ها توسط کلروفورم بی هوش شده و از قلب آنها جهت تعیین غلظت آلکالین فسفاتاز سرم خون، خون گیری به عمل آمد. سپس اندام عقبی موش ها از بدن جدا، پوست و عضلات ناحیه مفصل زانو تا حد امکان برداشته و جهت فیکس شدن در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند. پس از کلسیم زدایی نمونه ها و انجام مراحل آماده سازی بافتی، از نمونه ها مقطعی به ضخامت ۵ میکرو متر تهیه گردید. جهت انجام مطالعات هیستو لوژیک و هیستو مورفو متریک، از رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین و به منظور بررسی کیفی میزان پروتئو گلیکان های موجود در ماده زمینه ای، از رنگ آمیزی تولوئیدین بلو استفاده شد (۱۶). پس از انجام مطالعه هیستو لوژی، به کمک فتو میکروسکوپ کالیبره شده و متصل به رایانه، از اسلاید های رنگ آمیزی شده عکس برداری صورت گرفت. برای اندازه گیری ضخامت در بخش میانی غضروف طبق درشت نی، از هر نمونه شش مقطع بررسی شد و در هر مقطع تصاویر دیجیتالی از بخش میانی طبق درشتنی با بزرگ نمایی های مختلف به دست آمد. اندازه گیری بر روی تصاویر دیجیتالی توسط نرم افزار Axiovision

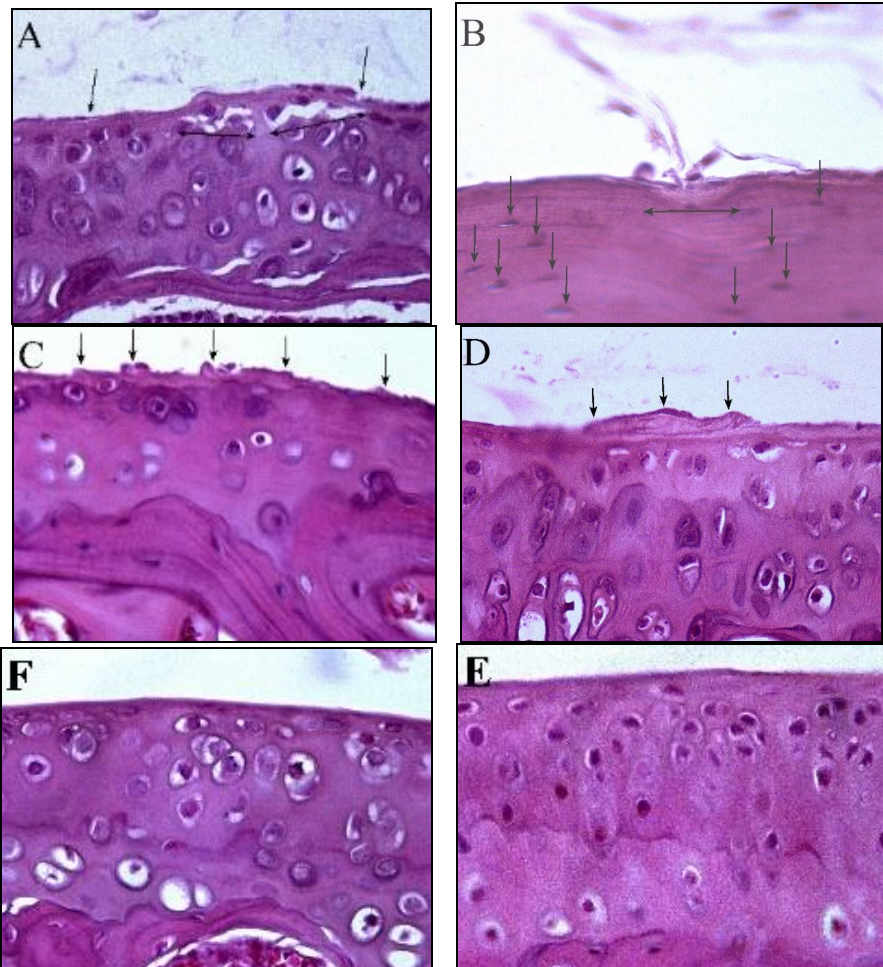


نمودار ۱. غلظت آلکالین فسفاتاز در سرم خون موش های سوری مورد مطالعه بر حسب واحد بین المللی در لیتر (U/L).

## ۲) نتایج هیستولوژی

غضروف طبق درشت نی موش از نظر بافت شناسی در گروه کنترل شامل چهار ناحیه سطحی، میانی، عمقی و آهکی بود. در گروه شم، ساختار بخش میانی غضروف طبق درشت نی، کنده شدن بخش هایی از لایه سطحی (تصویر ۱، A، پیکان ها). و ایجاد حفرات در این لایه (تصویر ۱، A و B، پیکان های دوسر) و تعداد زیادی سلول های دوکی شکل در لایه میانی (تصویر ۱، B، پیکان ها) را نشان می داد که تاییدکننده ضایعه

غضروفی در این گروه بود. در سایر گروه های مصرف کننده سیپروفلوکساسین که مورد ترمیم خود به خود (گروه تجربی اول) یا توسط رژیم حاوی سویا (گروه تجربی سوم) قرار گرفته بودند این تغییرات خفیف تر بوده (تصویر ۱، C و D) و نسبت به گروه هایی که مورد القای استئو آرتروز قرار نگرفته بودند (گروه کنترل و گروه دوم) و غضروف طبیعی داشت (تصویر ۱، E و F)، درجات کمی به هم ریختگی بافتی مشاهده گردید.



تصویر ۱. مقایسه ساختار بافتی بخش میانی غضروف طبق درشت نی در گروه های آزمایشی. پیکان ها در تصویر A، کنده شدن بخش هایی از لایه سطحی (گروه شم)، در تصویر B، تعداد زیادی سلول های دوکی شکل در لایه میانی و ایجاد حفرات در این لایه (گروه شم)، در تصویر C، به هم ریختگی بافتی اندک (گروه تجربی اول)، در تصویر D، به هم ریختگی بافتی اندک (گروه تجربی سوم) را نشان می دهند، E، بدون تغییر (گروه تجربی دوم)، F، بدون تغییر (گروه کنترل) (H & E, x 400).

## ۳) نتایج هیستوشیمی

بررسی مقاطع با استفاده از سیستم درجه بندی میزان کاهش رنگ پذیری ماده زمینه ای (۱۹)، نشان داد که

شدت کاهش رنگ پذیری ماده زمینه ای غضروف مفصلی در گروه تجربی سوم پکه پس از القای ضایعه غضروفی به مدت سه ماه از رژیم حاوی سویا مورد



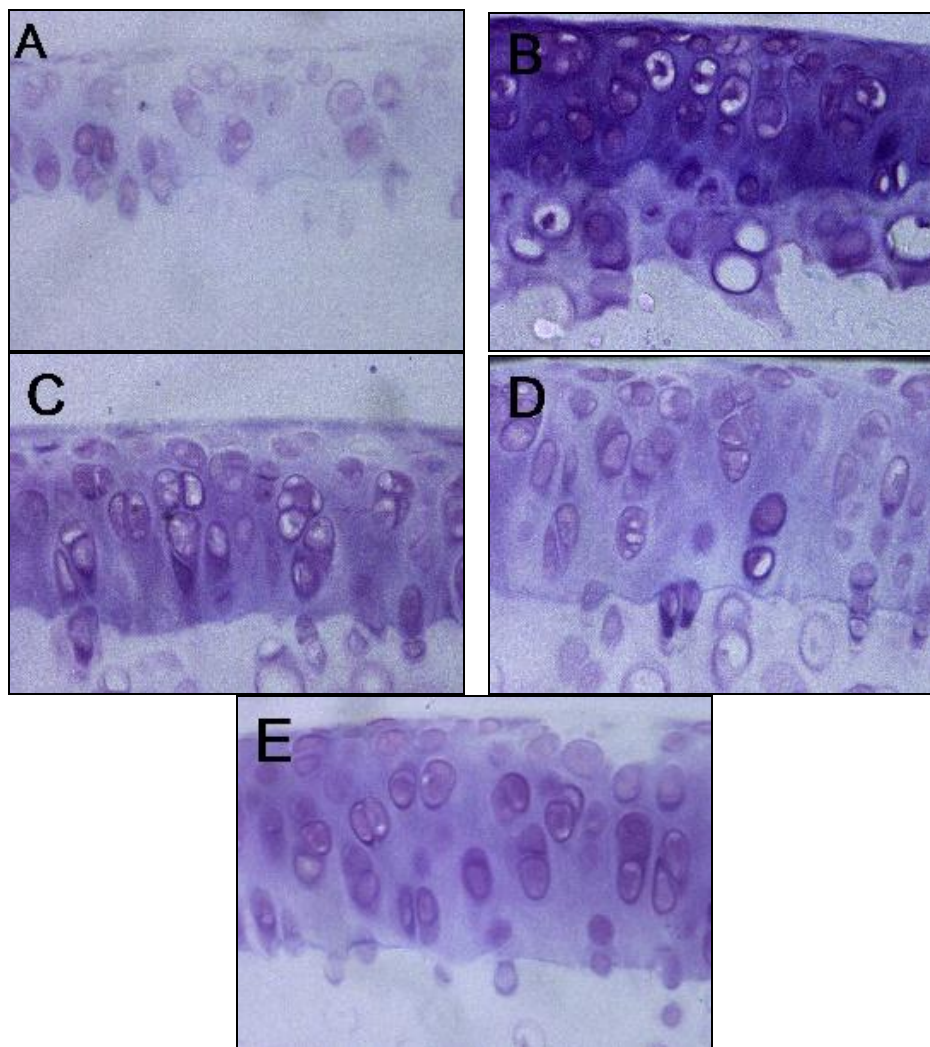
که کم ترین میزان کاهش رنگ پذیری، در گروه تجربی دوم که بدون القای ضایعه غضروفی از رژیم حاوی ۱۵٪ سویا استفاده کرده بودند وجود داشت و این اختلاف نسبت به همه گروه ها معنا دار بود ( $P < 0/05$ ) (تصویر ۲، C).

مصرف قرار داده بودند، نسبت به گروه تجربی اول که رژیم غذایی معمولی را پس از القای ضایعه دریافت کرده بود، کم تر بوده است. بیش ترین شدت کاهش رنگ پذیری ماده زمینه ای با اختلاف معنا دار نسبت به سایر گروه ها، در گروه ششم (مدل القای ضایعه غضروفی) تشخیص داده شد (تصویر ۲، A). در حالی

جدول ۱- میانگین درجه اکتسابی هر گروه از نظر میزان کاهش شدت رنگ پذیری ماده زمینه ای در برابر رنگ آمیزی تولوئیدین - بلو. کم ترین و بیش ترین میزان کاهش در شدت رنگ پذیری به ترتیب درجه ۱ و درجه ۵ در نظر گرفته شده است. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد در سطح معنی داری  $P < 0/05$  بیان شده است. حروف نا هماهنگ در ردیف افقی دال بر

اختلاف معنی دار است.

گروه های مورد مطالعه	گروه کنترل، مصرف رژیم معمولی	گروه ششم، تایید القای ضایعه غضروفی	گروه تجربی اول، القای ضایعه غضروفی و تغذیه با رژیم معمولی	گروه تجربی دوم، تغذیه با رژیم حاوی ۱۵٪ سویا	گروه تجربی سوم، القای ضایعه غضروفی و تغذیه با رژیم حاوی ۱۵٪ سویا
درجه اکتسابی	$2/30 \pm 0/82^b$	$4/5 \pm 0/71^a$	$3/1 \pm 0/96^b$	$1/3 \pm 0/88^c$	$2/21 \pm 1/06^b$

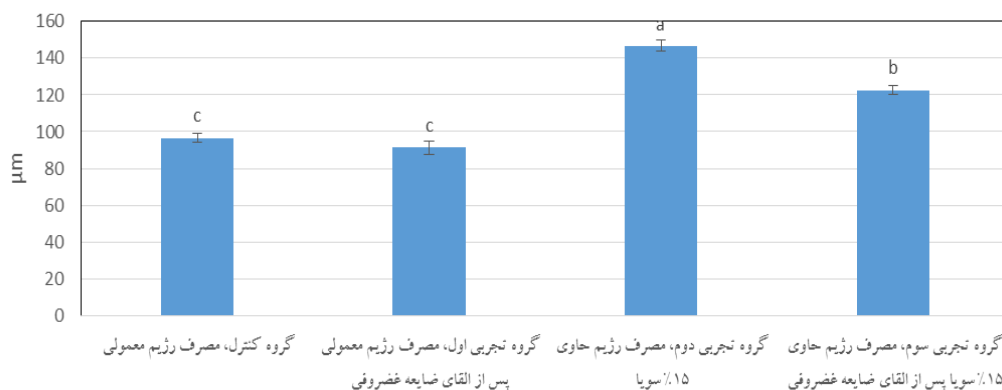


تصویر ۲- مقایسه درجه کاهش شدت رنگ پذیری غضروف مفصلی در گروه ششم و القای ضایعه غضروفی (A)، گروه تجربی دوم و مصرف رژیم حاوی ۱۵٪ (B)، گروه تجربی سوم و مصرف رژیم حاوی ۱۵٪ سویا پس از القای استئوآرتریت (C)، گروه کنترل و تغذیه با رژیم معمولی (D)، گروه تجربی اول و تغذیه با رژیم معمولی پس از القای ضایعه غضروفی (E) (تولوئیدین بلو،  $\times 400$ ).

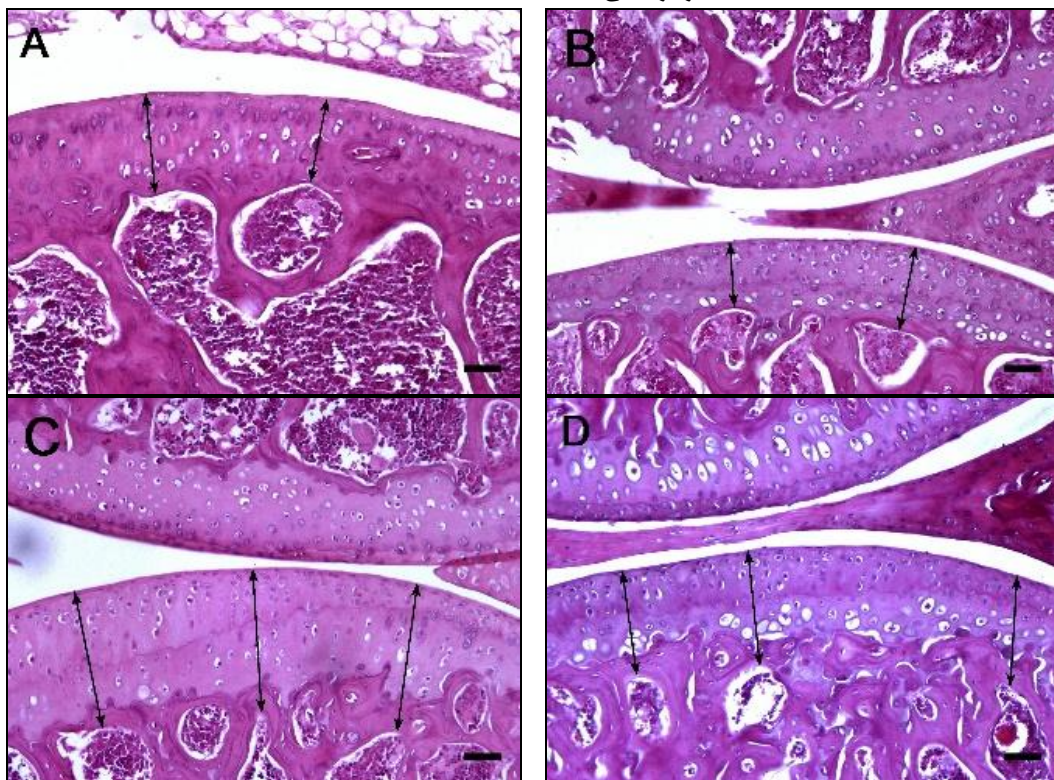
## ۴) نتایج هیستومتری

نتایج نشان داد که ضخامت بخش میانی طبق درشت نی در گروه تجربی دوم که بدون ایجاد ضایعه غضروفی از رژیم حاوی سویا استفاده کرده بودند نسبت به سایر گروه ها به صورت معنا دار بیش تر است. به علاوه، این شاخص در گروه مصرف کننده رژیم حاوی ۱۵٪ سویا پس از القای ضایعه غضروفی، نسبت به

گروه های کنترل و تجربی اول که از رژیم معمولی پس از القای ضایعه غضروفی استفاده نموده اند، به طور معنادار بیشتر است ( $P < 0.05$ ). این شاخص در مورد گروه تجربی اول نسبت به گروه کنترل کم تر بوده است که البته این اختلاف معنا دار نبوده است (نمودار ۲ و تصویر ۳).



نمودار ۲. مقایسه میانگین ضخامت بخش میانی غضروف طبق درشت نی در گروه های آزمایشی. حروف نا هماهنگ دال بر اختلاف معنا دار در سطح  $P < 0.05$  است (mean ± SD).



تصویر ۳. مقایسه ضخامت بخش میانی غضروف طبق درشت نی در گروه کنترل (A)، گروه تجربی اول و تغذیه با رژیم معمولی پس از القای ضایعه غضروفی (B)، گروهی تجربی دوم و مصرف رژیم حاوی ۱۵٪ (C) و گروه تجربی سوم و مصرف رژیم حاوی

۱۵٪ سویا پس از القای استئو آرتрит (D). پیکان‌های دوسر حدود ضخامت غضروف را نشان می‌دهد (H & E،  $\times 100$ ، اندازه خط مقیاس: ۵۰ میکرو متر).

### بحث و نتیجه‌گیری

حاکی از اثرات بهبود دهنده این ماده غذایی در مقایسه با رژیم بدون سویا بوده است (۱۳، ۱۴). در مطالعه حاضر به منظور مشاهده اثرات مصرف رژیم حاوی سویا روی استئو آرتريت در محیط طبیعی (in vivo)، ضایعه غضروفی توسط گاوآژ داروی سیپروفلوکساسین القا گردید. پس از بررسی بافت شناسی غضروف طبق درشت‌نی در گروه‌های مختلف، حفرات متعدد و کوچک در لایه‌های سطحی و میانی، کنده شدن بخش‌هایی از لایه سطحی و دوکی شدن سلول‌ها در لایه میانی در گروه‌های مواجه شده با سیپروفلوکساسین تشخیص داده شد و به این ترتیب القای ضایعه غضروفی توسط داروی سیپروفلوکساسین تایید گردید. این تظاهرات مشابه تغییرات گزارش شده در مطالعات سایر محققینی است که تشکیل شکاف و ایجاد حفره در لایه‌های سطحی و میانی غضروف مفصلی موش‌های صحرایی نا بالغ را متعاقب تجویز فلورو کینولون‌ها گزارش کرده‌اند (۵). هم‌چنین محققین دیگر کاهش ضخامت در غضروف صفحه رشد و غضروف مفصلی موش‌های صحرایی را متعاقب تجویز هفت روز سیپروفلوکساسین گزارش کرده‌اند. این محققین کاهش ضخامت غضروف را به دلیل اثر مهارکننده سیپروفلوکساسین بر میتوز سلول‌های ناحیه تکثیری و از بین رفتن ناحیه هیپر تروفیک در غضروف صفحه رشد تفسیر کرده‌اند. نتایج حاصل از مطالعه هیستو متریک نشان داد که ضخامت بخش میانی طبق درشت‌نی نه تنها در گروه موش‌های سالم مصرف‌کننده سویا، بلکه در موش‌های مصرف‌کننده رژیم حاوی سویا پس از القای استئو آرتريت افزایش معنادار داشته است. این نتایج همسو با نتایج مطالعاتی است که روی موش‌های سوری مواجه شده با رژیم کمبود پروتئین در سه ماهه اول زندگی انجام گرفت. در این مطالعه محققین گزارش نمودند که تیمار با رژیم حاوی پروتئین کامل حاوی سویا در سه ماهه دوم زندگی این موش‌ها در مقایسه با تیمار با رژیم حاوی پروتئین کامل ولی بدون سویا، توانسته است به طور

میزان وقوع بالای مشکلات مفصل زانو و لگن در سنین بالا خصوصا در زنان از یک سو و عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای موجود از سوی دیگر باعث شده است که مطالعات اخیر رویکردی مبنی بر بهبود این ضایعات به وسیله رژیم غذایی را در پیش بگیرند (۲، ۵). اخیرا داروهای گیاهی و مکمل‌های غذایی به موضوعات مهم تحقیقات آزمایشگاهی و بالینی در ارتوپدی و روماتولوژی تبدیل شده‌اند. بنابراین اطلاع جامع ارائه دهندگان مراقبت‌های بهداشتی و هم‌چنین بیماران از شواهد حمایت‌کننده یا مخالف این رویکردها حائز اهمیت زیادی است. تحقیقات منتشر شده مختلفی نشان می‌دهد که چندین داروی گیاهی و مکمل‌های غذایی توانایی کاهش درد در بیماران مبتلا به استئو آرتريت را داشته است. یکی از داروهای که در این رابطه مورد توافق بسیاری از محققین بوده و تاثیرات مثبت آن روی ضایعات مفصلی گزارش شده است کپسول‌های حاوی آووکادو و سویای غیرصابونی (ASU) است. با این حال محققینی که در رابطه با اثرات مصرف آووکادو تحقیق نموده‌اند، عوارض جانبی مختلفی را نیز گزارش نموده‌اند (۱۱)، با توجه به این‌که کپسول‌های ASU تنها یک سوم آووکادو بوده و دو سوم آن را سویا تشکیل می‌دهد، محققین زیادی تلاش نموده‌اند تا مصرف سویا به عنوان یک ماده غذایی را جایگزین این ترکیب نمایند. اولین مطالعه روی مصرف بلند مدت پروتئین سویا به تنهایی و بدون ترکیب با آووکادو روی بیماران که دارای استئو آرتريت مزمن بودند در سال ۲۰۱۲ انجام شده است (۱۲). در این مطالعه مشخص شد که مصرف روزانه ۴۰ گرم پروتئین سویا در مدت سه ماه توانسته است علائم مرتبط با استئو آرتريت مانند دامنه حرکت و چندین فاکتور مرتبط با درد و کیفیت زندگی را در بیماران بهبود ببخشد (۱۲). هم‌چنین مطالعات دیگری که در رابطه با اثر رژیم حاوی سویا روی غضروف طبق درشت‌نی در موش‌های سوری ماده انجام گرفته است



معنا داری باعث افزایش ضخامت بخش میانی غضروف طبق درشت نی شود (۱۴) هم چنین در تحقیق بلندمدت دیگری گزارش شده است که مواجهه موش-های سوری سالم با رژیم غذایی حاوی ۲۰ درصد سویا در طول شش ماه می تواند در مقایسه با رژیم عادی بدون سویا در همین مدت باعث افزایش معنا دار ضخامت بخش میانی غضروف طبق درشت نی شود (۱۳). نتایج مطالعه حاضر می تواند نشان دهد که مصرف رژیم حاوی سویا نه تنها توانسته است در موش های سالم باعث شادابی غضروف شود، بلکه می تواند به عنوان ماده ای برای جبران ضایعات غضروفی در موش های مبتلا به استئو آرتروز مطرح باشد. در مطالعه ای که به منظور کشف خاصیت سویا در بهبود بیماری های مفصلی انجام گرفت، برخی محققین این اثرات را مرتبط با آنتی اکسیدان گیاهی موجود در سویا به نام آنتوسیانین (Anthocyanin) دانستند که موجب کاهش تعداد سلول های Th17 و هم چنین سطح تولید سیتوکین های پیش التهابی به وسیله این سلول ها گشته است. به علاوه این محققین اظهار نمودند که این آنتی اکسیدان توانسته است سطح اکسیداتیو استرس را کاهش دهد (۱۷). محققین دیگری که در رابطه با اثر دو ایزو فلاون موجود در سویا به نام های دایدزین (Daidzein) و جنیستین (Genistein) مطالعه نموده اند بیان نمودند که احتمالاً مکانیسم اثر سویا در مورد بهبود علائم ضایعه مفصلی مربوط به شباهت ساختاری ایزو فلاون ها به استروژن می باشد (۱۸). در این رابطه گزارشاتی نیز در زمینه اثر عصاره آووکادو و سویا (Piascledine) بر فعالیت کلاژنو لیتیک کندروسیت های غضروف مفصل خرگوش در محیط کشت موجود است. این نتایج نقش این ماده را در محدود کردن اثر زیان آور اینترلوکین ۱ در بیماری استئو آرتروز و کاهش فعالیت آن را در تحریک تولید کلاژناز به وسیله کندروسیت ها نشان می دهد. در این بررسی، کندروسیت ها در ۵ روز به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت دارای Piascledine به میزان ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر قرار گرفتند. نتایج نشان داد که این دارو تولید کلاژناز را افزایش داده و اثر منفی بر عملکرد اینترلوکین از طریق کاهش ظرفیت سیتوکاین ها داشته

و در نتیجه از تخریب کندروسیت ها و سلول های سینیو ویال جلوگیری می نماید (۱۹). از طرف دیگر لازم به ذکر است که در مطالعه ای که روی میمون های اوارکتومی شده انجام شد، مصرف سه ساله سویا در این حیوانات نتوانست تاثیر معنا داری روی بهبود شرایط غضروف به جا بگذارد (۲۰). بر این اساس می توان چنین نتیجه گیری کرد که مصرف مزمن و بلند مدت رژیم حاوی سویا اثر مثبت مضاعفی روی ضخامت غضروف نگذاشته است. هم چنین قابل ذکر است که محققین دیگر نشان دادند که سویا نتوانسته است به تنهایی جایگزین مناسبی در موارد ضایعه غضروفی که ناشی از فقدان هورمون های تخمدانی است باشد (۲۱). بنا بر این می توان چنین استنباط کرد که رژیم حاوی سویا نمی تواند به صورت یک تجویز عمومی برای همه انواع ضایعات غضروفی استفاده شود. شاخص دیگری که در مطالعه حاضر مد نظر قرار گرفت مقایسه میزان پروتئوگلیکان های ماده زمینه ای غضروف بود. به این منظور از مقایسه شدت رنگ پذیری مقاطع نسبت به تولوئیدین بلو استفاده گردید. تولوئیدین بلو به صورت اختصاصی پروتئو گلیکان ها را رنگ می کند و میزان شدت جذب رنگ تولوئیدین بلو توسط ماده زمینه ای غضروف مفصلی، می تواند نشان دهنده میزان پروتئو گلیکان های آن باشد (۲۲). کاهش شدید ترکیبات ماده زمینه ای به ویژه پروتئو گلیکان ها، زمینه ساز بروز سایر تغییرات در ماده زمینه ای هم چون تشکیل حفره و شیار می شود (۲۲). در این مطالعه کاهش شدت جذب رنگ تولوئیدین بلو توسط ماده زمینه ای غضروف مفصلی و هم چنین حفره های متعدد و به هم ریختگی های بافتی در گروه های مواجه شده با سیپرو فلوکساسین در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید که این علائم نشان دهنده کاهش محتوای پروتئو گلیکان های ماده زمینه ای در این گروه بوده است. مطالعات سایر محققین هم کاهش میزان پروتئو گلیکان های ماده زمینه ای غضروف مفصلی متعاقب مصرف فلورو کینولون ها را تأیید می کند (۲۳). گزارش شده است که کاهش پروتئو گلیکان های ماده زمینه ای به علت عملکرد مهار کننده کینولون ها بر روی سنتز پروتئوگلیکان ها در کندروسیت ها می باشد. با این وجود

تغذیه شدند انجام گردید، بیان شد که غلظت پروتئو گلیکان ها در غضروف هیچ تغییر معنا داری نداشته است (۲۱). شاید بتوان چنین نتیجه گیری کرد که مواجهه مداوم با این پروتئین گیاهی به صورت بلند مدت تاثیر مثبتی بر روی میزان غلظت ماده زمینه ای غضروف نمی گذارد. در رابطه با غلظت آلکالین فسفاتاز موجود در سرم موش های مورد آزمایش در این مطالعه، نتایج حاصل از بررسی آماری نشان داد که غلظت این ماده در موش های مصرف کننده رژیم حاوی ۱۵٪ سویا بیش تر بوده است. با توجه به این که در این گروه ضخامت غضروف طبق درشت نی نیز افزایش داشته است، می توان عنوان نمود که این نتایج همسو با نتایج حاصل از مطالعه محققینی است که ارتباطی معنا دار بین میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز و ضخامت غضروف را اثبات نموده اند (۲۷). محققینی که رژیم حاوی ۲۰٪ سویا را به مدت سه ماه در اختیار موش های مواجه با کمبود پروتئین قرار داده اند نیز افزایش معنا دار آلکالین فسفاتاز را ثبت نموده اند (۱۳). پیش تر محققین دیگری نیز افزایش این ماده را در سرم خون موش های صحرایی متعاقب مصرف مکمل های گیاهی مانند سویا گزارش نموده بودند (۲۸). می توان چنین نتیجه گیری کرد که سویا قادر است با تاثیر افزایشی روی آلکالین فسفاتاز که شاخصی برای تعیین سلامت کندروسیت ها با نقش کانی سازی غضروف به شمار می رود (۲۹)، موجب تاثیر حفاظتی و مقاومتی در غضروف گردد. مطالعه حاضر نشان داد که تغذیه با رژیم حاوی ۱۵٪ سویا توانسته است نه تنها باعث افزایش ضخامت غضروف طبق درشت نی و افزایش غلظت پروتئو گلیکان های ماده زمینه ای آن در موش های سالم شود، بلکه توانسته است تا حدودی باعث تخفیف اثرات ضایعه غضروفی در مدل های القای استئو آرتریت نیز گردد. این نتایج بیانگر آن است که اضافه کردن سویا به رژیم غذایی توانسته است بر شادابی غضروف تاثیر داشته باشد. هم چنین این ماده غذایی می تواند حداقل در کنار تجویز دارو های شیمیایی شناخته شده برای این بیماری مصرف شود. این رویکرد می تواند باعث کاهش دوز مصرفی دارو ها

مطالعات قدیمی تر، کاهش پروتئو گلیکان ها را به علت کاهش سنتز آن ها و در اثر مهار سنتز DNA مطرح کرده اند (۱۵). این کاهش در گروه های مصرف کننده سویا نسبت به سایر گروه ها به طور معنا دار کم تر بود که می توان بیان کرد که رژیم حاوی سویا توانسته است موجب ایجاد تاثیر محافظتی در برابر القای ضایعه غضروفی شود و یا تاثیر مثبتی روی جبران ضایعه غضروفی القا شده داشته باشد. نتایج این مطالعه هم خوان با مطالعه دیگری است که نشان داده است که میزان غلظت پروتئو گلیکان های موجود در ماده زمینه ای غضروف در موش های سالم مصرف کننده رژیم حاوی ۲۰ درصد سویا طی مدت سه ماه به طور معنا دار افزایش داشته است (۱۳). به علاوه در مطالعه ای که روی موش های مصرف کننده داروی کپسول های ASU در مقایسه با دارون ما انجام شد، محققین دریافتند که مصرف این کپسول ها می تواند اثر تحریک کننده ای روی تولید پروتئو گلیکان ها توسط کندروسیت ها داشته باشد (۷). هم چنین در مطالعه دیگری که بر روی گوسفند هایی که منیسک زانوی آن ها برداشته شده بود و به مدت سه ماه با ASU تیمار شده بودند انجام گرفت، کاهش شدت رنگ پذیری تولوئیدین بلو نسبت به گروه دارو نما کم تر بود (۲۴). محققین دیگری که گزارش نموده اند که آووکادو سویا می تواند موجب افزایش شدت رنگ آبی در غضروف طبق درشت نی شود، بیان نمودند که این شدت رنگ-پذیری می تواند به علت کاهش کاتابولیسم یا افزایش آنابولیسم باشد. چنانچه پیش تر پیشنهاد نموده بودند که مهم ترین اثر آووکادو سویا ممکن است افزایش بیان ژن transforming growth factor beta1 and beta2 باشد که موجب تحریک تولید ماده بین سلولی توسط کندروسیت ها می گردد (۲۵). هم چنین محققان اظهار نموده اند که Transforming growth factor beta1 توانسته است باعث تحریک بیو سنتز کلاژن و گلیکوز آمینوگلیکان ها در کندروسیت های غضروف خرگوش های مورد آزمایش شود (۲۶). قابل ذکر است که در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۴ روی مدل های میمون اوارکتومی شده که به طور طبیعی مبتلا به استئو آرتریت بودند و به مدت سه سال با سویا

اثرات جانبی مصرف بلندمدت این دارو ها شود.

یا طول دوره درمان شود و به این واسطه باعث کاهش

### References

1. Cross M, Smith E, Hoy D, Nolte S, Ackerman I, Fransen M, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis* 2014;73:1323-30.
2. Hame SL, Alexander RA. Knee osteoarthritis in women. *Curr Rev Musculoskel Med* 2013;6:182-7.
3. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature Rev Rheumatol* 2010;6:625-35.
4. Varga Z, Sabzwari SRA, Vargova V. Cardiovascular risk of nonsteroidal anti-inflammatory drugs an under recognized public health issue. *Cureus* 2017;9:1144.
5. Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering chondrocytes and cartilage. *ArthRes Therap* 2002;4: 63.
6. Lin IC, Yamashita S, Murata M, Kumazoe M, Tachibana H. Equol suppresses inflammatory response and bone erosion due to rheumatoid arthritis in mice. *J Nutri Biochem* 2016;32:101-6.
7. Angermann P. Avocado/soybean unsaponifiables in the treatment of knee and hip osteoarthritis. *Ugeskrift Laeg* 2005;167:3023-5.
8. Blotman F, Maheu E, Wulwik A, Caspard H, Lopez A. Efficacy and safety of avocado soybean unsaponifiables in the treatment of symptomatic osteoarthritis of the knee and hip. A prospective multicenter three month randomized, double blind placebo controlled trial. *Rev Rhum* 1997;64:825-34.
9. Maheu E, Mazieres B, Valat JP, Loyau G, Loet XL, Bourgeois P, et al. Symptomatic efficacy of avocado soybean unsaponifiables in the treatment of osteoarthritis of the knee and hip a prospective, randomized, double blind, placebo controlled multicenter clinical trial with a six month treatment period and a two month followup demonstrating a persistent effect. *Arth Rheumatol* 1998;41:81-91.
10. Lippiello L, Nardo JV, Harlan R, Chiou T. Metabolic effects of avocado soy unsaponifiables on articular chondrocytes. *Evid Based Comple Alt Med* 2008;5:191-7.
11. Olivier P, Montastruc JL. Post marketing safety profile of avocado soybean unsaponifiables. *Pres Med Paris France* 2010;39:211-6.
12. Arjmandi BH, Khalil DA, Lucas EA, Smith BJ, Sinichi N, Hodges SB, et al. Soy protein may alleviate osteoarthritis symptoms. *Phytomedi Int J Phytotherap Phytopharmacol* 2004;11:567-75.
13. Fazelipour S, Tootian Z, Matini E, Hadipour Jahromy M. Histomorphometric alteration of knee articular cartilage and serum alkaline phosphatase in young female Mice by chronic supplementation with soybean. *Phytotherapy ResPTR* 2011;25:886-91.
14. Tootian Z, Fazelipour S, Sheibani M, Kiaei S. The effect of soybean meal on the maintenance of cartilage in animal knee joints. *J Vet Res* 2012;67:49-52.
15. Burkhardt JE, Hill MA, Carlton WW, Kesterson JW. Histologic and histochemical changes in articular cartilages of immature beagle Dogs dosed with difloxacin a fluoroquinolone. *Ve Pathol* 1990;27:162-70.
16. Maslanka T, Jaroszewski JJ, Mikolajczyk A, Rotkiewicz T. Effect of increasing doses of enrofloxacin on chicken articular cartilage. *Pol J Vet Sci* 2009;12:21-33.
17. Min HK, Kim SM, Baek SY, Woo JW, Park JS, Cho ML, et al. Anthocyanin extracted from black soybean seed coats prevents autoimmune arthritis by suppressing the development of th17 cells and synthesis of proinflammatory cytokines by such cells via inhibition of NF kappaB. *Plos One* 2015;10:138201.
18. Mohammadshahi M, Haidari F, Rashidi B, Saei AA, Mahboob S, Rashidi MR. Comparison of the effects of genistein and daidzein with dexamethasone and soy protein on rheumatoid arthritis in Rats. *Bio Impacts* 2011;1:161-70.
19. Mauviel A, Loyau G, Pujol JP. Effect of unsaponifiable extracts of avocado and

- soybean Piascledine on the collagenolytic action of cultures of human rheumatoid synoviocytes and Rabbit articular chondrocytes treated with interleukin-1. *Rev Rhum Malad Osteoarticul* 1991;58:241-5.
- 20.Ham KD, Loeser RF, Lindgren BR, Carlson CS. Effects of long term estrogen replacement therapy on osteoarthritis severity in cynomolgus monkeys. *Arth Rheum*2002;46:1956-64.
- 21.Ham KD, Oegema TR, Loeser RF, Carlson CS. Effects of long-term estrogen replacement therapy on articular cartilage IGFBP-2, IGFBP-3, collagen and proteoglycan levels in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Osteoarth Cartil*2004;12:160-8.
- 22.Jacobs JW, Rasker JJ, Bijlsma JW. Alternative medicine in rheumatology: threat or challenge? *Clin Exp Rheumatol*2001;19:117-9.
- 23.Jacobs JW, Rasker JJ, Riel PL, Gribnau FW, Putte LB. Rheumajecta and vasolastine in the treatment of rheumatoid arthritis the results of a placebo-controlled, double-blind trial of a complementary treatment. *Scandinavian J Rheumatol*1991;20:434-40.
- 24.Cake MA, Read RA, Guillou B, Ghosh P. Modification of articular cartilage and subchondral bone pathology in an ovine meniscectomy model of osteoarthritis by avocado and soya unsaponifiables. *Osteoarth Cartil*200;8:404-11.
- 25.Boumediene K, Felisaz N, Bogdanowicz P, Galera P, Guillou GB, Pujol JP. Avocado/soya unsaponifiables enhance the expression of transforming growth factor beta1 and beta2 in cultured articular chondrocytes. *Arth Rheum*1999;42:148-56.
- 26.Redini F, Galera P, Mauviel A, Loyau G, Pujol JP. Transforming growth factor beta stimulates collagen and glycosaminoglycan biosynthesis in cultured rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett* 1988;234(1):172-6.
- 27.Bitto A, Burnett BP, Polito F, Marini H, Levy RM, Armbruster MA, et al. Effects of genistein aglycone in osteoporotic, ovariectomized rats: a comparison with alendronate, raloxifene and oestradiol. *British J Pharmacol*2008;155:896-905.
- 28.Shiguemoto GE, Rossi EA, Baldissera V, Gouveia CH, Valdez GM, Andrade SE. Isoflavone-supplemented soy yoghurt associated with resistive physical exercise increase bone mineral density of ovariectomized Rats. *Maturitas*2007;57:261-70.
- 29.Claassen H, Kampen WU, Kirsch T. Localization of collagens and alkaline phosphatase activity during mineralization and ossification of human first rib cartilage. *Histochem Cell Biol*1996;105:213-9.



## Effect of Soybean Consumption on Histometry and Histochemistry of Tibial Plateau Cartilage in Female NMRI Mice after Osteoarthritis Induction

Hooshmandabbasi R<sup>1</sup>, Tootian Z<sup>1\*</sup>, Morovvati H<sup>1</sup>, Fazlipour S<sup>2</sup>, Shojaei B<sup>3</sup>, Kazemian A<sup>1</sup>

(Received: July 8, 2017

Accepted: October 22, 2017)

### Abstract

**Introduction:** Osteoarthritis is the most frequent knee joint disorder among old generation where it causes serious motion limitation. The objective of present study is investigating the effects of a diet containing soybean meal ingestion on relative treatment effect on knee articular cartilage in osteoarthritis induced mice.

**Material & methods:** Fifty immature female NMRI mice were accidentally divided into five groups. Control group received tap water and normal diet for three months. Sham group, as induced osteoarthritis model, received Ciprofloxacin by stomach Gavage method over two weeks, 20 Mg/kg of their body weight daily. First experimental group were osteoarthritis induced over two weeks and then received null soybean meal diet by three months. The second experimental group, were fed with designed diet based on %15 soybean meal during these three months. The third experimental group was ingested with the designed diet after osteoarthritis induction. After the experimental period, values of cartilage thickness at the middle part of tibial plateau, concentration of the extracellular matrix, and concentration of alkaline

phosphatase in blood serum were determined among the groups.

**Findings:** Comparison between the groups showed that among the groups which were fed with the diet based on %15 soybean meal either with or without osteoarthritis induction, not only the cartilage thickness at the middle part of tibial plateau but also the concentration of the glycoproteins in extracellular matrix was significantly higher than those of the groups which received the normal diet ( $p < 0.05$ ). Furthermore, in those groups which received the designed diet either with or without osteoarthritis induction, more concentration of alkaline phosphatase in blood serum was measured. This difference, however, was not significant.

**Discussion & conclusions:** Regarding the positive effects of the designed diet based on soybean meal on cartilage, addition of soybean meal in regimen in order to decrease the incidence of articular disorders can be recommended.

**Keywords:** Soybean meal, Osteoarthritis, Tibial plateaus cartilage, Histometry

1. Dept of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran

2. Dept of Anatomy, Tehran Medical Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Dept of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

\* Corresponding author Email: ztotian@ut.ac.ir