17) Van Astern, A., Allaart, J.G., Meeles, A.D., Gloudemans, P., Houwers, D., Grone, A., 2008. A new PCR followed by Mbol digestion for the detection of all variants of the Clostridium perfringens cpb2 gene. Vet Microbiol. 127, 412-416
18) Songer, J.G., Bueschel, D., 1999. Multiplex PCR Procedure for Genotyping Clostridium perfringens.
19) Meer R.R., Songer, J.G., 1997. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping Clostridium perfringens. Am J Vet Res. 58, 702-705.
20) Tooloei, M., Masodie, M.H., 2008. The distribution and prevalence rate of enterotoxemia in sheep in East Azarbaijan Province, Northwestern Iran, in Spring 2008. J. Anim. Vet. Adv., 1434–1439.
21) Ahsani et al., 2011. Genotyping of isolates of Clostridium perfringens from vaccinated and unvaccinated sheep. Small Ruminant Research. 95, 65–69.
22) Itodo, A.E., 1986. Toxin-types of Closteridium Perfringens strains isolated from sheep, cattle and paddock soil in Nigeria. Veterinary microbiology. 12, 93-96.
23) Gokce, H.B, Genc, O., Sozmen, M., Gokce, G., 2007. Determination of Clostridium perfringens Toxin-Types in Sheep with Suspected Enterotoxemia in Kars Province, Turkey. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 31, 355-360
24) Keyburn, L., Boyce, J., Vaz, P., Bannam, T., Ford, M., Parker, D., Rubbo, A., Road, J., Moore, R., 2008. NetB, a New Toxin That Is Associated with Avian Necrotic Enteritis Caused by Clostridium perfringens. PLOS pathogens. 32, 28-36.
25) Martin, T.G., 2010. The importance of the strain of Clostridium perfringens in the development of necrotic enteritis of poultry. Dissertations Collection for University of Connecticut.

اثر تزریق داخل بطن مغزی انسولین بر گلوکز خون در جوجه های گوشتی

شیبا یوسفوند[۱]؛ فرشید حمیدی[۱*] ؛ مرتضی زنده دل[۲]؛ عباس پرهام[۱]

[۱]بخش فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

[۲]بخش فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

Email: farshidhamidi@um.ac.ir

چکیده:

مقدمه– تحقیقات آزمایشگاهی بر روی جوجه های گوشتی در علوم پایه پر اهمیت می باشد. در مطالعاتی که بر روی رفتار تغذیه ای در جوجه ها جهت کشف مسیرهای نورونی درگیر افزایش و کاهش در اخذ غذا صورت می گیرد بسیاری از نوروترانسمیترها مورد

آزمایش واقع شده و می شوند، یکی از این نوروترانسمیترها، انسولین مغزی است، در این راستا سوالی مطرح است که انسولین مغزی در کنار آثاری که بعنوان یک نوروترانسمیتر بر هسته های هیپوتالاموسی دارد، آیا توانایی تغییر سریع قند خون را نیز دارد یا خیر.

مواد و روش کار- مطالعه حاضر بر روی ۱۲ قطعه جوجه خروس گوشتی نر نژاد راس ۳۰۸ در دو گروه با ۶ قطعه در هر گروه انجام شد. ابتدا با جراحی آسپتیک کانول راهنما در بطن جانبی راست در مغز کار گذاشته شد، سپس به جوجه ها ۷-۵ روز استراحت داده شد. در روز ششم آزمایش انجام شد. در گروه کنترل ۱۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی و در گروه انسولین ۱۰ نانو گرم انسولین (با حجم ۱۰ میکرولیتر) بصورت داخل بطن مغزی تزریق شد. قبل از تزریق و ۳۰ دقیقه بعد از تزریق از جوجه ها خونگیری شد تا میزان قند خون در آن ها بررسی شود.

نتایج- میزان قند خون بین دو گروه کنترل و انسولین قبل از تزریق اختلاف معنی داری با هم نداشتند ($p>۰/۰۵$)، اما در ۳۰ دقیقه پس از تزریق میزان قند خون در گروه کنترل بصورت معنی داری از گروه انسولین بیشتر بود ($p<۰/۰۵$). میزان قند خون در هر دو گروه انسولین و کنترل در ۳۰ دقیقه بعد از تزریق بصورت معنی داری از میزان قند خون این دو گروه در قبل از تزریق بیشتر بود ($p<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه گیری- تزریق مرکزی انسولین باعث ورود انسولین به خون می شود. انسولین در خون موجب افزایش جذب گلوکز به داخل سلول ها و مهار تولید گلوکز می شود و در نتیجه باعث کاهش قند خون می شود. در مطالعه حاضر هم ممکن است تزریق داخل بطن مغزی انسولین موجب ورود انسولین به خون و کاهش قند خون شده باشد.

واژگان کلیدی- جوجه گوشتی، بیهوشی، تزریق داخل بطن مغزی، انسولین، قند خون

مقدمه:

جوجه های گوشتی یک مدل حیوانی رایج و پرکاربرد در تحقیقات علوم پایه دامپزشکی، پزشکی، داروسازی،بیولوژی و ژنتیک می باشند (۳). گلوکز در پرندگان دارای کارکردهای متنوعی است ولی عمل اصلی آن در بدن تولید انرژی است (۲). سطح قند خون در جوجه ها نسبت به اکثر پستانداران بالاتر است (۷) ولی موضوع قابل توجه سطح انسولین پلاسما است که در جوجه یک دهم رت می باشد، که فرضیه تعداد کمتر سلول های بتای جزایر لانگرهانس و انسولین کمتر تولید شده توسط این سلول ها را در جوجه ها تایید می کند (۱۰،۷)، بنابراین برای ایجاد هیپوگلیسمی در جوجه ها مقدار زیادی انسولین اگزوژنوس لازم است (۷).

انسولین علاوه بر سلول های بتای جزایر لانگرهانس در نواحی مختلف مغزی مثل هیپوکامپ، قشر پره فورنتال و پیاز بویایی سنتز می شود. رسپتورهای انسولین در قسمت های مختلف مغزی پراکنده هستند و نقش های مختلف انسولین در مغز مثل متابولیسم گلوکز، انتقال سیناپسی، حافظه و یادگیری را وساطت می کنند (۶). در مطالعاتی که بر روی رفتارهای تغذیه ای در جوجه ها صورت می گیرد تا مسیرهای نورونی درگیر افزایش و کاهش در اخذ غذا کشف شوند بسیاری از نوروترانسمیترها مورد

آزمایش واقع شده و می شوند، یکی از این نوروترانسمیترها، انسولین مغزی است، در این راستا سوالی مطرح بوده است که انسولین مغزی در کنار آثاری که بعنوان یک نوروترانسمیتر بر هسته های هیپوتالاموسی دارد، آیا توانایی تغییر سریع قند خون را نیز دارد یا خیر. بنابراین با توجه به سطح بالای قند خون در جوجه ها و نیاز به دوز بالای انسولین اگزوژنوس برای ایجاد هیپوگلایسمی، در مطالعه حاضر اثر انسولین مغزی بطریقه تزریق داخل بطن مغزی در جوجه خروس های گوشتی بر روی قند خون بررسی شد.

مواد و روش کار:

مطالعه حاضر بر روی ۱۲ قطعه جوجه خروسی گوشتی نر نژاد راس ۳۰۸ تهیه شده از شرکت ماهان (ماهان، ایران) انجام شد. جوجه خروس های یک روزه به مدت دو هفته در قفس گروهی تحت شرایط استاندارد پرورشی و نور مداوم نگهداری شدند و دسترسی آزاد به آب و دان تهیه شده از شرکت چینه (چینه، ایران) را داشتند. سپس پرندگان در دو هفتگی به قفس های انفرادی منتقل شدند و این قفس ها دارای دان خوری و آب خوری مجزا بودند. انسولین و اوانس بلو از شرکت سیگما تهیه شد.

کانول گذاری:

پرندگان در سه هفتگی با میانگین وزنی ۶۸۲/۰۹±۶۹/۹۲ تحت یک عمل جراحی آسپتیک قرار گرفتند. قبل از انجام عمل جراحی به پرندگان ۶ ساعت محرومیت از غذا داده شد (۸). ابتدا پرندگان با ترکیب دارویی زایلازین/کتامین به میزان ml/kg ۰/۲۶ زایلازین و ml/kg ۰/۳۳ کتامین بیهوش شدند و سپس در دستگاه جراحی استریوتاکسیک قرار گرفتند (Stoelting، ایالات متحده). پس از تثبیت سر در دستگاه، کانول راهنما (سرسوزن شماره ۲۳ به طول ۱۶ میلی متر) با مختصات AP=۶/۷mm نسبت به برگما و L=۰/۷mm نسبت به خط میانی و H=۳/۵-۴mm از سطح سخت شامه قرار داده شد و با استفاده از سه عدد پیچ ریز و سیمان دندان پزشکی (مارلیک، ایران) در جمجمه ثابت گردید. ضمناً از یک درپوش کانول که از سیم ارتودنسی نمره ۱۴ (American orthodontics) و دقیقاً هم طول کانول راهنما بود، جهت جلوگیری از ورود عوامل عفونی به درون بطن ها یا مسدود شدن توسط مایع مغزی-نخاعی در فواصل بین تزریقات استفاده شد. در خاتمه عمل جراحی آنتی بیوتیک لینکواسپکتین (رازک، ایران) به میزان ۱ میلی لیتر در عضله سینه پرنده تزریق شد. سپس جوجه ها ۷-۵ روز دوره بهبودی پس از عمل جراحی را سپری کردند. در این مدت کاملاً تحت تیمار بودند (۱۴).

گروه های آزمایشی

این مطالعه دو گروه آزمایشی داشت و از هر گروه دو بار خونگیری صورت گرفت. تزریقات در روز ششم بعد از کانول گذاری انجام شدند. به هر دو گروه سه ساعت قبل از انجام تزریقات محرومیت از غذا داده شد و درست قبل از تزریق انسولین، از تمام جوجه ها در دو گروه خونگیری شد. بعد از خونگیری، گروه کنترل ۱۰ میکرو لیتر سرم فیزیولوژی و گروه انسولین،۱۰ نانو گرم انسولین در ۱۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی را بصورت داخل بطن مغزی دریافت کردند. بلافاصله بعد از تزریق جوجه ها به داخل قفس بازگردانده شده و آب و غذای تازه در اختیار آن ها قرار داده شد. ۳۰ دقیقه پس از تزریق مجدداً از هر جوجه خونگیری شد. در

هر دو مرحله خونگیری از ورید وداج انجام شد (۱۱). در خلال تزریقات جوجه ها با دست مقید می شدند تا استرس حاصل از تزریقات به حداقل برسد. تزریقات با استفاده از سرنگ هامیلتون انجام می گرفت و حجم تزریق هم ۱۰ میکرولیتر بود. در پایان تزریقات میزان ۱۰ میکرولیتر رنگ اوانس بلو بصورت داخل بطن مغزی در جوجه ها تزریق شد، سپس پرنده ها کشتار و مغز آنها خارج شد تا جهت تایید صحت تزریق مورد استفاده قرار گیرند.

آنالیز آماری:

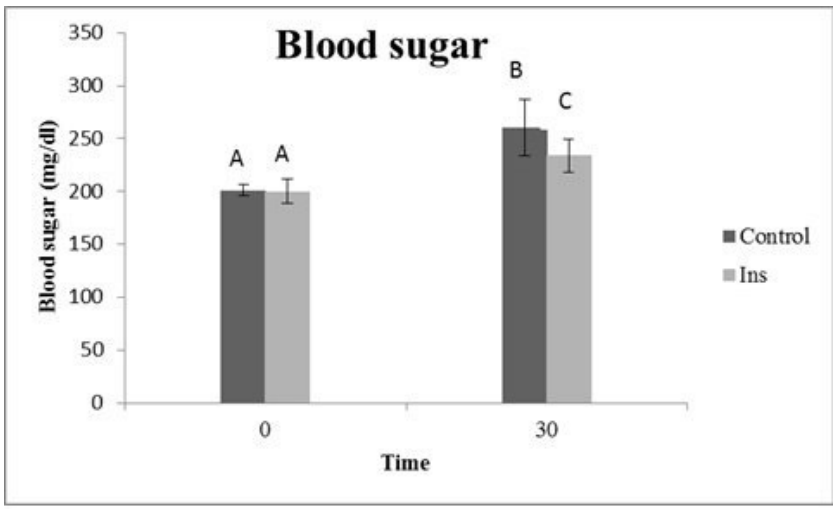
برای مقایسه قند خون گروه های کنترل و انسولین (دوز ۱۰ نانوگرم) با هم در قبل و بعد از تزریق از آزمون تی مستقل (Independent Sample *t* Test) و برای مقایسه قند خون هر گروه در قبل از تزریق و با گروه متناظرش در بعد از تزریق از آزمون تی زوجی (Paired Sample *t* Test) استفاده شد و سطح معنی داری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج:

نتایج حاصل از مطالعه حاضر، که بررسی اثر تزریق داخل بطن مغزی دوز ۱۰ نانو گرم انسولین بر میزان قند خون در جوجه خروس های گوشتی است در نمودار شماره ۱ ارائه شده است.

میزان قند خون بین دو گروه کنترل و انسولین قبل از تزریق اختلاف معنی داری با هم نداشتند ($p>۰/۰۵$)، اما در ۳۰ دقیقه پس از تزریق میزان قند خون در گروه کنترل بصورت معنی داری از گروه انسولین بیشتر بود ($p<۰/۰۵$). میزان قند خون در هر دو گروه انسولین و کنترل در ۳۰ دقیقه بعد از تزریق بصورت معنی داری از میزان قند خون این دو گروه در قبل از تزریق بیشتر بود ($p<۰/۰۵$).

همچنین در بررسی مغزهای خارج شده، مشاهده منظره بنفش رنگ اوانس بلو در بطن جانبی، تأیید کننده صحت تزریقات بود (۵). فقط داده های حاصل از تزریقات صحیح در آنالیز آماری مورد استفاده قرار گرفتند.



نمودار شماره ۱: اثر تزریق داخل بطن مغزی انسولین بر میزان قند خون در جوجه خروس های گوشتی. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه های کنترل و انسولین (دوز ۱۰ نانوگرم) در زمان قبل از تزریق و بعد از تزریق است. داده ها بصورت Mean±SD ارائه شده اند.

تصویر شماره ۱ : تزریق انسولین به صورت داخل بطن مغزی بوسیله سرنگ هامیلتون در جوجه خروس گوشتی.

بحث:

بطور معمول جوجه ها به انسولین حساس نیستند و برای ایجاد پاسخ متابولیکی به درمان با انسولین نیازمند دوزهای بالای انسولین هستند (۱). تزریق داخل وریدی دوز ۴۰ میکروگرم/کیلوگرم انسولین در جوجه های ۸ روزه باعث کاهش گلوکز خون می شود (۱۳) و همچنین در مطالعه ای دیگری بیان شده که تزریق دوز ۸۰ میکروگرم/کیلوگرم انسولین در کبوتر نیز باعث کاهش گلوکز خون شده است(۱۲).

در مطالعه حاضر قند خون گروه کنترل و گروهی که دوز ۱۰ نانوگرم انسولین را دریافت کردند در ۳۰ دقیقه پس از تزریق نسبت به قبل از تزریق افزایش معنی داری داشته است که منطقی است، و علت آن تغذیه مجدد جوجه های گرسنه بلافاصله بعد از تزریق باشد (۴).

مقایسه دو گروه در۳۰ دقیقه پس از تزریق نشان می دهد قند خون در گروهی که دوز ۱۰ نانو گرم انسولین را دریافت کرده نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری یافته است. از آنجا که تزریق داخل بطن مغزی انسولین باعث افزایش سطوح انسولین پلاسما می شود (۴)، بنابراین احتمالاً در مطالعه حاضر، تزریق داخل بطن مغزی انسولین باعث ورود انسولین به خون شده است و همانطوریکه در مطالعات قبلی اشاره شده (۱۲،۱۳) انفوزیون انسولین باعث کاهش گلوکز پلاسما می شود، و همچنین انسولین در خون باعث جذب گلوکز بدرون سلول ها و مهار تولید آن می شود (۹) پس در تحقیق حاضر نیز، افزایش غلظت انسولین مغزی به جهت تزریق داخل بطن مغزی موجب ورود به خون شده و در نتیجه کاهش گلوکز پلاسما را سبب می شود.

نتیجه گیری نهایی:

تزریق داخل بطن مغزی انسولین باعث کاهش معنی دار قند خون جوجه های گوشتی می شود، البته مکانیسم درگیر کاملاً مشخص نیست ولی احتمالاً به سبب ورود انسولین به گردش خون و اثر بر جذب گلوکز توسط سلول ها می باشد، با این وجود اثرات احتمالی بر هسته های مغزی و تاثیر بر مراکز دخیل در اخذ غذا و تاثیر گذاری ثانویه بر قند خون نیاز به تحقیقات و مطالعات بیشتری دارد.

تقدیر و تشکر:

هزینه این طرح تحقیقاتی توسط دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تأمین شده است و در بخش فیزیولوژی و آزمایشگاه مرکزی (دکتر رستگار) دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شده است که بدین وسیله از کارشناسان همکار تشکر و قدردانی میشود.

References:

1) Ashwell, C.M., Mc Murtry, J.P. (2003). Hypoglycemia and reduced feed intake in broiler chickens treated with metformin. Poult Sci. 82:106-110.
2) Braun, E.J., Sweazea, K.L. (2008). Glucose regulation in birds. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 151:1-9.
3) Brown, W. R., Hubbard, S. J., Tickle, C., & Wilson, S. A. (2003). The chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function. Nat Rev Genet. 4: 87-98.
4) Denbow D, Cline M. Food Intake Regulation, In: Scanes, C. ed, Sturkie's Avian Physiology. Sixth edition. Ireland: Academic Press, 2015: 469-485.
5) Denbow, D.M., Van Krey, H.P., Lacy, M.P., Dietrick, T.J. (1983). Feeding, drinking and body temperature of Leghorn chicks: Effects of icv injections of biogenic amines. Physiol Behav. 31:85–90.
6) Duarte, A.I., Moreira, P.I., Oliveira, C.R. (2012). Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. J Aging Res. 2012:1-21.
7) Dupont, J., Dagou, C., Derouet, M., Simon, J., Taouis, M. (2004). Early steps of insulin receptor signaling in chicken and rat: apparent refractoriness in chicken muscle. Domest Anim Endocrinol. 26: 127-142.

8) Hamidi, F., Zendehdel, M. (2015). Effect of food deprivation on the survival rate of broiler cockerels after stereotactic brain surgery. Pajouhesh & Sazandegi. 1: 67-72. (In Persian).
9) Obici, S., Feng, Z., Karkanias, G., Baskin, D.G., Rossetti, L. (2002). Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. Nat Neurosci. 5:566.
10) Rideau, N., Derouet, M., Grimsby, J., Simon, J. (2010). Glucokinase activation induces potent hypoglycemia without recruiting insulin and inhibits food intake in chicken. Gen Comp Endocrinol. 169:276-283.
11) Stevens, R.W., Ridgway, G.J. (1966). A technique for bleeding chickens from the jugular vein. Poult Sci .45:204-205.
12) Sweazea, K.L., McMurtry, J.P., Braun, E.J. (2006). Inhibition of lipolysis does not affect insulin sensitivity to glucose uptake in the mourning dove. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 144:387-394.
13) Tokushima, Y., Takahashi, K., Sato, K., Akiba, Y. (2005). Glucose uptake in vivo in skeletal muscles of insulin-injected chicks. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 141:43-48.
14) Zendehdel, M.O., Babapour, V.A., Asadi, S.A. (2009). Effects of intracerebroventricular injections of glucose and insulin on food intake in broiler cockerels. Pajouhesh and Sazandegi 22:6-12. (In Persian).