تأثیر۲۲ هفته تمرین هوازی بر بیان اینترفرون گاما و زیر رده‌های لکوسیتی در روند تولید پادزهر

میترا عزیزی ماسوله[۱]، عبدالعلی بنایی فر[۲*]، عباس زارع میرک آبادی[۳]، نادر شاکری[۴]

ص.ص: ۸۲-۶۷
تاریخ دریافت: ۹۷/۰۴/۰۸
تاریخ تصویب: ۹۷/۰۹/۰۲

چکیده

بکارگیری فعالیّت‌های ورزشی به‌عنوان روش غیر دارویی می‌تواند در فرایند تولید پادزهر و حفظ و ارتقا سلامت دام نقش مهمّی را ایفا کند. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثرات تمرین هوازی بر بیان اینترفرون گاما و زیر رده‌های لکوسیتی در روند تولید پادزهر بود. بدین منظور، ۱۰ رأس اسب نژاد متفاوت بالغ ۸- ۵ ساله با میانگین وزنی۳۵۰-۳۰۰ کیلوگرم در چرخه تولید پادزهر به‌صورت تصادفی به دو گروه زهر (V) و گروه زهر + تمرین (TV) تقسیم شدند. گروه آزمایشی، برنامه تمرینات هوازی را به‌مدّت ۲۲ هفته، ۳ جلسه در هفته و حداکثر زمان ۳۰ دقیقه با شدت ۶۰-۵۰ درصد ماکزیمم ضربان قلب انجام داد ند . از آزمودنی‌های هر دو گروه در دو نوبت، قبل از شروع و پایان پروتکل از طریق سیاهرگ وداج خون‌گیری به‌عمل آمد.نتایج تحقیق نشان داد، تعداد گلبول‌های سفید و لنفوسیت‌ها، نسبت به سطوح پایه کاهش یافت. همچنین تعداد مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها روند افزایشی را نشان داد، که این افزایش در هیچ یک از متغیرها معنادار نبود. از سوی دیگر میزان اینترفرون گاما بعد از ۲۲ هفته تمرین نسبت به سطوح پایه کاهش یافت ولی این کاهش معنادار نبود. در مجموع نتایج تحقیق حاضر نشان داد یک دوره تمرین استقامتی ۲۲ هفته‌ای می‌تواند در میزان اینترفرون گاما و زیر رده‌های لکوسیتی به-

[۱] . گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد تهران جنوب دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲]. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد تهران جنوب دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. (راهنمای اول)
[۳]. بخش سرم های درمانی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)،کرج، ایران (راهنمای دوم)
[۴]. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. (مشاور)
* ایمیل نویسنده مسئول: alibanaeifar@yahoo.com

منظور حفظ و ارتقاء سلامت دام تغییر ایجاد کند ولی جهت معنادار بودن تغییرات این شدّت از تمرینات تأثیرات معناداری را در تعدیل تغییرات ایمونولوژیکی در گروه تمرین نداشته است.

واژگان کلیدی: فعالیت هوازی، فاکتورهای لوکوسیتی، اینترفرون گاما، پادزهر.

مقدمه

افزایش تولید و بهبود کمی و کیفی سرم‌های درمانی در سلامت عمومی جامعه نقش بسزایی دارد. در چرخه تولید سرم‌های درمانی، اسب‌ها به منزله یک کارخانه تولید پادزهر عمل می‌کنند. بنابراین وضعیت سلامت عمومی آن‌ها به‌طور مستقیم و غیر مستقیم بر کیفیت سرم‌های درمانی تأثیر به سزائی داشته و آن‌ها را به‌مدّت بیشتری در چرخه تولید نگه می‌دارد. تزریق زهر موجب سندرم واکنش التهابی سیستمیک و هم‌چنین هیپرترمی یا هیپوترمی، لکوسیتوز، نوتروفیلی، لنفوپنی، ائوزینوفیلیا و کاهش کل پروتئین‌ها در حیوان می‌شود(۶). شواهد جمع‌آوری شده از مطالعات حیوانی و تجربه بالینی نشان می-دهد که دخالت آبشار التهابی و انتشار سیتوکین‌ها نقش مهمی در پاتوژنز بسیاری از سندرم‌های ناشی از زهر ایفا می‌کند.

سایتوکاین‌ها ازسلول‌هایی هم‌چون سلول‌های ایمن، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های ذخیره کننده-ی چربی ترشح می شوند. این عوامل دارای اجزای مختلفی اند که در این میان اینترفرون‌ها دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشند(۲۴). اینترفرون گاما سایتوکاین اصلی فعال کننده‌ی ماکروفاژ است و در ایمنی ذاتی و اکتسابی با واسطه ی سلولی بر علیه میکروب‌های داخل سلولی، نقش اساسی بر عهده دارد(۱).

از سوی دیگر با توجه به این‌که حیوانات واکسینه شده اغلب به علت اثرات ناشی از سم ایمونوژن‌ها و بی‌تحرکی بیمار می‌شوند و زندگی کوتاه‌تری را تجربه می‌کنند(۵). استفاده از فعالیت‌های ورزشی به-عنوان روش غیر دارویی می‌تواند گزینه‌ای در جهت حفظ و ارتقا سلامت دام باشد. درسال‌های اخیر تغییرات ایمونولوژیکی ناشی از فعالیت‌بدنی، مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است. تحقیقات نشان داده است فعالیت ورزشی با تغییر در شرایط متابولیکی و نوروآندوکرینی بر روی سیستم ایمنی و ایمنوگلوبولین های سرم تأثیر می‌گذارد(۴). فعالیت‌بدنی موجب تغییرات در تعداد و توزیع زیرگروه‌ها و هم‌چنین تکثیر گلبول‌های سفیدخونی می‌شود. نوع، شدت و مدت فعالیت بدنی از جمله مهم‌ترین عواملی هستند که می‌توانند پاسخ‌های ایمنی را تحت تاثیر قرار دهند(۱۴;۳۰). هم‌چنین ورزش تا متوسط می‌تواند پارامترهای مرتبط با ایمنی سلولی را تحریک کرده و از این رو خطر ابتلا به عفونت را کاهش دهد. بنابر این اثرات مفید ورزش منظم برای ارتقای سلامت و درمان بیماری‌ها به وضوح نشان داده شده است. تمرینات ورزشی استقامتی موجب لکوسیتوز در اسب‌ها می‌شود. لکوسیتوز در اسب‌ها می‌تواند در اثر افزایش تعداد نوتروفیل‌ها و کاهش لنفوسیت‌های خون احتمالاً تحت تأثیر افزایش کورتیکواستروئیدهای در حال گردش بوجود آید(۲۵;۲۳). به‌رغم مطالعات مختلفی که به‌صورت جداگانه به بررسی اثرات فعالیّت ورزشی و زهر بر شاخص‌های ایمنی، در راستای ارزیابی سلامت حیوانات و انسان پرداخته است، در این مطالعه، تمرکز محقق بر روی تعیین این موضوع است که آیا بکارگیری تمرینات بدنی با شدت متوسط به عنوان یک روش غیر داروئی می‌تواند شاخص‌های ایمنی ناشی از تزریق زهر در اسب‌های تولیدکننده پادزهر منووالان با هزینه و آسیب کمتر در جهت بهبود تولیدات پادزهر تغییر دهد؟

روش‌شناسی تحقیق

به‌منظور انجام این مطالعه تعداد ۱۰ راس اسب نر بالغ ۸- ۵ ساله با میانگین وزنی۳۵۰-۳۰۰ کیلوگرم که به‌مدت ۲ تا ۳ سال تحت شارژ زهر منووالان قرار داشتند در ایستگاه تحقیقاتی کردان وابسته به موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به‌صورت نمونه‌های در دسترس انتخاب شدند. قبل از ایمن‌سازی با زهر، اسب‌ها به‌منظور کنترل شرایط بالینی مناسب، توسط یک دام‌پزشک ماهر در زمینه طب اسب تحت معاینات بالینی قرار گرفتند. سپس اسب‌ها به صورت تصادفی به دو گروه ۵ تایی، دریافت کننده زهر مار (V) و گروه دریافت کننده زهر مار به‌همراه انجام فعالیت هوازی (TV) تقسیم شدند.

پروتکل تزریق آنتی‌ژن

اسب‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر طی یک دوره ۵ هفته‌ای تحت تزریق آنتی‌ژن قرار گرفتند که پس از اتمام دوره ۵ هفته‌ای به‌منظور جمع‌آوری سرم توسط مؤسسه، طی ۳ مرحله در مدت ۱۰ الی ۱۴ روز ،از اسب‌ها خون‌گیری به‌عمل آمد . سر انجام پس از پایان مراحل خون‌گیری ۴ هفته به اسب‌ها ریکاوری داده شد تا مجدداً برای دوره بعدی تزریق آنتی‌ژن آماده شوند(اسب‌ها در این مدت، زهر مار دریافت نکردند). در تمامی این مراحل اسب‌های گروه (TV) تمرینات هوازی را انجام می دادند درحالی‌که گروه شاهد (V) فاقد فعالیّت‌بدنی منظم بودند و طی این مدت میزان و دفعات تزریق آنتی‌ژن بر اساس پروتکل موسسه سرم‌سازی رازی انجام شد.

برنامه تمرینی

تعداد ۵ رأس اسب تحت شارژ (تزریق آنتی‌ژن) در گروه آزمایش (TV) به‌مدت ۲۲ هفته و هر هفته سه جلسه با شدّت متوسط ۵۵ تا ۶۰ درصد ماکزیمم ضربان قلب در محوطه لونژ مطابق با شکل (۱)در یک برنامه هوازی شرکت کردند. پیش از اجرای پروتکل اصلی، برنامه تمرینی سه جلسه به‌صورت آزمایشی برگزار شد. این جلسات جهت آشنایی با نحوه عملکرد دستگاه پلار[1] (تعیین ضربان قلب استراحتی)و هم‌چنین آشنایی اسب‌ها با محیط لونژ انجام شد. تمرینات در محوطه لونژ در محدوده‌ای دایره‌ای شکل با محیط ۵۳.۳۸ و شعاع ۸.۵ متر انجام گرفت. همچنین هر قسمت توسط صفحات فلزی متحرک از قسمت‌های دیگر جدا می‌شد. تعیین شدت تمرین بر اساس تعداد ضربان قلب در دقیقه محاسبه می شد. بدین منظور، ابتدا تعداد ضربان قلب بیشینه اسب‌ها تعیین گردید (ضربان قلب بیشینه در اسب ۲۱۰ تا ۲۴۰ ضربه در هر دقیقه تعریف شده است(۷)، از آنجائی‌که این اسب‌ها سابقه تمرین نداشتند ماکزیمم ضربان قلب ۲۱۰ در نظر گرفته شده بود. تعداد ضربان قلب بر اساس ماهیت هوازی تمرین بین ۵۵ تا ۶۵ درصد حداکثر ضربان قلب بیشینه (۱۴۰-۱۱۵ ضربه در دقیقه) مورد نظر بود این میزان در اسب‌ها کمتر از ۱۵۰ ضربه در دقیقه است(۱۱). بر این اساس ضربان قلب قبل از فعالیت (در اصطبل) و پس از فعالیت در مرحله ریکاوری (در اصطبل) درهر جلسه به وسیله دستگاه پلار مدل

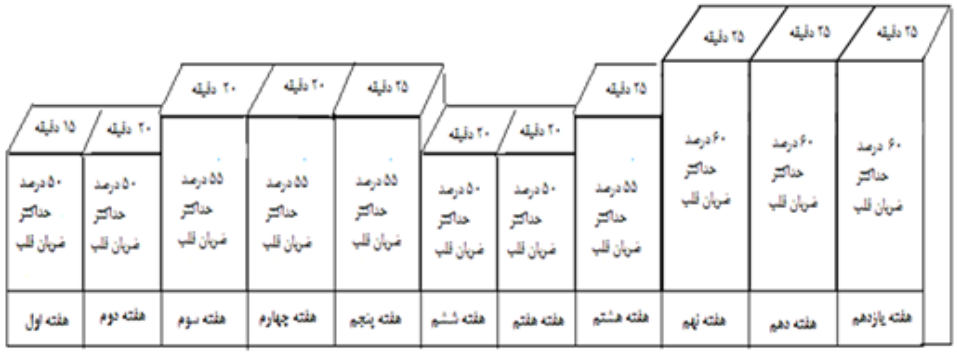
[1]. Polar Beat

(Polar equine M400 GPS-ride-MIT-Bluetooth smart) اندازه گیری شد. هم‌چنین در حین تمرین نیز تعداد ضربان قلب اسب‌ها از طریق این نرم‌افزار کنترل شد. علاوه بر اندازه‌گیری تعداد ضربان قلب، میزان مسافت طی شده نیز در هر جلسه تمرینی به‌وسیله (GPS) دستگاه مذکور برآورد گردید.و نیز با توجه به دو دوره کامل تهیه سرم (۲۲ هفته) در اسب‌ها برنامه تمرینی طراحی شد. در تمامی مراحل، شدت تمرینات بین ۱۴۰- ۱۱۵ ضربه در دقیقه و حداکثر زمان ۳۰ دقیقه به‌مدت سه روز در هفته در نظر گرفته شد. حال با در نظر گرفتن شرایط اسب‌ها طی هر مرحله از چرخه، جزئیات تمرینی به‌شرح ذیل می‌باشد:

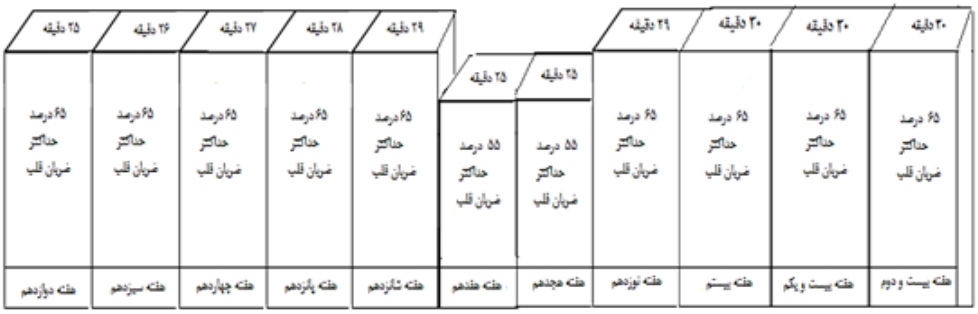
براساس اصل اضافه بار، جلسه اول تمرین باشدت ۵۰ درصد ضربان قلب بیشینه به مدت ۱۵دقیقه شروع و . به‌تدریج این افزایش تا هفته پنجم که توام با ۵ هفته تزریق آنتی‌ژن در اسب‌ها بود، تا شدت ۵۵ درصد ضربان قلب بیشینه و مدت ۲۵ دقیقه رسید. در هفته ششم به‌دلیل جمع‌آوری سرم از اسب‌ها و کاهش حجم خون، شدت تمرینات به ۵۰ درصد ضربان قلب بیشینه و مدت زمانی ۲۰ دقیقه کاهش یافت. این کاهش شدت تا هفته هفتم نیز ادامه داشت. بعد از اتمام مرحله جمع‌آوری سرم و شروع دوره استراحت اسب‌ها، از هفته هشتم تا پایان هفته یازدهم تمرینات همچنان با شدت ۵۵ درصد ضربان قلب بیشینه و مدت ۲۵ دقیقه ادامه داشت تا این که به‌تدریج به میزان ۶۰ درصد ضربان قلب بیشینه ادامه یافت (پایان دوره اول) . با شروع دوره شارژ دوم، تمرینات تا ۶۵ درصد ضربان قلب بیشینه طی مدت زمانی ۲۵ دقیقه رسید که این شدت تا پایان هفته شانزدهم توام با افزایش زمانی تمرین به مدت زمان ۲۹ دقیقه، پایدار ماند. مجدداً در هفته‌های هفدهم و هجدهم شدت تمرین به ۵۵ درصد ضربان قلب بیشینه و زمان به ۲۵ دقیقه کاهش یافت. با شروع هفته نوزدهم تا پایان هفته بیست و دوم میزان شدت همان ۶۵ درصد ضربان قلب بیشینه باقی ماند اما بر مدت زمانی برنامه تمرینی افزوده شد به‌طوری‌که درپایان هفته بیست و دوم مدت زمان تمرین به ۳۰دقیقه رسید.

جلسه تمرین: هر جلسه تمرین شامل ۳ دقیقه راه رفتن و گرم کردن – و ۳ دقیقه سردکردن برای خاتمه کار در نظر گرفته شده بود

پروتکل اصلی هم شامل یورتمه رفتن بر اساس شدت و مدت تعیین شده در هر جلسه بود.



برنامه تمرینی دوره شارژ اول



برنامه تمرینی دوره شارژ دوم

شکل ۱- برنامه تمرینی ۲۲ هفته ای در اسب‌های گروه زهر + تمرین

ارزیابی آزمایشگاهی

با توجه به هدف مطالعه حاضر، زمان‌های خون‌گیری از آزمودنی‌ها به‌ترتیب شامل مراحل ذیل انجام پذیرفت.

۱ : خون‌گیری پایه (۴۸ ساعت بعد از تزریق زهر و قبل از تمرین شروع تمرین).

۲ : ۴۸ ساعت بعد از تزریق زهر و قبل از شروع تمرین در هفته بیست و دوم.

نمونه‌های خون هر یک از اسب‌ها از ورید وداج با استفاده از سوزن‌های یکبار مصرف (۲۱ تا ۰.۸ میلی‌متر) به‌طور مستقیم به لوله‌های ۶ میلی‌لیتری خلاء حاوی EDTA/K2 ساخت کشور چین به منظور سنجش فاکتورهای لوکوسیتی و IFN-γ انتقال یافت. سپس جهت جدا نمودن پلاسمای خون، نمونه ها به مدت 15 دقیقه در دمای 4 درجه‌ی سانتی‌گراد با دور 3000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پلاسمای جدا شده در دمای - 80 درجه ی سانتی‌گراد نگهداری شد تا میزان IFN-γ اندازه‌گیری شود. جهت ارزیابی اینترفرون گاما از روش الایزا با استفاده از کیت ZellBio GmbH Horse ساخت کشور آلمان با حداقل میزان اندازه‌گیری 25تا 800 ng/L و حساسیت 1ng/L استفاده شد. به‌منظور شمارش سلول‌های خونی و زیر رده‌های آن‌ها از دستگاه CELLTACα سازنده شرکت NIHON KOHDEN ژاپن و مدل MEK-6550 استفاده شد. شمارش تفریقی گلبول‌های سفید به روش دستی و با استفاده از میکروسکوپ LEICA مدل DM500 ساخت آلمان صورت گرفت. همه اسب‌ها یک ساعت قبل از خون-گیری تغذیه یکسان داشته و از لحاظ هیجانی وضعیت آرامی داشتند. دستگاه لونژ دارای دو قسمت سخت‌افزاری و نرم‌افزاری است که هر بخش ساخت شرکت (DELTA) مدل (VFD-B) و شرکت (KINCO) مدل (MT4434T) ساخت کشور چین بوده و از طریق آن پروتکل تمرینی در اسب‌ها اجرا شد. اندازه‌گیری تعداد ضربان قلب به‌وسیله دستگاه پلار مدل (Polar equine M400 GPS-ride-MIT-Bluetooth smart) اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری وزن اسب‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال شرکت (OHASUS) مدل (EP241) ساخت کشور سوئد انجام گرفت.

در پژوهش حاضر برای آزمودن فرضیه تحقیق از آزمون تحلیل واریانس ترکیبی ۲ عاملی با اندازه-گیری‌های مکرر در عامل زمان (۲×۲) در سطح ۰/۰۵ استفاده شد. هم‌چنین تمام تحلیل توسط نرم‌افزار spss نسخه ۲۴ انجام گرفتند.

یافته‌ها تحقیق

نتایج تحلیل واریانس ترکیبی ۲×۲ (گروه × آنتی‌ژن) با اندازه‌گیری مکرر در عامل آنتی‌ژن در جدول شماره ۱ نشان داد: اثر تعاملی تمرین و زهر بر تعداد گلبول‌های سفید معنی‌دار نیست این بدین معناست که پس از خارج‌کردن تأثیر پیش‌آزمون اختلاف معناداری بین میانگین دو گروه وجود ندارد. (P=۰/۱۶۴) و تنها تغییرات مربوط به فاکتور زمان بود. هم‌چنین اثر تعاملی تمرین و زهر بر منوسیت‌ها(P=۰/۵۰۰)، نوتروفیل‌ها (P=۰/۵۵۳)، لنفوسیت‌ها (P=۰/۰۶۷) معنی‌دار نیست .هم‌چنین بررسی تغییرات (اثر درون-گروهی) اینترفرون گاما نشان داد این تغییرات در گروه زهر+تمرین نسبت به زهر کاهشی بود. گرچه که این تغییرات معنی دار نبود. این بدان معناست که بیست و دو هفته تمرین در مراحل مختلف تزریق زهر اثر معناداری بر IFN-γ (p=۰/۱۲۱) نداشته است و اثر تمرین بر اینترفرون گاما در مراحل مختلف تزریق زهرمشابه بود.

جدول شماره۱- میانگین و انحراف استاندارد و نتایج تحلیل واریانس ۲ عاملی فاکتورهای ایمونولووژی در زمان‌های قبل از شروع پروتکل (T1) و پایان هفته ۲۲ (T22)

فاکتور هماتولوژیک به تفکیک گروه های مورد مطالعه		T_1 M±SD	T_{22} M±SD	زهر	تمرین	تعامل زهر و تمرین
گلبول‌های سفید (هزار در میکرولیتر)	زهر+تمرین	۸/۳±۰/۲۳	۷/۹۵±۱/۶	η^2=۰/۳۹ P =۰/۰۵۳ ($F_{(۸ ،۱)}$=۵/۱۵	η^2=۰/۱۵ P =۰/۲۵۸ ($F_{(۸ ،۱)}$=۱/۴۸	η^2=۰/۲۲ P =۰/۱۶۴ ($F_{(۸ ،۱)}$=۲/۳۴
	زهر	۹/۸۳±۱/۸	۸/۰۳±۰/۶۳			
منوسیت‌ها (درصد)	زهر+تمرین	۵/۵±۱/۶	۶/۷±۷/۱	η^2=۰/۱۸ P =۰/۲۱۴ ($F_{(۸ ،۱)}$=۱/۸۲	η^2=۰/۰۷ P =۰/۴۴۹ ($F_{(۸ ،۱)}$=۰/۶۳۵	η^2=۰/۰۵ P =۰/۵۰۰ ($F_{(۸ ،۱)}$=۰/۵۰۰
	زهر	۵/۶±۱/۶	۹/۶±۴/۳			
لنفوسیت‌ها (درصد)	زهر+تمرین	۳۹/۷±۵/۸	۳۹/۷±۷	η^2=۰/۳۶ P =۰/۰۶۷ ($F_{(۸ ،۱)}$=۴/۵۰	η^2=۰/۳۰ P =۰/۱۰۱ ($F_{(۸ ،۱)}$=۳/۴۴	η^2=۰/۳۶ P =۰/۰۶۷ ($F_{(۸ ،۱)}$=۴/۵۰
	زهر	۳۸±۱/۴	۳۰/۶±۵/۳			
نوتروفیل‌ها (درصد)	زهر-تمرین	۵۲/۵±۷/۸	۵۵/۲±۷/۸	η^2=۰/۲۵ P =۰/۱۴۱ ($F_{(۸ ،۱)}$=۲/۶۶	η^2=۰/۰۲ P =۰/۶۳۸ ($F_{(۸ ،۱)}$=۰/۲۳۸	η^2=۰/۰۴ P =۰/۵۵۳ ($F_{(۸ ،۱)}$=۰/۳۸۴
	زهر	۵۲/۳±۴/۲	۵۸/۳±۴/۶			

جدول **شماره۲**- **میانگین و انحراف استاندارد و** نتایج تحلیل واریانس ۲ عاملی متغیر انترفرون گاما

در زمان‌های قبل از شروع پروتکل (T1) و پایان هفته ۲۲ (T22)

		T_1 M±SD	T_{22} M±SD	زهر	تمرین	تعامل زهر و تمرین
اینترفرون گاما (پیکو گرم بر میلی لیتر)	زهر+تمرین	۵۵/۳±۲/۷	۳۹/۲۴±۱/۶	P =۰/۱۲۱ η^2=۰/۲۴	P =۰/۴۸۴ η^2=۰/۰۶	P =۰/۱۲۳ η^2=۰/۲۴
	زهر	۴۸/۸±۶/۱	۴۸/۷±۳/۶۳			

بحث و نتیجه گیری

شواهد جمع‌آوری شده از مطالعات حیوانی و تجربه بالینی نشان می‌دهد که دخالت آبشار التهابی و انتشار سیتوکین‌ها نقش مهمی در پاتوژنز بسیاری از سندرم‌های ناشی از زهر ایفا می‌کند. هم‌چنین اگر تمرین و فعالیت‌بدنی متوسط به‌عنوان محرکی، پارامترهای مرتبط با ایمنی سلولی را تحریک کرده و خطر ابتلا به عفونت را کاهش دهد لازم است بدانیم که آیا بکارگیری تمرینات بدنی با شدت متوسط می‌تواند شاخص‌های ایمنی ناشی از تزریق زهر را در اسب‌های تولیدکننده پادزهر منووالان بهبود بخشد؟

اینتفرون‌گاما یکی از مهم‌ترین سایتوکاین‌هایی است که به‌طور عمده به وسیله‌ی لنفوسیت‌هایT و سلول‌های NK به‌دنبال فعال‌شدن سیستم ایمنی و تحریکات التهابی ساخته می‌شود(۱). نتایج بررسی حاضر نشان داد بیست و دو هفته تمرین هوازی اثر معناداری برIFN-γ (p=۰/۱۲۱) نداشته است. تحقیقات انجام شده نشان دادند که زهر مار از طریق افزایش ترشح سیتوکین‌های Th1 و Th2 موجب تقویت عملکرد سلول‌های NK و B می شوند. جالب است بدانیم که این تأثیر بر پاسخ ایمنی ذاتی و هومورال تا حدودی به‌علت اثرات تحریک‌کننده زهر بر تولید IFN-γ توسط سلول‌های Th1 ایجاد می-شود (۱۳). پاسخ Th1 و Th2 از جمله الگوهای مهم سایتوکاینی هستند که وضعیت پاسخ‌های ایمنی سلولی و ایمنی هومورال را نشان می‌دهند(۱). هم‌چنین بررسی تغییرات (اثر درون‌گروهی) اینترفرون گاما نشان می دهد تغییرات در گروه زهر+ تمرین نسبت به گروه زهر کاهشی بوده است . گرچه این تغییرات در تمامی مراحل معنادار نبود.

این نتایج همسو با نتایج تحقیقات پژوهشگرانی چون غلام نژاد و همکاران(۲۰۱۴)، الوندی و همکاران(۲۰۱۴)، صحت نتایج این تحقیق را که فعالیت بدنی ممکن است موجب کاهش در میزانIFN-γشود را تأیید می‌کند(۱۰;۲). گزارش‌های مختلف حاکی از تأثیر متفاوت ورزش بر میزان این سایتوکاین می‌باشد. به‌عنوان مثال استنزبرگ و همکاران، گزارش کردند(۲۸). پس از ۲.۵ ساعت دویدن بر روی تردمیل با حد اکثر اکسیژن مصرفی ۷۵٪ کاهش قابل توجهی در سلول‌های Th1 ایجاد کرده است . مطالعات نشان داد ه اند ورزش بلند مدت موجب کاهش غلظت در گردش لنفوسیت‌های نوع۱ تولیدکننده اینترفرون گاما می‌شود این کاهش تا چندین ساعت پس از ورزش پایدار می‌ماند. استارکی و همکاران(۲۰۰۱)،پیش از اجرای یک وحله ورزش شدید به آزمودنی ها آنتاگونیست گیرنده‌های آدرنال آلفا و بتا دادند. نتایج نشان داد با این‌که بلوکه شدن گیرنده‌های آدرنال آلفا و بتا از کاهش ناشی از ورزش در تعداد لنفوسیت‌های T تولیدکننده اینترفرون گاما جلوگیری کرد اما اثری بر میزان اینترفرون گاما تولید شده توسط لنفوسیت‌های تحریک شده نداشت(۲۷). مطالعات مختلف نشان می‌دهند که هم در محیط آزمایشگاه و هم در بدن انسان؛ سلول‌هایT، اینترفرون گاما و اینترلوکین۲ را تولید می‌کنند

و این امر به وسیله‌ی هورمون‌های کورتیزول و اپی‌نفرین متوقف می‌شود(۱۸). اسمیت[1](۲۰۰۰) در تحقیق خود که در مدت زمان ۶ ماه ورزش و هر جلسه ۷۰ دقیقه بر روی ۵۲ مرد و ۱۸ زن انجام داده بود، سایتوکاین‌های مختلفی از قبیل IFN-γ را مورد بررسی قرار داد. نتایج تحقیق نشان داد کهIFN-γ با ورزش کاهش می یابد (۲۴). هم‌چنین در این پژوهش طی ۲۲ هفته تمرین اسب ها وزن انها کاهش یافت که این خود می‌تواند دلیلی بر کاهش اینترفرون گاما در گروه تمرین باشد زیرا وقتی کاهش چربی در بدن اتفاق می افتد ماکروفاژ M1 به ماکروفاژM2 تبدیل می شود و همچنین از آنجایی‌که پروفایل ماکرو فاژ M1 فاکتورهای پیش التهابی اینترفرون گاما، اینترلوکین۶ را بیان می‌کند بنابراین احتمالا کاهش ماکروفاژM1 موجب کاهش اینترفرون گاما در گروه تمرین می‌شود(۱۲). از طرف دیگر نتایج برخی تحقیقات با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی ندارند. از جمله هسن[2]و همکاران(۲۰۰۳) در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند که میزان غلظت پلاسماییTNF-α و IFN-γ، ۳۰ دقیقه بعد از تمرین افزایش می‌یابد(۱۳).

از سوی دیگر گزارش شده است بلافاصله بعد از ۲۰ کیلومتر دویدن در دونده‌های استقامتی، دفع ادراری اینترفرون گاما بیش از ۵ برابر افزایش یافته است. همچنین غلظت اینترفرون‌گاما یک ساعت بعد از ورزش بالا می رود، ولی تا ۵ ساعت بعد از ورزش به سطح قبل بر می‌گردد(۲۶). اهمیت بیولوژیکی تغییرات در سیستم ایمنی توسط ورزش ناشناخته است، اکثر تحقیقات فقط به پاسخ مستقیم سیتوکین-ها، بلافاصله پس از انواع مختلف فعالیت‌بدنی در سرم یا پلاسما نگاه می‌کنند . تا کنون در اکثر مطالعات، تغییرات پلاسمایی در غلظت سیتوکین‌ها کم بوده است و یا از حد نرمال تجاوز نکرده است. با این حال، در برخی از مطالعات افزایش قابل توجهی از غلظت سیتوکین‌ها در نمونه‌های ادراری مشاهده شده است. شاید این موضوع یکی از دلایل عدم تشخیص تغییرات در غلظت‌های پلاسمایی سایتوکاین‌ها باشد چرا که این تفاوت ممکن است ناشی از ترخیص سریع سیتوکین‌ها از گردش خون باشد(۲۶). داده-های بدست‌آمده از تحقیق حاضر نشان داد تعداد گلبول‌های سفید اسب‌های مورد بررسی در تمامی مراحل ارزیابی در محدوده‌ی طبیعی بین۱۴۳۰۰-- ۵۴۰۰ میکرولیتر قرار دارند (۱۵) و شمار لکوسیت‌ها در طول مراحل تزریق زهر نسبت به پایه در هر دو گروه روند کاهشی را گزارش می کنند . از طرف دیگر، یافته‌های حاصل در مورد تفاوت بین گروهی حاکی از آن است که تغییرات این شاخص در اسب‌ها پس از انجام تمرینات‌بدنی کمتر از گروه کنترل است اما تفاوتی آماری بین دو گروه مشاهده نشد. همسو با مشاهدات این مطالعه نتایج تست‌های انعقادی و هماتولوژی توسط یاملی[3] و

[1]. Smith
[2]. Heesen
[3]. Yamileth

همکاران(۱۹۹۷) و واگمر[1]وهمکاران(۲۰۱۴) افزایش معناداری را در کل تعداد لکوسیت‌ها در اسب هایی که برای تولید آنتی ونوم با زهر مار ایمن شده بودند نشان می دهند (۳; ۳۲).

نتایج بررسی فاکتورهای هماتولوژی واگمر و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد تعداد کل لکوسیت‌های خون اسب‌ها در مقایسه با قبل از تزریق زهر، افزایش داشته است. هم‌چنین این افزایش در طول دوره ایمن سازی به‌صورت تدریجی و پایدار و معناداری باقی مانده است که نشان دهنده مؤثر بودن تزریق زهر جهت فعال سازی سیستم ایمنی می‌باشد(۳۲).

تحقیقات نشان دادند که شمارش لکوسیت‌ها در پاسخ فاز حاد افزایش می‌یابد و این امر در اثر تکرار تلقیح زهر و واکنش حاد آنتی بادی در اسب‌ها ایجاد می‌شود. چنین شرایط التهابی، با افزایش شمارش لکوسیت‌ها همراه است و به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی جهت مبارزه با عفونت و التهاب است که چنین رخ می دهد. البته که . لکوسیتها تحت تاثیر زیر رده‌ها خود قرار می‌گیرند. ۶۰ تا ۷۰ درصد لکوسیت‌ها را نتروفیل و ۱۵ تا ۲۰ درصد آن را لنفوسیت تشکیل می دهند . بنابر این افزایش لکوسیت‌ها ممکن است ناشی از افزایش قابل توجهی از نوتروفیل ها و یا لنفوسیت‌ها در حیوانات واکسینه شده با زهر مار باشد. آنگولو و همکاران (۱۹۹۷) تغییرات کلینیکی و آزمایشگاهی تست‌های انعقادی و هماتولوژی اسب‌هایی که برای تولید آنتی ونوم با زهر مار ایمن شده بودند را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاکی از افزایش معنادار در کل تعداد لکوسیت‌ها بود .افزایش در نوتروفیل ها ۳ ساعت و افزایش در تعداد لنفوسیت‌ها ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از تزریق مشاهده شد. هیچ تغییرات معناداری در ائوزینوفیل، بازوفیل و مونوسیت‌ها مشاهده نشد(۳).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد، میانگین لنفوسیت‌ها در طول مراحل تزریق زهر به طور معنی‌داری کاهش یافت اما میانگین لنفوسیت‌ها در گروه تمرین از گروه کنترل به طور معناداری بالاتر بود. این بدان معنی است که تمرین موجب افزایش لنفوسیت‌ها در گروه زهر+ تمرین شده است . این یافته‌ها با نتایج تحقیقات گائینی و همکاران، نلسن[2] و همکاران و نایمن[3] و همکاران مبنی بر افزایش لنفوسیت بعد از فعالیت ورزشی مطابقت دارد(۱۸;۱۷;۹). مکانیزم‌های اساسی تمرین در رابطه با تغییرات ایمنی چند عاملی هستند و شامل عوامل عصبی ـ هورمونی از قبیل آدرنالین (اپی‌نفرین)، نورآدرنالین (نور اپی‌نفرین)، هورمون رشد و کورتیزول می‌باشند. غلظت این هورمون‌ها در حین فعالیت‌های ورزشی افزایش می‌یابد و اندکی بعد از تمرین به مقادیر اصلی خود باز می‌گردد(۲۱).

اما به‌نظر می‌رسد که این هورمون‌ها اثراتی را روی لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها در مرحله ریکاوری اعمال می‌کنند(۲۰). در همین راستا مطالعات نشان دادند غلظت لنفوسیت‌ها در هنگام تمرین افزایش می‌یابد و بعد از تمرین طولانی‌مدت ، شدید غلظت آن به پائین‌تر از مقادیر شناخته شده آن تا قبل از

[1]. Waghmare
[2]. Nielsen
[3] . Nieman

تمرین می‌رسد. اما تکثیر لنفوسیت‌ها بعد از فعالیت‌های ورزشی تا سطح متوسط سرکوب نمی‌شود. چنین به نظر می‌رسد افزایش غلظت لنفوسیت‌ها به‌دلیل فراخوانی تمام زیر رده‌های لنفوسیتی به خون با انقباض و رهایی اریتروسیت‌ها از جایگاه ذخیره‌ای در طحال همراه بوده است(۱۶).

هم‌چنین نتایج داده ها در این مطالعه نشان داد میانگین نوتروفیل ها در هر دو گروه روند افزایشی داشته اما میانگین نوتروفیل‌ها در گروه تمرین+ زهر نسبت به گروه کنترل کمتر بوده است. گر چه تفاوت معنی داری بین دو گروه یافت نشد. اما نتایج به‌دست آمده از افزایش شمار نوتروفیل‌ها، حاکی از تحریک پاسخ ایمنی ناشی از تزریق زهر بود. تحقیقات نشان دادند افزایش تعداد نوتروفیل‌ها منعکس کننده پاسخ التهابی طبیعی ناشی از تزریق زهر است(۳۱).

بررسی نتایج تحقیقات واگمر و همکاران(۲۰۱۴) و نتو و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند کاهش میزان لنفوسیت‌ها و افزایش تعداد نوتروفیل‌ها منعکس کننده پاسخ التهابی است(۳۲).

از سوی دیگر در تحقیق حاضر کاهش میزان نوتروفیل ها در گروه تمرین+زهر نسبت به گروه زهر بیشتر مشاهده شده که احتمالا این کاهش نشان دهنده التهاب کمتر در تمرین+ زهر نسبت به گروه زهر بوده است.

تادرف[1] و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند گلوکوکورتیکوئیدها به‌صورت مزمن، با اثر بر گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی در سطح سلول‌های پیش ساز لنفوسیت باعث کاهش تولید لنفوسیت‌ها و اختلال در تمایز آن‌ها می‌گردد(۲۹). کاهش تعداد لنفوسیت‌ها از مهم‌ترین نشانه‌های تاثیر استرس مزمن بر فعالیت دستگاه ایمنی است. از آن‌جا که تولید و تمایز نوتروفیل‌های خون تحت تاثیر استرس و هورمون های استرسی قرار نمی‌گیرد(۲۲)، به نظر می رسد که نسبت این دو سلول به هم و تغییرات آن می‌تواند به عنوان یکی از نشانه‌های مهم افزایش فعالیت دستگاه استرسی محسوب شود(۲۹)، و ان نشان دهنده تاثیر منفی استرس ناشی ازتزریق زهر بر سیستم ایمنی و به‌ویژه تعداد لنفوسیت‌ها می باشد

در ارتباط با کاهش کمتر تعداد نوتروفیل‌ها در گروه زهر + تمرین می‌توان فعالیّت‌بدنی به عنوان عامل تعدیل‌کننده تغییرات در این گروه دانست چرا که بررسی لکوگرام ناشی از فعالیّت در اکثر مطالعات بیان‌گر افزایش تعداد لکوسیت‌ها می‌باشد. با وجود این، تفاوت‌های قابل‌توجهی در پاسخ‌های لکوسیتی به‌فعالیّت وجود دارد که ناشی از تفاوت در مدّت و شدّت فعالیّت می‌باشد. محققان نشان دادند برخلاف تمرینات باشدّت بالا، تمرینات ورزشی استقامتی موجب لکوسیتوز در اسب‌ها می‌شود. لکوسیتوز در اسب-ها می‌تواند در اثر افزایش کورتیکواستروئیدهای در حال گردش بوجود آید، که در این میان سرعت فعالیّت تأثیر قابل‌توجهی بر میزان نوتروفیلیا و لنفوسیتوپنیا دارد. در پژوهش پسیون[2](۲۰۱۰) کاهش در نسبت (N/L) همراه با افزایش در تعداد لنفوسیت‌ها به‌عنوان یک پاسخ حاد نسبت به استرس ورزشی

[1]. Taudorf
[2]. Piccione

مشاهده شد(۲۱). افزایش لنفوسیت‌ها احتمالاً نشان‌دهنده رهایش تعداد زیادی از لنفوسیت‌ها به‌داخل گردش خون است که با انقباض و رهایی اریتروسیت‌ها از جایگاه ذخیره ای در طحال همراه بوده است.

از سوی دیگر نتایج نایمن[1] و همکارانش با مطالعه حاضر هم‌خوانی نداشت. در مطالعاتی جداگانه آنها آثار تمرینات طولانی مدت یک تا سه ساعته با شدت متوسط را بر تعداد نوتروفیلها در هنگام و بلافاصله بعد از ورزش و نیز در دورهٔ بازیافت بررسی کردند. آنها دریافتند هر سه وضعیت تمرینی، میزان نوتروفیل‌ها را افزایش می‌دهد(۱۹). این تفاوت ممکن است بستگی به عوامل متعددی، از جمله پیچیدگی سیستم ایمنی و تفاوت در پروتکل های تمرینی داشته باشد. عملکرد سیستم ایمنی به تعدادی از انواع سلول‌ها، سیستم‌های گیرنده، واسطه‌های محلول و تعاملات آن‌ها بستگی دارد.اثرات تمرین بر اجزای مشتق از سیستم ایمنی ممکن است تغییر در وضعیت کلی ایمنی را منعکس نکند .به‌همین دلیل، تغییرات در شدت، مدت زمان یا نوع خاصی از فعالیت می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر پاسخ سیستم ایمنی داشته باشد(۱۹).

نتایج بررسی حاضر مشخص ساخت که میانگین منوسیت‌های گروه آزمایشی از گروه کنترل (زهر) پایین‌تر است اگرچه که این تغییرات معنادار نیست . تغییرات منوسیت‌ها ناشناخته است، اما امکان دارد نشان دهنده نوعی تطابق مثبت با نوع تمرین بکار برده شده باشد. از سوی دیگر ممکن است کاهش تعداد منوسیت_ها به همراه کاهش نوتروفیل‌ها در گروه تمرین+ زهر نسبت به گروه زهر نشان دهنده کاهش التهاب در گروه تمرین بوده باشد.

در مورد پاسخ‌های لکوسیتی و اینترفرون گاما به ورزش‌های استقامتی، یافته های یکدستی وجود ندارد. به هر حال با وجود تحقیقات زیاد درباره‌ی اثرات ورزش بر سیستم ایمنی، توافق کلی وجود ندارد که این خود مربوط به تفاوت در انواع فعالیت‌های ورزشی، شدت و مدت متفاوت تمرینات ورزشی، تفاوت های فردی و تجربه ی ورزشی افراد و اندازه‌گیری های متفاوت عوامل سیستم ایمنی می‌باشد، این مسأله لزوم انجام تحقیقات بیشتری در این زمینه را آشکار می سازد . همان‌طور که مشخص است پاسخ سایتوکاین‌ها به ورزش به ظاهر پیچیده است و به پارامتر های ورزشی، تمرین قبلی، محل اندازه‌گیری سایتوکاین (بافت ، خون، ادرار) و روش اندازه‌گیری بستگی دارد.

در مجموع با بررسی نتایج حاضر به نظر می‌رسد بتوان از تمرینات‌بدنی منظم به‌عنوان گزینه‌ای قابل دسترس و بی‌ضرر به‌منظور حفظ و ارتقاء سلامت دام و اثربخشی محصول، در روند تولید آنتی ونوم بهره جست.

[1] . Nieman

منابع

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pillai, S. (2014). Basic immunology: functions and disorders of the immune system. Elsevier Health Sciences.
2. Alvandi, H., Salehzadeh, K., Najafzade, M.R. and Kalani, A.T. (2014). The effect of strength training on anti-inflammatory cytokines, cortisol and testosterone in overweight men. Euro J Exp Bio, 4, pp.296-302.
3. Angulo, Y., Estrada, R. and Gutiérrez, J. (1997). Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (Crotalinae) antivenom. Toxicon, 35(1), pp.81-90.
4. Berk, L.S., Nieman, D.C., Youngberg, W.S., Arabatzis, K.O.N.S.T.A.N.T.I.N.O.S., Simpson-Westerberg, M.A.R.Y.E.L.L.E.N., Lee, J.W., Tan, S.A. and Eby, W.C. (1990). The effect of long endurance running on natural killer cells in marathoners. Med Sci Sports Exerc, 22(2), pp.207-212.
5. Chippaux JP, Goyffon M. (1998) Venoms, antivenoms and immunotherapy. Toxicon. 1; 36(6):823-46.
6. Domont, G.B., Perales, J. and Moussatche, H. (1991). Natural anti-snake venom proteins. Toxicon, 29(10), pp.1183-1194.
7. Evans, D.L. (2000). Training and Fitness in Athletic Horses: A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation; RIRDC Project No. US-77a. RIDC.
8. Franchimont, D., Galon, J., Gadina, M., Visconti, R., Zhou, Y.J., Aringer, M., Frucht, D.M., Chrousos, G.P. and O'Shea, J.J. (2000). Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. The Journal of Immunology, 164(4), pp.1768-1774.
9. Gaeini, A.A., Fallahi, A.A., Kazemi, A.A. and Kordi, R. (2009). Association between cardiovascular fitness and inflammatory markers in boys aged 11-14 years. Iranian Journal of Pediatrics, 19(3), pp.262-270.
10. Gholamnezhad, Z., Boskabady, M.H., Hosseini, M., Sankian, M. and Rad, A.K. (2014). Evaluation of immune response after moderate and overtraining exercise in wistar rat. Iranian journal of basic medical sciences, 17(1), p.1.

11. Gibbs, P.G., Potter, G.D., Nielsen, B.D., Householder, D.D. and Moyer, W. (1995). Scientific principles for conditioning race and performance horses. The Professional Animal Scientist, 11(4), pp.195-203.
12. Gleeson, M., Bishop, N.C., Stensel, D.J., Lindley, M.R., Mastana, S.S. and Nimmo, M.A. (2011). The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. Nature reviews immunology, 11(9), p.607.
13. Heesen, C., Gold, S.M., Hartmann, S., Mladek, M., Reer, R., Braumann, K.M., Wiedemann, K. and Schulz, K.H. (2003). Endocrine and cytokine responses to standardized physical stress in multiple sclerosis. Brain, behavior, and immunity, 17(6), pp.473-481.
14. Kenney, W.L., Wilmore, J.H. and Costill, D.L. (2018). Physiology of sport and exercise. Human kinetics.
15. Kou, J.Q., Han, R., Xu, Y.L., Ding, X.L., Wang, S.Z., Chen, C.X., Ji, H.Z., Ding, Z.H. and Qin, Z.H. (2014). Differential effects of Naja naja atra venom on immune activity. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014.
16. McCarthy, D.A. and Dale, M.M. (1988). The leucocytosis of exercise. Sports medicine, 6(6), pp.333-363.
17. Nielsen, H.B. and Pedersen, B.K.(1997). Lymphocyte proliferation in response to exercise. European journal of applied physiology and occupational physiology, 75(5), pp.375-379.
18. Nieman, D.C. and Pedersen, B.K. (1999). Exercise and immune function. Sports Medicine, 27(2), pp.73-80.
19. Nieman, D.C.(1997). Immune response to heavy exertion. Journal of applied physiology, 82(5), pp.1385-1394.
20. Pedersen, B.K. and Toft, A.D. (2000). Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. British journal of sports medicine, 34(4), pp.246-251.
21. Piccione, G., Casella, S., Giannetto, C., Messina, V., Monteverde, V., Caola, G. and Guttadauro, S. (2010). Haematological and haematochemical responses to training and competition in standardbred horses. Comparative clinical pathology, 19(1), pp.95-101.
22. Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L.M., de Boer, R.J., Borghans, J.A., Tesselaar, K. and Koenderman, L. (2010). In vivo

labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. Blood, 116(4), pp.625-627.
23. Rose, R.J. and Hodgson, D.R. (1982). Haematological and plasma biochemical parameters in endurance horses during training. Equine veterinary journal, 14(2), pp.144-148.
24. Smith, L.L. (2000). Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress?. Medicine & Science in Sports & Exercise, 32(2), p.317.
25. Snow DH, Kerr MG, Nimmo MA, Abbott EM. (1982). Alterations in blood, sweat, urine and muscle composition during prolonged exercise in the horse. Veterinary Record; 110(16):377-84.
26. Sprenger, H., Jacobs, C., Nain, M., Gressner, A.M., Prinz, H., Wesemann, W. and Gemsa, D. (1992). Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running. Clinical immunology and immunopathology, 63(2), pp.188-195.
27. Starkie, R.L., Angus, D.J., Rolland, J., Hargreaves, M. and Febbraio, M.A. (2000). Effect of prolonged, submaximal exercise and carbohydrate ingestion on monocyte intracellular cytokine production in humans. The Journal of physiology, 528(3), pp.647-655.
28. Steensberg, A., Van Hall, G., Osada, T., Sacchetti, M., Saltin, B. and Pedersen, B.K. (2000). Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. The Journal of physiology, 529(1), pp.237-242.
29. Taudorf, S., Krabbe, K.S., Berg, R.M.G., Pedersen, B.K. and Møller, K. (2007). Human models of low-grade inflammation: bolus versus continuous infusion of endotoxin. Clin. Vaccine Immunol. 14(3), pp.250-255.
30. Vidman, M.P. and Greisheimer, E.M. (2002). Physiology and Anatomy.
31. Voronov, E., Apte, R.N. and Sofer, S. (1999). The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. Journal of venomous animals and toxins, 5(1), pp.5-33.
32. Waghmare, A.B., Salvi, N.C., Deopurkar, R.L., Shenoy, P.A. and Sonpetkar, J.M. (2014). Evaluation of health status of horses immunized

with snake venom and montanide adjuvants, IMS 3012 (nanoparticle), ISA 206 and ISA 35 (emulsion based) during polyvalent snake antivenom production: Hematological and biochemical assessment. Toxicon, 82, pp.83-92.