

## The survey of comparison the effects of selenium nanoparticles and selenit sodium on hematological factors of sheep

Sirous Sadeghian Chaleshtori<sup>1\*</sup>,  
Gholam Ali Kojouri<sup>2</sup>, Abdonnaser Mohebbi<sup>3</sup>,  
Hamid Tavaneimanesht<sup>4</sup>

1. Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

2. Associate Professor, Department of Clinical Science, School of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

3. Professor, Department of Clinical Science, School of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

4. Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

(Received: Mar. 13, 2016 - Accepted: Aug. 20, 2017)

## بررسی مقایسه‌ای اثرات نانوذرات سلنیوم و سلنیت سدیم بر فاکتورهای خونی گوسفند

سیروس صادقیان چالشتوری<sup>۱\*</sup>، غلامعلی کجوری<sup>۲</sup>،  
عبدالناصر محبی<sup>۳</sup>، حمید توانایی منش<sup>۴</sup>

۱. استادیار، گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران،

تهران، ایران

۲. استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد،

شهرکرد، ایران

۳. دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد،

شهرکرد، ایران

۴. استادیار، گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران،

تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۵/۲۹)

### Abstract

The aim of the present study was to compare the effects of oral administration of nanoparticles-selenium and selenit sodium on peripheral blood factors in sheep. For the purpose fifteen sheep, were randomly divided to three groups and to groups 1 nanoparticles-selenium (1mg/kg), prepared by selenium dioxide reduction using ascorbic acid, to groups 2 selenit sodium (1mg/kg) and to group 3 as control group distilled water were orally given for 10 consecutive days. Then, the blood sample were collected from the jugular vein of all sheep into the tubes containing heparin on days 0,10,20 and 30 and on them were determined the hematological factors including hematocrit, erythrocytes, hemoglobin, white blood cell, platelet and total protein concentration was determined by autoanalyzer. For differential cell counting, after the preparation of candle flame smear, were fixed by methanol and were stained with giemsa for 20 minutes. Then the cells number of neutrophils, eosinophils, basophils, monocytes and lymphocytes differential count were by lens 100 of optical microscopy and cedar oil. Statistical analysis in the hematocrit, erythrocytes, hemoglobin, platelets, fibrinogen and total protein showed no significant difference among the three groups on different days. But the survey of the white blood cells count showed a significant increase in group1 on day30 with day 0 and means comparison in group-1 with control group on day 30. Also, the neutrophils count determined a significant increase ingroup 1 on day 30 with day 10 and means comparison in group-1 with two and control groups on day10. The survey of the lymphocytes count showed a significant decrease inmeans comparison in group-1 with two and control groups on day10. The study revealed nanoparticles-selenium compared with sodium selenite increase, the number of white blood cells and neutrophils with greater intensity.

**Keywords:** Hematological factors, nanoselenium, selenit sodium, sheep.

### چکیده

هدف از مطالعه حاضر مقایسه اثرات استفاده خوراکی نانوذرات سلنیوم و سلنیت‌سدیم بر روی فاکتورهای خون محیطی در گوسفند است. برای این منظور ۱۵ راس گوسفند به‌طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند و به گروه یک نانوذرات سلنیوم (۱ میلی‌گرم/کیلوگرم)، تهیه شده به روش احیای اکسید سلنیوم با استفاده از اسید آسکوربیک، به گروه دو سلنیت-سدیم (۱ میلی‌گرم/کیلوگرم) و به گروه سه به عنوان گروه کنترل آب مقطر استریل برای ۱۰ روز متوالی خوراندند. سپس نمونه خون از سیاهرگ وداج تمامی گوسفندها در لوله‌های حاوی هپارین در روزهای ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ جمع‌آوری و بر روی آنها میزان فاکتورهای خونی شامل میزان هماتوکریت، تعداد گلبول‌های قرمز، غلظت هموگلوبین، تعداد گلبول‌های سفید، تعداد پلاکت‌ها و میزان پروتئین تام توسط دستگاه اتوآنالایزر تعیین گردید. جهت شمارش تفریقی سلول‌ها، بعد از تهیه اسمیر شعله شمعی، توسط متانول فیکس شد و با گیمسا به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید. سپس تعداد سلول‌های نوتروفیل، ائوزینوفیل، بازوفیل، مونوسیت و لنفوسیت از طریق لنز شماره ۱۰۰ میکروسکوپ نوری و روغن سدر مورد شمارش تفریقی قرار گرفتند. بررسی آماری در میزان هماتوکریت، گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، پلاکت، فیبرینوژن و پروتئین تام در بین سه گروه، در روزهای مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. اما بررسی میزان گلبول‌های سفید در گروه یک در روز ۳۰ با روز صفر و مقایسه میانگین‌ها در گروه یک با گروه کنترل در روز ۳۰ افزایش معنی‌داری را نشان داد. همچنین میزان نوتروفیل‌ها در گروه یک در روز ۳۰ با روز ۱۰ و مقایسه میانگین‌ها در گروه یک با گروه‌های دو و کنترل در روز ۱۰ افزایش معنی‌دار را مشخص کرد. بررسی میزان لنفوسیت‌ها نشان داد مقایسه میانگین‌ها در گروه یک با گروه‌های دو و کنترل در روز ۱۰ کاهش معنی‌داری وجود دارد. این مطالعه مشخص کرد نانوذرات سلنیوم در مقایسه با سلنیت‌سدیم، تعداد گلبول‌های سفید و نوتروفیل‌های خون را با شدت بیشتری افزایش می‌دهد.

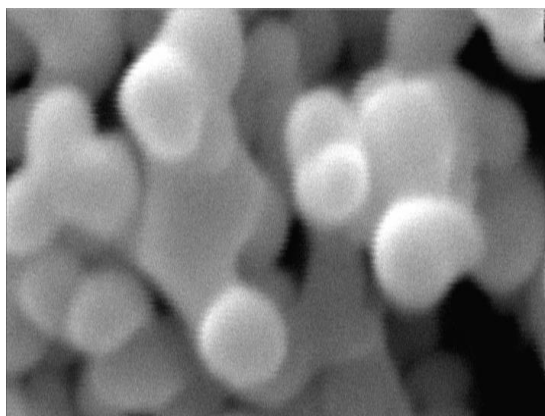
**واژه‌های کلیدی:** سلنیت سدیم، فاکتورهای خون، گوسفند، نانو سلنیوم.

## مقدمه

سلنیوم یکی از عناصر کمیاب است که نقشی اساسی را در زندگی موجودات ایفا می‌نماید. در دهه ۱۹۵۰ اهمیت سلنیوم در تغذیه دام مشخص گردید و نخستین بار در سال ۱۹۵۷ اسپوآرتز و فولتر دریافتند که عنصر سلنیوم می‌تواند جایگزین ویتامین E در جیره غذایی موش شود و از بروز نکروز کبدی در موش‌ها جلوگیری کند، لذا آن را در زمره عناصر ریز مغذی قرار دادند. از مهمترین نقش‌های این عنصر شرکت در ساخت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) و تیوردوکسین ردوکتاز (TrxR) است که در حذف رادیکال‌های آزاد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نقش دارند (Kojouri & Sharifi, 2013). ترکیبات سلنیوم‌دار از تخریب بافتی با حذف مواد سمی و رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کنند و تولید مواد سمی از نوتروفیل‌ها و پروکسیداسیون لیپیدها را کاهش می‌دهند (Bickhardt et al., 1999; Hodgson et al., 2006). اثرات آنتی‌اکسیدان و پرواکسیدان یا توانایی زیستی و مسمومیت سلنیوم بستگی به شکل شیمیایی آن دارد. به‌طوری‌که محققین گزارش کرده‌اند که ذرات نانوسلنیوم کارایی بهتری در مقایسه با سلنیت، سلنوم‌تیونین و متیل-سلنوسیسستین در تنظیم آنزیم‌ها در موش و رت دارند و به‌طور قابل توجهی کاهش مسمومیت حاد با سلنیوم را مشاهده کرده‌اند (Zhang et al., 2005; Wang et al., 2007; Zhang et al., 2008; Kojouri et al., 2012). ذرات نانوسلنیوم را می‌توان به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان با کاهش خطر مسمومیت سلنیوم و به‌عنوان یک نوع ماده شیمی‌درمانی پیشگیرانه استفاده کرد چرا که القای گلوتاتیون اس-ترانسفراز (GST) توسط سلنیوم یک مکانیسم حیاتی برای این اثر است (Wang et al., 2007; Kojouri et al., 2012). مزایای نانوسلنیوم را نسبت به سایر ترکیبات سلنیوم می‌توان این‌گونه بیان کرد: ۱- میزان مسمومیت با نانوسلنیوم بسیار پایین‌تر از سایر ترکیبات سلنیوم است در نتیجه

آسیب‌های کبدی آن هم کمتر است. ۲- نانوسلنیوم سبب تولید بسیار کمتر مالون دی‌آلدئید (MDA) (ماده تولیدی در اثر اکسیداسیون چربی‌ها) خواهد شد، بنابراین یک آنتی‌اکسیدان قوی است. ۳- فعالیت کبد (پاسخی بر علیه ترکیبات آسیب‌رسان به کبد که دارای اثرات آنتی‌اکسیدان است) توسط نانوسلنیوم قدرت بیشتر و طولانی‌تری را از خود نشان می‌دهد. ۴- فعالیت آنزیم‌های GPx و TrxR و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) توسط نانوسلنیوم بیشتر می‌شود بنابراین انتقال سلنیوم بهتر و بیشتر به موضع مورد نظر صورت می‌پذیرد (Sadeghian et al., 2012). ورود سلنیوم به داخل گلبول‌های قرمز و شرکت در ساختمان آنزیم GPx تنها در هنگام ساخته شدن گلبول‌های قرمز امکان‌پذیر است (Radostits et al., 2007)، لذا یکی از اهداف این مطالعه ارزیابی اثرات نانو ذرات سلنیوم بر روی تعداد گلبول‌های قرمز در مقایسه با سلنیت سدیم است. همچنین سلول‌های خون نسبت به محرک‌های مختلف محیط اطراف خود واکنش‌های متفاوتی نشان می‌دهند. یکی از این واکنش‌ها، حرکت سلول‌ها است. نوتروفیل‌ها توان ویژه‌ای جهت حرکت از درون شبکه مویرگی به بافت‌های بدن را دارند. این حرکت می‌تواند بصورت تصادفی یا به طرف مواد جاذب شیمیایی (ماده کموتاکتیک) باشد (Roitt et al., 2006; Abbas et al., 2012). کمبود سلنیوم می‌تواند منجر به کاهش فعالیت آنزیم SOD در داخل نوتروفیل‌ها گردد که این امر منجر به کاهش ظرفیت کشندگی نوتروفیل‌ها می‌شود (Xin et al., 1991). لذا اضافه نمودن سلنیوم به جیره و یا برطرف نمودن کمبود سلنیوم می‌تواند در بدن منجر به بهبود عملکرد ایمنی ذاتی و فعالیت نوتروفیل‌ها گردد. بنابراین یکی دیگر از اهداف این مطالعه ارزیابی اثرات نانو ذرات سلنیوم بر روی تعداد گلبول‌های سفید و خصوصاً تعداد نوتروفیل‌ها در مقایسه با سلنیت سدیم است. بنابراین مطالعه حاضر برای تعیین سطح سلول‌های خون محیطی در گوسفندان سالم در پاسخ به نانوذرات سلنیوم و سلنیت سدیم طراحی شد.

تأیید قرار گرفت. سپس به گروه‌های ۱ و ۲ به ترتیب به مدت ده روز نانو ذرات سلیوم (۱ میلی‌گرم/کیلوگرم) و سلیت سدیم (۱ میلی‌گرم/کیلوگرم) ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ )، وزن مولکولی = ۱۷۲/۹۴، شرکت سیگما با شماره کاتالوگ (۲۱۴۴۸۵) به صورت خوراکی خورانده شدند. در گروه سوم به عنوان گروه کنترل آب مقطر استریل خورانده شد. جیره گوسفندها در طول مطالعه شامل یونجه و جو بدون افزودن مکمل سلیوم بود. میانگین میزان سلیوم (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد) جیره بر اساس ماده خشک  $0/15 \pm 0/49$  میلی‌گرم/کیلوگرم بود.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) از نانوذرات سلیوم با بزرگ‌نمایی  $50000\times$ .

#### نمونه‌گیری و بررسی فاکتورهای خونی

از تمامی گوسفندان در هر سه گروه به‌طور جداگانه نمونه خون از سیاهرگ وداج در روزهای صفر (قبل از خوراندن ترکیبات سلیوم)، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ پس از خوراندن نانو ذرات سلیوم (گروه ۱) و سلیت سدیم (گروه ۲) اخذ شد. نمونه‌های خون اخذ شده در لوله‌های پلی اتیلن اسیدوآش حاوی هیپارین جمع‌آوری و بلافاصله برای بررسی فاکتورهای خونی به آزمایشگاه ارسال شدند. بر روی نمونه‌ها فاکتورهای خونی شامل میزان هماتوکریت، تعداد گلبول‌های قرمز، غلظت هموگلوبین، تعداد گلبول‌های سفید، تعداد پلاکت‌ها و میزان پروتئین تام توسط دستگاه اتوآنالایزر تعیین گردیدند. طوری که ظرف نمونه در حالت عمودی زیر لوله مکنده دستگاه شمارش

#### مواد و روش‌ها

##### روش تهیه نانو ذرات سلیوم

برای تهیه نانو ذرات سلیوم از روش احیای اکسید سلیوم با استفاده از اسید آسکوربیک طبق روش توضیح داده شده توسط Zhang *et al.* (2004) بهره گرفته شد. بدین منظور، ابتدا محلول‌های اسید آسکوربیک (وزن مولکولی = ۱۷۶/۱۲، شرکت سیگما با شماره کاتالوگ ۱۰۴۳۰۰۳) و دی‌اکسید سلیوم (وزن مولکولی = ۱۱۰/۹۶، شرکت سیگما با شماره کاتالوگ ۲۰۰۱۰۷) آماده شد. برای تهیه حدود ۳ گرم نانوذرات سلیوم، ۴/۲۱۶ گرم دی‌اکسید سلیوم در ۱۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و حدود یک گرم اسید آسکوربیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شدند. سپس برای شروع واکنش، محلول اسید آسکوربیک به صورت قطره قطره به محلول دی‌اکسید سلیوم اضافه شد. به این ترتیب غلظت نهایی دی‌اکسید سلیوم در ۲۰۰۰ میلی‌لیتر حجم نهایی برابر  $0/135$  مولار و غلظت نهایی اسید آسکوربیک در آن ۴ برابر یعنی  $0/054$  مولار بود. بعد از اضافه کردن اسید آسکوربیک، ذرات قرمز رنگ نانو سلیوم آغاز به شکل‌گیری کردند که موجب تغییر رنگ محلول از حالت بیرنگ به قرمز شد. رنگ قرمز محلول حاوی دی‌اکسید سلیوم نشان‌دهنده این است که سلیوم در شکل‌های مونوکلینیک و آمورفوس حضور دارد (Zhang *et al.*, 2004). سپس برای جداسازی نانو ذرات، محلول در یک محل آرام برای مدت ۷۲-۴۸ ساعت بدون حرکت قرار داده شد. بررسی نانو ذرات سلیوم به‌دست آمده توسط میکروسکوپ الکترونی (SEM) اندازه ۱۰۰ نانومتر را نشان داد (شکل ۱).

##### گروه‌بندی گوسفندان

۱۵ رأس گوسفند ۱۲-۵ ماهه نر نژاد لری-بختیاری به‌طور تصادفی در ۳ گروه قرار داده شدند. قبل از شروع مطالعه از تمامی گوسفندان نمونه‌گیری به عمل آمد و با انجام آزمایش‌های هماتولوژی و انگل‌شناسی و با انجام معاینات بالینی سلامت آنها مورد

هیچ اختلاف معنی‌داری میان سه گروه و در روزهای مختلف نمونه‌گیری وجود ندارد و می‌توان نتیجه گرفت که خوراندن نانوسلنیوم و سلنیت سدیم بر روی میزان پلاکت‌ها تأثیر معنی‌داری ندارد.

#### میزان گلبول قرمز و هموگلوبین

نتایج به‌دست آمده از تغییرات تعداد گلبول‌های قرمز و میزان هموگلوبین در هر یک از گروه‌ها و در روزهای مختلف نمونه‌گیری در جداول ۲ و ۳ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود نانو ذرات سلنیوم تأثیر معنی‌داری بر این فراسنج‌ها نداشته است. همچنین مقایسه آماری تعداد گلبول‌های قرمز خون و میزان هموگلوبین در روزهای مختلف نمونه‌گیری در گروه‌های تیمار و کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

#### میزان هماتوکریت

نتایج به‌دست آمده از تغییرات میزان هماتوکریت در گروه‌های آزمایشی مختلف در تمام دوره‌های نمونه‌گیری در جدول ۴ آورده شده است. آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی و در دوره‌های مختلف نمونه‌گیری وجود ندارد به این معنی که خوراندن نانوسلنیوم و سلنیت سدیم بر روی میزان هماتوکریت تأثیری ندارد.

سلولی celltac مدل Mek-6450K قرار داده شد و فاکتورهای خونی مورد نظر توسط دستگاه قرائت گردید. جهت شمارش تفریقی سلول‌ها (نوتروفیل، ائوزینوفیل، بازوفیل، مونوسیت و لنفوسیت)، ابتدا توسط لوله مویین یک قطره از نمونه خون روی لام قرار داده شد و اسمیر شعله شمعی تهیه شد. پس از خشک‌شدن در دمای محیط، توسط متانول فیکس شد و در گیمسا به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید. سپس تعداد سلول‌های نوتروفیل، ائوزینوفیل، بازوفیل، مونوسیت و لنفوسیت از طریق لنز شماره ۱۰۰ میکروسکوپ نوری و روغن سدر مورد شمارش تفریقی قرار گرفتند.

#### آنالیز آماری

نتایج با بهره‌گیری از نرم‌افزار سیگما-استات و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) تجزیه و تحلیل آماری شدند. همچنین از آزمون توکی جهت ارزیابی بیشتر در سطح  $P < 0.05$  استفاده شد.

#### نتایج

##### میزان پلاکت

نتایج به‌دست آمده از تغییرات میزان پلاکت‌ها در هر یک از گروه‌ها در تمام روزهای نمونه‌گیری در جدول ۱ آورده شده است. آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که

جدول ۱. میزان پلاکت‌ها ( $\times 10^6/\mu L$ ) (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در هر یک از گروه‌های طی روزهای مختلف نمونه‌گیری

روز نمونه‌گیری	گروه ۱ (نانو سلنیوم)	گروه ۲ (سلنیت سدیم)	گروه کنترل
۰	$524/300 \pm 65/472$	$588/500 \pm 20/642$	$544/800 \pm 60/334$
۱۰	$610/100 \pm 80/776$	$645/700 \pm 55/864$	$580/300 \pm 30/954$
۲۰	$584/200 \pm 47/551$	$540/200 \pm 44/450$	$496/900 \pm 100/248$
۳۰	$572/800 \pm 30/954$	$558/800 \pm 37/268$	$564/600 \pm 45/336$
P value	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$

جدول ۲. میزان گلبول‌های قرمز ( $\times 10^6/\mu L$ ) (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در هر یک از گروه‌های طی روزهای مختلف نمونه‌گیری

روز نمونه‌گیری	گروه ۱ (نانو سلنیوم)	گروه ۲ (سلنیت سدیم)	گروه کنترل
۰	$11/300 \pm 0/412$	$10/820 \pm 0/492$	$10/660 \pm 0/853$
۱۰	$11/660 \pm 0/811$	$10/900 \pm 0/935$	$10/820 \pm 1/260$
۲۰	$10/780 \pm 0/432$	$11/220 \pm 1/248$	$10/520 \pm 1/040$
۳۰	$11/240 \pm 0/288$	$10/120 \pm 1/117$	$10/380 \pm 1/184$
P value	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$

**جدول ۳.** میزان هموگلوبین (g/dL) (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در هر یک از گروه‌ها طی روزهای مختلف نمونه‌گیری

روز نمونه‌گیری	گروه ۱ (نانو سلنیوم)	گروه ۲ (سلنیت سدیم)	گروه کنترل
۰	۱۲/۱۲۰ $\pm$ ۰/۶۶۴	۱۱/۶۸۰ $\pm$ ۱/۰۱۴	۱۱/۱۵۰ $\pm$ ۱/۰۴۴
۱۰	۱۲/۴۵۰ $\pm$ ۱/۰۰۲	۱۱/۹۲۰ $\pm$ ۰/۹۲۲	۱۱/۰۶۰ $\pm$ ۱/۷۶۶
۲۰	۱۱/۵۷۰ $\pm$ ۰/۳۱۴	۱۲/۱۲۰ $\pm$ ۱/۱۲۳	۱۱/۷۴۰ $\pm$ ۱/۱۲۱
۳۰	۱۲/۳۰۰ $\pm$ ۰/۷۷۶	۱۱/۳۶۰ $\pm$ ۰/۴۴۲	۱۱/۴۳۰ $\pm$ ۰/۱۶۸
P value	P > ۰/۰۵	P > ۰/۰۵	P > ۰/۰۵

**جدول ۴.** میزان هماتوکریت (%) (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در هر یک از گروه‌ها طی روزهای مختلف نمونه‌گیری

روز نمونه‌گیری	گروه ۱ (نانو سلنیوم)	گروه ۲ (سلنیت سدیم)	گروه کنترل
۰	۳۲/۰۰ $\pm$ ۱/۲۲۵	۳۰/۴۰۰ $\pm$ ۱/۵۱۷	۳۰/۰۰ $\pm$ ۲/۵۵۰
۱۰	۳۳/۰۰ $\pm$ ۲/۳۴۵	۳۰/۸۰۰ $\pm$ ۲/۹۵۰	۳۰/۴۰۰ $\pm$ ۳/۶۴۷
۲۰	۳۰/۴۰۰ $\pm$ ۱/۱۴۰	۳۱/۶۰۰ $\pm$ ۳/۷۸۲	۲۹/۴۰۰ $\pm$ ۳/۰۵۰
۳۰	۳۱/۸۰۰ $\pm$ ۰/۸۳۷	۲۸/۴۰۰ $\pm$ ۳/۲۸۶	۲۹/۲۰۰ $\pm$ ۳/۷۰۱
P value	P > ۰/۰۵	P > ۰/۰۵	P > ۰/۰۵

### میزان گلبول سفید

همانطور که از جدول ۵ مشاهده می‌شود در گروه یک (نانو سلنیوم) از روز صفر تا روز ۲۰ بر تعداد گلبول‌های سفید خون افزوده شده است. بررسی آماری نشان داد که افزایش معنی‌داری در میزان گلبول‌های سفید در روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ به ترتیب با میزان  $P=۰/۰۳۱$ ،  $P=۰/۰۰۲$  و  $P=۰/۰۰۳$  وجود دارد. به این معنی که تعداد گلبول‌های سفید پس از خوردن نانوسلنیوم روند افزایشی داشته به طوری که حداکثر تعداد آنها در روز ۲۰ بوده و پس از آن به تدریج کاهش پیدا کرده است. در گروه دو (سلنیت سدیم) نیز تعداد گلبول‌های سفید تا روز ۲۰ افزایش یافته است اما این افزایش به اندازه گروه نانوسلنیوم نیست و بررسی آماری نشان داد که در میزان گلبول‌های سفید در روز ۱۰ نسبت به روز صفر ( $P=۰/۰۴۵$ ) و روز ۲۰ نسبت به روز صفر ( $P=۰/۰۲۳$ ) افزایش معنی‌داری وجود دارد اما برخلاف گروه یک (نانوسلنیوم) در روز ۳۰ نسبت به روز صفر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در گروه کنترل در هیچ یک از روزهای نمونه‌گیری اختلاف معنی‌داری از نظر آماری با سطح پایه (روز صفر) و در مقایسه با سایر روزهای نمونه‌گیری مشاهده نگردید. با مقایسه میزان گلبول‌های

سفید در بین سه گروه در روزهای مختلف مشخص گردید که در روز صفر اختلاف معنی‌داری وجود ندارد؛ اما پس از خوردن نانوسلنیوم و سلنیت سدیم تعداد گلبول‌های سفید افزایش یافته، به طوری که در روز ۲۰ در گروه یک در مقایسه با گروه کنترل ( $P=۰/۰۰۱$ ) و در همین روز در گروه دو در مقایسه با گروه کنترل ( $P=۰/۰۴۷$ ) افزایش معنی‌داری وجود داشت. همچنین در روز ۳۰ در گروه یک در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید وجود داشت ( $P=۰/۰۲۱$ ). اما این مقایسه میان گروه‌های دو و کنترل در روز ۳۰ از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. بنابراین می‌توان بیان کرد که استفاده از نانو ذرات سلنیوم سبب می‌شود تا میزان گلبول‌های سفید خون با شدت بیشتر و برای مدت زمان بیشتری در حد بالا قرار بگیرند.

**میزان سلول‌های چند هسته‌ای (نوتروفیل و ائوزینوفیل)**  
همانطور که از جدول ۶ مشخص است، تعداد نوتروفیل‌های خون در گروه‌های یک و دو از روز صفر تا روز ۲۰ افزایش یافته که این افزایش در گروه یک (نانوسلنیوم) بسیار بالاتر است. بررسی آماری نشان داد که در گروه یک افزایش در تعداد نوتروفیل‌ها در روز

بین سه گروه در روزهای مختلف مشخص گردید که در روز ۱۰ در گروه یک در مقایسه با گروه‌های دو ( $P=0/050$ ) و کنترل ( $P=0/049$ ) افزایش معنی‌داری در تعداد نوتروفیل‌ها وجود دارد. همچنین در گروه یک در مقایسه با گروه کنترل در روز ۲۰ ( $P<0/001$ ) و در روز ۳۰ ( $P<0/001$ ) و در گروه دو در مقایسه با گروه کنترل در روز ۲۰ ( $P=0/001$ ) و در روز ۳۰ ( $P=0/010$ ) اختلاف آماری را نشان دادند. این نتایج به خوبی نشان می‌دهند که نانو ذرات سلنیوم، تعداد نوتروفیل‌های خون را با شدت بیشتری افزایش داده‌اند و برای مدت زمان بیشتری در حد بالا حفظ کرده‌اند. میزان ائوزینوفیل‌ها (%) در هر سه گروه در محدوده طبیعی قرار داشت و بررسی آماری بین گروه‌ها و در روزهای مختلف هیچ اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

۱۰ نسبت به صفر ( $P<0/001$ )، روز ۲۰ نسبت به صفر ( $P<0/001$ )، روز ۳۰ نسبت به صفر ( $P<0/001$ ) و روز ۲۰ نسبت به روز ۱۰ ( $P=0/005$ ) معنی‌دار است. بررسی آماری در گروه دو (سلنیت سدیم) نیز نشان داد که مقایسه روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ با روز صفر (میزان  $P$  به ترتیب ۰/۰۱۹، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۳) و روز ۲۰ با روز ۱۰ ( $P=0/003$ ) معنی‌دار است. تفاوت در دو گروه یک و دو در روز ۳۰ نسبت به روز ۱۰ بود که در گروه یک افزایش معنی‌داری میان این دو روز وجود داشت ( $P=0/015$ ). در گروه کنترل تغییرات تعداد گلبول‌های سفید به گونه‌ای است که در هیچ یک از روزهای نمونه‌گیری اختلاف معنی‌داری از نظر آماری با سطح پایه (روز صفر) و در مقایسه با سایر روزهای نمونه‌گیری وجود ندارد. با مقایسه تعداد نوتروفیل‌ها در

**جدول ۵.** میزان گلبول‌های سفید (per/ $\mu$ L) (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در هر یک از گروه‌ها طی روزهای مختلف نمونه‌گیری

روز نمونه‌گیری	گروه ۱ (نانو سلنیوم)	گروه ۲ (سلنیت سدیم)	گروه کنترل
.	۷۴۶۰ $\pm$ ۴۹۷/۹۹۶	۷۴۲۰ $\pm$ ۴۴۹/۴۴۴	۷۴۴۰ $\pm$ ۶۰۲/۴۹۵
۱۰	۸۶۴۰ $\pm$ ۸۷۹/۲۰۴ a	۸۳۸۰ $\pm$ ۷۸۵/۴۹۳a	۷۵۶۰ $\pm$ ۷۹۵/۶۱۳
۲۰	۹۰۲۰ $\pm$ ۴۹۱/۹۳۵ a,A	۸۵۴۰ $\pm$ ۹۳۱/۶۶۵ a,A	۷۴۲۰ $\pm$ ۵۲۱/۵۳۶
۳۰	۸۵۸۰ $\pm$ ۳۴۹/۲۸۵ a,A	۸۱۰۰ $\pm$ ۷۶۸/۱۱۵	۷۵۰۰ $\pm$ ۷۶۸/۱۱۵
P value	$P < 0/05$	$P < 0/05$	$P > 0/05$

a: افزایش معنادار نسبت به روز صفر، A: افزایش معنادار نسبت به گروه کنترل.

**جدول ۶.** میزان نوتروفیل‌ها (%) (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در هر یک از گروه‌ها طی روزهای مختلف نمونه‌گیری

روز نمونه‌گیری	گروه ۱ (نانو سلنیوم)	گروه ۲ (سلنیت سدیم)	گروه کنترل
.	۳۳/۲۰۰ $\pm$ ۱/۹۲۴	۳۲/۴۰۰ $\pm$ ۱/۸۱۷	۳۴/۲۰۰ $\pm$ ۲/۸۶۴
۱۰	۴۳/۲۰۰ $\pm$ ۳/۷۰۱ a,A,B	۳۷/۸۰۰ $\pm$ ۳/۷۰۱ a	۳۵/۰۰۰ $\pm$ ۷/۰۰
۲۰	۶۳/۰۰۰ $\pm$ ۱۰/۸۴۰ a,b,B	۵۵/۲۰۰ $\pm$ ۸/۲۸۹ a,b,B	۳۶/۴۰۰ $\pm$ ۱/۵۱۷
۳۰	۵۲/۸۰۰ $\pm$ ۶/۶۸۶ a,b,B	۴۴/۶۰۰ $\pm$ ۶/۳۸۷ a,b,B	۳۴/۴۰۰ $\pm$ ۲/۵۱۰
P value	$P < 0/05$	$P < 0/05$	$P > 0/05$

a: افزایش معنادار نسبت به روز صفر، b: افزایش معنادار نسبت به روز ده، A: افزایش معنادار نسبت به گروه ۲، B: افزایش معنادار نسبت به گروه کنترل.

نیز معنی‌دار بود. به طوری که در گروه یک (نانوسلنیوم) در روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ نسبت به روز صفر (در هر سه روز  $P<0/001$ ) و در روز ۲۰ نسبت به روز ۱۰ ( $P=0/004$ ) و روز ۳۰ نسبت به روز ۱۰ ( $P=0/030$ ) کاهش معنی‌دار وجود داشت. در گروه دو (سلنیت سدیم) نیز در روزهای ۱۰ و ۲۰ نسبت به روز صفر (در هر دو روز  $P<0/001$ ) و

**میزان سلول‌های تک‌هسته‌ای (لنفوسیت و مونوسیت)**  
نتایج به دست آمده از تغییرات تعداد لنفوسیت‌های خون در هر یک از گروه‌ها و در روزهای مختلف نمونه‌گیری در جدول ۷ آورده شده است. در گروه‌های یک و دو تعداد لنفوسیت‌های خون از روز صفر تا روز ۲۰ کاهش یافتند. این کاهش در تعداد لنفوسیت‌ها از لحاظ آماری

مقایسه با گروه کنترل در روز ۲۰ ( $P=0/002$ ) و در روز ۳۰ ( $P=0/010$ ) اختلاف آماری را نشان دادند. در مورد میزان مونوسیت‌ها نیز باید گفت که تعداد آنها در هر سه گروه در روزهای مختلف نمونه‌گیری در محدوده طبیعی قرار داشت و بررسی آماری بین گروه‌ها و در روزهای مختلف هیچ اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

#### میزان فیبرینوژن و پروتئین تام

نتایج به‌دست آمده از تغییرات میزان فیبرینوژن و پروتئین تام در هر یک از گروه‌ها در تمام روزهای نمونه‌گیری در جدول‌های ۸ و ۹ آورده شده است. بررسی آماری داده‌ها نشان داد که هیچ اختلاف معنی‌داری در میزان فیبرینوژن و پروتئین تام در میان گروه‌ها و در روزهای مختلف نمونه‌گیری وجود ندارد و می‌توان گفت که خوردن نانوسلنیوم و سلنیت سدیم بر روی میزان فیبرینوژن و پروتئین تام تأثیری ندارد.

روز ۳۰ نسبت به روز صفر ( $P=0/002$ ) و همچنین روز ۲۰ نسبت به روز ۱۰ ( $P=0/003$ ) کاهش معنی‌داری وجود داشت. برخلاف گروه یک که در روز ۳۰ نسبت به روز ۲۰ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت در گروه دو در روز ۳۰ نسبت به روز ۲۰ افزایش معنی‌داری در تعداد لنفوسیت‌های خون وجود داشت ( $P=0/047$ ). در گروه کنترل تغییرات تعداد گلبول‌های سفید به گونه‌ای است که در هیچ یک از روزهای نمونه‌گیری اختلاف معنی‌داری از نظر آماری با سطح پایه (روز صفر) و در مقایسه با سایر روزهای نمونه‌گیری وجود ندارد. با مقایسه تعداد لنفوسیت‌ها در بین سه گروه در روزهای مختلف مشخص گردید که در روز ۱۰ در گروه یک در مقایسه با گروه‌های دو ( $P=0/010$ ) و کنترل ( $P=0/035$ ) کاهش معنی‌داری در تعداد لنفوسیت‌ها وجود دارد. همچنین در گروه یک در مقایسه با گروه کنترل در روز ۲۰ ( $P<0/001$ ) و در روز ۳۰ ( $P<0/001$ ) در گروه دو در

جدول ۷. میزان لنفوسیت‌ها (%) (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در هر یک از گروه‌ها طی روزهای مختلف نمونه‌گیری

روز نمونه‌گیری	گروه ۱ (نانو سلنیوم)	گروه ۲ (سلنیت سدیم)	گروه کنترل	P value
۰	$63/800 \pm 1/924$	$65/400 \pm 0/894$	$63/800 \pm 2/588$	
۱۰	$53/600 \pm 3/507$ a,A,B	$59/800 \pm 2/168$ a	$62/200 \pm 6/723$	
۲۰	$34/200 \pm 10/498$ a,b,B	$41/800 \pm 9/230$ a,b,B	$61/800 \pm 2/775$	
۳۰	$34/200 \pm 10/498$ a,b,B	$53/400 \pm 6/107$ a,c,B	$63/600 \pm 2/881$	
	$P < 0/05$	$P < 0/05$	$P > 0/05$	

a: کاهش معنادار نسبت به روز صفر، b: کاهش معنادار نسبت به روز ده، c: افزایش معنادار نسبت به روز بیست، A: کاهش معنادار نسبت به گروه ۲، B: کاهش معنادار نسبت به گروه کنترل.

جدول ۸. میزان فیبرینوژن (g/L) (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در هر یک از گروه‌ها طی روزهای مختلف نمونه‌گیری

روز نمونه‌گیری	گروه ۱ (نانو سلنیوم)	گروه ۲ (سلنیت سدیم)	گروه کنترل	P value
۰	$3/400 \pm 0/455$	$3/100 \pm 0/345$	$3/200 \pm 0/510$	
۱۰	$3/500 \pm 0/202$	$2/900 \pm 1/945$	$3/100 \pm 0/443$	
۲۰	$3/300 \pm 1/346$	$3/200 \pm 0/887$	$3/500 \pm 0/842$	
۳۰	$2/900 \pm 1/007$	$3/300 \pm 0/799$	$3/100 \pm 1/110$	
	$P > 0/05$	$P > 0/05$	$P > 0/05$	

جدول ۹. میزان پروتئین تام (g/L) (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در هر یک از گروه‌ها طی روزهای مختلف نمونه‌گیری

روز نمونه‌گیری	گروه ۱ (نانو سلنیوم)	گروه ۲ (سلنیت سدیم)	گروه کنترل	P value
۰	$66/400 \pm 2/458$	$65/700 \pm 3/720$	$66/200 \pm 3/522$	
۱۰	$65/500 \pm 3/896$	$65/300 \pm 4/453$	$64/800 \pm 4/180$	
۲۰	$66/100 \pm 4/988$	$66/400 \pm 1/873$	$64/900 \pm 6/422$	
۳۰	$66/200 \pm 1/653$	$66/300 \pm 1/545$	$65/500 \pm 2/271$	
	$P > 0/05$	$P > 0/05$	$P > 0/05$	

## بحث و نتیجه‌گیری

اضمحلال مغز استخوان و کاهش خون‌سازی و افزایش حساسیت گلبول‌های قرمز به همولیز می‌شود. به علاوه همولیز ناشی از تشکیل اجسام هینز در دام‌هایی که در مناطق دچار کمبود سلنیوم چرا می‌کنند، دیده شده است (Smith, 2015). همچنین محققین کمبود سلنیوم را به عنوان عاملی در سرکوب فعالیت گلوکوتائون پراکسیداز و افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در بافت‌ها از جمله گلبول‌های قرمز می‌دانند که منجر به افزایش تخریب اکسیداتیو بافت‌ها می‌شود (Van Vleet, 1982; Fraga et al., 1991; Lessard et al., 1987). اگرچه نقش سلنیوم در افزایش مقاومت گلبول‌های قرمز ثابت شده است و کمبود آن به‌عنوان یک فاکتور در وقوع کم‌خونی مورد توجه است اما در مطالعه حاضر این اثرات چندان چشمگیر نبوده است، هرچند از نظر کمی تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هموگلوبین و هماتوکریت در گروهی که نانو ذرات سلنیوم دریافت کرده‌اند کمی بالاتر از گروه سلنیت سدیم است که این ممکن است به دلیل اثر سلنیوم در حد نانومتر بر روی مغز استخوان و افزایش خون‌سازی باشد. لذا به منظور پی بردن به اثر دقیق نانو ذرات سلنیوم بر روی تعداد گلبول‌های قرمز توصیه می‌شود بررسی‌های مغز استخوان صورت گیرد. همچنین در این مطالعه نانو ذرات سلنیوم سبب تغییر معنی‌داری در میزان هماتوکریت، فیبرینوژن و پروتئین تام نگردید. مشابه یافته‌هایمان در مطالعه‌ای که بر روی الاغ انجام گردیده، گزارش شده است (Kojouri & Sharifi, 2013). در رابطه با تغییرات تعداد نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و مجموع گلبول‌های سفید باید گفت که نوع پاسخ سیستم ایمنی بدن و تغییرات لوکوگرام با توجه به نوع جاندار، اختلافات فردی، نوع تغذیه حیوان، درجه درگیری حیوان و حضور استرس متغیر است (Nandra, 1997). نتیجه‌ای که درباره اثر سلنیوم روی سلول‌های خون در این مطالعه به‌دست آمد، آن بود که ترکیبات سلنیوم میزان گلبول‌های

عوامل مختلفی بر روی فاکتورهای خونی تأثیر دارند. یکی از این عوامل تغذیه است و از بین عوامل مغذی نیز سلنیوم در این مهم تأثیر بسزایی دارد (Radostits et al., 2007). در اثر کمبود سلنیوم توانایی کشتن باکتری‌ها توسط نوتروفیل‌ها کاهش می‌یابد (Arvillomi et al., 1983) و کاهش فعالیت نوتروفیل‌ها در اثر کمبود سلنیوم را به سطح پایین آنزیم گلوکوتائون پراکسیداز مربوط می‌دانند، که این امر مؤید نقش ذکر شده برای سلنیوم می‌باشد (Radostits et al., 2007). محققین در مطالعاتشان مزیت‌های نانو ذرات سلنیوم را در مقایسه با دیگر شکل‌های سلنیوم نشان داده‌اند (Wang et al., 2008; Li et al., 2007). نشان داده‌اند که در گروه دریافت‌کننده نانو ذرات سلنیوم میزان ماده واکنش‌دهنده اسید تیوباربتوریک (TBARS) بعد از ۲۰ روز کاهش می‌یابد در حالی که در گروه دریافت‌کننده سلنیت سدیم میزان TBARS تا روز ۳۰ بالا می‌ماند و بازگشت آن به سطح پایه با تأخیر رخ می‌دهد که این نشان‌دهنده اثرات آنتی‌اکسیدانی بهتر نانو ذرات سلنیوم در مقایسه با سلنیت سدیم است. همچنین (Kojouri et al., 2012) نشان دادند نانو ذرات سلنیوم در مقایسه با سلنیت سدیم فعالیت کموتاکسی و انفجار تنفسی را به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد که اثرات تحریکی قوی‌تر نانو ذرات سلنیوم بر روی فعالیت‌های داخل سلولی را نشان می‌دهد. (Huang et al., 2003) نشان داده‌اند که نانو ذرات سلنیوم اثرات قابل توجهی بر روی پاکسازی رادیکال‌های آزاد توسط نوتروفیل‌ها دارد. در رابطه با تغییرات فاکتورهای خونی پس از ورود عامل خارجی به بدن تاکنون تحقیقات زیادی صورت گرفته است و هنوز هم مورد بحث است. اما آنچه باید مورد توجه قرار گیرد تأثیر سلنیوم بر روی توان زنده ماندن گلبول‌های قرمز است. در گوسفند کمبود سلنیوم به‌طور مشخص باعث تغییر و



سد اولیه دفاعی بدن که به عنوان جزئی از ایمنی ذاتی است توجه شود. زمانی یک ماده خارجی می‌تواند سیستم ایمنی اختصاصی را علیه خود فعال کند که از سد ایمنی ذاتی عبور کند و به صورت آنتی‌ژن به سیستم ایمنی اختصاصی عرضه شود ( Tizard, 2013). در واقع اگر همه مواد خارجی که وارد بدن می‌شوند به‌طور کامل توسط سلول‌های بیگانه‌خوار هضم و تخریب شوند، دیگر محرکی برای ایجاد ایمنی اختصاصی باقی نمی‌ماند. اما به منظور راه‌اندازی سیستم ایمنی اختصاصی برخی آنتی‌ژن‌ها باید باقی بمانند. از طرف دیگر اگر همه مواد خارجی که وارد بدن می‌شوند، بتوانند پاسخ ایمنی اختصاصی را راه‌اندازی کنند، دستگاه ایمنی ممکن است برای پاسخ به همه تحریکات خارجی از توانایی کافی برخوردار نباشد (Sadeghian et al., 2012). بنابراین می‌توان گفت که هر چه قدرت نوتروفیل‌ها برای برخورد با عامل محرک بیشتر باشد، میزان آنتی‌ژنی که توسط آنها حذف می‌شود افزایش یافته و میزان آنتی‌ژنی که توسط سلول‌های پرورنده آنتی‌ژن به سیستم ایمنی اختصاصی عرضه می‌شود کاهش می‌یابد. لذا عدم افزایش تعداد لنفوسیت‌ها در تحقیق حاضر را می‌توان به افزایش قدرت نوتروفیل‌ها و عدم برخورد لنفوسیت‌ها با هر گونه عامل محرک مربوط دانست. در مجموع نانو ذرات سلنیوم می‌توانند سبب افزایش مؤثرتر تعداد، مدت زمان بقاء و فعالیت گلبول‌های سفید و نوتروفیل‌ها در مقایسه با سلنیت سدیم شوند. بنابراین فاکتور مهمی در افزایش مقاومت و توانایی دفاع ایمنی ذاتی در گوسفند می‌باشد.

### سپاسگزاری

از تمامی کارکنان بیمارستان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد که در انجام این مطالعه همکاری داشتند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

سفید و به‌طور ویژه تعداد نوتروفیل‌ها را افزایش می‌دهند، اما نانو ذرات سلنیوم در مقایسه با سلنیت سدیم، سبب افزایش چشمگیرتر در سرعت تکثیر گلبول‌های سفید و نوتروفیل‌ها شده و آنها را برای مدت بیشتری در حد بالا حفظ کرده است. علت این امر به دلیل نقش سلنیوم به عنوان آنتی‌اکسیدان و توان آن در حفاظت سلول‌های بدن در برابر آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشد ( Bickhardt et al., 1999). البته با توجه به ماهیت عامل، پاسخ لوکوسیتی در نشخوارکنندگان متفاوت است اما به‌طور کلی در نشخوارکنندگان پیشرفت معنی‌دار نوتروفیلی در پاسخ به آنتی‌ژن اندک است. این امر به علت نسبت پایین نوتروفیل به لنفوسیت در حالت نرمال در نشخوارکنندگان می‌باشد که خود ناشی از نسبت پایین سرعت میلوپوئز است و می‌تواند این حیوانات را به تأخیر در پاسخ گرانولوپوئزی مستعد کند ( Lumsden et al., 1974). برخی از محققین فقدان پاسخ نوتروفیلی بسیار شدید در نشخوارکنندگان را به ذخیره گرانولوسیتی کمتر در مغز استخوان آنها نسبت می‌دهند؛ اما برخی دیگر نشان دادند که ذخیره مغز استخوان در گوسفند و سگ مشابه است و تفاوت در میزان بازگشت ذخیره گرانولوسیتی در مغز استخوان مسئول اصلی تفاوت‌های مشاهده شده در پاسخ لوکوسیتی نشخوارکنندگان می‌باشد ( Jacobs et al., 1994). Pighetti et al. (1998) کمبود سلنیوم را در کاهش قدرت تکثیری لنفوسیت‌ها مؤثر می‌دانند و اعلام کرده‌اند که رسپتور وارد کننده ترانسفرین که در ازدیاد لنفوسیت‌ها مؤثر است در حیوانات مبتلا به کمبود سلنیوم کاهش می‌یابد؛ لذا قدرت تکثیر لنفوسیت‌ها افت می‌کند. آنچه باید در اینجا مورد توجه قرار بگیرد آن است که در نتایج حاصله از تحقیق حاضر، تعداد لنفوسیت‌ها در پاسخ به نانوسلنیوم و سلنیت سدیم تا روز ۲۰ کاهش یافته است. برای تفسیر این رخداد باید به نقش نوتروفیل‌ها به عنوان

## REFERENCES

- Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pillai, S.; (2012). Cellular and Molecular Immunology. (7<sup>th</sup> ed). Elsevier. Philadelphia, USA. p. 55-88.
- Arvillomi, H.; Poikonen, K.; Jokinen, I.; (1983). Selenium and Immune function in humans. *Infection Immunology*; 41: 185-189.
- Bickhardt, K.; Ganterm, M.; Sallmann, P.; (1999). Investigation of the manifestation of vitamin E and selenium deficiency in sheep and goats. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*; 106: 242-247.
- Fraga, C.G.; Ariass, R.F.; Llesuy, S.F.; (1987). Effect of Vitamin E and Se deficiency on rat liver chemiluminescence. *Biochemical Journal*; 242: 383-392.
- Hodgson, J.C.; Watkins, C.A.; Bayne, C.W.; (2006). Contribution of respiratory burst activity to innate immune function and the effect of disease status and agent on chemiluminescence responses by ruminant phagocytes in vitro. *Veterinary Immunology Immunopathology*; 112: 12-23.
- Huang, B.; Zhang, J.; Hou, J.; Chen, C.; (2003). Free radical scavenging efficiency of nano-Se in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*; 35: 805-813.
- Jain, N.C.; (1986). Schalm's Veterinary Hematology. (4<sup>th</sup> ed). Lea & Febiger Publication. Philadelphia, USA. p. 381-383.
- Kojouri, G.A.; Sadeghian, S.; Mohebbi, A.; Mokhber Dezfouli, M.R.; (2012). The effects of oral consumption of selenium nanoparticles on chemotactic and respiratory burst activities of neutrophils in comparison with sodium selenite in sheep. *Biological Trace Elemental Research*; 146: 160-6.
- Kojouri, G.A.; Sharifi, S.; (2013). Preventing Effects of Nano-Selenium Particles on Serum Concentration of Blood Urea Nitrogen, Creatinine, and Total Protein during Intense Exercise in Donkey. *Journal of Equine Veterinary Science*; 33: 597-600.
- Lessard, M.; Yang, W.C.; Elliott, G.S.; (1991). Cellular immune response in Pigs fed a vitamin E & Se Deficient Diet. *Journal of Animal Science*; 69: 1575-1582.
- Li, H.; Zhang, J.; Wang, T.; Luo, W.; Zhou, Q.; Jiang, J.; (2008). Elemental selenium particles at nano-size (Nano-Se) are more toxic to Medaka (*Oryzias latipes*) as a consequence of hyper-accumulation of selenium: a comparison with sodium selenite. *Aquatic Toxicology*; 89: 251-256.
- Lumsden, J.H.; Valli, V.E.O.; McSherry, B.J.; (1974). The Piromen test as an assay of bone marrow Granulocyte reserves in the calf. I. Studies on bone marrow and peripheral blood leukocytes. *The Canadian Journal of Comparative Medicine*; 38: 56-64.
- Nandra, R.K.; (1997). Nutrition and the immune system: an introduction. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 66: S460-S463.
- Pighetti, G.M.; Eskew, M.L.; Reddy, C.C.; Sordillo, L.M.; (1998). Selenium and vitamin E deficiency impair transferrin receptor internalization but not IL-2, IL-2 receptor, or transferrin receptor expression. *Journal of Leukocyte Biology*; 63: 131-137.
- Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Hinchcliff, K.W.; Constable, P.D.; (2007). *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*, (10th ed). Elsevier. Spain. p.552-557.
- Roitt, I.P.; Martin, S.; Burton, D.; (2006). *Roitt's Essential Immunology*, (11th ed). Wiley-Blackwell. England. p. 115-119.
- Sadeghian, S.; Kojouri, G.A.; Mohebi, A.; (2012). Nanoparticles of Selenium as species with stronger physiological effects in sheep in comparison with sodium selenite. *Biological Trace Elemental Research*; 146: 302-8.

- Smith, B.P.; (2015). *Large Animal Internal Medicine*, (5th ed). Elsevier. Missouri. USA. p. 1062-1064.
- Tizard, I.R.; (2013). *Veterinary immunology*. (9<sup>th</sup> ed). Elsevier. China. p. 30-40.
- Van Vleet, J.F.; (1982). Comparative efficacy of five supplementation procedures to control selenium-vitamin E deficiency in swine. *American Journal of Veterinary Research*; 43: 1180-1186.
- Jacobs, R.M.; Smith, H.E.; Whetstone, C.A.; Suarez, D.L.; Jefferson, B.; Valli, V.E.O.; (1994). Haematological and lymphocyte subset analyses in sheep inoculated with bovine immunodeficiency-like virus. *Veterinary Research Communication*; 18: 471-482.
- Wang, H.; Zhang, J.; Yu, H.; (2007). Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. *Free Radical Biology and Medicine*; 42: 1524-1533.
- Xin, Z.; Waterman, D.F.; Hemken, R.W.; (1991). Effect of copper status on neutrophil Function in steers. *Journal of Dairy Science*; 74: 3078-3085.
- Zhang, J.; Wang, H.; Bao, Y.; Zhang, L.; (2004). Nano red elemental selenium has no size effect in the induction of seleno-enzymes in both cultured cells and mice. *Life Science*; 75: 237-244.
- Zhang, J.S.; Wang, H.L.; Yan, X.X.; Zhang, L.D.; (2005). Comparison of short-term toxicity between nano-Se and selenite in mice. *Life Science*; 76: 1099-1109.
- Zhang, J.S.; Wang, X.F.; Xu, T.W.; (2008). Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with Se-methylselenocysteine in mice. *Toxicology Science*; 101: 22-31.