تحقیقات تولیدات دامی

سال پنجم/شماره‌چهارم/زمستان۱۳۹۵ (۴۴-۳۳)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

اثر تلقیح جنینی آرژنین بر تغییرات مورفولوژی سرخرگ ششی، بطن راست و شش‌ها در آسیت القایی جوجه‌های گوشتی

مجتبی حقیقت[1*]، علی اصغر ساکی[2]، حمیدرضا خدایی[1]

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گلپایگان

۲- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

(تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۷ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۵)

چکیده:

به‌منظور بررسی اثرات تزریق آرژنین در روز پنجم جنینی بر تغییرات مورفولوژیکی ایجاد شده در سرخرگ ششی، بطن راست و شش‌ها در شرایط القاء آسیت دو آزمایش طراحی گردید. در آزمایش اول، ۵۶۰ تخم مرغ قابل جوجه کشی به ۷ گروه و هر گروه به چهار زیر گروه تقسیم شد. در روز پنجم جنینی ۰/۵۰ mL محلول آرژنین در نرمال سالین با غلظت صفر، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ mg/mL به زرده شش گروه تزریق شد. در۲۰ روزگی، غلظت اکسید نیتریک و اندوتلین۱ در سرخرگ ششی دو جنین از هر زیر گروه اندازه‌گیری شد. کمترین مقدار اندوتلین۱ (بافت ۱۳/۳۵ ng/۱۰۰mg) و بیشترین غلظت اکسید نیتریک (بافت ۸۹/۹۳μM/۱۰۰mg) در گروه ۴۰ mg/mL مشاهده شد (P<۰/۰۵). در آزمایش دوم، ۳۰۰ تخم مرغ قابل جوجه کشی به دو گروه تقسیم شد و در روز پنجم جنینی به یک گروه محلول آرژنین با غلظت ۴۰ mg/mL تزریق شد. بعد از هچ جوجه‌های نر از ماده جدا شدند. از ۲۱ تا ۴۸ روزگی، دمای سالن به ۱۴-۱۶ °C کاهش یافت و آسیت القا شد. اثر مستقل تزریق آرژنین تلفات ناشی از آسیت را کاهش داد (۱۷/۶ در برابر ۴۸/۸درصد) اما اثر مستقل جنسیت بر تلفات ناشی از آسیت معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). اثرات مستقل تزریق آرژنین مساحت داخلی سرخرگ‌ششی را افزایش داد (۳/۴۷ دربرابر ۲/۶۷mm^2). در تیمارهای بدون تزریق آرژنین نسبت به تزریق آرژنین، شکاف‌هایی در سطح سلولی لایه‌های شش‌ها مشاهده شد. تزریق آرژنین از طریق گشاد کردن سرخرگ ششی و حفظ لایه‌های طبیعی موجود در بافت شش‌ها تلفات ناشی از آسیت را کاهش داد.

واژه‌های کلیدی: آسیت، بطن راست، تزریق آرژنین، سرخرگ ششی، شش‌ها.

*نویسنده مسئول: haghighat@giau.ac.ir

مقدمه:

ناهنجاری افزایش فشار خون ریوی[2] (آسیت) در طیور گوشتی به دلیل سرعت رشد بسیار بالا، محدودیت‌های فیزیولوژیکی، نقص در سیستم قلبی-عروقی و سیستم ریوی ایجاد می‌گردد (Wideman and Hamal, 2011). اصطلاح آسیت به وضعیتی گفته می‌شود که نشانه اصلی آن تجمع غیرطبیعی مایعات کهربایی رنگ در اطراف قلب و حفره شکمی است که نتیجه سلسله واکنش‌هایی است که برای جبران کمبود اکسیژن در بدن اتفاق می‌افتد. این ناهنجاری در گله‌ها متغیر و تلفات ناشی از آن در حدود صفر تا ۳۰ درصد متغیر است (Pavlidis *et al*., 2007). یکی از عواملی که در بروز و ابتلاء آسیت موثر است اسیدآمینه آرژنین است. آرژنین یک اسیدآمینه ضروری در تغذیه طیور است. آرژنین به عنوان ماده اولیه در تولید اکسید نیتریک استفاده می‌گردد، که این ماده نقش‌های متعددی در سیستم ایمنی و تنظیم جریان خون قلبی-ریوی و فشار خون بر عهده دارد و از اینرو در بروز آسیت نقش بارزی ایفا می‌نماید (Khajali and Wideman, 2010). اکسید نیتریک توسط آنزیم نیتریک اکسید سنتتاز از آرژنین ساخته می‌شود که این آنزیم در سلول‌های اندوتلیال رگ‌ها بیان می‌گردد (اندوتلیال اکسید نیتریک سنتتاز (eNOS) یا (NOS-3) (Dil and Qureshi, 2002; Qureshi, 2003). در جوجه‌ها، اکسید نیتریک وظیفه گشاد کردن رگ‌های ششی و کاهش در تولید و انتشار و پاسخ رگ‌ها به منقبض کننده‌های رگ‌ها (مانند اندوتلین ۱) را بر عهده دارد(Hamal *et al*., 2008) . در پرورش جوجه‌های گوشتی امروزی، ظرفیت رگ‌های ششی برای برون ده قلبی، جهت تأمین اکسیژن مورد نیاز برای رشد سریع، در حد کافی نیست (Wideman, 2001). ظرفیت رگ‌های ریوی را می‌توان مربوط به محدودیت‌های متابولیکی بدن پرنده که مربوط به نوا (میزان انقباض) و یا مقاومت ایجاد شده رگ‌های اولیه (سرخرگ ششی) در برابر عبور خون و همچنین محدودیت‌های آناتومیکی و تطبیقی میزان گشاد شدگی رگ‌ها با میزان خونی که باید از آن بگذرد، دانست. رگ‌های ششی در جوجه‌های گوشتی خاصیت ارتجاعی کمی دارد و به طور طبیعی با برون‌ده قلب در شرایط نرمال (استراحت) سازگار است (Wideman *et al*., 1996 a,b). در نتیجه مکانیسم‌های شناخته شده برای به حداقل رساندن رگ‌های ششی در پستانداران ازجمله، اتساع سرخرگ، اتساع مویرگ، و منحرف شدن خون به رگ‌های مناطق دیگر در بدن، به نظر می‌رسد در طیور تأثیر حداقلی داشته باشند. طیور گوشتی دارای حداقل ظرفیت رگ‌های ششی‌اند که باعث افزایش فشار خون سرخرگ ششی و در نهایت سندرم افزایش فشار خون ریوی می‌گردد. در این حالت بطن راست فعالیت زیادی دارد که برون‌ده قلبی مناسبی به شش‌ها منتقل نماید (جهت نرخ متابولیسم بالا در این پرندگان) که در این حالت فشار سرخرگ ششی افزایش می‌یابد (Wideman, 2000; Wideman, 2001). در پرندگان مبتلا به هایپرتروفی بطن راست مقاومت رگ‌های ششی و برون‌ده قلبی نسبت به پرندگان سالم بالاتر است (Wideman *et al*., 2000; Wideman and Tackett, 2000). کاتتریزاسیون[3] سرخرگ ششی در پرندگان به ظاهر سالم نشان داد ابتدا هایپرتروفی بطن راست مشاهده می‌شود و بعد از آن هایپرتروفی سرخرگ ششی مشاهده می‌گردد (Wideman *et al*., 2006). در چنین حالتی هایپرتروفی ویژه بطن راست مشاهده می‌گردد (افزایش در جرم دیواره بطن راست) و ارزیابی وزن بطن راست به وزن کل بطن‌ها نقش محوری افزایش فشار خون ریوی را در سندرم آسیت نشان می‌دهد (Julian 1993; Wideman, 2000; ploog, 1973). در پرندگان سالم فشار سرخرگی ۱۵ میلی‌متر جیوه گزارش گردید اما پرندگانی که مبتلا به فشار خون ریوی بودند این مقدار بین ۱۶ تا ۵۵ میلی‌متر جیوه بود و همچنین نسبت وزنی بطن راست به کل بطن‌ها بین ۰/۲۰ تا ۰/۵۱ بود (Wideman, 2001; Chapman and Wideman, 2001). در این پژوهش اثر تزریق آرژنین به جنین‌های در حال رشد و القای آسیت در دوره رشد جوجه‌های گوشتی بر مورفولوژی سرخرگ ششی، بطن راست و شش‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

[2] Pulmonary Hypertension syndrome

[3] Catheter

مواد و روش‌ها:

این پژوهش شامل یک آزمایش جهت تعیین مقدار مناسب آرژنین جهت تزریق به داخل جنین‌های در حال رشد و یک آزمایش دیگر جهت بررسی اثر تزریق آرژنین بر تغییرات سرخرگ ششی، بطن راست قلب و شش‌ها در آسیت القایی بود.

آزمایش اول: تعداد ۵۶۰ تخم مرغ قابل جوجه کشی سویه راس ۳۰۸ به ۷ گروه و هر گروه به ۴ زیر گروه تقسیم شد. تعداد ۲۰ عدد تخم مرغ قابل جوجه کشی به هر زیر گروه اختصاص یافت. غلظت‌های صفر، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم آرژنین در یک میلی‌لیتر نرمال سالین حل شد. (آرژنین مورد استفاده در این پژوهش از شرکت داملران رازک با خلوص ۹۹/۹۷ درصد تهیه گردید) در روز پنجم جنینی بعد از نور دهی و مشخص شدن وضعیت کیسه هوا و محاسبه درصد باروری، مقدار ۰/۵۰ میلی‌لیتر از محلول‌های تهیه شده به داخل زرده ۶ گروه تخم مرغ-های بارور تزریق گردید و یک گروه بدون هیچ گونه تزریقی درنظر گرفته شد. برای استریل شدن محلول آرژنین از سرنگ فیلتر دار ۰/۲ میکرومتر استفاده شد.. محل تزریق با محلول ۰/۵۰ درصد سدیم هیپوکلراید شستشو شدند. سوراخ کردن سطح خارجی تخم مرغ توسط دستگاهی که برای این کار طراحی گردید صورت گرفت. این دستگاه دارای یک الکتروموتور کوچکی بود که توسط رابط مخصوصی که برای این کار طراحی و ساخته شده بود به یک مته دندان پزشکی متصل شد. و برای از بین بردن لایه کوتیکول و ایجاد سوراخ بسیار ریز استفاده شد. بعد از ایجاد سوراخ بسیار کوچک در سطح تخم مرغ، تزریق توسط سرنگ با سوزن نازک (شماره ۲۱) انجام گرفت (Ohta *et al*., 1999). محل تزریق شده توسط پارافین مذاب مسدود گردید. در طول تزریق سعی شد تا تخم مرغ‌های خارج شده از دستگاه بیشتر از ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نمانند (Uni and Ferket, 2004). شرایط دستگاه جوجه کشی از نظر دما و رطوبت در همه جای آن یکسان بود و تیمارها به صورت کاملاً تصادفی در نقاط مختلف دستگاه قرار داشتند. درصد هچ با توجه به درصد باروری برای تیمارهای مختلف محاسبه شد.

در روز ۲۰ انکوباسیون از هر تکرار ۲ عدد تخم مرغ انتخاب شد و بعد از خارج کردن جنین، سرخرگ ششی بلافاصله بعد از قلب به فاصله نیم سانتیمتر خارج شد و تا زمان اندازه‌گیری غلظت اکسید نیتریک به روش رنگ سنجی با دستگاه اسپکتوفتومتر و استفاده از کیت شرکت لایف ساینس[4] و اندوتلین ۱ به با استفاده از کیت اختصاصی به روش الایزا[5] در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. برای یخ گشایی از دستگاه حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه استفاده شد. به ازاء هر گرم بافت سرخرگ ششی ۱۰ میلی‌گرم بافر هموژنیزاسیون که شامل ۲۵ میلی مولار تریس اسید کلریدریک به PH ۷/۴، یک ملی مولار EDTAT، یک میلی مولار اتیلن گلیکول بیس (دو آمینو اتیل اتر) ۴ ان ترا اسید استیک (ethylene glycol-bis(2-aminoethyl (ether)-n n n' n'-tetraacetic acid اضافه گردید و با دستگاه هموژنایزر (Crusher, USA Silent) هموژن شد (Chapman and Wideman, 2006a). هموژن بدست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سانتریفیوژ g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد و بخش فوقانی برداشته شد و برای اندازه گیری اندوتلین ۱ و اکسید نیتریک (دو تکرار برای هر نمونه) مورد استفاده قرار گرفت. برای اندازه گیری اکسید نیتریک به روش رنگ سنجی از کیت تجاری (Life Science, USA) استفاده شد. میزان اندوتلین ۱ به روش الایزا با استفاده از کیت اختصاصی (Enzo Life Science, USA) اندازه گیری شد. تیماری که بالاترین و پایین‌ترین غلظت‌های اکسید نیتریک و اندوتلین ۱ را در بافت سرخرگ ششی داشتند به عنوان سطح مناسب تزریق در آزمایش دوم مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش دوم: در این آزمایش از ۳۰۰ تخم مرغ قابل جوجه کشی از همان مرغ مادری که تخم مرغ‌های مورد استفاده در آزمایش اول آورده شده بود (سویه راس ۳۰۸)، در کارخانه جوجه‌کشی گروه تولیدی بهپرور واقع در شهرستان لنگرود بعد از نوردهی و محاسبه درصد باروری استفاده شد. دما و رطوبت و سایر شرایط در همه جای دستگاه کاملا یکسان بود. سطح ۴۰ میلی‌گرم آرژنین در

[4] Life Science (ADI-917-020)

[5] Endothelin-1 EIA kit Catalog# ADI-900-020A and

میلی‌لیتر نرمال سالین مشخص شده در آزمایش اول به زرده تعداد ۱۵۰ عدد تخم مرغ تزریق شد و۱۵۰ تخم مرغ نیز به عنوان شاهد بدون تزریق آرژنین استفاده شد. جیره‌های مورد استفاده در دوره پرورش جیره شاهد (مقدار آرژنین برابر توصیه NRC سال ۱۹۹۴) بود که در همه تیمارها یکسان بود. جوجه‌های تفریخ شده از تخم مرغ‌های تزریق شده و تخم مرغ‌های بدون تزریق تعیین جنسیت شدند و به محل پرورش منتقل شدند. آزمایش به صورت یک آزمایش فاکتوریل ۲ ×۲ اجرا گردید. فاکتورها شامل تزریق در دو سطح (تزریق آرژنین و عدم تزریق آرژنین) و جنسیت در دو سطح (نر و ماده) بود که هر تیمار در چهار تکرار و در هر تکرار تعداد ۱۶ پرنده قرار داشت (با توجه به درصد هچ ۸۶/۶۷ درصد در تخم مرغ-های تزریق شده ۸۵/۳۳ درصد در تخم مرغ‌های بدون تزریق). دمای سالن هنگام ورود جوجه‌ها به سالن ۳۲ درجه سانتی‌گراد بود. هر هفته به میزان ۲ درجه سانتی‌گراد از دمای سالن کاسته شد تا در سن ۲۱ روزگی به ۲۶ درجه سانتی‌گراد رسید. از سن ۲۱ روزگی، به منظور القاء آسیت دمای سالن بلافاصله کاهش پیدا کرد و به ۱۶-۱۴ درجه سانتی‌گراد رسید و تا انتهای دوره این دما حفظ گردید (Wideman *et al*., 1995). در سنین ۳۵ و ۴۸ روزگی از هر تکرار دو جوجه انتخاب شد که پس از کشتار و خارج نمودن قلب، شاخص قلب به روش روزی و کاریلو[6]، ۱۹۹۱ محاسبه گردید. در کشتار سن ۴۸ روزگی از بطن راست، سرخرگ ششی و شش‌ها (دو جوجه در هر تکرار) جهت بررسی‌های مورفولوژی نمونه‌برداری شد. ابتدا بطن راست، سرخرگ ششی و شش‌ها با محلول بافر (شامل ۷ میلی مول منو فسفات سدیم، ۳ میلی مول دی فسفات سدیم، ۱۳۰ میلی‌مول کلرید سدیم و pH, ۷/۴) شستشو داده شد تا خون و مواد خارجی از آن جدا شود و برای اینکه بافت‌های مورد نظر حالت طبیعی خود را از دست ندهد فوراً در فیکساتور[7] قرار داده شدند. بعد از گذراندن مراحل آبگیری، شفاف سازی، آغشتگی، قالب گیری و مقطع گیری به روش هماتوکسلین-ائوزین رنگ آمیزی شد و لام تهیه گردید، جهت مشاهده لام‌ها از میکروسکوپ نوری (Ken-a-Vision, USA) با بزرگ‌نمایی‌های ۴، ۱۰ و ۴۰ عدسی شیی استفاده گردید و عکس‌برداری و تفسیر لام‌ها با استفاده از دوربین (Ken-a-Vision, USA) متصل به کامپیوتر و با استفاده از نرم افزار ماتیک ایمیج پلاس ۲ (USA) انجام گرفت قبل از کار با نرم افزار، بر اساس بزرگنمایی مورد استفاده، نرم افزار کالیبره گردید و با دوربین متصل به نرم افزار مساحت داخل سرخرگ ششی، محیط سرخرگ ششی، قطر بزرگ، قطر کوچک، ضخامت سرخرگ ششی، ضخامت ماهیچه بطن راست اندازه گیری شد و از سطح بافت شش‌ها عکس تهیه گردید. نتایج بدست آمده در آزمایش اول دز قالب طرح کاملاً تصادفی آنالیز شد. آزمایش دوم در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از آزمون فاکتوریل ۲×۲ تجزیه شد. میانگین اثرات معنی دار، در تجزیه واریانس با آزمون چند دامنه‌ای دانکن و فرض خطای ۰/۰۵ مقایسه گردید. برای تلفات ناشی از آسیت از آزمون مربع کای استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS ویرایش ۹/۲ (۲۰۰۰) انجام شد.

نتایج و بحث:

آزمایش ۱: نتایج بدست آمده از آزمایش اول در جدول ۱ نشان داده شده است. بین تیمارها از نظر درصد باروری تفاوت معنی داری وجود نداشت (P=۰/۲۶۳۴). اما از نظر درصد هچ بین تیمارها تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید (P<۰/۰۰۰۱) و کم‌ترین درصد هچ مربوط به تیمار صفر میلی گرم آرژنین در میلی‌لیتر نرمال سالین (تزریق ۰/۵۰ میلی‌لیتر نرمال سالین) مشاهده شد که به طور معنی داری کمتر از سایر تیمارها بود. هرچند تفاوت معنی داری بین درصد هچ تیمار بدون تزریق با سطوح مختلف تزریق آرژنین مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). پایین‌ترین غلظت اندوتلین ۱ در سرخرگ ششی بدست آمده از جنین در تیمار تزریق ۴۰ میلی گرم آرژنین در میلی‌لیتر نرمال سالین مشاهده شد که بالاترین غلظت آن در تیمار بدون تزریق آرژنین مشاهده گردید.

[6] Rossi and Carillo
[7] Fixator

جدول ۱- اثر تزریق (۰/۵ mL) محلول آرژنین (در نرمال سالین) به زرده تخم مرغ‌های بارور در روز پنجم انکوباسیون بر باروری، هچ و غلظت اندوتلین ۱ و اکسید نیتریک در سرخرگ ششی جنین‌ها در ۲۰ روزگی انکوباسیون.

Table 1. Effects of yolk in ovo injection of 0.50 ml arginine solution (in normal saline) at 5th day of incubation on fertility (%), hatching, nitric oxide and endotheline I concentration in pulmonary artery in twentieth day of incubation

Treatments		Fertility (%)	Hatching (%)	Endothelin 1 (ng/100mg tissue)	Nitric Oxide (µmol/100mg tissue)
None Injection		90.48	65.32[a]	137.06[a]	6.38[d]
	0	92.32	50.89[b]	128.74[a]	6.98[d]
	20	90.14	60.10[a]	136.07[a]	8.40[c]
	40	91.49	63.55[a]	89.93[c]	13.35[a]
Arginine(mg/mL)	60	92.09	69.20[a]	107.56[b]	12.28[b]
	80	92.46	64.00[a]	108.17[b]	11.13[b]
	100	93.71	63.84[a]	105.74[b]	10.21[b]
	SEM	0.278	0.436	1.18	0.096
	P-value	0.2634	<0.0001	<0.0001	<0.0001

[a,d] Values with different superscripts within same column are significantly different ($P<0.05$)

هرچند بین این تیمار (بدون تزریق آرژنین) و تیمارهای تزریق صفر میلی گرم آرژنین در میلی‌لیتر نرمال سالین (تزریق ۰/۵۰ میلی‌لیتر نرمال سالین)، و تیمار تزریق ۲۰ میلی‌گرم آرژنین در میلی لیتر نرمال سالین اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. تیمارها در غلظت اکسید نیتریک در سرخرگ ششی اختلاف معنی داری نشان دادند (*P*<۰/۰۰۰۱). بالاترین غلظت اکسید نیتریک در تیمار تزریق ۴۰ میلی گرم آرژنین در میلی‌لیتر مشاهده گردید. پایین‌ترین غلظت اکسید نیتریک در سرخرگ ششی در تیمارهای بدون تزریق و تزریق صفر میلی گرم آرژنین در میلی‌لیتر (تزریق ۰/۵۰ میلی‌لیتر نرمال سالین) مشاهده شد. بالاترین غلظت اکسید نیتریک و در عین حال پایین‌ترین غلظت اندوتلین ۱ در تیمار تزریق ۴۰ میلی گرم آرژنین در میلی‌لیتر نرمال سالین مشاهده شد.

در دیواره رگ‌ها اکسید نیتریک توسط عمل آنزیم اندوتلیال اکسید نیتریک سنتتاز از ال-آرژنین تولید می‌گردد (Palmer and Moncadan, 1989). این آنزیم به غشاء پلاسمایی اندوتلیوم متصل است (Khajali and Wideman, 2010). پیشنهاد شده است که بین ایزو فرم‌های آنزیم‌های اکسید نیتریک سنتتاز و اندوتلین‌ها رابطه‌ای وجود دارد، به‌طوریکه افزایش بیان ژن اکسید نیتریک سنتتاز باعث کاهش بیان اندوتلین‌ها می‌گردد (Napolitano *et al*., 2000). اندوتلین ۱ به عنوان یک تنگ کننده قوی رگ‌ها[۸] مطرح است. در حالی که اکسید نیتریک یک ماده گشاد کننده رگ‌ها[۹] به حساب می‌آید که تولید و فعالیت آن‌ها توسط مکانیسم فوق تنظیم می‌گردد (Buttery *et al*. 1994; Fried and Liu, 1994). نتایج اثرات تزریق آرژنین بر درصد جوجه درآوری نشان داد که تیمار سطح صفر آرژنین (فقط نرمال سالین تزریق شده بود) پایین‌ترین درصد هچ را داشت. تزریق نرمال سالین به داخل کیسه زرده باعث تغییر در فشار اسمزی می‌گردد (Ohta *et al*., 1999). تزریق یک میلی‌لیتر آب به داخل تخم مرغ درصد هچ را کاهش داد زیرا تخم مرغ‌هایی که سرعت از دست دادن آب در آن‌ها پایین باشد یا دیرتر هچ می‌شوند یا اصلاً هچ نمی‌شوند (Ar and Tulett, 2009). برای یک هچ موفقیت آمیز، هر تخم مرغ در طول انکوباسیون باید در حدود ۱۲ تا ۱۵ درصد وزن اولیه را از دست بدهد (Zhai *et al*., 2011). در مقابل افزایش غلظت آرژنین تزریق شده بر روی درصد هچ اثر معنی‌داری نداشت. لذا سطح ۴۰ میلی‌گرم آرژنین در میلی‌لیتر نرمال سالین به عنوان سطح پیشنهادی آزمایش اول در آزمایش دوم مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش ۲: نتایج بدست آمده از اثر اصلی تزریق آرژنین بر وزن نسبی بطن راست به کل بطن‌ها در ۴۸ روزگی نشان داد (جدول ۲) تزریق آرژنین به طور معنی‌داری نسبت

۸ Vasoconstrictor
۹ Vasodilator

وزن نسبی بطن راست به کل بطن‌ها را کاهش داد (P=۰/۰۳۳۹). اثرات متقابل تزریق آرژنین و جنسیت بر نسبت وزنی بطن راست به کل بطن‌ها بدست آمده از تلفات و پرندگان زنده تجزیه لاشه شده معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). اثر اصلی تزریق آرژنین بر روی تلفات در ۲۱ تا ۴۲ روزگی و کل دوره (۱ تا ۴۸ روزگی) معنی‌دار بود (جدول ۳، P<۰/۰۵) و تزریق آرژنین تلفات ناشی از القاء آسیت را کاهش داد. اما اثرات جنسیت بر میزان تلفات ناشی از آسیت معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

نتایج بدست آمده از بررسی‌های بافت‌شناسی روی سرخرگ ششی و بطن راست پرندگان زنده و بطن راست پرندگان تلف شده به علت آسیت در جدول ۴ نشان داد که اثر اصلی جنسیت بر مساحت داخلی سرخرگ ششی، قطر کوچک، محیط، ضخامت دیواره سرخرگ ششی و ضخامت بطن راست معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). اثر اصلی تزریق بر مساحت داخل، قطر کوچک و محیط سرخرگ ششی معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) و تزریق آرژنین صفات مورد اشاره را نسبت به بدون تزریق آرژنین افزایش داد. اثرات متقابل تزریق و جنسیت بر قطر بزرگ و ضخامت بطن راست نمونه‌های زنده معنی دار بود (P<۰/۰۵). در مقایسه میانگین تیمارها نشان داده شد که بالاترین مقدار قطر بزرگ سرخرگ ششی در مرغ‌هایی که تزریق آرژنین داشتند بدست آمده است که به طور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارها است (P<۰/۰۵). بیشترین ضخامت بطن راست نمونه‌های زنده در خروس‌های بدون تزریق آرژنین مشاهده گردید که به طور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارها بود (P<۰/۰۵). بررسی‌های بافت شناسی بر روی محور قلب راست-شش‌ها نشان داد تزریق آرژنین مساحت داخل سرخرگ ششی، قطر بزرگ، قطر کوچک را افزایش داد اما ضخامت دیواره بطن راست را کاهش داده است. با افزایش فشار به بطن راست برای پمپاژ خون، میوسیت قلبی با اضافه کردن واحد سارکومر قابل اتساع و همچنین افزایش میوسیت‌های[۱۰] عضلانی باعث افزایش ضخامت بطن راست می‌گردند. در نتیجه، افزایش فعالیت بطن راست، سبب افزایش تعداد میوسیت متحدالمرکز و افزایش ضخامت بطن راست بدون افزایش اندازه قلب می‌گردد (Rossi and Carillo, 1991; Epstein *et al*., 1999). مقایسه ضخامت بطن راست پرندگانی که به دلیل آسیت تلف شده بودند به طور متوسط بالاتر از پرندگان سالم بود. همچنین ضخامت بطن راست پرندگان زنده در تیمارهای مختلف متفاوت بود که نشان دهنده این است که تزریق آرژنین ضخامت بطن راست را کاهش داده است از طرفی میزان تلفات ناشی از آسیت در اثر تزریق آرژنین کاهش پیدا کرد که نشان دهنده کاهش فعالیت بطن راست است. یعنی فشار خون سرخرگی در اثر تزریق آرژنین کاهش پیدا کرده است. یکی از عواملی که در فشار خون سرخرگ ششی اثرگذار است شعاع سرخرگ ششی است که نتایج بدست آمده از بررسی‌های روی سرخرگ ششی نشان داد که تزریق آرژنین باعث افزایش قطر سرخرگ ششی می‌گردد. طبق معادله پوآسن فشار سرخرگ ششی، رابطه عکس با توان چهارم شعاع داخلی سرخرگ ششی دارد (Wideman *et al*., 2007). بدین ترتیب با افزایش قطر سرخرگ ششی، فشار خون داخل آن بسیار کاهش می‌یابد. در شکل ۱ تغییرات بافت شناسی به وجود آمده در تیمارها با بزرگ‌نمایی ۴، ۱۰ و ۴۰ عدسی شیی نشان داده شده است. در تیمار خروس-های بدون تزریق آرژنین جدار رگ نازک است. لایه اینتیمای داخلی نازک بوده در لایه مدیا آشفتگی لایه‌های بافتی دیده می‌شود و قطر آن کم است. لایه ادونتیس کاملاً گسیخته است. در مرغ‌های بدون تزریق آرژنین ضخامت دیواره رگ در شش کاهش پیدا کرده است و لایه اینتیما نازک است، لایه الاستیک داخلی از هم گسیخته است. لایه مدیا نازک شده است. در لایه ادونتیس از هم گسیختگی و فضاهای زیادی بین لایه‌ها دیده می‌شود. در تیمار تزریق آرژنین-خروس در لایه مدیا سلول‌ها به طور منظم قرار گرفته‌اند. لایه الاستیک خارجی کاملاً منظم است و به وضوح دیده می‌شود. اینتیما ضخامت طبیعی داشته و در مدیا سلول‌های عضلانی مشخص است. سلول‌ها در لایه ادونتیس به طور منظم دیده می‌شوند و ادونتیس طبیعی است. در تیمار تزریق آرژنین-مرغ لایه اینتیما از لایه زیرین خود جدا شده است. لایه لامینای الاستیک خارجی به وضوح دیده نمی‌شود و در لایه ادونتیس فاصله‌هایی بین لایه‌ها دیده می‌شود و آشفتگی به نظر می‌رسد.

۱۰. Myocyte

جدول ۲- اثر اصلی تزریق داخل زرده ۴۰ میلی‌گرم آرژنین در میلی‌لیتر نرمال سالین در روز پنجم جنینی، جنسیت و اثر متقابل جنسیت و تزریق بر نسبت وزنی بطن راست به کل بطن‌ها و تلفات ناشی از القای آسیت (دمای بعد از ۲۱ روزگی ۱۴-۱۶ سانتیگراد) در روزهای ۳۵ و ۴۸ روزگی

Table2. Main effect of yolk injection of 40mg Arginine per mL normal saline in 5th incubation, sex and their interaction on weight ratio of right ventricular to total ventricular and mortality due to ascite induction (rearing temperature after 21 days of age 14-16^0 C) in 35 and 48 days of age

Variables		RV:TV[1] 35 d	RV:TV[1] 48 d	Mortality RV:TV
Male		0.201	0.190	0.326
Female		0.217	0.192	0.354
None injection		0.234	0.205[a]	0.344
Arginine injection		0.189	0.175[b]	0.329
None injection-male		0.241	0.213	0.341
None injection-female		0.221	0.199	0.347
Arginine injection-male		0.163	0.164	0.310
Arginine injection female		0.214	0.167	0.368
SEM		0.011	0.004	0.005
P-Value	Sex	0.7439	0.9260	0.1799
	Injection	0.3851	0.0339	0.8246
	Sex×injection	0.4657	0.2255	0.2665
	Treatments	0.6620	0.1130	0.3850

[1] Weight of Right Ventricular: Weight of Total Ventricular
[a,b] Values with different superscripts within same column are significantly different (P<0.05).

جدول ۳- اثر اصلی تزریق داخل زرده ۴۰ میلی‌گرم آرژنین در میلی‌لیتر نرمال سالین در روز پنجم جنینی و جنسیت بر تلفات ناشی از آسیت در دوره رشد و پایانی و کل (دمای بعد از ۲۱ روزگی ۱۴-۱۶ درجه سانتیگراد).

Table 3. Main effect of yolk injection of 40mg Arginine per ml normal saline in 5th incubation and Sex ascites mortality in grower, finisher and total (rearing temperature after 21 days of age 14-16^0 C)

Variables		21-42d	42-48d	21-48d
Injection	Yes	(128)16[1]	(112) 9	(128) 25
	No	(128) 49	(79) 6	(128) 55
	P-Value	<0.0001	0.9112	<0.0001
Sex	Male	(128) 38	(90) 6	(128) 44
	Female	(128) 27	(101) 9	(128) 36
	P-Value	0.1142	0.5649	0.2807

1. (Tolal birds) Acites mortality

جدول ۴- اثر اصلی تزریق داخل زرده ۴۰ میلی‌گرم آرژنین در میلی‌لیتر نرمال سالین در روز پنجم جنینی، جنسیت و اثر متقابل جنسیت و تزریق بر ضخامت بطن راست در نمونه‌های زنده و تلفات، ضخامت دیواره سرخرگ ششی، محیط سرخرگ ششی، مساحت داخلی سرخرگ ششی، قطر کوچک و قطر بزرگ سرخرگ ششی(دمای بعد از ۲۱ روزگی ۱۴-۱۶ درجه سانتیگراد) در۴۸ روزگی.

Table 4. Main effect of yolk injection of 40mg Arginine in per ml normal saline in 5th incubation, Sex and their interaction on right ventricular thickness and pulmonary artery thickness, pulmonary artery circumference, pulmonary artery area and pulmonary artery large and small diameter (rearing temperature after 21 days of age 14-16^0 C) in 48 days of age.

Varible		Pulmonary Artery					Right Ventricular thickness	
		Area (mm2)	Large diameter (mm)	Small Diameter (mm)	Circumference (mm)	Thickness (mm)	Live (mm)	Mortality (mm)
Sex	Male	3.00	2.04	1.86	6.14	0.817	1.78	2.05
	Female	3.14	2.08	1.91	6.28	0.805	1.72	2.11
Injection	None injection	2.67^b	1.93	1.76^b	5.81^b	0.830	1.85	2.12
	Arginine injection	3.47^a	2.20	2.01^a	6.62^a	0.796	1.72	2.05
Treatments	None injection-male	2.61	1.97^c	1.69	5.76	0.853	2.02^a	2.14
	None injection-female	2.73	1.90^c	1.83	5.86	0.807	1.69^b	2.10
	Arginine injection-male	3.39	2.12^b	2.04	6.52	0.790	1.54^b	1.96
	Arginine injection female	3.55	2.27^a	1.99	6.71	0.804	1.74^b	2.14
SEM		0.020	0.007	0.011	0.018	0.008	0.041	0.036
P-Value	Sex	0.1491	0.1979	0.3590	0.1272	0.3642	0.4768	0.2876
	Injection	0.0006	0.0007	0.0053	0.0004	0.0645	0.0256	0.2741
	Injection×Sex	0.8178	0.0138	0.0973	0.5807	0.0845	0.0062	0.0821
	Treatments	0.0026	0.0023	0.0180	0.0017	0.0721	0.0074	0.1447

a,b Values with different superscripts within same column are significantly different (P<0.05).

نتیجه گیری کلی:

نتایج این پژوهش نشان داد تزریق ۴۰ میلی‌گرم آرژنین در میلی‌لیتر نرمال سالین در روز پنجم جنینی و پرورش جوجه‌های حاصل از آن در شرایط القاء آسیت سبب کاهش تلفات ناشی از آسیت می گردد. تزریق آرژنین در دوره جنینی با گشاد کردن سرخرگ ششی، نسبت به عبور جریان خون مقاومت کمتری دارد و آسیب‌های وارد شده به بطن راست و شش‌ها کمتر می-شود.

تشکر و قدردانی:

به این وسیله از کلیه همکاران و اساتید محترم به‌ویژه پرسنل محترم آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی همدان که در اجرای این پروژه به هر نحو ما را یاری نموده اند کمال تشکر و قدر دانی را دارم.

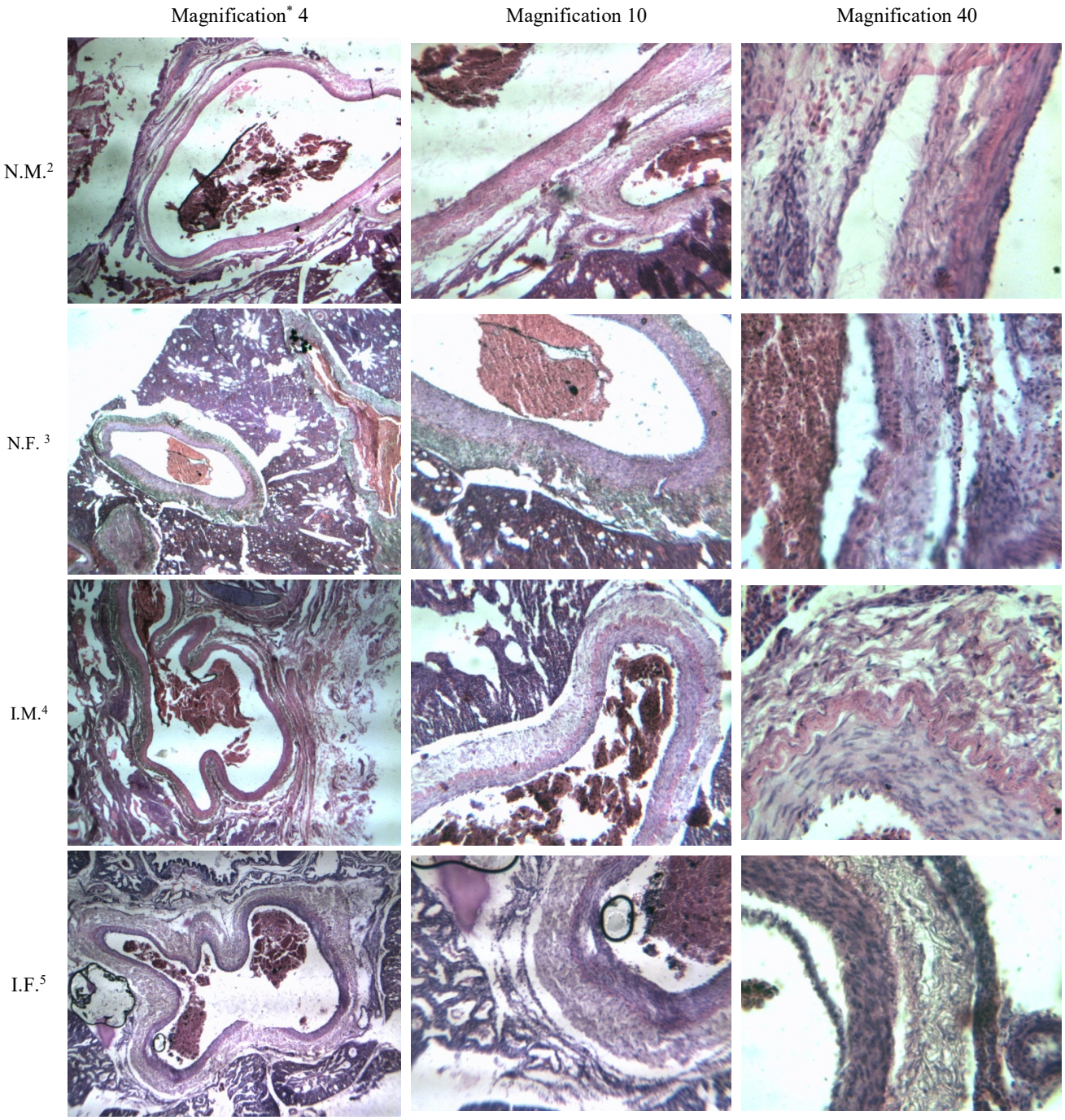

Fig. 1. Histological changes in 48th of ages on lungs in different treatments by 4, 10 and 40 object lens magnification.

*Magnification of lens objects 2- N.M. None Injection-Male 3- N.F. None Injection-Female 4-I.M.Arginine Injection-Male 5-I.F Arginine Injection-Female

شکل ۱- تغییرات بافت شناسی ایجاد شده در روز ۴۸ ام در شش‌ها در تیمارهای مختلف با بزرگ‌نمایی‌های ۴، ۱۰ و ۴۰ عدسی شیی.

فهرست منابع:

Ar, A. and Tulett, S. 2009. Egg water movements during incubation. Avian incubation: Butterworth (Publishers) Ltd.

Buttery, L.D.K., McCarthy, A., Springall, D.R., Sullivan, M.H.F., Elder, M.G., Michel, T. and Polak J.M. 1994. "Endothelial nitric oxide synthase in the human placenta :Regional distribution and proposed regulatory role at the feto-maternal interface". Placenta.15:257-65.

Chapman, M. and Wideman, R. 2001. Pulmonary wedge pressures confirm pulmonary hypertension in broilers is initiated by an excessive pulmonary arterial (precapillary) resistance. Poultry Science.80(4):468-73.

Chapman, M. and Wideman, R. 2006a. Evaluation of total plasma nitric oxide concentrations in broilers infused intravenously with sodium nitrite, lipopolysaccharide, aminoguanidine, and sodium nitroprusside. Poultry Science.85:312-20.

Dil, N. and Qureshi, M.A. 2002. Differential expression of inducible nitric oxide synthase is associated with differential Toll-like receptor-4 expression in chicken macrophages from different genetic backgrounds. Veterinary Immunology and Immunopathology.84:191-207.

Epstein, F.H., Hunter, J.J. and Chien, K.R. 1999. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. New England Journal of Medicine.341:1276-1283.

Fried, G. and Liu, Y.A., 1994. Effects of endothelin, calcium channel blockade and EDRF inhibition on the contractility of human uteroplacental arteries. Acta Physiologica Scandinavica.151(4):477-84.

Hamal, K.R., Wideman, R., Anthony, N. and Erf, G.F. 2008. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Lungs of Broiler Chickens Following Intravenous Cellulose Microparticle Injection. Poultry Science.87:636-44.

Julian, R.J. 1993. Ascites in poultry". Avian Pathology.22:419-54.

Khajali, F. and Wideman, R.F. 2010. Dietary arginine: metabolic, environmental, immunological and physiological interrelationships. World's Poultry Science Journal.66:751-66.

Napolitano, M., Miceli, F., Calce, A., Vacca, A., Gulino, A., Apa, R. and Lanzone, A. 2000. Expression and Relationship between Endothelin-1 Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) and Inducible/Endothelial Nitric Oxide Synthase mRNA Isoforms from Normal and Preeclamptic Placentas. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.85:2318-23 .

National research council 1994 Nutrient Requirements of Poultry. ed., editor. Washington DC: National Academy Press.

Ohta, Y., Tsushima, N., Koide, K., Kidd, M. and Ishibashi, T. 1999. Effect of amino acid injection in broiler breeder eggs on embryonic growth and hatchability of chicks. Poultry Science.78:1493-8 .

Palmer, R.M.J. and Moncada, S. 1989. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications.158:348-52.

Pavlidis, H., Balog, J., Stamps, L., Hughes J., Huff J. W. and Anthony, N. 2007. Divergent selection for ascites incidence in chickens. Poultry Science 86: 2517-2529.

Ploog, H.P. 1973. Physiologic changes in broiler chickens (Gallus domesticus) exposed to a simulated altitude of 4,267m(14,000 ft). University Park; 1973.

Qureshi, M. 2003. Avian macrophage and immune response: an overview. Poultry Science.82:691-8 .

Rossi, M.A. and Carillo, S.V. 1991. Cardiac hypertrophy due to pressure and volume overload: Distinctly different biological phenomena? . International Journal of Cardiology.31:133–42.

SAS. 2000. SAS/STAT User's Guide, Version 8.1.1, 2, and 3 .

Uni, Z. and Ferket, R. 2004. Methods for early nutrition and their potential". World's Poultry Science Journal.60(1):101-11.

Wideman, R. F. and Hamal, K. R. 2011. Idiopathic pulmonary arterial hypertension: An avian model for plexogenic arteriopathy and serotonergic vasoconstriction. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 63: 283-295.

Wideman, R. F. and Tackett, C. 2000. Cardio-pulmonary function in broilers reared at warm or cool temperatures: effect of acute inhalation of 100% oxygen. Poultry Science.79:257-64.

Wideman, R.F., Bowen, O., Erf, G. and Chapman, M. 2006. Influence of aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on the pulmonary hypertensive response to microparticle injections in broilers. Poultry Science.85:511-27 .

Wideman, R.F., Fedde, M., Tackett, C. and Weigle, G. 2000. Cardio-pulmonary function in preascitic (hypoxemic) or normal broilers inhaling ambient air or 100% oxygen. Poultry Science.79:415-25 .

Wideman, R.F. 2000. Cardio-pulmonary hemodynamics and ascites in broiler chickens. Poultry and Avian Biology Reviews 11:21-43 .

Wideman, R.F. 2001. Pathophysiology of heart/lung disorders:Pulmonary hypertension syndrome in broiler chickens. World's Poultry Science Journal 57:289–307 .

Wideman, R.F., Chapman, M.E., Hamal, K.R., Bowen, O.T., Lorenzoni, A.G., Erf, G.F. and Anthony, N.B. 2007. An inadequate pulmonary vascular capacity and susceptibility to pulmonary arterial hypertension in broilers. Poultry Science.86:984-98.

Wideman, R.F., Kirby, Y.K., Tackett, C.D., Marson, N.E. and Mcnew, R.W. 1996. Cardio-pulmonary function during aute unilateral occlusion of the pulmonary artery in broilers fed diets containing normal or high levels of arginine-HCl. Poultry Science.75:1587-602 .

Wideman, R.F., Kirby, Y.K., Tackett, C.D., Marson, N.E., Tressler, C.J. and Mcnew, R.W. 1996. Independent and simultaneous unilateral occlusion of the pulmonary artery and extra-pulmonary primary bronchus in broilers. Poultry Science.75:1417-27 .

Wideman R.F., Kirby, Y.K., Ismail, M., Bottje, W.G., Moore, R.W. and Vardeman, R.C. 1995. Supplemental L-aginine attenuates pulmonary hypertension syndrome (Ascites) in broilers. Poultry Science.74:323-30 .

Zhai, W., Rowe, D. and Peebles, E. 2011. Effects of commercial in ovo injection of carbohydrates on broiler embryogenesis. Poultry Science.90:1295-301.

Animal Production Research

Vol. 5, No. 4, 2017 (33-44)

University of Guilan

Effect of in ovo (embryonic) inoculation of arginine on pulmonary artery, right ventricular and lungs morphological changes in ascites induced broiler chickens

M. Haghighat[1*], A.A. Saki[2], H.R Khodaee[1]

1. Assistant Professor Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Golpayegan Branch
2. Professor, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University

(Received: 8-24-2015 – Accepted: 1-24-2017)

Abstract:

In order to evaluate the influence of yolk in ovo (embryonic) inoculation of arginine in fifth day of incubation on pulmonary artery, right ventricular and lungs morphological changes in induced ascites broiler chickens, two separate experiments were designed. In first experiment, 560 fertile eggs divided in 7 groups and 4 subgroups and levels of 0, 20, 40, 60, 80 and 100 mg arginine per mL normal saline injected on yolk in fifth day of incubation and a group had no injection. In 20th day of incubation, nitric oxide (NO) and endothelin 1 (ET1) in the pulmonary artery in 2 fetuses per subgroup was measured. The 40 mg arginine per mL normal saline was the most appropriate level of arginine injection (lowest ET1 was 89.93 ng/100 mg tissue and highest NO was 13.35 µmol/100mg tissue). In the second experiment, 300 fertile eggs divided in 2 groups. In first group 40 mg of arginine per mL normal saline injected to 150 fertile eggs. The chickes were separated by sex after hatch. From day 21 to day 48 the rearing temperature reduced to 14-16 ℃ and ascite was induced. In ovo injection of arginine reduced ascites mortality (17.6 vs 48.8%), but the main effect of sex was insignificant (P>0.05). Main effect of arginine injection increased inner pulmonary artery area (3.47mm^2 vs 2.67mm^2) In treatments without arginine injection compared with those having argenine injection rather than arginine injection some gaps was observed in the lung cell layers. In ovo injection of arginine lowered the mortality rate due to ascites through increasing the pulmonary artery diameter and preserving the natural layers in the lungs.

Key Words: Ascites, right ventricle, arginine, in ovo injection, pulmonary artery, lungs.

* Corresponding author: haghighat@giau.ac.ir