

پاسخ ایمنی و فعالیت‌های آنزیمی جوجه‌های گوشتی

تحت تنش سرمایی به داروی نیتروگلیسرین

- محمد حسین نعمتی (نویسنده مسئول)
استادیار بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی زنجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان، ایران.
- سید سعید موسوی
بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی زنجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان، ایران.
- صیفعلی ورمقانی
استادیار پژوهشی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان ایلام، ایلام-ایران.

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۸

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۶۴۱۹۵۲۲

Email: Nemati.mh1354@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2019.125912.1902

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی تاثیر افزودن داروی آهسته رهش نیتروگلیسرین بر جلوگیری از بروز سندرم آسیت در جوجه‌های گوشتی انجام شد. تعداد ۵۰۰ قطعه جوجه گوشتی نر در سن هفت روزگی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار، ۵ تکرار و ۲۰ قطعه جوجه در هر تکرار، مورد استفاده قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی شامل ۱- گروه شاهد مثبت (بدون القاء آسیت و بدون افزودن داروی نیتروگلیسرین) ۲- گروه شاهد منفی (القاء آسیت بدون افزودن داروی نیتروگلیسرین)، تیمارهای ۳، ۴ و ۵ به ترتیب شامل القاء آسیت به همراه ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره از داروی نیتروگلیسرین بودند. برای القای تنش سرمایی، از سن ۱۵ تا ۴۲ روزگی، دمای سالن در حد ۱۵ درجه سانتی‌گراد، ثابت نگه داشته شد. پاسخ‌های ایمنی خونی و سلولی و همچنین غلظت آنزیم‌های سرم خون مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که تنش سرمایی منجر به کاهش معنی‌دار وزن نسبی طحال و تیموس شد ($P<0/05$) ولی اثری بر وزن نسبی غده بورس فابریسیوس نداشت. استفاده از داروی نیتروگلیسرین منجر به افزایش معنی‌دار وزن نسبی طحال و تیموس شد ($P<0/05$). پاسخ ایمنوگلوبولین M و حساسیت بازوفیلی پوستی در نتیجه تنش سرمایی، کاهش و استفاده از نیتروگلیسرین بطور معنی‌داری آنها را افزایش داد ($P<0/05$). غلظت آنزیم‌های آسپارات آمینو ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز در نتیجه تنش سرمایی، افزایش یافت و استفاده از غلظت ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم نیتروگلیسرین در جیره، مقادیر آنها را بطور معنی‌داری کاهش داد ($P<0/05$). شاخص پراکسیداسیون لیپید در نتیجه استفاده از نیتروگلیسرین بطور متمایل به معنی‌داری ($P=0/06$) بهبود یافت. در مجموع، نتایج این پژوهش نشان دادند که استفاده از سطح ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم داروی فشار خون نیتروگلیسرین در شرایط تنش سرمایی، منجر به بهبود پاسخ‌های ایمنی و آنزیمی جوجه‌های گوشتی شد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم، پاسخ ایمنی، تنش سرمایی، جوجه‌های گوشتی، نیتروگلیسرین.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 128 pp: 205-216

Immune response and enzymatic activities of broiler chicks under cold stress to nitroglycerin.By: M.H. Nemati^{1*}, S.S. Mosavi², S.A. Varmaghani³

1: Assistant Professor Animal Science Research Department, Zanjan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zanjan, Iran (*Corresponding Author).

2: Animal Science Research Department, Zanjan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zanjan, Iran.

3: Animal Science Research Department, Ilam Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Ilam, Iran.

Received: April 2019**Accepted: October 2019**

This experiment was conducted to evaluate the effect of addition of nitroglycerin (NG) slow release drug on prevention of ascites syndrome in broiler chickens. A total of 500 male broiler chicks at 7 day of age were used in a completely randomized design with 5 treatments, 5 replicates and 20 chicks per each replication. The experimental treatments included: 1) positive control group (without induction of ascites and without addition of NG); 2) negative control group (induction of ascites without adding NG), and treatments 3, 4 and 5, including induction of ascites with 5, 10 and 20 mg NG /kg diet, respectively. In order to induce cold stress, the rearing house temperature was fixed at 15°C from 15 until 42 day of age. The humeral and cellular immune responses as well as blood serum enzyme concentrations were evaluated. The results showed that cold stress significantly reduced the relative weights of spleen and thymus ($P<0.05$) but had no significant effect on relative weight of bursa of Fabricius gland. The utilization of NG significantly increased the relative weights of spleen and thymus ($P<0.05$). The immunoglobulin M response and cutaneous basophilic sensitivity decreased as a result of cold stress, and significantly increased by using NG ($P<0.05$). The concentration of aspartate amino transferase and lactate dehydrogenase enzymes increased as a result of cold stress and addition of 20 mg NG/kg diet significantly decreased the mentioned enzymes concentration ($P<0.05$). The lipid peroxidation index improved near meaningfully as a result of dietary NG ($P=0.06$). In general, the results of this study showed that using 20 mg NG/kg diet in cold stress condition led to improvement in immune and enzymatic responses of broiler chickens.

Key words: enzyme, immune response, cold stress, broilers, nitroglycerin.**مقدمه**

سندرم آسیت نه تنها از طریق مرگ و میر بلکه از طریق کاهش سرعت رشد و ضبط لاشه در کشتارگاه، باعث بروز خسارات زیادی می شود به طوری که این سندرم بیش از ۲۵ درصد مرگ و میر جوجه های گوشتی را به خود اختصاص می دهد. با توجه به پرورش سالانه ۴۰ میلیون قطعه جوجه گوشتی در جهان، میزان ضایعات ناشی از این سندرم چشمگیر است (Guo و همکاران، ۲۰۰۷). با توجه به این که سالانه بیش از یک میلیارد و دویست میلیون قطعه جوجه گوشتی در داخل کشور پرورش داده می شود،

میزان تلفات و ضایعات ناشی از این سندرم، بسیار بالا می باشد (بی نام، ۱۳۹۱).

افزایش سرعت رشد و در نتیجه افزایش نیاز به اکسیژن، می تواند آغازگر بروز سندرم آسیت در جوجه های گوشتی باشد. شرایط فشار نسبی کم اکسیژن منجر به افزایش تعداد گلبول های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین شده و در نتیجه سبب افزایش مقاومت عروق خونی به جریان خون می شود. پیشنهاد شده است که با کاهش مقاومت عروق ششی توسط گشاد کننده های عروقی،

استفاده از داروهای شیمیایی جهت کنترل عارضه آسیت در جوجه های گوشتی نیز تحقیقات متعددی صورت گرفته است (Wu و همکاران، ۲۰۰۷). برای مثال Wideman و همکاران (۱۹۹۵) از داروهای قلبی فروزماید، کارودیلول و پریندوپریل، Forman و Wideman (۲۰۰۱) از داروی قلبی فروزماید، Ocampo و همکاران (۱۹۹۸) از داروی قلبی کلن بوتترول و Ozdemir و همکاران (۲۰۰۰) از داروی قلبی لیزینوپریل استفاده کردند. کاهش میزان اکسید نیتریک حاصل از دیواره داخلی عروق ششی در جوجه های مبتلا به آسیت، گزارش شده است (Moreno and Hernandez, 2003). با توجه به اینکه در شرایط تنش و بروز آسیت، پاسخ ایمنی و فعالیت های آنزیمی تحت تاثیر قرار می گیرند (دانشیار و همکاران، ۲۰۰۹؛ فتحی و همکاران، ۲۰۱۱) و با توجه به مکانیسم عمل داروی نیتروگلیسرین از جمله انبساط عروق ششی و کاهش فشار خون ریوی از طریق آزاد کردن اکسید نیتریک، پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر افزودن داروی آهسته رهش نیتروگلیسرین بر پاسخ ایمنی و فعالیت آنزیمی جوجه های گوشتی تحت شرایط القای آسیت انجام شد.

مواد و روش ها

تعداد ۵۰۰ قطعه جوجه گوشتی نر در سن هفت روزگی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار، ۵ تکرار و ۲۰ قطعه جوجه در هر تکرار مورد استفاده قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی شامل ۱- گروه شاهد مثبت (بدون القاء آسیت و بدون افزودن داروی نیتروگلیسرین، Nitroglycerin 6.4- Shafa، ۲- گروه شاهد منفی (قاء آسیت بدون افزودن داروی نیتروگلیسرین) ۳- القاء آسیت به همراه ۵ میلی گرم در کیلوگرم جیره از داروی نیتروگلیسرین ۴- القاء آسیت به همراه ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره از داروی نیتروگلیسرین و ۵- القاء آسیت به همراه ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره از داروی نیتروگلیسرین بودند. جیره های آزمایشی بر اساس احتیاجات مواد مغذی در راهنمای پرورش سویه راس ۳۰۸ برای سه مرحله آغازین (سن یک تا ۱۰ روزگی)، رشد (سن ۱۱ تا ۲۴ روزگی) و پایانی (سن ۲۵ تا ۴۲

می توان فشار خون ریوی و در نهایت برون دهی قلب را کاهش داد و از بروز ناهنجاری افزایش فشار خون ریوی جلوگیری کرد (Wideman و همکاران، ۲۰۱۳). اکسید نیتریک، مولکولی با یک الکترون منفرد و یک رادیکال آزاد است. این مولکول در غلظت بالا، اکسید شده و تولید نیتريت می نماید اما در غلظت پایین، نقش های بیولوژیکی فراوانی در بدن ایفا می کند. اکسید نیتریک به عنوان یک گشاد کننده قوی عروق، به طور مستقیم از طریق شل کردن عضلات صاف رگ ها، مقاومت رگ های ریوی را کاهش می دهد. همچنین باعث کاهش یا توقف تولید و آزاد سازی مواد منقبض کننده رگ مانند سرتونین، ترمبوکسان و اندوتلین-۱ می شود (Wideman و همکاران، ۲۰۰۷). اکسید نیتریک بوسیله اکسید نیتریک سنتتاز اندوتلیومی (eNOS) از ال-آرژنین ساخته می شود. وجود فشار خون سیستمیک در حیوانات فاقد اکسید نیتریک سنتتاز اندوتلیومی به اثبات رسیده است که این امر نشان می دهد اکسید نیتریک از طریق گشاد کردن مویرگ های محیطی، در کاهش مقاومت در برابر جریان خون نقش دارد (Huang و همکاران، ۱۹۹۵).

گزارش شده است که مکمل کردن جیره با ال-آرژنین منجر به افزایش سطح اکسید نیتریک پلاسما، اتساع رگ ها، کاهش مقاومت رگ های ریوی، بهبود جریان خون ریوی و کاهش تلفات ناشی از سندرم افزایش فشار خون ریوی در جوجه های گوشتی می شود (Tan و همکاران، ۲۰۰۷). نشان داده شده است که استفاده از جیره حاوی ۱۰ گرم در کیلوگرم مکمل آرژنین، سندرم فشار خون ریوی را در جوجه های گوشتی کاهش می دهد. در شرایط تنش محیطی، ال-آرژنین به عنوان یک سوپسترا برای تولید اکسید نیتریک که یک گشاد کننده قوی رگ های ریوی در جوجه های گوشتی است، عمل می کند (Wideman و همکاران، ۱۹۹۵).

افزایش فشار خون می تواند دلایل متعددی داشته باشد و شناخت دقیق عامل موثر بر افزایش فشار خون، بسیار مشکل است. بر اساس نوع فشار خون، داروهای مختلف با مکانیسم عمل های متفاوت، توصیه شده است (Prasad و همکاران، ۲۰۰۰). در خصوص

بعد از سن ۲۱ روزگی در سالن مشابهی، بطور جداگانه پرورش داده شد. رطوبت سالن پرورش ۵۰ تا ۶۰ درصد و برنامه نوری شامل ۲۳ ساعت روشنایی و یک ساعت خاموشی بود. واکسیناسیون جوجه‌ها بر علیه بیماری‌های برونشیت، نیوکاسل، آنفلونزا و گامبورو به ترتیب در روزهای ۱، ۹، ۹ و ۱۵ انجام شد.

روزگی) تنظیم شدند (جدول ۱). برای القای آسیت، از سن ۱۵ روزگی دمای سالن روزانه حدود ۲ درجه سانتی‌گراد کاهش داده شد تا در سن ۲۱ روزگی به دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد رسید و تا پایان دوره پرورش، در همین درجه حرارت باقی ماند. تیمار شاهد مثبت تحت شرایط دمایی توصیه شده (23 ± 2 درجه سانتی‌گراد)

جدول ۱- اجزای تشکیل دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره‌های مورد استفاده در آزمایش

اقلام خوراکی (درصد)	سن ۱۰-۲۰ روزگی	سن ۲۴-۱۱ روزگی	سن ۴۲-۲۵ روزگی
ذرت	۴۸/۳۴	۵۶/۲۴	۶۴/۱۴
کنجاله سویا	۴۳/۲۰	۳۶/۷۵	۳۰/۱۶
روغن سویا	۴/۶۰	۳/۳۲	۱/۹۹
دی کلسیم فسفات	۱/۵۲	۱/۴۷	۱/۳۶
کربنات کلسیم	۱/۳۱	۱/۱۵	۱/۱
نمک	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۷
مکمل ویتامینی ^۱	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل مواد معدنی ^۲	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
دی-ال متیونین	۰/۱۳	۰/۱۵	۰/۱۶
ال-لیزین هیدروکلراید	۰/۰۳	۰/۰۵	۰/۲۲

ترکیب مواد مغذی محاسبه شده

انرژی قابل سوخت و ساز (Kcal/Kg)	۳۰۰۰	۳۰۰۰	۳۰۰۰
پروتئین خام (درصد)	۲۳/۰۰	۲۰/۸۳	۱۸/۷۵
کلسیم (درصد)	۰/۹۶	۰/۸۸	۰/۸۱
فسفر قابل دسترس (درصد)	۰/۴۵	۰/۴۳	۰/۴
سدیم (درصد)	۰/۱۷	۰/۱۷	۰/۱۷
کلر (درصد)	۰/۱۹	۰/۱۹	۰/۱۸
لیزین (درصد)	۱/۴	۱/۲۷	۱/۲
متیونین (درصد)	۰/۵۳	۰/۵۱	۰/۴۸
متیونین + سیستین (درصد)	۰/۹۶	۰/۸۵	۰/۸۲
آرژنین (درصد)	۱/۵۵	۱/۴۰	۱/۲۷
تعادل کاتیون- آنیون جیره (mEq/kg) ^۳	۲۲۵	۲۲۰	۲۱۷

^۱ مقادیر ویتامین‌ها به ازای هر کیلوگرم جیره: ویتامین A، ۱۲۰۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین D₃، ۵۰۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین E، ۷۵ واحد بین‌المللی؛ ویتامین K₃، ۲/۸ میلی‌گرم؛ تیامین، ۳/۱۳ میلی‌گرم؛ ریوفلاوین، ۷/۹۲ میلی‌گرم؛ نیاسین، ۵۵/۶۳ میلی‌گرم؛ اسید پانتوتیک، ۱۸/۲۲ میلی‌گرم؛ پیریدوکسین، ۴/۸۶ میلی‌گرم؛ اسید فولیک، ۲/۲ میلی‌گرم؛ بیوتین، ۰/۳ میلی‌گرم؛ ویتامین B₁₂، ۰/۰۱۸ میلی‌گرم؛ کولین کلراید، ۱۵۰۰ میلی‌گرم و آنتی اکسیدان، ۱/۲ میلی‌گرم.

^۲ مقادیر مواد معدنی به ازای هر کیلوگرم جیره: منگنز، ۱۰۰ میلی‌گرم؛ روی، ۱۰۰ میلی‌گرم؛ آهن، ۲۰ میلی‌گرم؛ مس، ۱۲/۳۴ میلی‌گرم؛ ید، ۱/۲ میلی‌گرم و سلنیوم، ۰/۳ میلی‌گرم.

^۳ $Na^+ + K^+ - Cl^-$

از هر تکرار، خونگیری و فعالیت آنزیم های آلانین آمینو- ترانسفراز، آسپاراتات آمینو ترانسفراز، لاکتات دهیدروژناز و سوپر اکسید دیسموتاز سرم خون با استفاده از کیت های شرکت پارس آزمون و دستگاه اسپکتوفوتومتر (ساخت آمریکا، Milton Roy، مدل D21) اندازه گیری شد. برای اندازه گیری میزان پراکسیداسیون لیپید از روش اندازه گیری تیوباریتوریک اسید (TBARS) استفاده شد (Esterbauer and Cheesman, 1990). در این روش، ابتدا با تهیه رقت های مختلف مالون دی- آلدئید (Malondialdehyde, MDA)، منحنی استاندارد رسم و در نهایت میزان جذب نمونه در طول موج 532 nm سنجیده شد و با استفاده از منحنی استاندارد، میزان پراکسیداسیون لیپید تعیین گردید.

داده های حاصل از آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از رویه GLM نرم افزار آماری SAS نسخه 9/1 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین ها از آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح آماری 0/05 استفاده شد.

نتایج و بحث

تاثیر داروی ضد فشار خون نیتروگلیسرین بر میانگین وزن نسبی اندام های ایمنی و شاخص آسیت جوجه های گوشتی تحت تنش سرمایی در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده تاثیر پذیری وزن نسبی طحال و تیموس از تیمارهای آزمایشی است (0/05 < P). به طوری که تنش سرمایی منجر به کاهش وزن نسبی آنها شد. استفاده از داروی نیتروگلیسرین منجر به افزایش معنی دار وزن نسبی طحال و تیموس شد ولی وزن نسبی غده بورس فابریسیوس تحت تاثیر تنش سرمایی و تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. افزایش وزن نسبی قلب تحت شرایط تنش سرمایی تمایل به معنی داری (0/09 = P) داشت. نسبت وزن بطن راست به وزن کل بطن ها در جوجه های گوشتی تحت شرایط تنش سرمایی بطور معنی داری افزایش یافت (0/05 < P). استفاده از داروی نیتروگلیسرین در سطح 20 میلی گرم در کیلو گرم جیره منجر به کاهش معنی دار این نسبت شد.

برای سنجش میزان پاسخ اولیه تیترا آنتی بادی به تزریق گلبول قرمز خون گوسفند (SRBC¹)، در روزهای 25 و 32 دوره پرورش، تعداد 2 قطعه پرنده از هر تکرار انتخاب و مقدار 0/8 میلی لیتر SRBC ده درصد از طریق ورید بال، تزریق گردید. یک هفته بعد از هر تزریق، خونگیری انجام و میزان تیترا آنتی بادی سرم خون، سنجش شد. برای تعیین تیترا پاسخ کل (IgM + IgG) از روش هما گلو تیناسیون میکروتیترا استفاده شد. ابتدا نمونه های سرم خون جهت خنثی شدن سیستم کمپلمان و عدم تداخل آن با پادتن ضد گلبول قرمز گوسفند به مدت 30 دقیقه در دمای 55 درجه سانتیگراد در گرم خانه، قرار داده شدند. در هنگام قرائت نمونه ها، لگاریتم مبنای دو عکس آخرین رقتی که در آن هما گلو تیناسیون انجام شد، به عنوان عیار پادتن ثبت گردید (Hay and Hudson, 2002). برای اندازه گیری IgG و IgM که اجزای پاسخ به SRBC هستند، با جداسازی آنتی بادی مقاوم به مرکاپتا- اتانول که در حقیقت IgG هست و کسر این مقدار از پاسخ کل، آنتی بادی حساس به مرکاپتا اتانول بدست آمد که معرف IgM می باشد (Delhanty and Solomon, 1966).

برای سنجش پاسخ حساسیت بازوفیلی پوستی² (CBH)، از روش Ahmed و همکاران (2007) استفاده شد. برای این منظور، در سن 38 روزگی تعداد دو قطعه پرنده از هر تکرار انتخاب و بعد از اندازه گیری ضخامت پرده بین انگشتان هر دو پا، مقدار 100 میکرو گرم فیتوهما گلو تین فسفات (PHA-P) حل شده در 0/1 میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل، بین پرده پای انگشتان راست پرنده تزریق گردید. همچنین مقدار 100 میکرو لیتر سرم فیزیولوژی استریل به عنوان گروه شاهد به پای چپ پرنده، تزریق گردید. ضخامت پرده بین انگشتان، 36 ساعت پس از تزریق با استفاده از کولیس با دقت 0/01 میلی متر اندازه گیری شد. پاسخ CBH بصورت اختلاف بین ضخامت پرده بین انگشتان در قبل و بعد از تزریق بر حسب میلی متر بیان شد. در پایان دوره پرورش، تعداد 2 قطعه پرنده از هر تکرار متناسب با میانگین وزنی تکرار انتخاب و جهت بررسی وزن اندام های ایمنی، کشتار گردیدند. به منظور مطالعه فعالیت های آنزیمی، در روز 35 از دو قطعه پرنده

¹ Sheep Red Blood Cell

² Coetaneous Basophile Hypersensitivity Response

جدول ۲- تاثیر داروی نیتروگلیسرین بر میانگین وزن نسبی اندام‌های ایمنی و شاخص آسیت جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی (درصدی از وزن زنده)

تیمارهای آزمایشی ^۱							صفات مورد مطالعه
P-Value	SEM	NG20	NG10	NG5	NC	PC	اندام‌های ایمنی
۰/۰۲	۰/۰۱۷	۰/۱۹۵ ^{ab}	۰/۲۰۶ ^a	۰/۱۸۶ ^{ab}	۰/۱۳۲ ^c	۰/۱۵۳ ^{bc}	طحال
۰/۵۶	۰/۰۰۳	۰/۱۲۵	۰/۱۲۸	۰/۱۱۸	۰/۱۱۳	۰/۱۲۰	بورس
۰/۰۴	۰/۰۲۲	۰/۲۲۷ ^a	۰/۲۳۶ ^a	۰/۱۸۵ ^{ab}	۰/۱۵۶ ^b	۰/۱۹۱ ^{ab}	تیموس
شاخص آسیت							
۰/۰۹	۰/۰۲۵	۰/۵۸	۰/۵۹	۰/۶۰	۰/۶۳	۰/۵۶	قلب
۰/۰۴	۰/۰۱۲	۰/۲۳ ^b	۰/۲۵ ^{ab}	۰/۲۵ ^{ab}	۰/۲۷ ^a	۰/۲۲ ^b	RV/TV

^۱ تیمارهای آزمایشی شامل PC: شاهد مثبت (بدون تنش سرمایی و بدون دریافت نیتروگلیسرین)، NC: تیمار شاهد منفی (تنش سرمایی بدون دریافت نیتروگلیسرین)، NG: نیتروگلیسرین در سطوح ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره بودند. ^{a-c} در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه از نظر آماری اختلاف معنی داری دارند. RV/TV: نسبت بین وزن بطن راست به وزن کل بطن‌ها.

سلول‌های طحال نیز احتمال چنین فرضیه‌ای وجود دارد. افزایش وزن قلب و شاخص نسبت وزن بطن راست به وزن کل بطن‌ها (RV/TV) در اثر تنش سرمایی توسط محققین قبلی گزارش شده است (Danshyar و همکاران، ۲۰۰۹؛ Wang و همکاران، ۲۰۱۲) که در مطابقت با نتایج تحقیق حاضر است. قبل از بروز علائم آسیت در جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی، به طور معمول تغییرات آناتومیک و هماتولوژیکی از قبیل افزایش در نسبت وزن بطن راست به وزن کل بطن‌ها ($>0/25$) به عنوان نقطه شروع آسیت قابل تشخیص است (Wideman و همکاران، ۲۰۱۳). تحت شرایط تنش سرمایی، نیاز اکسیژنی پرنده افزایش یافته و فعالیت زیاد قلب در راستای تامین این نیاز منجر به هیپرتروفی بطن راست و آسیت می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که در حیوانات فاقد eNOS^۳، فشار خون سرخرگی بالا می‌باشد. این امر نقش اکسید نیتریک را در کاهش فشار خون از طریق گشاد کردن مویرگ‌های محیطی و کاهش مقاومت در برابر جریان خون، به اثبات می‌رساند (Huang و همکاران، ۱۹۹۵). Ruiz-Feria (۲۰۰۹) طی آزمایشاتی اثرات مکمل آرژنین، ویتامین E و ویتامین C را بر فراسنجه‌های آسیت، اکسید نیتریک

کاهش وزن نسبی اندام‌های ایمنی در نتیجه تنش سرمایی توسط تعدادی از محققین گزارش شده است (Campo و همکاران، ۲۰۰۸؛ Hangalapura و همکاران، ۲۰۰۴) که در مطابقت با نتایج تحقیق حاضر است. طحال اندامی برای تخریب و بازیابی سلول‌های قرمز پیر و فرسوده است که لنفوسیت‌ها را تولید می‌کند. در شرایط تنش، لنفوسیت‌ها کاهش می‌یابند و به تبع آن حجم خون و گلبول‌های قرمز، افزایش می‌یابند. کاهش فعالیت طحال منجر به کاهش وزن آن شده که در نتیجه استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدانی و تولید بیشتر لنفوسیت‌ها، وزن نسبی طحال نیز افزایش می‌یابد. تحقیقات اخیر نشان می‌دهند که سلول‌های غده بورس فابریسیوس، اولویت بالایی برای گلوکز، ایزولوسین و لیزین دارند اما سلول‌های تیموس، اولویت بسیار کمی دارند (Humphrey و همکاران، ۲۰۰۶) به علاوه، در هنگام مواجه شدن با کمبود گلوکز و لیزین، سلول‌های غده بورس فابریسیوس توانایی خود را برای بدست آوردن گلوکز و لیزین، بالا می‌برند در حالی که سلول‌های تیموس به میزان کمتری این توانایی را دارند لذا تحت شرایط تنش، تیموس بسیار حساس است که این مسئله موجب کاهش سریع تعداد سلول‌های آن و وزن این غده می‌شود. در خصوص

³ Endothelial Nitric Oxide Synthase

تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ولی سطح ایمنوگلوبولین M (IgM) در پاسخ ایمنی ثانویه تحت شرایط تنش سرمایی به طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0.05$). استفاده از داروی نیتروگلیسرین به میزان ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره منجر به افزایش معنی دار غلظت IgM شد. مقدار ایمنوگلوبولین کل و ایمنوگلوبولین G تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. ایمنی سلولی و پاسخ حساسیت بازوفیلی پوستی (CBH) در پاسخ به تزریق فیتوهاگلوتنین فسفاتنی تحت شرایط تنش سرمایی، کاهش یافت و استفاده از داروی نیتروگلیسرین به میزان ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره، منجر به افزایش معنی دار ایمنی سلولی شد ($P < 0.05$).

سنتاز و عملکرد قلبی- عروقی جوجه های گوشتی تحت شرایط تنش سرمایی را مورد مطالعه قرار داد و گزارش کرد که استفاده از آرژنین باعث حفظ بافت دیواره داخلی عروق، بهبود وظایف اکسید نیتریک بواسطه افزایش قابلیت دسترسی آن و کاهش فشار خون سرخرگ ریوی از طریق افزایش اکسید نیتریک، می شود. فتاحی و همکاران (۲۰۱۱) بهبود سیستم قلبی- عروقی و سندرم آسیت در نتیجه استفاده از آرژنین به میزان ۰/۳ درصد را ناشی از کاهش دانسیته خون و کاهش مقاومت در برابر جریان خون ششی، دانستند. تاثیر داروی ضد فشار خون نیتروگلیسرین بر ایمنی خونی و سلولی جوجه های گوشتی تحت تنش سرمایی در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان دادند که پاسخ ایمنی خونی اولیه تحت

جدول ۳- تاثیر داروی نیتروگلیسرین بر ایمنی خونی و سلولی جوجه های گوشتی تحت تنش سرمایی

تیمارهای آزمایشی ^۱							صفات مورد مطالعه
P-Value	SEM	NG20	NG10	NG5	NC	PC	
ایمنی خونی اولیه							
۰/۵۶	۰/۴۸	۳/۷۵	۳/۶۹	۴/۱۶	۳/۳۱	۴/۳۳	کل
۰/۶۳	۰/۲۷	۱/۶۳	۱/۵۴	۱/۸۲	۱/۴۱	۱/۶۸	IgM
۰/۲۶	۰/۳۷	۲/۱۲	۲/۱۵	۲/۳۴	۱/۹۰	۲/۶۵	IgG
ایمنی خونی ثانویه							
۰/۳۸	۰/۵۷	۴/۵۶	۴/۰۸	۴/۲۵	۳/۶۲	۵/۲۰	کل
۰/۰۵	۰/۴۳	۳/۰۵ ^a	۲/۱۵ ^{ab}	۲/۵۰ ^{ab}	۱/۶۱ ^b	۲/۸۹ ^{ab}	IgM
۰/۵۸	۰/۳۸	۱/۵۱	۱/۹۳	۱/۷۵	۲/۰۱	۲/۳۱	IgG
ایمنی سلولی							
۰/۰۴	۰/۱۵	۱/۵۸ ^a	۱/۲۹ ^{ab}	۱/۳۶ ^{ab}	۰/۹۳ ^b	۱/۷۵ ^a	CBH ^۲ (mm)

^۱ تیمارهای آزمایشی شامل PC: شاهد مثبت (بدون تنش سرمایی و بدون دریافت نیتروگلیسرین)، NC: تیمار شاهد منفی (تنش سرمایی بدون دریافت نیتروگلیسرین)، NG: نیتروگلیسرین در سطوح ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره.

^{a-b} در هر ردیف میانگین های دارای حروف غیرمشابه از نظر آماری اختلاف معنی داری دارند.

^۲ CBH (Coetaneous Basophile Hypersensitivity Response): پاسخ حساسیت بازوفیلی پوستی.

از سطح ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم داروی نیتروگلیسرین در جیره موجب کاهش معنی دار غلظت آنزیم های AST و LDH شد. تاثیر داروی ضد فشار خون نیتروگلیسرین بر شاخص پراکسیداسیون لیپید (مالون دی آلدئید^۵) سرم خون جوجه های تحت آسیت القایی، در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج نشان دادند که غلظت مالون دی آلدئید سرم خون جوجه های گوشتی تحت شرایط القا آسیت، به طور معنی داری افزایش یافت و استفاده از داروی نیتروگلیسرین منجر به کاهش نسبی غلظت مالون دی-آلدئید سرم خون جوجه های گوشتی تحت آسیت القایی شد ($P=0/06$).

سرکوب سیستم ایمنی خونی (Hester و همکاران، ۱۹۹۶) و سیستم ایمنی سلولی (Atta و همکاران، ۱۹۹۶) در شرایط تنش سرمایی توسط تعدادی از محققین نشان داده شده است. تاثیر آرژنین بر بهبود پاسخ ایمنی جوجه های گوشتی از طریق تولید اکسید نیتریک توسط تعدادی از محققین نشان داده شده است (Li و همکاران، ۲۰۰۹؛ Guo و همکاران، ۲۰۱۵).

اکسید نیتریک (NO) در بسیاری از سلول های سیستم ایمنی (ماکروفاژها، سلول های دندریتی، سلول های کشنده طبیعی (NK)، ماست سل ها و سلول های بیگانه خوار) و سلول های مرتبط با سیستم ایمنی (سلول های دیواره داخلی عروق، سلول های بافت پوششی و سلول های بافت کبد) تولید می شود. اکسید نیتریک به عنوان یک مولکول پیام رسان، نقش حیاتی در تنظیم پاسخ ایمنی و التهاب از طریق مسیرهای مختلف بیوشیمیایی دارد و می تواند از طریق کشتن عوامل بیماری زای غیراختصاصی مثل باکتری ها، قارچ ها، انگل ها و سلول های سرطانی، ایمنی غیراختصاصی را افزایش دهد. به علاوه اکسید نیتریک می تواند سنتز و ترشح بعضی از سیتوکین های ایمنی مثل فاکتور نکروز تومور (TNF^{α})، پروستاگلاندین E2، اینترلوکین و اینترفرون که تاثیر زیادی بر پاسخ ایمنی دارند را تنظیم کند (Tan و همکاران، ۲۰۰۷). در آزمایش حاضر، افزودن نیتروگلیسرین منجر به افزایش وزن نسبی طحال (جدول ۲) و در نتیجه افزایش تکثیر لنفوسیت های T در مقایسه با گروه شاهد منفی شد. لنفوسیت ها به عنوان سلول های کمک کننده، در تولید آنتی بادی ها نقش دارند. در آزمایش حاضر، افزایش غلظت آنتی بادی ها می تواند ناشی از این امر باشد.

تاثیر داروی ضد فشار خون نیتروگلیسرین بر فعالیت آنزیم های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، لاکتات دهیدروژناز (LDH) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) سرم خون جوجه های تحت آسیت القایی، در جدول ۴ آورده شده است. نتایج نشان دادند که در شرایط تنش سرمایی، مقادیر AST و LDH در سرم خون جوجه ها افزایش یافت ولی غلظت ALT و SOD تحت تاثیر معنی دار قرار نگرفت. استفاده

⁴ Tumor Necrosis Factor

⁵ Malondialdehyde

جدول ۴- تاثیر داروی نیتروگلیسرین بر فعالیت هورمونی، آنزیمی و شاخص پراکسیداسیون لیپیدی جوجه های گوشتی تحت تنش سرمایی

تیماهای آزمایشی ^۱							صفات مورد مطالعه
P-Value	SEM	NG20	NG10	NG5	NC	PC	آنزیم ها
۰/۶۳	۱/۲۳	۶/۲۵	۴/۸۶	۴/۱۸	۵/۱۲	۵/۲۴	ALT ^۲ (U/L)
۰/۰۱	۹/۸۵	۱۸۱/۱ ^b	۱۶۷/۳ ^b	۱۹۶/۵ ^{ab}	۲۱۶/۳ ^a	۱۸۳/۶ ^{ab}	AST ^۳ (U/L)
۰/۰۲	۲۸۵	۱۲۸۵ ^b	۱۷۶۰ ^{ab}	۲۰۲۰ ^{ab}	۲۲۴۵ ^a	۱۶۳۰ ^{ab}	LDH ^۴ (U/L)
۰/۳۴	۵۲	۱۰۴۳	۱۰۹۵	۹۸۷	۱۰۵۶	۱۱۲۵	SOD ^۵ (U/g hemoglobin)

شاخص پراکسیداسیون لیپیدی

۰/۰۶	۰/۵۸	۵/۲۱ ^{ab}	۵/۶۸ ^{ab}	۵/۵۲ ^{ab}	۶/۱۲ ^a	۴/۳۶ ^b	MDA ^۶ (nmol/ml)
------	------	--------------------	--------------------	--------------------	-------------------	-------------------	----------------------------

^۱ تیمارهای آزمایشی شامل PC: شاهد مثبت (بدون تنش سرمایی و بدون دریافت نیتروگلیسرین)، NC: تیمار شاهد منفی (تنش سرمایی بدون دریافت نیتروگلیسرین)، NG: نیتروگلیسرین در سطوح ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره. ^{a-b} در هر ردیف میانگین های دارای حروف غیرمشابه از نظر آماری اختلاف معنی داری دارند.

^۲ Alanin transferase
^۳ Aspartate transferase
^۴ Lactate dehydrogenase
^۵ Super oxide dismutase
^۶ Malondialdehyde

معنی دار سطح MDA سرم خون در نتیجه استفاده از ترکیب نیتروگلیسرین، ممکن است افزایش پتانسیل ایمنی حیوان را بواسطه ایجاد تعادل در تولید و حذف رادیکال های آزاد، توضیح دهد.

آسپاراتات آمینوترانسفراز آنزیمی است که در اثر آسیب های پارانشیم کبدی و نیز صدمات قلبی، افزایش می یابد و به عنوان شاخص سلامت کبد، اندازه گیری می شود. همچنین آنزیم لاکتات دهیدروژناز آنزیمی است که هنگام آسیب بافت های قلب، کبد و شش، به خون آزاد می شود (Daneshyar و همکاران، ۲۰۰۹). با توجه به آسیب های وارده به قلب، کبد و شش پرندگان مبتلا به آسیت، فعالیت آنزیم های پلاسمایی نیز تحت تاثیر قرار

پراکسیداسیون لیپید، یکی از نتایج تولید رادیکال های فعال اکسیژن و بروز تنش اکسیداتیو است. تحت شرایط تنش، تولید مالون دی آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید، افزایش می یابد و افزایش میزان MDA تحت شرایط تنش سرمایی، گزارش شده است (Mujahid، ۲۰۱۰؛ Wang و همکاران، ۲۰۱۲). زمانی که غلظت آنتی اکسیدان های پلاسمای خون کاهش می یابد، پراکسیداسیون لیپید در پلاسمای خون و بافت ها افزایش می یابد و منجر به آسیب دیدن غشای سلولی می شود. مشخص شده است که چنین اثراتی می توانند با مکمل کردن جیره با ترکیبات آنتی اکسیدانی، از بین بروند (Zhang و همکاران، ۲۰۰۹؛ Geng and Guo, 2005). در پژوهش حاضر، کاهش عددی ولی غیر-

- Daneshyar, M., Kermanshahi, H. and Golian, A. (2009). Changes of biochemical parameters and enzyme activities in broiler chickens with cold-induced ascites. *Poultry Science*. 88: 106-110.
- Delhanty, J.J. and Solomon, J.B. (1966). The nature of antibodies to goat erythrocytes in the developing chicken. *Immunology*. 11: 103-113.
- Esterbauer, H. and Cheesman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondealdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*. 186: 407-421.
- Fathi, M., Nazer Adl, K., Ebrahim Nezhad, Y., Aghdam Shahryar, H. and Daneshyar, M. (2011). The effects of vitamin E and L-arginine supplementation on antioxidant status and biochemical indices of broiler chickens with pulmonary hypertension syndrome. *Research Journal of Poultry Science*. 4: 33-40.
- Forman, M.F. and Wideman, R.F. (2001). Furosemide does not facilitate pulmonary vasodilation in broilers during chronic or acute unilateral pulmonary arterial occlusion. *Poultry Science*. 80: 937-943.
- Geng, A.L. and Guo, Y.M. (2005). Effects of dietary coenzyme Q10 supplementation on hepatic mitochondrial function and the activities of respiratory chain-related enzymes in ascitic broiler chickens. *British Poultry Science*. 46: 626-634.
- Guo, J.L., Zheng, Q.H., Yin, Q.Q., Cheng, W. and Jiang, Y.B. (2007). Study on mechanism of ascites syndrome of broilers. *American Journal of Animal Veterinary Science*. 2: 62-65.
- گرفته و افزایش می یابد و کاهش غلظت این آنزیم ها در سرم خون در نتیجه استفاده از داروی نیتروگلیسرین نشان دهنده بهبود این شاخص ها است. دانشیار و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که در شرایط القاء آسیت و تنش سرمایی، غلظت آنزیم های AST و LDH تحت تاثیر قرار نگرفت که در مغایرت با نتایج تحقیق حاضر است.
- بطور کلی، نتایج این پژوهش نشان دادند که استفاده از سطح ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم از داروی ضد فشار خون نیتروگلیسرین در شرایط تنش سرمایی منجر به بهبود پاسخ های ایمنی خونی و سلولی شد و سطح آنزیم های کبدی در سرم خون را کاهش داد.
- منابع**
- بی نام (۱۳۹۱). چکیده نتایج سرشماری از مرغداری های پرورش مرغ گوشتی. معاونت برنامه ریزی و نظارت راهبردی ریاست جمهوری، مرکز آمار ایران.
- Ahmed, O.A., Ahmed, E.G., Gilbert, L.H. and Magdi, M.M. (2007). The effect of lighting program and melatonin on the alleviation of the negative impact of heat stress on the immune response in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*. 6: 651-660.
- Atta, A.M., El-Tantawy, S.M.T., Osman, A. and El-Far, A.A. (1996). Suppression of cellular immune response of chickens following *in vivo* and *in vitro* heat stress. *Egyptian Journal of Animal Production*. 33: 71-77.
- Aviagen. (2014). Ross 308. Broiler Performance Objective. Retrieved from www.aviagen.com. Accessed on May 21.
- Campo, J.L., Prieto, M.T. and Da'vila, S.G. (2008). Effects of housing system and cold stress on heterophil-to-lymphocyte ratio, fluctuating asymmetry, and tonic immobility duration of chickens. *Poultry Science*. 87: 621-626.

- Guo, Y.W., Shi, B.L., Yan, S.M., Xu, Y.Q., Li, J.L. and Li, T.Y. (2015). Effects of arginine on cytokines and nitric oxide synthesis in broilers. *The Journal of Animal and Plant Sciences*. 25: 366-371.
- Hangalapura, B.N., Nieuwland, M.G.B., Buyse, J., Kemp, B. and Parmentier, H.K. (2004). Effect of duration of cold stress on plasma adrenal and thyroid hormone levels and immune responses in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Poultry Science*. 83: 1644-1649.
- Hay, L. and Hudson, F.C. (2002). Practical Immunology. Fourth Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Hester, P.Y., Muir, W.M. and Craig, J.V. (1996). Group selection for adaptation to multiple-hen cages: Humoral immune response. *Poultry Science*. 75: 1315-1320.
- Huang, P.L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K.D., Moskowitz, M.A., Bevan, J.A. and Fishman, M.C. (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 377: 239-242.
- Humphrey, B.D., Stephensen, C.B., Calvert, C.C. and Klasing, K.C. (2006). Lysine deficiency and feed restriction independently alter cationic amino acid transporter expression in chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 143: 218-227.
- Li, H.Y., Yan, S.M., Shi, B.L. and Guo, X.Y. (2009). Effect of chitosan on nitric oxide content and inducible nitric oxide synthase activity in serum and expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in small intestine of broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 22: 1048-1053.
- Moreno, S.M. and Hernandez, A. (2003). Nitric oxide synthase expression in the endothelium of pulmonary arterioles in normal and pulmonary hypertensive chickens subjected to chronic hypobaric hypoxia. *Avian Diseases*. 47: 1291-1297.
- Mujahid, A. (2010). Acute cold-induced thermogenesis in neonatal chicks (*Gallus gallus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. Molecular and Integrative Physiology*. 156: 34-41.
- Ocampo, L., Cortez, U., Sumano, H. and Avila, E. (1998). Use of low dose of Clenbuterol to reduce incidence of ascites syndrome in broilers. *Poultry Science*, 77: 1297-1299.
- Ozdemir, H.S., Aksulu, H.E., Karatas, F., Ustundag, B. and Bingo, I. (2000). Long-term lisinopril dehydrate application decrease plasma noradrenaline but not adrenaline levels in chickens. *Physiological Research*. 64: 183-188.
- Prasad, K., Chang, J.B., Oksen, E.R. and Sumpio, B.E. (2000). Textbook of Angiology. 1st Edition. Chapter 4: Blood Pressure and Its Control Mechanism. pp: 46-54. Springer, New York.
- Ruiz-Feria, C.A. (2009). Concurrent supplementation of arginine, vitamin E, and vitamin C improve cardiopulmonary performance in broilers chickens. *Poultry Science*. 88: 526-535.
- SAS (2002-2003). SAS/STAT Software: change and enhancement through release 9.1. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.
- Tan, X., Hu, S.H. and Wang, X.L. (2007). Possible role of nitric oxide in the pathogenesis of pulmonary hypertension in broilers: a synopsis. *Avian Pathology*. 36: 261-267.

- Wang, Y., Guo, Y., Ning, D., Peng, H., Cai, H., Tan, J., Yang, Y. and Liu, D. (2012). Changes of hepatic biochemical parameters and proteomics in broilers with cold-induced ascites. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. Available at: <http://www.jasbsci.com/content/3/1/41>.
- 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: 984-998.
- Wideman, R.F., Ismail, M., Kirby, Y.K., Bottje, W.G., Moore, R.W. and Vardeman, R.C. (1995). Furosemide reduces the incidence of pulmonary hypertension syndrome (ascites) in broiler exposed to cool environmental temperatures. *Poultry Science*. 74: 314-322.
- Wideman, R.F., Rhoads, D.D., Erf, G.F. and Anthony, N.B. (2013). Pulmonary arterial hypertension (ascites syndrome) in broilers: A review. *Poultry Science*. 92: 64-83.
- Wu, D.J., Lin, J.A. and Lin, C.S. (2007). Reduction of dilated cardiomyopathy of broiler chickens model by pharmacological treatments- pathological aspects. *Taiwan Veterinary Journal*. 33: 6-13.
- Zhang, X.H., Zhong, X., Zhou, Y.M., Du, H.M. and Wang, T. (2009). Effect of RRR- α -tocopherol succinate on the growth and immunity in broilers. *Poultry Science*. 88: 959-966.