Archive of SID

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۶، ۳۳۹ - ۳۳۳

روند تغییرات بیوشیمیایی، هماتولوژی و پاتولوژیک در سندرم آسیت جوجه‌های گوشتی با تأکید بر نقش رادیکال‌های آزاد اکسیژن

رضا جمشیدی [۱] حسینعلی عرب [۲]* علی رسولی [۲] عباسعلی جواهری [۱] غلامرضا شمس [۲]

۱) آموزشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان - ایران.

۲) گروه فارماکولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۷ اردیبهشت ماه ۱۳۸۴ ، پذیرش نهایی: ۵ آبان‌ماه ۱۳۸۵)

چکیده

۳۱۵ قطعه جوجه‌گوشتی نژاد راس جهت بررسی رابطهٔ بین رادیکال‌های آزاد اکسیژن و تغییرات بیوشیمیایی، هماتولوژی و پاتولوژیک در جوجه‌های مبتلا به آسیت مورد استفاده قرارگرفتند. این جوجه‌های به سه گروه ۱۰۵ قطعه‌ای تقسیم گردیدند که دو گروه از آنها از طریق مصرف هورمون T_3 و نگهداری در سرما، نسبت به آسیت مستعد گردیدند، و گروه سوم به عنوان کنترل استفاده شدند. نسبت وزن بطن راست به کل بطن‌ها، شمارش گلبول‌های قرمز، مقدار هماتوکریت، میزان آنزیم‌های ALT (آلانین ترانس آمیناز) و AST (آسپارتات ترانس آمیناز) به عنوان شاخص‌های بروز آسیت اندازه‌گیری گردیدند. میزان رادیکال هیدروکسیل از طریق سنجش متابولیت‌های هیدروکسیله اسیدسالیسیلیک ۲، ۳ - دی هیدروکسی بنزوئیک اسید و ۲، ۵ - دی هیدروکسی بنزوئیک اسید توسط HPLC اندازه‌گیری شد. آنالیز یافته‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) تغییرات معنی‌داری در نسبت وزن بطن راست به کل بطن‌ها، شمارش گلبول‌های قرمز، مقدار هماتوکریت و میزان آنزیم‌های ALT و AST، و میزان تلفات نسبت به گروه کنترل وجود داشت که بیانگر بروز آسیت در گروه‌های T_3 و سرما بود. میزان تولید رادیکال هیدروکسیل نیز در هر دو گروه‌های مبتلا به آسیت از روز یازدهم به طور معنی‌داری افزایش یافت. اما سایر تغییرات از جمله افزایش آنزیم‌ها، فاکتورهای خونی و نسبت بطن راست به کل بطن به ترتیب در روزهای ۱۸، ۲۵ و ۳۲ روزگی دیده شد. با توجه به افزایش معنی‌دار میزان رادیکال‌های آزاد در ابتدای وقوع پدیده آسیت و سپس بالا رفتن غلظت‌های آنزیمی و تغییرات هماتولوژیکی و در نهایت بروز تغییرات پاتولوژیکی در گروه‌های مستعد، می‌توان نتیجه گرفت که رادیکال‌های آزاد اکسیژن از جمله هیدروکسیل می‌توانند به عنوان شروع کننده سندرم آسیت مطرح باشند. تغییرات هماتولوژیکی، بیوشیمیایی و پاتولوژیکی متعاقب اثر آنها می‌توانند سبب آسیت و سایر عوارض در پرنده گردند.

واژه‌های کلیدی: آسیت، رادیکال‌های آزاد، تری یدوتیرونین، اسیدسالیسیلک، جوجه گوشتی.

مقدمه

سندرم آسیت که با تجمع مایع سروزی در فضاهای محوطهٔ شکمی مشخص می‌شود، به عنوان یکی از مشکلات مهم صنعت پرورش طیور در دنیا مطرح است. این عارضه غالباً با جمع شدن مایعات در محوطه بطنی، اطراف قلب و کبد همراه است(۲). بزرگ شدن قلب راست و هیدروپریکارد همراه با تغییراتی در بافت‌ها و اندام‌های دیگر از جمله پرخونی، چروکیدگی و وجود کپسول خاکستری و سطح نامنظم در کبد(۳،۱۰)، پرخونی و ادم ریه‌ها و افزایش هماتوکریت و شمارش کلی گلبول‌های قرمز از مهمترین عوارض این سندرم هستند(۲۵). علاوه بر این تغییرات، ضایعات میکروسکوپیک در کبد، ریه، قلب و کلیه نیز مشاهده گردیده و فیبرهای عضلانی قلب به دلیل ادم و تکثیر بافت همبند تا حدودی نظم خود را از دست داده و خونریزی کانونی و نفوذ هتروفیل‌ها در عضلهٔ قلب دیده می‌شود(۲۶، ۲۳، ۲۰). آسیت یا تجمع مایعات در بدن پرنده‌های مبتلا، بدنبال افزایش فشار در گردش خون ریوی صورت می‌گیرد، که به همین علت این پدیده تحت عنوان سندرم افزایش فشار ریوی (Pulmonary hypertension syndrome یا PHS) نیز شناخته می‌شود(۳،۶).

با وجود اینکه نقش عواملی از جمله ارتفاع زیاد، سرعت رشد بالا، سرما و مصرف جیره‌های پرانرژی در ایجاد آسیت به اثبات رسیده است، لیکن مکانیزم دقیق و علت اصلی عارضه هنوز مشخص نیست. مطالعات مختلف بر این باورند که عوامل فوق‌الذکر زمینه ساز افزایش متابولیسم، نیاز به اکسیژن بیشتر و ایجاد هیپوکسی می‌باشند که این شرایط می‌تواند پیش درآمدی برای وقوع آسیت باشد(۸،۱۹،۲۲). هیپوکسی سبب کاهش ناحیه‌ای فشار اکسیژن ریوی، اتساع عروق محیطی و افزایش فشار خون بازگشتی وریدی به قلب می‌شود(۱۵،۲۰). بدین صورت قلب برای غلبه بر افزایش مقاومت در برابر جریان خون و جبران افزایش بازگشت وریدی، مجبور است انقباضات قوی تری داشته باشد، که این امر به مرور باعث ایجاد هیپرتروفی بطن راست خواهد شد. در عین حال به دلیل اینکه با هر بار ضربان قلب حجم خون بیشتری از عروق ریوی می‌گذرد، زمان عبور خون کاهش پیدا می‌کند و خون فرصت کمتری برای تبادل اکسیژن خواهد داشت و این مسئله به هیپوکسی ایجاد شده دامن می‌زند(۱۵،۱۹،۲۴). آنوکسی ایجاد شده در پرندگان سبب تحریک کلیه جهت تولید اریتروپوئیتین می‌شود و به دنبال آن تولید گلبول‌های قرمز افزایش می‌یابد. به این ترتیب پلی سیتمی (polycythemia)، افزایش هموگلوبین و هماتوکریت خواهیم داشت. این موضوع باعث افزایش ویسکوزیته خون می‌گردد و به ایجاد هیپرتانسیون ریوی کمک می‌کند(۲۳،۲۴).

به دنبال هیپرتروفی ایجاد شده در بطن راست با هر بار ضربان، مقداری از

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۵۰-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email:harab@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

خون بطن راست به دهلیز پس خواهد زد و در ادامه افزایش تدریجی فشار وریدهای باب و نشت پلاسما از سینوزوئیدهای کبدی را به دنبال دارد. همچنین تخلیهٔ عروق لنفاوی نیز بلوکه می‌شود که به تجمع بیشتر مایعات در محوطه بطنی و ایجاد آسیت دامن می‌زند(۱۳،۱۹،۳۰).

رشد آرام قلب، کبد و ریه(۱۱،۱۴) و در نتیجه کوچک‌تر شدن ریه نسبت به کل بدن، وجود سدخونی هوایی ضخیم‌تر(۷)، گلبول‌های قرمز بزرگ با انعطاف‌پذیری کم و اشباع شدن هموگلوبین با مقادیر کمتر از اکسیژن بخصوص در جوجه‌های گوشتی سریع‌الرشد، همگی زمینه‌ساز بروز هیپوکسی هستند(۱۰،۲۲،۳۰). از طرفی افزایش فعالیت‌های متابولیکی در جوجه‌های سریع الرشد، گسترش هیپوکسی در بافت‌ها و به دنبال آن بروز فعالیت‌های جبرانی ممکن است بدن حیوان را در شرایط ایسکمی و پرفوزیون مداوم قرار دهد. این حالت می‌تواند زمینه‌ساز تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن از جمله هیدروکسیل(OH) هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و سوپراکسید ($O.^{-2}$) گردد. نقش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در ایجاد ضایعه ناشی از هیپوکسی و به دنبال آن ورود مجدد اکسیژن در بسیاری از اندام‌ها از جمله کبد، قلب و روده‌ها نشان داده شده است(۱۱،۱۹). این رادیکال‌ها با چربی‌ها و پروتئین‌های مختلف در بافت‌ها ترکیب می‌شوند و از طریق ایجاد پراکسیداسیون لیپیدی سبب تخریب جدار سلول‌ها و دیگر اجزاء سلولی می‌گردند(۱۴). نقش رادیکال‌های آزاد در بروز آسیت به وضوح مشخص نمی‌باشد. لیکن احتمال تولید این عناصر پس از هیپوکسی و تغییرات بیوشیمیایی و بیولوژیکی ناشی از آن و نقش آنها در ایجاد استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی در جوجه‌های مبتلا به آسیت مورد توجه قرار گرفته است(۶). از طرفی نتایج بعضی از مطالعات حاکی از آن است که جوجه‌های مبتلا به آسیت با کمبود معنی‌دار آنتی‌اکسیدان مواجه هستند و کاربرد آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله ویتامین C در جیره غذایی می‌تواند در جلوگیری از بیماری مؤثر باشد(۲،۱۷). بدین لحاظ، هدف این مطاله این است که روند پاتوفیزیولوژیکی آسیت را از طریق اندازه‌گیری تغییرات بیوشیمیایی، هماتولوژی و پاتولوژیک در سندرم آسیت با تأکید بر نقش رادیکال‌های آزاد اکسیژن مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش کار

حیوانات و گروه بندی: در این مطالعه تعداد ۳۱۵ قطعه جوجه خروس یک روزه گوشتی از نژاد تجارتی راس(Ross) خریداری و روی بستر پوشال با شرایط کاملاً یکسان از نظر نوع جیره، تهویه و سایر پارامترهای مؤثر بر رشد نگهداری شدند. این جوجه‌ها از جیره غذایی استاندارد آغازی و رشد تغذیه گردیدند که حاوی ۲۲۲-۲۰۵ گرم پروتئین خالص و ۲۹۵۴-۲۹۱۰ کیلوکالری انرژی متابولیسم در هر کیلوگرم بوده است. تمامی پرندگان تحت یک برنامهٔ مشخص برای جلوگیری از ابتلا به بیماری‌های ویروسی واکسینه شدند. از روز یازدهم جوجه‌ها به طور تصادفی به ۳ گروه مساوی تقسیم شدند (هر گروه ۱۰۵ قطعه جوجه). دو گروه از جوجه‌ها از طریق پایین آوردن دمای محیط و یا تجویز هورمون تری یدوتیرونین (T_3) در شرایط ابتلا به آسیت قرار داده شدند و جوجه‌های گروه سوم به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. بدین ترتیب از روز یازدهم به جیرهٔ گروه مصرف کننده T_3 مقدار ۱/۵ppm هورمون T_3 اضافه شد. روش کاهش حرارت محیط گروه دوم بر اساس متدی وشی بوده که توسط Hassanzadeh و همکاران در سال ۱۹۹۷(۱۷) توضیح داده شده است. در روز اول دما برای هر ۳ گروه ۳۲ درجه سانتگراد بوده و تا روز هفتم به ازای هر دو روز یک درجه از دما کاهش می‌یافت تا به ۲۵ درجه سانتیگراد رسید. برای گروه‌های شاهد و مصرف کننده T_3 میزان دما به همان میزان ثابت بود. لیکن برای گروه سرما این کاهش ادامه پیدا کرد و از روز ۱۴، میزان حرارت به ۱۵ درجه سانتیگراد کاهش یافت و تا روز ۲۵ ادامه داشت. از انتهای این روز به بعد، دما در درجه حرارت طبیعی همانند دو گروه دیگر (۲۵ درجه) ثابت نگه داشته شد.

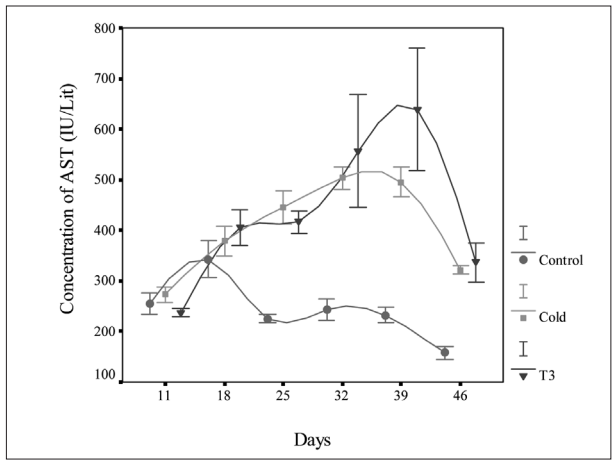
نمونه‌برداری: نمونه‌برداری‌ها از روز یازدهم شروع و با فواصل معینی تا روز ۴۶ ادامه داشت. بدین صورت که در روزهای ۱۱، ۱۸، ۲۱، ۲۵، ۲۸، ۳۲، ۳۹ و ۴۶ از هر گروه ۵ قطعه جوجه به صورت تصادفی جدا شده و پس از توزین به هرکدام به میزان ۱۰mg/kg از محلول آبی سالیسیلات به صورت داخل وریدی تزریق گردید و یک ساعت پس از تزریق، خون‌گیری در لوله‌های هپارینه انجام می‌گرفت. پس از خونگیری جوجه‌ها به روش مرگ آسان کشته می‌شدند و مورد کالبدگشایی قرار گرفتند

پاتولوژی: جوجه‌ها پس از کالبد گشایی از نظر وجود مایعات در محوطه بطنی و ضایعات قلبی مورد بازرسی قرار می‌گرفتند. سپس قلب آنها برای اندازه‌گیری نسبت وزن بطن راست به مجموع بطن‌ها از بدن بیرون آورده می‌شد. پس از جدا کردن عروق بزرگ، دهلیزها و چربی‌های اطراف قلب، بطن راست و چپ از محل اتصال آنها در دیوارهٔ بین دو بطن به طور کامل از هم جدا می‌گردیدند. برای تعیین نسبت وزن بطن راست به مجموع دو بطن، وزن بطن راست و مجموع دو بطن به طور جداگانه اندازه‌گیری می‌شدند. این نسبت به عنوان یک شاخص برای بررسی ضایعات قلبی در سندرم آسیت مورد استفاده قرار می‌گیرد.

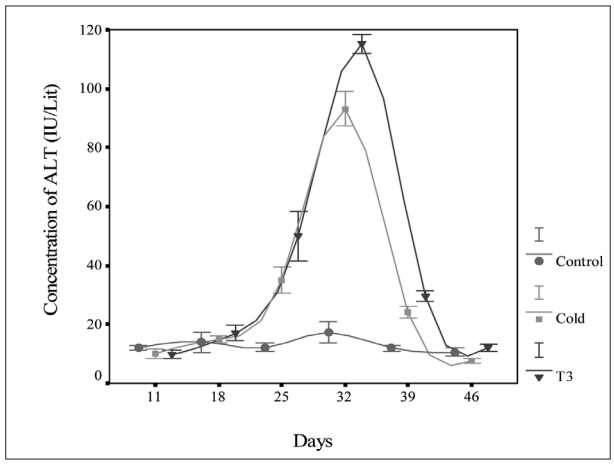
آزمایش‌های هماتولوژیکی و بیوشیمیایی: بخشی از خون هپارینه اخذ شده از هر کدام از نمونه‌ها جهت انجام آزمایش‌های هماتولوژی شامل اندازه‌گیری هماتوکریت و شمارش گلبول‌های قرمز استفاده گردید. هر کدام از پارامترهای فوق به روش‌های استاندارد و آزمایشگاهی اندازه‌گیری و ثبت می‌گردید. بقیه نمونه خونی سانتریفوژ گردید و پلاسمای بدست آمده که به میزان ۱۰۰۰ میکرولیتر بود، در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد برای انجام آزمایش‌های آنزیمی و اندازه‌گیری رادیکال‌های آزاد نگهداری شد. در این مطالعه دو آنزیم آلانین ترانس آمیناز (ALT) و آسپارتیک ترانس آمیناز (AST) با دستگاه اتوآنالایزر (analyzer 5060, Eppendorf CO, Germany EPOS) و در طول موج ۳۴۰ نانومتر و درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد و به روش IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) اندازه‌گیری شد(۴،۵).

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر۱- نمودار میزان آنزیم AST در گروه‌های شاهد، (Control)، نگهداری شده در سرما (Cold) و درمان شده با T_3 (T_3).



تصویر ۲- نمودار میزان آنزیم A در گروه‌های شاهد، (Control)، نگهداری شده در سرما (Cold) و درمان شده با T_3 (T_3).

برای اندازه‌گیری رادیکال آزاد هیدروکسیل از روش حساس و استاندارد هیدروکسیلاسیون سالیسیلیک اسید استفاده گردید. در این روش اسید سالیسیلیک تزریق شده به جوجه‌ها با رادیکال $OH^{\cdot}$ ترکیب می‌شود و متابولیت‌های ۲، ۳ ـ دی هیدروکسی بنزوئیک اسید و ۵، ۲ ـ دی ئیدروکسی بنزوئیک اسید تشکیل می‌گردد که میزان آنها با سیستم HPLC قابل اندازه‌گیری می‌باشند. تغییرات در میزان این متابولیت‌ها بیانگر تغییرات در مقدار رادیکال هیدروکسیل می‌باشد(۱۴،۲۳). سیستم HPLC از یک پمپ چند حلاله (Knauver, K1001)، تزریق کننده خودکار (Autosampler Triahtlon) و ستون C_{18} (µBondopack ۴,۳۰۰X میلیمتر و دمای محیط) و دتکتور الکتروکمیکال (Waters, 464) تشکیل شده بود. فاز متحرک مخلوطی از بافر استات سیترات pH 4.75 و متانول با نسبت ۹۴:۶ بود که با میزان ۱/۲ میلی لیتر در دقیقه در سیستم جاری بود. به ۵۰۰ میکرولیتر پلاسما از هر کدام از نمونه‌ها ۲۰ میکرولیتر محلول استاندارد داخلی ۳، ۴ دی هیدروکسی بنزوئیک اسید (3,4-DHBA) با غلظت ۰/۵ میلی مولار اضافه گردید. بعد از افزودن ۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۱ مولار و ۱۰ میلی لیتر دی اتیل اتر، نمونه‌ها توسط Vortex به مدت ۲ دقیقه مخلوط گردیدند. بعد از جدا شدن لایه اتری، مقدار ۱۰ میلی لیتر از این لایه جدا گردید و در بن ماری ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از تبخیر اتر، رسوبات باقی مانده تا جمع شدن تمام نمونه‌ها در فریزر ۷۰ـ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شد. در زمان آنالیز به هر کدام از نمونه‌ها، ۸۰۰ میکرولیتر بافر استات، سیترات و ۲۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۱ مولار اضافه شد و پس از مخلوط وارد ظرف مخصوص اتوسمپلر می‌شد و سپس از هرکدام به میزان ۲۰ میکرولیتر به HPLC تزریق می‌شد.

تجزیه و تحلیل آماری: کلیه اطلاعات به دست آمده از تمامی متغیرها، شامل نسبت وزنی بطن راست به مجموعه دو بطن، آزمایش‌های هماتولوژی و آزمایش‌های بیوشیمیایی با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. در صورت مشاهدهٔ تفاوت‌های معنی‌دار بین سه گروه آزمایشی با استفاده از تست تکمیلی Tukey با یکدیگر مقایسه شدند. در تمامی مقایسه های انجام شده مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

وقوع آسیت: نتایج حاصل از تست‌های مختلف نشان داد که آسیت در گروههای مصرف کننده T_3 و نگهداری شده در دمای پایین به وقوع پیوست. تعداد تلفات ناشی از آسیت ۲۴ قطعه جوجه بوده است که ۲۱ قطعه در گروه مصرف کننده T_3 و ۳ قطعه در گروه نگهداری شده در سرما بودند، در حالی که گروه کنترل هیچگونه تلفاتی نداشت. در کالبدگشایی نمونه‌های مبتلا، علائم مشخصی از بروز آسیت شامل تجمع اکسودای فراوان در محوطهٔ بطنی، هیدروپریکارد، بزرگ شدگی قلب، تورم کبد و کلیه و کف آلودگی ریهٔ در تمامی موارد مشهود بود.

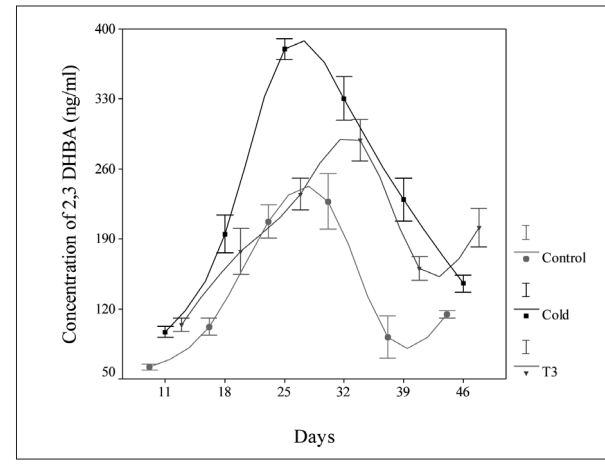
بزرگ شدن بطن راست: نسبت وزن بطن راست به کل بطن‌ها که در ۲۵، ۲۸، ۳۲، ۳۹ و ۴۶ روزگی جوجه‌ها اندازه‌گیری شده بود در جدول ۱ آورده شده است. براساس آمار مندرج در این جدول، تا ۳۹ روزگی اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مورد آزمون و گروه کنترل مشاهده نشد، ولی در روزهای ۳۹ و ۴۶ مقدار بطن راست گروه‌های مورد آزمون بصورت معنی‌داری بزرگتر از گروه کنترل بوده است.

هماتولوژی: خلاصه آماری حاصل از این آزمایش‌ها که در روزهای ۱۸، ۲۱، ۲۵، ۲۸، ۳۲، ۳۹ و ۴۶ روزگی انجام گرفته، در جدول ۲ آورده شده است. نتایج به دست آمده از مقایسهٔ آماری ۳ گروه نشان می‌دهد که میزان هماتوکریت در جوجه‌های قرار داده شده در شرایط ابتلا به آسیت (گروه نگهداری شده در دمای پایین و T_3 خورانیده شده)، از سن ۲۵ روزگی به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش پیدا کرده است (جدول ۲). همان طوری‌که جدول ۲ نشان می‌دهد، میزان گلبول‌های قرمز نیز از ۲۵ روزگی در گروه‌های در معرض آسیت با اختلاف معنی‌داری افزایش یافته است.

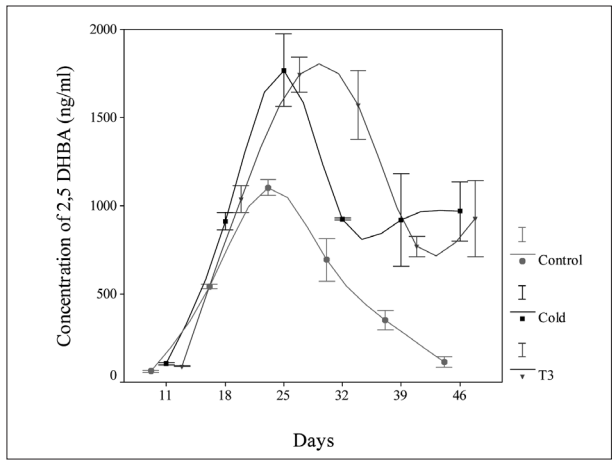
فعالیت‌های آنزیمی: نتایج مربوط به ترشح آنزیمی حاکی از آن است که

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۳- نمودار مقایسه میزان۲،۳-دی هیدروکسی بنزوئیک اسید در جوجه‌های نگهداری شده در دمای پایین (Cold) و درمان شده با T_3 (T_3) و گروه کنترل (Control).



تصویر ۴- مقایسه مقدار ۲، ۵-دی هیدروکسی بنزوئیک اسید در دو گروه تیمار [جوجه‌های در معرض سرما قرار داده (Cold) و گروه درمان شده با T_3 (T_3)] با گروه کنترل (Control).

میزان آنزیم آسپارتیک ترانس آمیناز (AST) در گروه نگهداری شده در دمای پایین و جوجه‌های مصرف کننده T_3 از ۲۱ روزگی به بعد نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافته است (نمودار ۱). نتایج آزمایش‌ها نشان دادند که از نظر ترشح آنزیم آلانین ترانس آمیناز نیز از ۲۱ روزگی به بعد بین گروه‌های مورد آزمون و گروه کنترل اختلاف معنی داری وجود دارد (نمودار ۲).

تولید رادیکال‌های هیدروکسیل(نتایج آنالیز HPLC): در این آزمایش‌ها میزان ۲، ۳ دی هیدروکسی بنزوتیک اسید و ۲، ۵-دی ئیدروکسی بنزوئیک اسید (به عنوان شاخص تولید $OH^{\cdot}$) سرم خون جوجه‌ها در روزهای ۴۶، ۳۹، ۳۲، ۲۸، ۲۵، ۲۱، ۱۸ روزگی و پس از گذشت یک ساعت از تزریق اسید سالیسیلیک با استفاده از دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. در مورد ۲، ۳-دی هیدروکسی بنزوئیک اسید، نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهد که در ۴۶، ۳۹، ۳۲، ۲۸، ۲۵، ۲۱، ۱۸ روزگی بین گروه‌های کنترل با نگهداری شده در سرما و مصرف کننده T_3 اختلاف معنی‌داری وجود دارد (نمودار ۳). نتایج مربوط به ۲، ۵-دی هیدروکسی بنزوئیک اسید حاکی از آن است که در روزهای ۱۱، ۱۸، ۲۱، ۲۵، ۲۸، ۴۶ بین گروه‌های کنترل با نگهداری شده در سرما و در روزهای ۱۱، ۱۸، ۲۱، ۲۵، ۲۸، ۴۶ بین گروه کنترل و مصرف کننده T_3 اختلاف معنی‌داری وجود دارد (نمودار ۴).

بحث

مطالعات وسیعی برای یافتن عامل عارضه آسیت و روش جلوگیری از آن در صنعت پرورش طیور گوشتی درسراسر دنیا در حال انجام است. بررسی‌های اخیر نشان داده در شرایط طبیعی هر عاملی که موجب افزایش فعالیت‌های متابولیک جوجه‌های گوشتی گردد، مانند افزایش سرعت رشد، کاهش درجه حرارت محیط، تغذیه با جیره‌های پرانرژی یا افزایش مصرف غذا از طریق تغذیه با جیره‌های پلت شده، می‌تواند باعث افزایش میزان بروز آسیت در طیور گوشتی شود (۶،۹،۱۶،۲۷). درمطالعهٔ حاضر، استفاده از هورمون T_3 و پرورش جوجه‌ها در دمای پایین سبب افزایش متابولیسم و مصرف اکسیژن گردیده که این امر باعث ایجاد هیپوکسی بافتی می‌گردد. در این وضعیت جوجه‌ها جهت جبران و رفع نیازهای بافتی، برون ده قلبی را افزایش می‌دهند و به دنبال آن جریان خون وریدی بیشتر شده و منجر به بروز افزایش فشار خون و نهایتاً آسیت گردیده است (۱۰،۱۱).

از ۳۱۵ قطعه جوجه تحت پرورش ۲۴ قطعه در اثر بروز آسیت تلف شدند که ۲۰ قطعه متعلق به گروه مصرف کننده T_3 و ۳ قطعه متعلق به گروه نگهداری شده در سرما بوده است، و در گروه شاهد هیچگونه تلفاتی ناشی از آسیت دیده نشد. البته باید توجه داشت که نمونه‌گیری‌های متوالی باعث کاهش تدریجی جوجه‌ها در گروه‌های مختلف گردیده است. بروز شدید آسیت در گروه مصرف کننده T_3 و بالا رفتن میزان استعداد جوجه‌ها به این عارضه نسبت به گروه نگهداری شده در سرما، می‌تواند نشان دهنده تأثیر افزایش متابولیسم در ایجاد آسیت باشد.

در خصوص پاتوژنز بیماری آسیت نظریات گوناگونی مطرح است، از جمله میتوان به افزایش فشار خون ریوی و هیپرتروفی بطن راست اشاره کرد. اکبری در سال ۱۳۷۵ نشان داد که درنسبت وزن بطن راست به کل بطن‌ها در هفتهٔ پنجم و هفتهٔ هفتم در دو گروه جوجه‌های کنترل و مصرف کننده T_3 از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری وجود داشت (۱) همچنین حسن‌زاده و بزرگمهری فرد درسال ۱۳۸۰ نشان دادند که در جوجه‌های مبتلا به آسیت، نسبت وزن بطن راست به کل بطن‌ها به صورت معنی‌داری از گروه شاهد بالاتر بوده است (۱۵). در مطالعهٔ حاضر همان‌گونه که در نتایج اشاره شده، هیپرتروفی بطن راست در نمونه‌های گروه‌های نگهداری شده در سرما و مصرف کننده T_3 در ۳۲، ۳۹ و ۴۶ روزگی منجر به افزایش نسبت وزن بطن راست به وزن مجموع دو بطن گردیده است. افزایش RV/TV می‌تواند نشانگر فعالیت جبرانی قلب برای مقابله با هیپوکسی ناشی از افزایش متابولیسم بافت‌های بدن در اثر نگهداری در سرما یا مصرف T_3 باشد. همچنین نتایج و بررسی‌های دیگران حاکی از آن است که هیپرتروفی سمت راست قلب از شایع ترین نشانه‌های بروز آسیت است (۱۶،۲۸).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱- آنالیز آماری نسبت وزن بطن راست به کل بطنها در جوجه‌های مبتلا به آسیت تجربی و گروه‌کنترل.

سن (روز)	نسبت بطن راست به کل بطن‌ها (RV/TV)		
	گروه کنترل	گروه نگهداری شده در سرما	گروه T_3 تجویز شده
۲۵	۰/۱۶±۰/۰۱^b	۰/۲۴±۰/۰۳^b	۰/۲۵±۰/۰۳^a
۲۸	۰/۱۹ ±۰/۰۱	۰/۱۸±۰/۰۱	۰/۲±۰/۰۱
۳۲	۰/۱۹±۰/۰۲^b	۰/۲۳±۰/۰۱^a	۰/۲۱±۰/۰۲^a
۳۹	۰/۱۸±۰/۰۱^b	۰/۲۷±۰/۰۱^a	۰/۲۷±۰/۰۴^a
۴۶	۰/۱۸±۰/۰۱^b	۰/۲۸±۰/۰۱^a	۰/۲۸±۰/۰۲^a

حروف غیر مشترک در هر ردیف بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار ($p<0.05$) بین گروه‌های تحت آزمایش می‌باشد.

***=خطای استاندارد از میانگین.**

جدول۲- مقایسه آماری میزان PCV و RBC در جوجه‌های مبتلا به آسیت با گروه‌کنترل.

سن (روز)	هماتوکریت (درصد)			گلبول‌های قرمز (number/µl)		
	گروه شاهد	گروه سرم	گروه T_3	گروه شاهد	گروه سرما	گروه T_3
۱۱				۳/۵۲±۰/۱۵*	۳/۶۸±۰/۰۸	۳/۵۰±۰/۱۵
۱۸	۲۸/۷۵±۳/۴۵	۳۰/۰۰±۲/۳۵	۲۹/۲۵±۱/۹۷	۲/۹۵±۰/۳۴	۳/۱۵±۰/۲۳	۲/۹۲±۰/۲۰
۲۱	۲۸/۶۰±۱/۸۶	۲۹/۲۰±۱/۳۶	۲۸/۴۰±۱/۱۲	۲/۸۵±۰/۳۴	۳/۱۵±۰/۲۳	۲/۹۲±۰/۲۰
۲۵	۲۹/۴۰±۰/۸۷^b	۳۶/۲۰±۱/۹۸^a	۳۴/۴۰±۱/۱۲^a	۳/۱۵±۰/۰۹^b	۳/۶۲±۰/۱۹^a	۳/۵۴±۰/۱۱^a
۲۸	۲۹/۲۰±۰/۷۳^b	۳۴/۰۰±۱/۳۰^a	۳۴/۰۰±۱/۳۸^a	۳/۰۰±۰/۱۵^b	۳/۵۴±۰/۰۷^a	۳/۶۰±۰/۱۶^a
۳۲	۲۷/۸۰±۱/۵۳^b	۳۲/۴۰±۰/۶۸^a	۲۹/۲۰±۱/۵۹^a	۳/۱۰±۰/۱۰^b	۴/۶۲±۰/۱۴^a	۴/۴۶±۰/۱۸^a

حروف غیر مشترک در هر ردیف بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار ($p<0.05$) بین گروه‌های تحت آزمایش می‌باشد.

***=خطای استاندارد از میانگین.**

نتایج آزمایش‌های هماتولوژی در این تحقیق نشان داد که میزان هماتوکریت و شمارش گلبولی از ۲۵ روزگی افزایش می‌یابد که این موضوع نشان دهندهٔ افزایش فعالیت متابولیک و ایجاد هیپوکسی در جوجه‌های نگهداری شده در سرما و مصرف کننده T_3 نسبت به گروه شاهد می‌باشد. افزایش هماتوکریت یک فعالیت جبرانی است که بدنبال هیپوکسی و به علت افزایش فعالیت اریتروپوئیتین در جوجه‌ها اتفاق می‌افتد. نتایج تحقیقات مختلف حاکی از آن است که در جوجه‌های مبتلا به آسیت میزان هماتوکریت خون افزایش می‌یابد(۹،۱۸،۲۹). از آنجایی که وقوع آسیت متعاقب هیپوکسی رخ می‌دهد این تغییرات خونی بیانگر مستعد شدن جوجه‌های تحت آزمایش به پدیده آسیت می‌باشد.از طرفی نتایج حاصل از اندازه‌گیری آنزیم‌های آلانین ترانس آمیناز و آسپارتیک ترانس آمیناز نشان می‌دهند که در اواخر دوره یعنی از ۲۱ روزگی به بعد ، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های جوجه‌های مصرف کننده T_3 و نگهداری شده در سرما با گروه شاهد قابل ملاحظه است. این افزایش فعالیت‌های آنزیمی در جوجه‌های مستعد به آسیت می‌تواند بیانگر بروز ضایعات سلولی در اثر وقوع آسیت در پرندگان تحت مطالعه باشد. بنابراین فعالیت‌های آنزیمی می‌تواند یکی دیگر از پارامترهای وقوع سندرم آسیت در جوجه‌های تحت آزمایش باشد.

میزان متابولیت‌های ۲، ۳ـ دی هیدروکسی بنزوئیک اسید و ۲، ۵ـدی هیدروکسی بنزوئیک اسید که شاخص تولید رادیکال‌های آزاد از جمله رادیکال هیدروکسیل هستند می‌تواند در شرایط مختلف از جمله افزایش میزان اکسیژن بعد از ایسکمی یا بالا رفتن متابولیسم در بافت‌های مختلف بالا رود(۶،۱۶،۲۴). در مطالعه حاضر، افزایش میزان رادیکال هیدروکسیل در گروه‌های مبتلا به اسیت در ابتدای رشد جوجه‌ها (از ۱۱ روزگی) حاکی از آن است که رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند در پاتوژنز آسیت جوجه‌ها نقش شروع کننده داشته باشند. نتایج گویای آن است که میزان متابولیت‌های ۲،۳ـ دی هیدروکسی بنزوئیک اسید و ۲، ۵ـدی هیدروکسی بنزوئیک اسید که بیانگر افزایش رادیکال ئیدروکسیل می‌باشد، در طول دوره رشد که میزان فعالیت‌های متابولیکی جوجه‌ها بالا بوده، به طور معنی‌داری افزایش داشته است. به نظر می‌رسد افزایش فعالیت متابولیکی در درجه اول باعث هیپوکسی شده و تلاش جوجه‌ها جهت جبران هیپوکسی منجر به افزایش ورود اکسیژن به درون سلول می‌گردد، این افزایش منجر به بالا رفتن فعالیت‌های اکسیداسیون در داخل میتوکندری‌ها شده که می‌تواند زمینه‌ساز تشکیل رادیکالهای آزاد اکسیژن باشد. نقش رادیکال آزاد اکسیژن در ایجاد ضایعه ناشی از هیپوکسی و به دنبال آن ورود مجدد اکسیژن در بسیاری از اندام‌ها از جمله کبد، قلب و روده‌ها نشان داده شده است(۲،۷،۱۰). مطالعه حاضر برای اولین بار نشان داد که میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن از جمله رادیکال هیدروکسیل در شروع روند ایجاد آسیت بالا می‌رود که این نتایج می‌تواند نقش آغازکنندگی رادیکال‌های آزاد را در ایجاد آسیت تقویت کند.

جمع بندی نتایج بدست آمده از پارامترهای مختلف نشان می‌دهد که در شروع روند ایجاد آسیت میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن به طور معنی‌داری افزایش یافته و پس از آن به ترتیب میزان فعالیت‌های آنزیمی و سپس نسبت بطن راست به کل بطن‌ها افزایش بالا می‌رود. این نتایج حاکی از آن است که رادیکال‌های آزاد اکسیژن از جمله رادیکال ئیدروکسیل می‌تواند به عنوان آغازگر سندرم آسیت در جوجه‌های گوشتی مطرح باشند.

References

1. Akbari, A.R.(1998) Effect of intermittent lighting Schedles on experimental ascites in broiler chickens using T_3 in feed. Dissertation, Fac.Vet. Med. Univ. Tehran. No.28.
2. Al_Taweil, R.N., Kassab. A.(1990) Effect of dietary vitamin C on ascites in broiler chicks. Int. J. Vit. Nutr. Res. 60: 366-371.
3. Anjum, A.D.(1990) Experimental Transmission of hydropericardium syndrome and protection against it in commercial broiler chickens. Avian Pathol. 19: 655-660.
4. Bergmeyer, H.U., Horder, M., Rej, R.(1986a)

www.SID.ir

Archive of SID

International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Committee, Analytical section: approved recommendation (1985) on IFCC method for the measurement of catalytic concentration of enzymes part 3. IFCC method for alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2). J.C.C.L.M. 24: 481-495.

5. Bergmeyer, H.U., Horder, M., Rej, R.(1986b) International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Committee, Analytical section: approved recommendation (1985) on IFCC method for the measurement of catalytic concentration of enzymes part 2. IFCC method for alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1). J.C.C.L.M. 24: 497-510.
6. Bottje, W.B., Widemane, R.F.J.R. (1995) Potential role of free radicals in the pathogenesis of pulmonary hypertension syndrome. Poultry Avian Biol. Rev. 6: 221-231.
7. Buyse, N., Dewil, E., Decuypere, E. (1995) Partial O2 and CO2 pressure in arterial and venous blood in ascites resistant and sensitive broiler lines. 84th Annual Meeting of the Poultry Association August 14-18. pp. 77, Edmonton, Canada.
8. Buyse, J., Buyse, N., Hassanzadeh, M. and Decuypere, E. (1995) Intermittent lighting reduces the incidence of ascites in broiler chickens-9th. International Conference on Production Disease in Farm Animals, Sep. 11-14, pp. 97.
9. Cueva, S., Sillau, H., Valenzuela, A. and Ploog, H. (1974) High altitude induced pulmonary hypertension and right heart failure in broiler chickens. Res. Vet. Sci. 16: 370-374.
10. Dacono, D.P.(1994) Free radicals and antioxidants in vascular biology: the roles of reaction kinetics, environment and substrate turnover. Q.J. Med., 87: 445.
11. Decuypere, E., Vega, C., Bartha, T., Buyse, J., Zoons, J. and Alberts, G.A. (1994) Increased sensitivity triiodothyronin (T_3) of broiler lines with a high susceptibility for ascites. Brit. Poultry Sci. 35: 287-297.
12. Diaz-Cruz, A., Nava, C., Villanueva, R., Serret, M., Guinzberg, R. and Pina, E. (1996) Hepatic and cardiac oxidative stress and other metabolic changes in broilers with the ascites syndrome. Poultry Sci. 75: 900-903.
13. Farber, J., Lokyle, M.E., Coleman, J.B. (1990) Biology of disease: mechanisms of cell injury by activated oxygen species. Lab Invest. 62: 670-676.
14. Halliwell, B., Grootveld, M.(1988) Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biochemical Systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. Methods Biochem. Anal. 33: 59-83.
15. Hassanzadeh, M., Bozorgmehrifard, M.H.(2001) Study of metabolical parameters of broiler chickens that has been naturally suffered from ascites syndrome. J. Fac.Vet. Med. Univ. Tehran. 56:15-17.
16. Hassanzadeh, M., Buys, N., Dewil, E., Rahimi, G. and Decuypere, E. (1997a) The prophylactic effect of vitamin C supplementation on broiler ascites incidence and plasma thyroid hormone concentration. Avian Pathol. 26: 33-44.
17. Hassanzadeh, M., Buys, N., Vander Pooten, A. (1997b) Myocardial β-adrenergic receptor charactcrcsties in T_3 induced ascites and in broiler lines differing in ascites susceptibility. Avain Pathol. 26: 293-303.
18. Huchzermeyer, F.W., DeRuyer, A.M.C.(1986) Pulmonary hypertension syndrome associated with ascites in broilers. Vet. Res. 119:94.
19. Hutchison, T.W.S., Riddle, C. (1990) A study of hepatic lesions in broiler chickens at processing plants in Saskatchewan. Canadian Vet. J. 31: 20-25.
20. Jaeschke, H. (1991) Reactive oxygen and ischemia reperfusion injury of the liver. Chem. Biol. Interactions, 79: 115-119.
21. Julian, R.H. (1990) Pulmonary hypertension: A cause of right heart failure ascites in meat type chickens. Feedstuffs. 29: 19-21.
22. Julian, R.M. (1993) Ascites in poultry. Avian Pathol. 22: 419-454.
23. Kadkhodaee, M., Endre, Z.H., Towner, R.A. and Cross, M. (1992) Hydroxyl radical generation following ischacmia reperfusion in cell free perfused rat kidney. Biochemist. et. Biophysics. Acta. 1243:

www.SID.ir

169-174.

24. Maxwell, M.H., Robertson, G.W. and Spence, S. (1986) Studies on ascites syndrome in young broilers: 1. haematology and pathology. Avian Pathol. 15: 511-524.
25. Maxwell, M.H., Dick, L.A., Anderson, I.A. and Mitchell, M.A. (1989) An ultrastructural study of an ascitic syndrome in young broilers reared at high altitude. Avian Pathol. 18: 113-124.
26. Maxwell, M.H., Robertson, G.W. (1996) Ascites in young broilers. 2nd European Poultry Breeders. Round table. No.73.
27. Odom, T.W. (1993) Ascites syndrome overview and update. Poult Dig. 52: 14-22.
28. Owen, R.L., Wideman, R. F., Cowen, B.S. (1995) Changes in pulmonary arterial and femoral arterial blood pressure upon acute exposure to hypodermic hypoxia in broiler chickens. Poult Sci. 74: 708-715.
29. Sillau, A.H., Cueva, S., Morales, P.(1980) Pulmonary arterial hypertension in male and female chickens at 3300m. Pfugers Archiv. 385:269-275.
30. Wideman, R.F., Bottje, W.G. (1993) Current understanding of the ascites syndrome and future research direction, in Proceedings of the Nutritional and Technical Symposium. 101 C: 463.

www.SID.ir

Archive of SID

BIOCHEMICAL, HEMATOLOGICAL AND PATHOLOGICAL ALTERATIONS ASSOCIATED WITH ASCITES IN BROILERS AND THE ROLE OF OXYGEN-DERIVED FREE RADICALS

Jamshidi, R.[1], Arab, H. A.[2]*, Rassouli, A.[2], Javaheri, A. L.[1], Shams,G.R.[2]

[1] *College of Veterinary Medicine University of Semnan, Semnan- Iran.*

[2] *Department of Pharmacology, Faculty of Veteinary Medicine. University of Tehran, Tehran-Iran.*

(Received 27 April 2005 , Accepted 27 October 2006)

Abstract:

Three hundred and fifteen day -old chickens were used to test the relationship between oxygen-derived free radicals and the biochemical, hematological and pathological alterations(associtd with ascites). They were randomly divided into three experimental groups and ascites were developed in two groups of animals by exposing them to low temperature or administration of triiodothyronine (T_3,), and the third group was used as control. Different hematological, biochemical and pathological tests were used to determine the incidence of ascites in birds. These include total red blood cell (RBC), hematochrit (PCV), activities of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) and the ratio of right ventricular weight to total ventricular weight (RV/TV). Two hydroxylated salicylic acid (SA) metabolites, 2, 3- and 2, 5-dihydroxy benzoic acids (2, 3- and 2, 5-DHBA), were measured by HPLC system to detect the generation of hydroxyl ($OH^{\cdot}$) radicals. An analysis of variance (ANOVA) was used to determine the differences between different experimental groups. Ascites syndrome was observed in T_3 and low temperature treated groups as shown by necropsy changes and significant increases ($p<0.05$) in the amount of RBC, PCV, ALT, AST and the ratio of RV/TV. While the significant increase was shown in the amounts of 2,3- and 2,5-DHBA from day 11, the alteration in the values of enzymes and hematoloic parameters and ratio of RV/TV occurred from days 18, 25 and 32 respectively. It can be concluded that OH^{-} radicals may be involved in the initiation of ascites syndrome, but the biochemical, hematological and pathological changes induced by these agents, can cause ascites and other alterations.

Key words: ascites, free radicals, triiodothyronine, salicylic acid, broiler chickens.

***Corresponding author's email: harab@ut.ac.ir, Tel: 021- 61117050, Fax: 021-66933222**

www.SID.ir