



## Original Research Paper

## The role of vitamin C in the treatment of ascites induced by triiodothyronine (T3) in broilers

Hamed Zarei <sup>1\*</sup>, Seyed Rasol Rostami Lima <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Basic Science, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran

### Key Words

Ascites  
Apoptosis  
Broiler  
Caspase  
Vitamin C

### Abstract

**Introduction:** Pulmonary hypertension syndrome (ascites syndrome) is considered as one of the basic problems in broiler chickens that have a high growth rate. Also, previous studies have shown that the amount of apoptosis increases in heart failure and pulmonary hypertension. In this study, for the first time, the effect of vitamin C on apoptosis was investigated by measuring the expression of caspase2 gene in the heart and lungs of broiler chickens suffering from pulmonary hypertension syndrome.

**Materials & Methods:** For this purpose, 90 one-day-old broiler chickens of Ross308 breed were divided into three groups of 30 pieces and bred for 49 days. Triiodothyronine (T3) hormone was used to induce pulmonary hypertension in chickens. After performing PCR for caspase2 and  $\beta$ -actin genes, the density of each of the bands was measured and compared in the form of caspase2/ $\beta$ -actin ratio in the studied groups.

**Results:** The amount of mRNA related to caspase2 gene at the ages of 21 and 49 days showed a significant decrease in the treatment group (1200 ppm vitamin C in the drinking water from the beginning of rearing) compared to the patient group ( $P < 0.05$ ). This significant difference indicates the reduction of apoptosis in the group that was treated with T3 hormone and then treated with vitamin C. Also, the ratio of the weight of the right ventricle to the total weight of both ventricles (RV/TV) as an index of the induction of this syndrome improved in the treatment group at the age of 49 days ( $P < 0.0$ ).

**Conclusion:** Finally, the present study showed that vitamin C can reduce the amount of apoptosis in broilers suffering from pulmonary hypertension.

\* Corresponding Author's email: [h.zarei@iautmu.ac.ir](mailto:h.zarei@iautmu.ac.ir)

Received: 17 December 2023; Reviewed: 18 January 2024; Revised: 19 March 2024; Accepted: 15 April 2024

(DOI):10.70102/AEJ.2025.16.2.15

## مقاله پژوهشی

## نقش ویتامین C در درمان آسیت القا شده با تری یدو تیرونین (T3) در جوجه‌های گوشتی

حامد زارعی<sup>۱\*</sup>، سیدرسول رستمی‌لیما<sup>۲</sup><sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران<sup>۲</sup> گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران

## چکیده

## کلمات کلیدی

**مقدمه:** سندرم هایپرتانسیون ریوی (سندرم آسیت) به‌عنوان یکی از معضلات اساسی در جوجه‌های گوشتی که نرخ رشد بالایی دارند، مطرح می‌باشد. هم‌چنین مطالعات پیشین نشان داده است که میزان آپوپتوز در نارسایی قلبی و هایپرتانسیون ریوی افزایش می‌یابد. در مطالعه حاضر برای نخستین بار تاثیر ویتامین C بر میزان آپوپتوز از طریق اندازه‌گیری بیان ژن کاسپاز ۲ در قلب و ریه جوجه‌های گوشتی مبتلا به سندرم هایپرتانسیون ریوی مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** بدین منظور تعداد ۹۰ قطعه جوجه خروس گوشتی یک‌روزه نژاد راس ۳۰۸ به سه گروه ۳۰ قطعه‌ای تقسیم شدند و به مدت ۴۹ روز پرورش یافتند. جهت القا هایپرتانسیون ریوی در جوجه‌ها از هورمون تری یدو تیرونین (T3) استفاده شد. پس از انجام PCR برای ژن‌های کاسپاز ۲ و بتا-اکتین، دانسیته هر یک از باندها اندازه‌گیری شده و به صورت نسبت کاسپاز ۲/بتا-اکتین در گروه‌های مورد مطالعه با یکدیگر مقایسه شد.

**نتایج:** میزان mRNA مربوط به ژن کاسپاز ۲ در سنین ۲۱ و ۴۹ روزگی کاهش معنی‌داری را در گروه درمان (مصرف ویتامین C در آب مصرفی از ابتدای پرورش به میزان ۱۲۰۰ ppm در لیتر) نسبت به گروه بیمار نشان داد ( $P < 0/05$ ). این اختلاف معنی‌دار بیانگر کاهش میزان آپوپتوز در گروهی است که با دریافت هورمون T3 مبتلا به سندرم هایپرتانسیون ریوی و سپس با دریافت ویتامین C درمان شدند. هم‌چنین نسبت وزن بطن راست به وزن مجموع هر دو بطن (RV/TV) به عنوان شاخص القا این سندرم در سن ۴۹ روزگی در گروه درمان بهبود یافت ( $P < 0/05$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** در نهایت مطالعه حاضر نشان داد که ویتامین C می‌تواند میزان آپوپتوز در جوجه‌های گوشتی مبتلا به هایپرتانسیون ریوی را کاهش دهد.

\* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: h.zarei@iautmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۲۶ آذر ۱۴۰۲؛ تاریخ داوری: ۲۸ دی ۱۴۰۲؛ تاریخ اصلاح: ۲۹ اسفند ۱۴۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۲۷ فروردین ۱۴۰۳

(DOI):10.70102/AEJ.2025.16.2.15

## مقدمه

زنده در مقابل اثرات مضر محافظت می کنند و از واکنش‌هایی که باعث اکسیداسیون ترکیبات مولکولی با ساختارهای سلولی می‌شوند جلوگیری به عمل می‌آورند (۱). در سیستم زنده، هنگام بروز اکسیداسیون، آنتی‌اکسیدان‌ها با رادیکال‌های آزاد ترکیب شده و از فعالیت آن‌ها می‌کاهند (۲۶). اسید آسکوربیک یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی محلول در آب است. این آنتی‌اکسیدان در اثر متقابل با رادیکال‌های آزاد، با جابجایی یک اتم هیدروژن موجب ثبات رادیکال آزاد می‌شود. به‌عنوان مثال ویتامین C توکوفروکسیل را که از ترکیب ویتامین E با رادیکال‌های آزاد به‌دست آمده، به‌صورت توکوفرول احیاء در می‌آورد که سپس به رادیکال آزاد مونو آسکوربات تبدیل می‌شود. طی فعالیت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی این رادیکال آزاد به آسکوربات و هیدروآسکوربات، که هیچ‌کدام رادیکال آزاد نیستند، تبدیل می‌شود. هم‌چنین ویتامین C در کاهش اثر اکسیدان‌ها در تخریب اندوتلیوم عروق، به‌ویژه عروق ریوی، تاثیر به‌سزایی دارد (۲۷). با توجه به این امر که در غالب مطالعات صورت گرفته پیرامون پاتوفیزیولوژی سندرم هایپرتانسیون ریوی به جنبه‌های سلولی و مولکولی متأثر از این سندرم در قلب و ریه جوجه‌های مبتلا پرداخته نشده است، لذا بر آن شدیم تا از طریق اندازه‌گیری بیان ژن کاسپاز ۲ به‌عنوان یکی از شاخص‌های آپوپتوز، در بطن راست و ریه جوجه‌های مبتلا، تأثیر ویتامین C بر میزان آپوپتوز ایجادشده در این سندرم را تعیین نماییم.

## مواد و روش‌ها

**گروه‌های آزمایشی:** تعداد ۹۰ قطعه جوجه گوشتی (راس ۳۰۸) یک‌روزه به ۳ گروه ۳۰ قطعه‌ای به‌شرح زیر تقسیم‌بندی گردید: گروه شاهد: دریافت‌کننده جیره پایه در تمام دوره آزمایش، گروه بیمار: دریافت‌کننده جیره پایه + هورمون تری‌یدوتیرونین (T3) با دوز ۱/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم از هفت‌روزگی، گروه درمانی: دریافت‌کننده جیره پایه + هورمون تری‌یدوتیرونین (T3) با دوز ۱/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم از هفت‌روزگی + ویتامین C به‌میزان ۱۲۰۰ ppm از ابتدای دوره پرورش. پیش از ورود جوجه‌ها سالن و پن‌ها ضدعفونی شدند. جوجه‌ها در تمام ساعات شبانه‌روز دسترسی آزادانه به آب آشامیدنی و جیره غذایی داشتند. در طی پرورش جوجه‌ها، تا روز دوازدهم از پیش‌دان، تا روز بیست و هشتم از جیره رشد و پس از آن از جیره پایانی استفاده گردید. در این سیستم پرورشی، سالن در طی شبانه‌روز، ۲۳ ساعت دارای نور و به‌مدت یک ساعت فاقد نور بوده است. به‌منظور حفظ سلامت جوجه‌ها و مصونیت آن‌ها در برابر برخی بیماری‌های ویروسی شایع در منطقه، برنامه واکسیناسیون بدین شرح اجرا شد:

سندرم هایپرتانسیون ریوی (PHS) نتیجه فرآیندهایی است که در هر دو سیستم تنفسی و قلبی-عروقی را درگیر می‌کند. این عارضه، یک اختلال متابولیک و سندرم چند عاملی است که در اثر تعامل بین عوامل محیطی، فیزیولوژیکی و ژنتیکی ایجاد می‌شود (۱۷). وقوع PHS با اختلالاتی هم‌چون هیپوکسمی، اضافه بار قلبی-ریوی، انسداد عروقی و قلبی و هایپرتروفی بطن راست همراه است. در جوجه‌های گوشتی با سرعت رشد بالا، نارسایی قلبی شایع است و سیستم تنفسی قادر به ارائه تهویه و تبادل گاز کارآمد نیست که در نهایت منجر به هیپوکسمی می‌شود (۸). افزایش جریان خون، برون ده قلبی، فشار عروقی در ریه و هایپرتروفی بطن راست به‌عنوان پیامدهای جبرانی سیستم قلبی-عروقی شناخته می‌شوند که این وضعیت در نهایت باعث ایجاد PHS می‌شود (۲، ۳). مطالعات نشان داده است که در طی این سندرم مقادیر فراوانی از اکسیدان‌ها در بافت‌های آسیب دیده تولید می‌شود. هم‌چنین، محققان در مطالعات مختلف بارزترین عوامل محیطی دخیل در بروز PHS را مورد بررسی قرار دادند. از مهم‌ترین این عوامل می‌توان به ارتفاع، تنش سرما، روشنایی، کیفیت هوا، تهویه، جیره‌های با چگالی مواد مغذی بالا و شرایط محیط جوجه‌کشی اشاره نمود (۱۳، ۱۴، ۲۹). از سوی دیگر یافته‌های حاصل از تحقیقات متعدد بیانگر افزایش میزان آپوپتوز در بیماری‌های قلبی و سندرم هایپرتانسیون ریوی بوده است (۱۲). آپوپتوز معمولاً در طول رشد و پیری به‌عنوان یک فرایند هومئوستاتیک برای حفظ جمعیت سلولی در بافت‌ها رخ می‌دهد. آپوپتوز هم‌چنین به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی به‌عنوان مثال در واکنش‌های ایمنی یا زمانی که سلول‌ها در اثر بیماری آسیب می‌بینند، رخ می‌دهد. آپوپتوز یک فرآیند بسیار حفاظت شده با مسیرهای متعدد درگیر در چندین پدیده فیزیولوژیکی و پاتولوژیک است. در سطح مولکولی، تغییرات عمده در این فرآیند شامل انقباض سلولی، تشکیل اجسام آپوپتوز، فعال شدن کاسپازها، تراکم کروماتین و در نهایت تکه تکه شدن DNA است. بازیگران مرکزی در فرآیند آپوپتوز، کاسپازها هستند، پروتئازهای سیستمین خاصی که عملکرد پروتئولیتیک دارند. کاسپازها آنزیم‌هایی هستند که سایر پروتئین‌های سیتوپلاسمی حاوی بقایای اسید آسپارتیک را تجزیه می‌کنند. افزایش کاسپاز ۱ (تحریک شده توسط عوامل التهابی) و کاسپاز ۲ می‌تواند به‌عنوان پارامترهایی برای تشخیص مراحل اولیه فرآیند آپوپتوز در نظر گرفته شود (۱۵، ۲۰، ۲۷). آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیبات شیمیایی هستند که در غلظت‌های کم‌تر از ماده اکسید شونده از اکسیداسیون ممانعت می‌کنند. از نظر زیستی آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان ترکیباتی تعریف می‌شوند که از سیستم

### استخراج و خالص سازی RNA از بافت بطن راست قلب و

ریه: در آزمایشگاه لوله‌های حاوی بافت ریه و بطن راست قلب از فریزر خارج گردید و با روش تک مرحله‌ای و یا همان روش استخراج اسید گوانیدیم تیوسیانات- فنول کلروفرم طی مراحل زیر، RNA کل بافت ریه و قلب استخراج گردید (۶): بخشی از بافت ریه و قلب در هاون همراه با مقداری ازت مایع خرد و به صورت پودر درآمد. به ازای هر ۱۰۰ میلی گرم از بافت ریه، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول دنا تورکننده در یک لوله ۱/۵ میلی لیتری به آن اضافه گردید. محلول دنا تورکننده شامل: گوانیدیم تیوسیانات (۲۵ گرم)، سدیم سیترات (۱/۸ میلی لیتر)، سارکوزیل (۱۰٪) (۲/۶ میلی لیتر) و آب مقطر (۲۹/۳ میلی لیتر) بود. در هنگام استفاده به ۵۰ میلی لیتر از محلول فوق ۳۵۰ میکرولیتر از ۲- مرکاپتواتانل اضافه شد. به لوله فوق سدیم استات به میزان ۵۰ میکرولیتر اضافه گردید. ۵۰۰ میکرولیتر از فنل اشباع شده با آب و ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کلروفرم ایزوآمیلوالکل (۴۹:۱) اضافه گشته و به خوبی مخلوط شد. لوله حاوی مواد فوق را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد قرار داده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه توسط سانتریفیوژ یخچال دار در ۴ درجه سانتی گراد در ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. فاز مایع به یک لوله اپندورف جدید منتقل گردید. هم حجم مایع از محلول ایزوپروپانول (۱۰۰٪) اضافه شده و بعد از تکان دادن، در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. لوله مذکور در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه با ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب مجدداً در ۳۰۰ میکرولیتر محلول دنا تورکننده حل شد. ۳۰۰ میکرولیتر از ایزوپروپانول (۱۰۰٪) اضافه شد و ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفت. لوله فوق در ۴ درجه سانتی گراد با ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی خارج گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از اتانول (۷۵٪) به رسوب ته لوله اضافه شد و ورتکس گردید. سپس به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. لوله فوق در ۲۵ درجه سانتی گراد با ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی خارج شد. با توجه به احتمال آلودگی محلول به دست آمده از استخراج فوق به DNA، ضروری بود به روش زیر DNA حذف گردیده تا RNA با خلوص بالا در اختیار داشته باشیم: ابتدا میزان RNA موجود در محلول حاصله از مراحل استخراج RNA با روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. به ازای هر یک میکروگرم از RNA موجود در محلول یک واحد از آنزیم دزوکسی ریبونوکلاز I و یک حجم از بافر مربوطه (حاوی ۱۰۰ میکرومول تریس اسید کلریدریک، ۲/۵ میکرومول کلریدمنیزیم و ۰/۱ میکرومول کلریدکلسیم) اضافه گردید. حجم

نیوکاسل: واکسن کلون ۳۰ به صورت قطره چشمی همراه با فرم روغنی واکسن دو گانه نیوکاسل- آنفولانزا به صورت تزریقی در روز ۱۴ و هم چنین واکسن لاسوتا در سن ۲۵ روزگی به صورت آشامیدنی در جوجه‌ها استفاده شد. برونشیت: واکسن برونشیت در سن چهار روزگی به صورت آشامیدنی تجویز شد. گامبرو: این واکسن در سن ۱۷ و ۲۷ روزگی به صورت آشامیدنی به جوجه‌ها ارائه شد.

درجه حرارت محیط نیز بدین صورت تنظیم گردید که در ابتدای ورود، کلیه جوجه‌ها در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس در سه روز اول روزانه یک درجه سانتی گراد از دمای محیط کاسته گردید. پس از آن به طور متوسط هر سه روز یک درجه دمای سالن کاهش یافت تا این که در روز ۲۱ دوره پرورش، دما به ۲۲ درجه سانتی گراد رسید. سپس تا انتهای دوره دمای محیط در حدود ۲۲-۲۱ درجه سانتی گراد تثبیت شد. جهت اندازه گیری دمای محیط در هر سالن از یک دماسنج استفاده گردید. دماسنج‌ها در ارتفاع ۲۰ سانتی متری سطح بستر جوجه‌ها قرار داده شده بودند.

### نمونه برداری و تعیین میزان هایپر تروفی بطن راست: در

طی دوره پرورش، دو بار نمونه برداری در روزهای ۲۱ و ۴۹ از هر سه گروه انجام گرفت، به نحوی که هر بار تعداد ۶ قطعه جوجه از هر گروه به طور تصادفی انتخاب و توزین شده و سپس تمامی جوجه‌ها با قطع نمودن شریان‌های کاروتید و وریدهای وداج ذبح شدند. پس از خروج کامل خون، در طی عمل کالبدگشائی وضعیت عمومی لاشه، میزان پرخونی و ادم، تجمع مایع در محوطه بطنی، وجود مایع اضافی در آبشامه قلب، وضعیت ریه‌ها، کلیه‌ها، کبد و هم چنین ضایعات قلبی مورد ارزیابی قرار گرفت و وجود هر گونه حالت غیرطبیعی ثبت شد. آن گاه با قطع نمودن عروق متصل به قلب، قلب از قفسه سینه خارج شد. پس از جدا نمودن قلب هر جوجه از لاشه، عروق بزرگ، سینوس‌ها، دهلیزها و چربی‌های اطراف قلب به وسیله قیچی جراحی به دقت جدا گردید تا در نهایت فقط بطن‌ها باقی بمانند. سپس بطن راست به دقت توسط قیچی جراحی از محل اتصال آن به دیواره بین دو بطن بریده شد و هر دو بطن از وجود احتمالی لخته‌های خون کاملاً پاک شدند. وزن بطن راست و وزن مجموع دو بطن به صورت جداگانه با ترازوی حساس تعیین شد و نهایتاً شاخص وزنی قلب مربوط به هر یک از جوجه‌ها به صورت نسبت وزن بطن راست به وزن مجموع هر دو بطن (RV/TV) برحسب گرم محاسبه شد. لازم به ذکر است براساس مطالعات پیشین، چنان چه این نسبت بیش تر ۰/۲۹ باشد آن جوجه مبتلا به هایپرتانسیون ریوی شده است (۲۴). بطن راست و ریه‌های جدا شده جوجه‌های مورد نظر در لوله‌های سرپوش دار مقاوم به انجماد (Cryotube) در ظرف حاوی ازت مایع قرار داده شد و بلافاصله به فریزر با دمای ۷۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند.

میکروگرم)، راندوم هگزامر (۲۰۰ نانوگرم) و dNTP (۰/۵ میلی‌مولار) در یک لوله ۰/۵ میلی‌لیتری اپندورف ریخته و حجم نهایی این محلول توسط آب مقطر به ۲۰ میکرولیتر رسانده و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله بعد به این محلول، مهارکننده RNase (۴۰ واحد)، بافر RT شامل تریس-اسید کلریدریک (۵۰ میلی‌مولار)، کلرید پتاسیم (۷۵ میلی‌مولار)، کلرید منیزیم (۳ میلی‌مولار)، DTT (۱۰ میلی‌مولار) و آنزیم رونوشت برداری معکوس به نام M-MLV (۲۰۰ واحد)، اضافه شد. محلول حاصله به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۵۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در مرحله آخر محلول را در درجه حرارت ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده تا آنزیم رونوشت برداری معکوس غیرفعال شود. در مرحله بعد با استفاده از پرایمر اختصاصی برای کاسپاز ۲ (جدول ۱) قسمت‌هایی از mRNA که مربوط به کاسپاز ۲ بود، تکثیر گردید.

نهایی محلول فوق توسط آب حاوی DEPC به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول فوق به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در انتها، دزوکسی ریبونوکلاز I، با قرارگرفتن لوله حاوی محلول فوق در درجه حرارت ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، در حضور ۲/۵ میکرومول از EDTA خنثی گردید. RNA موجود در محلول دوباره توسط اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان خلوص آن‌ها بررسی شد. بایستی توجه داشت که اگر نسبت OD<sub>۲۸۰</sub>/OD<sub>۲۶۰</sub> بین ۱/۸ تا ۲ باشد نشان‌دهنده خلوص قابل توجه RNA است. کیفیت RNA توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد، با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نیز مورد بررسی قرار گرفت.

#### RT-PCR نیمه کمی: هدف از این مرحله ابتدا تهیه کپی DNA

(cDNA) از RNA بوده که تحت عنوان رونوشت برداری نامیده می‌شود و سپس این DNA با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) افزوده سازی می‌گردد. جهت ساخت cDNA ابتدا موادی شامل RNA (۱)

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در انجام PCR در این مطالعه

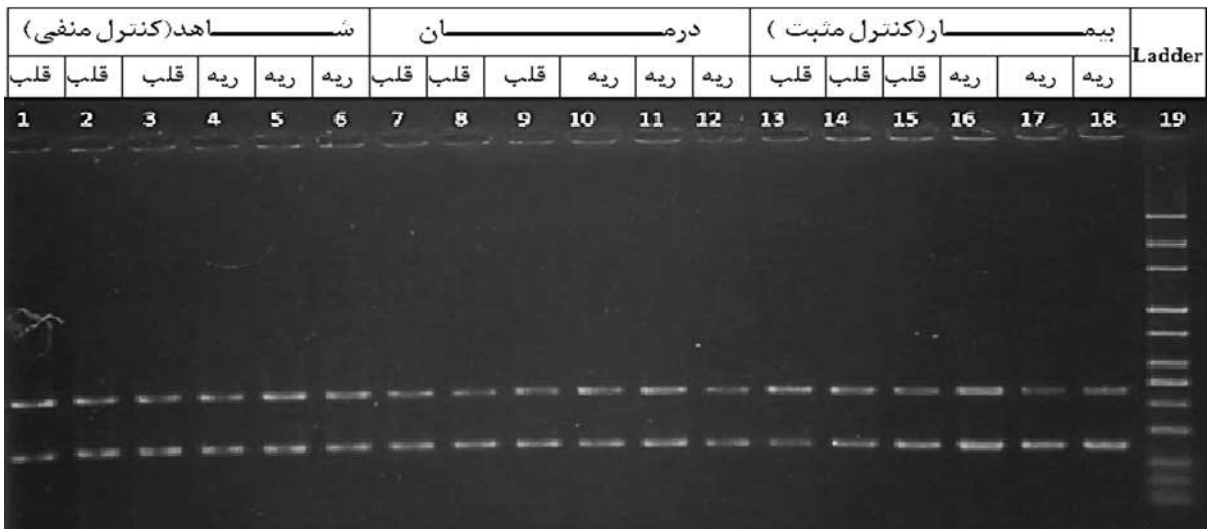
ژن	انتهای ۳' پرایمر	انتهای ۵' پرایمر	دفعات تکرار چرخه	دمای annealing	اندازه محصول PCR
بنا-اکتین	ACTGGATTTCGAGCAGGAGAT	TTAGAAGCATTTCGCGTGGACAA	۲۵	۶۰ درجه سانتی‌گراد	۴۶۸ جفت باز آلی
کاسپاز ۲	TGGCACTGATGGCAAACCTCC	ATCGGAGCGTGTAGGCAAAC	۲۷	۶۲ درجه سانتی‌گراد	۲۳۸ جفت باز آلی

در این روش ژن داخلی استاندارد به نام بنا-اکتین که اصطلاحاً Housekeeping gene نامیده می‌شود نیز تکثیر گردید تا در هنگام سنجش دانسیته باندهای ژن کاسپاز ۲، مقادیر به دست آمده با دانسیته باند این ژن داخلی مقایسه گردد. در واقع به همین دلیل این روش را نیمه کمی (Semiquantitative) نامیده‌اند (۲۱). مواد لازم برای هر واکنش در این مرحله برای بنا-اکتین عبارتند از: مخلوط dNTP (۱/۵ میلی‌مول) - بافر PCR که شامل: شامل تریس-اسید کلریدریک (۵ میلی‌مولار)، کلرید سدیم (۱۰ میلی‌مولار)، تریتون X-۱۰۰ (۰/۱٪)، DTT (۰/۱ میلی‌مولار)، EDTA (۰/۰۱ میلی‌مولار) و گلیسرول ۵٪ (۲/۵ میکرولیتر) می‌باشد - کلرید منیزیم (۱/۵ میلی‌مولار) - پرایمر اختصاصی R+F مربوط به بنا-اکتین (۲ میلی‌مولار) - cDNA (۱ میکرولیتر) - پلی‌مرز Taq (۰/۲ واحد). بعد از مخلوط کردن مواد فوق در یک لوله اپندورف، حجم مخلوط را با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده و سپس در دستگاه Thermocyclor قرار دادیم، البته قبلاً دستگاه به صورت زیر برای ژن کاسپاز ۲ برنامه‌ریزی گردید:

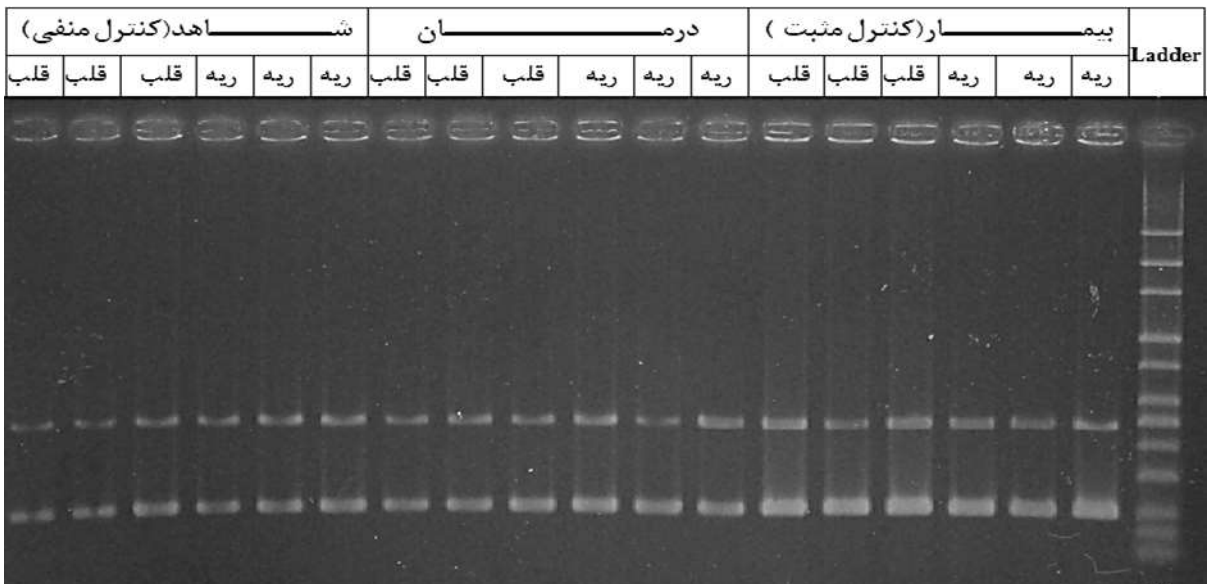
برنامه حرارتی PCR برای ژن کاسپاز ۲: الف) ۴ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد جهت باز شدن اولیه دو رشته DNA (pre Denaturation) ب) ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد جهت باز شدن دو رشته DNA (Denaturation)، ج) ۸۰ ثانیه در ۶۲ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال پرایمرها به توالی هدف (Annealing)، د) ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت طویل شدن رشته‌های جدید (Extension)، ه) ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت تکمیل تکثیر رشته‌های ناقص Final Extension نام دارد. مراحل ب-د در ۲۷ سیکل تکرار گردید.

شده در ژل الکتروفورز مقایسه کرده تا اندازه تقریبی باندها مشخص شود. اندازه‌های به دست آمده با اندازه‌های مورد انتظار مقایسه شده تا از اختصاصی بودن باندهای به دست آمده برای هر ژن اطمینان حاصل گردد. در مرحله انتهایی که دانسیتومتری است، با استفاده از برنامه کامپیوتری photo-capt v.99 Image software دانسیته هر یک از باندها اندازه گیری شده و سپس با دانسیته باندهای بتا-اکتین مربوطه مقایسه و به صورت نسبت کاسپاز ۲/بتا-اکتین ثبت گردید.

پرایمرها به توالی هدف (Annealing)، (د) ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد جهت طویل شدن رشته‌های جدید (Extension)، (ه) مرحله Final Extension جهت تکمیل تکثیر رشته‌های ناقص به مدت ۴ دقیقه مراحل ب تا د در ۲۵ سیکل تکرار گردید. بعد از انجام PCR برای دو ژن کاسپاز ۲ و بتا-اکتین باندهای مربوطه را با استفاده از عمل ژل الکتروفورز در ژل آگارز (۱/۵٪) متمایز ساخته و پس رنگ آمیزی با اتیدیدیم برماید توسط اشعه ماوراء بنفش مورد مشاهده قرار گرفت (شکل های ۱ و ۲). سپس باندهای حاصله را با باندهای مارکر استفاده



شکل ۱: ژل الکتروفورز ژن کاسپاز ۲ و بتا-اکتین در بافت بطن راست قلب و ریه در سن ۲۱ روزگی (ردیف بالا بتا-اکتین و ردیف پایین کاسپاز ۲)



شکل ۱: ژل الکتروفورز ژن کاسپاز ۲ و بتا-اکتین در بافت بطن راست قلب و ریه در سن ۴۹ روزگی (ردیف بالا بتا-اکتین و ردیف پایین کاسپاز ۲)

درمانی با یکدیگر مقایسه شده است. با توجه به نتایج به دست آمده میزان mRNA مربوط به کاسپاز ۲ بافت بطن راست در هر دو سن ۲۱ و ۴۹ روزگی در گروه درمانی نسبت به گروه بیمار کاهش یافته است که این کاهش از لحاظ آماری دارای معنی دار می باشد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۳: نسبت دانسیته کاسپاز ۲/بتا-اکتین حاصل از PCR در بافت ریه بین گروه‌های مورد مطالعه در سنین مختلف

سن (روز)	گروه درمان	گروه بیمار	گروه شاهد
۲۱	$2.04 \pm 0.26^a$	$3.65 \pm 0.14^b$	$2.12 \pm 0.17^a$
۴۹	$2.04 \pm 0.26^a$	$4.52 \pm 0.25^b$	$1.82 \pm 0.23^a$

a,b حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین دو گروه در یک سن خاص است ( $P < 0.05$ )

جدول ۴: نسبت دانسیته کاسپاز ۲/بتا-اکتین حاصل از PCR در بطن راست بین گروه‌های مورد مطالعه در سنین مختلف

سن (روز)	گروه درمان	گروه بیمار	گروه شاهد
۲۱	$1.79 \pm 0.28^a$	$2.91 \pm 0.12^b$	$1.41 \pm 0.15^a$
۴۹	$2.13 \pm 0.24^a$	$3.59 \pm 0.33^b$	$1.89 \pm 0.30^a$

a,b حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین دو گروه در یک سن خاص است ( $P < 0.05$ )

## بحث

مطالعات اخیر ثابت نموده است که در شرایط طبیعی، هر عاملی که موجب افزایش فعالیت‌های متابولیکی در جوجه‌های گوشتی شود میزان بروز هایپرتانسیون ریوی و آسیب را افزایش می‌دهد. افزایش سرعت رشد، کاهش درجه حرارت، تغذیه با جیره‌های پر انرژی یا مصرف جیره‌های پلت شده از جمله عواملی هستند که می‌توانند با افزایش عملکردهای متابولیکی موجب افزایش مصرف اکسیژن در طیور و در نهایت بروز آسیب به خصوص در جوجه‌های گوشتی شوند (۵، ۱۵، ۲۵). از این رو در مطالعه حاضر به منظور القای هایپرتانسیون ریوی با افزایش متابولیسم و در نتیجه افزایش مصرف اکسیژن هورمون T3 به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی از هفت روزگی افزوده شد. به‌طور کلی افزایش فعالیت‌های متابولیکی، افزایش نیاز به اکسیژن را به دنبال خواهد داشت و سبب بروز هیپوکسی بافتی می‌گردد که جهت جبران آن و رفع نیازهای بافتی برون ده قلبی افزایش می‌یابد، جریان خون ریوی بیش تر شده و نهایتاً منجر به بروز آسیب می‌گردد. تحقیقات پیشین مشخص نموده است که پرکاری تیروئید موجب افزایش عملکرد قلبی عروقی به صورت افزایش برون ده قلبی و کاهش مقاومت عروق سیستمیک می‌گردد که خود افزایش ضربان قلب، افزایش عملکرد سیستمولیک، دیاستولیک و هایپرتروفی قلب را به دنبال دارد (۴، ۱۰). زمانی که به

## محاسبات آماری: برای انجام محاسبات آماری از نرم افزار SPSS-14

استفاده شده و جهت مقایسه مقادیر هر یک از متغیرها مابین سه گروه بیمار، درمانی و شاهد از آزمون (one way anova) استفاده گردید ( $P < 0.05$ ). به عنوان اختلاف معنی دار از نظر آماری مدنظر قرار گرفت. کلیه نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد از میانگین (mean  $\pm$  SEM) ثبت شدند.

## نتایج

### مقایسه میانگین $\pm$ خطای معیار از میانگین نسبت وزن بطن

راست به وزن هر دو بطن (RV/TV) گروه‌های آزمایشی در سنین مختلف: با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۲ نسبت وزن بطن راست به مجموع دو بطن در هر دو سن ۲۱ و ۴۹ روزگی در گروه بیمار نسبت به هر دو گروه شاهد و درمانی افزایش یافته است که این افزایش در سن ۴۹ روزگی نسبت به هر دو گروه درمانی و شاهد از لحاظ معنی دار بوده است ( $P < 0.05$ ). هم چنین این نسبت در ۴۹ روزگی جوجه‌ها بیش تر از ۰/۲۹ شده است که نشان دهنده بروز هایپرتانسیون ریوی می‌باشد.

### جدول ۲: نسبت وزن بطن راست به وزن هر دو بطن (RV/TV) بین

#### گروه‌های مورد مطالعه در سنین مختلف

سن (روز)	گروه درمان	گروه بیمار	گروه شاهد
۲۱	$0.21 \pm 0.01$	$0.24 \pm 0.01$	$0.22 \pm 0.01$
۴۹	$0.22 \pm 0.01^a$	$0.32 \pm 0.00^b$	$0.19 \pm 0.00^a$

a,b حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین دو گروه در یک سن خاص است ( $P < 0.05$ )

### مقایسه میانگین $\pm$ خطای معیار از میانگین نسبت دانسیته

#### کاسپاز ۲/بتا-اکتین حاصل از PCR در بافت ریه بین گروه‌های

آزمایشی در سنین مختلف: نسبت دانسیته کاسپاز ۲/بتا-اکتین بافت ریه در گروه‌های شاهد، بیمار و درمانی در جدول ۳ با یکدیگر مقایسه شده است. با توجه به نتایج به دست آمده میزان mRNA مربوط به کاسپاز ۲ بافت ریه در هر دو سن ۲۱ و ۴۹ روزگی در گروه درمانی نسبت به گروه بیمار کاهش معنی داری را نشان داده است ( $P < 0.05$ ).

### مقایسه میانگین $\pm$ خطای معیار از میانگین نسبت دانسیته

#### کاسپاز ۲/بتا-اکتین حاصل از PCR در بافت بطن راست بین

#### گروه‌های آزمایشی در سنین مختلف: در جدول ۴ نسبت دانسیته

کاسپاز ۲/بتا-اکتین بافت بطن راست در گروه‌های شاهد، بیمار و

هر علتی فعالیت متابولیکی بافت‌های مختلف بدن افزایش یابد، به جریان خون موضعی در آن بافت افزوده می‌گردد و این امر موجب کاهش فشار خون عمومی بدن می‌شود. با وقوع این حالت قلب با افزایش عملکرد خود سعی در جبران فشار خون کاهش یافته می‌کند که البته در طولانی مدت می‌تواند موجب هایپرتروفی قلب و در نتیجه نارسایی آن گردد. RV/TV یکی از پارامترهای ارزیابی بروز هایپرتروفی قلب است. شاخص RV/TV در واقع بیان‌کننده میزان هایپرتروفی بطن راست در مقایسه با کل توده بطنی است و نشان می‌دهد که چه نسبتی از وزن بطن‌ها مربوط به بطن راست است. در نتیجه افزایش این نسبت در مقایسه با حالت طبیعی، می‌تواند به علت هایپرتروفی بطن راست باشد. افزایش فشار سرخرگ‌های ریوی مستقیماً بر این شاخص اثرگذار است و نسبت RV/TV می‌تواند سنجشی برای فشار بار روی بطن راست باشد (۲۴). یافته‌های حاصل از مطالعات پیشین ثابت کرده است که رشد ریه‌ها در جوجه‌های گوشتی در مقایسه با رشد بدن، کندتر است (۳). با توجه به این نتایج، افزایش وابسته به سن نسبت RV/TV در گروه بیمار را می‌توان به همین موضوع نسبت داد. در مطالعه حاضر، در گروه بیمار در تمام مراحل آزمایش این نسبت بزرگ‌تر از گروه شاهد و درمان بوده است و این افزایش در ۴۹ روزگی جوجه‌ها در مقایسه با هر دو گروه شاهد و درمان افزایش معنی‌داری را نشان داده است. در مجموع با استناد به توصیف Wideman، از سندرم هایپرتانسیون ریوی که افزایش نسبت RV/TV به بیش از ۰/۲۹ را نشانه حضور این سندرم در پرندگان مطرح نموده است (۲۴) و با توجه به داده‌های به‌دست آمده، این سندرم در ۴۹ روزگی جوجه‌ها گروه بیمار را کاملاً درگیر کرده است. افزایش استرس‌های اکسیداتیو شرایطی را توصیف می‌کند که در آن آنتی‌اکسیدان‌های سلولی قادر به غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد واکنش‌دهنده نیستند. غلظت بالای این عوامل با افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و تولید مقادیر فراوانی مالون دی‌آلدئید به نواکلئیک اسید، لیپید و پروتئین‌های سلولی آسیب می‌رسانند که در نهایت سبب بروز نکروز، آپوپتوز و سرانجام مرگ سلول می‌گردد (۹). بر اساس یافته‌های مطالعه کنونی، در گروهی از جوجه‌ها که توسط مقادیر مختلف ویتامین C تحت درمان قرار گرفته بودند، این معیار قلبی تا حدود زیادی به میزان طبیعی آن نزدیک شد که می‌تواند ناشی از اثرات آنتی‌اکسیدانی ویتامین C در این سندرم باشد. تا به امروز تمرکز غالب مطالعات بر پاتوفیزیولوژی سندرم هایپرتانسیون ریوی بوده است و عمدتاً عواملی مانند افزایش فشار خون ریوی، اختلالات قلبی و رادیکال‌های آزاد به عنوان مهم‌ترین علل احتمالی آسیب در طیور گوشتی مطرح نمودند و توجه کم‌تری به جنبه‌های ملکولی و سلولی تأثیر گرفته شده از این سندرم در قلب و ریه جوجه‌های مبتلا شده

است. اندازه‌گیری بیان ژن (کاسپاز ۲) به عنوان شاخص، در بطن راست و چپ قلب و ریه جوجه‌های مبتلا، میزان آپوپتوز ایجاد شده در این سندرم را تعیین نماید (۱۹). براساس مطالعات Upadhyay و همکاران، مشخص شده است که فعالیت کاسپاز ۳ به طور معنی‌داری در رت‌های هایپرتیروئید افزایش می‌یابد و افزایش هورمون‌های تیروئیدی سبب افزایش میزان آپوپتوز می‌گردد (۲۲). هم‌چنین Wang و همکاران، اعلام نمودند که میزان آپوپتوز در قلب رت‌هایی که در معرض هورمون تیروئیدی قرار داشتند افزایش یافته است و پیشنهاد نمودند که افزایش میزان آپوپتوز، قلب را به سمت نارسا شدن هدایت می‌نماید (۲۳). لازم به ذکر است مطالعات متعددی نشان دادند که میزان آپوپتوز در نارسایی قلبی و هایپرتانسیون ریوی افزایش می‌یابد. در تحقیق حاضر، مطالعه انجام گرفته توسط RT-PCR نیمه کمی بر روی بیان ژنی (کاسپاز ۲) در قلب و ریه طیور گوشتی حاکی از آن بوده است که این میزان بیان در گروهی که هورمون T3 دریافت نموده‌اند به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و درمان افزایش یافته است ( $P < 0.05$ ) که هم راستا با نتایج مطالعات پیشین بوده است. طبق تحقیقات Hochhauser و همکاران، افزایش آپوپتوز نقش مهمی در انواع ایسکمی‌های آسیب‌رسان، از جمله ایسکمی میوکارد که در اثر خون‌رسانی ناقص و کاهش میزان اکسیژن اتفاق می‌افتد، ایفا می‌کند و باعث مرگ کاردیومیوسیت‌ها در موش‌ها می‌شود (۱۶). هم‌چنین Freude و همکاران، مطرح نمودند که آسیب ناشی از ایسکمی باعث شروع آپوپتوز می‌گردد و چنانچه ایسکمی ادامه پیدا کند، تبدیل به نکروز خواهد شد (۱۱، ۱۸). بررسی روی مدل‌های حیوانی از جمله موش، رت، خرگوش و سگ و هم‌چنین مدل انسانی نشان داده است که سیتوکروم C سیتوزولیک که در پاسخ به تحریک آپوپتوز از میتوکندری آزاد می‌گردد و هم‌چنین پروآنزیم‌های فعال‌کننده آپوپتوز به نام کاسپاز در هر دو مدل حیوانی و انسانی متعاقب نارسایی قلبی آشکار می‌گردند. هم‌چنین پروتئین Bcl-2 که به عنوان مهارکننده آپوپتوزیس مطرح است بعد از نارسایی حاد کرونر به خصوص در میوکارد بهبود یافته در سطح بالایی تنظیم می‌شود (۱۲). در یک سری مطالعات بیان شده است که تعادل بین Bcl-2 به عنوان مهارکننده آپوپتوز و پروتئین‌های Bax و Bad به عنوان القاکننده آپوپتوز به همراه پروآنزیم کاسپاز در افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های قلبی بسیار مهم است (۷). هم‌چنین در بررسی انجام شده روی مدل‌های حیوانی موش و رت مشخص شده است که میزان آپوپتوز در سلول‌های قلبی متعاقب نارسایی قلبی مانند ایسکمی و هایپرتروفی بطنی از ۰/۲٪ به ۳۵٪ رسیده است و این میزان در حیوانات با سن بیش‌تر (۲۴ ماه) نسبت به حیوانات با سن کم‌تر (۳ ماه) بالاتر می‌باشد. Gurbano و همکاران با بررسی هم‌زمان بر روی انسان و رت متوجه شدند که متعاقب

- perspectives. *Avian Pathol.* 37(2): 117-126. <https://doi.org/10.1080/03079450801902062>
3. **Balog, J.M., 2003.** Ascites syndrome (pulmonary hypertension syndrome) in broiler chickens: Are we seeing the light at the end of the tunnel? *Poult Avian Boil Rev.* 14(3): 99-126.
  4. **Chang, S., Lin, M., Croom, J. and Fan, Y., 2003.** Administration of triiodothyronine and dopamine to broiler chicks increases growth, feed conversion and visceral organ mass. *Poult Sci.* 82(2): 285-293. <https://doi.org/10.1093/ps/82.2.285>
  5. **Chen, Y., Han, S., Wang, Y., Li, D., Zhao, X., Zhu, Q. and Yin, H., 2019.** Oxidative stress and apoptotic changes in broiler chicken splenocytes exposed to T-2 toxin. *BioMed Res Int.* 2019: 5493870. <https://doi.org/10.1155/2019/5493870>
  6. **Chomezynski, P., 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 262: 611-616. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
  7. **Condorelli, G., Morisco, C., Stassi, G., Notte, A., Farina, F., Sgaramella, G., de Rienzo, A., Roncarati, R., Trimarco, B. and Lembo, G., 1999.** Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat. *Circul.* 99(23): 3071-3078. <https://doi.org/10.1161/01.cir.99.23.3071>
  8. **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(3): 370-374.
  9. **Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D. and Milzani, A., 2006.** Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 52(4): 601-623. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.061408>
  10. **Fazio, S., Palmieri, E.A., Lombardi, G. and Biondi, B., 2004.** Effects of thyroid hormone on the cardiovascular

هیپرتانسیون ریوی میزان آپوپتوز در سلول‌های عضلات صاف عروق خونی و ریه افزایش می‌یابد و مرگ برنامه ریزی شده سلول‌های عضله صاف دیواره عروق عامل اصلی تغییر وضعیت عروق خونی است و تعادل بین آپوپتوز و تقسیم سلولی میزان رشد سلول‌های عضله صاف دیواره عروق را تعیین می‌کند (۱۲). در مطالعه حاضر که برای نخستین بار ارتباط بین میزان آپوپتوز و سندرم هیپرتانسیون ریوی و اثر درمانی ویتامین C به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در طیور مورد بررسی قرار گرفت. براساس یافته‌های حاصل شده، میزان بیان ژنی (کاسپاز ۲) در گروه درمان نسبت به گروه شاهد در سنین ۲۱ و ۴۹ روزگی در بافت ریه و بطن راست به طور معنی‌داری کاهش یافت که این اختلاف معنی‌دار بیانگر کاهش میزان آپوپتوز در گروهی است که با دریافت هورمون T3 مبتلا به هایپرتانسیون ریوی و سپس با ویتامین C درمان شدند. همان‌طور که نتایج نشان دادند در گروهی از جوجه‌ها که توسط مقادیر مختلف ویتامین C تحت درمان قرار گرفته بودند، معیار قلبی RV/TV تا حدود زیادی اصلاح که می‌تواند ناشی از اثرات آنتی‌اکسیدانی ویتامین C در این سندرم باشد (۹). معمولاً این ویتامین به جیره طیور اضافه می‌گردد اگرچه طیور توانایی ساختن این ویتامین را در بدن خود دارند اما در شرایط خاص مثل سرعت بالای رشد، گرما، سرما، عفونت، نیاز به این ویتامین افزایش می‌یابد و اضافه کردن آن در جیره ضروری به نظر می‌رسد. ثابت شده است که ویتامین C میزان اتساع عروق را تشدید می‌کند. به‌ویژه ثابت شده است که می‌تواند موجب آزاد شدن بیش تر نیتريت اکساید (متسع کننده عروق) از دیواره عروق شود که این اثر ویتامین C می‌تواند در کاهش هایپرتانسیون ریوی مؤثر باشد. مطالعات اولیه‌ای که در مورد اسیدآسکوربیک انجام گرفتند، مشخص نمودند که این ویتامین می‌تواند مرگ و میر ناشی از استرس‌های محیطی را کاهش دهد (۲۷). در نهایت مطالعه حاضر نشان داد که ویتامین C می‌تواند میزان هایپرتانسیون ریوی را کاهش دهد که این نتیجه هم‌سو با یافته‌های پیشین بوده است.

## منابع

1. **Akbarian, A., Michiels, J., Degroote, J., Majdeddin, M., Golian, A. and De Smet, S., 2016.** Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. *J Anim Sci Biotechnol.* 7(1): 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0097-5>
2. **Baghbanzadeh, A. and Decuyper, E., 2008.** Ascites syndrome in broilers: physiological and nutritional

- Silymarin in Broiler Chickens Fed on Mash and Pellet Diets. *Iran J Vet Res.* 15(1): 104-121.
18. **Zimmermann, K.C., Bonzon, C. and Green, D.R., 2001.** The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther.* 92(1): 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0163.7258\(01\)00159.0](https://doi.org/10.1016/s0163.7258(01)00159.0)
  19. **Rai, N.K., Tripathi, K., Sharma, D. and Shukla, V.K., 2005.** Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 4(3): 138-144. <https://doi.org/10.1177/1534734605280018>
  20. **Riley, D., Thakker-Varia, S., Wilson, F., Poiani, G. and Tozzi, C., 2000.** Role of proteolysis and apoptosis in regression of pulmonary vascular remodeling. *Physiol Res.* 49(5): 577-86.
  21. **Sundaresan, N.R., Saxena, V.K., Sastry, K.V.H., Anish, D., Marcus Leo, M.D., Kantaraja, C., Saxena, M. and Ahmed, K.A., 2008.** Caspase-mediated apoptosis in chicken postovulatory follicle regression. *Vet Research Commun.* 32: 13-19. <https://doi.org/10.1007/s11259.007.-9005-y>
  22. **Upadhyay, G., Singh, R., Kumar, A., Kumar, S., Kapoor, A. and Godbole, M.M., 2004.** Severe hyperthyroidism induces mitochondria-mediated apoptosis in rat liver. *Hepatol.* 39(4): 1120-1130. <https://doi.org/10.1002/hep.20085>
  23. **Wang, Y.Y., Jiao, B., Guo, W.G., Che, H.L. and Yu, Z.B., 2010.** Excessive thyroxine enhances susceptibility to apoptosis & decreases contractility of cardiomyocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 320(1-2): 67-75. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.01.031>
  24. **Wideman, R., 2001.** Pathophysiology of heart/lung disorders: pulmonary hypertension syndrome in broiler chickens. *Worlds Poult Sci J.* 57(3): 289-307.
  25. **Wideman, R., Rhoads, D., Erf, G. and Anthony, N., 2013.** Pulmonary arterial hypertension (ascites syndrome) in broilers: a review. *Poult Sci.* 92(1): 64-83. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02745>
  26. **Xiang, R., Sun, W., Wang, J. and Wang, X., 2002.** Effect of vitamin C on pulmonary hypertension and system. *Recent Prog Horm Res.* 59(1): 31-50. <https://doi.org/10.1210/rp.59.1.31>
  11. **Freude, B., Masters, T.N., Robicsek, F., Fokin, A., Kostin, S., Zimmermann, R., Ullmann, C., Lorenz-Meyer, S. and Schaper, J., 2000.** Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 32(2): 197-208. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1999.1066>
  12. **Gurbanov, E. and Shiliang, X., 2006.** The key role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur J Cardiothorac Surg.* 30(3): 499-507. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2006.05.026>
  13. **Hassanpour, H., Afzali, A., Fatemi, Tabatabaie, R., Torabi, M. and Alavi, Y., 2016.** Cardiac renin-angiotensin system (gene expression) and plasma angiotensin II in chickens with T3-induced pulmonary hypertension. *Br Poult Sci.* 57(4): 444-450. <https://doi.org/10.1080/00071668.2016.1162284>
  14. **Hassanpour, H., Momtaz, H., Shahgholian, L., Bagheri, R., Sarfaraz, S. and Heydaripoor, B., 2011.** Gene expression of endothelin-1 and its receptors in the heart of broiler chickens with T3-induced pulmonary hypertension. *Res Vet Sci.* 91(3): 370-375. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.09.019>
  15. **Hassanpour, H., Teshfam, M., Momtaz, H., Zarei, H. and Bahadoran, S., 2014.** Caspase 1, -2, and -3 gene expression is enhanced in the heart and lung of chickens with pulmonary hypertension (ascites). *Turkish J Vet Anim Sci.* 38(2): 133-137.
  16. **Hochhauser, E., Kivity, S., Offen, D., Maulik, N., Otani, H., Barhum, Y., Pannet, H., Shneyvays, V., Shainberg, A., Goldshtaub, V. and Tobar, A., 2003.** Bax ablation protects against myocardial ischemia reperfusion injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ.* 284(6): 2351-2359. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00783.2002>
  17. **Hosseini, S.A., Abdi-Hachesoo, B., Nazifi, S., Hezaveh, S.A.H., Tabar, S.H.H. and Rezapoor, R., 2021.** Cardioprotective and Hepatoprotective Activity of

- muscularisation of pulmonary arterioles in broilers. *British Poultry Scienc.* 43(5): 705-712. <https://doi.org/10.1080/0007166021000025064>
27. **Zakeri nasab, M., Jamili, S., Valipour, A., Fatemi, S.M.R., Ramezani fard, E., 2019.** Morphology of the (Alburnus chalcoides) during growth. *J Anim Enviro.* 11(3): 163-172. (In Persian)
28. **Zamani Moghaddam, A., Hassanpour, H. and Mokhtari, A., 2009.** Oral supplementation with vitamin C improves intestinal mucosa morphology in the pulmonary hypertensive broiler chicken. *Br Poult Sci.* 50(2): 175-180. <https://doi.org/10.1080/00071660802710132>
29. **Zahedi, S., Akbarzadeh, A., Mehrzad, J., Noori, A., Harsij, M., 2019.** The effect of increasing stocking density on growth performance, cortisol concentration and heat shock protein gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Anim Enviro.* 11(2): 225-232. (In Persian)