

## اثر ویتامین C بر میزان آپوپتوزیس از طریق اندازه گیری بیان ژن caspase (1) در قلب وریه جوجه‌های گوشتی مبتلا به سندرم هایپرتانسیون ریوی

حامد زارعی<sup>۱\*</sup>، آزاده رشتی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران.

<sup>۲</sup> گروه علوم دامی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران.

E-mail: zarei1361@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۲۰

### چکیده

سندروم هایپرتانسیون ریوی با ویژگی افزایش فشار شریان ریوی، اتساع و هایپرتروفی بطن راست به عنوان یکی از مشکلات جوجه‌های گوشتی که سرعت رشد بالایی دارند، مطرح می‌باشد. از طرف دیگر ثابت شده است که میزان آپوپتوزیس در نارسایی قلبی و هایپرتانسیون ریوی افزایش می‌یابد. در این تحقیق برای اولین بار تاثیر ویتامین C بر میزان آپوپتوزیس از طریق اندازه گیری بیان ژن caspase1 در قلب و ریه جوجه‌های گوشتی مبتلا به سندرم هایپرتانسیون ریوی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور تعداد ۹۰ قطعه جوجه گوشتی بمدت ۴۹ روز پرورش و جهت القاء هایپرتانسیون ریوی از هورمون ( $T_3$ ) استفاده شد. بعد از انجام PCR برای ژن caspase1 و  $\beta$ -actin به عنوان (Housekeeping gene) دانسیته هر یک از باندها اندازه‌گیری شده و به صورت نسبت caspase1/ $\beta$ -actin در گروه‌های مورد مطالعه (بطن راست و ریه) با یکدیگر مقایسه شد. میزان mRNA مربوط به ژن caspase1 در بطن راست در سنین ۴۹ و ۲۱ روزگی و در بافت ریه در سن ۴۹ روزگی کاهش معنی‌داری را در گروه درمانی نسبت به گروه بیمار نشان داد ( $p < 0.05$ ) که این اختلاف معنی دار بیانگر کاهش میزان آپوپتوزیس در گروهی است که با دریافت هورمون  $T_3$  مبتلا به سندرم هایپرتانسیون ریوی و در عین حال با ویتامین C درمان شده‌اند. همچنین نسبت RV/TV به عنوان شاخص القاء این سندرم در سن ۴۹ روزگی در گروه درمان بهبود یافت.

**کلیدواژه‌ها:** آپوپتوزیس، سندروم هایپرتانسیون ریوی، ویتامین C، caspase1

### مقدمه

روش‌های مؤثر تغذیه‌ای، مدیریتی و ژنتیکی سرعت رشد طیور افزایش چشمگیری داشته است. به طوری که امروزه طیور گوشتی در کوتاه‌ترین زمان ممکن به رشد استاندارد رسیده و جهت عرضه به بازار آماده می‌گردند. این تغییرات باعث شده تا بیماری‌های

با افزایش روز افزون جمعیت جهان و افزایش نیاز به منابع پروتئینی، پروتئین‌های حیوانی بخصوص گوشت مرغ، به عنوان یک منبع تامین کننده پروتئین مورد توجه قرار گرفته است. به واسطه بهره جستن از

مقابل اثرات مضر محافظت می کنند و از واکنش هایی که باعث اکسیداسیون ترکیبات مولکولی با ساختارهای سلولی می شوند جلوگیری به عمل می آورند. در سیستم زنده، هنگام بروز اکسیداسیون، آنتی اکسیدانها با رادیکالهای آزاد ترکیب شده و از فعالیت آنها می کاهند. اسید اسکوربیک یکی از مهمترین آنتی اکسیدانهای طبیعی محلول در آب می باشد. این آنتی اکسیدان در اثر متقابل با رادیکالهای آزاد، با جابجایی یک اتم هیدروژن موجب ثبات رادیکال آزاد می شود. به عنوان مثال ویتامین C توکوفروکسیل را که از ترکیب ویتامین E با رادیکالهای آزاد بدست آمده، به صورت توکوفرول احیاء در آورده و سپس به رادیکال آزاد منو آسکوربات تبدیل می شود. طی فعالیت های آنزیمی و غیر آنزیمی این رادیکال آزاد به اسکوربات و هیدرواسکوربات، که هیچ کدام رادیکال آزاد نیستند، تبدیل می شود. همچنین ویتامین C در کاهش اثر اکسیدانها در تخریب اندوتلیوم عروق، به ویژه عروق ریوی، تاثیر بسزایی دارد [۲۱ و ۲۲]. از سوی دیگر ثابت شده است که میزان آپوپتوزیس در نارسایی قلبی و هایپرتانسیون ریوی افزایش می یابد [۸]. آپوپتوزیس نوعی از مرگ برنامه ریزی شده سلولی به صورت یکسری از مراحل ملکولی است که منجر به مرگ آن سلول می شود. در آپوپتوزیس یکسری از اتفاقات بیوشیمیایی منجر به تغییرات مورفولوژیک سلول می شود. مانند تورم سلولی، از بین رفتن متعلقات غشا، چروکیدگی سلول، تجزیه هسته و تکه تکه شدن ملکول DNA کروموزومی. فرایند آپوپتوزیس توسط سیگنال های سلولی گوناگونی کنترل می شود که این سیگنالها ممکن است از محرک های خارج سلولی از قبیل هورمونها، فاکتورهای رشد، نیتریک اکساید و سیتوکینینها و یا از محرک های

متابولیک از جمله سندرم هایپرتانسیون ریوی و آسیت، بروز و شیوع بیشتری بیابد. متناسب نبودن رشد بافت های قلبی - ریوی با میزان رشد و متابولیسم، از علل دخیل در افزایش این سندرم است. نیاز به اکسیژن از عوامل عمده بروز اولیه هایپرتانسیون ریوی در جوجه های گوشتی با سرعت رشد بالا است. برون ده قلبی بالا و افزایش فشار خون در ریه ها جهت اکسیژن گیری بیشتر از خون، منجر به بروز این عارضه و در نهایت منجر به بروز آسیت می شود. این سندرم، در جوجه های گوشتی آبشاری از وقایعی است که منجر به تغییراتی شامل بزرگ شدگی و شل شدگی قلب، هایپرتروفی بطن راست و تجمع مایع در حفره بطنی می شود [۲۱]. عوامل متعددی از جمله ارتفاع، سرما، تهویه نامناسب و انرژی بالا در جیره غذایی سبب بروز این سندرم می گردد. هورمون تیروئیدی ( $T_3$ ) با افزایش مصرف اکسیژن و اثر بر روی مسیرهای مولکولی ویژه ای در قلب و عروق موجب اختلالات قلبی و عروقی می شود. به خوبی مشخص شده که پرکاری تیروئید موجب پرکاری قلب و عروق (افزایش برون ده قلبی و کاهش مقاومت عروق سیستمیک) شده و موجب تندتر شدن ضربان قلب، افزایش عملکرد سیستولیک و دیاستولیک و هایپرتروفی قلب می شود. اضافه کردن هورمون تیروئیدی  $T_3$  (تری یدوتیرونین) به جیره جوجه های گوشتی، وقوع هایپرتروفی بطن راست و مرگ وابسته به آسیت را افزایش می دهد که احتمالاً این امر به طور ثانویه در اثر افزایش نیاز اکسیژن رخ می دهد [۹ و ۱۰]. آنتی اکسیدانها ترکیبات شیمیایی هستند که در غلظت های کمتر از ماده اکسید شونده از اکسیداسیون ممانعت می کنند. از نظر بیولوژیکی آنتی اکسیدانها به عنوان ترکیباتی تعریف می شوند که از سیستم زنده در

گروه شاهد: دریافت کننده جیره پایه در کل دوره آزمایش

گروه بیمار: دریافت کننده جیره پایه + هورمون تری‌یدوتیرونین ( $T_3$ ) با دوز  $1/5 \text{ mg/kg}$  به جیره غذایی از هفت روزگی

گروه درمانی: دریافت کننده جیره پایه + هورمون تری‌یدوتیرونین ( $T_3$ ) با دوز  $1/5 \text{ mg/kg}$  به جیره غذایی از هفت روزگی + ویتامین C به میزان  $1200 \text{ ppm}$  به آب مصرفی از ابتدای دوره پرورش

قبل از ورود جوجه‌ها سالن و پن‌ها ضد عفونی و گاز داده شد. در تمام ساعات شبانه روز آب و دان به صورت آزادانه در دسترس جوجه‌ها بود و در طی شبانه روز حداقل سه بار وضعیت آب و دان حیوانات مورد بررسی قرار می‌گرفت. در طی پرورش جوجه‌ها تا روز دوازدهم از پیش دان و تا روز بیست و هشتم از جیره رشد و پس از آن از جیره پایانی استفاده گردید. مقدار انرژی قابل متابولیسم جیره  $2900-3050$ ، مقدار پروتئین جیره  $18-22$  درصد در نظر گرفته شد. در این سیستم پرورشی، سالن در شبانه روز،  $23$  ساعت دارای نور و  $1$  ساعت فاقد نور بوده است. به منظور حفظ سلامت جوجه‌ها و ایمن سازی آنها علیه برخی بیماری‌های ویروسی شایع در منطقه، برنامه واکسیناسیون بدین شرح اجرا شد:

نیوکاسل: واکسن colon30 به صورت قطره چشمی همراه با فرم روغنی واکسن دو گانه نیوکاسل - آنفولانزا به صورت تزریقی در روز ۱۴ و همچنین واکسن لاسوتا در سن ۲۵ روزگی به صورت آشامیدنی در جوجه‌ها استفاده شد.

برونشیت: واکسن برونشیت (H120) در سن ۴ روزگی به صورت آشامیدنی داده شد.

داخل سلولی مانند اتصال گیرنده هسته به گلیکوکورتیکوئیدها، گرما، تشعشع، محرومیت از تغذیه، آلودگی ویروسی و هیپوکسی ناشی شوند. رویدادهای ملکولی مورد بحث در آپوپتوزیس بطور وسیعی توسط پروتئازهای سیستین ویژه‌ای بنام (caspases) میانجی می‌شوند. بطور معمول پروسه آپوپتوزیس توسط یک یا چند caspases آغازگر (caspase1,2,8,9,10) شروع می‌شود. کاسپازهای آغازگر یک یا چند کاسپاز اجرایی یا مؤثر در روند ایجاد آپوپتوزیس را مانند (caspase3,6,7) بوسیله تقسیم پروآنزیم‌هایشان فعال می‌سازند. بنابر این میزان بیان ژن‌های caspase مؤید میزان بروز آپوپتوزیس می‌باشد [۱۱ و ۱۵]. از آنجا که بیشتر مطالعات تا کنون در زمینه پاتوفیزیولوژی سندرم هایپرتانسیون ریوی صورت گرفته است و عمدتاً عواملی مانند افزایش فشار خون ریوی، اختلالات قلبی و رادیکال‌های آزاد را به عنوان مهمترین علل احتمالی آسیب در طیور گوشتی مطرح می‌کنند و توجه کمتری به جنبه‌های ملکولی و سلولی تأثیر گرفته شده از این سندرم در قلب و ریه جوجه‌های مبتلا صورت گرفته است، لذا بر آن شدیم تا از طریق اندازه‌گیری بیان ژن (caspase1) به عنوان شاخص، در بطن راست و ریه جوجه‌های مبتلا، تأثیر ویتامین C بر میزان آپوپتوزیس ایجاد شده در این سندرم را تعیین نمائیم.

## مواد و روش کار

### ۱- پرورش جوجه

تعداد ۹۰ قطعه جوجه گوشتی سویه راس ۳۰۸ یک روزه به ۳ گروه ۳۰ قطعه‌ای در ۳ پن ۱۰ قطعه‌ای با سه تکرار به شرح زیر تقسیم‌بندی گردید.

گامبورو: این واکسن در سنین ۱۷ و ۲۷ روزگی به صورت آشامیدنی داده شد. درجه حرارت محیط نیز بدین صورت تنظیم گردید که در ابتدای ورود، کلیه جوجه‌ها در دمای  $32^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند. سپس در سه روز اول روزانه  $1^{\circ}\text{C}$  از دمای محیط کاسته گردید. پس از آن به طور متوسط هر سه روز  $1^{\circ}\text{C}$  از دمای سالن کاسته شد تا اینکه در روز ۲۱ دوره پرورش، دما به  $22^{\circ}\text{C}$  رسید. سپس تا انتهای دوره دمای محیط در حدود  $21-22^{\circ}\text{C}$  نگهداشته شد. جهت اندازه گیری دمای محیط در هر سالن از یک دماسنج استفاده گردید. دماسنج‌ها در ارتفاع ۲۰ سانتی‌متری سطح بستر جوجه‌ها قرار داده شده بودند.

## ۲- نمونه برداری و تعیین میزان هایپرتروفی 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، هر یک به طور جداگانه بر روی میز خوابانده شده و محوطه شکمی آنها توسط قیچی جراحی شکافته می‌شد. در طی عمل کالبد گشائی وضعیت عمومی لاشه، میزان پرخونی و ادم، تجمع مایع در محوطه بطنی، وجود مایع اضافی در آبشامه قلب، وضعیت ریه‌ها، کلیه‌ها، کبد و همچنین ضایعات قلبی مورد دقت و ارزیابی قرار گرفت و وجود هر گونه حالت غیر طبیعی ثبت گردید و 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 بوسیله قیچی جراحی به دقت جدا می‌گردید تا 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 شد. سپس 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) بر حسب گرم مورد محاسبه قرار گرفت. در صورتی که این نسبت بیشتر از  $0.29$  باشد آن جوجه مبتلا به هایپرتانسیون ریوی شده است [۱۹]. بطن راست و ریه‌های جدا شده جوجه‌های مورد نظر در لوله‌های سرپوش‌دار مقاوم به انجماد (Cryotube) در ظرف حاوی ازت مایع قرار داده شد و در اسرع وقت به فریزر با دمای  $-70^{\circ}\text{C}$  منتقل گردید.

## ۳- استخراج و خالص سازی RNA از بافت قلب (بطن راست) و ریه

در آزمایشگاه لوله‌های حاوی بافت ریه و قلب از فریزر  $-70^{\circ}\text{C}$  خارج گردید و با روش تک مرحله‌ای<sup>۱</sup> و یا همان روش استخراج اسید گوانیدیم تیوسیانات - فنول - کلروفرم [۳] طی مراحل زیر، RNA کل بافت ریه و قلب استخراج گردید: تکه‌ای از بافت ریه و قلب در هاون همراه با مقداری ازت مایع خرد و به صورت پودر درآمد. - به ازای هر  $100\text{mg}$  از بافت ریه،  $500\mu\text{l}$  از محلول دناتور کننده در یک لوله  $1/5$  میلی‌لیتری به آن اضافه گردید. - محلول دناتور کننده شامل: گوانیدیم تیوسیانات (EM)  $25\text{g}$ ، سدیم سترات

<sup>1</sup> Single - step

با توجه به احتمال آلودگی محلول بدست 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 ۲۶۰nm اندازه‌گیری شد. به ازای هر ۱ میکروگرم از RNA موجود در محلول یک واحد از آنزیم دزوکسی ریبونوکلاز I و یک حجم از بافر مربوطه (حاوی ۱۰۰mM تریس اسید کلریدریک، ۲/۵mM کلرید منیزیم و ۰/۱mM کلرید کلسیم) اضافه گردید. حجم نهایی محلول فوق توسط آب حاوی DEPC به ۱۰ml رسانده شد. - محلول فوق در ۳۷°C بمدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. در انتها، دزوکسی ریبونوکلاز I، با قرارگرفتن لوله حاوی محلول فوق در درجه حرارت ۶۵°C به مدت ۱۰ دقیقه، در حضور ۲/۵mM از EDTA خنثی گردید. RNA موجود در محلول دوباره توسط اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰nm مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان خلوص آنها بررسی شد. بدین صورت که اگر نسبت OD260/OD280 بین ۱/۸ تا ۲ بود نشان دهنده خلوص قابل توجه RNA است. کیفیت RNA توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد، با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید (۱mg/ml) نیز مورد بررسی قرار گرفت.

#### ۴- RT-PCR نیمه کمی

هدف از این مرحله ابتدا تهیه کپی DNA (cDNA) از RNA بوده که تحت عنوان رونوشت برداری معکوس<sup>۱</sup> (RT) نامیده می‌شود و سپس این DNA با

به میزان ۱/۸ml، سارکوزیل (۰/۱۰٪) به مقدار ۲/۶ml و آب مقطر ۲۹/۳ml بود. در هنگام استفاده به ۵۰ میلی لیتر از محلول فوق ۳۵۰ μl از ۲-مرکاپتواتانل (2-ME) اضافه شد.

- به لوله فوق سدیم استات به مقدار ۵۰ μl اضافه گردید.

- ۵۰۰ μl از فنل اشباع شده با آب و ۲۰۰ μl از محلول کلروفرم ایزوآمیلوالکل (۱:۴۹) اضافه گشته و بخوبی مخلوط شد. لوله حاوی مواد فوق را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه توسط سانتریفیوژ یخچال دار در ۴ درجه سانتی‌گراد در دور ۹۰۰۰rpm، سانتریفیوژ گردید. فاز مایع به یک لوله اپندورف جدید منتقل گردید. هم حجم مایع از محلول ایزوپروپانول (۰/۱۰٪) اضافه شده و بعد از تکان دادن، در دمای (۲۰-) درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. - لوله مذکور در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۹۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. رسوب مجدداً در ۳۰۰ μl محلول دناتور کننده حل شد. - ۳۰۰ μl از ایزوپروپانول ۰/۱۰٪ اضافه کرده و ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

- لوله فوق در ۴°C با دور ۹۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی خارج گردید. - ۲۰۰ μl از اتانول (۰/۷۵٪) 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°C با دور ۹۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی خارج شد.

<sup>۱</sup> Reverse transcription

بعد از مخلوط کردن مواد فوق در یک لوله اپندورف، حجم مخلوط را با آب مقطر (یونیزه) به ۲۵ $\mu$ l رسانده و سپس در دستگاه Thermocyclor قرار دادیم، البته قبلاً دستگاه به صورت زیر برای ژن caspase 1 برنامه ریزی گردید:

#### برنامه حرارتی PCR برای ژن caspase1:

الف) ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد جهت باز شدن اولیه دو رشته DNA (pre Denaturation)  
 ب) ۵۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد جهت باز شدن دو رشته DNA (Denaturation)  
 ج) ۵۰ ثانیه در ۶۸ درجه سانتی گراد جهت اتصال پرایمرها به توالی هدف (Annealing)  
 د) ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد جهت طولی شدن رشته های جدید (Extension)

سه مرحله آخر حرارتی (از ب تا د) در ۲۵ سیکل تکرار گردید.

در این روش ژن داخلی استاندارد به نام  $\beta$ -actin که اصطلاحاً Housekeeping gene نامیده می شود نیز تکثیر گردید تا در هنگام سنجش دانسیته باندهای ژن caspase1، مقادیر بدست آمده با دانسیته باند این ژن داخلی مقایسه گردد. در واقع به همین دلیل این روش را نیمه کمی (Semiquantitative) نامیده اند [۱۶ و ۱۰].

مواد لازم برای هر واکنش در این مرحله برای  $\beta$ -actin عبارتند از:

مخلوط dNTP (۱/۵mM) - بافر PCR (۱X) که شامل: تریس اسید کلریدریک (۵mM)، کلرید سدیم (۱۰mM)، EDTA (۰/۰۱mM) و DTT (۰/۱mM)، تریتون

روش واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)<sup>۱</sup> افزوده سازی می گردد. جهت ساخت cDNA ابتدا موادی شامل RNA (۱ $\mu$ g)، راندوم هگزامر (۲۰۰ng) و dNTP (۰/۵mM) در یک لوله ۰/۵ میلی لیتری اپندورف ریخته و حجم نهایی این محلول توسط آب مقطر به ۲۰ $\mu$ l رسانده و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

در مرحله بعد به این محلول، مهار کننده RNase (۴۰ واحد)، بافر RT (شامل تریس - اسید کلریدریک (۵۰mM)، کلرید پتاسیم (۷۵mM)، کلرید منیزیم (۳mM)، DTT (۱۰mM) و آنزیم رونوشت برداری معکوس به نام M-MLV (۲۰۰ واحد)، اضافه شد. محلول حاصله به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی گراد و سپس ۵۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در مرحله آخر محلول را در درجه حرارت ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده تا آنزیم رونوشت برداری معکوس غیر فعال شود. در مرحله بعد با استفاده از پرایمر اختصاصی برای caspase1 (جدول ۱) قسمت هایی از mRNA مربوط به caspase 1 تکثیر گردید.

مواد لازم برای هر واکنش در این مرحله برای caspase1 عبارتند از:

مخلوط dNTP (۲mM) - بافر PCR (۱X) که شامل: تریس اسید کلریدریک (۵mM)، کلرید سدیم (۱۰mM)، EDTA (۰/۰۱mM) و DTT (۰/۱mM)، تریتون x-۱۰۰ (۰/۰۱٪) و گلیسرول ۵٪ (۲/۵ $\mu$ l) - کلرید منیزیم (۱/۵mM) - پرایمر اختصاصی R+F مربوط به caspase (1) (۲ $\mu$ M) - cDNA (۰/۵ $\mu$ l) - پلی مرز Taq (۰/۵ واحد)

<sup>1</sup> Polymerase chain reaction

مرحله انتهایی که دانسیتومتری است، با استفاده از برنامه کامپیوتری photo-capt v.99 Image software دانسیته هر یک از باندها اندازه‌گیری شده و سپس با دانسیته باندهای  $\beta$ -actin مربوطه مقایسه و به صورت نسبت  $\text{caspase1}/\beta\text{actin}$  ثبت گردید.

#### ۵- 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. در مواردیکه احتمال کمتر از ۰/۰۵ ( $P < 0/05$ ) شد، اختلاف از نظر آماری معنی دار تلقی گردید. کلیه نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد از میانگین ( $Mean \pm SEM$ ) درج گردید.

#### نتایج

۱- مقایسه میانگین  $\pm$  خطای معیار از میانگین نسبت وزن بطن راست به وزن هر دو بطن (RV/TV) بین گروه‌های بیمار، درمانی و شاهد در سنین مختلف:

با توجه به نتایج ارائه شده در جدول شماره ۲ نسبت وزن بطن راست به مجموع دو بطن (RV/TV) 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 ۲۱ روزگی نسبت به گروه درمانی و در سن ۴۹ روزگی نسبت به هر دو گروه درمانی و شاهد از لحاظ آماری دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد ( $p < 0/05$ ). همچنین این نسبت در سن ۴۹ روزگی در گروه بیمار بیشتر از ۰/۲۹ شده است که نشان دهنده بروز سندرم هایپرتانسیون ریوی در این گروه است [۱۹].

۱۰۰-x (۰/۱٪) و گلیسرول ۰/۵٪ ( $2/5 \mu\text{l}$ ) - کلرید منیزیم ( $1/5 \text{mM}$ ) - پرایمر اختصاصی R+F مربوط به  $\beta$ -actin ( $2 \mu\text{M}$ ) - cDNA ( $1 \mu\text{l}$ ) - پلی‌مراز Taq ( $0/2$  واحد). بعد از مخلوط کردن مواد فوق در یک لوله اپندورف برای ژن  $\beta$ -actin، حجم مخلوط را با آب مقطر (یونیزه) به  $25 \mu\text{l}$  رسانده و سپس در دستگاه Thermocyclor قرار دادیم، البته قبلاً دستگاه به صورت زیر برای ژن  $\beta$ -actin برنامه ریزی گردید:

#### برنامه حرارتی PCR برای ژن $\beta$ -actin:

الف) ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد جهت بازشدن اولیه دو رشته DNA (pre Denaturation)  
ب) ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد جهت باز شدن دو رشته DNA (Denaturation)  
ج) ۶۰ ثانیه در ۶۸ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال پرایمرها به توالی هدف (Annealing)  
د) ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت طولی شدن رشته‌های جدید (Extension)

سه مرحله آخر حرارتی (از ب تا د) در ۲۴ سیکل تکرار گردید.

بعد از انجام PCR برای دو ژن caspase1 و  $\beta$ -actin باندهای مربوطه را با استفاده از عمل ژل الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵٪ متمایز ساخته و پس از رنگ آمیزی با اتیدیدیم برماید ( $1 \text{mg/ml}$ )، توسط اشعه ماوراء بنفش مورد مشاهده قرار گرفت. سپس باندهای حاصله را با باندهای مارکر استفاده شده در ژل الکتروفورز مقایسه کرده تا اندازه تقریبی باندها مشخص شود. اندازه‌های بدست آمده با اندازه‌های مورد انتظار مقایسه شده تا از اختصاصی بودن باندهای بدست آمده برای هر ژن اطمینان حاصل گردد. در

راست بین گروه‌های شاهد، بیمار و درمانی در سنین مختلف:

در جدول شماره ۴ نسبت دانسیته caspase1/ $\beta$ -actin در بافت بطن راست در گروه‌های شاهد، بیمار و درمانی با یکدیگر مقایسه شده است. با توجه به نتایج به دست آمده میزان mRNA مربوط به caspase1 در 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 اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0/05$ ). همچنین این میزان در سن ۴۹ روزگی در گروه درمانی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $p < 0/05$ ).

۲- مقایسه میانگین  $\pm$  خطای معیار از میانگین نسبت دانسیته caspase1/ $\beta$ -actin حاصل از PCR دریافت ریه بین گروه‌های شاهد، بیمار و درمانی در سنین مختلف: نسبت دانسیته caspase1/ $\beta$ -actin بافت ریه در گروه‌های شاهد، بیمار و درمانی در جدول شماره ۳ با یکدیگر مقایسه شده است. با توجه به نتایج به دست آمده میزان mRNA مربوط به caspase1 بافت ریه در سن ۴۹ روزگی در گروه درمانی نسبت به گروه بیمار کاهش معنی‌داری را نشان داده است ( $p < 0/05$ ).

۳- مقایسه میانگین  $\pm$  خطای معیار از میانگین نسبت دانسیته caspase1/ $\beta$ -actin حاصل از PCR در بطن

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

Gene	3.primer	5.primer	Cycles, Annealing temperature	Size of PCR Product	Accession No,
$\beta$ -actin	ACTGGATTCGAGCAGGAGAT	TTAGAAGCATTTGCGGTGGACAA	24-60 °C	468 bp	LO8165
Caspase1	CGGCCAGCGCCATCTTCATT	AGGGAGCTGTCACAGTGCCT	25-64 °C	347 bp	AF031351.1

جدول ۲- نسبت وزن بطن راست به وزن هر دو بطن (RV/TV) بین گروه‌های مورد مطالعه در سنین مختلف

گروه شاهد	گروه بیمار	گروه درمانی	سن (روز)
$0/24 \pm 0/00^a$	$0/26 \pm 0/00^a$	$0/20 \pm 0/00^b$	۲۱
$0/22 \pm 0/01^a$	$0/31 \pm 0/01^b$	$0/23 \pm 0/01^a$	۴۹

<sup>a,b</sup> حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها در یک سن خاص است ( $p < 0/05$ ).

جدول ۳- نسبت دانسیته caspase1/ $\beta$ -actin حاصل از PCR در بافت ریه بین گروه‌های مورد مطالعه در سنین مختلف

گروه شاهد	گروه کنترل	گروه درمان	سن (روز)
$1/73 \pm 0/17$	$2/11 \pm 0/25$	$1/86 \pm 0/14$	۲۱
$2/03 \pm 0/19^a$	$4/10 \pm 0/17^b$	$2/20 \pm 0/19^a$	۴۹

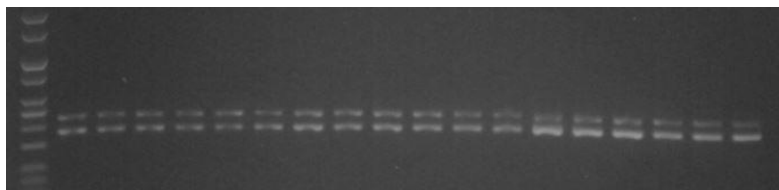
<sup>a,b</sup> حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین دو گروه در یک سن خاص است ( $p < 0/05$ ).

جدول ۴- نسبت دانسیته caspase1/ $\beta$ -actin حاصل از PCR در بطن راست بین گروه‌های مورد مطالعه در سنین مختلف

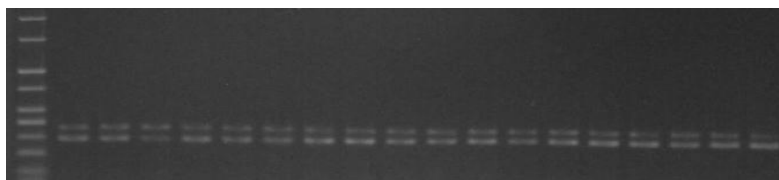
گروه شاهد	گروه کنترل	گروه درمان	سن (روز)
$2/32 \pm 0/30^a$	$3/80 \pm 0/24^b$	$2/74 \pm 0/22^a$	۲۱
$1/33 \pm 0/30^a$	$4/75 \pm 0/34^b$	$2/54 \pm 0/19^c$	۴۹

<sup>a,b,c</sup> حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین دو گروه در یک سن خاص است ( $p < 0/05$ ).





شکل ۱- ژل الکتروفورز ژن caspase1 در بافت بطن راست. به ترتیب از سمت چپ به راست به فاصله هر ۶ باند گروه شاهد، درمانی و کنترل. (ردیف بالا  $\beta$ -actin و ردیف پایین caspase1)



شکل ۲- ژل الکتروفورز ژن caspase1 در بافت ریه. به ترتیب از سمت چپ به راست به فاصله هر ۶ باند گروه شاهد، درمانی و کنترل. (ردیف بالا  $\beta$ -actin و ردیف پایین caspase1)

## بحث

بررسی‌های اخیر نشان داده است که در شرایط طبیعی، هر عاملی که موجب افزایش فعالیت‌های متابولیکی جوجه‌های گوشتی شود میزان بروز هایپرتانسیون ریوی و آسیت را افزایش می‌دهد. افزایش سرعت رشد، کاهش درجه حرارت، تغذیه باجیره‌های پر انرژی، یا مصرف جیره‌های پلت شده از جمله عواملی هستند که می‌توانند با بالا بردن فعالیت‌های متابولیکی موجب افزایش مصرف اکسیژن در پرنده و در نهایت بروز آسیت در طیور گوشتی شوند [۱ و ۲]. در مطالعه حاضر هدف از افزودن هورمون  $T_3$  به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی، افزایش متابولیسم و در نتیجه افزایش مصرف اکسیژن و فعالیت‌های متابولیکی بوده است. افزایش نیاز به اکسیژن باعث هیپوکسی بافتی شده که جهت جبران آن و رفع نیازهای بافتی بر برون ده قلبی افزوده می‌شود و بدنبال آن جریان خون ریوی بیشتر شده منجر به بروز افزایش فشار خون ریوی و نهایتاً آسیت می‌شود. به خوبی مشخص شده که پرکاری تیروئید موجب پرکاری قلب و عروق (افزایش برون ده قلبی و کاهش

مقاومت عروق سیستمیک) شده، که موجب تندتر شدن ضربان قلب، افزایش عملکرد سیستمولیک و دیاستولیک و هایپرتروفی قلب می‌شود [۱ و ۶]. زمانی که به هر علتی فعالیت متابولیکی بافت‌های مختلف بدن افزایش یابد، جریان خون موضعی بافتی افزایش یافته و موجب کاهش فشار خون عمومی بدن می‌شود که در این شرایط قلب با افزایش فعالیت خود سعی در جبران فشار خون کاهش یافته می‌کند که البته در طولانی مدت می‌تواند موجب هایپرتروفی قلب و نارسایی آن گردد. مقدار RV/TV در واقع بیان کننده 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. بنابراین در تعیین میزان این نسبت دو عامل تعیین کننده وجود دارد که عبارتند از وزن کل بطن‌ها و وزن بطن راست. افزایش این نسبت می‌تواند به علت هایپرتروفی بطن راست باشد. هایپرتروفی دیواره بطن راست مستقیماً با افزایش فشار سرخرگ‌های ریوی در ارتباط است و نسبت RV/TV می‌تواند سنجشی برای فشار بار روی بطن راست باشد. بنابراین نسبت RV/TV مهمترین شاخص برای تعیین هایپرتروفی بطن راست و هایپرتانسیون

و رادیکال‌های آزاد به عنوان مهمترین علل احتمالی آسیب در طیور گوشتی مطرح شده است و توجه کمتری به جنبه‌های ملکولی و سلولی تأثیر گرفته شده از این سندرم در قلب و ریه جوجه‌های مبتلا صورت گرفته است، اندازه گیری بیان ژن (caspase1) به عنوان شاخص، در بطن راست و ریه جوجه های مبتلا، میزان آپوپتوزیس ایجاد شده در این سندرم را تعیین می‌نماید [۱۴]. در مطالعه Upadhyay و همکارانش در سال ۲۰۰۴ مشخص شده است که فعالیت caspase به طور معنی‌داری در رت‌های هایپرتیروئید افزایش یافته است و نشان داده اند که افزایش هورمون‌های تیروئیدی سبب ازدیاد میزان آپوپتوز می‌گردد [۱۷]. Wang و همکاران در سال ۲۰۱۰ اعلام نمودند که میزان آپوپتوزیس در قلب رتهایی که در معرض T4 قرار داشتند افزایش یافته است و آنها پیشنهاد نمودند که ازدیاد میزان آپوپتوزیس قلب را به سمت نارسا شدن هدایت می‌نماید [۱۸]. از سوی دیگر نیز ثابت شده که میزان آپوپتوزیس در نارسایی قلبی و هایپرتانسیون ریوی افزایش یافته است. حسن پور و همکاران در سال ۲۰۱۴ عنوان نمودند که میزان بیان ژن caspase1,2,3 و به دنبال آن میزان آپوپتوزیس در قلب و ریه جوجه‌های گوشتی مبتلا به سندرم هایپرتانسیون ریوی القاء شده با هورمون تیروئیدی افزایش می‌یابد [۱۱]. افزایش آپوپتوزیس نقش مهمی در انواع ایسکمی‌های آسیب رسان، از جمله ایسکمی میوکارد که در اثر خون‌رسانی ناقص و کاهش میزان اکسیژن اتفاق می‌افتد، ایفاء می‌کند و باعث مرگ کاردیومیوسیت‌ها در موش‌های ترانس ژن می‌شود. همچنین آسیب ناشی از ایسکمی باعث شروع آپوپتوزیس می‌گردد و اگر ایسکمی ادامه پیدا کند، تبدیل به نکروز خواهد شد [۷ و ۱۲]. بررسی بر روی

ریوی است [۱۹]. مشخص گردیده است که رشد ریه‌ها در جوجه‌های گوشتی در مقایسه با رشد بدن، کندتر است [۲]، که افزایش وابسته به سن نسبت RV/TV در گروه بیمار را می‌توان به همین موضوع نسبت داد. در گروه بیمار در تمام مراحل نسبت RV/TV بزرگتر از گروه شاهد و درمان است (این افزایش در روز ۲۱ نسبت به گروه درمان و در روز ۴۹ نسبت به هر دو گروه شاهد و درمان معنی‌دار است). در مجموع با توجه به تعریفی که Wideman در سال ۲۰۰۱ از سندروم هایپرتانسیون ریوی داشته است بدین معنی که افزایش نسبت RV/TV به بیش از ۰/۲۹ نشان دهنده حضور این سندروم در پرنده است [۱۹] و با توجه به داده‌های بدست آمده، این سندرم در ۴۹ روزگی گروه کنترل را کاملاً درگیر کرده است. افزایش استرس‌های اکسیداتیو شرایطی را توصیف می‌کند که در آن آنتی‌اکسیدان‌های سلولی قادر به غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد واکنش دهنده نیستند. غلظت بالای این عوامل استرس با افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و تولید مقدار زیادی مالون دی‌آلدئید به نوکلئیک اسید، لیپید و پروتئین‌های سلولی آسیب می‌رساند که به وسیله واکنش‌های ثانویه باعث بروز نکروز، آپوپتوزیس و سرانجام مرگ سلول می‌شود که در نتیجه عدم تعادل داخلی و ایجاد بیماری را داریم [۱۳]. همانطور که نتایج نشان داده است گروهی از جوجه‌ها که توسط مقادیر مختلف ویتامین C تحت درمان قرار گرفته بودند، این معیار قلبی تا حدود زیادی اصلاح شده است که می‌تواند ناشی از اثرات آنتی‌اکسیدانی ویتامین C در این سندرم باشد. تاکنون بیشتر مطالعات در زمینه پاتوفیزیولوژی سندرم هایپرتانسیون ریوی صورت گرفته است و عمدتاً عواملی مانند افزایش فشار خون ریوی، اختلالات قلبی

آنتی‌اکسیدان‌ها در حذف رادیکال‌های آزاد تاثیرگذار است [۱۳]. معمولاً این ویتامین به جیره طیور اضافه می‌گردد. اگر چه طیور توانایی ساختن این ویتامین را در بدن خود دارند اما در شرایط خاص مثل سرعت بالای رشد، گرما، سرما و عفونت نیاز به این ویتامین افزایش می‌یابد و اضافه کردن آن در جیره ضروری به نظر می‌رسد. ثابت شده است که ویتامین C می‌تواند موجب آزاد شدن بیشتر نیتريت اکساید (گشاد کننده عروق) از دیواره عروق شود که این اثر می‌تواند در کاهش هایپرتانسیون ریوی موثر باشد. مطالعات اولیه‌ای که در مورد اسید اسکوربیک انجام گرفت مشخص گردید که این ویتامین می‌تواند مرگ و میر ناشی از استرس‌های محیطی را کاهش دهد [۲۱ و ۲۲]. آنچه که این تحقیق نشان می‌دهد آن است که ویتامین C توانست میزان هایپرتانسیون ریوی را کاهش دهد که با نتایج سایر تحقیقات مشابه نیز همسو است. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است شاخص قلبی RV/TV در گروه‌های درمان شده با ویتامین C در تمام سنین به طور قابل توجهی کاهش پیدا کرده است که این می‌تواند حاکی از کاهش میزان پس بار قلبی (کاهش فشار خون ریوی) و در نتیجه عدم هایپرتروفی بطن راست باشد. در این مطالعه که برای اولین بار ارتباط بین میزان آپوپتوزیس و سندروم هایپرتانسیون ریوی و اثر درمانی ویتامین C به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در طیور تعیین گردید، میزان بیان ژنی (caspase1) در گروه درمان نسبت به گروه کنترل در سنین ۲۱ و ۴۹ روزگی در بافت ریه و بطن راست به طور معنی‌داری کاهش یافته است که این اختلاف معنی‌دار بیانگر کاهش میزان آپوپتوزیس در گروهی است که با دریافت هورمون  $T_3$  مبتلا به هایپرتانسیون ریوی و در عین حال با ویتامین C به عنوان یک

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 آپوپتوزیس از میتوکندری آزاد می‌گردد و همچنین پروآنزیم‌های فعال کننده آپوپتوزیس بنام Caspase در هر دو مدل حیوانی و انسانی متعاقب نارسائی قلبی آشکار می‌گردند و همچنین پروتئین Bcl-2 که به عنوان مهار کننده آپوپتوزیس مطرح است بعد از نارسائی حاد کرونر بخصوص در میوکارد بهبود یافته در سطح بالایی تنظیم می‌شود [۸]. تعادل بین Bcl-2 به عنوان مهار کننده آپوپتوزیس و پروتئین Bax و Bad به عنوان القاء کننده آپوپتوزیس به همراه پروآنزیم Caspase در افزایش میزان آپوپتوزیس در سلول‌های قلبی بسیار مهم است [۴]. متعاقب هایپرتانسیون ریوی میزان آپوپتوزیس در سلول‌های عضلات صاف عروق خونی و ریه افزایش می‌یابد و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های عضله صاف دیواره عروق عامل اصلی تغییر وضعیت عروق خونی است و تعادل بین آپوپتوزیس و تقسیم سلولی میزان رشد سلول‌های عضله صاف دیواره عروق را تعیین می‌کند [۵]. در تحقیق حاضر، مطالعه انجام گرفته توسط RT-PCR نیمه کمی بر روی بیان ژنی (caspase1) در قلب و ریه طیور گوشتی حاکی از آن است که این میزان بیان ژن در گروهی که هورمون  $T_3$  دریافت نموده و به سندرم هایپرتانسیون ریوی مبتلا شده‌اند به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و درمانی افزایش یافته است که همسو با سایر تحقیقات مشابه می‌باشد. با توجه به اینکه رادیکال‌های آزاد در بروز هایپرتانسیون ریوی موثرند و همچنین ثابت شده است که هیپوکسی موجب افزایش رادیکال‌های آزاد در میتوکندری‌ها می‌شود ویتامین C به عنوان یکی از مهمترین

lung of chickens with pulmonary hypertension (ascites). *Turk J Vet Anim Sci*, 38: 133-137.

- [12] Hochhauser E., Kivity S., Offen D., Maulik N., Otani H., Barhum Y., Pannet H., Shneyvays V., Shainberg A., Goldshtaub V., Tobar A., Vidne BA. 2003, Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284: 2351-9.
- [13] Isabella D.D., Ranieri R., Roberto C., Daniela G., Aldo M. 2006, Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *American Association for Clinical Chemistry*, 52:4601-623.
- [14] Rai N.K., Tripathi K., Sharma D., Shukla V.K. 2005, Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*, 4: 138-44.
- [15] Riley DJ., Thakker-Varia S., Wilson FJ., Poiani GJ., Tozzi CA. 2000, Role of proteolysis and apoptosis in regression of pulmonary vascular remodeling. *Physiol Res*, 49: 577-585.
- [16] Sundaresan N. R., Saxena V. K., Sastry K. V. H., Anish D., Marcus M. D. C. 2008, Kantaraja Caspase-mediated apoptosis in chicken postovulatory follicle regression. *Vet Res Commun*, 32: 13-19.
- [17] Upadhyay G. R., Singh A., Kumar S., Kumar A. 2004, Severe hyperthyroidism induces mitochondria mediated apoptosis in rat liver. *Hepatology*, 39: 1120-1130.
- [18] Wang Y. Y., Jiao B., Guo W. G., Che H. L., Yu Z. B. 2010, Excessive thyroxine enhances susceptibility to apoptosis and decreases contractility of cardiomyocytes. *Mol. Cell. Endocrinol*, 320: 67-75.
- [19] Wideman RF. 2001, Pathophysiology of heart/lung disorders: pulmonary hypertension syndrome in broiler chickens. *World's Poultry Sci J*, 57: 289-307.
- [20] Wideman RF., Rhoads DD., Erf GF., Anthony NB. 2013, Pulmonary arterial hypertension (ascites syndrome) in broilers: a review. *Poult Sci*, 92: 64-83.
- [21] Xing R. P., Wang Y. 2002, Effect of Vitamin C On Pulmonary hypertension and Muscularisation of Pulmonary arterioles in broilers. *Br. Poult. Sci*, 43: 705-712.
- [22] Zamanimoghaddam A. K., Hassanpour H., Mokhtari A. 2009, Oral supplementation with vitamin C improves intestinal mucosa morphology in the pulmonary hypertensive broiler chicken. *British poultry science*, 50:175-180.
- [23] Zimmermann KC., Bonzon C., Green DR. 2001, The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*, 92: 57-70.

آنتی اکسیدان درمان شده اند.

## منابع:

- [1] Baghbanzadeh A., Decuypere E. 2008, Ascites syndrome in broilers: physiological and nutritional perspectives. *Avian Pathology*, 37: 117-126.
- [2] Balog J.M. 2003, Ascites syndrome (pulmonary hypertension syndrome) in broiler chickens: are we seeing the light at the end of the tunnel?. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 14: 99-126.
- [3] Chomezynski p., saachi N. 1987, Single - step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate - phenol - chloroform extraction. *Anal. Bioche*, 162-126.
- [4] Condorelli G., Morisco C., Stassi G., Notte A., Farina F., Sgaramella G., deRienzo A., Roncarati R., Trimarco B., 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. *Circulation*, 99: 3071-3078.
- [5] Emin G., Xiao Sh. 2006, The key role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of pulmonary. *Eur J Cardiothorac Surg*, 30:499-50.
- [6] Fazio S., Palmieri EA., Lombardi G., Biondi B. 2004, Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. *Recent Prog Horm Res*, 59: 31-50.
- [7] Freude B., Masters TN., Robicsek F., Fokin A., Kostin S., Zimmermann R., Ullmann C., Lorenz-Meyer S., Schaper J. 2000, Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 32:197-208.
- [8] Gurbanov E., Shiliang X. 2006, The key role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur J Cardio-Thoracic Surg*, 30: 499-507.
- [9] Hassanpour H., Afzali A., Fatemi Tabatabaie A., Torabi M., Alavi A. 2016, Cardiac renin-angiotensin system (gene expression) and plasma angiotensin II in chickens with T3-induced pulmonary hypertension. *British Poultry Science*, 57(4): 444-450.
- [10] Hassanpour H., Momtaz H., Shahgholian L., Bagheri R., Sarfaraz S., Heydaripour B. 2011, Gene expression of endothelin-1 and its receptors in the heart of broiler chickens with T3-induced pulmonary hypertension. *Research in Veterinary Science*, 91: 370-375.
- [11] Hassanpour H., Teshfam M., Momtaz H., Zarei H., Bahadoran SH. 2014, Caspase-1, -2, and -3 gene expression is enhanced in the heart and

