نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۰، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۷، ص. ۵۱۲-۵۰۱

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 10, No. 4, Winter 2019, p. 501-512

تاثیر گیاه گزنه (*Urtica dioica*) بر پارامترهای سرم و بیان ژن‌های نیتریک اکسید سنتتاز و اندوتلین۱ در جوجه‌های گوشتی درگیر با فشار خون ریوی

بهنام احمدی پور[۱*] - فریبرز خواجعلی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۱

چکیده

این تحقیق جهت بررسی تاثیر استفاده از پودر برگ گیاه گزنه بر وزن نسبی برخی اندام‌ها، فراسنجه‌های سرمی و خونی و بیان ژن‌های نیتریک اکسید سنتتاز (NOS) و اندوتلین۱ (ET1) در قلب و ریه جوجه‌های گوشتی پرورش‌یافته در ارتفاع بالا (۲۱۰۰ متر از سطح دریا) در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی سطوح مختلف پودر برگ گیاه گزنه (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) در جیره جوجه‌های گوشتی بود. نتایج آزمایش نشان داد که افزودن پودر برگ گیاه گزنه به خوراک، موجب کاهش معنی‌دار وزن نسبی قلب و کبد و همچنین کاهش فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارتات آمینو ترانسفراز در سرم جوجه‌های گوشتی شد (P<۰/۰۵). در مقابل، میزان پروتئین تام سرم، آلبومین و نیتریک اکسید سرم در تیمارهای حاوی گزنه افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). سطوح ۱ و ۱/۵ درصد گیاه گزنه موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن نیتریک اکسید سنتتاز (NOS) در قلب و ریه و کاهش معنی‌دار بیان ژن اندوتلین۱ (ET1) در این دو اندام گردید (P<۰/۰۵). به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن سطوح ۱ و ۱/۵ درصد پودر برگ گیاه گزنه به خوراک جوجه‌های گوشتی پرورش‌یافته در ارتفاع بالا دارای اثرات مثبتی بر شاخص‌های فشار خون ریوی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، جوجه‌گوشتی، فراسنجه‌های سرم، فشار خون ریوی، گیاه گزنه

مقدمه

انتخاب ژنتیکی فشرده‌ای که در چند دهه اخیر در جهت افزایش سرعت رشد جوجه‌های گوشتی صورت گرفته است، موجب شده است که وزن بدن یک جوجه گوشتی از ۱ تا ۵۶ روزگی به حدود ۱۰۰ برابر برسد. پیامد این وضعیت، بر هم خوردن تعادل بین اندام‌های تأمین‌کننده اکسیژن (قلب و ریه‌ها) و اندام‌های مصرف‌کننده اکسیژن و در نهایت عارضه فشار خون ریوی بوده‌است (۴۰). عواملی مانند ارتفاع بالا، تهویه نامناسب، کاهش میزان اکسیژن محیط، اختلالات پاتولوژیک ریه (مثل بیماری مزمن تنفسی و برونشیت) که کاهش ظرفیت اشباع شدن خون با اکسیژن را در پی دارد (۴) و یا عواملی از قبیل سرما، مصرف دان پلت شده و چربی بالای جیره که با بالا بردن فعالیت‌های متابولیکی موجب افزایش نیاز به اکسیژن می‌شوند، تعادل اکسیژن بدن را نامناسب‌تر کرده و شرایط را برای بروز فشار خون ریوی و آسیت بیش از پیش مستعد می‌کنند (۲۹). یکی از عوامل مهم بروز عارضه فشارخون ریوی بروز تنش‌های اکسیداتیو و آزاد شدن بیش از اندازه رادیکال‌های آزاد (ROS)[۳] در بدن پرنده می‌باشد (۲۸). این فرایند موجب آسیب به غشای اندوتلیال مویرگ‌ها و پراکسیداسیون غشاء سلول‌های کبدی می‌گردد (۲۳). با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و هجوم آن‌ها به طرف بافت‌های پر خون مانند قلب، ریه و کبد، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت‌ها برای خنثی کردن آن‌ها کافی نمی‌باشد و در پی آن دیواره سلول‌های اندوتلیال عروق خونی دچار تغییرات ساختاری (remodeling) می‌شود (۹). علاوه بر این، واکنش رادیکال‌های سوپر اکسید با نیتریک اکسید منجر به تولید پروکسی نیترات می‌گردد که یک ترکیب اکسیدان است که خود موجب آسیب به غشاء سلول می‌گردد (۲۸). با کاهش سنتز نیتریک اکسید انقباض عروق ریوی و مقاومت در برابر جریان خون ریوی افزایش یافته و با افزایش برون ده قلبی برای تأمین اکسیژن هایپرتروفی بطن راست قلب (RV) بروز پیدا نموده و نقص در عملکرد قلب ایجاد می‌گردد (۳۲). یکی از راه‌های افزایش توان

۱- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: behnam.ahmadipour@gmail.com)
DOI: 10.22067/ijasr.v10i4.67175

3- *Reactive oxygen species*

آنتی‌اکسیدانی بدن استفاده از گیاهان دارویی می‌باشد. امروزه تعداد بی‌شماری از داروهای بیولوژیکی رایج در عرصه داروسازی دارای منشا گیاهی می‌باشند (۳۷ و ۴۴). گیاه گزنه یکی از این گیاهان دارویی است که به‌طور وسیع در جهان به دلیل داشتن ترکیبات قوی آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی و تحریک سیستم ایمنی جهت درمان بیماری‌های قلبی و عروقی، تنفسی، سرطانی و آلرژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. یکی از اثرات مهم این گیاه کاهش فشار خون می‌باشد (۲۱). گیاه گزنه با نام علمی *اورتیکا دیویکا Urtica dioica* یک گیاه چند ساله علفی است که متعلق به خانواده Urticacea می‌باشد. این گیاه در اکثر نقاط کشور مانند استان‌های شمالی، نواحی غربی و مرکزی رشد می‌نماید (۴۵). گزنه به علت داشتن ترکیبات پلی‌فنلی از قبیل لانالول، کاریوفلین، کاروون، نفتالن، آنیتول، کارواکرول، فیتول، فتالیدها و فلاونوئیدها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و کاهش رادیکال‌های آزاد است (۱۵). این ترکیبات با فعالیت آنتی‌آکسیدانی قادر هستند به‌طور قوی عوامل فعالی مثل نیتریت پراکسید و رادیکال هیدروکسید را غیرفعال کنند (۱ و ۸). گیاه گزنه باعث افزایش ترشح نیتریک اکسید از سلول‌های اندوتلیال و همچنین موجب باز شدن کانال‌های پتاسیم می‌گردد و این امر باعث اتساع عروق و افزایش خون‌رسانی به سلول‌ها می‌شود (۳۶). با توجه به اینکه افزایش میزان ترکیبات اکسیدانی و کاهش غلظت نیتریک اکسید در بروز عارضه فشار خون ریوی و آسیت در جوجه‌های گوشتی دارای نقش مهمی هستند، هدف تحقیق حاضر بررسی اثرات برگ گیاه دارویی گزنه بر فشار خون ریوی در جوجه‌های گوشتی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در ایستگاه پرورش مرغ دانشگاه شهرکرد (ارتفاع ۲۱۰۰ متری از سطح دریا) انجام شد. پرورش جوجه‌های گوشتی در چنین ارتفاعی، شرایط کمبود فشار اکسیژن را به آسانی فراهم می‌سازد. در این تحقیق از تعداد ۲۴۰ قطعه جوجه گوشتی سویه راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۴ تکرار (۱۵ جوجه در هر تکرار) استفاده شد. جیره‌های آزمایشی بر پایه ذرت و سویا و با توجه به نیازهای توصیه شده شورای پژوهش‌های ملی آمریکا ۱۹۹۴ (۲۵) و با استفاده از نرم‌افزار UFFDA برای دو دوره آغازین (۲۱-۱ روزگی) و رشد (۴۲-۲۲ روزگی) تنظیم شدند (جدول ۱). در طول دوره پرورش، آب و خوراک به‌صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار گرفت و از یک برنامه نوری ۲۳ ساعت روشنایی و یک ساعت تاریکی استفاده شد. دمای سالن در هفته اول، دوم و سوم به‌ترتیب ۳۲، ۲۵ و ۲۰ درجه سلسیوس و از هفته چهارم تا پایان دوره ۱۵ درجه سلسیوس تنظیم گردید (۳۲).

تیمارهای آزمایشی شامل جیره شاهد (بدون گزنه) و تیمارهای ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد پودر برگ گزنه به جای سبوس گندم در جیره شاهد بود. گیاه گزنه از مراتع استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری گردید و شناسایی آن توسط کارشناس هرباریوم دانشگاه شهرکرد صورت پذیرفت. برگ گیاه جدا و با انتقال به آزمایشگاه در محیط سایه و تحت تهویه مناسب خشک گردید و توسط آسیاب برقی به پودر تبدیل و مورد استفاده قرار گرفت.

در سن ۴۲ روزگی، با توجه به میانگین وزنی تکرارها ۲ پرنده از هر تکرار (هر تیمار ۸ قطعه جوجه) خون‌گیری و سپس کشتار گردیدند. نمونه‌های خون (۳ میلی‌لیتر) از سیاهرگ بال هر پرنده گرفته شد و سرم تهیه گردید. غلظت مالون دی آلدهید (MDA) سرم بر اساس روش نیر و ترنر (۲۴) و غلظت نیتریک اکسید سرم به روش بهروج و همکاران (۶) اندازه‌گیری شد. همچنین، غلظت پروتئین تام، آلبومین، اوره سرم و فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) در سرم با دستگاه اتوانالایزر (BT 3000) با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری گردید. به منظور تعیین وزن قلب و بطن‌های قلبی برش‌های لازم برای جدا کردن قلب و بطن‌ها انجام گرفت و نسبت وزن بطن راست به وزن بطن‌ها با استفاده از ترازوی با دقت ۰/۰۱ گرم تعیین گردید. نسبت وزن بطن راست به وزن بطن‌ها (RV/TV) شاخصی از هایپرتروفی بطن راست در پرندگان است. پرندگان تلف شده در طول آزمایش نیز کالبدگشایی شدند و نسبت وزنی بطن راست به کل دو بطن اندازه‌گیری شد. مواردی که نسبت مذکور بالاتر از ۰/۲۵ بود، به‌عنوان تلفات ناشی از فشار خون ریوی ثبت گردید (۲۹).

جهت تعیین نسبی بیان ژن‌های نیتریک اکسید سنتتاز (NOS) و اندوتلین۱(ET1) در بین تیمارهای آزمایشی قطعاتی از بطن چپ و ریه جوجه‌های کشتار شده جدا و بلافاصله نمونه‌ها در تانک حاوی نیتروژن مایع ریخته شد و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید. برای استخراج RNA به ۱۰۰ mg از بافت خرد شده ریه یا قلب، محلول دناتورکننده RNX PLUS (متعلق به شرکت سیناژن) اضافه و بعد از افزودن کلروفرم و اتانول (۷۵٪) مرحله استخراج RNA به پایان رسید. برای تولید cDNA از کیت مخصوص PrimeScript ™ RT Reagent Kit محصولات شرکت بیوتکنولوژی تاکارا، ژاپن، استفاده گردید (۲). ژن‌های NOS و ET1 به‌عنوان ژن هدف و ژن β- Actin به‌عنوان ژن مرجع انتخاب و پرایمرهای موردنظر با استفاده از نرم افزار Primer-Blast قابل دسترس در شبکه اینترنت (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC = BlastHome) طراحی گردید. جدول ۲ توالی پرایمرهای مورد استفاده را نشان می‌دهد. نمونه‌ها جهت انجام Real – time PCR آماده شدند. برای هر نمونه ۱۰μL رنگ اینترکاله Sybr-Green شرکت تاکارا، ژاپن، ۱μLپرایمر و

β -actin و NO و ET1 و ۱µL از cDNA استخراج شده اضافه و حجم مخلوط را با آب مقطر (یونیزه) به ۲۵µL رسانده و در دستگاه Thermocyclor (Rotor Gene Q 6000, Qiagen, USA) قرار داده شد (۱۷). برای به‌دست آوردن بازده (efficiency) هریک از نمونه‌ها از برنامه کامپیوتری Line Reg PCR استفاده شد و از روش فافل (۱۳) جهت ارزیابی بیان ژن در تیمارهای آزمایشی استفاده گردید. آنالیز داده‌ها در یک طرح کاملاً تصادفی با استفاده از روش GLM توسط نرم‌افزار آماری SAS (۳۱) انجام گردید. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد.

جدول ۱- اجزاء و ترکیب شیمیایی جیره‌های مورد استفاده در جوجه‌های گوشتی در مرحله استارتر و رشد

Table 1- Composition of the basal diet for broilers during starter and grower stages

اجزای جیره (درصد) Item (%)	استارتر (۱ تا ۲۱ روزگی) Starter (1–21days)	رشد (۲۲ تا ۴۲ روزگی) Grower (22–42 days)
ذرت Corn	51.8	58.4
کنجاله سویا Soybean meal (44% CP)	38.6	32.5
روغن سویا Soy oil	4	3.9
دی – کلسیم فسفات Dicalcium phosphate	1.7	1.3
صدف Oyster shell	1.5	1.5
نمک Salt	0.3	0.3
دی – ال متیونین DL-Methionine	0.1	0.1
ال – لایزین L-Lysine	-	-
مکمل معدنی Mineral supplement[a]	0.25	0.25
مکمل ویتامینه Vitamin supplement[b]	0.25	0.25
سبوس گندم[1] Wheat bran	1.5	1.5
ترکیب محاسباتی جیره Calculated composition		
انرژی قابل سوخت و ساز (کیلوکالری در کیلوگرم) AME (kcal/kg)	3000	3100
پروتئین خام (درصد) Crude protein (%)	21.5	19.5
سیستین +متیونین (درصد) Methionine + cysteine (%)	0.9	0.72
لیزین (درصد) Lysine (%)	1.26	1.03
کلسیم (درصد) Calcium (%)	0.95	0.88
فسفر قابل دسترس (درصد) Available phosphorus	0.43	0.35
سدیم (درصد) Sodium (%)	0.18	0.15
کلر (درصد) Chlorine (%)	0.27	0.29
پتاسیم (درصد) Potassium (%)	0.9	0.92
تعادل الکترولیتی (میلی اکی والان/کیلوگرم) Na+K–Cl (mEq/kg)	232	233

[۱] جایگزینی سطوح مختلف (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) پودر برگ گزنه با سبوس گندم ۴ جیره آزمایشی تهیه گردید.

[1] With replacing different levels (0, 0.5, 1 and 1.5%) of Urtica diocia leves with wheat bran provided five experimental diets.

[a] Provided the following per kg of diet: vitamin A (trans retinyl acetate), 3600IU; vitamin D3 (cholecalciferol), 800 IU; vitamin E (dl-α-tocopheryl acetate), 7.2 mg; vitamin K3, 1.6 mg; thiamine, 0.72 mg; riboflavin, 3.3 mg; niacin, 0.4 mg; pyridoxin, 1.2 mg; cobalamine, 0.6 mg; folicacid, 0.5 mg; choline chloride, 200 mg.

[b] Provided the following per kg of diet: Mn (from MnSO4-H2O), 40mg; Zn (from ZnO), 40mg; Fe (from FeSO4-7H2O), 20mg; Cu (from CuSO4-5H2O), 4 mg; I [from Ca (IO3)2-H2O], 0.64 mg; Se (from sodium selenite),0.08 mg.

جدول ۲- ترتیب و سایر مشخصات پرایمرهای به‌کار گرفته شده در واکنش PCR

Table 2- Details of the primers used for quantitative real time PCR analysis of chicken mRNAs

ژن Target	ترتیب پرایمر Primers	طول قطعه (جفت باز) PCR product (bp)	کد شناسایی Accession No.
بتا اکتین β-Actin	5′-AGCGAACGCCCCCAAAGTTCT-3′ 5′-AGCTGGGCTGTTGCCTTCACA-3′	139	NM_205518.1
نیتریک اکسید سنتتاز ۱ iNOS	5′-AGGCCAAACATCCTGGAGGTC-3′ 5′-TCATAGAGACGCTGCTGCCAG-3′	371	U46504
اندوتلین ۱ ET-1	5′-GGACGAGGAGTGCGTGTATT-3′ 5′-GCT CCAGCAAGCATCTCTG-3′	141	XM418943

SOD1: superoxide dismutase 1; iNOS: inducible nitric oxide synthase; ET-1: endothelin 1; bp: base pair

نتایج و بحث

طبق داده‌های جدول ۳ جوجه‌هایی که جیره‌ی حاوی سطوح ۰/۵ تا ۱/۵ درصد برگ گزنه را مورد تغذیه قرار دادند، بازدهی وزن قلب و کبد نسبت به وزن زنده جوجه‌ها در ۴۲ روزگی و همچنین نسبت بطن راست به کل بطن‌ها (RV/TV) کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داده‌است و بهترین عملکرد مربوط به تیمار حاوی ۱ درصد گزنه است (P<۰/۰۵). نسبت RV/TV شاخصی برای تعیین فشار خون ریوی در مرغ‌های گوشتی می‌باشد. چنانچه این نسبت از ۲۵ درصد بالاتر باشد، نشان‌دهنده این است که جوجه‌های گوشتی درگیر عارضه فشار خون ریوی می‌باشند (۲۹). میانگین داده‌های این آزمایش نشان می‌دهد که نسبت RV/TV در گروه کنترل بالاتر از ۰/۲۵ می‌باشد و به نحوی درگیری پرندگان با فشار خون ریوی را نشان می‌دهد. در شرایط کمبود فشار اکسیژن و سرما به دلیل انقباض عروق و مقاومت عروقی در برابر جریان خون ریوی، فشار وارده به بطن راست جهت افزایش برون ده قلب بالا رفته و در نتیجه منجر به پر رشدی بطن راست و افزایش وزن بطن راست و کل قلب می‌گردد (۴۱). گزنه حاوی ترکیبات پلی‌فنلی از جمله فتالیدها و فلاوونوئیدها است (۱۵) فلاوونوئیدها با بلوکه کردن کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ مانع از ورود کلسیم به داخل سلول عضله شده و در نتیجه سبب رفع انقباض عضله می‌شود (۱۸). همچنین ترکیبات فنالیدی با مهار اثر نور آدرنالین بر گیرنده‌های آدرنرژیک عضلات صاف عروق خونی باعث اتساع عروق خونی و کاهش فشار خون می‌گردند (۳۸).

بر اساس آزمایش‌ها، عصاره گیاه گزنه موجب ترشح بیشتر اکسید نیتریک از سلول‌های اندوتلیال عروق و باز کردن کانال‌های پتاسیم می‌گردد (۳۶)، که این عوامل باعث اتساع عروق و کاهش فشار خون می‌شوند که به نظر می‌رسد با کاهش فشار مکانیکی روی قلب از هایپرتروفی قلب و خصوصاً هایپرتروفی بطن راست جلوگیری به‌عمل می‌آورد. مطالعات نشان می‌دهد که در جوجه‌های درگیر با آسیت وزن قلب و کبد بیشتر از جوجه‌های سالم است (۲ و ۳۲). کبد مهمترین محل لیپوژنز در پرندگان می‌باشد (۶). بر اساس تحقیقات اگرچه کبد حدود ۲/۵ تا ۳ درصد از وزن بدن را تشکیل می‌دهد، اما نزدیک به ۲۰ درصد اکسیژن مورد استفاده در بدن صرف فرآیند متابولیکی کبد می‌شود (۱۰). در شرایط کمبود اکسیژن بیشترین تنش‌های اکسیداتیو در کبد صورت گرفته و آسیب‌های جدی را به سلول‌های کبدی رسانده و موجب نکروزه شدن و افزایش وزن کبد می‌گردد (۳۰). ترکیبات فلاوونوئیدی از طریق مکانسیم‌هایی مانند فعالیت مستقیم برای شکنندگی رادیکال‌های آزاد، کلیت شدن با یون‌های فلزی و مهار اکسیدازها از استرس‌های اکسیداتیو جلوگیری می‌کنند (۳۵). نقش آنتی‌اکسیدانی فلاوونوئیدها مربوط به گروه‌های هیدروکسیل (OH) می‌باشد که روی اسکلت فلاوون قرار دارند و عمل متقابل آن‌ها با ملکول‌های ROS باعث خنثی شدن رادیکال‌های آزاد می‌گردد و باعث تثبیت و بی‌ضرر شدن رادیکال‌ها می‌گردد (۱۱).

همچنین گروه‌های هیدروکسیل حلقه فلاوون با انجام واکنش با یون‌های فلزی از جمله یون Fe^{2+} و Cu^{2+} ایجاد کلیت‌های موقتی می‌نمایند و با احیاء این یون‌های فلزی از قدرت اکسیدانی آن‌ها کاسته و در نتیجه تولید رادیکال‌های آزاد و پراکسید شدن چربی‌ها را کاهش می‌دهند (۱۶).

جدول ۳- تأثیر سطوح مختلف گزنه بر وزن نسبی برخی اندام‌ها و اجزای لاشه جوجه‌گوشتی در سن ۴۲ روزگی (درصد وزن زنده)

Table 3- Effect of different levels of *Urtica diocia* on the relative weight of different organs and carcass traits in broiler chickens at 42 days of age. (% of live body weight)

اجزای لاشه Carcass Ingredient	سطوح گزنه در جیره (درصد) Dietary levels of Urtica diocia (%)				SEM	p-value
	Control (0)	0.5	1	1.5		
کبد Liver	2.41[a]	2.19[b]	2.14[b]	2.04[b]	0.05	0.0002
قلب Heart	0.736[a]	0.66[b]	0.645[b]	0.657[b]	0.016	0.002
شاخص آسیتی RV:TV	0.33[a]	0.27[b]	0.23[c]	0.24[c]	0.011	0.0001

[۱]میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

Superscripts in the same row with different letters are significantly different (P<0.05).
RV: TV – right ventricle to total ventricle weight ratio.

جدول ۴ تأثیر سطوح مختلف برگ گزنه بر غلظت فراسنجه‌های سرم را نشان می‌دهد. مقایسه آماری نشان می‌دهد که غلظت آنزیم‌های ALT،ALK در تمام تیمارهایی که گزنه را دریافت می‌نمایند و AST در گروه‌های دریافت‌کننده ۱ و ۱/۵ درصد گزنه کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) را نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد. همچنین در گروه‌های دریافت‌کننده گزنه غلظت اوره و مالون دی‌الدهید کاهش و غلظت نیتریک اکسید، آلبومین و کل پروتئین سرم افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) را نسبت به گروه شاهد به‌وجود آورده است. کمبود فشار اکسیژن اولین عامل توسعه فشار خون ریوی و ناهنجاری آسیت می‌باشد. با بروز تنش‌های اکسیداتیو و افزایش رادیکال‌های آزاد و آغاز عارضه فشار خون ریوی غلظت فراسنجه‌هایی از قبیل مالون دی‌الدهید (۲)، اوره، AST و ALT در سرم (۵) افزایش و غلظت آلبومین (۴۳) و پروتئین سرم (۷) کاهش می‌یابند که با آزمایش حاضر تطابق دارد. در جوجه‌های درگیر با عارضه‌ی آسیت مقدار ALP افزایش یافته که علت آن پراکسیداسیون بافتی و صدمه به کبد و ریه و قلب است (۳). به نظر می‌رسد که گزنه با داشتن ترکیبات پلی‌فنلی و فلاونوئیدی با حمایت از سلول‌های کبدی و حذف رادیکال‌های آزاد میزان ALP سرم را نسبت به تیمار شاهد کاهش داده است. همچنین فلاونوئیدها از طریق حذف رادیکال‌های آزاد و با کاهش تنش‌های اکسیداتیو موجب افزایش فعالیت سلول‌های لنفاوی می‌شوند (۴۷). ترکیب مالون دی‌آلدهید نشان‌دهنده پراکسید شدن لیپیدها در بدن می‌باشد و به‌عنوان شاخصی از تنش‌های اکسیداتیو است (۲). کاهش غلظت مالون دی‌الدهید در تیمارهای دریافت‌کننده گزنه دلیلی بر توان آنتی‌اکسیدانی این گیاه دارویی می‌باشد. در آزمایشی (۳۳)که تاثیر ترکیبات فنلی اعم از اسید گالیک، اسید تانیک و تیمول در جوجه‌های گوشتی بررسی شد. با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات عملکرد پرنده افزایش و میزان MDA و اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع کاهش نشان داده است که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

آنزیم‌های ALT و AST در کبد یافت می‌شود و در صورت آسیب سلول‌های هپاتوسایت کبدی به سرعت در جریان خون آزاد گردیده و جهت تشخیص سریع آسیب‌های کبدی از آن‌ها استفاده می‌گردد. در شرایط طبیعی متابولیسمی حدود ۱ تا ۲ درصد اکسیژن مصرفی تبدیل به رادیکال‌های آزاد می‌گردد که توسط سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن حذف می‌گردند، اما در شرایط هایپوکسی میزان تولید رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد و این افزایش رادیکال‌ها و ضعف سیستم آنتی‌اکسیدانی موجب بروز استرس‌های اکسیداتیو و تخریب غشاء سلولی می‌گردد که موجب آسیب شدید به اندام‌های داخلی از جمله کبد، ریه، قلب می‌گردد (۱۲). جوجه‌هایی که در شرایط محیطی سرد پرورش یافتند به دلیل نیاز بیشتر به اکسیژن نشانه‌های پاتولوژی فشار خون ریوی با افزایش رادیکال‌های آزاد آغاز گردید و غلظت ALT و AST در سرم افزایش یافت که نشانه‌ای از آسیب به سلول‌های کبدی است (۱۴). بنابراین می‌توان اظهار نمود که در پژوهش حاضر به دلیل شرایط هایپوکسی و افزایش ظرفیت رادیکال‌های آزاد در گروه شاهد عامل پراکسید شدن سلول‌های کبدی و تخریب سلول‌های کبدی، منجر به افزایش آنزیم‌های ALT و

AST سرم گردید. در صورتی‌که در سایر تیمارها ترکیبات پلی‌فنلی گزنه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش داده و با حذف رادیکال‌های آزاد مانع از تخریب سلول‌های کبدی و موجب کاهش آنزیم‌های کبدی می‌گردند. به نظر می‌رسد شرایط هایپوکسی و نبود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در تیمار شاهد موجب بروز آسیب‌های مزمن کبدی گردیده است. با افزایش سطوح گزنه میزان فعالیت آنزیم‌های مورد آزمایش کاهش یافته‌است که می‌تواند بیانگر نقش محافظتی ترکیبات موثر گزنه را از کبد نشان دهد.

جدول ٤- تاثیر سطوح مختلف گزنه بر فراسنجه‌های خونی و سرمی‌جوجه‌های گوشتی در ۴۲ روزگی

Table 4- Effect of *Urtica diocia* on serum and blood variables in broiler chickens measured at 42 days of age

فراسنجه Metabolites	سطوح گزنه در جیره (درصد) Dietary levels of *Urtica diocia* (%)				SEM	p-value
	Control (0)	0.5	1	1.5		
اوره Urea	6.37[a]	5.5[b]	4.6[c]	4.7[bc]	0.282	0.0004
پروتئین Protein (g/dl)	3.4[b]	4[ab]	4.5[a]	4.8[a]	0.261	0.004
آلبومین Albumin (g/dl)	2[b]	2.1[b]	2.5[a]	2.7[a]	0.136	0.001
آلکالین فسفاتاز Alkalin phosphatas (U/l)	2955.8[a]	2572.3[b]	2147.4[c]	2216.8[c]	88.5	0.0001
الانین امینو ترانسفراز Alanine amino transaminase (U/l)	3.8[a]	3.3[b]	2.9[c]	2.7[c]	0.09	0.0001
اسپارتات امینو ترانسفراز Spartat amino transaminase (U/l)	199.8[a]	190.6[ab]	165.9[b]	159.3[b]	10.5	0.032
مالون دی الدهید Malonedialdehyde (µmol/l)	4.88[a]	2.96[b]	2.74[b]	2.48[b]	0.375	0.0003
نیتریک اکسید Plasma nitric oxide (µmol/l)	9.58[b]	14.86[a]	16.65[a]	17.5[a]	1.6	0.007

[1]میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵)

Superscripts in the same row with different letters are significantly different (P<0.05).

تعدادی از محققین در آزمایشی با استفاده از تتراکلرید کربن که به‌عنوان ترکیبی که موجب افزایش تنش‌های اکسیداتیو می‌گردد، اسیب‌های حاد کبدی را در موش‌ها به‌وجود آوردند و با استفاده از سطوح مختلف عصاره گزنه نشان دادند در تیماری که از ۴۰۰ میلی‌گرم عصاره به ازای هر کیلوگرم وزن زنده دریافت کرده بودند، غلظت پروتئین، مالون دی آلدهید و آنزیم‌های ALP، ALT و AST سرم تا حدود ۳۰۰ درصد نسبت به تیمار دریافت‌کننده تتراکلرید کربن کاهش و آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز غلظت ۴ برابری را در تیمار دریافت‌کننده عصاره گزنه نشان داده است که با نتایج آزمایش حاضر تطابق دارد (۳۰). همچنین در طی آزمایشی در موش‌های درگیر با آسم تجربی مشخص گردید که غلظت نیتریک اکسید و آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در گروه‌های دریافت‌کننده گزنه بالاتر بود که نشان‌دهنده خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه است (۴۶). تحقیقات Yener و همکاران (۴۲) نشان داد که عصاره گزنه با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی که دارد از تخریب و نکروزه شدن سلول‌های کبدی ممانعت نموده و قوام بافت کبد را حفظ می‌نماید و دارای یک اثر تثبیت‌کننده روی هپاتوسیت‌ها است که از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش تولید رادیکال‌های آزاد حاصل می‌گردد.

به نظر می‌رسد یکی از عوامل مهم در ممانعت از بروز عارضه فشار خون ریوی، حفظ بافت کبد است که بدین صورت توسط گیاه گزنه در تیمارهای آزمایشی حاصل شده و از تخریب و افزایش وزن کبد در این آزمایش ممانعت نموده‌است.

می‌توان گفت که در شرایط ارتفاع بالا و هایپوکسی و درگیر شدن

جوجه‌ها با عارضه فشار خون ریوی و تخریب سلولی، میزان نشت پلاسما از اندام کبد در محوطه بطنی افزایش می‌یابد و پروتئین‌های موجود در سرم خصوصاً آلبومین به درون محوطه‌ی بطنی وارد شده و درنتیجه موجب کاهش مجموع پروتئین‌های سرم خون می‌گردد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که در سطوح ۱ تا ۱/۵ درصد پودر برگ گزنه به دلیل اثر محافظت‌کنندگی ترکیبات پلی‌فنلی، میزان نشت پلاسما کاهش یافته و درنتیجه از کاهش پروتئین سرم ممانعت به‌عمل آمده است.

جدول ۵ اثر گزنه بر بیان ژن‌های نیتریک اکسید سنتتاز (NOS) و اندوتلین۱ (ET1) را در قلب و ریه جوجه‌های دریافت‌کننده سطوح مختلف گزنه را نشان می‌دهد. بر اساس این نتایج میزان mRNA مربوط به NOS در تیمارهای تغذیه شده با گزنه در قلب (به غیر از تیمار ۰/۵ درصد گزنه) و ریه افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد. اما میزان mRNA مربوط به ET1 در ریه و قلب کلیه تیمارها کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) را در مقایسه با تیمار کنترل نشان می‌دهد. بر اساس نتایج بین تیمار ۱ و ۱/۵ درصد اختلافی وجود ندارد.

جدول ۵- تاثیر سطوح مختلف گزنه بر بیان ژن‌های نیتریک اکسید سنتتاز و اندوتلین-۱ در بافت‌های ریه و بطن راست قلب جوجه‌های گوشتی در ۴۲ روزگی

Table 5- Effect of *Urtica diocia* on expression of iNOS and ET-1 genes in the right ventricle (heart) and lung of broiler chickens measured at 42 days of age

اندام	Gene	سطوح گزنه در جیره (درصد) Dietary levels of *Urtica diocia* (%)				SEM	p-value
		Control (0)	0.5	1	1.5		
بطن راست قلب							
Heart (Right ventricle)	ET1	0.302[a]	0.0045[b]	0.0039[b]	0.0038[b]	0.048	0.0001
	iNOS	0.001[b]	0.0026[b]	0.235[a]	0.258[a]	0.043	0.0001
ریه							
Lung	ET1	1.06[a]	0.167[b]	0.011[b]	0.006[b]	0.166	0.0002
	iNOS	0.0008[b]	0.0017[a]	0.031[a]	0.227[a]	0.045	0.003

[1]میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵)

Superscripts in the same column with different letters are significantly different (P<0.05). iNOS: inducible nitric oxide; ET-1:endothelin1

نیتریک اکسید به‌عنوان یک گشادکننده عروق سهم به‌سزایی در تسهیل جریان خون در عروق ریوی دارد که با کاهش مقاومت عروق در برابر فشار خون موجب کاهش فشار بر بطن راست جهت پمپاژ خون به ریه‌ها شده و از این‌رو کاهش نسبت شاخص آسیتی RV/TV را در پی داشته است (۲۰ و ۴۰). از طرفی اندوتلین-۱ از سلول‌های غشاءپوششی عروق ترشح و با اتصال به رسپتورA[1] (ETAR) سلول‌های صاف عضلانی عروق موجب انقباض عروق خونی می‌گردند (۲۶). به نظر می‌رسد عامل افزایش غلظت نیتریک اکسید در سرم به دلیل تغذیه گیاه گزنه باشد. بر اساس نتایج در سطوح ۱ و ۱/۵ درصد بیان ژن نیتریک اکسید سنتتاز در قلب و ریه افزایش یافته است که موجب افزایش غلظت نیتریک اکسید پلاسما گردیده است. تحقیقات نشان داده است که کاهش بیان ژن نیتریک اکسید سنتتاز و کاهش در سنتز نیتریک اکسید در بطن‌های قلب و ریه‌ها باعث نقص در عملکرد قلب و همچنین شیوع عارضه فشار خون ریوی و آسیت را در جوجه‌های گوشتی می‌گردد (۱۷). نتایج آزمایش حاضر نشان داده‌است گیاه گزنه به دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی خود به‌طور معنی‌داری از شیوع عارضه فشار خون ریوی جلوگیری نموده است. مطالعات گذشته هم نشان می‌دهد که تخریب عروق در عارضه فشار خون ریوی عامل تلفات جوجه‌ها می‌باشد (۳۹). همچنین ترکیبات پلی‌فنلی با ممانعت از تکثیر سلول‌های صاف عضلانی عروق از ضخیم شدن عروق ریوی جلوگیری می‌نماید (۲۲). ریشه گزنه باعث افزایش تولید نیتریک اکسید از سلول‌های آندوتلیال شده و به‌طور معنی‌داری از کاهش این ماده جلوگیری می‌کند این عمل احتمالاً از طریق یکی از فلاونوئیدهای مهم عصاره ریشه گزنه به نام کوئرستین انجام می‌گیرد (۲۷) همچنین ترکیبات فنالیدی و فلاوونوئیدی گزنه به دلیل توان متسع‌کنندگی عروق با اثر بر غشاء اندوتلیال عروق موجب گشاد کردن رگ‌ها و کاهش فشار خون در عروق (۱۹) و با بهبود عملکرد قلب از عارضه فشار خون ریوی و آسیت جلوگیری نمایند. با تخریب دیواره عروق ترشح اندوتلین۱ افزایش یافته و فشار مضاعف بر بطن راست قلب را در پی دارد به دلیل اینکه تعداد و شدت ضربان قلب جهت تأمین اکسیژن افزایش می‌یابد که این امر نسبت مستقیمی با عارضه فشار خون ریوی دارد (۳۴). به نظر می‌رسد در این آزمایش کاهش معنی‌دار عارضه فشار

1- Endothelin-1 binds to type A receptors (ETAR)

خون ریوی در تیمارهای حاوی گزنه بر اساس شاخص آسیتی مربوط به توان بالای گیاه دارویی گزنه در کاهش بیان ژن اندوتلین۱ باشد. مطالعات نشان داده است که تر کیبات فتالیدی و فلاوونوئیدی موجود در گیاه کرفس کوهی بیان ژن‌های نیتریک اکساید سنتتاز را در قلب جوجه‌های گوشتی افزایش و اندوتلین۱ را کاهش داده است که به نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد (۲).

نتیجه‌گیری کلی

برگ گیاه گزنه به‌طور معنی‌داری عرضه فشار خون ریوی را در جوجه‌های پرورش‌یافته در ارتفاع بالا از سطح دریا کاهش می‌دهد. اثرات مفید این گیاه دارویی مربط به ترکیبات پلی‌فنلی و فلاونوئیدی می‌باشد که دارای خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، متسع‌کنندگی عروق و افزایش‌دهندگی سنتز نیتریک اکسید است. بنابراین گیاه گزنه می‌تواند یکی از گیاهان دارویی موثر در کاهش فشار خون ریوی در جوجه‌های گوشتی باشد.

منابع

1. Abrol, S. O., A. Trehan, and O. P. Katare. 2005. Comparative study of different silymarin formalations: formulation and in vitro/in vivo evaluation. Current Drug Delivery, 2: 45-51.
2. Ahmadipour, B., H. Hassanpour, E. Asadi, F. Khajali, F. Rafiei, and F. Khajali. 2015. *Kelussia odoratissima* Mozzaf- A promising medicinal herb to prevent pulmonary hypertension in broiler chickens reared at high altitude. Journal of Ethnopharmacology, 159: 49-54.
3. Arab, H., R. Jamshidi, A. Rassouli, G. Shams, and M. Hassanzadeh. 2006. Generation of hydroxyl radicals during ascites experimentally. British Poultry Science, 47: 216-222.
4. Baghbanzadeh, A., and E. DeCuypere. 2008. Ascites syndrome in broilers: Physiological and nutritional perspectives. Avian Pathology, 37:117-126.
5. Balog, J. M., B. D. Kidd, W. E. Huff, G. R. Huff, N. C. Rath, and N. B. Anthony. 2003. Effect of Cold Stress on Broilers Selected for Resistance or Susceptibility to Ascites Syndrome. Poultry Science, 82:1383-1387.
6. Behrooj, N., F. Khajali, and H. Hassanpour. 2012. Feeding reduced-protein diets to broilers subjected to hypobaric hypoxia is associated with the development of pulmonary hypertension syndrome. British Poultry Science, 53: 658-664.
7. Biswas, N. K., M. R. Dalapati, and M. K. Bhowmik. 1995. Ascites syndrome in broiler chickens: Observations on certain biochemical and pathological changes. Indian Journal of Animal Sciences, 65:1068-1072.
8. Boots Agnes, W., and R. M. Haenen Guido. 2002. Oxidative damage shifts from lipid peroxidation to thiol arylation by catecholcontahnhng antioxidants. Biochemicalogy, 1583: 279-284.
9. Bottje, W., and R. Wideman. 1995. Potential role of free radicals in the pathogenesis of pulmonary hypertension syndrome. Avian and Poultry Biology Reviews, 6:211-231.
10. Brigitte, V., and M. Michael. 2008 The Hepatic Microcirculation: Mechanistic Contributions and Therapeutic Targets in Liver Injury and Repair. Physiological Reviews, 9:1269-1339.
11. Chang, W., Z. Shao, J. Yin, S. Mehendale, C. Wang, Y. Qin., W. Chen, C. Chien, L. Becker, T. Vanden Hoek, and C. Yuan. 2007. Comparative effects of flavonoids on oxidant scavenging and ischemia-reperfusion injury in cardiomyocytes. European Journal of Pharmacology, 566:58-66.
12. Chen, J., and B. Meyrick. 2004. Hypoxia increases Hsp90 binding to eNOS via PI3K-Akt in porcine coronary artery endothelium. Laboratory Investigation, 84: 182-190.
13. Dorak, T. 2006. Real time PCR .by Taylor & Francis Group. School of Clinical Medical Sciences (Child Health) Newcastle University Newcastle-upon-Tyne. UK. pp 60- 66.
14. Fathi, M., K. Nazeradl, Y. EbrahimNezhad, H. Aghdam Shahryar, M. Daneshyar, and T. Tanha. 2011. The role of oxidative stress in the development of congestive heart failure (CHF) in broilers with pulmonary hypertension syndrome (PHS). Journal of Animal and Veterinary Advances, 8: 176-181.
15. Gul, S., B. Demirci, K. H. Baser, H. A. Akpulat, and P. Aksu. 2012. Chemical composition and in vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *Urtica dioica*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 88:666-671.
16. Guo, M., C. Perez, Y. Wei, E. Rapoza, G. Su, F. Bou-Abdallah, and N. Chasteen. 2007 .Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. Dalton Transactions, 4951-4961.
17. Hassanpour, H., A. Yazdani, K. Khabir Soreshjani, and S. Asgharzadeh. 2009. Evaluation of endothelial and inducible nitric oxide synthase genes expression in the heart of broiler chickens with experimental pulmonary hypertension. British Poultry Science, 50:725-732.

18. Hernandez-Abreu, O., P. Castillo-España, I. Leon-Rivera, M. Ibarra- Barajas, R. Villalobos-Molina, J. Gonzalez-Christen, and *et al.* 2009. Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. Biochemical Pharmacology, 78: 54-61.
19. Jorge, V. G., J. R. LuisAngel, T. S. Adrian, A. C. Francisco, S. G. Anuar, E. S. Samuel, S. O. Angel, and H. N. Emmanuel. 2013. Vasorelaxant activity of extracts obtained from *Apium graveolens*: possible source for vasorelaxant molecules isolation with potential antihypertensive effect. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 3:776-779.
20. Khajali, F., and S. Fahim. 2010. Influence of dietary fat source and supplementary α- tocopheryl acetate on pulmonary hypertension and lipid peroxidation in broilers. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 94: 767-772.
21. Legssyer, A., A. Ziyyat, H. Mekhfi, M. Bnouham, A. Tahri, M. Serhrouchni, J. Hoerter, and R. Fischmeister. 2002. Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. In isolated rat heart and aorta. Phytotherapy Research,16: 503-507.
22. Lu, Q., T. Q. Qiu, and H. Yang. 2006. Ligustilide inhibits vascular smooth muscle cells proliferation. European Journal of Pharmacology, 542:136-140.
23. Ma, A., and H. Chen. 2008. Antioxidant therapy for prevention of inflammation, ischemic reperfusion injuries and allograft rejection. Cardiovasc. Hematol. Agents in Medicinal Chemistry, 6: 20-43.
24. Nair, V., and G. Turner. 1984. The thiobarbituric acid test for lipid peroxidation: structure of the adduct with malondialdehyde. Lipids, 19: 804-805.
25. National Research Council (NRC). 1994. Nutrient Requirements for Poultry, 9th revised edn, National Research Council, NY.
26. Odom, T., L. Martinez-Lemus, R. Hester, E. Becker, J. Jeffre, G. Meininger, and G. Ramirez. 2004. *In vitro* hypoxia differentially affects constriction and relaxation responses of isolated pulmonary arteries from broiler and leghorn chickens. Poultry Science, 83:835-841.
27. Rodriguez, L., J. Reyes-Esparzaa, S. Burchielb, and D. Herrera-Ruiza. 2008. Risks and Benefits of Commonly used Herbal Medicines in México, Toxicology Pharmacology, 227(1): 125-135.
28. Ruiz-Feria, C. A. 2009. Concurrent supplementation of arginine, vitamin E, and vitamin C improve cardiopulmonary performance in broilers chickens. Poultry Science, 88: 526-535.
29. Saedi, M., and F. Khajali. 2010. Blood gas values and pulmonary hypertension as affected by dietary sodium source in broiler chickens reared at cool temperature in a high altitude area. Acta Veterinaria Hungarica, 58: 379-388.
30. Sarma Kataki, M., V. Murugamani, A. Rajkumari, P. Singh Mehra, D. Awasthi, and R. Yadav. 2012. Antioxidant, Hepatoprotective, and Anthelmintic Activities of Methanol Extract of *Urtica dioica* L. Leaves. Pharmaceutical Crops, 3: 38-46
31. SAS Institute. 2000. SAS User's Guide: Statistics, Version 9.1 Edition. Cary, NC, USA.
32. Sharifi, M. R., F. Khajali, and H. Hassanpour. 2016. Antioxidant supplementation of low-protein diets reduced susceptibility to pulmonary hypertension in broiler chickens raised at high altitude. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 100:69-76.
33. Starcevic, K., L. Krstulovic, D. Brozic, M. Mauric, Z. Stojevic, Z. Mikulec, M. Bajic, and T. Masek. 2015. Production performance, meat composition and oxidative susceptibility in broiler chicken fed with different phenolic compounds**.** Journal of the Science of Food and Agriculture, 95(6):1172-1178.
34. Stewart, D. J., R. D. Levy, P. Cernacek, and D. Langleben. 1991. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? Annals of Internal Medicine, 114:464-469.
35. Surai, P. 2014. Polyphenol compounds in the chicken/animal diet: from the past to the future. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 98:19-31.
36. Testai, L., S. Chericoni, V. Calderone, and G. Wencioni. 2002. Nierip Cardiovascular effects of *Urtica dioical* root extracts, In vitro and in vivo pharmacological studies. Journal of Ethnopharmacology, 81: 105-109.
37. Tiwari, M., U. K. Dwivedi, and P. Kakkar. 2014. Tinospora cordifolia extract modulates COX-2, iNOS, ICAM-1, pro-inflammatory cytokines and redox status in murine model of asthma. Journal of Ethnopharmacology, 153:326-337.
38. Vergara-Galicia, J., L. Jimenez-Ramirez, A. Tun-Suarez, F. Aguirre-Crespo, and G. Salazar-Gómez. 2013. Vasorelaxant activity of extracts obtained from Apium graveolens: Possible source for vasorelaxant molecules isolation with potential antihypertensive effect. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 13:60154-9.
39. Wideman, R. F., K. R. Hamal, M. T. Bayona, A. G. Lorenzoni, D. Cross, F. Khajali, D. D. Rhoads, G. F. Erf, and N. B. Anthony. 2011. Plexiform lesions in the lungs of domestic fowl selected for susceptibility to pulmonary arterial hypertension: Incidence and histology. Anatomical Record, 294:739-755.
40. Wideman, R. F., G. Rhoads, G. C. Erf, and N. B. Anthony. 2013. Pulmonary arterial hypertension (ascites syndrome) in broilers: A review. Poultry Science, 92:64-83.

41. Yang, X., Y. Luo, Q. Zeng, K. Zhang, X. Ding, S. Bai, and J. Wang. 2014. Effects of low ambient temperatures and dietary vitamin C supplement on growth performance, blood parameters, and antioxidant capacity of 21-day-old broilers. Poultry Science, 93:898-905.
42. Yener, Z., I. Celik, F. Ilhan, and R. Bal. 2009. Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. Food and Chemical Toxicology, 47:418-424.
43. Yersin, A. G., W. E. Huff, L. F. Kubena, M. A. Elissalde, R. B. Harvey, D. A. Witzel, and L. E. Giroir. 1992. Changes in hematological, blood gas and serum biochemical variables in broilers during exposure to stimulated high altitude. Avian Diseases, 36:189-197.
44. You, H., S. Chen, L. Mao, B. Li, Y. Yuan, R. Li, and X. Yang. 2014. The adjuvant effect induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is mediated through oxidative stress in a mouse model of asthma. Food and Chemical Toxicology, 71:272-281.
45. Zargari, A. 1994. Herbal drugs. Fifth eds, vol 4 TUS publication institute. pp: 418- 9. (In Persian).
46. Zemmouri, H., O. Sekiou, S. Ammar, A. El Feki, M. Bouaziz, M. Messarah, and A. Boumendjel. 2017. *Urtica dioica* attenuates ovalbumin-induced inflammation and lipid peroxidation of lung tissues in rat asthma model. Pharmaceutical Biology, http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2017.1310905.
47. Zhu. Q. Y., Y. Huang, and Z. Y. Chen. 2000. Interaction between flavonoids and α-tocopherol in human low density lipoprotein. Journal of Nutritional Biochemistry, 11: 14-21.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 10, No. 4, Winter 2019, p. 501-512

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۰، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۷، ص. ۵۱۲-۵۰۱

Effect of *Urtica dioica* on Serum Parameters and Genes Expression of Nitric Oxide Synthase and Endothelin-1 in Broiler Chickens Involved in Pulmonary Hypertension

B. Ahmadipour[1*]- F. Khajali[2]

Received: 31-08-2017
Accepted: 10-02-2018

Introduction
Modern strains of broiler chickens are susceptible to pulmonary hypertension syndrome (PHS) because of the mismatch between oxygen demanding muscles and oxygen-supplying organs (i.e. heart and lungs). Intensive genetic selection for rapid growth over the past several decades has reduced allometric growth of the heart and lungs in modern broiler chickens compared with their chronological counterparts. The susceptibility of broilers to PHS is exacerbated whenever they are raised at high altitudes where the availability of atmospheric oxygen is limited. Pulmonary arterioles in broilers respond to hypoxia by vasoconstriction and if the situation sustains, broiler develop pulmonary hypertension with subsequent right ventricular failure that finally leads to ascites. Research has addressed the impact of nutritional factors including energy, protein, electrolytes and feed restriction on the development of PHS. However, the effects of herbal medicine in the prevention and control of PHS in broiler chickens have not been adequately studied. *Urtica dioica* is a medicinal herb that belongs to the family of *Urticacea* and it grows in most parts of the world. *Urtica dioica* is used because of antioxidant and anti-inflammatory compounds for the treatment of cardiovascular, respiratory, cancerous and allergic diseases. One of the important effects of this plant is the reduction of blood pressure. The purpose of the present study was to examine the effects of different levels of this medicinal plant in preventing pulmonary PHS in broiler chickens.

Materials and Methods
The experiment was conducted in the experimental facility of Shahrekord University, Shahrekord, Iran, which had an altitude of 2100 m above sea level. A total of 240 day-old broilers (Ross308) were randomized across16 floor pens (15 birds per pen). A control diet based on corn and soybean meal were formulated for the starting (1–3 weeks of age) and growing (4–6 weeks of age) stages according to NRC (1994) recommendations. Three additional diets were prepared by substituting 0.5%, 1%, and 1.5% *Urtica dioica* for wheat bran in the control diet.
At 42 days of age, 8 birds per treatment were selected for blood collection and then killed by decapitation. Blood samples (3mL) were collected from the brachial vein. Serum samples were used for the determination of nitricoxide (NO), malondialdehyde (MDA), urea, albumin, alkalin phosphatas (ALP), alanine amino transaminase(ALT) and aspartat amino transaminase(AST). To measure the expression of the gene, the heart and lung samples were harvested and the right ventricles dissected and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C for subsequent RNA analysis. The levels of nitric oxide synthase (NOS), Endothelin 1 (ET-1) and β-actin transcripts were determined by real-time reverse transcriptase (RT)-PCR. Results were compared by GLM using SAS (2007) software in a completely randomized design. Means were separated by Duncan's multiple range test.

Results and Discussion
The results of the experiment showed that broiler chickens fed a diet containing 0.5 to 1.5% *Urtica dioica* leaves, the efficiency of heart and liver weight relative to the live weight of the chickens and right ventricular ratio to total ventricles showed a significant decrease compared to control group ($P<0.05$). Birds received *Urtica dioica* at 1 and 1.5% had significantly ($P<0.05$) higher circulatory concentrations of nitric oxide, protein and albumin

1- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2- Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
(*- Corresponding author email: behnam.ahmadipour@gmail.com)

though significantly (P<0.05) lower serum concentrations of malondialdehyde, alkaline phosphatase, alanine amino transaminase and aspartate amino transaminase when compared to the birds fed the control diet. The expression of endothelin 1 (ET-1) and nitric oxide synthase (NOS) genes in the heart and lung of broiler chickens has been affected by feeding *Urtica dioica* to broiler chickens. NOS gene has been highly over expressed in the heart and lung of broilers fed *Urtica dioica* from 1 to 1.5 % increase relative to the control. On the other hand, *Urtica dioica* significantly suppressed the expression of ET-1 in the heart and lung (P<0.05). The *Urtica dioica* contains polyphenolic compounds, including phthalides and flavonoids, which have antioxidant properties. This compound can prevent oxidative stress by scavenging of reactive oxygen species (ROS), activation of antioxidant enzymes, metal chelating activity. It also causes more nitric oxide secretion from vascular endothelial cells and opening of potassium channels. The *Urtica dioica* extract prevents the destruction and necrosis of the liver cells and maintains the consistency of the liver tissue and has a stabilizing effect on hepatocytes.

Conclusion

In conclusion, levels of 1 to 1.5% *Urtica dioica* in the diet can significantly prevent PHS in broiler chickens reared at high altitudes. Beneficial effects of this medicinal plant are attributed to vasorelaxant and antioxidant actions that mediated through polyphenolic compounds Therefore, *Urtica dioica* is a promising medicinal herb to prevent pulmonary hypertension in broiler chickens reared at high altitude.

Keywords: Chicken, Gene expression, Pulmonary hypertension, Serum biochemical parameters, *Urtica dioica*