اثرات تزریق داخل تخم مرغی (*In ovo*) هورمون لپتین بر هماتوکریت، غلظت هموگلوبین و تعداد گویچه های قرمز خون در جوجه های تفریخ شده

حسن رحیمی اسکوئی[۱]، جمشید قیاسی قلعه کندی[۲]، علیرضا لطفی[۱] ، یحیی ابراهیم نژاد[۲]، کیوان هاتفی نژاد[۲]، مهدی سلمان زاده [۱]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان، گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر

۲- عضو هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر

H_RO1362 @yahoo.com

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی اثرات تزریق داخل تخم مرغی لپتین بر برخی از پارامترهای خونسازی جوجه های تفریخ شده انجام پذیرفت. تعداد ۷۵۰ تخم مرغ نطفه دار به پنج گروه آزمایشی شامل گروه شاهد یا T_1 (بدون هیچ نوع تزریق)، گروه شاهد منفی یا T_2 (تزریق داخل تخمی نیم ccتامپون فسفات ﴿حلال﴾)، گروه T_3 (تزریق داخل تخمی ۰/۵ میکروگرم لپتین در روز هفتم جوجه کشی)، گروه T_4 (تزریق داخل تخمی ۱ میکرو گرم لپتین در روز هفتم جوجه کشی) و گروه T_5 (تزریق داخل تخمی ۱/۵ میکروگرم لپتین در روز هفتم جوجه کشی) تقسیم شدند. بعد از تفریخ جوجه ها و تهیه نمونه های خون از آنها غلظت هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گویچه های قرمز تعیین شد. مشاهده گردید تیمارهای T_2 وT_3 فعالیت خونسازی کمتری نسبت به گروه های T_1 (شاهد)، T_4 و T_5 داشتند. در جوجه های T_5 بالاترین سطوح پارامترهای خونسازی (RBC: 6.7×10^6، PCV %: 39 و Hb:13/31 g/dl) مشاهده شد (در مقایسه با گروه شاهد: RBC: 6.3×10^6، PCV %: 37 وHb:12.58 g/dl). در حالیکه گروه های T_2(تزریق حلال) ، T_3 تزریق غلظت پایین لپتین (۰/۵ میکروگرم/تخم) وT_4 تزریق غلظت لپتین (۱ میکروگرم/تخم) تاثیر منفی برپارامترهای خونسازی جوجه های تفریخ شده داشته است. در نتیجه تزریق لپتین به مقدار ۱/۵ میکروگرم لپتین در زمان شروع اندام زایی جنین مرغ احتمالاً باعث تحریک فعالیت سلول های مغز استخوان و تولید گویچه های قرمز خون شده است. اما تزریق داخل تخمی سطوح پایین تر - هورمون در اوایل دوره جنینی موجب کاهش روند خونسازی در جنین می شود.

واژگان کلیدی: تزریق داخل تخم مرغی، هورمون لپتین ، جوجه ، پارامترهای خونسازی

مقدمه

هورمون لپتین که اولین بار در سال ۱۹۹٤ توسط فریدمن و همکارانشان از ژن Ob کشف شد، پپتیدی کوچک، با ۱٦۷ اسیدآمینه و ۱٦ کیلو دالتون وزن ملکولی میباشد که از بافت چربی ترشح میشود و دارای دو نوع رسپتور درهیپوتالاموس و دیگر بافتها مانند کبد، ماهیچه ها و روده میباشد. این هورمون به عنوان یک عامل سیری توصیف می شود که با رسپتورهای مخصوص اش در هیپوتالاموس باعث مهار ترشح نوروپپتید Y و باعث کاهش اشتها میشود و از طریق دیگر با افزایش دادن میزان متابولیسم بدن میزان انرژی مورد نیاز و در نتیجه میزان چربی بدن را کنترل میکند. برای اولین بار پپتید لپتین درطیور از ناحیه شکمی(کبد وبافت چربی) جداسازی شد (تائویس،۱۹۹۸). اثر عمده لپتین درطیور، تنظیم جذب غذا و مصرف انرژی و کارکرد آندوکرینی هیپوتالاموس در واکنش به تغییرات تغذیه ای است. لاموزا وهمکاران گزارش کردند تزریق زیرجلدی لپتین به تخم بلدرچین ژاپنی منجربه کاهش مصرف خوراک درجوجه های گوشتی شده وهمچنین باعث تسریع رشد جنینی و رشد بعد ازتفریخ می شود. نتایج بدست آمده از مطالعات حیوانیِ کارو وهمکارانش نشان داد که تزریق لپتین باعث افزایش هورمون های تروئیدی ، کاهش تیروتروپین (TSH) وافزایش سلول های فولیکولی می شود. همچنین لپتین در هماتوپوئز که به نظر می رسد در سطح hematopoietic stem/progenitor cellباشد نقش دارد و احتمالا بر روی خون سازی خصوصاً در موارد کم خونی و پیشرفت خون سازی موثر است و همراه با اریتروپویتین سبب اریتروپوئز (افزایش گلبول های قرمز) می شود(سی اُف، ۱۹۹٦). فرض می گردد کاهش تولید لپتین تشدید کننده آنمی باشد.این یافته ها نشانگرنقش خونسازی لپتین می باشند.

با توجه به مشخص شدن نقش لپتین در توسعه جنینی، تکثیرپذیری سلولی، خونسازی (درپستانداران) وپیشنهادات صاحب نظران لپتین در طیور (کای یا ، ۲۰۰۹)در رابطه با بررسی نقش لپتین درتکامل جنین پرندگان ، هدف ازاین مطالعه اثرات تزریق داخل تخمی لپتین در طول دوره جوجه کشی بر نشانگرهای فرآیند خون سازی در جوجه های تفریخ شده حاصل از جنین های توسعه یافته در معرض لپتین اگزوژن می باشد.

مواد و روش

در این مطالعه، تعداد ۷۵۰ تخم مرغ از گله مادر هم سن سویه *Cobb* 500 جمع آوری شدند. تخم مرغ ها به پنج گروه آزمایشی شامل،گروه شاهد یا T_1 (بدون هیچ نوع تزریق)، گروه شاهد منفی یا T_2 (تزریق داخل تخمی نیم ccتامپون فسفات ﴿حلال﴾)، گروه T_3 (تزریق داخل تخمی ۰/۵ میکروگرم لپتین در روز هفتم جوجه کشی)، گروه T_4 (تزریق داخل تخمی ۱ میکرو گرم لپتین در روز هفتم جوجه کشی) و گروه T_5 (تزریق داخل تخمی ۱/۵ میکروگرم لپتین در روز هفتم جوجه کشی) تقسیم شدند. هورمون لپتین از شرکت Sigma-Aldrich® خریداری شد و در محلول (تامپون فسفات) حل گردیده و غلظت های مذکور تهیه شدند. در روزهفتم جوجه کشی تخم مرغ های هریک ازتیمارها به ترتیب از دستگاه جوجه کشی به منظور تزریق بیرون آورده شدند. دمای اتاق تزریق ۳۷/۵ درجه سانتیگراد بود و فرآیند تزریق هر گروه حداکثر یک ساعت طول کشید. سپس تخم مرغ ها به داخل دستگاه انتقال یافتند. درهنگام تزریق، بعد از کندلینگ تخم مرغ ها و اطمینان از بقای جنین و علامت گذاری محل مورد نظر درروی پوسته، کلیه تزریق ها با سرنگ های یکبار مصرف دارای سر سوزن ۲۲G کوتاه به صورت تزریق به داخل سفیده انجام گرفت. سپس محل تزریق با چسب پلاستیکی مخصوص مسدود شد. از جوجه های هر پنج گروه آزمایشی بلافاصله بعد از تفریخ خونگیری به عمل آمد. نمونه های خون کامل در کنار یخ خشک به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انتقال یافتند. سپس به شمارش تعداد گویچه های قرمز، تعیین هماتوکریت و غلظت هموگلوبین اقدام شد. داده ها در غالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 آنالیز شده و توسط آزمون دانکن مقایسه میانگین در سطح ۵٪ انجام گرفت.

نتایج

نتایج مربوط به شاخص های خون سازی مطالعه شده در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول۱. سطوح گویچه های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین متعاقب تزریق *in ovo* لپتین در جوجه های تفریخ شده

تیمار(T)	غلظت و زمان تزریق لپتین	تعداد گویچه های قرمز RBC	هماتوکریت PCV %	غلظت هموگلوبین Hb g/dl
1	شاهد(بدون تزریق)	$6.3 \times 10^{6\,b}$	37^{b}	12.58^{b}
2	شاهدمنفی یا تامپون فسفات (روز هفتم انکوباسیون)	$5.7\times10^{6\,d}$	35^{d}	$9/61^{d}$
3	۰/۵میکروگرم (روز هفتم انکوباسیون)	$5.8\times10^{6\,d}$	35^{d}	11.56^{c}
4	۱ میکروگرم (روز هفتم انکوباسیون)	$6/1\times10^{6\,c}$	36^{c}	11.94^{c}
5	۱/۵ میکروگرم (روز هفتم انکوباسیون)	$6.7\times10^{6\,a}$	39^{a}	$13/31^{a}$

– اختلافات بین میانگین ها با تفاوت در حروف لاتین در سطح احتمال ۵٪ بیان شده است.

نتیجه گیری کلی

در این مطالعه تزریق ۱/۵میکروگرم/تخم مرغ در روز ۷جنینی باعث افزایش نرخ فاکتورهای خون سازی اعم از تعدادگویچه های قرمز، نرخ هماتوکریت وهموگلوبین شده است(جدول ۱). این نتایج علاوه براینکه با نظریه نقش کلیدی لپتین بر رشد جنینی و پس از جنینیِ آشویل وهمکاران همخوانی دارد با یافته های هوگارد وهمکاران نیز مطابقت دارد. لذا با توجه به این یافته ها احتمالاً لپتین درتکثیرسلول های خونی نقش داشته باشد. امّا تزریق cc ۰/۵ تامپون فسفات (حلال) و همچنین تزریق غلظت های پایین (۰/۵و۱میکروگرم/تخم)، تاثیر منفی بر نرخ هماتوکریت، تعدادگویچه های قرمز وهموگلوبین جوجه های تفریخ شده داشته است(جدول۱).افزودن لپتین به مقدار۱/۵میکروگرم در زمان شروع اندام زایی(روزهفتم) جنین مرغ احتمالاً باعث رشد و تحریک فعالیت سلول های مغز استخوان شده و تولید سلول های خونی را تحریک کرده و باعث خونسازی می شود اما این اثر در هفته اول جنینی وجود ندارد. نتایج بدست آمده، رابطه بین لپتین و محور آدرنال هیپوفیز هیپوتالاموس (HPA) و تنظیم این محور توسط لپتین را گزارش کردند، که موجب تسریع فعالیت هیپوتالاموسی محور غده هیپوفیز – تیروئید می شود. و موجب افزایش THها و افزایش متابولیسم پایه و افزایش تعداد گلبول های قرمز و سلول های خونی در جوجه ها می شود و به واسطه آن خونسازی و سطح نشانگرهای آن در جوجه های تفریخ شده افزایش می یابد(آهیما، ۱۹۹٦). پیشنهاد می شود مطالعات مکمل با استفاده از غلظت های بالاتر هورمون و تزریق به زرده انجام گیرد.

منابع:

۱. محیطی ج. افخمی م. صدقی ه. ۱۳۸۳. مقایسه سطح خونی هورمون لپتین در بیماران چاق دیابتی و غیردیابتی. مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی -درمانی شهید صدوقی یزد. (سال دوازدهم)، شماره صفحه ۹ تا ١٤

2. Ahima, R. S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B. B. 1996: Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature 382: 250-252
3. Cioff. J.A., Shafer. A.W., Zupancic. T.J., Smith-Gbur, J., Mikhail, A., Platika, D., Novel, B.1996. OB receptor isoforms: Possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. Nat Med, 2: 585-9.
4. Kaiya, H., M. Furuse., M. Miyazato., K. Kangawa. 2009. Current knowledge of the roles of Leptin in regulating food intake and energy balance in birds. General and Comparative Endocrinology, 163: 33–38
5. Taouis, M., Chen, J.W., Davidaudc, Dupond, J., Derotet, M, Simin, J. 1998. Cloning the chicken leptin gene. Gene, 208: 239-242.

The effects of *In ovo* administration of Leptin on Hematocrit, Hemoglobin and Red blood cells in newly-hatched chicks

Abstract

The aim of this study was to investigation of effect of in ovo administration of Leptin on some of hematopoitic parameters in hached chicks. 750 fertile eggs were divided to 5 groups ; control or T1 (without injection), group T2 (in ovo injected with ./5 cc tampon phosphate at day 7), group T3 (in ovo injected with ./5 µg Leptin at day 7), group T4 (in ovo injected with 1 µg Leptin at day 7) and group T5 (in ovo injected with 1/5 µg Leptin at day 7). After hatching and blood sampling, RBC, PCV% and Hb were determined. It was observed T2 and T3 had lower hematopoitic activity in compared with control, T4 or T5. In T5, chicks had highest hematopoitic parameters (RBC: 6.7×106 ،PCV %: 39 and Hb: 13/31 g/dl) in compared with control (RBC:6.3×106 ،PCV %: 37, Hb: 12.58 g/dl).but, in ovo injection in T2, T3, T4 had negative effects on hematopoitic parameters. It is concluded, in ovo administration of 1/5 µg Leptin at beging Of organogenesis period of chicken embryo may cause stimulate bone narrow cells activity for production of red blood cells, but lower dose or injection at early embryonic life may cause suppress hematopoiesis.

Keywords: in ovo , Leptin , Chicken , hematopoitic parameters.