DOI: 10.22055/IVJ.2023.366039.2514

اثر اسانس مورد بر بیان ژن پروفایل سایتوکینی در بافت روده جوجه گوشتی

محمود نظری[1*] و سپیده رستمی[2]

[1] دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
[2] دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۵ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۲۰

چکیده

اسانس گیاه مورد اثرات ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی دارد. تانن‌ها و فلاوونوئید موجود در گیاه مورد دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. در نتیجه می‌توان انتظار داشت که اسانس گیاه مورد بتواند سیستم ایمنی جوجه گوشتی را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین در این تحقیق اثر اسانس مورد بر بیان سایتوکین‌های اینترلوکین ۱، ۲، ۴ و ۱۰ بافت روده کوچک جوجه گوشتی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از ۲۰۰ قطعه جوجه گوشتی سویه تجاری راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصافی با ۲ تیمار، ۵ تکرار و ۱۲ قطعه جوجه در هر تکرار استفاده شد. دو تیمار آزمایشی شامل: ۱- جیره شاهد، ۲- جیره پایه به همراه ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم جیره اسانس مورد بود. در انتهای آزمایش یک مرغ از هر تکرار کشتار شده و بافت آن‌ها سریعاً جدا و به همراه ازت مایع به آزمایشگاه منتقل گردید. بیان ژن‌های پروفایل سیتوکینی به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی ارزیابی شد. تجزیه واریانس نشان داد که افزودن ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسانس مورد در جیره غذایی مرغ گوشتی بر بیان ژن IL-2 و IL-10 اثر معنی‌داری نداشته است. در حالی که بیان ژن‌های IL-1 و IL-4 اثر معنی‌داری داشت. این نتایج نشان دهنده این است که اسانس مورد با کاهش سایتوکین‌های پیش التهابی می‌تواند در پاسخ ایمنی سلولی در روده کوچک مرغ گوشتی نقش ایفا کند. پس می‌توان با افزودن اسانس مورد در جیره جوجه گوشتی از خصوصیات ضد التهابی آن بهره برد.

کلمات کلیدی: اسانس مورد، بیان ژن، پاسخ ایمنی، سایتوکین

مقدمه

در سال‌های اخیر توصیه به استفاده از موادی مثل گیاهان دارویی و پروبیوتیک‌ها به عنوان محرک رشد افزایش یافته است. ارزش اقتصادی بالا، هزینه تولید کم، نداشتن اثرهای تخریبی بر محیط زیست و عوارض کم‌تر در مقایسه با داروهای شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها باعث شده است در سال‌های اخیر مصرف گیاهان دارویی و فرآورده‌های آن‌ها در تغذیه و تولید دام و طیور از ارزش و جایگاه خاصی برخوردار باشند (Rabieh et al, 2020).

گیاهان دارویی حاوی ترکیبات مفید با خاصیت هورمونی، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، تقویت کننده سیستم ایمنی و تحریک کننده رشد هستند که می‌توانند سبب بهبود رشد، سیستم ایمنی و فلور میکروبی دستگاه

*نویسنده مسئول : محمود نظری، دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
E-mail: M.Nazari@asnrukh.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

گوارش جوجه گوشتی شوند (Mosavi et al, 2022; Rabieh et al, 2020; Sabahi et al, 2020; Shojaeian et al, 2017; Taki et al, 2015; Zainali et al. 2013). اسانس‌ها روغن‌های طبیعی بسیار غلیظی هستند که از گیاهانی مشتق می‌شوند که از متابولیت‌های معطر، فرار و ثانویه گیاهی تشکیل شده‌اند. اسانس‌ها عمدتاً با تقطیر با بخار استخراج می‌شوند و بوی بسیار شدیدی از خود نشان می‌دهند. ترکیبات اصلی در اسانس‌ها نشان‌دهنده مونو و سسکوی ترپن‌ها و چندین مشتق اکسیژن‌دار هستند. سایر مواد موجود در روغن‌ها شامل الکل‌ها، آلدئیدهای آلیفاتیک و استرها می‌باشد. معمولاً اسانس‌ها شامل دو یا سه جزء اصلی هستند که فعالیت‌های بیولوژیکی و خواص شیمیایی آن‌ها را تعیین می‌کنند (Hotta et al, 2009).

برخی اسانس‌های گیاهی با خاصیت ضد باکتریایی به عنوان گزینه‌های جاگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره طیور مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته است. ترکیبات آنتی‌اکسیدان و اسیدهای چرب غیراشباع نقش مهمی در بهبود پاسخ ایمنی و فلور میکروبی روده در جوجه‌های گوشتی دارند. گیاهان دارویی و عصاره آن‌ها باعث تأثیر بر ترکیب و فلور دستگاه گوارش شده، سیستم ایمنی را تقویت و کلسترول خون را کاهش و در نهایت منجر به بهبود عملکرد در جوجه‌های گوشتی می‌شوند. گیاهان دارویی و ترکیبات مؤثره آن‌ها باعث افزایش جمعیت میکروب‌های مفید (باکتری‌های اسید لاکتیک) شده و رشد باکتری‌های غیرمفید و بیماری‌زای دستگاه گوارش را مهار می‌کنند و سبب افزایش طول پرزهای روده در جوجه‌های گوشتی می‌شوند (Lee et al, 2004).

مورد با نام علمی *Myrtus communis* درختچه‌ای کوچک با برگ‌های همیشه سبز است. اسانس مورد حاوی میرتنول، استات میرتنول، لیمونین، لینالول، آلفا پینن، ۱،۸- سینئول، بتا-کاریو فیلنین، سیمن، گرانیول، نرول، فنیل پروپانوئید و متیل‌لیوجنول است که برای اهداف مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرند. تانن‌ها مانند گالوتانین و فلاوونوئید موجود در گیاه مورد مانند میریستین، کاتچین و کوئرستین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که اثر محافظتی علیه اختلالات قلبی عروقی دارد (Ozek et al, 2000). اسانس مورد دارای خاصیت آنتی‌باکتریال است که سبب افزایش ارتفاع پرز و بهبود ناحیه سطح جذب و بازده خوراک می‌شود. ترکیبات اسانس مورد مانند سینئول و برنئول سبب کاهش فعالیت 3-s-هیدروکسی-متیل گلوتاریل-کوآ (HMG-COA) ردوکتاز در کبد می‌شود و تغذیه پرندگان با اسانس مورد سبب کاهش کلسترول خون می‌شود (Najibzadeh et al, 2018). میرتوکومولون و سمی‌میرتوکومولون استخراج شده از گیاه مورد اثرات محافظتی قابل توجهی در آسیب اکسیداتیو ناشی از LDL دارند و همچنین اثرات محافظتی قابل توجهی در کاهش اسیدهای چرب غیراشباع دارای چند باند دوگانه و کلسترول نشان داده و مانع از افزایش محصولات اکسیداتیو آن‌ها می‌شوند (Rosa et al, 2008). از لحاظ فعالیت ضدمیکروبی مشخص گردید اسانس مورد خاصیت ضد میکروبی بر علیه اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس آئروس و کاندیدا آلبیکانس دارد (Yadegarinia et al, 2006)، همچنین از روغن‌های مورد برای نگهداری مواد غذایی و در طب سنتی برای درمان ناهنجاری‌های تنفسی، اسهال، بواسیر و فعالیت‌های ضد التهابی استفاده می‌شود (Bouzabata et al, 2015).

مطالعاتی که بر روی تأثیر اسانس مورد در جوجه‌های گوشتی انجام شد نشان داد که افزودن اسانس مورد (در سطح ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰) میلی‌گرم در کیلوگرم و آنتی‌بیوتیک (در سطح ۴۵۰) میلی‌گرم در کیلوگرم در مقایسه با گروه شاهد در سن ۴۲ روزگی به صورت معنی‌داری باعث افزایش ارتفاع پرز و کاهش ضخامت بافت پوششی روده کوچک شد و سطوح مختلف اسانس مورد بر آنزیم‌های کبدی اثر معنی‌داری نداشت، تیتر آنتی‌بادی نیوکاسل، آنفولانزا و برونشیت به خصوص در سطح ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسانس افزایش یافت و همچنین سطح ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم باعث افزایش پروتئین کل سرم و بهبود وضعیت ریخت‌شناسی روده کوچک در جوجه‌های

گوشتی شد و نتیجه گرفته شد که از اسانس مورد می‌توان به عنوان جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده کرد (Najibzadeh et al, 2018). همچنین، استفاده از اسانس مورد می‌تواند سبب افزایش بیان ژن موسین ۲ در روده جیره مرغ گوشتی شود. لایه مخاطی روده با ترشح موکوس (موسین) اولین سد دفاعی دستگاه گوارش را تشکیل می‌دهد. موسین ساخته شده توسط سلول‌های گابلت با آغشته کردن سطح مجاری گوارشی، به عنوان واسطه در جذب مواد مغذی از این مجاری نقش دارد، بنابراین تغییر میزان و غلظت موسین دستگاه گوارش هضم و جذب را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Zainali et al, 2013).

از طرف دیگر، برخی از دانشمندان گزارش کرده‌اند که خوراک‌های حاوی مواد مغذی خاص، به ویژه آن‌هایی که خواص آنتی‌اکسیدانی دارند، ممکن است باعث بهبود عملکرد سیستم ایمنی بدن شوند (Rabieh et al, 2020). تانن‌ها و فلاوونوئید موجود در گیاه مورد دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی تانن‌ها و فلاوونوئیدها می‌توان انتظار داشت که اسانس مورد بتواند سیستم ایمنی جوجه‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. بعضی اسانس‌های گیاهی حاوی مواد ضدمیکروبی هستند. برخی از اثرات بیولوژیکی اسانس اکالیپتوس مانند خواص ضدعفونی آن در برابر طیف وسیعی از عوامل میکروبی (Schnitzler et al, 2001; Takarada et al, 2004) و پتانسیل ضدالتهابی آن (Juergens et al, 2003) نشان داده شده است. همچنین، تحقیقات نشان داده که اسانس گیاه مورد اثرات ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی یا ضدالتهابی دارد (Najibzadeh et al, 2018; Yadegarinia et al, 2006). با توجه به شواهد ارایه شده احتمالاً استفاده از اسانس مورد می‌تواند سبب افزایش ایمنی در دستگاه گوارش جوجه گوشتی شود. بنابراین در این تحقیق اثر اسانس مورد بر بیان پروفایل ژن‌های سایتوکینی در بافت روده جوجه گوشتی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

برای انجام آزمایش از ۱۲۰ قطعه جوجه گوشتی یک روزه سویه تجاری راس ۳۰۸ استفاده شد و آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲ تیمار، ۵ تکرار و ۱۲ قطعه جوجه در هر تکرار به مدت ۴۲ روز انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱- جیره شاهد ۲- جیره مکمل شده با ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم جیره اسانس مورد بودند. جیره غذایی بر پایه ذرت-کنجاله سویا تنظیم و مکمل اسانس‌ها به آن‌ها اضافه گردید (Table 1). جوجه‌ها دسترسی آزادانه به آب و خوراک داشتند. در پایان دوره (۴۲ روزگی) از هر تکرار یک قطعه جوجه به تصادف انتخاب و کشتار شد. نمونه از قسمت انتهایی بافت ژژنوم و متصل به ایلیوم (Meckel's diverticulum) تهیه شده و پس از تخلیه مدفوع و شستشو با بافر فسفات سالین به همراه ازت مایع به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۸۰- ذخیره شدند.

استخراج RNA نمونه‌ها با استفاده از محلول استخراج شرکت دنازیست (DENAzist column RNA isolation kit, S-1020) انجام گرفت. برای بررسی کمیت و خلوص RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ مدل (Thermo Scientific NanOdrOp. 2000. USA) و برای تعیین کیفیت RNA استخراج شده از ژل آگارز دو درصد در بافر 0.5x TBE استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت سیناکلون و طبق دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد. توالی پرایمرها استفاده شده در این تحقیق و خصوصیات آن‌ها در Table 2 ارایه شده است (Lammers et al, 2010). به منظور بررسی تغییر در رونوشت ژن از روش PCR در زمان واقعی (RT-qPCR) استفاده گردید.

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad انجام شد. تکثیر قطعات توسط واکنش PCR دستگاه ترمال سایکلر Bio-Rad بر اساس روش استاندارد انجام شد. تعداد سیکل‌های انجام واکنش PCR برای هر جفت پرایمر ۳۵ در نظر گرفته شد. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل، ۷ میکرولیتر آب استریل، ۱ میکرولیتر

از هر پرایمر رفت و برگشت (۰/۵ میکرومولار از هر پرایمر)، ۲ میکرولیتر از cDNA (۵۰ نانوگرم) و ۱۰ میکرولیتر Master mix 1.5 بود و برنامه حرارتی عبارتند از: یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل با دمای واسرشت‌سازی ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بوده است. الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد و رنگ‌آمیزی آن با ماده سیف استین صورت گرفت. برای تجزیه و تحلیل بیان ژن با تکنیک q RT-PCR از دستگاه Step One Plus Real-Time PCR System شرکت ABI و کیت Real Q Plus 2x Master Mix Green (High ROX) استفاده شد. اجزای واکنش ریل تایم در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل، ۴ میکرولیتر cDNA (حاوی ۵۰ نانوگرم)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر رفت و برگشت (۰/۵ میکرومولار از هر پرایمر)، ۴ میکرولیتر آب استریل، ۱۰ میکرولیتر کیت تجاری Real Q Plus 2x Master Mix Green (High ROX) بود و برنامه حرارتی شامل: یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه ۱۵ دقیقه، ۴۰ سیکل با دمای واسرشت‌سازی ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۰ سیکل با دمای ۹۵–۵۵ درجه به مدت ۱۰ ثانیه برای تهیه نمودار ذوب بوده است.

Table 1: Ingredient composition of the experimental diets (%)

Ingredients (%)	Stater Diet (1-21 days)	Grower Diet (22-42 days)
Corn	56.22	60.50
Soybean meal (44% crude protein)	31.72	28.39
Di-calcium phosphate	1.60	1.45
Oyster shell	1.20	1.10
Corn gluten	4.00	2.50
Plant oil	4.00	4.85
Salt	0.40	0.40
L-lysine	0.14	0.11
DL-Methionine	0.22	0.20
Vitamin premix1	0.25	0.25
Mineral premix2	0.25	0.25
Calculated analysis		
Metabolizable energy (kcal kg^{-1})	3100	3200
Crude protein (%)	21.50	19.50
Met + Cys	0.93	0.84
Lysine	1.18	1.04
Calcium (%)	0.88	0.80
Available phosphorus (%)	0.44	0.40

[1]Vitamin premix provided the following per kilogram of diet: vitamin A: 8000 IU; vitmin D3: 2500 IU; vitamin E: 25.00 mg; vitamin K3: 2.00 mg; vitamin B1: 2.00 mg; vitamin B3: 6.00 mg; vitamin B5: 10.00 mg; vitamin B12: 0.01 mg; vitamin B6: 3.00 mg; vitamin B7: 0.10 mg.
[2] Mineral premix provided the following per kilogram of diet: Mn: 70.00 mg; Fe: 40.00 mg; Zn: 84.00; Cu: 10.00 mg; I: 0.40 mg; Co: 0.30 mg.

Table 2: The sequence and characteristics of the primer used in this study

Gene name	Primer sequence	Access no.	Amplicon Size (bp)
IL-1	F: 5'- CAGCAGCCTCAGCGAAGAG-3' R: 5'- CTGTGGTGTGCTCAGAATCCA-3'	AJ245728	86
IL-2	F: 5'- TTCAAAATATCGAAAAGAACCTCAAG-3' R: 5'- CGGTGTGATTTAGACCCGTAAGAC-3'	AF033563	51
IL-4	F: 5'- GTGCCCACGCTGTGCTTAC-3' R: 5'- AGGAAACCTCTCCCTGGATGTC-3'	AJ621249	82
IL-10	F: 5'- CGCTGTCACCGCTTCTTCA-3' R: 5'- TCCCGTTCTCATCCATCTTCTC-3'	AJ621614	88
γIFN-	F: 5'- GTGAAGAAGGTGAAAGATATCATGGA-3' R: 5'- GCTTTGCGCTGGATTCTCA-3'	Y07922	71
TNF-α	F: 5'- AATTTGCAGGCTGTTTCTGC-3' R: 5'- TATGAAGGTGGTGCAGATGG-3'	374125	112
TGF- β4	F: 5'- ACCTCGACACCGACTACTGCTT-3' R: 5'- ATCCTTGCGGAAGTCGATGT-3'	M31160	86
PIgR	F: 5'- GGATCCGACGTGCAGATCCAGCTCCTTCGT-3' R: 5'- TCACCATCATCGACTTCCCAGAGCAGG-3'	AY233381	247
28S	F: 5'- GGCGAAGCCAGAGGAAACT-3' R: 5'- GACGACCGATTTGCACGTC-3'	DQ018756	62

روش بررسی تغییرات بیان ژن در این پژوهش روش ΔΔCT (آستانه مقایسه‌ای) و نسبت به بیان ژن 28s بود (Pfaffl et al, 2002):

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CT target\,(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CT ref(control-sample)}}$$

در این رابطه Etarget و Eref به ترتیب بازدهی ژن مورد مطالعه و ژن مرجع می‌باشد. ΔCT حاصل تفریق CT (حد آستانه) ژن مورد مطالعه در نمونه از کنترل است. آنالیز سطح بیان ژن با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و سپس آزمون دانکن در سطح خطای ۵ درصد و ۱ درصد بررسی شد.

نتایج

تکثیر ژن‌های سایتوکینی

برای تعیین این که آیا mRNA ژن‌های اینترلوکین ۱، ۲، ۴ و ۱۰، همچنین اینترفرون گاما (IFN-γ)، فاکتور نکروزه کننده تومور (TNF)، تبدیل فاکتور رشد بتا (TGF beta 4)، گیرنده ایمونوگلوبولین پلیمری (PIgR) و 28s بیان می‌شوند یا خیر، RNA کل از بافت روده کوچک جوجه گوشتی استخراج شد و با استفاده از تکنیک PCR تکثیر شد. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR برای ژن‌های اینترلوکین ۱، ۲، ۴ و ۱۰ و 28s در Figure 1 نشان داده شده است.

نتایج الکتروفورز بیان این ژن‌ها را در سلول‌های بافت روده کوچک مرغ‌های گوشتی تأیید کرد و به صورت یک باند روی ژل آگارز ۲ درصد ظاهر شدند. الکتروفورز محصولات PCR به ترتیب قطعات ۸۶، ۵۱، ۸۲، ۸۸ و ۶۲ جفت باز را برای اینترلوکین ۱، ۲، ۴ و ۱۰ و 28S نشان داد.

برای ژن‌های اینترفرون گاما، فاکتور نکروزه کننده تومور، TGF beta 4 و گیرنده ایمونوگلوبولین پلیمری باندی بر روی ژل آگارز تشکیل نشد. پس از تأیید تکثیر قطعات مورد نظر، تکنیک ریل تایم qPCR جهت بررسی بیان ژن‌های مورد نظر اجرا گردید.

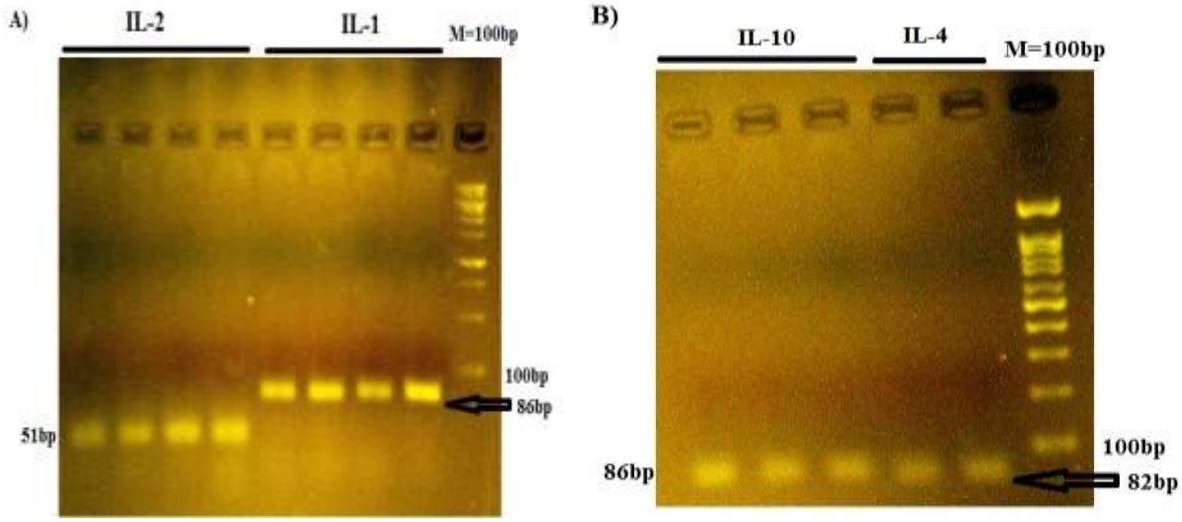

Figure 1: A sample of electrophoresis of PCR products for A) IL-1 and IL-2, B) IL-4 and IL-10 on the 2% Agarose gel. M: size marker 100bp

ارزیابی نتایج تکنیک PCR در زمان واقعی

منحنی ذوب برای ژن‌های اینترلوکین ۱، ۲، ۴ و ۱۰ در Figure 2 نشان داده شده است. وجود تنها یک پیک (قله) در منحنی ذوب بیان‌کننده حداقل دایمر-پرایمر و نشان دهنده اختصاصیت پرایمرها است.

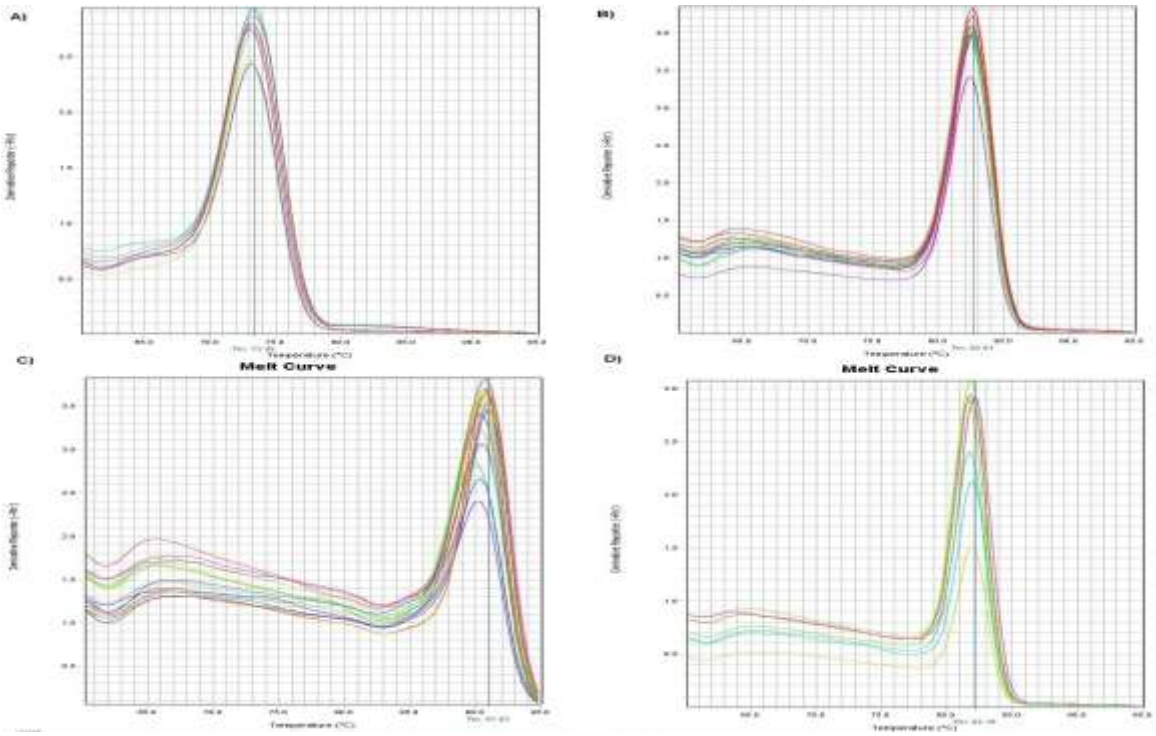

Figure 2: Real-time PCR melting curves. Pictures Show real-time PCR melting curves for A) IL-1 B) IL-2 C) IL-4 D) IL-10 genes in laying hens.

اثر تیمار بر بیان ژن‌ها

اثر تیمارها بر بیان ژن‌های سایتوکینی روده جوجه‌های گوشتی در Table 3 آورده شده است. اعداد داخل جدول بر اساس روش واحد اختیاری (Arbitrary unit) ارایه شده است (Rabieh et al, 2020). در این روش میزان بیان گروه کنترل ۱ در نظر گرفته می‌شود و بقیه تیمارها نسبت به آن سنجیده می‌شود. تجزیه واریانس نشان داد که افزودن ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسانس مورد بر بیان ژن IL-2 و IL-10 اثر معنی‌داری نداشته‌اند (P>۰/۰۵). میزان بیان ژن IL-2 و IL-10 در گروه تغذیه شده با سطح ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسانس مورد به ترتیب ۱/۲۱۲ و ۰/۹۴۲ برآورد شد که در هر دو گروه در سطح ۵ درصد معنی‌دار نشد (P>۰/۰۵).

تجزیه واریانس نشان داد که افزودن ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسانس مورد بر بیان ژن‌های IL-1 و IL-4 اثر معنی‌داری دارد (P<۰/۰۱). میزان بیان ژن IL-1 و IL-4 در گروه تغذیه شده با سطح ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسانس مورد به ترتیب ۰/۴۲۸ و ۰/۴۱۸ برآورد شد که در هر دو گروه نسبت به کنترل بیان ژن کاهش یافت و این کاهش در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (P<۰/۰۱).

Table 3: Effects of different treatments on cytokine profiles gene expression in broiler chickens

	Gene name			
Treatments	IL-1	IL-2	IL-4	IL-10
Control	1.00 [a]	1.00 [a]	1.00 [a]	1.00 [a]
Control+ 250 mg/kg myrtle essential oil	0.428 [b]	1.212 [a]	0.418 [b]	0.942 [a]
P value	0.001	0.139 [a]	0.001	0.583 [a]

The amount of mRNAs was normalized to the amount 28s mRNA. Different letters superscripts (a and b) in each row indicates a significant difference between the treatments (P< 0.01)

بحث

اسانس‌ها به طور گسترده در آروماتراپی، آرایشی و بهداشتی، صنایع غذایی (عوامل طعم‌دهنده و نگهدارنده) و صنعت داروسازی (عوامل ضدمیکروبی و ضد درد) استفاده می‌شوند. علاقه به کاربردهای بیش‌تر اسانس‌ها به طور پیوسته در حال افزایش است. فعالیت‌های تعدیل‌کننده ایمنی آن‌ها از طریق مکانیسم‌های متعددی انجام می‌شود: مشخص شده است که اسانس‌ها سیستم ایمنی را با افزایش مقدار لنفوسیت‌های در گردش و افزایش فعالیت فاگوسیتی آن‌ها تحریک می‌کند و در نتیجه پاکسازی باکتریایی را بهبود می‌بخشد (Sandner et al, 2020). همچنین، اسانس‌ها پاسخ‌های درگیر در التهاب را سرکوب می‌کنند و تولید سایتوکین را با تداخل با واسطه‌های کلیدی مسیرهای التهابی کاهش می‌دهند (Sandner et al, 2020). اسانس‌ها به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها در جوجه‌های گوشتی معرفی شده‌اند. بنابراین، اثرات تعدیل‌کننده ایمنی امیدوارکننده اسانس‌های گیاهی می‌تواند برای درمان‌های جایگزین مورد استفاده قرارگیرد (Ipu et al, 2006). با این حال، اطلاعات کمی در مورد تأثیر اسانس مورد بر سیستم ایمنی جوجه گوشتی وجود دارد. به همین دلیل، در این تحقیق اثرات اسانس گیاه مورد بر بیان ژن پروفایل سایتوکینی شامل سایتوکین‌های التهابی و پیش‌التهابی در بافت روده جوجه گوشتی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج الکتروفورز نشان داد که ژن‌های اینترفرون گاما، فاکتور نکروزه کننده تومور (TNF-α)، TGF beta 4 و گیرنده ایمونوگلوبولین پلیمری در بافت روده جوجه گوشتی استفاده در این آزمایش تحت این جیره غذایی و شرایط پرورشی بیان نمی‌شوند و حضور این ژن‌ها در بافت روده مشخص نشد. نتایج این تحقیق با نتایج Nobakht و Muhaghegh Dolatabadiسال ۲۰۱۸ همخوانی دارد. این محققین بیان نمودند به هنگام اضافه نمودن بلوط به جیره جوجه گوشتی باندی برای IFN –γ بر روی ژل آگارز تشکیل نشد و ژن اینترفرون گاما تکثیر نشد. اینترفرون گاما

یک سایتوکین است که برای ایمنی ذاتی و سازگار در برابر عفونت‌های ویروسی، برخی باکتریایی و تک‌یاخته‌ای ضروری است. اینترفرون گاما دارای خواص ضد ویروسی، تنظیم کننده ایمنی و ضد تومور است (Schroder et al, 2004). اینترفرون گاما در نتیجه تحریک میتوژن‌ها و پادگن‌ها ساخته می‌شود. بنابراین، سلول‌های طبیعی تا زمانی که برای سنتز اینترفرون گاما القا نشده باشند، معمولاً این کار را انجام نمی‌دهند و عفونت‌های ویروسی یکی از عومل قوی تولید اینترفرون‌ها هستند. با توجه به این که در این پژوهش جوجه‌ها تحت تأثیر چالش ایمنی قرار نداشتند و اسانس مورد نیز دارای ترکیبات میتوژنی نمی‌باشد، به نظر می‌رسد که اسانس مورد نتواند باعث تحریک بیان ژن اینترفرون‌گاما شود. این موضوع را می‌توان به ژن‌های TNF-α، TGF-β و گیرنده ایمونوگلوبولین پلیمری هم تعمیم داد. این ژن‌ها در زمان حضور یک محرک‌های بیماری‌زا بیان می‌شوند. سایتوکین TNF-α با بودن عوامل میکروبی مثل لیپوپلی ساکاریدها، تولید شده و باعث می‌شود سلول‌های اندوتلیال عروق در محل عفونت، مولکول‌های چسبان مانند سلکتین‌ها را بیان کنند، بنابراین لکوسیت‌هایی مانند نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها می‌توانند به سطح این عروق چسبیده و به محل عفونت وارد شوند (Pfeffer, 2003). بنابراین نقش اصلی TNF-α ایجاد پاسخ‌های التهابی موضعی نسبت به میکروب‌ها می‌باشد (Chu, 2013). فاکتور رشد تغییردهنده بتا (TGF-β) نیز یکی از کارهای اصلی این پروتئین، تنظیم فرایندهای التهابی، به ویژه در روده است. اثرات محافظتی TGF-β در انواع مختلفی از واکنش‌های ایمنی به خصوص در مواردی که بافت خاصی در گیر می‌شود به اثبات رسیده است. همچنین نقش مهمی در تمایز سلول‌های بنیادی و همچنین تنظیم و تمایز سلول T دارد. دلیل نقش آن در تنظیم و تمایز سلول‌های بنیادی ایمنی و سلول‌های بنیادی، یک سایتوکین بسیار تحقیق شده در زمینه‌های سرطان، بیماری‌های خود ایمنی و بیماری‌های عفونی است. افزایش بیان TGF-β اغلب با بدخیمی بسیاری از سرطان‌ها و نقص در پاسخ مهار رشد سلولی به TGF-β ارتباط دارد (Moses et al, 2016). گیرنده ایمونوگلوبولین پلیمری (pIgR) عمدتاً در پوشش اپیتلیال سطح مخاط دستگاه گوارش قرار دارند و تحت تنظیم قوی سایتوکین‌ها، هورمون‌ها و محرک‌های بیماری‌زا است. برجسته‌ترین تعدیل کننده‌های تنظیم pIgR شامل TLR4 و TLR3 است که به ترتیب لیپوپلی ساکارید باکتریایی و ژنوم dsRNA ویروسی را تشخیص می‌دهند. بیان pIgR توسط سایتوکین‌های پیش التهابی مانند IL-1، IL-4، TNF-α و IFN-γ تنظیم می‌شود. تنظیم رونویسی توسط سایتوکین‌های مختلف از طریق مسیرهای مشابه، شامل حلقه بازخورد NF-kB انجام می‌شود. تعامل IL-1 و TNF-α با گیرنده‌های آن‌ها در نهایت منجر به فعال‌سازی رونویسی ژن PIGR به واسطه NF-kB می‌شود. NF-kB با اینترون ۱ ژن PIGR برای شروع سنتز pIgR تعامل دارد. علاوه بر مسیر NF-kB، القای رونویسی نیز در پاسخ به IFN-γ ادامه می‌یابد و بیان pIgR را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، IL-4 به صورت هم‌افزایی با IFN-γ برای القای رونویسی pIgR عمل می‌کند. ترکیب آن‌ها بیان PIGR را افزایش می‌دهد (Kaetzel, 2005; Asano and Komiyama, 2011). نمی‌توان انتظار داشت هنگامی که بیان سایتوکین‌های پیش التهابی مانند IL-1، IL-4 کاهش یافته است و TNF-α و IFN-γ نیز بیان نشده‌اند، رونویسی ژن PIGR انجام پذیرد. پس عدم تکثیر ژن PIGR در این تحقیق منطقی است.

طبق نتایج به دست آمده بیان ژن‌های پیش التهابی مثل IL-1 و IL-4 کاهش یافته است و این در حالی است که افزودن اسانس گیاه مورد تأثیری بر بیان ژن‌های IL-2 و IL-10 نداشته است. نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج دیگر محققین هم‌خوانی دارد. Serafino و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که افزودن اسانس اکالیپتوس به محیط کشت سلول‌های MDM انسانی القا شده توسط لیپوپلی ساکاریدهای باکتریایی جهت تولید سایتوکین‌ها، می‌تواند تولید سایتوکین‌های پیش التهابی مثل IL-4, IL-6 و TNF-α را کاهش دهد. در حالی که افزودن اسانس اکالیپتوس بر

دیگر سایتوکین‌های ایمنی یعنی IL-2 ، IL-10 و IFN-γ اثری نداشت. همچنین نتایج این تحقیق با نتایج Nobakht و Muhaghegh Dolatabadi در سال ۲۰۱۸ هم‌خوانی دارد. این محققین بیان نمودند به هنگام اضافه نمودن بلوط به جیره جوجه گوشتی به میزان ۲۰ درصد تغییری در بیان IL-2 و IL-13 نداشت. آن‌ها بیان کردند که جیره حاوی ۲۰ درصد آرد میوه بلوط به علت دارا بودن ترکیبات فنولی و مواد ضد تغذیه‌ای بیش‌تر مانند تانن‌ها، خوش‌خوراک نبوده و منجر به کاهش مصرف خوراک می‌گردد. از آن جایی که یکی از ترکیبات مهم و مؤثر در جیره پروتئین است و از طرف دیگر ساخت اینترفرون‌ها نیازمند پروتئین می‌باشد، به نظر می‌رسد کاهش مصرف خوراک بتواند باعث کاهش تولید اینترفرون‌ها شود.

اینترفرون‌ها ترکیباتی هستند که باعث مقاومت سلول‌ها به آلودگی ویروسی می‌شوند (Tayal and Singh Kalra, 2007). به هنگام بروز آسیب یا عفونت در یک عضو یا اندام، پاسخ ایمنی در جهت سرکوب این عفونت شکل می‌گیرد، که در این بین رها شدن سایتوکاین‌های پیش التهابی در طول التهاب، نشان‌دهنده تلاش بدن برای پاسخ به عفونت است (Scarpioni et al, 2016). از مهم‌ترین سایتوکین‌های پیش التهابی اصلی IL-1 ، IL-4 و TNF-α و غیره هستند. این سایتوکین‌ها به گیرنده اختصاصی خود بر سطح سلول هدف متصل شده و به دنبال آن یک آبشار مولکولی درون سلولی رخ می‌دهد. این سایتوکین‌ها با تحریک یا ممانعت از فعالیت، تکثیر و یا تمایز سلول‌های مختلف و با تنظیم ترشح آنتی‌بادی‌ها یا سایر سایتوکین‌ها بر شدت و زمان پاسخ‌های ایمنی تأثیر می‌گذارند (Opal and DePalo, 2000). کاهش سایتوکین‌های پیش التهابی (IL-4 و IL-1) در این تحقیق به معنی جلوگیری از التهاب است. با کاهش این سایتوکین‌ها، آبشار مولکولی درون سلولی هم تشکیل نخواهد شد یا کاهش می‌یابد و از اثرات بعدی جلوگیری به عمل خواهد آمد.

از جمله سایتوکین‌های ضدالتهابی می‌توان به IL-10 اشاره کرد که مهم‌ترین سایتوکین ضدالتهابی در پاسخ ایمنی است. این مولکول روی سلول‌های Th1 اثر خود را اعمال می‌کند و از تولید سایتوکین‌های که توسط این سلول‌ها تولید می‌شوند مانند اینترفرون گاما و IL-2 جلوگیری می‌کند. از این ترکیب ضدالتهابی برای درمان بیماری‌های التهابی روده در آزمایشات بالینی استفاده شده است (Opal and DePalo, 2000). همان طور که نتایج این تحقیق نشان داد اسانس مورد بر بیان IL-2 و IL-10 اثری نداشته است.

نتایج بیان کننده این موضوع است که اسانس مورد با کاهش سایتوکین‌های پیش التهابی مثل IL-4 و IL-1 می‌تواند در پاسخ ایمنی سلولی در روده کوچک مرغ گوشتی نقش ایفا کند. پس می‌توان با افزودن اسانس مورد در جیره جوجه گوشتی از خصوصیات ضد التهابی آن بهره برد.

تشکر و قدردانی

از مسئولین پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان که هزینه این تحقیق را تأمین نمودند تشکر به عمل می‌آید. همچنین از آقای مهندس حسینی کارشناس محترم آزمایشگاه مرکزی دانشگاه که در انجام آزمایشات ریل تایم همکاری نمودند کمال تشکر را داریم.

تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مالی

منابع مالی این پژوهش از طرح شماره ۱۴۰۲/۳۸ توسط دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تأمین گردیده است.

منابع

Asano, M. and Komiyama, K. (2011). Polymeric immunoglobulin receptor. *Journal of Oral Science*, 53(2), 147–156.

Bouzabata, A., Bazzali, O., Cabral, C., Goncalves, M., Cruz, J., Bighelli, M., Tomi, A. and Salgueiro, L. (2015). Myrtus communis L. as source of a bioactive and safe essential oil. *Journal Food and Chemical Toxicology*, 75, 166–172.

Chu, WM. (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer Lett*, 328(2), 222-5.

Hotta, M., Nakata, R., Katsukawa, M., Hori, K., Takahashi, S. and Inoue, H. (2009). Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR and suppresses COX-2 expression. *Journal of Lipid Res*, 51, 132–139.

Ipu, M. A., Akhtar, M. S., Anjumi, M. I. and Raja, M. L. (2006). New dimension of medicinal plants as animal feed. *Pakistan Veterinary Journal*, 26, 144-148.

Juergens, U., Dethlefsen, U., Steinkamp, G., Gillissen, A., Repges, R. and Vetter, H. (2003). Anti-inflammatory activity of 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respir Med*, 97, 250-256.

Kaetzel, CS. (2005). The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunological Reviews*, 206, 83–99.

Lammers, A., Wieland, W.H., Kruijt, L., Jansma, A., Straetemans, T., Schots, A., den Hartog, G. and Parmentier, H.K. (2010). Successive immunoglobulin and cytokine expression in the small intestine of juvenile chicken. *Developmental and Comparative Immunology*, 34(12), 1254-62.

Lee, K.W., Everts, H. and Eynen, A. C. (2004). Essential oils in Broiler Nutrition. *International Journal of poultry Science*, 3(12), 738-752.

Mosavi S. T., Beigi Nassiri M T., Roshanfekr H R., Nazari M. and ghorbani M R G. (2022). The Effect of Vitex Agnuse Castus Fruits Powder on Oviduct Markers Gene Expression of Laying Hens. *Research on animal production*, 13 (38), 138-146 (In Persian).

Moses, H.L., Roberts, A.B. and Erynck, R. (2016). The Discovery and Early Days of TGF-β: A Historical Perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(7), a021865.

Najibzadeh, N., Mohammadi-Saeei, M., Golchin-Gelehdooni, S. and arahmadi, B. (2018). Effects of Myrtle essential oil on intestinal morphology, antibody titer and blood parameters of broiler chickens. *Research on Animal Production*, 9 (21), pp.10-17 (In Persian).

Nobakht, E. and Muhaghegh Dolatabadi, M. (2018). Expression analysis of IFN -γ, IL -2 and IL -13 genes in Thymus tissue of broiler chickens fed with different levels of oak acorn. *Modern genetics Journal*, 13(2), 197-203 (In Persian).

Opal, SM., and DePalo, VA. (2000). Anti-Inflammatory Cytokines, impact of basic research on tomorrow's medicine. *CHEST*, 117(4), 1162–1172.

Ozek, T., Demirci, B. and Baser, K. (2000). Chemical composition of Turkish myrtle oil. *Journal of essential oil research*, 12, 541-544.

Pfaffl, M. W.; Horgan, GW. and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, pp.1-10

Pfeffer, K. (2003). Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14(3-4), 185-91.

Rabieh, M., Rooshanfekr, H., Nazari, M. and Ghorbani, M.R. (2020). Gene expression of antioxidant enzymes fed wild pistachio (Pistachio atlantica), purslane (portulaca oleracea) extract and vitamin E under in broiler chickens under heat stress condition. *Iranian Veterinary Journal*, 17(2), 51-60 (In Persian).

Rosa, A., Melis, M. P., Deian, M., Atzeri, A., Appendino, V. and Corona, G. (2008). Protective effect of the oligomeric acylphoroglucinols from Myrtus communis on cholesterol and human low density lipoprotein oxidation. *Chemistry and physics of lipids*, (155), 16-23.

Sabahi, R., Nazari, M., Beigi Nassiri, M.T. and Ghorbani, M.R. (2020). The Effect of Vitex Agnuse Castus Fruit Powder on Hypothalamic GnRH Gene Expression in Laying Hens. *Research on Animal Production*, 11 (30), 92-100 (In Persian).

Sandner, G., Heckmann, M. and Weghuber, J. (2020). Immunomodulatory Activities of Selected Essential Oils. *Biomolecules*, 10(8), 1139.

Scarpioni, R., Ricardi, M. and Albertazzi, V. (2016). Secondary amyloidosis in autoinflammatory diseases and the role of inflammation in renal damage. *World J Nephrol*, 5(1), 66-75.

Schnitzler, P., Schon, K. and Reichling, J. (2001). Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. *Pharmazie*, 56, 343-347.

Schroder, K., Hertzog, PJ., Ravasi, T. and Hume, DA. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2), 163–189.

Serafino, A., Sinibaldi Vallebona, P., Andreola, F., Zonfrillo, M., Mercuri, L., Federici, M., Rasi, G., Garaci, E. and Pierimarchi, P. (2008). Stimulatory effect of Eucalyptus essential oil on innate cell-mediated immune response. *BMC Immunol*ogy, 18(9), 17.

Shojaeian, K., Habibi, R., Shahryari, R. and Jalilvand, G. (2017). Effects of different levels of Eucalyptus (Eucalyptus globules) leaf powder on performance, carcass characteristics and immune response of broiler chicks. *Journal of Animal Science Research*, 27 (1), 81-94 (In Persian).

Takarada, K., Kimizuka, R., Takahashi, N., Honma, K., Okuda, K. and Kato, T. (2004). A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol*, 19: 61-64.

Taki, A., Salari, S., Boujarpour, M., Sari, M. and Taghizadeh, M. (2015). Effects of feeding various levels of Lavandula stoechas essence on quantitative and qualitative characteristics of egg, some blood parameters, and morphological changes of ovary in laying hens. *Iranian Veterinary Journal*, 11(1), 43-55 (In Persian).

Tayal, V. and Singh Kalra, B. (2007). Cytokines and anti-cytokines as therapeutics — An update. *European Journal of Pharmacology*, 579, 1–12.

Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh-Alipoor, S. and Rasooli, I. (2006). Biochemical activities of Iranian Mentha piperita. L and Myrtus communis. L essential oils. *Photochemistry*, 67, 1249-1255.

Zainali, S., Ghazanfari, Sh., and Ebrahimi, M. A. (2013). The effect of plant essential oils (Myrtus - Artemisia) on mucin gene expression in the intestinal tissue of broiler chickens. The first international congress and the 13th Iranian genetics congress, Tehran.

Received: 16.03.2023
Accepted: 11.08.2023

Vol. 19, No. 4, Winter, 2024 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2023.366039.2514

Effect of myrtle essential oil (MEO) on gene expression of cytokine profiles in the small intestine of broiler chicken

Mahmood Nazari[1*] and Sepideh Rostami[2]

[1] Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
[2] Ph.D student of Animal genetic and Breeding, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

Received: 16.03.2023 Accepted: 11.08.2023

Abstract

Myrtle essential oil (MEO) has antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory effects. Especially, tannins and flavonoids in MEO have antioxidant properties. So, it can be expected that MEO can affect the immune system of broilers. Therefore, in this research, the effect of MEO on the gene expression of cytokines (IL-1, IL-2, IL-4, and IL-10) in the tissues of the small intestine of broiler chickens was investigated. For this purpose, 120 Ross 308 broiler chicks in a completely randomized design with 2 treatments, 5 replicates and 12 chicks were used in each replicate. The treatments included: 1- control diet, 2- basal diet plus 250 mg / kg MEO. After 42 days, at the end of testing one chickens each replicate were slaughtered and their tissues were excised quickly and transported with liquid nitrogen to the laboratory. Quantitative real-time PCR was used to measure the expression of the cytokines. Analysis of variance showed that the addition of 250 mg/kg of the myrtle essential oil (MEO) in the diet of broiler chickens had no significant effect on IL-2 and IL-10 gene expression. While the expression of IL-1 and IL-4 genes had a significant effect. These results indicate that the myrtle essential oil can play a role in the cellular immune response in the small intestine of broiler chicken by reducing pro-inflammatory cytokines. So, the anti-inflammatory aspect of MEO could be used by adding it to the diet of broilers.

Key words: Myrtle essential oil, Gene expression, Immune response, Cytokine

[*] **Corresponding Author**: Mahmood Nazari, Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
E-mail: M.Nazari@asnrukh.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).