تاثیر عصاره دارچین بر میزان بیان ژن COX-2 کبدی و تغییرات پروفایل لیپیدی در سرم جوجه های گوشتی سالم و آلوده به *اشریشیا کولی*

سید محمود طباطبائی[۱*]، رضا بدل زاده[۲و۳]، رضا محمدنژاد[۲]، بهمن یوسفی[۳]

۱- استادیار گروه فیزیولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۲- مرکز تحقیقات کاربردی داروئی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران.
۳- مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: smt@iaut.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۴/۴/۱۵ پذیرش نهایی: ۹۴/۶/۳۰)

چکیده

استفاده از گیاهان دارویی به جای آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل خواص چندگانه آنها در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های دام و طیور می‌تواند فواید زیادی داشته باشد. این مطالعه، اثرات عصاره دارچین بر سطح بیان ژن سیکلوکسیژناز-۲ (COX-2) کبدی و تغییرات پروفایل لیپیدی در سرم جوجه‌های گوشتی سالم و آلوده به *اشریشیا کولی* را بررسی کرده است. ۹۰ قطعه جوجه با نژاد Ross-308 در گروه‌های سالم و آلوده به باکتری، رژیم غذایی نرمال یا رژیم غذایی به همراه عصاره دارچین در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم جیره غذایی دریافت نمودند. سوسپانسیون *اشریشیا کولی* (۱۰۸ cfu/ml) به‌صورت زیرجلدی ۱۲ روز پس از تجویز عصاره به جوجه‌ها تزریق شد و ۷۲ ساعت بعد، نمونه‌های خون برای اندازه‌گیری مقادیر متغیرهای پروفایل لیپیدی و سپس نمونه‌های بافت کبد برای تعیین سطح بیان ژن COX-2 از طریق Real-time PCR به‌دست آمد. آلودگی به *اشریشیا کولی* به‌طور معنی‌داری میزان بیان ژن COX-2 کبدی و برخی از متغیرهای پروفایل لیپیدی (تری‌گلیسرید) سرم را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد ($p<۰/۰۵$). پیش‌درمانی با مکمل دارچین در جیره غذایی جوجه‌های آلوده به باکتری، مقادیر COX-2 کبدی و تری‌گلیسرید سرم را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه دریافت‌کننده *اشریشیا کولی* کاهش داد ($p<۰/۰۵$). تجویز عصاره دارچین نتوانست تاثیر آماری معنی‌داری بر پارامترهای فوق در جوجه‌های سالم داشته باشد. در نتیجه، اضافه کردن عصاره دارچین در رژیم غذایی جوجه‌ها می‌تواند از آسیب‌های التهابی و اکسیداتیو بافتی ناشی از شرایط پاتولوژیک نظیر آلودگی به *اشریشیا کولی* جلوگیری کند.

کلید واژه‌ها: *اشریشیا کولی*، پروفایل لیپیدی، جوجه‌های گوشتی، دارچین.

مقدمه

تولیدات آلی دام‌ها به دلیل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در پرورش دام و مقابله با بیماری‌های دام به‌خصوص در صنعت طیور با محدودیت و نگرانی‌های زیادی مواجه شده است. از سوی دیگر، مصرف‌کنندگان ترجیحاً تمایل به خرید محصولات دامی دارند که به‌طور طبیعی و بدون استفاده از آنتی‌بیوتیک پرورش یافته‌اند. مقاومت دارویی در باکتری‌ها و وجود بقایای دارویی در گوشت حاصل از حیوانات از دلایل مهمی هستند که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها را در صنعت دام محدود می‌سازد. برای غلبه بر احتمال آلودگی به عفونت‌های متعدد به‌دنبال حذف آنتی‌بیوتیک‌ها از رژیم غذایی حیوانات، تلاش ها برای پیدا کردن روش‌های جایگزین به سمت استفاده از مکمل‌های غذایی طبیعی و کم خطرتر معطوف شده است (Griggs *et al.*, 2005).

یکی از باکتری‌هایی که باعث بروز و ایجاد خسارات زیاد به صنعت دام و طیور به‌خصوص صنعت طیور و پرورش مرغ می‌شود، باکتری *اشریشیا کولی* (*E. coli*) می‌باشد (Barnes *et al.*, 2008). *اشریشیا کولی* باعث ایجاد بیماری کلی‌باسیلوز در جوجه‌ها، بوقلمون‌ها و سایر گونه‌های مرغی می‌شود که منجر به کاهش بهره‌وری تولید در طیور و افزایش مرگ و میر در همه مراحل زندگی پرندگان می‌گردد (Barnes *et al.*, 2008; Lutful-Kabir, 2010; Bisaillon *et al.*, 1988; Sams, 2001). *اشریشیا کولی* می‌تواند تولیدات دامی از جمله تخم مرغ و گوشت را آلوده کرده و باعث ایجاد یک مسیر انتقال بیماری از دام به انسان شود (Johnson *et al.*, 2009) و بدینوسیله دارای پتانسیل ایجادکننده بیماری مشترک انسان و دام باشد (Moulin-Schouleur *et al.*, 2006; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005; Ewers *et al.*, 2007).

تماس *اشریشیا کولی* با بافت بدن میزبان باعث افزایش پروتئین‌های فاز حاد، ایجاد پاسخ التهابی و افزایش تولید سایتوکین‌های التهابی به‌ویژه فاکتور نکروزدهنده تومور (TNF-α) و فاکتور رونویسی (NF-κB) می‌گردد (*Helwig et al.*, 2006; *Teo et al.*, 2006; Demir *et al.*, 2007; Türközkan *et al.*, 2005). در شرایط التهاب، TNF-α باعث آزاد شدن طیفی از عوامل پیش‌التهابی از قبیل اینترلوکین-۱ (IL-1) و اینترلوکین-٦ (IL-6) می‌شود که به‌دنبال آن افزایش بیان آنزیم‌های سیکلواکسیژناز (COX) در سلول‌ها اتفاق افتاده و روند التهاب و استرس اکسیداتیو تشدید می‌گردد (Takimoto *et al.*, 2008). COX-1 در فیزیولوژی طبیعی سلول نقش بازی می‌کند در حالی‌که، COX-2 در شرایط پاتولوژیک از قبیل عفونت باکتریایی دخالت می‌کند (Gonzalez *et al.*, 2011). باکتری *اشریشیا کولی* همچنین می‌تواند باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش توان دفاع اکسیدانی بدن، افزایش نفوذپذیری عروق و تجمع پروتئین‌ها و مایعات در بافت و ادم سلولی گردد (Celik Shen *et al.*, 2010; *et al.*, 2007). این تغییرات (استرس اکسیداتیو و فرایند التهاب) نیز می‌تواند زمینه‌ساز بیماری‌های مختلفی در دام و انسان باشد.

گیاهان دارویی از هزاران سال پیش برای درمان بیماری‌های متعدد استفاده می‌شود و اخیراً علاقه روزافزونی به استفاده از این عوامل طبیعی در پیشگیری و یا درمان بسیاری از بیماری‌های حیوانی و انسانی ایجاد شده است (Chang-Liang *et al.*, 2011). یکی از این گیاهان دارویی پرکاربرد در طب سنتی، دارچین می

باشد (Perdones *et al*., 2014; Rao *et al*., 2014; Rieger *et al*., 2014). گزارش شده است که دارچین می‌تواند اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی از خود نشان داده و می‌تواند با کاربردهای بالقوه در تولید مرغ و ماکیان مطرح باشد. عصاره دارچین اثر بازدارندگی بر فعالیت *هلیکوباکتر پیلوری* در محدوده غلظتی مشابه با آنتی‌بیوتیک داشته و خواص ضدمیکروبی آن به طور عمده مربوط به محتوای سینامالدئید، اوژنول و محتویات کارواکرول آن دانسته شده است (Taback *et al*., 1999; Rieger *et al*., 2014). فعالیت ضدباکتریایی روغن دارچین علیه باکتری‌هایی از قبیل *اشریشیا کولی* (Chang *et al*., 2001; Griggs and Jacob, 2005) و خواص ضد قارچی آن علیه *آسپرژیلوس فلاووس* گزارش شده است (Montes-Belmont *et al*., 1998).

به‌خاطر اثرات ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی دارچین در بافت‌های مختلف می‌توان گفت که این ماده شاید بتواند عوارض ناشی از شرایط پاتولوژیک مثل عفونت و آلودگی به باکتری *اشریشیا کولی* در صنعت دام را کاهش دهد. از طرف دیگر، *اشریشیا کولی* حامل ضررهای اقتصادی و مرگ و میرهای متعدد در انسان و حیوانات به‌خصوص در طیور می‌باشد. بنابراین، در این مطالعه، اثرات عصاره دارچین بر تغییرات بیان ژن COX-2 کبدی و همچنین متغیرهای پروفایل لیپیدی سرم جوجه های گوشتی سالم و آلوده به *اشریشیا کولی* بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این مطالعه، ۹۰ قطعه جوجه گوشتی یک‌روزه با نژاد Ross-308 استفاده شد. رژیم‌های غذایی حیوانات بر اساس راهنمای سازمان بین المللی NRC انتخاب و برای سه دوره شامل رژیم غذایی آغازگر (۱ تا ۱۰ روزگی)، رژیم غذایی رشد (۱۱ تا ۲۱ روزگی) و رژیم غذایی پایانی (از روز ۲۲ تا زمان کشتار) تنظیم گردید (جدول ۱). جوجه‌ها دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند.

جدول ۱- میزان احتیاجات غذایی جوجه گوشتی نژاد راس ۳۰۸

دوره موادخوراکی (٪)	دوره آغازین (۱۰-۱)	دوره رشد (۲۱-۱۱)	دوره پایانی ۲۲ تا کشتار
گندم	٦٢/٣٧	٦٨/٩٢	٧٠/٩٦
کنجاله‌ی سویا	٢٩/٠٦	٢٢/٥٩	١٩/٩١
چربی طیور	٣	٣	٤
دی کلسیم فسفات	٢/٠٨	١/٥٤	١/٣٤
پودر صدف	١/١٨	١/٤٤	١/٣٨
نمک	٠/٣٥	٠/٣٥	٠/٣٥
مکمل ویتامینی ۱	٠/٢٥	٠/٢٥	٠/٢٥
مکمل معدنی ۲	٠/٢٥	٠/٢٥	٠/٢٥
DL- متیونین	٠/٢٤	٠/٢٧	٠/٢٧
لیزین منوهیدروکلراید	٠/٢١	٠/٢٣	٠/٢٩

ادامه جدول

دوره مواد خوراکی (٪)	دوره آغازین (۱۰-۱)	دوره رشد (۲۱-۱۱)	دوره پایانی ۲۲ تا کشتار
سالینومایسین	۰/۵	۰/۵	۰/۵
آنزیم آرابینوزایلاناز	۰/۵	۰/۵	۰/۵
ترکیبات محاسبه شده			
انرژی قابل متابولیسم (کیلو کالری در کیلوگرم)	۲۸۳٤	۲۸۹٤	۲۹۷۸
پروتیین (درصد)	۱۹/۹۵	۱۷/۸٦	۱٦/۹۲
کلسیم (درصد)	۰/۹۵	۰/۹	۰/۸۳
فسفر قابل دسترس (درصد)	۰/٤۷	۰/٤۵	۰/٤۱
سدیم (درصد)	۰/۱۷	۰/۱۷	۰/۱۷
پتاسیم (درصد)	۰/۸٤	۰/۷٤	۰/٦۹
کلر (درصد)	۰/۲٤	۰/۲٤	۰/۲٤
متیونین (درصد)	۰/۲۷	۰/۲٤	۰/۲۲
متیونین + سیستیین (درصد)	۰/۸۳	۰/۸	۰/۷۷
لیزین (درصد)	۱/۱٤	۱	۰/۹۸
تریپتوفان (درصد)	۰/۲۸	۰/۲٤	۰/۲۳

۱- هر ۲/۵ کیلوگرم مکمل ویتامینی نژاد راس حاوی مقادیر خالص ویتامین‌های زیر می‌باشد. ویتامین A، ۱۲۰۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین B1، ۴۰۰۰ میلی‌گرم؛ ویتامین B2، ۶۰۰۰ میلی‌گرم؛ ویتامین B3، ۱۸۰۰۰ میلی‌گرم؛ ویتامین B6، ۳۰۰۰ میلی‌گرم؛ ویتامین B12، ۱۵ میلی‌گرم؛ ویتامین D3، ۵۰۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین E، ۵۰۰۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین K3، ۳۰۰۰ میلی‌گرم؛ ویتامین B9، ۱۵۰۰ میلی‌گرم؛ ویتامینB5 (نیاسین)، ۷۰۰۰۰ میلی‌گرم؛ ویتامین H2، ۱۰۰ میلی‌گرم؛ کلین کلراید، ۴۰۰۰۰۰میلی‌گرم.

۲- هر ۲/۵ کیلوگرم مکمل معدنی نژاد راس حاوی مواد خالص زیر می‌باشد. منیزیم، ۱۲۰۰۰۰ میلی‌گرم؛ روی، ۱۰۰۰۰۰ میلی‌گرم؛ آهن، ۴۰۰۰۰ میلی‌گرم؛ مس، ۲۰۰۰۰ میلی‌گرم؛ ید، ۱۰۰۰ میلی‌گرم؛ سلنیوم، ۳۰۰ میلی‌گرم.

گروه‌بندی حیوانات و طرح آزمایش

جوجه‌های گوشتی به ٦ گروه، هرکدام با سه تکرار و ۵ جوجه در هر تکرار تقسیم‌بندی شدند:

گروه ۱: جوجه‌های سالم با رژیم نرمال (گروه کنترل)؛ گروه ۲: جوجه‌های سالم با رژیم نرمال به همراه عصاره دارچین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا (گروه NC100)؛ گروه ۳: جوجه‌های سالم با رژیم نرمال به همراه عصاره دارچین با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا (گروه NC200)؛ گروه ٤: جوجه‌های آلوده به *اشریشیا کولی* با رژیم نرمال (گروه *E.coli*)؛ گروه ۵: جوجه‌های آلوده به *اشریشیا کولی* با رژیم نرمال به همراه عصاره دارچین با دوز ۱۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم غذا (گروه NE100)؛ و گروه ٦: جوجه های آلوده به *اشریشیا کولی* با رژیم نرمال به همراه عصاره دارچین با دوز ۲۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم غذا (گروه NE200).

تمامی جوجه‌ها تا روز بیست و یکم با رژیم غذایی نرمال تغذیه شدند. پس از روز ۲۱، عصاره پودر شده دارچین در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذای حیوانات به جیره غذایی در گروه‌های مربوطه اضافه شد. سپس در روز ۳۲، مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری *اشریشیا کولی* با غلظت

10^8cfu/ml به‌صورت زیرجلدی به جوجه‌ها در گروه‌های مربوطه تزریق گردید و ۷۲ ساعت پس از انتهای دوره آزمایش، نمونه های خون از طریق ورید بالی حیوانات به‌دست آمده و به لوله‌های آزمایش انتقال داده شد. به‌علاوه، در تمامی گروه‌ها سر حیوانات تحت بیهوشی مختصری با دی‌اتیل اتر از بدن جدا شده و نمونه‌های بافت کبد از آنها تهیه و پس از انجماد در یخچال ۸۰- درجه سلسیوس تا زمان آزمایش نگه‌داری شدند.

تهیه عصاره دارچین

پوست درخت دارچین از بازار محلی در شهر تبریز، استان آذربایجان شرقی-ایران خریداری شد و پس از شناسائی و تائید علمی گونه مربوطه (*Cinnamomum zeylanicum*) توسط کارشناس، نمونه‌های گیاه به تکه‌های کوچکی خرد شده و در زیر سایه در دمای آزمایشگاه خشک گردید، سپس به‌خوبی پودر شد. عصاره‌گیری از گیاه از طریق خیساندن پودر حاصله (حدود ۳۵۰ گرم) با متانول ۹۹ درصد در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ٤٨ ساعت انجام گرفت. عصاره‌گیری سه بار تکرار شد و در نهایت حلال آن به‌طور کامل در خلأ تبخیر شده و عصاره خشک شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری گردید.

تهیه سوسپانسیون اشریشیا کولی

برای تهیه سوسپانسیون *اشریشیا کولی*، ابتدا ٢٤ ساعت قبل از انجام آزمایش، یک کلونی از کشت ذخیره باکتری به محیط کشت آگار شیب‌دار مغذی تلقیح گردید و به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، پس از رشد کشت مربوطه، کلونی‌های سطح آن با محلول نرمال سالین ۰/۹ درصد شسته شده و سوسپانسیون غلیظی از میکروب‌ها حاصل گردید. آنگاه به کمک پیپت پاستور استریل مقدار کمی از این سوسپانسیون غلیظ میکروبی، داخل لوله‌های درپیچ‌دار استریل ریخته شده و سپس با افزودن محلول نرمال سالین، سوسپانسیون غلیظ تا حدی رقیق گردید که در روش کدورت سنجی، میزان جذب (کدورت) سوسپانسیون در طول موج ۵۳۰ نانومتر اسپکتروفوتومتر با میزان کدورت محلول ۰/۵ مک فارلند برابر گردد. به این ترتیب، سوسپانسیونی با غلظت تقریبی cfu/ml 10^8به‌دست آمد که از آن در زمان تلقیح به جوجه‌ها استفاده شد.

اندازه‌گیری پروفایل لیپیدی در سرم

نمونه‌گیری‌های خون در انتهای آزمایش و قبل از جراحی از ورید بالی حیوانات انجام گرفت. نمونه‌های خون بلافاصله در ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و پلاسمای نمونه‌ها جدا شده و تا زمان اندازه‌گیری متغیرهای پروفایل لیپیدی به یخچال ۲۰- درجه سلسیوس منتقل شد. برای اندازه‌گیری مقادیر سرمی متغیرهای کلسترول، تری-گلیسرید و لیپوپروتئین با دانسیته بالا از کیت‌های اختصاصی موجود (پارس آزمون- ایران) استفاده گردید. میزان لیپوپروتئین با دانسیته پائین با استفاده از معادله فریدوالد (Friedewald) تخمین زده شد. مقادیر به‌دست آمده به صورت mg/ml گزارش شدند.

تعیین میزان بیان ژن COX-2 کبدی: Real-time PCR

برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن COX-2 در گروه‌های مورد مطالعه از روش Real-time PCR استفاده شد.

پس از جدا کردن نمونه‌های بافت کبد از جوجه‌ها و فریز و خشک کردن آنها در نیتروژن مایع، حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه حاصله برای استخراج RNAتام سلولی با استفاده از کیت استخراج ®RNATRIzol استفاده شد و غلظت RNA توسط اسپکتروفوتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ nm و ۲۸۰ nm سنجش شده و میزان خلوص آن تعیین شد. cDNA از ۲ میکروگرم از RNA توسط کیت AccuPower® RT PreMix (محصول شرکت Bioneer, Korea) به‌دست آمد. سنجش کمی بیان ژن Real-time PCR توسط کیت SYBR Premix Ex Taq (شرکت Takara, Shiga, Japan) انجام گرفت. مشخصات عملی و شرایط PCR به‌صورت $95^{\circ}C$ به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ سیکل در $94^{\circ}C$ به‌مدت ۲۵ ثانیه و $60^{\circ}C$ به‌مدت ۵۰ ثانیه بود. دستگاه Rotor-Gene TM (شرکت Corbett Life Science, Australia) برای انجام واکنش‌های PCR مورد استفاده قرار گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه برای ژن COX-2 شامل فوروارد -'5 CCCTTGGGTGTCAAAGGTAA-'3 و معکوس '5-GCCCTCGCTTATGATCTGTC-'3؛ و برای ژن بتا–اکتین به عنوان کنترل داخلی شامل فوروارد -'5 CCTGGAGGAGAGCTACGAG-'3 و معکوس-'5 TTCATGATGGAGTTGAAGGT-'3 بودند. بیان نسبی ژن COX-2 نسبت به بتا–اکتین به روش $2^{-(\Delta Ct)}$ محاسبه شد.

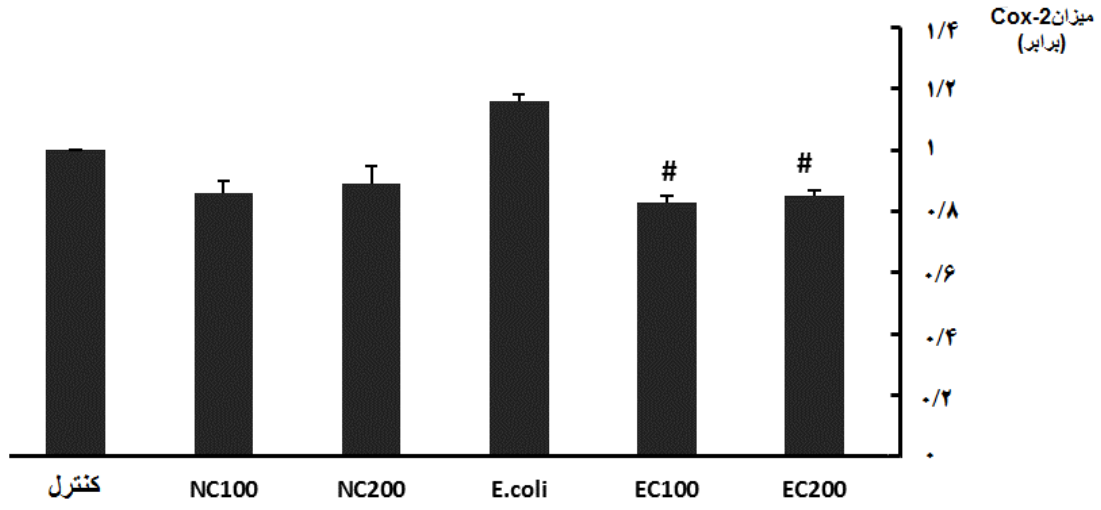
تحلیل آماری داده‌ها

تمامی داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار ارائه شدند. تفاوت متغیرها در بین گروه‌های مختلف توسط روش آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و در صورت معنی‌داری از تست تعقیبی توکی (Tukey)استفاده شد و $p<0/05$ به عنوان تغییر معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر عصاره دارچین بر میزان بیان ژن COX-2 کبدی در گروه‌های مختلف

نتایج PCR نشان داد که تزریق *اشریشیا کولی* منجر به افزایش بیان این ژن در مقایسه با جوجه‌های گوشتی سالم گردید ($p<0/05$). در گروه‌های NC100 و NC200 که در آنها دو دوز مختلف ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره دارچین در هر کیلوگرم غذای جوجه‌ها اضافه شد، میزان بیان COX-2 با بیان آن در گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. با وجود این، در جوجه‌های گوشتی آلوده به *اشریشیا کولی* مشاهده شد که دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم دارچین باعث کاهش معنی‌دار در بیان ژن COX-2 کبدی در مقایسه با گروه *اشریشیا کولی* فاقد درمان گردید ($p<0/05$). هم‌چنین، مشاهده شد که اثر کاهش‌دهندگی هر دو دوز تقریباً مشابه هم بوده و تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (نمودار ۱).



نمودار ۱- تغییرات میزان بیان ژن COX-2 کبدی در بین گروه‌های مختلف. # $p<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه *اشریشیا کولی* (*E. coli*). NC: رژیم نرمال به همراه دارچین (با دوز ۱۰۰ یا ۲۰۰ mg/kg)؛ EC: رژیم نرمال به همراه دارچین (با دوز ۱۰۰ یا ۲۰۰ mg/kg) در جوجه های آلوده به *E. coli*

اثر عصاره دارچین بر پروفایل لیپیدی سرم در گروه‌های مختلف

مقادیر متغیرهای پروفایل لیپیدی شامل کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL و HDL در سرم جوجه‌های گوشتی سالم و آلوده به باکتری *اشریشیا کولی* در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اگرچه تزریق *اشریشیا کولی* غلظت پارامترهای پروفایل لیپیدی را تغییر داد اما افزایش سطح تری‌گلیسرید در گروه *اشریشیا کولی* در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). به‌علاوه، اضافه نمودن دارچین به غذای جوجه‌ها توانست سطح تری گلیسرید افزایش یافته را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه *اشریشیا کولی* کاهش دهد ($p<۰/۰۵$). همچنین در مورد تغییرات سایر پارامترهای پروفایل لیپیدی، تجویز دارچین در جوجه‌های سالم و *آلوده به اشریشیا کولی*، سطح کلسترول و لیپوپروتئین با دانسیته پایین را کاهش و سطح لیپوپروتئین با دانسیته بالا را افزایش داد، اما این تغییرات از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (جدول ۲).

جدول ۲- مقادیر میانگین متغیرهای پروفایل لیپیدی در گروه‌های مختلف آزمایش

گروه‌ها	CHOL (mg/dl)	TG (mg/dl)	LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)
کنترل	۱۲٦±۷	٤۷۱±٤	۱٥٦±۲	۲۹±۳
NC100	۱۲٤±۳	٤٥۱±٥	۱٥۰±۸	۳۳±۸
NC200	۱۲۰±٥	٤۲۱±۸	۱٤۷±۹	۳۳±۱۱
E.coli	۱٤۱±۸	٥۹۱±٥ *	۱٦٥±۳	۲٥±٦
EC100	۱۳٥±٦	٥۱۱±٤ #	۱٦۰±۷	۲٦±۸
EC200	۱۲۷± ۳	٤۷۱±٦ #	۱٥٤±۹	۲۸±٤

داده‌ها بصورت میانگین± انحراف معیار گزارش شده‌اند. *: $p<۰/۰٥$ در مقایسه با گروه کنترل؛ و #: $p<۰/۰٥$ در مقایسه با گروه *اشریشیا کولی* (*E. coli*). CHOL: کلسترول، TG: تری گلیسرید، LDL: لیپوپروتئین با دانسیته کم و HDL: لیپوپروتئین با دانسیته بالا. NC: رژیم نرمال به همراه دارچین؛ EC: رژیم نرمال به همراه دارچین در جوجه های آلوده به *E. coli*.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، اثر عصاره دارچین بر میزان بیان ژن COX-2 کبدی و تغییرات پروفایل لیپیدی پلاسمای جوجه‌های گوشتی سالم و آلوده به باکتری *اشریشیا کولی* بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که جوجه‌های آلوده به باکتری *اشریشیا کولی* میزان بیان این ژن پیش-التهابی و مارکر استرس اکسیداتیو کبدی را افزایش داد. پیش‌درمانی با دارچین در جوجه‌های سالم تاثیر معنی‌داری بر پروفایل لیپیدی یا بیان ژن نداشت و با وجود این، تیمار جوجه‌های آلوده به *اشریشیا کولی* با عصاره دارچین در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذای حیوانات، توانست سطح بیان ژن COX-2 و برخی از پارامترهای پروفایل لیپیدی (تری‌گلیسرید) را کاهش دهد.

هلویگ و همکاران در سال ۲۰۰٥ و تورکوزکان و همکاران در سال ۲۰۰٦ گزارش کرده‌اند که آلودگی بدن میزبان با باکتری *اشریشیا کولی* باعث ایجاد واکنش‌هایی مثل پاسخ‌های التهابی و افزایش سطح سیتوکاین‌هایی نظیر TNF-α و فاکتور نسخه‌برداری NF-kB می‌گردد که این‌ها نیز به نوبه خود منجر به بیان ژن سیتوکاین‌های التهابی مثل IL-1b، IL-2، IL-5، و IL-12 می‌شوند (Helwig *et al*., 2006; Türközkan *et al*., 2005). هم‌چنین، سلیک در سال ۲۰۰۷ و شن در سال ۲۰۱۰ مشخص کردند که آلودگی با *اشریشیا کولی* منجر به القاء استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی شده و بدینوسیله آسیب‌های بافتی و اثرات مضر بعدی این باکتری ایجاد می‌گردد (Celik *et al*., 2007; Shen *et al*., 2010).

مطالعات گذشته مشخص کرده‌اند که دارچین دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدباکتریایی می‌باشد (Stefan *et al*., 2009). گزارش شده است که عصاره دارچین واجد اثرات ضد میکروبی علیه *اشریشیا کولی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *انتروکوکوس فکالیس*، *استافیلوکوکوس آرئوس*، *کلبسیلا پنومونی* و سالمونلا می باشد (Perdones *et al*., 2014; Chang *et al*., 2001; Griggs and Jacob, 2005). به‌علاوه، پیشنهاد

شده است که دارچین فعالیت فاگوسیتی ماکروفاژها را تقویت کرده و بدینوسیله نقش مهمی در سیستم دفاعی ایمنی بدن بازی می‌کند. روغن‌های دارچین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی در جوجه‌های با وزن بالا داشته و عصاره آن می‌تواند اثرات محافظتی بر بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو در انسان داشته باشد (Stefan, 2009; Rao *et al*., 2014; Rieger *et al*., 2014).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دارچین سطح پروفایل لیپیدی را در جوجه های سالم چندان تغییر نمی‌دهد و این یافته تا حدودی با مطالعات قبلی مطابقت دارد به‌طوری‌که، باکر و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش کرده‌اند که به‌نظر نمی‌رسد دارچین بر سطح پایه پارامترهای پروفایل لیپید سرم تاثیر معنی‌داری داشته باشد (Baker, *et al*., 2008). در مطالعه مشابهی نیز وفا و همکاران در سال ۲۰۱۲ نتیجه‌گیری کرده‌اند که دارچین می‌تواند سطح قند خون را کاهش دهد اما تاثیر معنی‌داری بر پروفایل لیپیدی ندارد (Vafa *et al*., 2012). از طرف دیگر، در مطالعه‌ای مغایر با نتایج فوق، تجویز دارچین به موش‌های صحرایی هیپرکلسترولمیک توانسته است که سطح پروفایل لیپیدی را نسبت به گروه کنترل کاهش دهد (Rahman *et al*., 2013). بنابراین، چنین می‌توان استنتاج کرد که دارچین احتمالاً بر سطح پایه پروفایل لیپیدی خون تاثیر زیادی ندارد اما این عصاره می‌تواند باعث کاهش سطح افزایش یافته پارامترهای پروفایل لیپیدی در شرایط پاتولوژیکی مثل هیپرکلسترولمی گردد. در تائید این فرضیه، در مطالعه حاضر مشاهده شد که پیش‌درمانی با دارچین در جوجه‌های آلوده به *اشریشیا کولی* توانست به‌طور معنی‌داری از افزایش سطح تری‌گلیسرید سرم ناشی از تزریق *اشریشیا کولی* جلوگیری کرده و سطح این پارامتر را کاهش دهد، هرچند که تاثیر عصاره بر سایر پارامترهای لیپیدی اندک بود. این موضوع می‌تواند به دوره حاد آلودگی به *اشریشیا کولی* مربوط باشد که در این دوره کوتاه فرصت تغییرات پارامترهای خونی اندک بوده و برای مشاهده تغییرات به دوره زمانی بیشتری نیاز است. لازم به ذکر است که این مورد در مطالعه حاضر به عنوان یکی از محدودیت های مطالعه، بررسی نشده است. دارچین در شرایط هیپرلیپیدمی می‌تواند یک نقش مستقیم در متابولیسم لیپیدی و کاهش سطح لیپیدهای سرمی داشته باشد و از طریق افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی کبدی میزان پراکسیداسیون لیپیدی را نیز کاهش دهد (Rahman *et al*., 2012).

افزایش سطح واسطه‌های التهابی و استرس اکسیداتیو به‌دنبال آلودگی با *اشریشیا کولی* باعث صدمه به غشای سلول و واکنش‌های آپوپتوزی می‌شود که در سرنوشت بقاء یا مرگ سلولی نقش مهمی ایفا می‌کنند. در مطالعه حاضر، ما دیدیم که پیش‌درمانی جوجه‌ها با دارچین از طریق افزودن آن در رژیم غذایی به‌طور معنی‌داری از افزایش بیان ژن اکسیداتیو و پیش التهابی COX-2 کبدی ناشی از تزریق باکتری *اشریشیا کولی* جلوگیری کرد. بنابراین، تغذیه جوجه‌ها با عصاره دارچین می‌تواند بافت‌های حیوان را در برابر تاثیرات مضر ناشی از آلودگی به *اشریشیا کولی* محافظت کند. می‌توان گفت که این یافته در توافق با نتایج مطالعات گذشته می باشد به‌طوری‌که، دارچین و ترکیب سینامالدئید آن سطح بیان و فعالیت COX-2 در ماکروفاژهای موش‌های صحرایی دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکاریدها را مهار کرده است (Liao *et al*., 2012). همچنین، چانگ و همکاران در

سال ۲۰۱۱ در مطالعات خود دریافتند که عصاره متانولی پوست درخت دارچین اثر آنتی‌اکسیدانی خود را از طریق مهار مواد مختلفی مثل TNF-α اعمال می‌کند (Chang *et al*., 2011). یوان و همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز نتایج مشابهی را از تجویز دارچین و ترکیبات موجود در آن به موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین گزارش کرده اند (Yuan *et al*., 2011). به‌علاوه، تجویز خوراکی عصاره دارچین در موش از توسعه و پیشرفت بیماری کولیت از طریق تولید سلول‌های ارایه‌دهنده آنتی‌ژن و تولید سایتوکاین ضدالتهابی اینترلوکین ۱۰ و همچنین از طریق خاصیت ضدالتهابی قوی این عصاره با مهار تولید COX-2 در رده سلول‌های ماکروفاژ موش ممانعت کرده است (Kwon *et al*., 2011).

بر اساس یافته‌های این مطالعه، آلودگی حاد با باکتری در جوجه‌ها توانست بیان ژن COX-2 کبدی را تحریک کرده و برخی از شاخص‌های پروفایل لیپیدی سرم مثل تری‌گلیسرید را افزایش دهد. پیش‌درمانی جوجه‌ها با عصاره دارچین در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذای حیوانات توانست از تغییرات ناشی از تزریق *اشریشیا کولی* در میزان بیان ژن COX-2 کبدی و پروفایل لیپیدی (تری‌گلیسرید) در سرم جوجه‌های گوشتی جلوگیری کند. هم‌چنین تغییرات مشاهده شده در هر دو دوز دارچین مشابه هم بوده و لذا اثرات دارچین در موارد مذکور وابسته به دوز نمی‌باشد. به‌دلیل پتانسیل ضدالتهابی و آنتی‌اکسیداتیو دارچین و فعالیت تعدیل‌کنندگی آن روی سیستم ایمنی بدن به‌واسطه داشتن ترکیباتی مثل سینامالدئید و دیترپن‌ها که می‌توانند اثرات ضد آلرژی و ضد باکتریایی نیز داشته باشند (Rieger *et al*., 2014)، می‌توان نتیجه گرفت که دارچین می‌تواند به عنوان یک ماده مفید در کاهش سمّیت ناشی از شرایط پاتولوژیک مثل آلودگی به *اشریشیا کولی* در دام و انسان مطرح شود.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز برای تامین مالی تحقیق حاضر تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید.

منابع

- Baker, W.L., Gutierrez-Williams, G., White, M., Kluger, J. and Coleman, C.I. (2008). Effect of Cinnamon on Glucose Control and Lipid Parameters. Diabetes Care, 31: 41-43.
- Barnes, H.J., Nolan, L.K. and Vaillancourt, J.P. (2008). Diseases of Poultry. 12th ed., Amsterdam: Blackwell Publishing, pp: 691-732.
- Bisaillon, J.R., Meek, A.H. and Feltmate, T.E. (1988). An assessment of condemnations of broiler chicken carcasses. Canadian Journal of Veterinary Research, 52: 269-276.
- Celik, S., Gorur, S., Aslantas, O., Erdogan, S. and Ocak, S. (2007). Caffeic acid phenethylester suppresses oxidative stress in *Escherichia coli*-induced pyelonephritis in rats. Molecular and Cellular Biochemistry, 297: 1-2.
- Chang, S.T., Chen, P.F. and Chang, S.C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from Cinnamomun osmophloeum. Journal of Ethnopharmacology, 77: 123-127.

- Chang-Liang, H.E., Ben-Dong, F.U. and Hai-Qing, S. (2011). Xiang-Qi-Tang Increases Avian Pathogenic *Escherichia coli*-Induced Survival Rate and Regulates Serum Levels of Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin-1 and Soluble Endothelial Protein C Receptor in Chicken. Biological Pharmacy, 34(3): 379-382.
- Demir, M., Sert, S. and Kaleli, I. (2007). Liver lipid peroxidation in experimental *Escherichia coli* peritonitis: the role of myeloperoxidase and nitric oxide inhibition. Medical Science Monitoring, 10: 225-229.
- Ewers, C., Li, G. and Wilking, H. (2007). Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? International Journal of Medical Microbiology, 297(3): 163-176.
- Gonzalez, D., Mustacich, D.J., Traber, M.G. and Cherian, G. (2011). Early feeding and dietary lipids affect broiler tissue fatty acids, vitamin E status, and cyclooxygenase-2 protein expression upon lipopolysaccharide challenge. Poultry Sciences, 90 (12): 2790-2800.
- Griggs, J.P. and Jacob, J.P. (2005). Alternatives to Antibiotics for Organic Poultry Production. Journal of Applied Poultry Research, 14:750-756.
- Helwig, K., Lammers, M. and Rizzello, F. (2006). Massimo Campieri Lactobacilli, bifido bacteria and *E.coli* nissle induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. World Journal of Gastroenterology, 12: 5978-5986.
- Johnson, T.J., Logue, C.M. and Wannemuehler, Y. (2009). Examination of the source and extended virulence genotypes of *Escherichia coli* contaminating retail poultry meat. Foodborne Pathogens and Disease, 6(6): 657-667.
- Kwon, H.K., Hwang, J. and Lee, C.G. (2011). Cinnamon extract suppresses experimental colitis through modulation of antigen-presenting cells. World Journal of Gastroenterology, 8: 976-986.
- Liao, J., Deng, J., Chiu, C.H. and Hou, W. (2012). Anti-Inflammatory activities of Cinnamomum cassia constituents In Vitro and In Vivo. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 3: 1-12
- Lutful-Kabir, S.M. (2010). Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. International Journal of Environmental Research and Public Health, 7(1): 89-114.
- Montes-Belmont, R. and Carvajal, M. (1998). Control of Aspergillus flavus in maize with plant essential oils and their components. Journal of Food Protection, 61: 616-619.
- Moulin-Schouleur, M., Schouler, C. and Tailliez, P. (2006). Common virulence factors and genetics relationships betweenO18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. Journal of Clinical Microbiology, 44(10): 3484-3492.
- Perdones, Á., Vargas, M., Atarés, L. and Chiralt, A. (2014). Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan–cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. Food Hydrocolloids, 36: 256-264.
- Rahman, S., Begum, H. and Rahman, Z. (2013). Effect of Cinnamon (Cinnamomum cassia) as a Lipid Lowering Agent on Hypercholesterolemic Rats. Journal of Enam Medical College, 3(2): 94-98.
- Rao, P.V. Gan, S.H. (2014). Cinnamon: A multifaceted medicinal plant. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014: 1-12.
- Rieger, K.A. and Schiffman, J.D. (2014). Electrospinning an essential oil: Cinnamaldehyde enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly (ethylene oxide) nanofibers. Carbohydrate Polymers, 113: 561-8.
- Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Fakhr, M.K. and Nolan, L.K. (2005). Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. Microbiology, 151: 2097-2110.
- Sams, A.R. (2001). Poultry Meat Processing. 1th ed., USA: New York, CRC Press, pp: 19-34.

- Shen, Y.B., Piao, X.S., Kim, S.W., Wang, L. and Liu, P. (2010). The effects of berberine on the magnitude of the acute inflammatory response induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in broiler chickens. Poultry Sciences, 89:13-19.
- Stefan, F., Zita, F., Iveta, P. and Juraj, K. (2009). Effect of Cinnamomum zeylanicum Essential Oil on antioxidative status in broiler chickens. Acta Veterinaria Brno, 78: 411-417.
- Taback, M., Armon, R. and Neeman, I. (1999). Cinnamon extracts inhibitory effect on Helicobater pylori. Journal of Ethnophamacoology, 67: 269-277.
- Takimoto, T., Sato, K., Akiba, Y. and Takahashi, K. (2008). Role of Chicken TL1A on Inflammatory Responses and Partial Characterization of Its Receptor. Journal of Immunology, 180: 8327-8332.
- Teo, A.L. and Tan, H.M. (2006). Effect of Bacillus subtilis PB6 on Broilers Infected with a Pathogenic Strain of *Escherichia coli*. Journal of Applied Poultry Research. 15:229-235.
- Türközkan, N., Seven, I., Erdamar, H. And Cimen, B. (2005). Effect of vitamin A pretreatment on *Escherichia coli*-induced lipid peroxidation and level of 3-nitrotyrosine in kidney of guinea pig. Molecular and Cellular Biochemistry, 278(1-2): 33-37.
- Vafa, M., Mohammadi, F. and Shidfar, F. (2012). Effects of Cinnamon Consumption on Glycemic Status, Lipid Profile and Body Composition in Type 2 Diabetic Patients. International Journal of Preventive Medicine, 3(8): 531-536.
- Yuan, H.D., Huang, B. and Chung, S.H. (2011). Protective effect of Cinnamaldehyde on streptozotocin-induced damage in rat pancreatic β-cells. Food Science Biotechnology, 5: 1271-1276.

Effect of Cinnamon extract on COX-2 gene expression level in liver and lipid profile alterations in serum of healthy broiler chickens and those infected with *E. coli*

Tabatabaei, S.M.[1*], Badalzadeh, R.[2,3], Mohammadnezhad, R.[2], Yousefi, B.[2]

1- Department of Physiology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2- Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
3- Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
*Corresponding author's email: smt@iaut.ac.ir
(Received: 2015/7/6 Accepted: 2015/9/21)

Abstract

The use of herbal medicine instead of antibiotics for treatment of livestock and poultry disease could have many beneficial implication due to their multiplex activities. This study has investigated the effects of cinnamon extract on cyclooxygenase-2 (COX-2) gene expression level in liver and lipid profile alterations in serum of healthy and Escherichia coli infested broiler chickens. Ninety Ross-308 broilers in healthy or E.coli-infected groups were received normal diet or diet supplemented with cinnamon extract in concentrations of 100 or 200 mg/kg of diet. E. coli suspension (10^8cfu/ml) was injected subcutaneously after 12 days of cinnamon administration. Seventy-two hours after E. coli injection, blood samples were taken for analysis of lipid profile alterations in serum, and then liver tissue samples were obtained for detection of COX-2 gene expression using real-time PCR. Infection with E. coli significantly decreased the levels of COX-2 gene expression as well as some variables of lipid profile including triglyceride level as compared with the control group (p<0.05). Pre-administration of cinnamon extract in broilers diet (in both concentrations) significantly reduced the tissue levels of COX-2 gene expression and triglyceride levels in serum of broiler chickens infected with E. coli in comparison with E. coli-alone group (p<0.05). The cinnamon extract could not induce statistically significant effects on the tested parameters in healthy broilers. Thus, pre-administration of cinnamon extract in diets of broiler chickens may be capable of reducing the inflammatory and oxidative injuries induced by pathologic conditions such as infection with E. coli.

Key words: *Escherichia coli*, Lipid profile, Broiler chickens, Cinnamon.