اثر عصاره آویشن شیرازی و پروبیوتیک بر بیان ژن فاکتورهای رشد شبه انسولینی و گیرنده‌های آن‌ها در کبد جوجه‌های گوشتی

علی معتمدی مطلق[1]، وهاب باباپور[1*]، زربخت انصاری پیرسرائی[2] و نریمان شیخی[1]

تاریخ دریافت:۱۳۹۴/۰۶/۳۱
تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۰/۰۲

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی اثر عصاره آویشن شیرازی و پروبیوتیک بر مقدار بیان نسبی ژن فاکتورهای رشد شبه انسولینی نوع اول و دوم و بیان نسبی ژن گیرنده‌های این فاکتورها در بافت کبد پرنده به عنوان شاخص‌های بیولوژیک رشد، در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. از نظر برنامه غذایی، جیره‌های مورد استفاده از نظر اجزاء و ترکیب شیمیایی کاملا یکسان بوده و فقط از نظر به کارگیری عصاره آویشن و یا پروبیوتیک متفاوت بودند. ضمنا در کل دوره ۴۲ روزه پرورش در هیچ گروهی از آنتی بیوتیک استفاده نشد.این پژوهش با ۱۰۸ قطعه جوجه خروس گوشتی نژاد راس در ۳ تیمار انجام شد. هر گروه آزمایشی دارای ۳ تکرار بوده که در هر تکرار نیز ۱۲ قطعه جوجه قرار داشت. در سن ۴۲ روزگی (پایان دوره پرورش) از هر واحد آزمایشی دو قطعه پرنده با وزنی نزدیک به میانگین وزن هر پن انتخاب و پس از ثبت مشخصات، به منظور استخراج بافت کبد برای اندازه گیری بیان نسبی ژن‌های مذکور بلافاصله کشتار شدند. این پژوهش نشان داد که مصرف عصاره آویشن شیرازی و نیز پروبیوتیک، تأثیر معنی داری بر بیان ژن فاکتورهای رشد شبه انسولینی و نیز بیان ژن گیرنده‌های آن در بافت کبد جوجه خروسهای گوشتی نداشت اما مصرف پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد و همچنین گروهی که عصاره آویشن شیرازی دریافت کرده بودند، به شکل معنی داری باعث افزایش بیان نسبی ژن رسپتورهای فاکتورهای رشد شبه انسولینی شد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، فاکتورهای رشد شبه انسولینی، پروبیوتیک، آویشن شیرازی، جوجه گوشتی

---

۱. دانشکده دامپزشکی- واحد علوم و تحقیقات- تهران
۲. دانشکده علوم دامی- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی- ساری
* عهده دار مکاتبات: (babapour@ut.ac.ir)

مقدمه

در سال‌های اخیر، پرورش مرغ گوشتی با توجه به نقش و اهمیت خاصی که در تأمین پروتئین حیوانی مورد نیاز انسان دارد رشد چشمگیری داشته و به صنعت بزرگی تبدیل شده است. استفاده از آنتی بیوتیک‌ها به دلیل به وجود آمدن سویه‌های مقاوم باکتریایی و امکان انتقال این مقاومت به انسان و به هم زدن فلور طبیعی دستگاه گوارش، مشکلات جدی در بهداشت عمومی و دامی ایجاد کرده و موجبات نگرانی مصرف کنندگان را فراهم ساخته است لذا متعاقب ضرورت محدودیت مصرف بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها و داروهای بهبود دهنده رشد، ترکیبات فیتوژنیک و همچنین پروبیوتیک‌ها درسطح گسترده مورد ارزیابی و به کارگیری قرارگرفته شده است (۷،۸،۲۳،۲۴). عصاره‌های گیاهی با تحریک حس بویایی و چشایی موجب افزایش اشتها شده در ضمن با افزایش ترشحات گوارشی و تحریک فعالیت‌های آنزیمی و سهولت مکانیزم‌های حمل و نقل موجب افزایش جذب مواد غذایی می‌شود. ضمنا این مواد نقش به سزایی در مهار رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها و تثبیت فلور میکروبی دستگاه گوارش هم ایفا می‌کند (۲۳). از مهم ترین عصاره‌های به کارگرفته شده در تغذیه دام و طیور می‌توان از آویشن نام برد که با توجه به وجود ترکیبات موجود در آن چون تیمول، موجب تحریک رشد و کاهش ضریب تبدیل غذا و اثرات مثبت دیگر چون خاصیت آنتی اکسیدانی می‌شود (۱۸و۱۹). در رابطه با آویشن باغی(*Thymus Volgaris*) اطلاعات زیادی در دسترس است. ازدیگر گونه قابل ذکر این گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) از خانواده نعناعیان می‌باشد (۱).

امروزه استفاده از پروبیوتیک‌ها به علت بهبود فلور میکروبی روده، کاهش مقدار وقوع اسهال، افزایش سطح ایمنی، توان رقابت با باکتری‌های پاتوژن، ایجاد مقاومت در برابراسترس و تولید برخی از آنزیم‌ها در صنعت پرورش طیور در حال گسترش است. افزودن بسیاری از این میکروارگانیسم‌ها موجب افزایش وزن در هفته‌های اول پرورش در جوجه‌های گوشتی می‌شود. ضمنا مصرف این مواد موجب کنترل عوامل پاتوژن در دستگاه گوارش طیور شده از این رو در بهبود عملکرد تغذیه‌ای طیور همچنین افزایش اخذ غذا و بهبود ضریب تبدیل غذا و در نتیجه افزایش وزن بدن آنها موثر واقع می‌شود. (۱۷و۳۱). Nurmi و Rantala (۱۹۷۳)، با ارائه فرضیه حذف رقابتی (Competitive exclusion)، در سال‌های نخستین دهه ۷۰ میلادی سعی در اقدامی موثر در کنترل عفونت‌های سالمونلایی در مرغ‌های گوشتی داشته است اما مشخص شد بکارگیری پروبیوتیک‌ها موجب محافظت در برابر عفونت‌های باکتریایی و حتی افزایش رشد می‌شود (۴، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۲۷و ۳۳)

از اولین محصولات تجاری ساخته شده حاصل از این فرضیه Broilact بود که در شرکت Orion در فنلاند ساخته شد و از سال ۱۹۸۷ تا ۱۹۹۴ بصورت مایع در فنلاند و سوئد تولید می‌شد و از آن پس تا کنون به شکل پودر منجمد به بازار ارائه می‌شود. در واقع Broilact مخلوطی از ۳۲ نوع باکتری انتخاب شده از محتویات سکوم مرغ بالغ سالم بوده که قابلیت اتصال به غشای روده را دارند. (۲۷و۳۱).

علاوه برخواص حذف رقابتی Broilact مشخص شد این میکروارگانیسم‌ها با تولید اسیدهای چرب فرار عرصه را برای فعالیت باکتری‌های پاتوژن چون سالمونلا تنگ می‌کنند. ضمنا Schneitz و همکاران (۱۹۹۸)، نشان دادند که مصرف این پروبیوتیک ضمن کاهش تلفات جوجه‌ها موجب افزایش قابلیت هضم مواد آلی و افزایش میزان ابقاء مواد ازته و نهایتا بهبود ضریب تبدیل و افزایش رشد شده است که قسمتی از این بهبود کارایی را مربوط به افزایش تخمیر در محتویات روده دانستند. ضمنا با به کارگیری پروبیوتیک با توجه به عملکرد حذف رقابتی، موجبات لانه گزینی سریع فلور سالم و کامل در بدو زندگی جوجه‌ها را فراهم کرده و با تشکیل پوشش حفاظتی مانع اتصال باکتری‌های پاتوژن به غشای روده می‌شوند (۲۶).

فاکتورهای رشد شبه انسولینی نوع اول و دوم (IGF- I و IGF- II) ترکیباتی پلی پپتیدی بوده و از نظر ساختمانی و عملکردی شباهت‌هایی به هورمون انسولین دارد. البته این فاکتورهای رشد در گونه‌های مختلف پرندگان در مقایسه با پستانداران، هم از نظر تعداد و هم از نظر توالی اسیدهای آمینه متفاوتند. این هورمون‌ها در کنار هورمون رشد، هورمون‌های تیروئیدی و هورمون انسولین نقش مهمی در رشد جانوران ایفا می‌کنند (۱۶).

تحقیقات نشان می‌دهد بسیاری از اعمال هورمون رشد در پرندگان به مانند پستانداران به واسطه‌ی فاکتورهای رشد شبه انسولینی صورت می‌گیرد (لی ۲۰۰۵). از جمله این اعمال، افزایش متابولیسم گلوکز و اسیدهای آمینه، سنتز DNA، تکثیر سلول‌های مختلف بدن و ضمنا تنظیم رشد می‌باشد (۲۱).

بر خلاف دوران جنینی که mRNA و مراحل سنتز این فاکتورهای رشد در بافت مغز، چشم و استخوان‌های پرندگان مشاهده شده، پس از هچ، سلول‌های کبد و تا حدودی سلول‌های قلب بیشترین نقش را در تولید این هورمون‌ها به عهده دارند (۱۶و ۲۹).

عملکرد فاکتورهای رشد شبه انسولینی به خاطر تأثیرات این هورمون‌ها بر گیرنده‌های اختصاصی اشان (IGF- Receptors) که روی سطح اغلب سلول‌های جانوری دیده می‌شود صورت می‌گیرد. طبق مطالعات به عمل آمده در مقایسه با پستانداران هیچ مدرکی دال بر وجود رسپتورهای IGF- II در جوجه‌ها در دست نیست و IGF- II به مانند فاکتور رشد شبه انسولینی نوع یک با تأثیر بر IGF- I R نقش خود را بازی می‌کند. این گیرنده‌ها به دسته بزرگی از رسپتورها موسوم به تیروزین کیناز تعلق دارد که گیرنده‌های انسولینی نیز در این گروه قرار می‌گیرند فعال شدن این رسپتورها موجب توسعه و هایپرتروفی سلول‌هایی چون عضلات اسکلتی و دیگر بافت‌های هدف می‌شود (۲۱).

با توجه به اینکه تاکنون تحقیقات گسترده‌ای پیرامون بررسی تأثیرات مستقیم عصاره آویشن و همچنین پروبیوتیک مورد نظر بر سیستم آندوکرینی و خصوصا فاکتورهای رشد شبه انسولینی و رسپتورهای آن‌ها که تأثیرات مهمی در متابولیسم و رشد جوجه‌ها بر جای می‌گذارند صورت نگرفته است، و نظر به اینکه بیان ژن، گام نخست در سنتز هر ماده مثل هورمون‌های مورد مطالعه در این تحقیق می‌باشد در این پژوهش سعی شده تأثیرات

عصاره آویشن شیرازی و پروبیوتیک بر بیان ژن IGF- I و IGF- II و IGF- I R در کبد جوجه خروس‌های گوشتی بررسی شود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در مجتمع کشت وصنعت آراست شهرستان آمل انجام شد. کلیه برنامه‌های بهداشتی و مدیریتی بر اساس موازین بهداشتی اداره کل دامپزشکی استان مازندران و اصول و مقررات این مرکز انجام گرفت. در ابتدای ورود جوجه‌ها به داخل سالن پرورش، جوجه‌ها تعیین جنسیت شده و خروس‌ها برای انجام آزمایش انتخاب شدند. سپس جوجه‌ها به صورت انفرادی وزن کشی و جوجه‌های با وزن حدود ۴۴/۵ گرم انتخاب و بصورت تصادفی در درون پن‌ها قرار داده شدند. واکسیناسیون بر طبق برنامه واکسیناسیون منطقه اجرا شد. در این بررسی از برنامه نوردهی دائمی استفاده شد. از پوشال چوب به عنوان بستر در درون پن‌ها استفاده گردید و به منظور جلوگیری از انتقال بستر و تماس جوجه‌های پن‌های مجاور با همدیگر، میان پن‌ها صفحات پلاستیکی قرار داده شد. کارگر نیز به جز در موارد ضروری وارد واحدهای آزمایشی نمی شد و در صورت نیاز برای ورود به درون پن‌ها برای هر واحد آزمایشی چکمه جداگانه فراهم شده بود.. در کل دوره ۴۲ روزه پرورش در هیچ گروهی از آنتی بیوتیک استفاده نشد. ضمنا تعداد تلفات هر واحد آزمایشی به صورت روزانه ثبت شد.

این پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تیمار و سه تکرار و دوازده مشاهده در هر تکرار انجام شد ازاین رو ۹ واحدآزمایشی که در هر واحد ۱۲ قطعه جوجه خروس گوشتی یک روزه نژاد راس (مجموعا ۱۰۸ قطعه) به طور تصادفی در قفس‌ها قرار داده شد.

تیمارهای آزمایشی شامل:

تیمار۱ (تیمار شاهد) : جیره پایه.

تیمار۲: جیره پایه + عصاره آویشن شیرازی

تیمار۳ : جیره پایه + پروبیوتیک

نیازهای تغذیه ای بر اساس توصیه NRC (۱۹۹۴) و بر اساس سه مرحله آغازین (یک تا۲۱ روزگی)، رشد (۲۲ تا ۳۵ روزگی) و پایانی (۳۵ تا ۴۲ روزگی) تنظیم شد (جداول ۱ و۲). جیره‌های مورد استفاده از نظر اجزا و ترکیب شیمیایی کاملا یکسان بوده و فقط از نظر به کارگیری عصاره آویشن و یا پروبیوتیک متفاوت بودند. در سن ۴۲ روزگی از هر واحد آزمایشی دو قطعه پرنده با وزنی نزدیک به میانگین وزن هر پن انتخاب و به منظور استخراج بافت کبد بلافاصله کشتار و در حد انجام آزمایش‌های مرتبط با آنالیز بیان ژن، دو نمونه بافت کبد از هر تکرار بلافاصله در دمای ۱۸۰- درجه سلسیوس به آزمایشگاه ارسال گردید و تا زمان انجام آزمایش‌های آنالیز بیان ژن نگهداری شد.

میزان مصرف عصاره آویشن با توجه به پژوهش‌های Lee و همکاران (۲۰۰۴) انتخاب شد به طوری که ppm ۱۰۰ تیمول در جیره باشد. با توجه به نتیجه آنالیز عصاره آویشن شیرازی به کار گرفته شده در پژوهش و وجود ۰/۵ درصدی تیمول در ترکیب آن برای ساختن غلظت ppm ۱۰۰ از این ترکیب فنلی در جیره جوجه‌ها به ازای هر کیلوگرم دان مصرفی، gr ۲۰ عصاره استفاده شد. عصاره مذکور با دان مصرفی بطور روزانه مخلوط و در تمام دوره ۴۲ روزه پرورش در اختیار جوجه‌ها قرار گرفته و هر روز دان باقیمانده حاوی عصاره آویشن از دانخوری‌ها جمع آوری می‌شد.

جدول ۱- اجزاء جیره پایه

اجزاء جیره (درصد)	آغازین (صفر تا ۲۱ روزگی)	رشد (۲۱ تا ۳۵ روزگی)	پایانی (۳۵ تا ۴۲روزگی)
ذرت	۵۶۳	۶۲۹	۶۴۷
سویا	۳۷۱	۳۱۶	۲۸۷
گلوتن ذرت	۱۰	–	–
روغن	۱۱/۲۰	۱۵/۸۵	۲۷/۸۰
متیونین	۲/۸۰	۲/۳۰	۲/۲۰
لیزین	۱/۳۰	۰/۶۰	۰/۸۵
ترئونین	۰/۶۰	۰/۳۵	۰/۴۵
دی کلسیم فسفات	۱۸/۸۰	۱۶/۶۰	۱۵/۴۰
صدف	۱۱/۶۰	۱۰	۱۰
نمک	۳/۲۰	۲/۸۰	۲/۸۰
جوش شیرین	۱/۵۰	۱/۰۰	۱/۰۰
مکمل ویتامینه	۲/۵۰	۲/۵۰	۲/۵۰
مکمل معدنی	۲/۵۰	۲/۵۰	۲/۵۰

[۱] - مکمل ویتامینه از نظر محتویات ویتامینی عرضه نموده برای هر کیلو جیره شامل : تیامین منو هیدرات ۲/۵ mg، نیکوتینیک اسید ۴۵۰ mg، ریبوفلاوین ۶ mg ، دی کلسیم-پنتوتنات ۱۵mg ،کوبال آمین ۰/۰۲۵ mg، پری دوکسین هیدروکلراید ۳mg ، بیوتین ۰/۱۵ mg ، فولیک اسید ۱/۵ mg ، کولین کلراید ۸۴۰ mg ، کوله کلسیفرول ۴۰۰۰ IU ، ترانس رتینول استات ۱۰۰۰۰ IU ، توکوفرول استات ۵۵ IU ، اتوکسی کوئین ۱/۲۵ mg.

[۲] - مکمل معدنی از نظر محتویات ویتامینی عرضه نموده برای هر کیلو جیره شامل : منگنز اکساید ۱۲۰ mg ، فروس سولفات ۴۰ mg ، اکسید روی ۱۰۰ mg ،سولفات سرب ۱۶ mg ، یدات کلسیم ۱/۲۵ mg، سلنات سدیم ۰/۳ mg

جدول۲- ترکیب شیمیایی جیره

ترکیب (٪)	پیش دان (صفر تا ۲۱ روزگی)	رشد دان (۲۱ تا ۳۵ روزگی)	پس دان (۳۵ تا ۴ روزگی)
انرژی قابل متابولیزم (کیلوکالری در هر کیلوگرم)	۲۹۱۰	۳۰۰۰	۳۱۰۰
پروتئین خام(٪)	۲۱/۷۹۱	۱۹/۱۵۹	۱۸/۰۵۵
کلسیم(٪)	۱/۰۳۲	۰/۹۰۲	۰/۸۶۴
فسفر قابل دسترس(٪)	۰/۵۰۲	۰/۴۵۰	۰/۴۲۲
لیزین(٪)	۱/۲۶۹	۱/۰۷۱	۱/۰۱۵
متیونین	۰/۵۹۹	۰/۵۱۳	۰/۴۸۹
متیونین+ سیستئین (٪)	۰/۹۵۴	۰/۸۳۳	۰/۷۹۳
ترئونین(٪)	۰/۸۸۲	۰/۷۶۰	۰/۷۲۵
تریپتوفان(٪)	۰/۲۶۴	۰/۲۳۱	۰/۲۱۵
آرژنین(٪)	۱/۴۴۷	۱/۲۷۳	۱/۱۸۵
والین(٪)	۱/۰۱۸	۰/۸۹۸	۰/۸۴۳
ایزولوسین(٪)	۰/۹۰۷	۰/۷۹۱	۰/۷۳۸
هیستیدین(٪)	۰/۵۹۰	۰/۵۲۶	۰/۴۹۵
لوسین(٪)	۱/۸۷۴	۱/۶۵۴	۱/۵۷۳
فنیل آلانین(٪)	۱/۰۸۱	۰/۹۵۲	۰/۸۹۴
سدیم(٪)	۰/۱۹۲	۰/۱۶۱	۰/۱۶۱
کلر(٪)	۰/۲۴۸	۰/۲۱۱	۰/۲۱۶
پتاسیم(٪)	۰/۹۰۳	۰/۸۱۱	۰/۷۵۹
DEB(mEq/kg)	۲۴۵	۲۱۹	۲۰۴

مراحل آماده سازی و نحوه مصرف پروبیوتیک Broilact که بر پایه باکتری‌های Bacteroides-Porphyromonas-Eubacterium- Lactobacillus-Entrococcus و Escherchia غیر بیماریزا می‌باشد، طبق دستورالعمل شرکت تولیدکننده آن (Orion) و پژوهش‌های به عمل آمده توسط Palmu و Camelin (۱۹۹۷) انجام شده است. در این پژوهش از بسته پودر خشک استفاده شده است. به منظور تأمین تعداد باکتری توصیه شده توسط شرکت سازنده جهت تأثیر لازم، یک بسته ۲ گرمی پودر خشک پروبیوتیک لیوفیلیزه که در هر گرم آن حداقل 10^{10} CFU[1] موجود می‌باشد به ازای ۲۰۰۰ قطعه جوجه در ۵ لیتر آب حل شده و در ۴ ساعت ابتدایی دوره پرورش بطوریکه هر پرنده ۱ میلی گرم پروبیوتیک دریافت کند به آنها خورانده شد.

کلیه مراحل مطالعات مولکولی در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشکده علوم دامی دانشگاه کشاورزی ساری انجام گرفت. در ابتدا به منظور استخراج RNA از بافت کبد، از محلول آکوزول (AccuZol-Catno K 3090) شرکت بایونیر استفاده شد.

مراحل استخراج شامل همگن سازی نمونه‌ها، جداسازی، رسوب RNA، شستن RNA، خشک کردن RNA بر اساس راهنمای کیت انجام گرفت سپس RNA استخراج شده تا زمان تبدیل آن به cDNA در دمای ۷۰-

1. Colony Forming Unit

سلسیوس نگهداری شد. و سپس برای تولید cDNA از کیت Quantifast Revears-Transcriptase شرکت کیاژن (Cat NO 205311) استفاده شد. cDNA حاصل پس از اتمام کارها و حل نمودن آن در آب بدون یون و استریل، در دمای ۷۰- درجه سلسیوس تا انجام مراحل بعدی آزمایش نگهداری شد.

به منظور انجام Real time PCR از کیت QuantiFast SYBER Green PCR شرکت Thermo Scientific با مشخصه (Lot No 00145251) استفاده شد. با استفاده از نرم افزار Vector NTI، آغازگرهای اختصاصی، طراحی و سپس توسط شرکت Metabion ساخته شد. ویژگی‌های آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول۳ آورده شد.

جدول ۳- ویژگی‌های آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

ژن	شماره ثبت در بانک ژن	توالی آغازگر ('۳-'۵)	جهت	اندازه باند (bp)
IGF-I	M32791	TggCCTgTgTTTgCTTACCTT	رفت	۳۰۱
		TTCCTTTTgTgCTTTTggCAT	برگشت	
IGF-I R	S40818	CTCTTCCCCAACCTCACggTCA	رفت	۲۷۴
		gCTTCTCCTCCATCgTTCCTgg	برگشت	
IGF-II	NM_001030342.1	TgTggAggAgTgCTgCTTTC	رفت	۱۰۱
		gggAggTggCggAgAggTCA	برگشت	
β-Actin	L08165	gAgAAATTgTgCgTgACATCA	رفت	۱۵۲
		CCTgAACCTCTCATTgCCA	برگشت	

بر اساس پروتوکل کیت QuantiFast SYBER Green PCR، آغازگرهای مورد نظر با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر برای واکنش Real time PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

در این مطالعه از RNA ریبوزومی (rRNA β – actin) به عنوان ژن مرجع استفاده شد (۹و ۲۰و ۲۸). به منظور اندازه گیری بیان نسبی ژن IGF- I و IGF- II و IGF- I R از دستگاه Real time PCR Rotor- Gene شرکت Corbett مطابق با روش Livak و Schmittgen ۲۰۰۱ اقدام شد.

داده‌های این پژوهش در غالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار آماری SAS (SAS Institute Inc., 2003). مورد آنالیز قرار گرفت و از آزمون دانکن نیز به منظور مقایسه میانگین‌ها استفاده شد.

نتایج

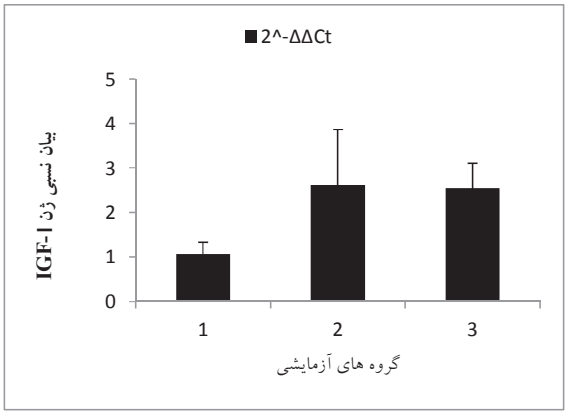
نتایج آزمون‌های بیان ژن تحت تأثیر عوامل آزمایشی به کار رفته در این پژوهش در سه گروه آزمایشی شامل:

۱- گروه شاهد

۲- گروه مصرف کننده عصاره آویشن شیرازی

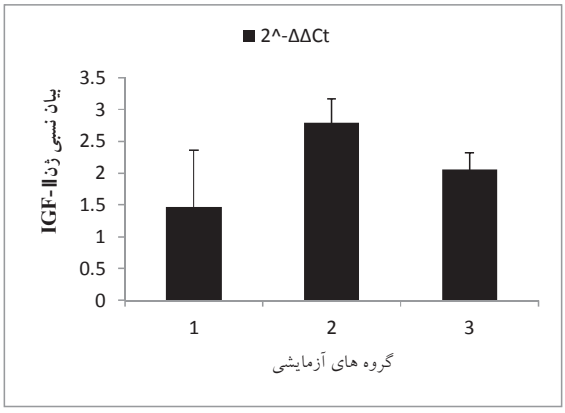
۳- گروه مصرف کننده پروبیوتیک

در نمودارهای ۱ و ۲ و ۳ آمده است.



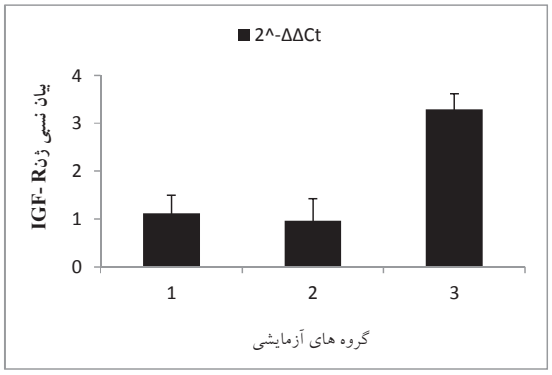
نمودار۱- بیان ژن IGF- I در پایان۴۲ روزگی تحت تأثیر عوامل آزمایشی با استفاده از روش $2^{-ct\Delta\Delta}$ ستون‌ها ±SD میانگین.

ستون‌ها با حروف غیر مشابه تفاوت معنی دار با یکدیگر دارند ($P<0.05$).



نمودار۲- بیان ژن IGF- II در پایان۴۲ روزگی تحت تأثیر عوامل آزمایشی با استفاده از روش $2^{-ct\Delta\Delta}$ ستون‌ها ±SD میانگین.

ستون‌ها با حروف غیر مشابه تفاوت معنی دار با یکدیگر دارند ($P<0.05$).



نمودار۳- بیان ژن IGF- R در پایان۴۲ روزگی تحت تأثیر عوامل آزمایشی با استفاده از روش $2^{-ctΔΔ}$ ستون‌ها ±SD میانگین.

ستون‌ها با حروف غیر مشابه تفاوت معنی دار با یکدیگر دارند ($P<0.05$).

بحث

با توجه به نتایج برخی از پژوهش‌های به عمل آمده که نشان می‌دهد به کارگیری آویشن موجب بهبود ضریب تبدیل و افزایش وزن جوجه‌های گوشتی گشته است (۲و ۵و ۱۸) و همچنین وجود پژوهش‌های مختلفی که نشان داد استفاده از پروبیوتیک‌ها روی بهبود عملکرد رشد طیور موثر است (۱۷و ۳۱) این پژوهش با هدف بررسی تأثیر دو عامل عصاره آویشن شیرازی و پروبیوتیک بر بیان ژن IGF- I و IGF- II و IGF- I R در کبد جوجه خروس‌های گوشتی انجام شد.

نتایج این بررسی نشان داد که مصرف عصاره آویشن شیرازی به مقدار مورد استفاده در این پژوهش تأثیری بر بیان ژن IGF- I و IGF- II و IGF- I R در کبد جوجه خروس‌های گوشتی ندارد. پژوهش‌ها نشان می‌دهد مصرف عصاره آویشن در جوجه‌های گوشتی اثرات آنتی اکسیدانی و ضد نفخی داشته و موجب بهبود عملکرد سیستم ایمنی و نیز تأثیرات مثبت بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون می‌شود (۳) اما تحقیقات به عمل آمده توسط Motamedi Motlagh و همکاران (۲۰۱۵) نشان می‌دهد بهبود عملکرد رشد ناشی از مصرف عصاره آویشن شیرازی در جوجه‌های گوشتی مرتبط با افزایش میزان هورمون‌های دخیل در رشد چون هورمون‌های تیروییدی و هورمون رشد نبوده و ممکن است تیمول و دیگر ترکیبات موثر در این عصاره با تأثیر بر مراکز اشتها واقع در هیپوتالاموس و دیگر مکانیسم‌های موثر بر اخذ غذا موجب بهبود عملکرد رشد شوند.

طبق نتایج حاصل از این تحقیق، مصرف مقدار به کار گرفته شده از پروبیوتیک در این تحقیق تأثیری بر میزان بیان نسبی ژن فاکتورهای رشد شبه انسولینی در سن ۴۲ روزگی نداشته اما به طور معنی داری سبب افزایش بیان ژن IGF- I R نسبت به گروه مصرف کننده عصاره آویشن و نیز گروه شاهد گردید. مطالعات نشان می‌دهد هورمون رشد، هم به طور مستقیم باعث رشد استخوان‌ها و عضلات و دیگر بافت‌های بدن شده و هم به طور غیر مستقیم

با تحریک تولید و ترشح سوماتومدین‌ها چون IGF-I و IGF- II از بافت‌ها خصوصا بافت کبد موجبات بهبود رشد پرندگان را فراهم می‌آورد (۱۵).

با توجه به اینکه بیان ژن هورمون‌های دخیل در رشد در واقع اولین مرحله شروع سنتز این هورمون‌ها بوده ضمنا گام اول تأثیر پذیری بافت‌ها در پاسخ به این هورمون‌ها افزایش گیرنده‌های مربوط به این فاکتورهای رشد می‌باشد، لذا مطالعات مولکولی در این مرحله از سنتز پروتئین می‌تواند اطلاعات مفیدی در خصوص این عوامل در اختیار قرار دهد زیرا صفات بیولوژیک مانند چگونگی ترشح هورمون‌های دخیل در رشد در واقع پاسخی از رفتار ژن مربوطه، تحت تأثیر فاکتورهای محیطی محسوب می‌شود.

نتایج پژوهش‌های محققین نشان می‌دهد که بهبود قابلیت هضم و جذب مواد غذایی در اثر مصرف پروبیوتیک در پرندگان می‌تواند عامل تأثیرگذاری بر فاکتورهای بیولوژیک مرتبط با رشد باشد (۲۴و ۳۲). ضمنا طبق نتایج مطالعات انجام شده، تأثیرات مثبت استفاده از این پروبیوتیک بر میزان هورمون‌های موثر بر رشد چون تیروکسین و نیز بیان ژن هورمون رشد در کبد جوجه‌های گوشتی گزارش شده است(۲۲). به نظر می‌رسد اثر افزایندگی پروبیوتیک به کار رفته در پژوهش بر بیان ژن گیرنده‌های IGF- I به خاطر تأثیرات مثبت مصرف پروبیوتیک به کار گرفته شده در این پژوهش بر افزایش قابلیت هضم و جذب مواد غذایی در دستگاه گوارش و افزایش ابقا مواد ازته بوده است (۳۲)

با اینکه به طور محدود در مورد تأثیر عوامل تغذیه‌ای و پروبیوتیک‌ها بر عملکرد رشد و بیان ژن‌های مختلف پرندگان مطالعاتی صورت گرفته است (۵و ۱۴و ۲۴)، تا کنون به طور کامل مکانیزم تأثیرگذاری بیولوژیک پروبیوتیک‌ها گزارش نشده است (۱۰و ۲۴) و متأسفانه گزارشاتی که مکانیزم تأثیر مستقیم پروبیوتیک‌ها بر بیان ژن هورمون‌های دخیل در رشد را در پرندگان نشان دهد در دست نیست لذا با نظر به وجود گزارشات محدود در مورد مکانیزم بیولوژیک تأثیر عوامل تغذیه‌ای و پروبیوتیک‌ها بر عملکرد رشد مطالعه تأثیر thymol و پروبیوتیک بر روی بیان ژن فاکتورهای رشد شبه انسولینی و گیرنده‌های آن‌ها نیاز به پژوهش‌های گسترده‌تری دارد.

منابع

۱. خانوی. م.، نوروزی. م.، طباطبایی. ح.، صالحی نوده. ع.، برزگرصفوی. س.، شفیعی. ع. (۱۳۸۸). شناسایی ترکیبات شیمیایی روغن فرار دو گیاه آویشن شیرازی و مرزنگوش و بررسی اثرات ضد ویروسی آن‌ها. فصلنامه گیاهان دارویی، سال نهم، دوره اول، شماره مسلسل سی و سوم، صفحات ۱۲۸تا ۱۳۷.

2. Abdulkarimi R., Aghazadeh A., Daneshyar M. 2011. Growth performance and some carcass characteristics in broiler chickens supplemented with thymus extract (Thymus vulgaris) in drinking water. AJS. 7: 400-405.

3. Aeschbach R., Loliger J., Scott B. C., Mucia A., Butler J., Halliwell B. 1994. Antioxidant action of thymol, carvacrol, 6-ginerol, zinezerone and hydroxytyrosol. Food Chemi toxicol. 32: 31-36.

4. Aho M., Nuotio L, Nurmi E., Kiiskinen T. 1992. Competitive exclusion of campylobacters from poultry with K-bacteria and Broilactâ.Int. J. Food Microbiol. 15: 265–275.

5. Aliakbarpour H. R., Chamani M., Rahimi G., Sadeghi A. A., Qujeq D. 2012. The Bacillus subtilis and Lactic Acid Bacteria Probiotic Influences Intestinal Mucin Gene Expression, Histomorphology and Growth Performance in Broilers. Asian-Aust. J. Anim. Sci. Vol. 25, No. 9: 1285-1293.

6. Al-Kassie G. A. M. 2009. Influence of two plant extracts derived from thyme and cinnamon on broiler performance. Pakistan. Vet. J. 29: 169-173.

7. Amad A. A., Männer K, Wendler K. R., Neumann K., Zentek J. 2011. Effects of a phytogenic feed additive on growth performance and ileal nutrient digestibility in broiler chickens. Poult Sci. 90: 2811–2816.

8. Bai S. P., Wu. A. M., Ding X. M., Lei Y, Bai J., Zhang K. Y., Chio J. S. 2013. Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. Poult. Sci. 92: 663–670.

9. Bustin S. A., Benes V., Nolan T., Pfaffi. M. V. 2005. Quantitative real-time RT-PCR- a perspective. Journal of Molecular Endocrinology. 34: 597–601.

10. Chichlowski M., Croom J., McBride B. W., Daniel L., Davis G., Koci M. D. 2007. Direct-fed microbial primaLac and salinomycin modulate whole-body and intestinal oxygen consumption and intestinal mucosal cytokine production in the broiler chick. Poult.Sci. 86: 1100–1106.

11. Elwinger K., Schneitz C., Berndtson E., Fossum O., Teglo¨ f B., Engstro¨m B. 1992. Factors

affecting the incidence of necrotic enteritis, caecal carriage of Clostridium perfringens and bird performance in Broiler chicks.Acta Vet. Scand. 33: 369-378.

12. Goren E., De Jong. W. A., Doornenbal P., Koopman J. P., Kennis H. M. 1984. Protection of chicks against salmonella infection induced by spray application of intestinal microflora in the hatchery. Vet. Q. 6: 73–79.

13. Hakkinen M.and Schneitz C. 1996. Efficacy of a commercial competitive exclusion product against a chicken pathogenic Escherichia coli and E. coli O157:H7. Vet. Rec. 139: 139–141.

14. Horn N. L., Donkin S. S., Applegate T. J., Adeola O. 2009. Intestinal mucin dynamics: Response of broiler chicks and White Pekin ducklings to dietary threonine. Poult. Sci. 88: 1906–1914.

15. Huybrechts L. M., King D. B., Lauterio T. J., Marsh J., Scanes C. G. 1985. Plasma concentrations of somatomedin-C in hypophysectomized, dwarf and intact growing domestic fowl as determined by heterologous radioimmunoassay. J. Endocrinol. 104: 233-239.

16. Kadlec J., Hosnedlová B., Řehout V., Čítek J., Večerek L., Hanusová L. 2011. Insulin-like growth factor-I gene polymorphism and its association with growth and slaughter characteristics in broiler chickens. Journal of Agrobiology. 28(2): 157–163.

17. La Ragione R. M., Narbad A., Gasson M. J., Woodward M. J. 2004. In vivo characterization of Lactobacillus johnsonii FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. Lett Appl Microbiol. 38: 197–205.

18. Lee K.-W., Everts H., Beynen A. C. 2004.Dietary Carvacrol Lowers Body. Essential Oils in Broiler Nutrition. Int J. Poult. Sci. 3: 738-752.

19. Lee K.-W., Everts H., Kappert H. J., Yeom K. H., Beynen A. C. 2003. Weight Gain but Improves Feed Conversion in Female Broiler Chickens. J. Appl. Poult. Res. 12: 394–399.

McMurtry JP (1998): Nutritional and developmental roles of insulin-like growth factors in poultry. J Nutrition 128, pp. 302.

20. Livak K. J. and Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2 -ΔΔCt method. Methods. 25: 402–408.

21. McMurtry JP., Francis G. L., Upton Z. 1997: Insulin-like growth factors in poultry. Domesti Anim Endocrin 14: 199–229.

22. Motamedi Motlagh A., Babapour V., Ansari Pirsaraei Z., Sheikhi N. 2015. Effect of thyme

(Zataria multiflora) extract and probiotic (Broilact) feeding on blood thyroid hormones concentration and growth hormone gene expression of liver in broiler chickens. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences. 5 (S1): 1979-1985.

23. Mountzouris K. C., Paraskevas V., Fegeros K. 2009. PHYTOGENIC COMPOUNDS IN BROILER NUTRITION in Tobias Steiner. Phytogenics in Animal Nutrition., Natural Concepts to Optimize Gut Health and Performance. First published , Erber AG, Austria: 97-107.

24. Mountzouris K. C., Tsitrsikos P., Palamidi I., Arvaniti A., Mohnl M., Schatzmayr G., Fegeros K. 2010. Effect of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestability, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. Poult. Sci. 89: 58-67.

25. National Research Council. 1994. Nutrient Requirements of Poultry,8th Ed. Natl. Acad. Press. Washington, DC.

26. Nurmi E. V., Rantala M. 1973. New aspects of Salmonellainfection in broiler production. Nature. 241:210.

27. Palmu L., Camelin I. 1997. The Use of Competitive Exclusion in Broilers to Reduce the Level of Salmonella Contamination on the Farm and at the Processing Plant. Poult. Sci. 76: 1501–1505.

28. Pfaffi M. W. 2001. A new mathematical model for elative quantification in real time RT- PCR. Nucleic Acids Res. 29: 2002-2007.

29. Richards M. P., Poch S. M., McMurtry J. P. 2005. Expression of insulin-like growth factor system genes in liver and brain tissue during embryon ic and post-hatch development. Biochemistry and Physiology, Part A. 141 : 76- 86.

30. SAS Institute. 2003. SAS User's Guide. Version 9.1 ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.

31. Schneitz C., Hakkinen M. 1998. Comparison of two different types of competitive exclusion products. Appl. Micro. 26: 338–341.

32. Schneitz C., Kiiskinen T., Toivonen V, Na¨ si M.1998. Effect of BROILACTâ on the Physicochemical Conditions and Nutrient Digestibility in the Gastrointestinal Tract of Broilers. Poult Sci. 77: 426–432.

33. Soerjadi-Liem A. S., Snoeyenbos G. H., Weinack O. M. 1984. Establishment and competitive exclusion of Yersinia enterocolitica in the gut of monoxenic and holoxenic chicks. Avian Dis. 28: 256–260.

Effect of thyme (*Zataria multiflora)* extract and probiotic (*Broilact*) feeding on IGF-I, IGF-II and IGF- I R gene expression of liver in broiler chickens

A.Motamedi Motlagh[1] , V. Babapour[1*] , Z. Ansari Pirsaraei[2] and N. Sheikhi[1]

Received Date: 22/09/2015

Accepted Date: 23/12/2015

Abstract

Researchers indicated that some phytogenic extracts or probiotics improve growth performance. This study was conducted to examine the effects of thyme extract and probiotic on biological growth promoters. Therefore insulin like growth factor- 1 (IGF- I), insulin like growth factor- 2 (IGF- II) and IGF- I Receptors gene expression were measured. One hundred and eight one-day-old Ross male broiler were randomly allocated in 3 experimental treatments including: control- unsupplemented (CTRL), birds supplemented with *Zataria multiflora* extract (Thy) and probiotic in feed (Pro). Each treatment had 3 replicates of 12 broilers. The birds were fed on a corn- soybean based diet. IGF- I, IGF- II and IGF- I R gene expression in liver were determined. The results of this study showed that the amount of thyme extract used in this experiment has no effect on thyroid hormones concentrations. At 42 day of age IGF- I and IGF- II gene expression in liver not significantly changed in treatments (P>0.05). IGF- I R gene expression in Pro birds significantly increased compared with CTRL and Thy birds.

Keywords: IGF- I gene expression, Probiotic, Thyme extract, Broiler

1- Department of Veterinary Physiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Animal Science Department, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

* Corresponding Author: (babapour@ut.ac.ir)