Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Research on Animal Production, Vol. 15, Issue 1, 2024 p: 63- 72

OPEN ACCESS

Research Paper

The Effect of Chromium Propionate and Alpha-Lipoic Acid Supplementation on Gene Expression of Cytokine Profile in the Spleen Tissue of Broilers

Hadis Mirzaei[1], Ali Aghaei[2], Elham Hoveizi[3] and Mahmood Nazari[4]

1- Ph. D. student in Poultry nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
2- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran, (Corresponding author: aghaei@asnrukh.ac.ir)
3- Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
4- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

Received: 9 August, 2023 Accepted: 28 December, 2023

Extended Abstract

Background: Alpha-lipoic acid (α-LA) is synthesized enzymatically in the mitochondrion from octanoic acid. Endogenous levels of α-lipoic acid have been reported in the micromolar range. Due to its high lipophilicity, alpha-lipoic acid can easily pass through biological membranes and is converted into dihydrolipoic acid (DHLA) in cells. Alpha-lipoic acid and DHLA are described as an ideal antioxidant couple due to their exceptional ability to protect against oxidative stress through multiple pathways. Both compounds exhibit metal chelating activity, act as coenzymes in glucose metabolism, and can produce other antioxidants such as ascorbate, vitamin E, and glutathione (GST). Alpha-lipoic acid also has anti-inflammatory properties, and its supplementation in broiler diets improves the expression of inflammation-related genes in the spleen.

On the other hand, trivalent chromium is recognized as an essential trace element for humans and other animals, as it is part of the glucose tolerance factor (GTF). Chromium is essential for the metabolism of carbohydrates, proteins, and lipids and can be present in the diet in the form of inorganic compounds or organic complexes. After absorption, chromium circulates in a free state and binds to transferrin or other plasma proteins (such as β-globulin). Trivalent chromium appears to play a role in the structure and expression of genetic information in animals, with stronger binding to nucleic acids than other metal ions. Chromium protects RNA against thermal denaturation and is concentrated in the cell nucleus, where it binds to chromatin, participates in gene expression, and increases the initiation sites for RNA synthesis. This increase results from the induction of proteins bound to the nucleus and the activation of nuclear chromatin, thereby affecting gene function. Chromium supplementation has shown a positive effect on the immune response of broiler chickens. The aim of this research was to investigate the simultaneous effects of dietary chromium propionate and alpha-lipoic acid supplementation on the expression of cytokines interleukin 1, 2, 4, and 10, as well as IFN-γ, TNF, and TGF-β4 genes in the spleen tissue of broiler chickens.

Methods: For this purpose, an experiment was conducted with 144 Ross 308 broiler chicks in a completely randomized design (CRD) with a 3×2 factorial arrangement of treatments, including six treatments, three replicates, and eight chickens in each replicate. The dietary treatments consisted of three doses of chromium propionate (0, 750, and 1500 µg/kg) combined with two levels of alpha-lipoic acid (0 and 300 mg/kg) supplemented to the basal diets. At the end of the experimental period (42 days old), two chickens from each pen were randomly selected and euthanized. Samples were taken from the spleen, immediately frozen in liquid nitrogen, and then stored at -80°C. The quantity and purity of the extracted RNA were checked using a Nanodrop device. To confirm the specific amplification of the desired genes, PCR reactions were performed using specific primers. The expression of cytokine profile genes was quantified by quantitative real-time PCR, using 28S as a housekeeping gene to normalize the gene expression data. The method of analyzing the obtained data employed the difference in threshold degree changes

Copyright ©2024 Mirzaei et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

(ΔΔCT), using the 2-ΔΔCT method (comparative threshold) and the ratio of gene expression (28S).

Results: The results of electrophoresis confirmed the expression of genes in the spleen cells of broiler chickens, appearing as one band on a 2% agarose gel. Electrophoresis of polymerase chain reaction products showed fragments of 86, 51, 82, and 88 bp for interleukin 1, 2, 4, and 10, respectively. No bands were formed on the agarose gel for the IFN-γ, TNF, and TGF-β4 genes. The results indicated that alpha-lipoic acid at the level of 300 mg/kg significantly decreased interleukin 1 gene expression compared to the control group (0 mg/kg). Additionally, supplementing the basal diet with chromium propionate at the level of 1500 µg/kg significantly increased interleukin 1 and 4 gene expression compared to the control group and the chromium propionate at the level of 750 µg/kg. However, the addition of alpha-lipoic acid and chromium propionate had no effect on the expression of interleukin 2 and 10 genes.

Conclusion: Adding 300 mg/kg of alpha-lipoic acid to the diet can improve the immune response by reducing the expression of the IL-1 gene in broilers. Furthermore, high amounts of chromium propionate (1500 µg) may lead to decreased immunity by increasing the expression of IL-1 and 4 genes. In contrast, the addition of chromium propionate up to the level of 750 µg/kg does not adversely affect immunity. Based on the results, it is recommended to include alpha-lipoic acid at the level of 300 mg/kg in the broiler diet, while the addition of chromium propionate up to 750 µg/kg is acceptable if it has beneficial effects on yield and production characteristics.

Keywords: Alpha-lipoic, Chromium, Gene expression, Immune response

How to Cite This Article: Mirzaei, H., Aghaei, A., Hoveizi, E., & Nazari, M. (2024). The Effect of Chromium Propionate and Alpha-Lipoic Acid Supplementation on Gene Expression of Cytokine Profile in the Spleen Tissue of Broilers. *Res Anim Prod*, *15*(1), 63-72. doi:10.61186/rap.15.43.57

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقاله پژوهشی

تأثیر مکمل‌های پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک بر بیان نسبی ژن‌های درگیر در روند التهاب در بافت طحال جوجه گوشتی

حدیث میرزائی[۱]، علی آقائی[۲]، الهام حویزی[۳] و محمود نظری[۴]

۱- دانشجوی دکتری تغذیه طیور، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران،
(نویسنده مسوول: aghaei@asnrukh.ac.ir)
۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۴- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۷
صفحه ۶۳ تا ۷۲

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: اسید آلفا لیپوئیک (α-LA) به‌صورت آنزیمی در میتوکندری از اسید اکتانوئیک سنتز می‌شود. سطح درون‌زا α-LA در محدوده میکرومولار گزارش شده است. اسید آلفا لیپوئیک به‌دلیل خاصیت چربی دوستی بالا می‌تواند به‌راحتی از غشای‌های بیولوژیکی عبور کند و در سلول‌ها به اسید دی هیدرولیپوئیک (DHLA) تبدیل شود. اسید آلفا لیپوئیک و DHLA را به‌عنوان یک زوج آنتی‌اکسیدان ایده‌آل توصیف کرده‌اند، زیرا توانایی محافظت بسیار بالایی در برابر استرس اکسیداتیو از طریق مسیرهای متعدد دارند. اسید آلفا لیپوئیک و DHLA دارای فعالیت کلات‌کننده فلز هستند، به‌عنوان یک کوآنزیم در متابولیسم گلوکز عمل می‌کنند و می‌توانند آنتی‌اکسیدان‌های دیگر مانند آسکوربات، ویتامین E و گلوتاتیون (GST) تولید کنند. اسید آلفا لیپوئیک دارای خواص ضدالتهابی است و افزودن آن به جیره جوجه‌های گوشتی بیان نسبی ژن‌های مرتبط با التهاب را بهبود می‌بخشد. از طرف دیگر، کروم سه ظرفیتی یک عنصر کمیاب ضروری شناخته شده در انسان و سایر حیوانات می‌باشد که جز فاکتور تحمل گلوکز (GTF) است. کروم برای متابولیسم کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و لیپیدها ضروری است. کروم ممکن است در جیره به شکل ترکیبات معدنی یا کمپلکس‌های آلی وجود داشته باشد. پس از جذب، کروم در حالت آزاد گردش می‌کند و به ترانسفرین یا سایر پروتئین‌های پلاسما (پروتئین b-گلوبولین) متصل می‌شود. به‌نظر می‌رسد کروم سه ظرفیتی در ساختار و بیان اطلاعات ژنتیکی در حیوانات نقش داشته باشد. اتصال کروم به اسیدهای نوکلئیک قوی‌تر از سایر یون‌های فلزی است. کروم از RNA در برابر دناتوره شدن حرارتی محافظت می‌کند. همچنین واضح است که کروم در هسته سلولی متمرکز است. کروم با اتصال به کروماتین در بیان ژن شرکت می‌کند و باعث افزایش مکان‌های شروع و در نتیجه افزایش سنتز RNA می‌شود. این افزایش به‌دلیل القای پروتئین متصل به هسته و فعال شدن کروماتین هسته‌ای است در نتیجه کروم بر عملکرد ژن تأثیر می‌گذارد. مکمل کروم در جیره تأثیر مثبتی بر پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی دارد. بنابراین در این تحقیق اثر مکمل‌های کروم و اسید آلفا لیپوئیک بر بیان ژن اینترلوکین ۱، ۲، ۴ و ۱۰، همچنین IFN-γ، TNF – α و TGF-β4 بافت طحال جوجه گوشتی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: جهت انجام این آزمایش از ۱۴۴ قطعه جوجه گوشتی یک روزه سویه راس ۳۰۸ به‌صورت فاکتوریل (۳×۲) در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو سطح اسید آلفالیپوئیک (صفر و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و سه سطح پروپیونات کروم (صفر، ۷۵۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم) با ۶ تیمار، ۳ تکرار و ۸ قطعه جوجه در هر تکرار استفاده شد. در پایان دوره آزمایش (۴۲ روزگی)، دو قطعه جوجه از هر پن به‌طور تصادفی انتخاب و کشتار شدند. نمونه از طحال گرفته شد و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و سپس در ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. بررسی کمیت و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ انجام شد. به‌منظور تأیید تکثیر اختصاصی ژن‌های موردنظر در این مطالعه با استفاده از آغازگرها، ابتدا واکنش PCR انجام شد. بیان نسبی ژن‌های اینترلوکین ۱، ۲، ۴ و ۱۰، همچنین IFN-γ، TNF – α و TGF-β4 بافت طحال به‌روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی ارزیابی شد. در این روش 28S به‌عنوان ژن خانه دار جهت مقایسه نسبی داده‌ها استفاده شد. برای آنالیز داده‌های به‌دست آمده از روش اختلاف در تغییرات درجه آستانه (ΔΔCT) استفاده شد. روش بررسی تغییرات بیان ژن در این پژوهش روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ (آستانه مقایسه‌ای) و نسبت به بیان ژن (s28) بود.

یافته‌ها: نتایج الکتروفورز بیان ژن‌ها را در سلول‌های طحال مرغ‌های گوشتی تأیید کرد و به‌صورت یک باند روی ژل آگارز ۲ درصد ظاهر شدند. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌ترتیب قطعات ۸۶، ۵۱، ۸۲ و ۸۸ جفت باز را برای اینترلوکین ۱، ۲، ۴ و ۱۰ نشان داد. برای ژن‌های IFN-γ، TNF – α و TGF-β4 باندی بر روی ژل آگارز تشکیل نشد. نتایج نشان داد بیان ژن اینترلوکین ۱ در گروه دریافت کننده اسید آلفالیپوئیک (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. همچنین، بیان نسبی ژن‌های اینترلوکین ۱ و ۴ در گروه دریافت کننده سطح ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم پروپیونات کروم نسبت به گروه شاهد و گروه دریافت کننده ۷۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم پروپیونات کروم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در حالی‌که افزودن اسید آلفالیپوئیک و پروپیونات کروم تاثیری بر بیان ژن‌های اینترلوکین ۲ و ۱۰ نداشت.

نتیجه‌گیری: افزودن ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسید آلفالیپوئیک به جیره می‌تواند سبب بهبود پاسخ ایمنی ذاتی با کاهش بیان ژن اینترلوکین ۱ در جوجه‌های گوشتی گردد. به‌علاوه، افزودن مقادیر بالای پروپیونات کروم (۱۵۰۰ میکروگرم) منجر به کاهش ایمنی (با افزایش بیان ژن اینترلوکین ۱ و ۴) می‌گردد. در حالی‌که افزودن پروپیونات کروم تا سطح ۷۵۰ میکروگرم تاثیر بر ایمنی ندارد. با در نظر گرفتن نتایج، افزودن اسید آلفالیپوئیک در سطح ۳۰۰ میلی‌گرم به جیره جوجه‌های گوشتی توصیه می‌گردد. افزودن پروپیونات کروم تا سطح ۷۵۰ میکروگرم در صورتی‌که اثرات مفیدی بر عملکرد و خصوصیات تولیدی داشته باشد بلامانع است.

واژه‌های کلیدی: آلفالیپوئیک، بیان ژن، پاسخ ایمنی، کروم

مقدمه

پرورش جوجه گوشتی با عوامل استرس‌زای مختلفی که بر وضعیت آنتی‌اکسیدانی و سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی تأثیر می‌گذارند، روبرو است که در نتیجه تولیدکنندگان متحمل ضرر اقتصادی می شوند (Piva *et al.*, 2003; Nazari *et al.*, 2020). طیور تحت تأثیر شرایط پرورش خود، از جمله قرار گرفتن در محیط زیست در معرض فلزات، آلودگی هوا، سموم دفع آفات و تشعشعات یونیزه در طول دوره پرورش قرار دارند. این عوامل برون‌زا می‌توانند باعث ایجاد گونه های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) در بدن شود. سلامت حیوانات با تعادل بین تولید ROS تولید شده توسط منابع درون‌زا و برون‌زا و با از بین بردن این گونه‌ها توسط مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیداتیو تعیین می‌شود (Frisard & Ravussin., 2006).

پاسخ‌های ایمنی به دو دسته هومورال (وابسته به تولید آنتی‌بادی) و سلولی (وابسته به سلول T) تقسیم می‌شوند (Chenani *et al.*, 2021). یکی از سیگنال‌های فعال‌سازی پاسخ ایمنی هومورال، ترشح سایتوکین‌ها از سلول‌های ایمنی است. سایتوکین‌ها، گلیکوپروتئین‌هایی هستند که سبب فعال شدن، تکثیر و تمایز سلول‌های B می‌شوند (Fietta & Delsante., 2009). اگرچه سایتوکین‌ها توسط جمعیت‌های سلولی زیادی تولید می‌شوند، اما تولیدکنندگان اصلی آنها سلول‌های T کمک کننده و ماکروفاژها هستند (Tayal & Singh Kalra, 2007). بعضی سایتوکاین‌ها به‌طورکلی فاکتورهای رشد لنفوسیتی هستند، بعضی دیگر به‌عنوان مولکول‌های پیش التهابی یا ضدالتهابی عمل می‌کنند، درحالیکه دیگر سایتوکین‌ها پاسخ سامانه ایمنی به آنتی‌ژن را جهت‌دهی می‌کنند (Dinarello., 2007).

شناسایی اولیه پپتیدهای مشتق از آنتی‌ژن به‌وسیله گیرنده‌های سلول‌های T انجام شده و سلول‌های T (Th) کمکی نقش مهمی در القا و تنظیم پاسخ ایمنی ایفا می‌کنند که به دو دسته Th1 و Th2 تقسیم می‌شوند. بیان متفاوت سایتوکین‌ها در بدن مشخص‌کننده‌ی نوع پاسخ ایمنی است، که خود این پاسخ متفاوت نقش مهمی در بیماری‌زایی دارد. اینترلوکین‌ها، سایتوکین‌هایی هستند که روابط بین لنفوسیت‌ها و سایر لکوسیت‌ها را تنظیم می‌کنند و با مولکول‌های بسیاری به‌صورت واسطه‌ای در مکانیسم‌های ایمنی مرتبط هستند. لذا، به محرک‌های انتخابی بسیاری از بیماری‌های عفونی پاسخ می‌دهند (Downing *et al.*, 2010). تیموس که اندام اولیه لنفی است در عدم حضور هر تحریک کننده‌ای قادر به تولید انواع سایتوکین‌هاست (Peters *et al.*, 2003).

تحقیقات نشان داده که بین اجزای جیره غذایی طیور با تولید و تولیدمثل (Sabahi *et al.*, 2020; Mosavi *et al.*, 2022; Nazari *et al.*, 2023; Koohgivi *et al.*, 2021) و عملکرد سیستم ایمنی (Ramiro *et al.*, 2005) ارتباط وجود دارد. تمرکز اصلی پژوهش حاضر، امکان تغییر سیستم ایمنی جوجه‌های سالم جهت بهبود سلامت از طریق تغذیه می‌باشد. به‌عنوان مثال، برخی از محققان گزارش کرده‌اند که خوراک‌های حاوی مواد مغذی خاص، به‌ویژه آن‌هایی که خواص آنتی‌اکسیدانی دارند، ممکن است باعث بهبود عملکرد سیستم ایمنی بدن شوند (Meydani *et al.*, 1998; Piva *et al.*, 2003).

اسید آلفا لیپوئیک یا اسید 1,2-dithiolane-3-pentanoic، یک ترکیب دیتیول طبیعی می‌باشد که به‌عنوان فاکتور اساسی برای بسیاری از آنزیم‌های متابولیکی میتوکندری و در متابولیسم انرژی میتوکندری نقش دارد. اسید آلفا لیپوئیک در میتوکندری از اسید اکتانوئیک سنتز می‌شود اما ممکن است از منابع غذایی نیز جذب شود و به‌طور آهسته در بسیاری از بافت‌ها تجمع یابد (Mayr *et al.*, 2014). اسید آلفالیپوئیک به‌سرعت جذب دستگاه گوارش شده و بلافاصله از پلاسما خارج شده، که منعکس‌کننده حمل و نقل سریع به داخل بافت‌ها است. اسید آلفا لیپوئیک به‌دلیل چربی دوست بودن بالا می‌تواند به راحتی از غشای سلولی عبور کند و در سلول‌ها به اسید دی هیدرولیپوئیک (DHLA) تبدیل می‌شود (Wollin & Jones., 2003). علاوه‌براین، اسید آلفالیپوئیک دارای خواص ضدالتهابی است و افزودن آن به جیره جوجه‌های گوشتی بیان ژن‌های مرتبط با التهاب طحال را بهبود می‌بخشد (Li et al., 2014). تزریق داخل صفاقی اسید آلفا لیپوئیک اثر ضدالتهابی نشان داده است (Guo *et al.*, 2016). آزمایشات نشان داده که اسید آلفا لیپوئیک استرس اکسیداتیو و تغییرات ایمنی ناشی از آفلاتوکسین را کاهش می‌دهد و پاسخ التهابی را حداقل تا حدی از طریق تغییر در بیان سایتوکین‌های التهابی طحال مانند IL6 و TNF–α در جوجه‌های گوشتی تعدیل می‌کند (Guo *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015) از طرفی عناصر کم‌یاب نقش مهمی در هموستاز بدن انسان و حیوانات دارند. عنصر کروم یک عنصر کمیاب ضروری شناخته شده برای انسان و حیوانات می‌باشد. اثرات مفید کروم در سلامت انسان و حیوانات به دلیل نقش آن به‌عنوان یک جز جدایی ناپذیر از فاکتور تحمل گلوکز (GTF) گزارش شده است. مطالعات روی حیوانات نشان داده که کروم آلی (حدود ۲۵٪ تا ۳۰٪) نسبت به کروم غیر آلی (حدود ۱٪ تا ۳٪) با کارآیی بیشتری جذب می‌شود (Piva et al., 2003). همچنین، در نتیجه مصرف مکمل کروم در جوجه‌های گوشتی (Zhang & Luo, 2006) و مرغ‌های تخم‌گذار بهبود در پاسخ ایمونولوژیک گزارش شده است (Zhang *et al.*, 2018) و اثرات آن در هنگام استرس بارزتر به‌نظر می‌رسد. کروم از طریق تأثیر بر انتشار سایتوکین‌ها، پاسخ ایمنی را تعدیل می‌کند (Granchi *et al.*, 1998). با این حال، نتایج بدست آمده تاکنون متناقض بوده و با هر آزمایش متفاوت است. تأثیر قابل توجهی از مکمل کروم در بیان IFN-γ در بافت طحال جوجه گوشتی مشاهده شده که نقش آن را در تعدیل سیستم ایمنی نشان می‌دهد (Bhagat *et al.*, 2008). این مطالعات در نهایت درک ما از نقش کروم در پاسخ‌های ایمنی مرغ را بهبود می‌بخشد و در طراحی اصلاحات مناسب جیره برای غلبه بر شرایط بیماری‌های خاص در طیور که تولید بهینه را مختل می‌کنند، کمک خواهد کرد. با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی پروپیونات کروم و اسید آلفالیپوئیک می‌توان انتظار داشت که افزودن این‌ها به جیره غذایی بتواند سیستم ایمنی جوجه‌ها را تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین، هدف از این پژوهش ارزیابی بیان نسبی ژن‌های مرتبط با ایمنی در بافت طحال جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروپیونات کروم و اسید آلفالیپوئیک بود.

مواد و روش‌ها

پرندگان و جیره‌های غذایی آزمایشی

این آزمایش با استفاده از ۱۴۴ قطعه جوجه گوشتی (مخلوط دو جنس) یک روزه سویه راس ۳۰۸ به‌صورت فاکتوریل (۳×۲) در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو سطح اسید آلفا لیپوئیک (صفر و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و سه سطح پروپیونات کروم (صفر، ۷۵۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم) با ۶ تیمار، ۳ تکرار و ۸ قطعه جوجه در هر تکرار به‌مدت ۴۲ روز انجام شد.

در این آزمایش از قرص‌های ۳۰۰ میلی‌گرمی اسید آلفا لیپوئیک (شرکت داروسازی رها، ۹۹۰۰۲) و پروپیونات کروم (NuTech Biosciences Inc, New York, USA) با خلوص ۰/۴ درصد استفاده گردید.

تیمارهای آزمایشی شامل (۱) جیره شاهد بر پایه ذرت و کنجاله سویا، (۲) جیره شاهد همراه با ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسید آلفا لیپوئیک، (۳) جیره شاهد همراه با ۷۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم پروپیونات کروم، (۴) جیره شاهد همراه با ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم پروپیونات کروم، (۵) جیره شاهد همراه با ۷۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم پروپیونات کروم و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسید آلفا لیپوئیک و (۶) جیره شاهد همراه با ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم پروپیونات کروم و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسید آلفا لیپوئیک بودند. دوره های مختلف پرورش بر اساس استاندارد سویه راس شامل دوره آغازین (۰ تا ۱۰ روزگی)، دوره رشد (۱۱ تا ۲۴ روزگی) و دوره پایانی (۲۵ تا ۴۲ روزگی) بود. جیره‌ها مطابق کتابچه توصیه مواد مغذی (۲۰۱۹) سویه راس ۳۰۸ و با استفاده از نرم‌افزار WUFFDA تنظیم شد (جدول ۱). در طی دوره آزمایش، پرندگان به طور آزاد به آب و خوراک دسترسی داشتند. طول دوره روشنایی ۲۳ ساعت و یک ساعت تاریکی در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری بیان نسبی ژن

در پایان دوره آزمایش (۴۲ روزگی)، یک قطعه جوجه از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و کشتار شد. نمونه از طحال گرفته شد و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و سپس در ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. در این پژوهش، استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج شرکت دنا زیست طبق پروتکل شرکت به‌ترتیب انجام شد. بررسی کمیت و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل (Thermo Scientific NanOdrOp. 2000. USA) انجام شد (نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر نشان‌دهنده آلودگی‌های پروتئینی در محلول RNA استخراج شده هست که توسط دستگاه محاسبه گردید). جهت سنتز cDNA از کیت ساخت شرکت سینا کلون استفاده گردید. به‌منظور تأیید تکثیر اختصاصی ژن‌های موردنظر در این مطالعه با استفاده از آغازگرها، ابتدا واکنش PCR انجام شد. در صورت تأیید تکثیر ژن‌های موردنظر با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده به‌منظور بررسی مقایسه‌ای بیان نسبی ژن‌ها از تکنیک PCR در زمان حقیقی (Real time qPCR) استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق از مطالعه لامرز و همکاران (Lammers *et al.*, 2010) بدست آمده بود. توالی و خصوصیات پرایمرها در جدول ۲ ارائه شده است.

از cDNA سنتز شده ۲ میکرولیتر به میکروتیوپ اول اضافه شد. به خوبی مخلوط گردید سپس از میکروتیوپ ۲،۱ میکرولیتر برداشته به میکروتیوپ ۲ اضافه گردید و این عمل تا میکروتیوپ شماره ۴ تکرار شد .میکروتیوپ‌های ۳،۲،۱ و ۴ نسبت به cDNA اولیه به‌ترتیب دارای رقت‌های ۲۰، ۴، ۰/۸، ۰/۱۶ گردیدند.

برای آنالیز داده‌های به دست آمده از روش اختلاف در تغییرات درجه آستانه ($\Delta\Delta CT$) استفاده شد. روش بررسی تغییرات بیان ژن در این پژوهش روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ (آستانه مقایسه‌ای) و نسبت به بیان ژن (28s) بود (Pfaffl et al., 2002). 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.

جدول ۱- ترکیب مواد خوراکی و مواد مغذی جیره‌های غذایی آزمایشی (بر حسب درصد)
Table 1. Food and nutritional composition of experimental diets (in percent)

مرحله پایانی Finisher diet (days 25-42)	مرحله رشد Grower diet (days 11-24)	مرحله آغازین Starter diet (days 0-10)	اجزای جیره (درصد) Ingredients (%)
60.50	55.95	53.00	ذرت Corn
28.30	32.80	35.80	کنجاله سویا Soybean meal
2.25	2.80	3.28	گلوتن ذرت Corn gluten
4.91	4.14	3.17	روغن گیاهی (آفتابگردان) Sunflower oil
1.10	1.15	1.24	صدف shell
1.45	1.60	1.80	دی‌کلسیم فسفات Dicalcium phosphate
0.22	0.22	0.22	جوش شیرین Sodium Bicarbonate
0.25	0.24	0.24	نمک Sodium chloride
0.27	0.30	0.35	متیونین Methionine
0.18	0.20	0.27	لیزین Lysine
0.07	0.10	0.13	ترئونین Threonine
0.25	0.25	0.25	مکمل ویتامینی[1] Vitamin premix[1]
0.25	0.25	0.25	مکمل معدنی[2] Mineral premix[2]
		ترکیب شیمیایی جیره Chemical analysis diet	
3200	3100	3000	انرژی متابولیسمی (کیلوکالری/ کیلوگرم) Metabolisable Energy (Kcal/Kg)
19.50	21.51	23.03	پروتئین خام (درصد) Crude protein (%)
0.83	0.90	0.98	کلسیم (درصد) Calcium (%)
0.40	0.44	0.48	فسفر دردسترس(درصد) Available phosphorus (%)
0.91	0.99	1.08	متیونین+ سیستین(درصد) Methionine + Cystine (%)
0.59	0.65	0.72	متیونین (درصد) Methionine (%)
1.12	1.26	1.40	لیزین (درصد) Lysine (%)

۱- مکمل ویتامینی در هر کیلوگرم جیرهٔ غذایی: رتینیل استات، ۱۰۰۰۰ واحد بین‌الملل؛ کوله کلسیفرول، ۴۵۰۰ واحد بین‌الملل؛ α- توکوفرول استات، ۳۷/۵ واحد بین الملل؛ تیامین، ۱/۲۵ میلی‌گرم؛ نیاسین، ۳۹/۲۵ میلی‌گرم؛ فولیک اسید، ۰/۵ میلی‌گرم؛ اسید پانتوتنیک، ۱۰ میلی‌گرم؛ ویتامین k، ۵ میلی‌گرم؛ نیکوتینامید، ۴/۶۳ میلی‌گرم؛ کولین، ۳۷/۵ میلی‌گرم؛ کوبالامین، ۰/۰۲۵ میلی‌گرم.
۲- مکمل مواد معدنی در هر کیلوگرم جیرهٔ غذایی: کولین کلرید، ۱۵۰ میلی‌گرم؛ منگنز، ۱۱۲/۵ میلی‌گرم؛ روی، ۶۲/۵ میلی‌گرم؛ مس، ۱۲/۵ میلی‌گرم؛ سیلنیم، ۰/۳۱ میلی گرم؛ ید، ۱/۴ میلی‌گرم؛ آهن، ۳۲/۵ میلی‌گرم.
1- Vitamin premix supplied the following per kilogram of diet: retinyl acetate, 10000 IU; cholecalciferol, 4500 IU; α-tocopheryl acetate, 37.5 IU; thiamine, 1.25 mg; niacin, 39.25 mg; folic acid, 0.5 mg; pantothenic acid, 10 mg; vitamin K, 5 mg; Nicotinamide, 4.63 mg; choline, 37.5 mg; cobalamin, 0.025 mg.
2- mineral premix supplied the following per kilogram of diet: choline chloride 150 mg; Mn, 112.5 mg; Zn, 62.5 mg; Cu, 12.5 mg; Se, 0.31 mg; Iodine, 1.4 mg; and Fe mg.

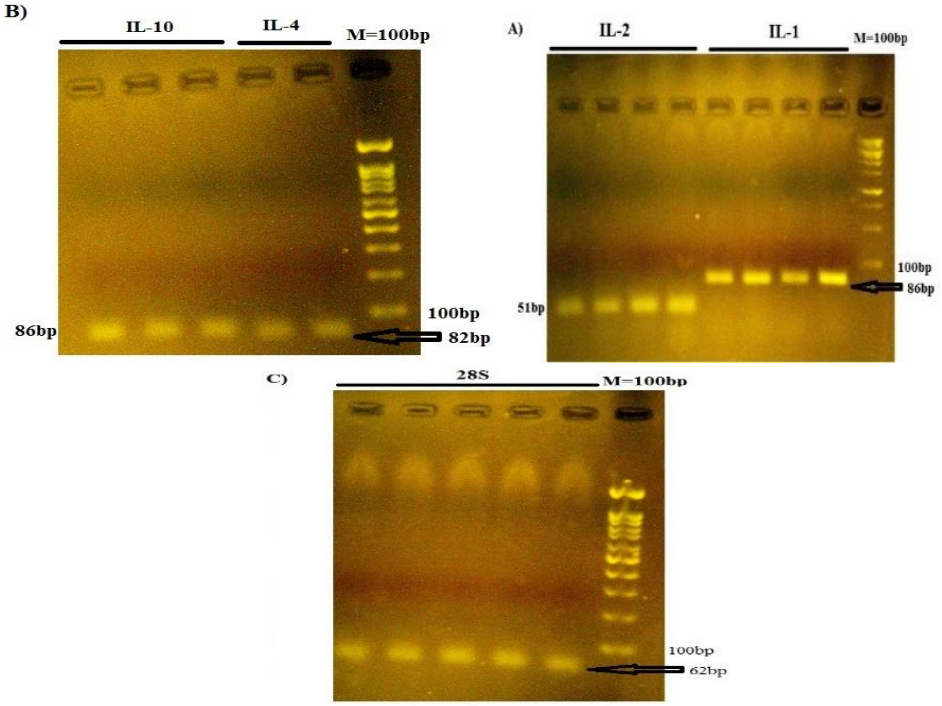
جدول ۲- توالی و خصوصیات آغازگرهای رفت و برگشت استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز
Table 2. The sequence and characteristics of the primer used in PCR reaction.

ژن Gene	شماره دسترسی Accession number	توالی آغازگرها Primers Sequence (5'-3')	طول محصول (جفت باز) Product length (bp)
IL-1	AJ245728	F: 5'- CAGCAGCCTCAGCGAAGAG-3' R: 5'- CTGTGGTGTGCTCAGAATCCA-3'	86
IL-2	AF033563	F: 5'- TTCAAAATATCGAAAAGAACCTCAAG-3' R: 5'- CGGTGTGATTTAGACCCGTAAGAC-3'	51
IL-4	AJ621249	F: 5'- GTGCCCACGCTGTGCTTAC-3' R: 5'- AGGAAACCTCTCCCTGGATGTC-3'	82
IL-10	AJ621614	F: 5'- CGCTGTCACCGCTTCTTCA-3' R: 5'- TCCCGTTCTCATCCATCTTCTC-3'	85
IFN-γ	Y07922	F: 5'- GTGAAGAAGGTGAAAGATATCATGGA-3' R: 5'- GCTTTGCGCTGGATTCTCA-3'	71
TNF-α	374125	F: 5'- AATTTGCAGGCTGTTTCTGC-3' R: 5'- TATGAAGGTGGTGCAGATGG-3'	112
TGF- β4	M31160	F: 5'- ACCTCGACACCGACTACTGCTT-3' R: 5'- ATCCTTGCGGAAGTCGATGT-3'	86
28S	DQ018756	F: 5'- GGCGAAGCCAGAGGAAACT-3' R: 5'- GACGACCGATTTGCACGTC-3'	62

نتایج و بحث

تکثیر ژن‌های سایتوکینی

نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR برای ژن‌های اینترلوکین ۱، ۲، ۴ و ۱۰ و 28s در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج الکتروفورز بیان این ژن‌ها را در سلول‌های طحال مرغ‌های گوشتی تأیید کرد و به‌صورت یک باند روی ژل آگارز ۲ درصد ظاهر شدند. الکتروفورز محصولات PCR به‌ترتیب 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 و TGF β4باندی بر روی ژل آگارز تشکیل نشد. پس از تأیید تکثیر قطعات مورد نظر، تکنیک qPCR در زمان واقعی جهت بررسی بیان ژن‌های موردنظر اجرا گردید.



شکل ۱- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز. A: ژن اینترلوکین ۱ و ۲ B: اینترلوکین ۴ و ۱۰ C: 28s روی ژل آگارز ۲ درصد. M: مارکر مولکولی ۱۰۰ bp
Fig 1. electrophoresis of PCR products for A) IL-1 and IL-2, B) IL-4 and IL-10, C) 28S on the 2% Agarose gel. M: size marker 100bp

اثر آلفالیپوئیک اسید بر بیان نسبی ژن‌ها

نتایج حاصل از تاثیر آلفالیپوئیک اسید بر بیان نسبی ژن‌های مرتبط با ایمنی بافت طحال جوجه‌های گوشتی در جدول ۳ ارائه شده است. اعداد داخل جدول براساس روش واحد اختیاری (Arbitrary unit) ارائه شده است (Rabieh *et al.*, 2020). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر آلفالیپوئیک اسید بر بیان نسبی ژن‌های مرتبط با ایمنی معنی‌دار بوده است. همانطور که نتایج نشان می‌دهند بیان ژن‌های اینترلوکین ۱ در گروه دریافت‌کننده اسید آلفالیپوئیک (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است ($p\leq ۰/۰۵$). در حالی‌که افزودن

اسید آلفالیپوئیک تأثیری بر بیان نسبی ژن‌های اینترلوکین ۲، ۴ و ۱۰ ندارد.

اثر پروپیونات کروم بر بیان نسبی ژن‌ها

نتایج حاصل از تأثیر پروپیونات کروم بر بیان نسبی ژن‌های مرتبط با ایمنی بافت طحال جوجه‌های گوشتی در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر پروپیونات کروم بر بیان نسبی ژن‌های مرتبط با ایمنی معنی‌دار بوده است ($p\leq$۰/۰۱).

جدول ۳- تأثیر سطوح مختلف آلفالیپوئیک اسید و پروپیونات کروم بر بیان نسبی ژن‌های مرتبط با ایمنی در طحال جوجه‌های گوشتی

Table 3. The effect of different levels of alpha-lipoic acid and chromium propionate on the expression of immune-related genes in the spleen of broiler chickens.

			اینترلوکین ۱ (IL1)	اینترلوکین ۲ (IL-2)	اینترلوکین ۴ (IL-4)	اینترلوکین ۱۰ (IL-10)
اثرات اصلی (Main effects)						
آلفالیپوئیک اسید (میلی‌گرم) Alpha-lipoic acid (mg)	0		2.17[a]	0.90	1.74	0.88
	300		1.34[b]	1.23	1.61	0.95
خطای استاندارد میانگین Standard error of the mean (SEM)			0.22	0.18	0.13	0.10
پروپیونات کروم (میکروگرم/کیلوگرم) Chromium propionate (µg /kg)	0		0.85[b]	1.01	0.79[b]	1.03
	750		1.44[b]	1.16	1.23[b]	0.92
	1500		2.97[a]	1.03	3.01[a]	0.80
خطای استاندارد میانگین Standard error of the mean (SEM)			0.28	0.22	0.17	0.12
اثرات متقابل (Interaction effects)						
تیمار ۱ (Treatment 1)	0	0	1.00	1.00	1.00	1.00
تیمار ۲ (Treatment 2)	750	0	1.55	1.01	1.10	1.06
تیمار ۳ (Treatment 3)	1500	0	3.95	1.00	3.12	0.93
تیمار ۴ (Treatment 4)	0	300	0.71	0.72	0.59	0.71
تیمار ۵ (Treatment 5)	750	300	1.34	1.33	1.36	0.91
تیمار ۶ (Treatment 6)	1500	300	1.98	1.35	2.89	0.88
خطای استاندارد میانگین Standard error of the mean (SEM)			0.39	0.32	0.24	0.17
سطح احتمال Probability						
آلفالیپوئیک اسید Alpha-lipoic acid			0.02	0.23	0.53	0.63
پروپیونات کروم Chromium propionate			0.0005	0.88	0.0001	0.44
آلفالیپوئیک اسید × پروپیونات کروم Alpha-lipoic acid Chromium × propionate			0.08	0.63	0.39	0.80

a-b: در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مختلف تفاوت آماری معنی‌داری دارند ($P\leq$۰/۰۵).

a-b: Means with different alphabet in columns differ significantly ($p<0.05$).

همانطور که نتایج نشان می‌دهند بیان نسبی ژن‌های اینترلوکین ۱ و ۴ در گروه دریافت کننده سطح ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم پروپیونات کروم (T3) نسبت به گروه شاهد (T1) و گروه دریافت کننده ۷۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم پروپیونات کروم (T2) به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P\leq$۰/۰۱). سطوح بیان نسبی ژن‌های اینترلوکین ۲ و ۱۰ در گروه‌های دریافت کننده پروپیونات کروم مشابه گروه شاهد بود.

اثرات متقابل آلفالیپوئیک اسید و پروپیونات کروم

همانطور که در جدول ۳ آمده است تنها اثرات متقابل در ژن اینترلوکین ۱ معنی‌دار شده است و برای ژن های اینترلوکین ۲ و ۴ و ۱۰ معنی‌دار نشده است. بیشترین میزان بیان ژن اینترلوکین ۱ در گروه تغذیه شده با سطح ۱۵۰۰ میکروگرم پروپیونات کروم مشاهده شد. افزودن ۱۵۰۰ میکروگرم پروپیونات کروم منجر به افزایش بیان ژن اینترلوکین ۱ شده است. تفاوتی در بیان ژن اینترلوکین ۱ در سطح ۷۵۰ میکروگرم پروپیونات کروم با شاهد مشاهد نشد. در نتیجه افزودن ۷۵۰ میکروگرم پروپیونات کروم نتوانسته است بیان ژن اینترلوکین ۱ را تحت تاثیر قرار دهد. افزودن همزمان ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسید آلفالیپوئیک با ۱۵۰۰ میکروگرم پروپیونات کروم به جیره توانسته است اثرات کروم را خنثی کند. در نتیجه بیان نسبی ژن اینترلوکین ۱ در گروه تغذیه شده به‌طور همزمان با ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسید آلفالیپوئیک و۱۵۰۰ میکروگرم پروپیونات کروم با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت.

در مورد بیان ژن اینترلوکین ۴، افزودن ۱۵۰۰ میکروگرم پروپیونات کروم منجر به افزایش بیان این ژن شده است و افزودن ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسید آلفالیپوئیک هم نتوانسته است از این افزایش جلوگیری کند در نتیجه تفاوت معنی‌داری در بیان ژن اینترلوکین ۴ در تیمار (T6) تغذیه شده با ۱۵۰۰ میکروگرم پروپیونات کروم و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسید آلفالیپوئیک با تیمار (T3) تغذیه شده با ۱۵۰۰ میکروگرم پروپیونات کروم مشاهده نشد.

بررسی‌ها نشان داده‌اند که وجود آنتی‌اکسیدان‌های مناسب در جیره جوجه ها می‌تواند پاسخ ایمنی را افزایش دهد (Kurutas *et al.*, 2015). در مطالعه حاضر، طحال به‌عنوان یک اندام لنفاوی ثانویه انتخاب شد، زیرا محل پاسخ‌های ایمنی ذاتی و تطبیقی است (Oláh & Vervelde., 2008). نقش مواد مغذی غذایی در تعدیل پاسخ ایمنی توجه زیادی را در تحقیقات حیوانی به‌خود جلب کرده است. نقش مواد مغذی مختلف جیره غذایی مانند ویتامین‌ها و مواد معدنی در تعدیل

ایمنی از طریق تأثیر بر بیان سایتوکین‌ها مشخص می‌شود (Kidd., 2004).

نتایج الکتروفورز نشان داد که ژن‌های اینترفرون گاما (IFN –γ)، فاکتور نکروزه کننده تومور آلفا (TNF-α) و TGF β4 در طحال جوجه گوشتی استفاده در این آزمایش تحت جیره غذایی (آلفالیپوئیک اسید و پروپیونات کروم) و شرایط پرورشی بیان نمی‌شوند و حضور این ژن‌ها در بافت طحال مشخص نشد. نتایج این تحقیق با نتایج دیگر محققان همخوانی دارد (Nobakht & Muhaghegh Dolatabadi, 2018). 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 سایتوکینی است که برای ایمنی ذاتی و تطبیقی در برابر برخی از عفونت‌های ویروسی، باکتریایی و تک یاخته‌ای 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 زمانی‌که برای سنتز اینترفرون گاما القاء نشده باشند، معمولاً این کار را انجام نمی‌دهند و عفونت‌های ویروسی یکی از عومل قوی تولید اینترفرون‌ها هستند. با توجه به این‌که در این پژوهش جوجه‌ها تحت تأثیر چالش ایمنی قرار نداشتند و تیمارهای آزمایشی (آلفالیپوئیک اسید و پروپیونات کروم) نیز دارای ترکیبات میتوژنی نمی‌باشد، به‌نظر می‌رسد که این مواد نتوانند باعث تحریک بیان ژن اینترفرون‌گاما شوند. این موضوع را می‌توان به ژن‌های TNF-α و TGF-β هم تعمیم داد. این ژن‌ها در زمان حضور یک محرک بیماری زا بیان می‌شوند. سایتوکین TNF-α با بودن عوامل میکروبی مثل لیپوپلی‌ساکاریدها، تولید شده و باعث می‌شود سلول های 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. بنابراین نقش اصلی TNF-αایجاد پاسخ‌های التهابی موضعی نسبت به میکروب‌ها می‌باشد (Pfeffer., 2003). فاکتور رشد تغییردهنده بتا (TGF-β) نیز یکی از پروتئین مهم در تنظیم فرایندهای التهابی است. اثرات محافظتی TGF-β در انواع مختلفی از واکنش‌های ایمنی بخصوص در مواردی که بافت خاصی درگیر می‌شود به اثبات رسیده 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).

طبق نتایج ارائه شده در جدول ۳ افزودن مکمل اسید آلفالیپوئیک در سطح ۳۰۰ میلی گرم سبب کاهش بیان ژن IL-1 شده است و این در حالی است که افزودن این مکمل تاثیری بر بیان ژن های IL-2 ، IL-4 و IL-10 نداشته است. مطابق با این نتایج، محققین نشان دادند که اسید آلفا لیپوئیک التهاب حاد را کاهش داده و به حرکت لیپیدها در طول پاسخ التهابی در بافت چربی سفید موش کمک می‌کند (Guo et al., 2016). مطالعات نشان داده که افزودن اسید آلفالیپوئیک سبب بهبود عملکرد، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کنترل پاسخ التهابی در جوجه‌های گوشتی می‌شود. اسید آلفالیپوئیک می‌تواند با مسدود کردن تولید و بیان سیتوکین‌ها دارای اثرات ضد التهابی باشد (Guo *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015). همچنین، مصرف جیره های حاوی ویتامین C، ویتامین E و اسید آلفالیپوئیک به‌طور قابل توجهی سطوح بیان ژن‌های IL-1β، IL6، IFN-γ و TNF-α را در طحال جوجه‌های گوشتی ۲۱ روزه در مقایسه با گروه شاهد کاهش داد ند (El-Senousey *et al.*, 2018). علاوه‌براین، پس از تزریق دگزامتازون، گروه دریافت کننده اسید آلفالیپوئیک بیشترین تاثیر را بر پاسخ ایمنی داشت زیرا به‌طور قابل‌توجهی سطوح بیان IL-1β، IL6، IFN-γ و TNF-α را در مقایسه با سایر تیمارها کاهش داد، احتمالاً به‌دلیل توانایی اسید آلفالیپوئیک در بازگرداندن پروتئین‌های مرتبط با استرس و پاسخ‌های ایمنی باشد (Lu et al., 2017).

از مهمترین سایتوکین‌های پیش التهابی اصلی IL-1 ، IL-4 و TNF-α و غیره هستند. این سایتوکین ها به گیرنده‌های اختصاصی خود بر سطح سلول هدف متصل شده و به‌دنبال 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 تاثیر می‌گذارند (Opal & DePalo., 2000). اینترلوکین ۴ فعالیت بیولوژیکی اساسی در توسعه التهاب آلرژیک به‌دلیل توانایی در تمایز T کمکی نوع TH0 به TH2 دارد. اینترلوکین ۴ یک اینترفرون پیش التهابی است که بیان eotaxin و سایر سایتوکین‌های التهابی را افزایش می‌دهد که ممکن است به التهاب کمک کند (Steinke & Larry, 2001). کاهش اینترفرون های پیش التهابی (IL-1 و IL-4) در این تحقیق به معنی جلوگیری از التهاب است. با کاهش این اینترفرون‌ها آبشار مولکولی درون سلولی هم تشکیل نخواهد شد یا کاهش می‌یابد و از اثرات بعدی جلوگیری به‌عمل 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 می شوند مانند اینترفرون گاما و IL-2 جلوگیری می‌کند. ازاین ترکیب ضدالتهابی برای درمان بیماری‌های التهابی روده در آزمایشات بالینی استفاده شده است (Opal & DePalo., 2000). همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شد افزودن مکمل اسید آلفالیپوئیک بر بیان IL-2 و IL-10 نداشته است.

طبق نتایج ارائه شده در جدول ۳ افزودن مکمل پروپیونات کروم در سطح ۱۵۰۰ میکروگرم سبب افزایش بیان ژن‌های IL-1 و IL-4 شده است و این در حالی است که افزودن مکمل های کروم تاثیری بر بیان ژن های IL-2 و IL-10 نداشته است. البته بایستی در نظر داشت افزودن مکمل پروپیونات کروم تا سطح ۷۵۰ میکروگرم تاثیری بر بیان ژن‌های IL-1 و IL-4 نداشته است. گزارش‌های مربوط به خوک، گاو و سایر گونه‌ها اثرات متفاوتی از کروم در پاسخ ایمنی را نشان می‌دهد. گزارش‌هایی مبنی بر سرکوب ایمنی

(Khangarot *et al.*, 1999) بعضی گزارش‌ها افزایش (Uyanik *et al.*, 2002) و بعضی گزارش‌ها عدم تاثیر کروم بر ایمنی بدن ارائه شده است (Van de Ligt *et al.*, 2002). تفاوت در گزارش‌های مختلف می‌تواند به‌دلیل تفاوت در شکل کروم، دوز مصرف و گونه حیوان باشد. مشخص شده که کروم نقش تنظیم‌کننده ایمنی در جوجه‌های گوشتی دارد زیرا بر بیان ژن IFN-γ در برابر واکسن بیماری نیوکاسل به روشی وابسته به دوز و مسیر تأثیر می‌گذارد. مکمل کروم در دوز و مسیر مناسب ممکن است یک رویکرد موثر در برابر واکسن بیماری نیوکاسل از طریق افزایش بیان IFN-γ یا ایمنی سلولی داشته باشد (Bhagat *et al.*, 2008). یک بررسی نشان داد که مکمل کروم التهاب را کاهش داده و بیان ژن PPAR-γ، GLUT-1، LDLR و IL-1 را بهبود بخشید. اگرچه بر بیان ژن‌های IL-8، TNF-α، TGF-β و VEGF تأثیری نداشت (Amiri Siavashani *et al.*, 2018). در مطالعه دیگری، مصرف کروم نیاسینات به‌مدت ۷ هفته باعث کاهش سطح سایتوکین‌های پیش التهابی (TNF-α، IL-6 و CRP) و استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی دیابتی شد (Jain *et al.*, 2007). اثر سرکوب کننده کروم بر نشانگرهای پیش التهابی ممکن است با غیرفعال کردن مسیرهای استرس اکسیداتیو و کاهش فسفوریلاسیون Akt مرتبط با آبشار مقاومت به انسولین در کبد تسهیل شود (Bartlett & Eperjesi, 2008).

نتیجه‌گیری کلی

افزودن ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسید آلفالیپوئیک به جیره می‌تواند سبب بهبود پاسخ ایمنی ذاتی با کاهش بیان ژن اینترلوکین ۱ در جوجه‌های گوشتی گردد. به‌علاوه، افزودن مقادیر بالای پروپیونات کروم (۱۵۰۰ میکروگرم) منجر به کاهش ایمنی (با افزایش بیان ژن اینترلوکین ۱ و ۴) می‌گردد. در حالی‌که افزودن پروپیونات کروم تا سطح ۷۵۰ میکروگرم تاثیر بر ایمنی ندارد. با در نظر گرفتن نتایج، افزودن اسید آلفالیپوئیک در سطح ۳۰۰ میلی‌گرم به جیره جوجه‌های گوشتی توصیه می‌گردد. افزودن پروپیونات کروم تا سطح ۷۵۰ میکروگرم در صورتی‌که اثرات مفیدی بر عملکرد و خصوصیات تولیدی داشته باشد بلامانع است.

References

Amiri Siavashani, M., Zadeh Modarres, S. Mirhosseini, N. Aghadavod, E. Salehpour, S. & Asemi, Z. (2018). The effects of chromium supplementation on gene expression of insulin, lipid, and inflammatory markers in infertile women with polycystic ovary syndrome candidate for in vitro fertilization: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 726.

Bartlett, H. E. & Eperjesi, F. (2008). Nutritional supplementation for type 2 diabetes: a systematic review. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 28(6), 503-523.

Bhagat, J., Ahmed, K. A. Tyagi, P. Saxena, M. & Saxena, V.K. (2008). Effects of supplemental chromium on interferon-gamma (IFN-γ) mRNA expression in response to Newcastle disease vaccine in broiler chicken. *Research in veterinary science*, 85(1), 46-51.

Chenani, H., Nazari, M. Beigi Nassiri, M. T. & Roshanfekr, H. (2021). Exonic SNP in MHC-DMB2 is associated with gene expression and humoral immunity in Japanese quails. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 239, Article 110302.

Dinarello, C. A. (2007). Historical insights into cytokines. Eur. *Journal of Immunology*, 37, S34–45.

Downing, T., Lloyd, A. T. O'Farrelly, C. & Bradley, D.G. (2010). The differential evolutionary dynamics of avian cytokine and TLR gene classes. *The Journal of Immunology*, 184(12), 6993-7000.

El-Senousey, H. K., Chen, B. Wang, J. Y. Atta, A. M. Mohamed, F. R. & Nie, Q. H. (2018). Effects of dietary vitamin C, vitamin E, and alpha-lipoic acid supplementation on the antioxidant defense system and immune-related gene expression in broilers exposed to oxidative stress by dexamethasone. *Poultry science*, 97(1), 30-38.

Fietta, P. & Delsante, G. (2009). The effector T helper cell triade. *In Biology Forum/Rivista di Biologia*, 102, 1.

Frisard, M. & Ravussin, E. (2006). Energy metabolism and oxidative stress. *Endocrine*, 29(1), 27-32.

Granchi, D., Verri, E. Ciapetti, G. Savarino, L. Cenni, E. Gori, A. & Pizzoferrato, A. (1998). Effects of chromium extract on cytokine release by mononuclear cells. *Biomaterials*, 19(1-3), 283-291.

Guo, J., Gao, S. Liu, Z. Zhao, R. & Yang, X. (2016). Alpha-lipoic acid alleviates acute inflammation and promotes lipid mobilization during the inflammatory response in white adipose tissue of mice. *Lipids*, 51(10), 1145-1152.

Guo, Z. Y., Li, J. Zhang, L. Jiang, Y. Gao, F. & Zhou, G. H. (2014). Effects of alpha-lipoic acid supplementation in different stages on growth performance, antioxidant capacity and meat quality in broiler chickens. *British poultry science*, 55(5), 635-643.

Jain, S. K., Rains, J. L. & Croad, J. L. (2007). Effect of chromium niacinate and chromium picolinate supplementation on lipid peroxidation, TNF-α, IL-6, CRP, glycated hemoglobin, triglycerides, and cholesterol levels in blood of streptozotocin-treated diabetic rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(8), 1124-1131.

Khangarot, B. S., Rathore, R. S. & Tripathi, D. M. (1999). Effects of chromium on humoral and cell-mediated immune responses and host resistance to disease in a freshwater catfish, Saccobranchus fossilis (Bloch). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43(1), 11-20.

Kidd, M. T. (2004). Nutritional modulation of immune function in broilers. *Poultry science*, 83(4), 650-657.

Koohgivi, K., Rooshanfekr, H. Nazari, M. & Tatar, A. (2021). The effect of substitution to DL-methionine with L-methionine and dietary protein levels on Expression Myogenic Genes in Japanese quail. *Iranian Veterinary Journal*, 16(4), 64-73.

Kurutas, E. B. (2015). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition journal*, 15(1), 1-22.

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

Li, Y., Ma, Q. G., Zhao, L. H., Wei, H. Duan, G. X. Zhang, J. Y. & Ji, C. (2014). Effects of lipoic acid on immune function, the antioxidant defense system, and inflammation-related genes expression of broiler chickens fed aflatoxin contaminated diets. *International journal of molecular sciences*, 15(4), 5649-5662.

Lu, M., Bai, J. Xu, B. Sun, Q. Wei, F. Tang, X. & Li, S. (2017). Effect of alpha-lipoic acid on relieving ammonia stress and hepatic proteomic analyses of broilers. *Poultry Science*, 96(1), 88-97.

Ma, Q., Li, Y. Fan, Y. Zhao, L. Wei, H. Ji, C. & Zhang, J. (2015). Molecular mechanisms of lipoic acid protection against aflatoxin B1-induced liver oxidative damage and inflammatory responses in broilers. *Toxins*, 7(12), 5435-5447.

Mayr, J. A., Feichtinger, R. G. Tort, F. Ribes, A. & Sperl, W. (2014). Lipoic acid biosynthesis defects. Journal of inherited metabolic disease, 37(4), 553-563.

Meydani, S. N., Meydani, M. Blumberg, J. Leka, L. Pedrosa, M. Diamond, R. & Schaefer, E. (1998). Assessment of the safety of supplementation with different amounts of vitamin E in healthy older adults. *The American journal of clinical nutrition*, 68(2), 311-318.

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

Mosavi, S. T., Beigi Nassiri, M. T., Roshanfekr, H. R., Nazari, M. & 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).

Nazari, M., Ghorbani, M. R., Beigi Nassiri, M. T., Fathimoghadam, N., Sabahi, R. & Mosavi, S. T. (2023). The effects of Chaste-berry fruits on hypothalamic-pituitary-ovarian markers gene expression and immune response of laying hens: Phytoestrogens in Chaste-berry are ERβ-selective. *Iranian Veterinary Journal*, 19(1), 61-71.

Nazari, M., Salabi, F. & Radpoor, S. (2020). Investigation of heat shock protein 70 gene polymorphism in Khuzestan native chickens. *Agricultural Biotechnology Journal*, 12 (1), 81-100.

Nobakht, E. & 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).

Oláh, I. & Vervelde, L. (2008). Structure of the avian lymphoid system. 13. Avian Immunology. Elsevier Academic Press Inc. pp: 13-50.

Opal, S. M. & DePalo, V. A. (2000). Anti-Inflammatory Cytokines, impact of basic research on tomorrow's medicine. *Chest*, 117(4), 1162–1172.

Peters, M. A, Browning, G.F. Washington, E. A. Crabb, B. S. & Kaiser, P. (2003). Embryonic age influences the capacity for cytokine induction in chicken thymocytes. *Immunology*, 110: 358–367.

Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & 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, 1-10

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

Piva, A., Meola, E. Gatta, P. Biagi, G. Castellani, G. Mordenti, A. & Mordenti, A. (2003). The effect of dietary supplementation with trivalent chromium on production performance of laying hens and the chromium content in the yolk. *Animal Feed Science and Technology*, 106(1-4), 149-163.

Rabieh, M., Rooshanfekr, H. Nazari, M. & 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).

Ramiro, E., Franch, A. Castellote, C. Andrés-Lacueva, C. Izquierdo-Pulido, M. & Castell, M. (2005). Effect of Theobroma cacao flavonoids on immune activation of a lymphoid cell line. *British Journal of Nutrition*, 93(6), 859-866.

Sabahi, R., Nazari, M. Beigi Nassiri, M. T. & 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).

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

Steinke, J.W. & Larry, B. (2001). Th2 cytokines and asthma—Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res*, 2(2), 66-70.

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

Uyanik, F., Atasever, A. Özdamar, S. & Aydin, F. (2002). Effects of dietary chromium chloride supplementation on performance, some serum parameters, and immune response in broilers. *Biological trace element research*, 90(1), 99-115.

Van de Ligt, J. L. G., Lindemann, M D. Harmon, R. J. Monegue, H. J. & Cromwell, G. L. (2002). Effect of chromium tripicolinate supplementation on porcine immune response during the postweaning period. *Journal of animal science*, 80(2), 449-455.

Wollin, S. D. & Jones, P. J. (2003). Alpha-Lipoic acid and cardiovascular disease. *The Journal of nutritio*n, 133(11), 3327-3330.

Zhang, Q. & Luo, X. (2006). Effect of dietary chromium on growth performance, immune functions and carcass quality of broilers. *Chinese Journal of Animal Science*, 42(9), 19.

Zhang, S., Sun, X. Liao, X. Lu, L. Zhang, L. Ma, Q. & Luo, X. (2018). Dietary supplementation with chromium picolinate influences serum glucose and immune response of brown-egg laying hens. *Biological Trace Element Research*, 185(2), 448-455.