بیان ژن‌های سیتوکین در بافت طحال جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح متفاوت آرد میوه بلوط

چکیده

جایگزینی ذرت با میوه بلوط در جیره طیور می تواند منجر به کاهش وابستگی و خروج ارز از کشور شود، اما بلوط دارای مقدار زیادی ترکیبات ضد تغذیه ای (تانن) است که می تواند عامل محدود کننده‌ای در مصرف آن باشد. بنابراین بررسی اثرات مقادیر مختلف میوه بلوط در جیره بر عملکرد و سیستم ایمنی طیور ضروری می باشد تا سطوح مناسب بلوط برای استفاده در جیره طیور مشخص گردد. از این رو، هدف از این پژوهش، بررسی بیان ژن‌های سیتوکین در بافت طحال جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی آرد میوه بلوط بود. به این منظور از سه جیره حاوی صفر، ۱۵و ۲۰ درصد آرد میوه بلوط برای تغذیه جوجه‌های گوشتی در یک دوره ۴۲ روزه استفاده شد. در سنین ۲۱ و ۴۲ روزگی جوجه ها، اندام طحال از تعداد ۱۸ قطعه جوجه کشتار شده جدا گردید (از هر تیمار ۶ عدد)، و از هر کدام RNA کل استخراج گردید و بیان ژن‌های IL-2، IL-4، IL-5، IL-10، IL-13 و IFN- γ در هر ۳ تیمار مشخص گردید. از ژن بتا اکتین نیز به عنوان ژن مرجع استفاده شد. داده‌های حاصل از این بررسی با استفاده از نرم افزار REST 2009 V2.0.13 ارزیابی آماری گردید. با توجه به نتایج، بیان ژن IFN-γ در اندام طحال جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با ۱۵ درصد آرد میوه بلوط نسبت به گروه شاهد در هر دو سن ۲۱ و ۴۲ روزگی افزایش معنی‌داری داشت ($p<0.05$). در تیمار تغذیه شده با ۲۰ درصد آرد میوه بلوط، اگرچه میزان بیان ژن IFN-γ در هر دو سن ۲۱ و ۴۲ روزگی، بالاتر از تیمار شاهد بود ولی این اختلاف معنی‌دار نبود. در سن ۲۱ روزگی، بیان ژن IL-4 در جیره حاوی ۱۵ درصد آرد میوه بلوط نیز افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد ($p<0.01$). از طرف دیگر، در سن ۴۲ روزگی، بیان ژن‌های اینترلوکین ۲ و ۴ در تیمار ۱۵ درصد آرد میوه بلوط نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($p<0.05$). مقایسه بیان ژن‌های IL-5، IL-10 و IL-13 در تیمارهای حاوی بلوط در هر دو سن ۲۱ و ۴۲ روزگی نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند. . بطور کلی، جایگزینی ذرت با بلوط در جیره جوجه های گوشتی، بر اساس مقدار و مدت زمان مورد استفاده، می‌تواند منجر به تغییر بیان ژن‌های سیستم ایمنی در بافت طحال شوند.

واژه‌های کلیدی: اینترلوکین، بلوط، بیان ژن، جوجه گوشتی، طحال

مقدمه

امروزه در کشورهای در حال توسعه به دلیل بهبود سطح درآمد و تغذیه، تقاضا برای مصرف پروتئین به شدت افزایش پیدا کرده است و مرغ گوشتی یکی از مهمترین منابع تامین پروتئین حیوانی محسوب می‌شود. از این رو، فراهم ساختن شرایط مناسب و ارزان برای پرورش جوجه‌های گوشتی می‌تواند یکی از اصول راهبردی سیاست‌های ملی در کشور ما باشد. از طرف دیگر، ذرت یکی از خوراک‌های عمده و اصلی در جیره طیور بوده که قسمت اعظم آن از طریق واردات تامین می‌شود. از این رو، شناخت کمی و کیفی منابع خوراکی بومی جایگزین در جیره غذایی طیور و ارائه الگوهای صحیح و اصولی جهت استفاده بهینه از این مواد خوراکی امری لازم و ضروری می‌باشد. از جمله این مواد خوراکی موجود و در دسترس در کشور، میوه بلوط بوده که می‌تواند جایگزین مناسبی برای ذرت در ترکیب جیره غذایی طیور در نظر گرفته شود. بلوط یکی از مهمترین و فراوان‌ترین گونه درختی موجود در استان‌های غربی و جنوب غربی کشور از جمله ایلام، کهکیلویه و بوراحمد و فارس می‌باشد که میوه آن از نظر کربوهیدرات نشاسته غنی بوده و با انرژی قابل متابولیسم ۳۳۰۰ کیلو کالری به ازای هر کیلوگرم (Saeidi *et al*., 2017) می‌تواند به عنوان یک ماده خوراکی جایگزین ذرت در جیره طیور در نظر گرفته شود. البته محدودیت اصلی در استفاده از میوه بلوط در جیره طیور، وجود ترکیبات ضد تغذیه‌ای (تانن‌ها) در آن است (Shimada, 2001).

تانن‌ها گروهی متنوع از ترکیبات فنلی با وزن مولکولی بین ۵۰۰ تا ۲۰۰۰۰ دالتون می‌باشند که به طور گسترده در طبیعت پراکنده می‌باشند (Vuolo *et al*., 2019). ترکیبات ضد تغذیه‌ای (تانن ها) متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند که معمولاً در شرایط استرس تولید می‌شوند و نقش محافظتی برای گیاه در مواردی مانند محافظت نوری در برابر اشعه ماورا بنفش، رادیکال‌های آزاد و یا دفاع در برابر موجودات دیگر و شرایط محیطی مانند خشکی را به عهده دارند (Barbehenn and Constabel, 2011; de Hoyos-Martinez *et al*., 2019; Shirmohammadli *et al*., 2018). از فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف تانن‌ها می‌توان به فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها اشاره کردکه به ساختار شیمیایی آنها مربوط می‌شود زیرا آنها دارای حلقه‌های فنلی هستند که می‌توانند به طیف گسترده‌ای از مولکول‌ها متصل شده و به عنوان جاذب الکترون برای به دام انداختن یون‌ها و رادیکال‌ها عمل کنند. آنها همچنین گروه‌های هیدروکسیلی زیادی دارند که به آنها ویژگی‌های آب دوست، حلالیت در حلال‌های آبی و همچنین توانایی تشکیل کمپلکس‌هایی با پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، اسیدهای نوکلئیک و آلکالوئیدها را می‌دهد. (de Hoyos-Martinez *et al*., 2019; Shirmohammadli *et al*., 2018). از طرف دیگر، با محدود شدن استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در تولیدات دامی، تمایل روزافزون صنعت دام و طیور به یافتن گزینه‌های گیاهی برای جایگزینی آنتی بیوتیک‌ها در خوراک افزایش یافته است. به عنوان مثال، در مطالعات گسترده‌ای که بر روی

خوک انجام شده، شواهد زیادی از فیتوبیوتیک‌ها به عنوان گزینه‌های احتمالی برای آنتی بیوتیک‌ها جهت بهبود عملکرد رشد و سلامت به دست آمده است (Liu *et al*., 2013; Liu et al., 2014; Michiels *et al*., 2010). همچنین، ترکیبات فنولی با تنظیم فعالیت آنزیم‌های هدف و نیز تنظیم بیان ژن، باعث ایجاد تغییر در فعالیت‌های آنزیمی و رونویسی می‌شوند (Kumari and Jain, 2012). یکی دیگر از ویژگی‌های مهم تانن‌ها قابلیت اتصال آن‌ها به پروتئین‌های جیره می‌باشد، بنابراین با ایجاد بازدارندگی در عمل آنزیم‌ها، موجب اختلال در فعالیت آنزیم‌های مورد استفاده در امر هضم نشاسته شده و باعث کاهش انرژی می‌شود (Mahmood and Smithard, 1993).

طی سال‌های اخیر تاثیر ترکیبات مختلف پلی فنولی در بیان ژن‌های سیتوکین در سیستم ایمنی، موضوع بسیاری از مطالعات بوده است (Kaleem *et al*., 2014; Madhuri *et al*., 2011; Marzo *et al*., 1990). بطورکلی، سیتوکین‌ها واسطه‌های تنظیم کننده ایمنی هستند که توسط اندام‌های سیستم ایمنی سنتز شده و نقش اصلی را در تنظیم پاسخ‌های ایمنی بر ضد عفونت‌های مختلف ایفا می‌کنند. از سیتوکین‌های رایج می‌توان به اینترلوکین‌ها اشاره کرد که توسط انواع گویچه‌های سفید خون سنتز شده و بر لنفوسیت‌های دیگر مؤثر می‌باشند (Banks *et al*., 1994). تاثیر ترکیبات فنولی مانند تانن‌ها بر ترشح و سنتز سیتوکین‌ها در اندام‌های سیستم ایمنی در تحقیقات متعددی تایید شده است. برای مثال، نوبخت و محقق دولت آبادی گزارش کردند که بیان ژن‌های IL-2 و IL-13 در بافت بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با ۲۰ درصد آرد میوه بلوط کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشتند (Nobakht and Muhaghegh, 2019). از طرف دیگر، استفاده طولانی مدت از ترکیبات پلی فنولی چای به همراه باکتری *Lactobacillus brevis* M8 در جوجه‌های گوشتی، بیان سیتوکین‌های IFN-γ، TNF-α، IL-10، IL-6 و IL-1β که نقش مهمی در سیستم ایمنی بدن و پاسخ التهابی ایفا می‌کنند را در سلول‌های روده کاهش داد (Li *et al*., 2015). بنابراین، جهت استفاده از مواد خوارکی مانند بلوط در جیره طیور، که حاوی مقادیر نسبتا بالایی از تانن است، درک خصوصیات شیمیایی و اثرات بیولوژیکی این ترکیبات بسیار مهم است.

طحال به عنوان یک اندام سیستم ایمنی، با تولید، بلوغ و ذخیره لنفوسیت‌ها در خود، نقش اساسی در هر دو پاسخ ایمنی هومورال و سلولی داشته (Smith and Hunt, 2004) و بیان ژن در این عضو بدن معمولاً به عنوان شاخص واکنش ایمنی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Redmond *et al*., 2010). بر این اساس، هدف از تحقیق حاضر، بررسی تغییرات بیانی در ژن‌های سیتوکین در طحال جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح ۱۵ و ۲۰ درصد آرد میوه بلوط در جیره نسبت به گروه شاهد می‌باشد تا تاثیر مقدار بلوط جیره بر واکنش سیستم ایمنی در طحال جوجه های گوشتی ارزیابی گردد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تعداد ۱۳۲ قطعه جوجه گوشتی یک روزه از هر دو جنس (نر و ماده) از سویه تجاری کاپ ۵۰۰، در قالب طرح کاملا تصادفی، با ۳ تیمار به مدت ۴۲ روز داخل جایگاه بسته پرورش داده شدند. در گروه شاهد، جوجه‌ها از جیره پایه فاقد آرد میوه بلوط استفاده نمودند، در حالی که جوجه‌های گروه دوم و سوم به ترتیب از جیره حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد آرد میوه بلوط تغذیه شدند. جیره‌های غذایی مورد استفاده در آزمایش براساس توصیه‌های انجمن ملی تحقیقات (NRC, 1994) تهیه شد. در هر یک از سنین ۲۱ و ۴۲ روزگی پرورش، تعداد ۱۸ جوجه با نسبت جنسی یکسان (تعداد ۶ جوجه از هر گروه) انتخاب، و پس از کشتار، بافت طحال از هر جوجه توسط تیغ سترون (استریل) جدا شد و به تانک نیتروژن مایع با دمای ۱۸۰- سانتی‌گراد منتقل گردید. سپس، با استفاده از کیت استخراج (ترایزول) و برپایه دستور کار شرکت سازنده (یکتا تجهیز آزما)، RNA کل از نمونه‌ها استخراج گردید. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با روش طیف سنجی (اسپکتوفتوکتری درطول موج ۲۸۰و ۲۶۰ نانومتر) و همچنین با استفاده از ژل آگارز یک درصد تعیین شد. سپس، جهت حذف هر گونه آلودگی ژنومی (DNA)، نمونه های استخراج شده RNA، در معرض هضم آنزیم DNaseI قرار گرفتند. برای انجام مرحله نسخه برداری معکوس و ساخت cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت تکاپوزیست استفاده شد. کیفیت cDNA سنتز شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد تعیین شد. در نهایت cDNA سنتز شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت بررسی بیان ژن‌های IL-2، IL-4، IL-5، IL-10، IL-13، IFN- γ و ژن β-actin به عنوان ژن مرجع از آغازگرهای تخصصی استفاده شد (جدول۱). در بین آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق، تنها آغازگرهای مورد نیاز جهت تکثیر قطعه‌ای از ژن IL-10، بر اساس توالی این ژن در بانک ژن و به کمک برنامه Primer3plus (https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) طراحی شدند. سایر آغازگرهای از مقالات چاپ شده در زمینه طیور استفاده شدند (جدول۱). در این تحقیق، جهت اندازه‌گیری بیان ژن‌ها از روش تکثیر ژن طی واکنش Real Time PCR در دستگاه CFX 96 مدل Bio Rad و با استفاده از رنگ فلورسنت سایبرگرین بر پایه روش استاندارد نسبی انجام گرفت. جهت انجام واکنش Real Time PCR از مستر میکس سایبرگرین AMPLIQON شرکت یکتاتجهیز آزما استفاده شد. برای هر نمونه در هر تیوپ ۵ میکرولیتر مستر میکس سایبرگرین، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومول، ۵۰ نانوگرم cDNA سنتز شده و ۳ میکرولیتر آب DNase Free اضافه شد و در کل حجم نهایی هر میکروتیوب به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. برای هر نمونه نیز دو تکرار در نظر گرفته شد. برنامه دمایی مورد استفاده در واکنش Real Time PCR برای ژن‌های هدف شامل دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه، دمای ۹۵ درجه

سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه و مرحله نهایی در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه بود که دو مرحله آخر به تعداد ۴۰ بار تکرار شد. برنامه دمایی مورد استفاده برای β-Actin شامل ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سلسیوس و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه بود که مراحل ۲ تا ۴ به تعداد ۴۵ بار تکرار شدند. در انتهای واکنش RT-PCR نرم افزار دستگاه به طور خودکار خط آستانه را رسم و نتایج را به صورت چرخه آستانه (Ct) گزارش می‌کند. در اندازه‌گیری نسبی تغییر در سطوح mRNA یک ژن نسبت به یک ژن مرجع که به عنوان کالیبراتور در نظر گرفته می‌شود، اندازه‌گیری می‌شود. در تحقیق حاضر تغییرات نسبی بیان ژن‌های مورد مطالعه نسبت به ژن β-Actin نرمال گردید. برای مقایسه بیان ژن‌های هدف در دو تیمار حاوی آرد میوه بلوط نسبت به گروه شاهد از نرم افزار REST 2009 استفاده شد. برنامه REST نسبت های بیان نسبی را بر اساس میانگین گروه برای ژن هدف در مقابل ژن مرجع محاسبه می کند و نتایج این نسبت ها را برای معنی دار بودن آزمون می کند. برای این منظور، مدل ریاضی مورد استفاده در این نرم افزار، بر اساس تصحیح راندمان دقیق PCR و میانگین انحراف حد آستانه بین گروه(های) نمونه و گروه(های کنترل) است (Pffafl *et al.*, 2002).

جدول۱- ویژگی‌های آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر قطعات مورد نظر ژن‌های سیتوکین

ژن	توالی آغازگر	طول (جفت باز)	منبع
اینترلوکین-۲	F: 5′-TTCTGGGACCACTGTATGCTCTT-3′ R: 5′-TACCGACAAAGTGAGAATCAATCAG-3’	۱۲۹	(Liu *et al.*, 2010)
اینترلوکین-۴	F: 5’-AATGACATCCAGGGAGAGGTTTC-3’ R: 5’-AGGCTTTGCATAAGAGCTCAGTT-3’	۱۰۰	(Liu *et al.*, 2010)
اینترلوکین-۵	F: 5’-GGAACGGCACTGTTGAAAAATAA-3’ R: 5’-TTCTCCCTCTCCTGTCAGTTGGTG-3’	۱۱۱	(Liu *et al.*, 2010)
اینترلوکین-۱۰	F: 5’-GCTGAGGGTGAAGTTTGAGGAA-3’ R: 5’-GAAGCGCAGCATCTCTGACA-3’	۴۱۰	Designed by primer3plus
اینترلوکین-۱۳	F: 5′- CTGCCCTTGCTCTCCTCTGT-3’ R: 5′-CCTGCACTCCTCTGTTGAGCTT-3’	۱۲۳	(Liu *et al.*, 2010)
اینترفرون-گاما	F: 5′-AAGTCAAAGCCGCACATCAAAC-3’ R: 5′-CTGGATTCTCAAGTCGTTCATCG-3’	۱۳۲	(Liu *et al.*, 2010)
بتا-اکتین	F: 5’-CTGTGCCCATCTATGAAGGCTA-3’ R: 5’-ATTTCTCTCTCGGCTGTGGTG-3’	۱۳۹	(Yang *et al.*, 2013)

نتایج و بحث

مقایسه بیان ژن‌های مورد مطالعه در بافت طحال جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با ۱۵ و ۲۰ درصد آرد میوه بلوط نسبت به گروه شاهد (جیره فاقد آرد میوه بلوط) در سن ۲۱ روزگی جوجه‌های گوشتی در جدول۲ آمده است. همانطور که نتایج در جدول نشان می‌دهد بیان ژن IL-4 در جیره حاوی ۱۵ درصد آرد میوه بلوط افزایش معنی‌داری ($p<0.01$) نسبت به گروه کنترل داشت. در این تیمار میزان بیان ژن IL-4 نسبت به تیمار کنترل ۲۲/۶ برابر شده است. همچنین، بیان ژن INF-γ در بافت طحال جوجه‌های گوشتی در هر دو تیمار حاوی آرد میوه بلوط نسبت به گروه شاهد روندی افزایشی داشته است، اما این تغییر تنها در جوجه های گوشتی تغذیه شده با ۱۵ درصد آرد میوه بلوط نسبت به گروه شاهد معنی‌داری بود ($p<0.05$)، بطوری که بیان ژن INF-γ در تیمار ۱۵ درصد آرد میوه بلوط نسبت به گروه شاهد ۷۵/۴۹ برابر شده است. در همین سن، بیان ژن‌های IL-2، IL-5، IL-10 و IL-13 در تیمارهای حاوی آرد میوه بلوط نسبت به گروه شاهد احتلاف معنی داری را نشان ندادند.

نتایج تجزیه و تحلیل مقایسه بیان ژن‌های مورد مطالعه بافت طحال جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با ۱۵ و ۲۰ درصد آرد میوه بلوط نسبت به گروه شاهد در سن ۴۲ روزگی در جدول ۳ آمده است. با توجه به نتایج به دست آمده، بیان ژن INF-γ در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با ۱۵ درصد آرد میوه بلوط در سن ۴۲ روزگی نسبت به جوجه‌های گوشتی گروه شاهد احتلاف معنی‌داری نشان داده ($p<0.05$) بطوری که بیان این ژن نسبت به گروه شاهد ۲۴/۷۳ برابر شده است.

جدول ۲. بیان ژن‌های سیتوکین در طحال جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح ۱۵ و ۲۰ درصد آرد میوه بلوط نسبت به گروه شاهد در سن ۲۱ روزگی

ژن	تیمار	بیان	مقدار p	نتایج
اینترلوکین-۲	تیمار ۱۵٪ بلوط	۳/۴۴	۰/۲۸	-
	تیمار ۲۰٪ بلوط	۳/۳۵	۰/۱۱	-
اینترلوکین-۴	تیمار ۱۵٪ بلوط	۲۲/۶	۰/۰۰۸	افزایش
	تیمار ۲۰٪ بلوط	۰/۶۹	۰/۷۸	-
اینترلوکین-۵	تیمار ۱۵٪ بلوط	۲/۲۷	۰/۳۹	-
	تیمار ۲۰٪ بلوط	۲/۱۰	۰/۴۰	-
اینترلوکین-۱۰	تیمار ۱۵٪ بلوط	۲/۳۶	۰/۶۸	-
	تیمار ۲۰٪ بلوط	۰/۶۳	۰/۵۹	-
اینترلوکین-۱۳	تیمار ۱۵٪ بلوط	۰/۳۹	۰/۳۵	-
	تیمار ۲۰٪ بلوط	۰/۶۲	۰/۵۸	-
اینترفرون-گاما	تیمار ۱۵٪ بلوط	۷۵/۴۹	۰/۰۳	افزایش
	تیمار ۲۰٪ بلوط	۴۲۸/۸۱	۰/۴۶	-

از طرف دیگر، بیان ژن‌های IL-2 و IL-4 در تیمار ۱۵ درصد آرد میوه بلوط نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($p<0.05$). میزان بیان ژن‌های IL-2 و IL-4 نسبت به گروه شاهد به ترتیب ۰/۲۱ و ۰/۲۶ برابر بودند (جدول۳). در این سن، اختلاف معنی‌دار در بیان ژن‌های IL-5، IL-10 و IL-13 نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد.

بطور کلی، سیتوکین‌ها، پروتئین‌های واسطه مهمی هستند که در ارتباطات شبکه‌ای برای سیستم ایمنی ضروری بوده که توسط سلول‌های کمکی T[1] (Th) با اثرات پیش التهابی و ضد التهابی تولید می‌شوند (Boshtam *et al*., 2017). سلول‌های کمکی CD4+ T بسته به محیط سیتوکین به انواع سلول‌های کمکی T، از جمله سلول‌های کمکی نوع ۱ (Th1) و نوع ۲ (Th2) تمایز می‌یابند (Gorenec *et al*., 2016). سلول‌های Th1 سیتوکین‌هایی مانند IL-2 ، IL-10 و اینترفرون‌ها (IFN) را تولید می‌کنند که مونوسیت، ماکروفاژ، سلول‌های کشنده طبیعی و سلول‌های T[2] سیتوتوکسیک را فعال می‌کنند و با دفاع میزبان در برابر باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها مرتبط هستند. در مقابل، سلول‌های Th2 سیتوکین‌هایی مانند IL-4، IL-5 و IL-13 تولید می‌کنند که با پاسخ‌های آلرژیک همراه هستند. اعتقاد بر این است که تعادل بین تولید سیتوکین‌های Th1 و Th2 در تنظیم ایمنی سلولی در مقابل واکنش‌های آلرژیک مهم است (Louten *et al*., 2009; Miles *et al*., 2005).

جدول ۳. بیان ژن‌های سیتوکین در طحال جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح ۱۵ و ۲۰ درصد آرد میوه بلوط نسبت به گروه شاهد در سن ۴۲ روزگی

ژن	تیمار	بیان	مقدار p	نتایج
اینترلوکین-۲	تیمار ۱۵٪ بلوط	۰/۲۱	۰/۰۳	کاهش
	تیمار ۲۰٪ بلوط	۲/۱۴	۰/۳۲	-
اینترلوکین-۴	تیمار ۱۵٪ بلوط	۰/۲۶	۰/۰۴	کاهش
	تیمار ۲۰٪ بلوط	۰/۳۲	۰/۲۳	-
اینترلوکین-۵	تیمار ۱۵٪ بلوط	۱/۸۹	۰/۱۰	-
	تیمار ۲۰٪ بلوط	۰/۷۵	۰/۸۰	-
اینترلوکین-۱۰	تیمار ۱۵٪ بلوط	۱/۶۴	۰/۴۵	-
	تیمار ۲۰٪ بلوط	۰/۶۶	۰/۵۳	-
اینترلوکین-۱۳	تیمار ۱۵٪ بلوط	۱/۸۸	۰/۲۴	-
	تیمار ۲۰٪ بلوط	۰/۵۴	۰/۵۹	-
اینترفرون-گاما	تیمار ۱۵٪ بلوط	۲۴/۷۳	۰/۰۲	افزایش
	تیمار ۲۰٪ بلوط	۵/۹۲	۰/۳۱	-

[1] T helper cell (Th)
[2] Cytotoxic T-cells

تاثیر ترکیبات پلی‌فنولی مانند تانن‌ها بر روی سیستم ایمنی در انسان و حیوانات می‌تواند سودمند یا مضر باشد که این تفاوت در نتایج به نوع و منبع ترکیب پلی‌فنولی، گونه جانوری، وضعیت سلامتی، مدت زمان و غلظت ترکیبات فنولی در رژیم غذایی دارد (Jamroz *et al*., 2009). برای مثال مقادیر بالای تانیک اسید در طول دوره پرورش جوجه‌های گوشتی باعث ایجاد شرایط استرس در آنها شده و ممکن است در اختلال سیستم ایمنی نقش داشته باشد (Huang *et al*., 2018). در این مطالعه نیز، استفاده از آرد میوه بلوط در انتهای دوره پرورش منجر به کاهش بیان ژن‌های IL-2 و IL-4 در طحال جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با ۱۵ درصد آرد میوه بلوط گردید. البته مطالعات متعددی نشان داده‌اند که رژیم غذایی با مقادیر کم تانن از منابع مختلف می‌تواند باعث بهبود وضعیت سلامت، تغذیه و عملکرد حیوانات شود (Brus *et al*., 2013; Huang *et al*., 2018). جالب توجه است، تغذیه جوجه‌های گوشتی با مکمل تانن به‌دست‌آمده از شاه بلوط منجر به اقزایش راندمان تبدیل غذایی شد (Starčević *et al*., 2015). اثرات سرکوب کننده سیستم ایمنی مرغ تغذیه شده با رژیم غذایی ۲۵ یا ۳۰ گرم بر کیلوگرم تانیک اسید سبب کاهش بسیار زیاد تعداد گلبول‌های سفید خون شده و سطوح سرمی IgM و IgY متناسب به مقدار مورد استفاده کاهش یافت (Marzo *et al*., 1990). از سوی دیگر، تغذیه جوجه‌های گوشتی با جیره حاوی غلظت پایین تانن تغلیظ شده، سبب افزایش تکثیر سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی، اسپلنوسیت‌ها و تیموسیت‌ها گردید. علاوه بر این، تغذیه مرغ با دوزهای پایین تانن خوراکی به مدت ۵ هفته باعث افزایش جمعیت سلول‌های لنفوسیت T نوع CD+4 و لنفوسیت B نوع Bu-1 در طحال شد (Park *et al*., 2013). مطالعه دیگری نشان داد که انگور فرنگی هندی (*Emblica officinalis*) حاوی غلظت‌های پایین تانن دارای اثر تعدیل‌کننده ایمنی با تحریک سلول‌های T و ماکروفاژها و اثرات تقویت‌کننده بر پاسخ‌های ایمنی هومورال در جوجه‌ها بوده است (Kaleem *et al*., 2014; Madhuri *et al*., 2011).

ویژگی تعدیل‌کنندگی ایمنی پلی‌فنل‌ها با تاثیر برخی از آنها بر جمعیت سلول‌های ایمنی، تنظیم تولید سیتوکین‌ها و بیان ژن‌های پیش التهابی از طریق مهار مسیر فاکتورهای رونویسی NF-kB و AP-1 و فعال سازی Nrf2 توسط مطالعات مختلفی تایید شده است (Gonzalez-Gallego *et al*., 2007; Hachimura et al., 2018; John *et al*., 2011; Karasawa *et al*., 2011). برای مثال، فرولیک اسید، پلی فنول موجود در جو دوسر، با فعال کردن گیرنده‌های TLR-7 و TLR-9، افزایش تولید اینترفرون‌ها و مهار مسیر NF-kB، میزان بقا و کاهش وزن را در موش های آلوده به ویروس آنفلواتزا را کاهش داد (Zhu *et al*., 2019). در مطالعه حاضر نیز بیان اینترفرون گاما در طحال جوجه‌های تغذیه شده با ۱۵ و ۲۰ درصد آرد میوه بلوط نسبت به گروه شاهد افزایشی بود که این اختلاف برای تیمار ۱۵ درصد میوه بلوط در جیره، در هر دو سن ۲۱ و ۴۲ روزگی در سطح ۵ درصد معنی دار بود. پلی‌فنول چای (EGCG) فعال شدن فاکتور رونویسی NFκ B را در سلول‌های اپیتلیال انسان متوقف کرده، و با کاهش بیان iNOS (نیتریک اکساید سنتاز القایی) و تولید NO (اکسید نیتریک) در سلول‌های ماکروفاژ، منجر به تعدیل سیستم ایمنی می‌شود (Kanwar *et al*., 2012;

(Singh *et al*., 2011). همچنین، مطالعات *in vivo* و *in vitro* نشان می‌دهد که رسوراترول، پلی‌فنول موجود در انگور قرمز و آجیل، می‌تواند COX را مهار کرده، گیرنده گامای فعال‌شده با تکثیر پراکسی زوم را غیرفعال و اندوتلیال اکسید نیتریک سنتاز را در ماکروفاژهای موش القا کند (Biasutto *et al*., 2012; Mohar and Malik, 2012; Speciale *et al*., 2011). به همین ترتیب، RVSA40، ترکیبی شبیه به رسوراترول، سیتوکین‌های پیش التهابی TNF-α و IL-6 را در سلول‌های ماکروفاژ موش مهار می‌کند (Capiralla *et al*., 2012). مجموعه‌ای از مطالعات آزمایشگاهی نشان داد که پلی‌فنل‌های دیگر مانند اسید اولئانولیک، کورکومین، کامفرول-۳-O سوفوروسید، EGCG و لیکوپن با مهار پروتئین POX-1، پروتئین کروماتینی مهمی که با نوکلئوزوم‌ها، فاکتورهای رونویسی و هیستون‌های تنظیم کننده رونویسی در تعامل است، نقش کلیدی در التهاب دارند که همه این نمونه‌ها از اثرات ضد التهابی پلی‌فنول‌ها حمایت می‌کنند (Bae, 2012). مطالعه‌ای بر روی پلی‌فنول‌های پوست انار و اجزای خاص آن مانند پانیکالاژین و اسید الاژیک کاهش سیتوکین‌های پیش التهابی TNF-α، IL-1β و IL-6 و کاهش سایر واسطه‌های التهابی از جمله کاهش نیتریک اکسید (NO)، پروستاگلاندین E2 (PGE2)، کاهش بیان نیتریک اکسید سنتاز (iNOS) و سیکلواکسیژناز-۲ القایی (COX-2) را نشان داد (Du *et al*., 2018). به طور مشابه، پلی‌فنول‌های پوست انار اثرات مهاری بر تولید گونه‌های اکسیژن فعال درون سلولی (ROS) و سرکوب TLR4 در هر دو سطح mRNA و پروتئین را نشان داده‌اند که همگی نقش اصلی در التهاب دارند (Du *et al*., 2019). علاوه بر این، نشان داده شده است که عصاره هسته انگور باعث کاهش تولید سیتوکین، ROS و سوپراکسید پیش التهابی می‌شود و در عین حال بیان ژن آنزیم آنتی‌اکسیدانی و ترشح واسطه‌های ضد التهابی را افزایش می‌دهد (Nallathambi *et al*., 2020; Wang *et al*., 2020). پلی‌فنول‌های چای سبز همچنین تولید سیتوکین‌های التهابی (TNF-α، IL-6 و IL-1β) را کاهش می‌دهند و مسیر سیگنالینگ TLR4 را مهار می‌کنند (Li *et al*., 2020).

علاوه بر تعامل مستقیم با سیستم ایمنی، ترکیبات پلی‌فنولی می‌توانند از طریق مکانیسم‌های غیرمستقیم سیستم ایمنی را تحت تاثیر قرار دهند. ترکیبات پلی‌فنولی به خوبی در روده کوچک جذب نمی‌شوند و در روده بزرگ دست نخورده باقی می‌مانند که در آنجا با میکروبیوتای روده تعاملات دینامیکی دارند (Kawabata *et al*., 2019). از آنجایی که شواهد ارتباط بین ایمنی، عفونت و میکروبیوتای روده را نشان می‌دهند، می‌توان پیش‌بینی کرد که پلی‌فنول‌ها با فعالیت تعدیل‌کننده میکروبی می‌توانند بر ایمنی تأثیر بگذارند (Cardona *et al*., 2013; Kaulmann and Bohn, 2016; Man *et al*., 2020; Shinde *et al*., 2020). برای مثال، استرس اکسیداتیو بیش از حد در طول عفونت نقش مهمی در آسیب‌های بافتی، مانند آسیب بافت ریه و اختلال عملکرد سد اپیتلیال در عفونت‌های ویروسی حاد تنفسی دارد. با توجه به اثرات تنظیم شده بر روی دفاع آنتی‌اکسیدانی، پلی فنولی‌ها احتمالاً به بهبود عوارض ناشی از رادیکال‌های آزاد کمک می‌کنند (Iddir *et al*., 2020; Shinde *et al*., 2020). در نهایت، نتایج نشان می‌دهد که ترکیب

پلی‌فنول avenanthramide 2c یک تقویت کننده فراهمی زیستی آهن در انسان است، که نشان می‌دهد این پلی فنل می‌تواند ایمنی را از طریق تأثیر آن بر وضعیت آهن تنظیم کند (Chu and Fleige, 2019). همچنین غلظت بالای ترکیبات فنولی در رژیم غذایی، نه تنها مصرف خوراک را کاهش می دهد بلکه با کاهش جذب کربوهیدرات‌ها و اسیدهای آمینه از روده (Santidrian and Marzo, 1989)، منجر به کاهش در دسترسی اسیدهای آمینه در جیره‌های حاوی ترکیبات فنولی شده و نهایتا سنتز پروتیین در سیستم ایمنی کاهش می‌یابد (Marzo *et al*., 1990). برای مثال، در جیره حاوی ۲۰ درصد آرد میوه بلوط، به دلیل بالا بودن ترکیبات فنولی آن به ویژه تانن ها، کاهش مصرف خوراک را در جوجه‌های گوشتی را به همراه داشته باشد (Hamou *et al*., 2012). از طرف دیگر، از ویژگی‌های مهم ترکیبات فنلی می‌توان به توانایی آنها در اتصال به گروه‌های دارای بار مثبت موجود در ساختار پروتئین و اسیدهای آمینه اشاره کرد که منجر به کاهش زیست فراهمی این ترکیبات می‌شود(Jansman, 1993). از آنجایی که سنتز اینترلوکین‌ها مانند سایر پروتیین ها با منشا داخلی بدن نیازمند فراهم بودن اسید آمینه از طریق تغذیه می باشد، به نظر می‌رسد کاهش مصرف خوراک، تغذیه طولانی مدت با جیره‌های حاوی بلوط و کاهش زیست فراهمی پروتئین می‌تواند تولید و بیان اینترلوکین‌ها را کاهش دهد که با نتایج بدست آمده در این مطالعه در سن ۴۲ روزگی برای ژن‌های IL-2 و IL-4 در تیمار ۱۵ درصد آرد میوه بلوط همخوانی دارد. در مطالعه ای استفاده از تانن شاه بلوط در جیره جوجه‌های گوشتی منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن سیتوکین پیش التهابی IL-6 و سیتوکین ضد التهابی IL-10 در سلول‌های روده، در روزهای ۲ و ۶ دوره پرورش گردید، در حالی که برای سایر سیتوکین‌های پیش التهابی افزایش معنی‌داری در بیان آنها مشاهده نشد (Lee *et al*., 2021). در تحقیق حاضر نیز، درسن ۲۱ روزگی بیان ژن IL-4 و IFN-γ نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری نشان داد که می‌تواند به دلیل استرس حاصل از مصرف آرد میوه بلوط در سطح ۱۵ درصد باشد. برای مثال، در خوکچه غلظت سرمی سیتوکین ضد التهابی، مانند IL-4، به میزان زیادی توسط پلی فنول‌های چای افزایش یافت (Deng *et al*., 2010).

نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، جایگزینی ذرت با آرد میوه بلوط در دو سطح ۱۵ و ۲۰ درصد جیره جوجه‌های گوشتی نشان داد که آرد میوه بلوط در هر دو سطح می تواند منجر به تغییر بیان ژن‌های سیستم ایمنی در طحال در سنین ۲۱ و۴۲ روزگی دوره پرورش گردد. در سن ۲۱ روزگی، افزودن آرد میوه بلوط به دلیل استرس ایجاد شده منجر به تغییر بیان ژن‌های IL-2، IL-4، IL-5، IL-10 و IFN-γ و با روندی افزایشی نسبت به گروه شاهد شد که این افزایش برای ژن IL-4 و IFN-γ معنی‌دار بود. در سن ۴۲ روزگی، این

تغییر به دلیل تاثیرات طولانی مدت آرد میوه بلوط در جیره جوجه‌های گوشتی منجر به کاهش بیان معنی‌دار در ژن‌های IL-2 و IL-4 در تیمار ۱۵ گردید که می‌تواند به دلیل کاهش دسترسی اسیدهای آمینه جهت سنتز این سیتوکین‌ها باشد. بیان ژن IFN-γ در همه تیمارهای حاوی آرد میوه بلوط در دو سن ۲۱ و ۴۲ روزگی نسبت به گروه شاهد روندی افزایشی داشته است که این اختلاف برای تیمار تغذیه شده با ۱۵ درصد آرد میوه بلوط در هر دو سن معنی‌دار بود. بطور کلی غلظت بالای ترکیبات پلی فنولی مانند تانن‌ها در جیره با ایجاد استرس، کاهش مصرف خوراک، کاهش جذب کربوهیدرات‌ها و اسیدهای آمینه در دستگاه گوارش، ممانعت از اتصال فاکتورهای رونویسی به DNA به هنگام رونویسی و تعدیل فعالیت میکروبی دستگاه گوارش می‌تواند منجر به تغییر بیان ژن‌های سیستم ایمنی شوند.

غیر قابل استناد

References

Bae, J. S. (2012). Role of high mobility group box 1 in inflammatory disease: focus on sepsis. *Archives of Pharmacal Research*, 35, 1511-1523.

Banks, W. A., Kastin, A. J. & Gutierrez, E. G. (1994). Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neuroscience Letters*, 179, 53-56.

Barbehenn, R. V. & Constabel, C.P. (2011). Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry*, 72, 1551-1565.

Biasutto, L., Mattarei, A. & Zoratti, M. (2012). Resveratrol and health: the starting point. *Chembiochem*, 13, 1256-1259.

Boshtam, M., Asgary, S., Kouhpayeh, S., Shariati, L. & Khanahmad, H. (2017). Aptamers against pro-and anti-inflammatory cytokines: a review. *Inflammation*, 40, 340-349.

Brus, M., Dolinšek, J., Cencič, A. & Škorjanc, D. (2013). Effect of chestnut (Castanea sativa Mill.) wood tannins and organic acids on growth performance and faecal microbiota of pigs from 23 to 127 days of age. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19, 841-847.

Capiralla, H., Vingtdeux, V., Venkatesh, J., Dreses-Werringloer, U., Zhao, H., Davies, P. & Marambaud, P. (2012). Identification of potent small-molecule inhibitors of STAT 3 with anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophages. *The FEBS Journal*, 279, 3791-3799.

Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J. & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 1415-1422.

Chu, Y. & Fleige, L. (2019). Increasing Bioavailability of Iron with Avenanthramide 2c. Google Patents.

de Hoyos-Martinez, P. L., Merle, J., Labidi, J. & Charrier–El Bouhtoury, F. (2019). Tannins extraction: A key point for their valorization and cleaner production. *Journal of Cleaner Production*, 206, 1138-1155.

Deng, Q., Xu, J., Yu, B., He, J., Zhang, K., Ding, X. & Chen, D. (2010). Effect of dietary tea polyphenols on growth performance and cell-mediated immune response of post-weaning piglets under oxidative stress. *Archives of Animal Nutrition*, 64, 12-21.

Du, L., Li, J., Zhang, X., Wang, L. & Zhang, W. (2018). Pomegranate peel polyphenols inhibits inflammation in LPS-induced RAW264. 7 macrophages via the suppression of MAPKs activation. *Journal of Functional Foods*, 43, 62-69.

Du, L., Li, J., Zhang, X., Wang, L., Zhang, W., Yang, M. & Hou, C. (2019). Pomegranate peel polyphenols inhibits inflammation in LPS-induced RAW264.7 macrophages via the suppression of TLR4/NF-κB pathway activation. *Food & Nutrition Research*, 63.

Gonzalez-Gallego, J., Sánchez-Campos, S. & Tunon, M. (2007). Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición Hospitalaria*, 22, 287-293.

Gorenec, L., Lepej, S. Z., Grgic, I., Planinic, A., Bes, J. I., Vince, A. & Begovac, J. (2016). The comparison of Th1, Th2, Th9, Th17 and Th22 cytokine profiles in acute and chronic HIV-1 infection. *Microbial Pathogenesis*, 97, 125-130.

Hachimura, S., Totsuka, M. & Hosono, A. (2018). Immunomodulation by food: Impact on gut immunity and immune cell function. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82, 584-599.

Hamou, H., Bouderoua, K., Sisbane, I. & Mourot, J. (2012). Effect of green oak acorn based diet on performance and fatty acid composition of cooked breast meat. *International Journal of Applied Animal Sciences*, 1, 94-101.

Huang, Q., Liu, X., Zhao, G., Hu, T. & Wang, Y. (2018). Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Animal Nutrition*, 4, 137-150.

Iddir, M., Brito, A., Dingeo, G., Fernandez Del Campo, S. S., Samouda, H., La Frano, M. R. & Bohn, T. (2020). Strengthening the immune system and reducing inflammation and oxidative stress through diet and nutrition: considerations during the COVID-19 crisis. *Nutrients*, 12, 1562.

Jamroz, D., Wiliczkiewicz, A., Skorupińska, J., Orda, J., Kuryszko, J. & Tschirch, H. (2009). Effect of sweet chestnut tannin (SCT) on the performance, microbial status of intestine and histological characteristics of intestine wall in chickens. *British Poultry Science*, 50, 687-699.

Jansman, A. (1993). Tannins in feedstuffs for simple-stomached animals. *Nutrition Research Reviews*, 6, 209-236.

John, C. M., Sandrasaigaran, P., Tong, C. K., Adam, A. & Ramasamy, R. (2011). Immunomodulatory activity of polyphenols derived from Cassia auriculata flowers in aged rats. *Cellular Immunology*, 271, 474-479.

Kaleem, Q. M., Akhtar, M., Awais, M. M., Saleem, M., Zafar, M., Iqbal, Z., Muhammad, F. & Anwar, M. I. (2014). Studies on Emblica officinalis derived tannins for their immunostimulatory and protective activities against coccidiosis in industrial broiler chickens. *The Scientific World Journal*, 1, 1-10.

Kanwar, J., Taskeen, M., Mohammad, I., Huo, C., Chan, T. H. & Dou, Q. P. (2012). Recent advances on tea polyphenols. *Frontiers in Bioscience* (Elite edition), 4, 111.

Karasawa, K., Uzuhashi, Y., Hirota, M. & Otani, H. (2011). A matured fruit extract of date palm tree (Phoenix dactylifera L.) stimulates the cellular immune system in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 11287-11293.

Kaulmann, A. & Bohn, T. (2016). Bioactivity of polyphenols: preventive and adjuvant strategies toward reducing inflammatory bowel diseases—promises, perspectives, and pitfalls. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 9346470.

Kawabata, K., Yoshioka, Y. & Terao, J. (2019). Role of intestinal microbiota in the bioavailability and physiological functions of dietary polyphenols. *Molecules*, 24, 370.

Kumari, M., Jain, S., 2012. Tannins: An antinutrient with positive effect to manage diabetes. *Research Journal of Recent Sciences*, 1, 1-8.

Lee, A., Dal Pont, G.C., Farnell, M.B., Jarvis, S., Battaglia, M., Arsenault, R.J. & Kogut, M.H. (2021). Supplementing chestnut tannins in the broiler diet mediates a metabolic phenotype of the ceca. *Poultry Science*, 100, 47-54.

Li, H. l., Li, Z. j., Wei, Z. S., Liu, T., Zou, X. Z., Liao, Y. & Luo, Y. (2015). Long-term effects of oral tea polyphenols and Lactobacillus brevis M8 on biochemical parameters, digestive enzymes, and cytokines expression in broilers. *Journal of Zhejiang University-Science* B, 16, 1019-1026.

Li, Y., Rahman, S. U., Huang, Y., Zhang, Y., Ming, P., Zhu, L., Chu, X., Li, J., Feng, S. & Wang, X. (2020). Green tea polyphenols decrease weight gain, ameliorate alteration of gut microbiota, and mitigate intestinal inflammation in canines with high-fat-diet-induced obesity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 78, 108324.

Liu, H., Zhang, M., Han, H., Yuan, J. & Li, Z. (2010). Comparison of the expression of cytokine genes in the bursal tissues of the chickens following challenge with infectious bursal disease viruses of varying virulence. *Virology Journal*, 7, 1-9.

Liu, Y., Che, T., Song, M., Lee, J., Almeida, J., Bravo, D., Van Alstine, W. & Pettigrew, J. (2013). Dietary plant extracts improve immune responses and growth efficiency of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Animal Science*, 91, 5668-5679.

Liu, Y., Song, M., Che, T., Lee, J., Bravo, D., Maddox, C. & Pettigrew, J. (2014). Dietary plant extracts modulate gene expression profiles in ileal mucosa of weaned pigs after an Escherichia coli infection. *Journal of Animal Science*, 92, 2050-2062.

Louten, J., Boniface, K. & de Waal Malefyt, R. (2009). Development and function of TH17 cells in health and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123, 1004-1011.

Madhuri, S., Pandey, G. & Verma, K. (2011). Antioxidant, immunomodulatory and anticancer activities of Emblica officinalis: an overview. *International Research Journal of Pharmacy*, 2, 38-42.

Mahmood, S. & Smithard, R. (1993). A comparison of effects of body weight and feed intake on digestion in broiler cockerels with effects of tannins. *British Journal of Nutrition*, 70, 701-709.

Man, A. W., Zhou, Y., Xia, N. & Li, H. (2020). Involvement of gut microbiota, microbial metabolites and interaction with polyphenol in host immunometabolism. *Nutrients*, 12, 1-29.

Marzo, F., Tosar, A. & Santidrian, S. (1990). Effect of tannic acid on the immune response of growing chickens. *Journal of Animal Science*, 68, 3306-3312.

Michiels, J., Missotten, J., Van Hoorick, A., Ovyn, A., Fremaut, D., De Smet, S. & Dierick, N. (2010). Effects of dose and formulation of carvacrol and thymol on bacteria and some functional traits of the gut in piglets after weaning. *Archives of Animal Nutrition*, 64, 136-154.

Miles, E. A., Zoubouli, P. & Calder, P. C. (2005). Effects of polyphenols on human Th1 and Th2 cytokine production. *Clinical Nutrition*, 24, 780-784.

Mohar, D.S. & Malik, S. (2012). The sirtuin system: the holy grail of resveratrol? *Journal of clinical & experimental cardiology*, 3, 11.

Nallathambi, R., Poulev, A., Zuk, J. B. & Raskin, I. (2020). Proanthocyanidin-rich grape seed extract reduces inflammation and oxidative stress and restores tight junction barrier function in Caco-2 colon cells. *Nutrients*, 12, 1623.

Nobakht, E. & Muhaghegh, D.M. (2019). Effect of feeding oak acorn on expression of IL-2, IL-13 and IFN-γ genes in bursa Fabricius tissue of broiler chickens. *Poultry Science Journal*, 7, 95-100.

Park, I. J., Cha, S. Y., Kang, M. & Jang, H. K. (2013). Immunomodulatory effect of a proanthocyanidin-rich extract from Pinus radiata bark by dosing period in chickens. *Poultry Science*, 92, 352-357.

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(9), e36-e36.

Redmond, S., Tell, R., Coble, D., Mueller, C., Palić, D., Andreasen, C. B. & Lamont, S. J. (2010). Differential splenic cytokine responses to dietary immune modulation by diverse chicken lines. *Poultry Science*, 89, 1635-1641.

Saeidi, F., Houshmand, M., Parsaei, S. & Zarrin, M. (2017). Potential of oak acorn with and without polyethylene glycol as an alternative to corn in broiler diets. *South African Journal of Animal Science*, 47, 895-903.

Santidrian, S. & Marzo, F. (1989). Effect of feeding tannic acid and kidney bean (Phaseolus vulgaris) on the intestinal absorption of d-galactose and l-leucine in chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 47, 435-442.

Schiavone, A., Guo, K., Tassone, S., Gasco, L., Hernandez, E., Denti, R. & Zoccarato, I. (2008). Effects of a natural extract of chestnut wood on digestibility, performance traits, and nitrogen balance of broiler chicks. *Poultry Science*, 87, 521-527.

Shimada, T. (2001). Nutrient compositions of acorns and horse chestnuts in relation to seed-hoarding. *Ecological Research*, 16, 803-808.

Shinde, T., Hansbro, P. M., Sohal, S. S., Dingle, P., Eri, R. & Stanley, R. (2020). Microbiota modulating nutritional approaches to countering the effects of viral respiratory infections including SARS-CoV-2 through promoting metabolic and immune fitness with probiotics and plant bioactives. *Microorganisms*, 8, 921.

Shirmohammadli, Y., Efhamisisi, D. & Pizzi, A. (2018). Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review. *Industrial Crops and Products*, 126, 316-332.

Singh, B.N., Shankar, S. & Srivastava, R. K. (2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical pharmacology*, 82, 1807-1821.

Smith, K. G. & Hunt, J. L. (2004). On the use of spleen mass as a measure of avian immune system strength. *Oecologia*, 138, 28-31.

Speciale, A., Chirafisi, J., Saija, A. & Cimino, F. (2011). Nutritional antioxidants and adaptive cell responses: an update. *Current Molecular Medicine*, 11, 770-789.

Starčević, K., Krstulović, L., Brozić, D., Maurić, M., Stojević, Z., Mikulec, Ž., Bajić, M. & Mašek, T. (2015). Production performance, meat composition and oxidative susceptibility in broiler chicken fed with different phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 1172-1178.

Vuolo, M. M., Lima, V. S. & Junior, M. R. M. (2019). Phenolic compounds: Structure, classification, and antioxidant power, *Bioactive compounds*. (pp. 33-50.) Elsevier.

Wang, Y., Wang, Y., Shen, W., Wang, Y., Cao, Y., Nuerbulati, N., Chen, W., Lu, G., Xiao, W. & Qi, R. (2020). Grape seed polyphenols ameliorated dextran sulfate sodium-induced colitis via suppression of inflammation and apoptosis. *Pharmacology*, 105, 9-18.

Yang, F., Lei, X., Rodriguez-Palacios, A., Tang, C. & Yue, H. (2013). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in chicken embryo fibroblasts infected with avian leukosis virus subgroup. *Journal of BMC Research Notes*, 6, 1-5.

Zhu, Y., Shao, Y., Qu, X., Guo, J., Yang, J., Zhou, Z. & Wang, S. (2019). Sodium ferulate protects against influenza virus infection by activation of the TLR7/9-MyD88-IRF7 signaling pathway and inhibition of the NF-κB signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 512, 793-798.

Expression of cytokine genes in spleen tissue of broiler chickens fed with different levels of oak acorn

Abstract

Replacing corn with oak fruit in the poultry diet can lead to a decrease in dependence and the outflow of currency from the country, but oak fruit has a large amount of anti-nutritional compounds (tannins), which can be a limiting factor in its consumption. Therefore, it is necessary to investigate the effects of different amounts of oak fruit in the diet on the performance and immune system of poultry in order to determine the appropriate levels of oak for use in poultry rations. This study aimed to investigate the expression of cytokine genes in the spleen tissue of broiler chickens fed with a diet containing oak acorn. For this purpose, three rations containing 0, 15, and 20% oak acorn were used to feed broilers for a period of 42 days. At the ages of 21 and 42 days, the spleen tissue was separated from 18 slaughtered broiler chickens (6 from each treatment), and the total RNA was extracted. The expression of cytokine genes including IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, and IFN-γ were investigated in all three treatments. Beta-actin gene was also included in the experiment as a reference gene. The REST, 2009, V2.0.13 software was used for the analysis of gene expression data. According to the results, the expression of the IFN-γ gene showed a significant increase in the spleen tissue of broiler chickens fed with 15% oak acorn with respect to the control group at both 21 and 42 days of age ($P<0.05$). In the 20% oak acorn group, although the IFN-γ gene expression was higher than the control treatment at both ages, this difference was not significant. At the age of 21 days, the mRNA levels of the IL-4 gene also showed a significant increase in the diet containing 15% oak acorn compared to the control group ($p<0.01$). On the other hand, at the age of 42 days, the expression levels of interleukin 2 and 4 genes showed a significant decrease in the treatment of 15% oak acorn compared to the control group ($p<0.05$). Furthermore, the mRNA levels of IL-5, IL-10, and IL-13 genes showed no significant difference in treatments containing oak acorn at both the ages of 21 and 42 days compared to the control group. In general, replacing corn with oak acorn in the diet of broiler chickens, based on the amount and duration of consumption, can lead to changes in the expression of immune system genes in the spleen tissue.

Keywords: interleukin, oak, gene expression, broiler, spleen

Extended Abstract

Introduction

Corn is one of the major feeds in the poultry diet, most of which is supplied through imports in our country. Therefore, it is necessary to identify alternative local food sources in the poultry diet and provide correct and principled models for the optimal use of them. Oak fruit is an available food in the country, which can be considered a good substitute for corn in the poultry diet. Oak fruit is rich in carbohydrates and starch but it also contains high amounts of phenolic compounds and tannin. The phenolic compounds contain numerous hydroxyl groups in their structure, which can stimulate or suppress the immune system. Therefore, understanding the chemical properties and biological effects of these compounds is necessary in order to use oak in poultry diets. The spleen has a fundamental role in both humoral and cellular immune responses and its gene expression usually represents an indicator of the immune system. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of different levels of oak acorn on the expression of cytokine genes in the spleen tissue of broiler chickens.

Material and methods

In this study, 132 one-day-old chickens were allocated to three treatments and four repeats in a completely randomized design. The first treatment was fed with a diet based on the maize-soybean meal (without oak acorn), and the two other treatments contained 15% and 20% oak acorn, respectively. At the ages of 21 and 42 days, eighteen broiler chicken were selected randomly (6 chicks from each treatment) and their spleen tissue were harvested and the total RNA was extracted. The expressions of cytokine genes including IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, and IFN-γ were investigated in all three treatments. Beta-actin gene was also included in the experiment as a reference gene. The REST, 2009, V2.0.13 software was used for the analysis of gene expression data.

Results

A significant increase was shown in the expression of the IFN-γ in the spleen tissue of broiler chickens fed with 15% oak acorn with respect to the control group at both 21 and 42 days of age ($P<0.05$). In the 20% oak acorn group, although the IFN-γ gene expression was higher than the control treatment at both ages, this difference was not significant. At the age of 21 days, the mRNA levels of the IL-4 gene also showed a significant increase in the diet containing 15% oak acorn compared to the control group ($p<0.01$). On the other hand, at the age of 42 days, the expression levels of interleukin 2 and 4 genes showed a significant decrease in the treatment of 15% oak acorn compared to the control group ($p<0.05$). Furthermore, the mRNA levels of IL-5, IL-10, and IL-13 genes showed no significant difference in treatments containing oak acorn at both the ages of 21 and 42 days compared to the control group.

Conclusion

In general, replacing corn with an oak acorn in the diet of broiler chickens, based on the amount and duration of consumption, can lead to changes in the expression of immune system genes in the spleen tissue. generally, a high concentration of polyphenolic compounds such as tannins in the diet can be altered the gene expression of the immune system due to stress, reducing feed consumption, decreasing the absorption of carbohydrates and amino acids, preventing the transcription factors binding to DNA in transcription and modulation of the microbial activity of the digestive tract.