DOI: 10.22092/vj.2019.125730.1566
شماره ۱۲۸ پاییز ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تاثیر جاذب مایکوتوکسین Toxeat®، بر روی بیان ژن‌های INFγ و INFα و غلظت سرمی IL۲ و IL۶ در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با آفلاتوکسین)

• سهیلا صرامی
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه،دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، تهران، ایران
• حمیدرضا سیدآبادی (نویسنده مسئول)
موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي، کرج، ایران
• سید عبدالله حسینی
موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي، کرج، ایران
• محسن براتی
گروه علوم دامی، دانشــکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲۸-۱۲-۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: ۰۹-۰۴-۱۳۹۸

Email: hseyedabady@gmail.com

چکیده

هدف از انجام این پژوهش بررسی تاثیر استفاده از جاذب مایکوتوکسین Toxeat® در کاهش اثرات منفی افلاتوکسین به روی بیان ژن‌های INFγ و INFα و غلظت سرمی IL۲ و IL۶ در جوجه‌های گوشتی می باشد. تعداد ۳۰۰ قطعه جوجه گوشتی سویه کاب ۵۰۰ ، به صورت تصادفی در شش تیمار در پنج تکرار و۱۰ قطعه جوجه در هر واحد آزمایشی اختصاص داده شد. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار ۱: جیره پایه(NC)، تیمار ۲: جیره پایه +۱ میلی‌گرم برکیلوگرم آفلاتوکسین (PC)، تیمار ۳: PC+g/kg ۱ از Toxeat® ، تیمار۴: PC g/kg+ ۲ از Toxeat® ، تیمار۵: PC + g/kg ۳ از Toxeat®، تیمار۶: PC + g/kg ۱ از Toxeat® بدون بخش غیرآلی (هیدرات سدیم-کلسیم آلومینوسیلیکات). در پایان ۴۲ روزگی به منظور بررسی تغییرات بیـان ژن‌هـای INFγ و INFα، ۳ نمونه بافت کبد از هر تیمار جمع آوری شد. پس از استخراج RNA از بافت کبد رونویسی معکوس به عمل آمد. نتایج تحقیق نشان داد که بیان ژن‌های INFγ ، INFα در همه تیمارهای آزمایشی با یکدیگر متفاوت است به طوری که بیان ژن INFγ در تیمار ۳ در مقایسه با سایر تیمارها به طور معنی‌داری افزایش دارد (P<۰/۰۵). همچنین بیان ژن INFα در تیمارهای دریافت کننده جاذب مایکوتوکسین Toxeat® در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش نشان داد(P<۰/۰۵). در بررسی میزان غلظت سرمی IL۶، تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد(P<۰/۰۵) ولی در میزان غلظت سرمی IL۲ اختلاف معنی داری بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵) . به طور کلی نتایج تحقیق نشان داد مکمل‌سازی جیره با جاذب مایکوتوکسین Toxeat® می‌تواند با کنترل اثرات سوء افلاتوکسین، بر روی بیان ژن و تولید و ترشح سیتوکین موثر بوده و در نتیجه با بهبود پاسخ سیستم ایمنی باعث کاهش تلفات جوجه‌های گوشتی شود.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین، جاذب مایکوتوکسین Toxeat®، بیان ژن، سیستم ایمنی، جوجه گوشتی

Veterinary Researches & Biological Products No 128 PP: 41-48

The Effect of Mycotoxin Binder Toxeat® on The Expression of INFγ and INFα Genes and Serum Levels of IL2 and IL6 in Broiler Chickens Fed with Aflatoxin

By: Soheila, S., Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran. Seyedabadi, H. R., (Corresponding Author) Animal Science Research Institute of IRAN (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Hosseini, S. A., Animal Science Research Institute of IRAN (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. And Barati, M., Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 2019-03-19 Accepted: 2019-06-30

Email: hseyedabady@gmail.com

The aim of this study was to investigate the effect of Mycotoxin Binder Toxeat® in reducing the negative effects of aflatoxin on the expression of INFγ and INFα genes and serum levels of IL2 and IL6 in broiler chicks. 300 oneday-old (Cobb 500) broiler chicks were used. They were randomly assigned to six treatments, 5 replicates and 10 birds in each unit. Experimental treatments included: Base diet (T1), Base diet+1 mg/kg of aflatoxin (T2), T2+1 g/kg Toxeat® (T3), T2+2 g/kg Toxeat® (T4), T2+3 g/kg Toxeat® (T5), T2+1 g/kg Toxeat® without inorganic section (sodium-calcium hydrated aluminosilicate hydrate) (T6). On day 42 livers were collected (3 per treatment) to evaluate changes in the expression of INFγ and INFα genes after reverse transcription of RNA extracted from liver tissue were taken. The results of this study showed that the expression of INFγ and INFα genes were different in all experimental treatments, so that the expression of INFγ gene increased significantly in treatment 3 compared to other treatments ($P < 0.05$). Also, expression of INFα gene in Myxotoxin Binder Toxeat® receiving treatments increased significantly compared with the control group ($P < 0.05$). In the study of IL6 serum concentration showed a significant difference between treatments ($P < 0.05$) but there was no significant difference in IL2 serum concentration between treatments ($P > 0.05$). Generally, the results of the study showed that diet supplements with Mycotoxin Binder Toxeat® could be effective in controlling the undesirable effects of Aflatoxin, it has an effect on gene expression and production and secretion of cytokines resulting in a reduction in the mortality of broiler chicks by improving the immune response.

Keywords: Aflatoxin, Mycotoxin Binder Toxeat, Gene exPression, immune system, broiler

مقدمه

مهم‌ترین چالش در صنعت طیور تأمین غذای باکیفیت و باقیمت مناسب می‌باشد(۱). آفلاتوکسین‌ها گروه بزرگی از مایکوتوکسین‌ها می‌باشند که بوسیله گونه‌های خاصی از جنس آسپرژیلوس بویژه فلاووس (*Aspergillus flavus*) و پارازیتیکوس (*Aspergillus parasiticus*) تولید می‌شود (۱۰). متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط این قارچ‌ها شامل انواع B۱، B۲، G۱ و G۲ می‌باشد که نوع B۱ سمی‌ترین می‌باشد (۱۰). آلودگی مواد خوراکی به آفلاتوکسین یک موضوع مهم جهانی است و تخمین زده می‌شود حداقل ۲۵ درصد غلات تولیدی جهان آلوده به مایکوتوکسین‌ها است (۳). آفلاتوکسین‌ها باعث برخی تأثیرات نامطلوب در حیوانات می‌شوند که می‌توان به جذب ضعیف مواد مغذی، ضایعات بافت کبدی، کاهش عملکرد، تضعیف سیستم ایمنی، مشکلات تولید مثلی و در برخی از موارد، مرگ اشاره کرد (۹). اثرات سرکوب کننده سیستم ایمنی توسط مایکوتوکسین‌ها در حیوانات اهلی به صورت کاهش فعالیت لنفوسیت‌های B و T، کاهش تولید ایمونوگلوبولین‌ها و نقص عمل سلولی ماکروفاژی ظاهر می‌شود (۷). قرارگیری در معرض آفلاتوکسین باعث تغییر در سطح بیان ژن‌های کبدی شامل خنثی‌کننده‌های زنوبیوتیک، تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی، استرس اکسیداتیو، ترمیم‌کننده‌های آسیب‌های DNA، متابولیزه کننده‌های اسیدآمینه‌ها، تکثیر سلولی، ایمنی و متابولیسم اسیدهای چرب می‌شود (۱۷). با توجه به اثرات زیان‌آور و عوارض نامطلوب ناشی از مسمومیت با آفلاتوکسین و به منظور برطرف نمودن یا به حداقل رساندن این قبیل اثرات در دام‌های اهلی و به دنبال آن پیشگیری از قرار گرفتن انسان در معرض آن، از طریق مصرف فرآورده‌های دامی، راهکارهای مختلفی به کار گرفته می‌شوند که عبارت‌اند از: بهبود کیفیت جیره (افزودن اسیدآمینه، افزایش سطح پروتئین جیره)، اصلاح ژنتیکی، استفاده از روش‌های فیزیکی (UV و حرارت) و استفاده از مایکوتوکسین بایندرها می‌باشد (۵). استفاده از موادی با قابلیت جذب مایکوتوکسین‌ها، یک ابزار ارزشمند برای کمک به کاهش اثرات مضر مایکوتوکسین‌ها و جلوگیری از افت عملکرد در تولیدات دام می‌باشند (۱۵). با توجه به اثرات منفی آلودگی منابع غذایی مصرفی در تغذیه طیور به آفلاتوکسین و زیان‌های اقتصادی ناشی از تغذیه جوجه‌های گوشتی با منابع غذایی آلوده، آزمایش حاضر با هدف

بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف جاذب مایکوتوکسین ®Toxeat، بر روی بیان ژن‌های INFγ و INFα و غلظت سرمی IL۲ و IL۶ در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با آفلاتوکسین انجام شد.

مواد و روش‌کار

نحوه تولید آفلاتوکسین

جهت تولید سم آفلاتوکسین، از قارچ آسپرژیلوس فلاووس تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران استفاده شد(PTCC NO:۵۰۰۴). افلاتوکسین با آلوده نمودن برنج به قارچ Aspergillus flavus بر اساس روش Neeff و همکاران (۱۸) تهیه شد. میزان کمی و کیفی آفلاتوکسین تولید شده از طریق تست TLC (Thin layer chromatography) اندازه‌گیری شد. آفلاتوکسین نمونه برنج حاوی B۲:۰,۰۲۲۲ppm, G۱:۰,۱۲۵۶ppm ,G۲:۰,۰۰۸ppm ppm, B۱: ۰,۲۸۹۴ و غلظت کل آفلاتوکسین‌ها برابر ۰,۴۴۵۲ ppm بود. سپس پودر برنج تا رسیدن به غلظت ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم آفلاتوکسین، به جیره پایه اضافه و با آن مخلوط شد. این مقدار ۵۰ برابر حد مجاز افلاتوکسین در جیره‌ی طیور است (۴).

جاذب مایکوتوکسین ®Toxeat

®Toxeat، جاذب مایکوتوکسین تجاری شرکت تک ژن، حاوی دو سویه باسیلوس و ۴ سویه لاکتوباسیلوس و به میزان cfu/g ۱×$۱۰^{۷}$ از هرکدام می‌باشد. این جاذب مایکوتوکسین حاوی دیواره مخمر ساکارومیسس

جدول۱- مواد تشکیل دهنده و ترکیب جیره های پایه(به عنوان تغذیه براساس ٪)

(٪) Feed ingredient	(d)۱۴-۱	(d)۲۸-۱۵	(d)۴۲-۲۹
Corn	۵۵	۴۶,۰۸	۴۵
Soybean meal	۳۹	۲۹	۳۲,۶
Vegetable oil	۱	۱,۰۵	۳,۸
Wheat	۰	۲۰	۱۵
Oysters shell	۱,۳	۱,۱۷	۱
Salt	۰,۲	۰,۲	۰,۱
*Premixing nutrients	۳,۵	۲,۵	۲,۵
AME(kcal/kg)	۲۹۰۵	۲۹۸۷	۳۱۲۱
Digestible lysine٪	۱,۱۵۶	۰,۹۲۳	۰,۹۹۴
Methionine+ Digestible cystine	۰,۸۳۴	۰,۶۹۸	۰,۷۱۷
Crude protein٪	۲۲,۵۸	۱۹,۲۵	۲۰,۲۳
Calcium	۱,۰۶۸	۰,۸۷	۰,۸۱۲
Phosphorus	۰,۵۴۶	۰,۴۲	۰,۴۲۴
Sodium٪	۰,۲۱۲	۰,۱۸۷	۰,۱۴۵
Digestible methionine٪	۰,۵۲۸	۰,۴۲۳	۰,۴۳۴

* Premix provided the following nutrients in one kilogram of diet: vitamin A, 10000 IU;vitamin D3,3500 IU; vitamin E, 40IU;vitamin K3, 2mg; vitamin B1, 2mg; vitamin B2, 5mg; vitamin B3 35mg; vitamin B5, 13mg; vitamin B6, 1.5mg; vitamin B12,0/01mg; vitamin B9, 1.6mg; Biotin, 1.5mg ; I, 1.25mg; Cu, 16mg; Zn, 100mg; Se, 0.3mg;Mn, 120mg;Fe, 40mg;Choline chloride,350mg; Betaine,150mg ;Me(kcal/kg) 2837; CP, 12.5% ;TSAA, 6.3%; Dig Lys, %1.8;Dig Thr 0.85%; Ca, 21.88%;Na 2.45%;AP, 11.5% .d:day.

سرویزیه به عنوان جزء آلی و هیدرات سدیم کلسیم آلومینوسیلیکات به عنوان حامل غیرآلی می‌باشد. لازم به ذکر است که باکتری‌های موجود در این محصول از بین ۲۰۰ سویه بومی ایران جدا شده و توانایی سم‌زدایی آن‌ها در شرایط In vitro بررسی شده است(۲).

تیمارهای آزمایشی و تهیه نمونه‌های مورد آزمایش

برای انجام این آزمایش از تعداد ۳۰۰ قطعه جوجه گوشتی سویه کاب ۵۰۰ استفاده شد. جوجه‌ها به طور تصادفی به شش تیمار، پنج تکرار و ۱۰ قطعه جوجه در هر تکرار تقسیم شدند. گروه‌های آزمایشی عبارت بودند از: تیمار ۱: جیره پایه(NC)، تیمار ۲: جیره پایه +۱ میلی‌گرم برکیلوگرم آفلاتوکسین (PC)، تیمار ۳: PC+g/ kg ۱ از (T۳ Toxeat®)، تیمار۴: PC+ kg/ton ۲ از (T۴ Toxeat®)، تیمار۵: PC + kg/ton ۳ از (T۵ Toxeat®)، تیمار۶: PC + kg/ton ۱ از Toxeat® بدون بخش غیرآلی (هیدرات سدیم-کلسیم آلومینوسیلیکات) (T۶). جوجه‌ها بر روی بستر با برنامه نوری ۲۳ ساعت روشنایی در روز به آب و غذا دسترسی آزاد داشتند. جیره براساس ذرت و کنجاله سویا مطابق با نیازهای غذایی توصیه شده در دفترچه راهنمای پرورش جوجه های گوشتی سویه کاب ۵۰۰ تهیه شدند (جدول ۱). جوجه‌ها در برابر برونشیت، نیوکاسل و گامبرو واکسینه شدند، اما هیچ برنامه دارویی در کل دوره آزمایشی اجرا نشد. در طول دوره‌ی آزمایش، همه‌ی گروه‌های آزمایشی از شرایط محیطی یکسانی برخوردار بودند و در تمامی مراحل آزمایش، کلیه ملاحظات اخلاقی رعایت گردید.

روش نمونه‌گیری

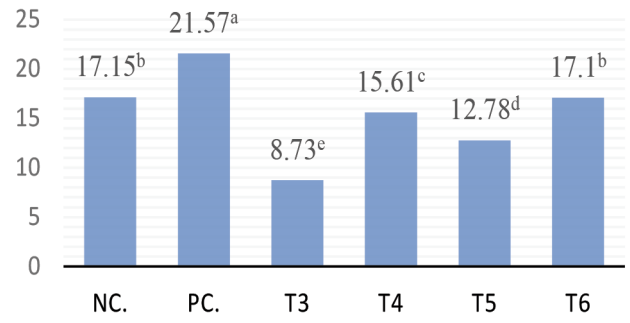
در پایان دوره آزمایش سه جوجه از هر تکرار به صورت تصادفی انتخاب و کشتار گردید و از بافت کبد آنها نمونه‌گیری به عمل آمد. بلافاصله نمونه‌های بافتی با استفاده از ازت مایع فریز شده و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور منتقل شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

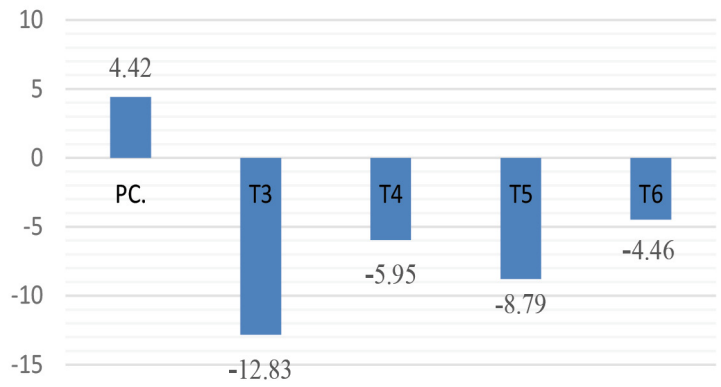
برای استخراج RNA ابتدا نمونه‌های هر تکرار به طور جداگانه هموژن گردید . بدین نظور ۳۰ میلی‌گرم از بافت مورد نظر را خرد کرده در هاون ریخته و با کمک نیتروژن مایع پودر یکنواختی از آن تهیه شد. RNA با استفاده از کیت Genejet TM RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific USA,) استخراج و کمیت و کیفیت آن توسط دستگاه اسپکتوفتومتر نانودراپ ND-1000(Thermo Fisher Scientific USA,) اندازگیری شد. ساخت cDNA با استفاده از کیت RevertAid first (Strand cDNA Synthesis Kit Thermo Fisher Scientific USA,) انجام شد. ابتدا نمونه‌های RNA از فریزر خارج و یخ‌گشایی شدند. اجزای کیت هم در دمای آزمایشگاه (۲۵-۲۰ درجه سلسیوس) قرار گرفتند. سپس در تیوب‌های ویژه کیت، ۲ میکرولیتر RNA با غلظت ۵۰ نانوگرم به همراه اجزاء کیت افزوده شده تا به حجم ۲۰ میکرولیتر برسد. پس از آن برنامه PCR ذوب پرایمر ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سنتز cDNA در دمای۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت، دمای غیرفعالسازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه) اجرا شد. پس از اتمام مرحله cDNA، CR سنتز شده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا در ادامه برای انجام واکنش‌های Real- Time PCR مورد استفاده قرار گیرد . برای واکنش Real- Time PCR ازمستر میکس سایبرگرین Master Mix Quanti Fast SYBER Green PCR (Thermo Fisher Scientific USA,) استفاده شد. ژن β-actin به عنوان ژن کنترل انتخاب شد. آغازگرهای ویژه ژن β-actin و ژن‌های INFγ وINFα از شرکت ندای فن تهیه شد. اطلاعات آغازگرهای استفاده شده در جدول ۲ آورده شده است. چرخه حرارتی در Real- Time PCR برنامه

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنشهای Real- Time PCR

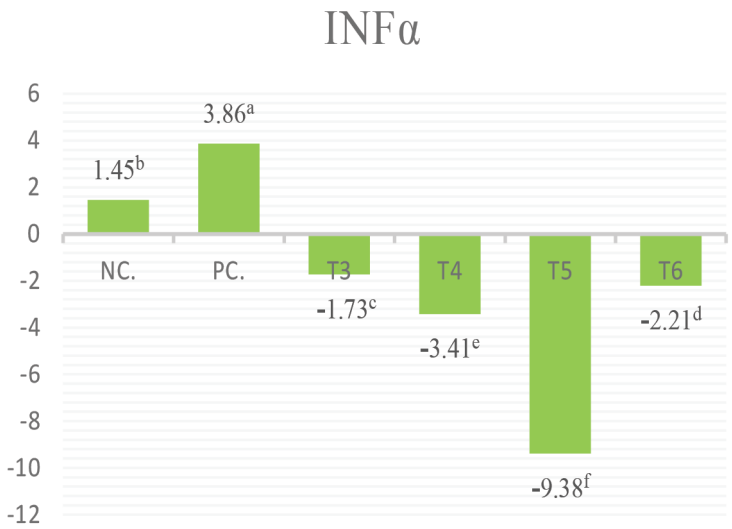
ژن	شماره بانک ژن	Sequence (۵'-۳')	طول قطعه تکثیر شده	دمای اتصال
INFγ	JN۹۴۲۵۸۸	F: -۵AGCTGACGGTGGACCTATTATTGT۳- R: -۵CGGCTTTGCGCTGGATTC۳-	۲۶۰ bp	۶۰OC
INFα	AB۰۲۱۱۵۴	F: -۵GACATCCTTCAGCATCTCTTCA۳- R: -۵AGGCGCTGTAATCGTTGTCT۳-	۲۳۸bp	۶۰OC
β-actin	L۰۸۱۶۵	F: -۵TGCGTGACATCAAGGAGAAG۳- R: -۵TGCCAGGGTACATTGTGGTA۳-	۳۰۰bp	۶۰OC



نمودار ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف افزودنی Toxeat® بر میزان بیان ژن آنزیم INFγ کبدی در جوجه‌های گوشتی تیمار شده با آفلاتوکسین، نمودار بر اساس ژن β-actin نرمالایز شده است P value = ۰/۰۰۰۱، NC/۹۶، SEM=۰: جیره پایه، PC: جیره پایه +۱ میلی گرم برکیلوگرم آفلاتوکسین



نمودار۲- تأثیر غلظت‌های مختلف افزودنی Toxeat® بر میزان بیان ژن آنزیم INFγ کبدی در جوجه‌های گوشتی تیمار شده با آفلاتوکسین، در مقایسه با شاهد



نمودار ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف افزودنی Toxeat® بر میزان بیان ژن آنزیم INFα کبدی در جوجه‌های گوشتی تیمار شده با آفلاتوکسین، نمودار بر اساس ژن β-actin نرمالایز شده است P value = ۰/۰۰۰۱، SEM/۱=۰

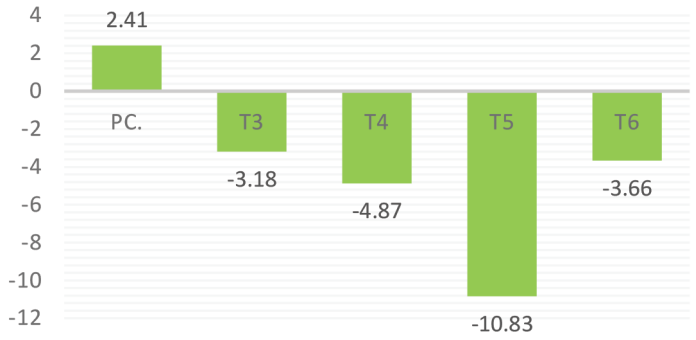
حرارتی واکنش PCR در مرحله واسرشته‌سازی یک چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود که در ادامه برای ۸۰ سیکل از حرارت مرحله واسرشته‌سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها۶۰درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و بسط آغازگرها در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ثانیه استفاده گردید. مرحله بسط نهایی آغازگرها دارای یک چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. Ctهای (Cycle Thereshold) به دست آمده از آنالیز Real-Time PCR برای ژن‌های هدف و ژن β-actin، در روش محاسباتی که به صورت ۲ΔΔct- است قرار داده شد و بیان نسبی ژن‌ها بر طبق آن محاسبه گردید (۱۳). همچنین برای محاسبه میزان بازدهی PCR از نرم‌افزار linregPCR استفاده شد (۱۹). نرم‌افزار LinRegPCR یک نرم‌افزار برای بررسی داده‌های Real- Time به منظور محاسبه کارایی پرایمرها و (PCR Efficiency) PCR می‌باشد. این نرم‌افزار داده‌های Real- Time را بررسی نموده و بوسیله رگرسیون خطی و تخمین شیب (sloPe) خط رگرسیون برای هر نمونه، کارایی پرایمرها و PCR را محاسبه می‌نماید.

اندازه‌گیری اینترلوکین

سه میلی‌لیتر خون از ورید بال هر پرنده از هر واحد آزمایشی در سن ۴۲ روزگی اخذ شد. سپس سرم خون برای اندازگیری غلظت سرمی

جدول ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف افزودنی Toxeat® به روی غلظت سرمی IL۶وIL۲ در جوجه‌های گوشتی تیمار شده با آفلاتوکسین

ژن تیمار	IL-۶	IL-۲
NC.	۵,۴۳a	۴,۵۶
PC.	۲,۹۰d	۴,۰۰
T۳	۳,۷۶c	۴,۱۶
T۴	۴,۲cb	۴,۷۳
T۵	۴,۴۳bc	۴,۴۳
T۶	۵,۰۳ab	۴,۷۳
SEM	۰,۲۲	۰,۱۴
P value	۰,۰۰۱	۰,۶۶۳



نمودار۴ -تأثیر غلظت‌های مختلف افزودنی Toxeat®بر میزان بیان ژن آنزیم INFα کبدی در جوجه‌های گوشتی تیمار شده با آفلاتوکسین در مقایسه با شاهد

IL۲ و IL۶ جداسازی شد. آنالیز نمونه‌های سرم با استفاده از کیت الایزا (MyBioSource USA,) انجام شد (۶).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SAS (۲۰) با مدل طرح کاملا تصادفی رویه عمومی خطی(GLM) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه دانکن استفاده شد. مدل آماری طرح به شرح زیر بود.

$Yij = \mu + Ti + eij$

Yij: میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در بافت کبد؛ μ : میانگین کل؛ Ti : اثر iامین تیمار؛ eij: اثر عوامل باقیمانده

نتایج

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیان ژن‌های INFα ، INFγ در همه تیمارهای آزمایشی با یکدیگر متفاوت است. بیان این ژن‌ها در تیمار دو که در آن جوجه‌ها یک میلی‌گرم آفلاتوکسین در هر کیلوگرم خوراک دریافت کرده بودند نسبت به تیمار شاهد به طور معنی داری کاهش پیدا کرد (P<۰/۰۵). (نمودار۱). همچنین نتایج نشان داد که بیان ژن INFγ در تیمارسه که در آن جوجه‌ها یک گرم جاذب مایکوتوکسین ®Toxeat در هر کیلوگرم خوراک دریافت کرده بودند در مقایسه با سایر تیمارها به طور معنی‌داری افزایش یافته است(P<۰/۰۵) (نمودار۲).

همچنین بیان ژن INFα در تیمارهای دریافت کننده جاذب مایکوتوکسین ®Toxeat نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش نشان داد(P<۰/۰۵) (نمودار۳) و بیان ژن INFα در تیمار ۵ که در آن جوجه‌ها سه گرم مایکوتوکسین بایندر ®Toxeat در هرکیلوگرم خوراک دریافت کرده بودند در مقایسه با سایر تیمارها به طور معنی‌داری افزایش یافته است(P<۰/۰۵) (نمودار۴).

در بررسی نتایج مربوط به غلظت سرمی IL۶ ، تفاوت معنی داری بین تیمارها مشاهده شد(P<۰/۰۵) به طوری که کمترین میزان بیان مربوط به تیمار دو(PC) بود و بقیه‌ی تیمارها که دریافت‌کننده‌ی جاذب مایکوتوکسین ®Toxeat بودند اثرات سوء افلاتوکسین را به روی غلظت سرمی IL۶ کنترل کردند به طوری که میانگین غلظت سرمی IL۶ در تیمار شش در مقایسه با تیمار شاهد اختلاف معنی داری مشاهده نشد (P<۰/۰۵). همچنین در بررسی نتایج مربوط به میانگین غلظت سرمی IL۲ اختلاف معنی داری بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (جدول۲).

بحث

هرگونه ناهماهنگی و عدم تعادل در تولید و اختلال در تنظیم عملکرد سیتوکین‌ها می‌تواند منجر به اختلالات پاتولوژیک شود (۲۱). INFγ از سلول‌های T و NK ترشح می‌شوند. این سیتوکین مسئول عملکردهای متنوعی از سیستم ایمنی شامل متعادل کننده‌ی سیستم ایمنی، عامل مهاجرت و حرکت سلول‌های ایمنی می‌باشد. IL۶ یک سیتوکین با چندین عملکرد است که به طور عمده از سلول‌های T فعال ترشح می‌شود. از وظایف این سیتوکین تنظیم تکثیر T-cell و مشارکت در تنظیم پاسخ‌های التهابی را می‌توان ذکر کرد (۱۱). همچنین به عنوان سیتوکین دخیل در تمایز سلول‌های B و یکی از عوامل اصلی برای القا آنتی بادی شناخته می‌شود (۱۲). IL۲ از سلول‌های T-cell فعال شده ترشح می‌شود و این سیتوکین باعث تکثیر و بلوغ و تمایز لنفوسیت‌ها می‌شود و یک سیتوکین کلیدی در پاسخ های ایمنی است.

He و همکاران (۱۰) گزارش دادند که مقدار IL۲ و IL۶ و INFα در گروهی که افلاتوکسین را دریافت کرده بودند کاهش داشته است. کاهش این سیتوکین‌ها به معنی کاهش تکثیر لنفوسیت T است. آنچه از تحقیقات گذشته ذکر شد با نتایج مربوط به تیمار دو مطابقت دارد و کاهش تکثیر لنفوسیت T باعث کاهش مقاومت در برابر بیماری‌ها و در نتیجه افزایش مرگ و میر در جوجه‌های گوشتی می‌شود. براساس نتایج Chen و همکاران (۶)، افلاتوکسین B۱ باعث کاهش غلظت سرمی IL۲ و INFγ می شود. در گزارش‌هایی تاثیر افلاتوکسین به روی TNFα و INFγ و IL۱ و IL۴ و IL۲ در موش‌هایی که تحت تزریق با افلاتوکسین قرار گرفته‌اند گزارش شده است. همچنین گزارشاتی از سرکوب پاسخ التهابی سیستم ایمنی نیز اعلام شده است (۱۲). در جوجه‌های تیمار شده با ۰/۳ mg/kg با افلاتوکسین، سم باعث کاهش غلظت سرمی IL۲ و INFγ شده بود (۱۲). مقایسه‌ی عددی نتایج IL۲ با آنچه ذکر شد مطابقت دارد. افلاتوکسین باعث مهار تولید mRNA و بیان پروتئین‌های IL۴،IL۶،IL۱۰ در cell line های ماکروفاژ، لنفوسیت‌های طحالی شده است(۸). البته درخوک های در معرض افلاتوکسین افزایش بیان mRNA های IL۱،IL۶،IL۱۰، INFα، INFγ گزارش شده است (۱۶). همچنین در غلظت ۰/۰۷۴ از افلاتوکسین، افزایش در بیان ژن و غلظت پروتئین IL۶ و INFγ گزارش شده است (۱۴). که نتایج تحقیق حاضر با پژوهش‌های مذکور مطابقت ندارد اما به طورکلی می‌توان گفت غلظت و نوع موجود زنده نیز به روی بیان و ترشح سیتوکین‌ها موثر است. کاهش غلظت سیتوکین‌ها به علت جیره‌ی آلوده به افلاتوکسین در جوجه‌های گوشتی گزارش شده است (۶) و گروه‌هایی که ®Toxeat را دریافت کرده بودند به خوبی توانسته بودند اثرات سوء افلاتوکسین را به روی بیان ژن و تولید سیتوکین‌ها کنترل کنند. کاهش در غلظت سیتوکین‌ها در جوجه‌های تغذیه شده با تیمار دو نیز دیده شد اما کنترل اثرات افلاتوکسین در گروه‌های دریافت کننده‌ی ®Toxeat هم در بیان ژن‌ها و هم در غلظت سرمی سیتوکین‌ها مشاهده شد حتی غلظت سرمی IL۶ در جوجه‌های دریافت‌کننده تیمار شش در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت و این نشان دهنده توانایی بالای بخش بیولوژیک جاذب مایکوتوکسین ®Toxeat می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج این آزمایش نشان داد که افزودن مایکوتوکسین بایندر ®Toxeat به جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین می‌تواند با کنترل اثرات سوء افلاتوکسین بر روی بیان ژن و تولید و ترشح سیتوکین موثر بوده و می‌توان از آن به عنوان جاذب آفلاتوکسین برای بهبود پاسخ سیستم ایمنی و در نتیجه کاهش تلفات جوجه‌های گوشتی استفاده کرد. با توجه به اینکه واردات ترکیبات جاذب توکسین وارداتی سبب خروج ارز از کشور می‌شود این فرآورده می‌تواند به عنوان توکسین بایندر قوی در تغذیه جوجه های گوشتی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

امکانات اجرای این طرح توسط موسسه علوم دامی (ایران-کرج) و شرکت تک ژن (ایران-تهران) فراهم گردید، نویسندگان این مقاله از آن‌ها بسیار سپاسگزاری می‌کنند.

منابع مورد استفاده

1-Agboola, A.F., B.R.O. Omidiwura., O. Odu., F.T. Odupitan and E.A. Iyayi. 2015. Effect of Probiotic and Toxin Binder on Performance, Intestinal Microbiota and Gut Morphology in Broiler Chickens. *Journal of Animal Science Advances* 5: 1369-1379.

2-Barati, M., M. Chamani. S. N. Mousavi., S. A. Hoseini., M. Taj Abadi Ebrahimi.2017.Effect of Commercial Toxin Binder, Native Probiotic Strains, Cell Wall Yeast and Aluminosilicate in Diets Contaminated with Aflatoxin, on the Expression of GOT2, CYP450 1A5 Genes and Serum Concentrations of Liver Enzymes in Broiler Chickens. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 23: 953-960.

3-Binder, E., M. Tan., L.M. Chin., L.J. Handl and J.Richard .2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology* 137: 265–282.

4-Boudergue, C., C.Burel., S. Dragacci., M.C. Favrot., J.M. Fremy., C. Massimi., P. Prigent., P. Debongnie., L. Pussemier., H. Boudra and D. Morgavi. 2009. Review of mycotoxin detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. Scientific report submitted to EFSA. Reference number of the call for proposal: CFP/EFSA/ FEEDAP/2009/01, 192pp.

5-Bovo, F., L.T. Franco., E. Kobashigawa., G.E. Rottinghaus., D.R. Ledoux and C.A.F. Oliveira.2015. Efficacy of beer fermentation residue containing Saccharomyces cerevisiae cells for ameliorating aflatoxicosis in broilers. *poultry science* 94: 934-942.

6-Chen, K., S.Yuan., J.Chen., X. Peng., F.Wang., H. Cui and J. Fang. 2013. Effects of sodium selenite on the decreased percentage of T cell subsets, contents of serum IL-2 and IFN-γ induced by aflatoxin B1 in broilers. *Research in veterinary science*. 95: 143-145.

7-Corrier, D.E. 1991. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. Veterinary immunology and immunopathology 30: 73-87.

8-Dugyala R.R. and R.P. Sharma. 1996. The effect of aflatoxin B1 on cytokine mRNA and corresponding protein levels in peritoneal macrophages and splenic lymphocytes. *International journal of immunopharmacology* 18: 599-608.

9-Eaton, D.L. and J.D. Groopman. 1994. The Toxicology of aflatoxins. academic press, New York, 383-424.

10-Fani Makki, O., A.Omidi., N.Afzali., H. Sarir., M. Frouzanmehr and A. Shibak. 2014. Efficacy of Silybum Marianum Seeds in Ameliorating the Toxic Effects of Aflatoxin B1 in Broilers. *Iranian Journal of Toxicology* 24: 977-982.

11-He, Y., J.Fang., X.Peng., H.Cui., Z. Zuo., J.Deng., Z.Chen., W.Lai., G.Shu and L.Tang. 2014. Effects of sodium selenite on aflatoxin B1-induced decrease of ileac T cell and the mRNA contents of IL-2, IL-6, and TNF-α in broilers. *Biological trace element research* 159:167-173.

12-Jiang, M., X. Peng., J, Fang., H. Cui., Z.Yu and Z.Chen. 2015. Effects of aflatoxin B1 on T-cell subsets and mRNA expression of cytokines in the intestine of broilers. *International journal of molecular sciences* 4: 6945-6959.

13-Livak, K.J and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene exoression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25:402-408.

14-Li, Y., Q.G. Ma., L.H. Zhao., H. Wei., G.X. Duan., J.Y. Zhang and C. Ji. 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: 5649-5662.

15-Meissonnier, G.M., P. Pinton., J. Laffitte., A.M.Cossalter., Y.Y. Gong., C.P. Wild., G. Bertin., P. Galtier and I.P. Oswald. 2008. Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. *Toxicology and applied pharmacology* 231:142-149.

16-Magan, N. 2006. Mycotoxin contamination of food in Europe: Early detection and prevention strategies. *Mycopathologia*.162: 245–253.

17-Merrick B.A., D.P. Phadke., S.S. Auerbach., D. Mav., S.M. Stiegelmeyer., R.R. Shah and R.R.Tice. 2013. RNA-Seq profiling reveals novel hepatic gene expression pattern in aflatoxin B1 treated rats. *PloS one* 8: 61768.

18-Neeff, D.V., D.R. Ledoux., G.E. Rottinghaus., A.J.Bermudez., A. Dakovic., R.A. Murarolli and C.A.F. Oliveira. 2013. In vitro and in vivo efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to bind and reduce aflatoxin residues in tissues of broiler chicks fed aflatoxin B1. *Poultry science* 92: 131-137.

19-Ramakers C., J.M. Ruijter., R.H. Deprez., A.F. Moorman. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339: 62-66.

20-SAS Institute Inc. 2004. SAS. STAT User's Guide: Version 9. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.

21-Tayal, V. and B.S. Kalra. 2008. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics—an update. *European journal of pharmacology* 579: 1-12.