بررسی بیان ژن‌های پپتیدهای ضد میکروبی در سکوم جوجه‌های گوشتی هنگام آلودگی به سالمونلا و تغذیه با پروبیوتیک

محمدرضا اکبری[1]، حسن کرمانشاهی[1]، حمیدرضا حقیقی[2]، شایان شریف[2]

[1]دانشگاه فردوسی مشهد، [2]دانشگاه گوئلف

چکیده

در این آزمایش اثرات پروبیوتیک‌ها بر بیان ژنهای بتا-دفنسین (که در طیور گلیناسین نیز نامیده می‌شوند) و کتلایسیدین در لوزه‌های سکومی جوجه‌های گوشتی به دنبال عفونت سالمونلایی بررسی گردید. ۴ تیمار شامل کنترل منفی، گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک، گروه آلوده شده به سالمونلا، و گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک و آلوده شده به سالمونلا در قالب یک طرح کاملاً تصادفی پایه‌ریزی شد. در روزهای ۱، ۳، و ۵ بعد ار عفونت سالمونلایی از لوزه‌های سکومی جوجه‌ها جهت استخراج RNA، نمونه‌گیری به عمل آمد. RNA استخراج شده جهت تعیین کمی بیان ژنهای Gallinacin(Gal)-1، Gal-2، Gal-6، Gal-7، و کتلایسیدین با استفاده از روش real-time RT-PCR، مورد استفاده قرار گرفت. دریافت پروبیوتیک و یا عفونت سالمونلایی تأثیری بر بیان ژن‌های مورد مطالعه در روز اول پس از عفونت نداشت. همچنین، دریافت پروبیوتیک هیچ گونه اثر معنی‌داری بر بیان ژن‌های مورد مطالعه در روزهای ۳ و ۵ بعد از عفونت نداشت. در عین حال عفونت سالمونلایی سبب افزایش ($P<۰/۰۵$) بیان ژنهای Gal-1، Gal-2، Gal-6، Gal-7، و کتلایسیدین در روزهای ۳ و ۵ بعد از عفونت گردید. از سوی دیگر، دریافت پروبویتیک در روز قبل از عفونت سالمونلایی قادر به حذف کامل اثر تحریک‌کنندگی عفونت سالمونلایی بر بیان ژنهای مورد مطالعه بود. این اثر پروبیوتیک‌ها در ممانعت از تحریک بیان ژنهای پپتیدهای ضدمیکروبی توسط سالمونلا احتمالاً در نتیجه اثر پروبیوتیک در جلوگیری از استقرار سالمونلا در روده می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، سالمونلا، پپتیدهای ضد میکروبی، بیان ژن، جوجه گوشتی

بررسی بیان ژن‌های پپتیدهای ضد میکروبی در سکوم جوجه‌های گوشتی هنگام آلودگی به سالمونلا و تغذیه با پروبیوتیک

محمدرضا اکبری[۱]، حسن کرمانشاهی[۱]، حمیدرضا حقیقی[۲]، شایان شریف[۲]

[۱]دانشگاه فردوسی مشهد، [۲]دانشگاه گوئلف

چکیده

در این آزمایش اثرات پروبیوتیک‌ها بر بیان ژنهای بتا-دفنسین (که در طیور گلیناسین نیز نامیده می‌شوند) و کتلایسیدین در لوزه‌های سکومی جوجه‌های گوشتی به دنبال عفونت سالمونلایی بررسی گردید. ۴ تیمار شامل کنترل منفی، گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک، گروه آلوده شده به سالمونلا، و گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک و آلوده شده به سالمونلا در قالب یک طرح کاملاً تصادفی پایه‌ریزی شد. در روزهای ۱، ۳، و ۵ بعد ار عفونت سالمونلایی از لوزه‌های سکومی جوجه‌ها جهت استخراج RNA، نمونه‌گیری به عمل آمد. RNA استخراج شده جهت تعیین کمی بیان ژنهای Gallinacin(Gal)-1، Gal-2، Gal-6، Gal-7، و کتلایسیدین با استفاده از روش real-time RT-PCR، مورد استفاده قرار گرفت. دریافت پروبیوتیک و یا عفونت سالمونلایی تأثیری بر بیان ژن‌های مورد مطالعه در روز اول پس از عفونت نداشت. همچنین، دریافت پروبیوتیک هیچ گونه اثر معنی‌داری بر بیان ژن‌های مورد مطالعه در روزهای ۳ و ۵ بعد از عفونت نداشت. در عین حال عفونت سالمونلایی سبب افزایش ($P<۰/۰۵$) بیان ژنهای Gal-1، Gal-2، Gal-6، Gal-7، و کتلایسیدین در روزهای ۳ و ۵ بعد از عفونت گردید. از سوی دیگر، دریافت پروبویتیک در روز قبل از عفونت سالمونلایی قادر به حذف کامل اثر تحریک‌کنندگی عفونت سالمونلایی بر بیان ژنهای مورد مطالعه بود. این اثر پروبیوتیک‌ها در ممانعت از تحریک بیان ژنهای پپتیدهای ضدمیکروبی توسط سالمونلا احتمالاً در نتیجه اثر پروبیوتیک در جلوگیری از استقرار سالمونلا در روده می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، سالمونلا، پپتیدهای ضد میکروبی، بیان ژن، جوجه‌گوشتی

مقدمه

داخل کردن آنتی‌بیوتیک‌ها در تغذیه طیور راهکاری جهت تقویت سلامت، عملکرد و کیفیت تولیدات بود. در عین حال، استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در خوراک طیور خطر توسعه باکتریهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک را افزایش داده است. کاربرد باکتری‌های مفید به عنوان پروبیوتیک در تغذیه حیوانات اهلی به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها جهت حفظ سلامت و تقویت رشد در طیور توصیه شده است (۱). روده طیور در بر گیرنده گونه‌های بیماری‌زای انسانی همچون سالمونلا و کامپیلوباکتر می‌باشد و به نظر می‌رسد که پروبیوتیک‌ها قادرند به طور مؤثری استقرار این گونه‌ها در روده طیور را کاهش دهند (۲). علی‌رغم گزارشات زیاد در مورد کارایی پروبیوتیک‌ها در کاهش استقرار باکتری‌های بیماری‌زا در روده طیور، هنوز مکانیسم عمل آن‌ها در این مسیر به طور کامل مشخص نشده است. پپتیدهای ضد میکروبی بخشی از سیستم دفاع ذاتی(ایمنی ذاتی) میزبان بوده (۵) و به دو خانواده عمده دفنسین (defensins) و کتلایسیدین (cathelicidins) تقسیم می‌شوند. بتا-دفنسین‌ها در طیور گاهاً گلیناسین (Gallinacin) نیز نامیده می‌شوند. در این مطالعه، ما اثرات یک ترکیب پروبیوتیک را در متن عفونت سالمونلایی بر سیستم ایمنی ذاتی از طریق اندازه‌گیری کمی بیان ژنهای بتا–دفنسین در لوزه‌های سکومی جوجه‌های گوشتی در طول هفته اول زندگی آن‌ها، بررسی نمودیم.

مواد و روش‌ها

چهار تیمار اعمال شده به ترتیب زیر بود: ۱) کنترل منفی (بدون دریافت پروبیوتیک، بدون عفونت سالمونلایی)، ۲) دریافت کننده پروبیوتیک، ۳) آلوده شده با سالمونلا، و ۴) دریافت کننده پروبیوتیک و آلوده شده با سالمونلا. درسن یک روزگی همگی

جوجه‌ها در گروه‌های ۲ و ۴ میزان ۰/۵ میلی‌لیتر PBS حاوی $۱×۱۰^{۶}$ واحد تشکیل دهنده کلونی (CFU) پروبیوتیک را از طریق تخلیه به داخل چینه‌دان، دریافت نمودند. در روز بعد جوجه‌ها در گروه‌های ۳ و ۴ میزان ۰/۵ میلی‌لیتر PBS حاوی $۱×۱۰^{۴}$ CFU سالمونلا انتریتیکا سویه تیفی‌موریوم را از طریق دهان دریافت نمودند. در روزهای ۱، ۳، و ۵ پس از عفونت با سالمونلا، ۶ جوجه از هر گروه به طور تصادفی انتخاب شده و از لوزه‌های سکومی آن‌ها نمونه‌گیری بعمل آمد. RNA کل از نمونه‌های لوزه‌های سکومی با استفاده از معرف ترایزول و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. تعیین کمی میزان بیان ژن‌های هدف (Gal-1، Gal-2، Gal-6، Gal-7، و کتلایسیدین) و مرجع (بتا–اکتین) در نمونه‌های cDNA با استفاده از تکنیک real-time PCR و با دستگاه Lightcycler®480 و یک کیت real-time انجام شد. بیان نسبی به صورت نسبت بین بیان ژن‌های هدف (Gal-1، Gal-2، Gal-6، Gal-7، و کتلایسیدین) و بیان ژن مرجع (بتا–اکتین) در هر نمونه cDNA تعیین گردید. جهت این امر از فرمول زیر استفاده شد (۳):

$$\text{Ratio} = E_T^{CpT(c)-CpT(s)} \times E_R^{CpR(s)-CpR(c)}$$

در این فرمول E_T و E_R به ترتیب بیان‌کننده راندمان real-time PCR مربوط به ژن هدف و ژن مرجع، $C_PT(C)$ و $C_PT(S)$ به ترتیب بیان‌کننده نقاط تلاقی (Crossing Point) مربوط به ژن هدف برای کالیبراتور و نمونه‌ها و $C_PR(S)$ و $C_PR(C)$ به ترتیب بیان‌کننده نقاط تلاقی مربوط به ژن مرجع برای نمونه‌ها و کالیبراتور می‌باشند. همگی داده‌ها بر مبنای یک طرح کاملاً تصادفی شامل ۴ تیمار و ۶ تکرار و با استفاده از روشهای مدلهای خطی عمومی نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. معنی‌داری تفاوت بین میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری $\alpha = ۰/۰۵$، آزمون شد (۴).

نتایج

بیان ژن‌های Gal-1، Gal-2، Gal-6، Gal-7، و کتلایسیدین در لوزه‌های سکومی در روز اول پس از عفونت، تحت تأثیر دریافت پروبیوتیک یا عفونت سالمونلایی قرار نگرفت. همچنین دریافت پروبیوتیک تأثیری بر بیان ژن‌های مورد مطالعه در ۳ و ۵ روز پس از اعمال عفونت سالمونلایی نداشت. در عین حال، بیان ژن‌های Gal-1، Gal-2، Gal-6، Gal-7، و کتلایسیدین در پاسخ به عفونت سالمونلایی در روز ۳ پس از عفونت به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) در مقایسه با گروه کنترل منفی افزایش یافت. با وجود این، چنین افزایشی در بیان ژن‌های مورد مطالعه هنگامی که جوجه‌ها قبل از دریافت عفونت سالمونلایی پروبیوتیک دریافت کرده بودند (گروه دریافت کننده پروبیوتیک و آلوده شده با سالمونلا)، مشاهده نشد. افزایش بیان ژن‌های مورد مطالعه در روز ۵ بعد از عفونت سالمونلایی نیز مشاهده شد؛ ولی در این زمان، این افزایش بیان تنها برای Gal-2 و Gal-6 معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). نظیر زمان قبل (۳ روز پس از اعمال عفونت سالمونلایی)، بیان ژن‌های مورد مطالعه در گروه دریافت کننده پروبیوتیک و آلوده شده با سالمونلا در روز ۵ پس از عفونت سالمونلایی نیز تفاوتی با گروه کنترل منفی نشان نداد.

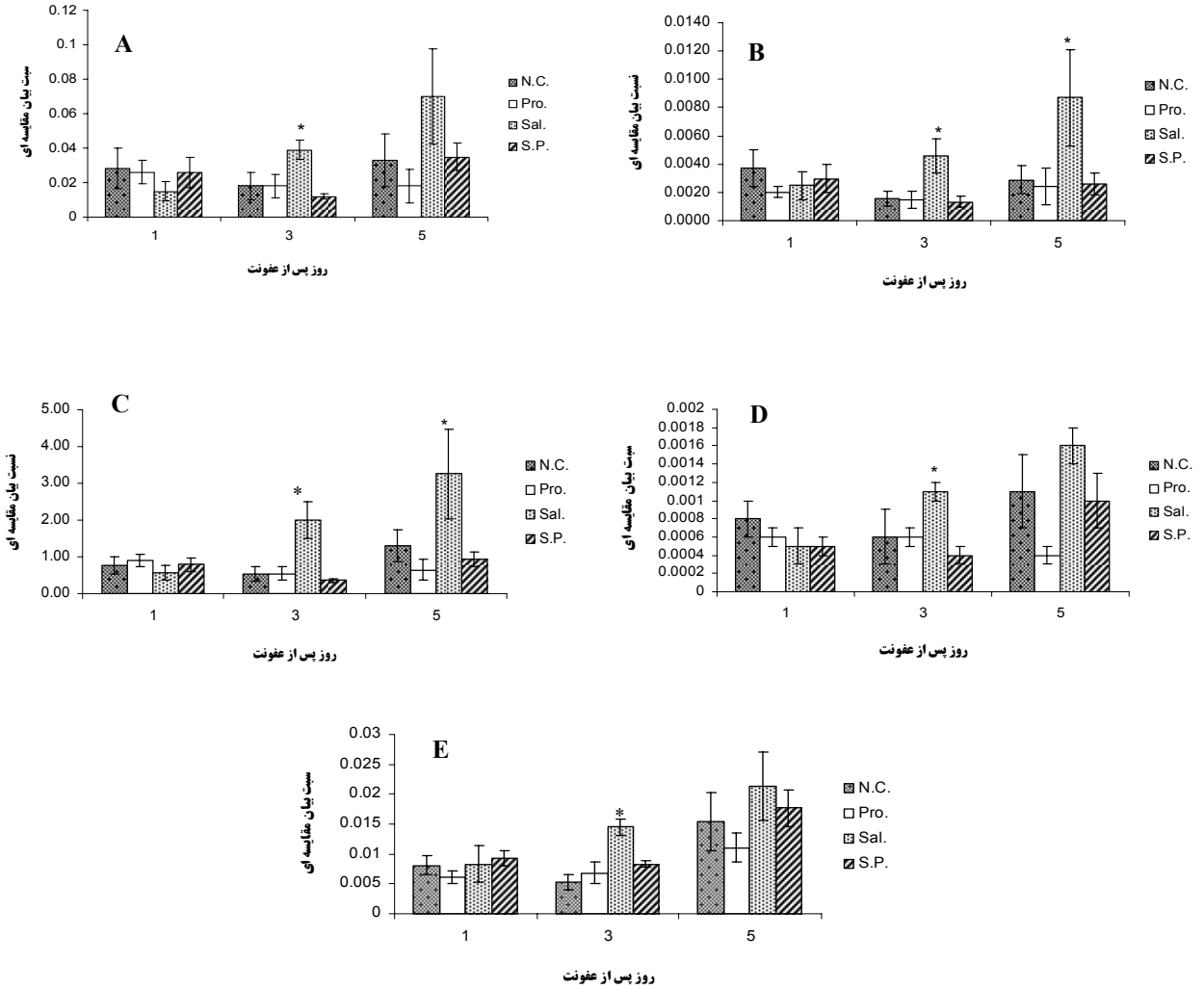
نتیجه‌گیری

به طور کلی، در این آزمایش ما نشان دادیم که عفونت سالمونلایی درجوجه‌های گوشتی جوان می‌تواند به طور معنی‌داری بیان تعدادی از ژن‌های بتا–دفنسین در لوزه‌های سکومی را افزایش دهد. به علاوه، ما نشان دادیم که یک ترکیب پروبیوتیکی به تنهایی قادر به القاء بیان ژن‌های بتا–دفنسین نبود؛ ولی هنگامی که این ترکیب پروبیوتیکی قبل از آلوده شدن جوجه‌ها به سالمونلا استفاده شد، قادر به کاهش بیان بتا–دفنسین‌ها تا سطوح قابل مقایسه با گروه کنترل منفی بود. جهت تعیین منبع بتا–دفنسین‌های افزایش یافته در لوزه‌های سکومی جوجه‌های آلوده به سالمونلا و نیز مکانیسم عمل پروبیوتیک‌ها در کاهش بیان بتا–دفنسین‌ها در جوجه‌های آلوده به سالمونلا، به تحقیقات بیشتری نیاز است.

منابع

1. Fuller, R. 2004. What is a probiotic? *Biologist*, 51: 231.

2. Higgins, J. P., Higgins, S. E., Vicente, J. L., Wolfenden, A. D., Tellez, G., Hargis, B. M. 2007. Temporal effects of lactic acid bacteria probiotic culture on Salmonella in neonatal broilers. *Poult Sci.* 86: 1662-1666.
3. Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45.
4. SAS Institute 1990. SAS/STAT User's Guide. Version 6.06, SAS institute Inc., Cary, NC.
5. Sugiarto, H., and Yu, P. L. 2004. Avian antimicrobial peptides: the defense role of beta-defensins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323: 721-727.



شکل ۱. بیان Gal-1 (A)، Gal-2 (B)، Gal-6 (C)، Gal-7 (D)، و Cathelicidin (E) در لوزه‌های سکومی جوجه‌های گوشتی به دنبال تغذیه با پروبیوتیک و آلودگی با سالمونلا؛ .N.C، کنترل منفی؛ .Pro، گروه مصرف کننده پروبیوتیک؛ .Sal، گروه آلوده شده با سالمونلا؛ .S.P، گروه مصرف کننده پروبیوتیک و آلوده شده به سالمونلا؛ (*: معنی دار در $p \leq ۰/۰۵$).