نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۶ شماره ۳/ سال۱۳۹۵

بررسی تاثیر پودر گیاه نعناع و عرق بهار نارنج بر بیان نسبی ژن پروتین شوک گرمایی (HSP70) و برخی فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی در شرایط تنش گرمایی

مهدی اسماعیلی[1]، حمید دلدار*[2]و زربخت انصاری پیرسرائی[2]

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹٤/۱۱/٦

[1] دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[2] بترتیب استادیار و دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
*مسئول مکاتبه: Email: h.deldar@sanru.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: استفاده از گیاهان دارویی در سلامتی انسان اهمیت به سزایی دارد، چون ترکیبات موجود در آن دارای کمترین اثرهای جانبی می‌باشند. این پژوهش به منظور ارزیابی اثرهای مختلف پودر نعناع، عرق بهار نارنج و آنتی بیوتیک نیومایسین بر بیان نسبی ژن پروتین شوک گرمایی ۷۰ (HSP70) و برخی فراسنجه‌های خونی در جوجه‌های گوشتی در شرایط تنش گرمایی انجام شد. **روش کار**: در این پژوهش از ۱۲۰ قطعه جوجه گوشتی سویه راس ۳۰۸ یک روزه استفاده شد. پژوهش در مدت شش هفته و در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و چهار تیمار و ۱۰ قطعه جوجه در هر تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: تیمار شاهد، پودر نعنا (دو درصد خوراک)، عرق بهار نارنج (دو درصد آب مصرفی) و آنتی‌بیوتیک نیومایسین (۰/۲ گرم‌درکیلوگرم خوراک) بود. فراسنجه‌های خونی و بیان نسبی ژن پروتین شوک گرمایی ۷۰ (HSP70) در خون اندازه گیری شد. **نتایج**: بیشترین مقدار تری گلیسیرید سرم مربوط به تیمار عرق بهار نارنج بود ($P<0/05$). بیان نسبی ژن HSP70 در خون، در تمام تیمارها نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی داری داشت ($P<0/05$). **نتیجه گیری نهایی**: یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که گیاهان دارویی نعناع و عرق بهار نارنج ممکن است بتوانند تاثیر منفی تنش گرمایی را بر بازده جوجه ها کنترل کنند.

واژگان کلیدی : پروتین شوک گرمایی، نعناع، عرق بهار نارنج، جوجه‌های گوشتی و شرایط تنش گرمایی

مقدمه

یکی از مشکلات مهم در صنعت طیور در مناطق گرمسیر جهان تنش گرمایی است، چرا که موجب کاهش عملکرد رشد و سیستم ایمنی و بنابراین افزایش تلفات می‌شود (بوتجی و هاریسون ۱۹۸۵). زمانی که دمای محیط به بالاتر از منطقه آسایش حرارتی افزایش می یابد، پرنده دچار تنش گرمایی شده و در این حالت تغییرات فیزیولوژیکی در اسیدیته و متابولیت‌های خون صورت می‌گیرد. کاهش مصرف و نبود بازدهی مناسب خوراک، کاهش وزن، کیفیت لاشه و قدرت دفاعی و سیستم ایمنی بدن از مهمترین موارد در زمان تنش گرمایی است (بورجس و همکاران ۲۰۰٤ و کوپر و واشبورن ۱۹۹۸). تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی باعث افزایش تولید

رادیکال سوپراکسید و اکسیژن واکنشگر یا ROS[1] در ماهیچه سینه‌ای می‌شود (موجاهد و همکاران ۲۰۰۶). در حالت فعالیت طبیعی سلول‌ها مقادیر کمی رادیکال آزاد واکسیژن واکنشگر تولید می‌کنند. اگرچه وجود مقادیر کم ROS در بسیاری از فرایندهای بیوشیمیایی ضروری است اما انباشته شدن ROS می‌تواند به بسیاری از مولکول‌های بزرگ بیولوژیک مانند پروتین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و DNA آسیب برساند (میتس و همکاران ۱۹۹۹) پژوهش های جدید بیانگر افزایش غلظت کورتیکوسترون آزاد شده در شرایط تنش گرمایی می باشد که منجر به افزایش پراکسیداسیون اسیدهای چرب می‌شود (فلنبرگ و اسپیسکی ۲۰۰۶). تنش گرمایی، تولید رادیکال‌های آزاد مشتقات اکسیژنی را افزایش می‌دهد که اثرهای زیان آور مختلفی بر طیور می‌گذارد (سهین و کوچوک ۲۰۰۳). یکی از مشخص ترین پاسخ‌های سلولی به تنش، تولید گروهی از پروتین‌هاست که به پروتین‌های شوک گرمایی (HSP) معروف است. هدف از تولید این پروتین‌ها حفظ هموستازی بدن، ترمیم و بنابراین حفاظت از سلول در برابر آسیب‌های بیشتر است (فبرایو و کوکولاس ۲۰۰۰). این پروتین‌ها بیشتر داخل سلولی بوده، ولی در خارج سلول، و همچنین در خون به وفور یافت شده‌اند (ایرلند و همکاران ۲۰۰۷). پروتین شوک گرمایی اثرهای آنتی اکسیدانی و ضد التهابی دارند و در تا خوردگی اولیه و مجدد پروتین‌ها کمک کرده و موجب محافظت هسته سلول‌ها و غشای لیپیدی در مقابل آسیب شده و از مرگ برنامه ریزی شده سلول جلوگیری می-کنند (هوپر ۲۰۰۵). علاوه بر شوک گرمایی محرک‌های متعددی از جمله هیپوکسی، اسیدوز، اکیسژن و نیتروژن واکنشگر، عفونت‌های ویرال، بدخیمی‌ها، بیماری‌های خود ایمن باعث القای رونویسی HSP70 می‌شوند (کواین، ۲۰۰۲). پژوهش انجام شده در خانواده نعناع (*Mentha piperita L*) نشان دهنده خاصیت آنتی اکسیدانی متوسط بوده و می‌تواند اکسیداسیون چربی‌ها را با کمک آنزیم‌های مهم که نقش قابل توجهی در حفظ تعادل بین رادیکال‌های آزاد و سیستم آنتی اکسیدانی دارد، کنترل کند. آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز جگر می تواند موجب کاهش پراکسیداسیون لیپید ها شود، بر این اساس عصاره متانولی نعناع در جگر می تواند تولید رادیکال آزاد را کاهش دهد (اسمارت و همکاران ۲۰۰۸). برخی ترکیب‌های فنولیک گیاهان دارویی می توانند سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی را تقویت و مانع از تولید رایکال های آزاد در بدن طیور شده و نیز اکسیداسیون در لاشه آنها را کاهش دهند (سهین و کوچوک ۲۰۰۳). فلاونوییدها دسته‌ای از پلی فنول‌ها است که در عصاره گرفته شده از بهار نارنج موجود می‌باشند (کوپر و واشبورن ۱۹۹۸). بر اساس پژوهش‌های انجام شده فلاونوییدها تاثیرات فارماکولوژیک گسترده از جمله جلوگیری از اکسیداسیون لیپوپروتین‌های با وزن مولکولی کم ، جلوگیری از تجمع پلاکت‌ها و همچنین پایداری سلول‌های ایمنی را دارا هستند. بنابراین در درمان ناراحتی‌های روانی، عفونت‌های ویروسی، تورم و آلرژی از آنها استفاده می‌شوند (محمودی و همکاران ۲۰۰۵). آنتی اکسیدان ها می‌توانند ROS را غیر فعال کرده و سلول‌ها را از آسیب اکسیداتیو محافظت نمایند (ایواگامی ۱۹۹۶). برای بهبود توانایی سیستم آنتی اکسیدانی در مقابله با فعالیت‌های اکسیداتیو تحت شرایط تنش، افزودن ترکیبات آنتی اکسیدانی مانند ویتامین E، کارتنوئیدها و داروهای گیاهی به جیره غذایی مفید است (فلنبرگ و اسپیسکی ۲۰۰۶). هدف از انجام این مطالعه استفاده از گیاهان دارویی با خاصیت آنتی اکسیدانی بر تغییرات فراسنجه های خونی و بیان نسبی ژن HSP70 در بدن پرندگان بود.

مواد و روش ها

در این پژوهش یکصد و بیست قطعه جوجه گوشتی سویه تجاری راس ۳۰۸ در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در چهار تیمار و سه تکرار و ده قطعه جوجه در

[1] Reactive oxygen specie

هر تکرار، استفاده شد. تیمار اول شامل دو درصد پودر خشک نعناع در خوراک، تیمار دوم دو درصد عرق بهار نارنج در آب مصرفی، تیمار سوم آنتی بیوتیک نیومایسین توسط شرکت دارویی سازنده در خوراک، تیمار چهارم گروه شاهد در نظر گرفته شده است. جیره های آزمایشی بر پایه ذرت و کنجاله ی سویا بودند که با توجه به احتیاجات مواد مغذی توصیه شده توسط NRC (۱۹۹٤) برای دو دوره آغازین و رشد تنظیم شدند. مصرف خوراک پرندگان به صورت هفتگی اندازه گیری شد. دوره پرورش به مدت ٤۲ روز بود. به منظور ایجاد شرایط تنش گرمایی، دمای سالن از پانزده روزگی به بعد، به مدت هشت ساعت در روز به ۳۲ درجه سانتی گراد رسانده شد و رطوبت نسبی سالن بین ۵۰ تا ۷۰ درصد بود. پرنده‌های مورد آزمایش، برای گرفتن خون از راه ورید بال گزینش شدند (سه پرنده در هر تکرار). پس از گرفتن خون از پرندگان، سرم نمونه‌های خونی با استفاده از سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، جداسازی و سپس سرم‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۱- توالی آغازگرهای واکنش Real-Time PCR

Table 1- The details of primer sequences used for quantitative real-time PCR

ژن Gene Symbol	شماره ثبت در بانک ژن Accession Number	جهت	توالی آغازگر (۳'-۵') Sequence of Primers (3'-5')	نقطه ذوب Melting Point (ºC)	اندازه باند Product Size(bp)
HSP70	AY763790	رفت Forward	AGCGTAACACCACCATTCC	57	372
		برگشت Reverse	ACGCTCCTGCAAGATAGTGAT	58	
GAPDH	M32599	رفت Forward	TGAAAGTCGGAGTCAACGGAT	59	230
		برگشت Reverse	ACGCTCCTGGAAGATAGTGAT	59	

HSP70 :Heat Shock Protein 70 و GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

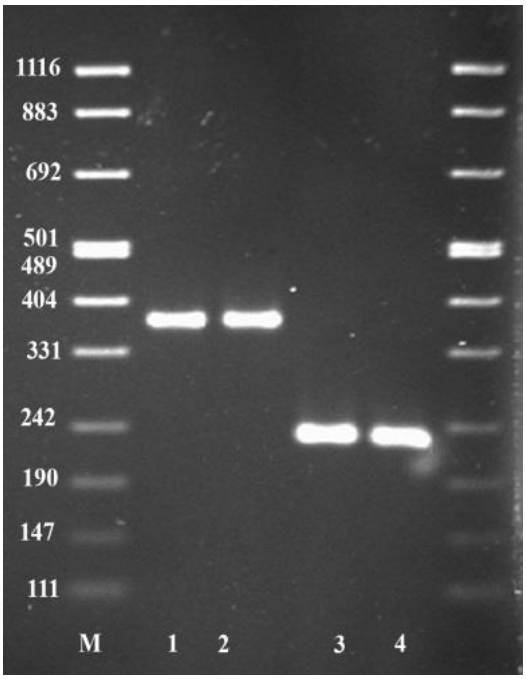
برای آزمایش، از کیت‌های تشخیصی شرکت پارس آزمون استفاده شد. پس از یخ گشایی نمونه‌ها، از هر نمونه ۱ میلی لیتر سرم به دستگاه اتوآنالیزر (BS–120, Mindray, China) بیوشیمیایی ریخته شد. دستگاه مزبور، آزمایش‌های مربوط به فراسنجه‌های خون را به روش نمونه به نمونه با دقت زیاد انجام می دهد. فراسنجه‌های خونی مورد اندازه‌گیری در برگیرنده گلوکز، کلسترول، تری گلیسرید،HDL، و LDL با استفاده از فرمول محاسبه شد.

نمونه‌های خون برای بررسی بیان ژن (HSP70) در زمان کشتار جوجه‌ها در سن ٤۲ روزگی جمع‌آوری شدند و تا زمان انجام آنالیز در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مراحل کار سنجش بیان نسبی ژن دربرگیرنده؛ جداسازی RNA کل، ساخت cDNA و بررسی بیان ژن HSP70 که با روش Real-Time PCR (qPCR) بود. استخراج RNA نمونه‌های خون با استفاده از کیت (Cat. No. K-2102) AccuZolTM شرکت Korea BIONEER انجام گرفت. وجود دو باند قابل تشخیص از RNA نشانه‌ای از

درستی روند استخراج بوده، زیرا باند سبک‌تر معرف حساس‌ترین نوع RNA یعنی RNA ریبوزومی است و با شناسایی آن تا حد زیادی می توان اطمینان حاصل نمود که بخش بیشترِ mRNA که هدف اصلی استخراج و نمونه اولیه برای واکنش RT-PCR است، نیز استخراج شده است. برای ساخت cDNA از کیت Cat. No. K-Accupower® RocketScript™ RT PreMix (۲۰۱۲) شرکت Korea BIONEER استفاده شد. RocketScript™ RT PreMix مخلوط اصلی (mastermix) است که همه اجزاء مورد نیاز برای ساخت cDNA تک رشته‌ای را دارا می‌باشد. نخست نمونه‌های RNA از فریزر خارج شده و روی یخ قرار گرفتند تا یخ گشایی به طور کامل انجام شود. اجزای کیت هم در دمای آزمایشگاه (۲۰-۲۵ درجه) قرار گرفتند. سپس محلول های کیت و RNA در تیوپ‌های ویژه کیت بر اساس دستور العمل شرکت سازنده، ریخته شد. پس از آن بر اساس گامه‌ی حرارتی ۲ دقیقه C ۴۰، ۳۰ دقیقه در C ۴۲ و ۳ دقیقه در C ۹۵ برنامه PCR اجرا شد. پس از اتمام مرحله PCR، cDNA ساخت شده در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا در ادامه برای انجام واکنش‌های Real-Time PCR مورد استفاده قرار بگیرد. برای واکنش Real-Time PCR از کیت Master Mix QuantiFast SYBER Green PCR (Cat. No.204052) شرکت کیاژن[2]استفاده شد. در این مرحله برای استفاده بهینه از کیت، واکنش‌ها برای حجم ۱۵ میکرولیتر تنظیم شد. ژن GAPDH[3] به عنوان ژن کنترل[4]گزینش شد. آغازگرهای ویژه ژن GAPDH و ژن HSP70 از شرکت متابیون[5]آلمان تهیه شدند. توالی و مشخصات آغازگرهای به کار رفته در مورد ژن‌های مورد بررسی و ژن کنترل در جدول ۱ آورده شده است. پس از رقیق کردن آغازگرهای اختصاصی ژن‌ها با آب بدون یون، به غلظتی معادل ۱۰۰ پیکومول در میکرولیتر رسیدند و به عنوان استوک اصلی نگهداری شدند. زمان استفاده، به غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر رسانده شدند. برای کشیدن منحنی استاندارد برای هر یک از ژن‌ها، ٦ رقت مختلف از cDNA نمونه تهیه شد. رقیق سازی بر اساس ضریب ۰/۱ انجام شد، به شیوه‌ای که غلظت پایانی در استاندارد شماره ٦ یک میلیونیم استاندارد شماره یک بود. برای هر سنجش بیان نسبی ژن HSP70 ، یک نمونه با GAPDH در نظر گرفته شد. دستگاه مورد استفاده، Rotor Gene ۳۰۰۰ از شرکت Corbett بود. واکنش ها در دستگاه Real-Time PCR انجام شد. در پایان محصول Real-Time PCR روی ژل آگارز ۱/۳ درصد بارگذاری شد (شکل ۱). Ct[6]های به دست آمده از آنالیز Real-time PCR برای ژن‌های هدف و ژن رفرانس (GAPDH)، در روش محاسباتی ارایه شده توسط لیواک[7] و همکارن، (۲۰۰۱) که به صورت $2^{-\Delta\Delta CT}$ است قرار داده شد و بیان نسبی ژن‌ها بر طبق آن محاسبه شد.

برای اطمینان از ساخته شدن فرآوردهای Real-Time PCR، فرآورده‌های دستگاه روی ژل آگارز ۱/۳ درصد بررسی شدند (شکل ۱).

[2] Qiagene
[3] Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
[4] Housekeeping
[5] Methabion
[6] Cycle Thereshold
[7] Livak



شکل ۱- الکتروفورز فرآورده Real Time PCR، M مارکر، ۱و۲ HSP70 و ۳و۴ GAPDH

Figure 1- The agarose gel electrophoresisof quantitative real-time PCR. M: marker; 1 and 2 HSP70; 3and 4 GAPDH

داده‌های جمع‌آوری شده در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از مدل‌های خطی عمومی (GLM) و به وسیله برنامه نرم افزاری SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند . مقایسه میانگین تیمارهای مختلف توسط آزمون چند دامنه ای دانکن (P<0.05) انجام شد.

نتایج و بحث

اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های خونی در جدول ۲ گزارش شده است. افزودن پودر نعناع، عرق بهار نارنج و نیومایسین بر غلظت گلوکز، کلسترول، LDL و HDL خون تفاوت معنی داری با گروه شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵). اما افزودن عرق بهار نارنج باعث افزایش تری گلیسرید خون شد (P<۰/۰۵).

جدول ۲ - تاثیر تیمارهای آزمایشی بر برخی فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی در ۴۲ روزگی (میلی گرم در دسی لیتر) (خطای استاندارد ± میانگین)

Table 2- The effect of experimental treatments on some blood parametersof broiler chicken at 42 days (mg/dL) (Mean ± SE)

تیمار Treatment	LDL	HDL	گلوکز Glucose	تری گلیسرید Triglyceride	کلسترول Cholesterol
شاهد Control	16.96±2.61[ab]	84.00±3.84	123.66±6.37	41.83±5.62[b]	109.33±5.25 [ab]
نعناع Peppermint	9.24±0.77[b]	80.00±3.80	210.50±3.87	61±60.55[ab]	101.66±5.70[b]
بهارنارنج Orange blossom	27.53± 5.38 [a]	80.33±3.14	222.00±8.22	80.16±11.03[a]	123.16±4.07[a]
نیومایسین Neomycin antibiotic	27.16±5.96[a]	87.66±4.34	217.00±2.33	48.50±6.36[b]	107.66±7.04 [ab]

میانگین‌هایی که در هر ردیف با حروف انگلیسی متفاوت نشان داده شده اند دارای اختلاف معنی دار می‌باشند (P< ۰/۰۵).

[a,b]Between rows, different superscripts denote significant difference (P < 0.05).

اثر تیمارهای آزمایشی بر بیان نسبی ژن HSP70 در جدول ۳ گزارش شده است. افزودن پودر نعناع، عرق بهار نارنج و نیومایسین بر بیان ژن HSP70 تفاوت معنی داری نشان داد (P<۰/۰۵). با افزودن گیاهان دارویی نعناع و عرق بهار نارنج و آنتی بیوتیک نیومایسین، بیان نسبی ژن HSP70 کاهش یافت که در

جدول شماره ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود بیشترین کاهش به ترتیب مربوط به عرق بهار نارنج، پودر نعناع و سپس آنتی بیوتیک نیومایسین بود (P<۰/۰۵).

تا کنون ترکیب‌های طبیعی زیادی به عنوان مهار کننده-های آنزیم گزانتین اکسیداز مطرح شده‌اند که یکی از مهمترین آنها ترکیبات فلاونوییدی هستند (لیو و همکاران ۱۹۸۵). این ترکیبات بر تولید رادیکال‌های آزاد اثر می‌گذارد و به همین دلیل بعضی از این ترکیبات به دلیل مهار تولید رادیکال آزاد توسط آنزیم گزانتین اکسیداز در کنترل بیماری‌های مختلف از جمله نقرس، تصلب شراین، التهاب و حتی ایسکمی نقش دارند، زیرا آنزیم گزانتین اکسیداز طی ایسکمی با تبدیل هیپو گزانتین به اورات مقادیر زیادی رادیکال آزاد تولید می کند که باعث آسیب بافتی می‌شود (بارتلت و اسمیت ۲۰۰۳). در کبوترهایی که در معرض تنش گرمایی و بی آبی قرار گرفتند ، غلظت تری گلیسریدهای سرم به کمتر از نصف مقدار گروه‌های شاهد کاهش یافت، در صورتی که غلظت اسیدهای چرب آزاد پلاسما، افزایش بیش از دو برابر نشان دادند، که اشاره ای است به این نکته که افزایش در اسیدهای چرب آزاد به دلیل شکستن (تجزیه‌ی چربی) تری گلیسریدهای خون است.

جدول ۳ - تاثیر تیمارها بر بیان نسبی ژن HSP70 در جوجه‌های گوشتی در ۴۲ روزگی (خطای استاندارد ± میانکین)

Table 3- The effect of experimental treatments on relative gene expression of HSP70 in broiler chicken at 42 days (Mean ± SE)

بیان نسبی ژن Relative gene expression	نعناع Peppermint	عرق بهار Orange blossom	نیومایسین Neomycin antibiotic	شاهد Control
HSP70	0.14±0.035[b]	0.09±0.009[b]	0.18±0.009[b]	1.05±0.24[a]

میانگین‌هایی که بین ستون با حروف انگلیسی متفاوت نشان داده شده است دارای اختلاف معنی دار می‌باشند (P< ۰/۰۵).

[a,b]Between columns, different superscripts denote significant difference (P < 0.05).

تزریق سیاهرگی آرژنین وازوتوسین (٤٠٠ میلی واحد برای هر کبوتر) به کبوترهای دارای حرارت طبیعی، افزایش زیاد و معنی داری در اسیدهای چرب آزاد (۳۰ دقیقه پس از تزریق) بوجود آورد (اساسی و نیلی ۱۳۸۱). پس می‌توان نتیجه گرفت که بالا بودن غلظت تری گلیسیرید سرم در تیمار عرق بهار نارنج نشان دهنده تاثیر کمتر تنش گرمایی بر پرندگان در این تیمار بوده است و به نظر می رسد که تجزیه نشدن تری گلیسرید ها در تیمار عرق بهار نارنج نشان از بالا نرفتن احتمالی غلظت هورمون تنشی آرژنین وازوتوسین در خون باشد. دمای محیطی بالا منجر به کاهش مصرف خوراک در جوجه‌های گوشتی شد. بنابر این جوجه‌های گوشتی نیاز انرژی خود را به وسیله تجزیه چربی های بدن تامین می کنند که این منجر به افزایش تری گلیسرید خون شد (کونکا و کیرکپینار ۲۰۰۸). از جمله معایب وجود میکروب‌های مضر در دستگاه گوارش، افزایش تجزیهٔ پروتین و اسیدهای آمینهٔ مواد هضمی، فعالیت دی آمیناسیونی پروتین و اسیدهای آمینهٔ مصرفی و نیز افزایش سرعت تجزیهٔ آنها در اثر ترشح موادی از قبیل آنزیم اوره آز توسط میکروب‌ها است. با توجّه به اینکه گیاهان دارویی سبب کاهش جمعیت میکروبی مضر دستگاه گوارش می‌شود، لذا سرعت تجزیه‌ی پروتین و اسیدهای آمینهٔ مواد گوارشی کاهش یافته و مقادیر بیشتری از آنها جذب و در بدن ذخیره می‌شود و منجر به بهبود درصد لاشه و به دنبال آن باعث کاهش تبدیل

پروتین به چربی شده و مقادیر کمتری چربی نیز می-تواند در بدن تجمع یابد.

در این پژوهش، کاهش غلظت گلوکز، کلسترول و تری گلیسرید سرم خون می‌تواند مرتبط با الیاف خام و ترکیباتی مانند منتول در نعناع بوده باشد، چنانکه در طب سنتی از بعضی گیاهان از قبیل گزنه برای کاهش غلظت گلوکز و سیر به منظور کاهش غلظت کلسترول سرم خون و غیره استفاده می‌شد (طهماسبی و همکاران ۱۳۹۱). گیاهان دارویی به کار رفته در این آزمایش نیز اثرات مشابه این گیاهان را در زمینه‌ی متابولیت‌های خون اعمال نموده‌اند (لی و همکاران ۲۰۰۳).

بیان نسبی ژن HSP70 توسط عوامل محرک زیادی افزایش می‌یابد (از جمله هیپوکسی، اکسیژن واکنشگر، عفونت‌ها و اشعه یو وی، تنش گرمایی و غیره) (یابوناکا و همکاران ۱۹۹۵). در پژوهشی که به وسیله اکامبارام (۲۰۱۱) صورت گرفت نشان داه شد که چای و نعناع آنتی اکسیدان های موثر و قوی شناخته شدند که نقش کنترل کننده اکسیژن واکنشگر (ROS) را برعهده دارند. چای و نعناع هردو اثر حفاظتی و بازدارنده مرگ برنامه زی شده سلولی هستند و باعث کاهش بیان ژن HSP70 شدند که هم راستای یافته های پژوهش حاضر است. هیگدون و فری، (۲۰۰۳) و پادمینی و همکاران، (۲۰۰۸) ظرفیت داخلی نعناع از آنتی اکسیدان را عامل کاهش بیان نسبی ژن HSP70 دانسته اند. همچنین دوفرنس و همکاران (۲۰۰۱) در گزارش خود مکانیسم فعالیت آنتی اکسیدانی نعناع را با مهار مستقیم و یا رفع رادیکال‌های آزاد اکسیژن و یا گونه‌های اکسیژن واکنش گر و مهار آنزیم‌های اکسیداتیو در کاهش بیان ژن HSP70 تفسیر نمودند که در راستای یافته های پژوهش ما است. تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی تولید رادیکال سوپراکسید و اکسیژن واکنشگر (ROS)را در ماهیچه سینه افزایش می‌دهد (موجاهد و همکاران ۲۰۰۶). در محیط‌های اکسیداتیو، تولید رادیکال آزاد یک فرایند طبیعی محسوب می شود. انباشته شدن ROS شاید به بسیاری از مولکول‌های بزرگ بیولوژی مانند پروتین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و DNA آسیب برساند (میتس و همکاران ۱۹۹۹). پروتین شوک گرمایی اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی دارند و در تا خوردگی اولیه و مجدد پروتین‌ها کمک می کنند و باعث محافظت هسته سلول‌ها و غشای لیپیدی در مقابل آسیب می‌شوند و از مرگ برنامه ریزی شده سلول ها جلوگیری می‌کنند (هوپر ۲۰۰۵). شاید افزایش بیان نسبی ژن HSP70 در گروه نعناع نسبت به آنتی بیوتیک در پژوهش انجام شده نشان دهنده خاصیت آنتی اکسیدانی متوسط بوده و می تواند اکسیداسیون چربی‌ها را با کمک آنزیم‌های مهم که نقش قابل توجهی در حفظ تعادل بین رادیکال‌های آزاد و سیستم آنتی اکسیدانی دارد ربط داد. آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز جگر که موجب کاهش پراکسیداسیون لیپید می-شود با عصاره متانولی نعناع در جگر افزایش و در نتیجه تولید رادیکال آزاد در جگر را کاهش داد (اسمارت و همکاران ۲۰۰۸). فلاونوییدها دسته ای از پلی فنول‌ها است که در عصاره گرفته شده از بهار نارنج موجود می‌باشند (کوپر و واشبورن ۱۹۹۸). بر اساس پژوهش-های انجام شده فلاونوییدها تاثیرات فارماکولوژیک وسیعی از جمله ممانعت از اکسیداسیون لیپوپروتین‌های با وزن مولکولی کم ، جلوگیری از تجمع پلاکت‌ها و همچنین پایداری سلول‌های ایمنی را دارا هستند (محمودی و همکاران ۲۰۰۵). بر اساس گزارش اعلام شده بوسیله نول (۲۰۰۱) افزودن بتائین به جیره جوجه-های گوشتی به طور قابل توجهی باعث توسعه سیستم ایمنی شده و به این ترتیب پرنده را از خطرات تنش گرمایی محافظت می‌کند که شاید هم‌راستای پژوهش ما در مقابله با شرایط منفی تنش و افزایش سیستم ایمنی گروه‌های گیاهان دارویی و آنتی بیوتیک باشد.

نتیجه گیری

شاید بتوان در این پژوهش گفت که گیاهان دارویی استفاده شده با کنترل تجزیه و تولید برخی فراسنجه‌های

خونی سعی در کنترل مکانیسم اثر دفاعی بدن در شرایط تنش گرمایی را داشته اند. گیاهان دارویی نعناع و عرق بهار نارنج با تاثیر آنتی اکسیدانی خود توانستند بر شرایط بد تنش گرمایی غلبه کرده و تاثیرات منفی تنش گرمایی را که باعث القای بیان ژن HSP70 می‌شود، کاهش دهند. درنتیجه با استفاده از این گیاهان شاید بتوانیم از آسیب سلولی در این شرایط پیشگیری و هم از عوامل منفی بعد از آن جلوگیری کنیم.

منابع مورد استفاده

اساسی ک و نیلی ح، ۱۳۸۱. پرورش پرندگان اهلی درآب و هوای بسیار گرم.(ترجمه) چاپ اول، انتشارات دانشگاه شیراز. ٤١٢ صفحه.

طهماسبی ا ه. شریعتمداری ف و کریمی ترشیزی م ا،۱۳۹۱. تأثیر استفاده از عصاره الکلی گیاه آویشن باغی ، ویتامین E و چربی در جیره غذایی بر میزان کلسترول سرم خون و زرده تخم مرغ و سیستم ایمنی مرغ تخم گذار تحت شرایط تنش حرارتی. فصل نامه گیاهان دارویی. دوره دوم. شماره ۹. صفحه های: ۱۸۳-۱۹۱.

Bartlett JR and Smith MO, 2003. Effects of different levels of zinc on the performance and immunocompetence of broiler under heat stress. Poultry Science 82:1580-1588.

Bottje WG and Harrison PC, 1985. Effect of carbonated water on growth performance of cockerels subjected to constant and cyclic heat stress temperatures. Poultry Science 64:1285–1292.

Borges SA, Fischer Da. Silva AV, Majorka A, Hooge DM , and Cummings KR, 2004. Physiological responses of broiler chickens to heat stress and dietary electrolyte balance (sodium plus potassium minus chloride, miliequivalents per kilogram). Poultry Science 83:1551-1558.

Bopanna KN, Kannan J, Gadgil S, Balaraman ER and Rathore SP, 1997. Antidiabetic and anti hyperglycaemic effects of neem seeds kernel powder on alloxan diabetic rabbits. Indian Journal of Pharmacology 29: 162-167.

Cooper MA and Washburn KW, 1998.The relationships of body temperature to weight gain,feed consumption, and feed utilization inbroilers under heat stress. Poultry Science 77: 237-242.

Dufresne CJ and Farnworth ER, 2001. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. Journal of Nutritional Biochemistry 12: 404-421.

Duncan DB, 1955. Multiple ranges and multiple F-test. Biometrics 11: 1- 420.

Ekambaram PM, 2011. HSP70 Expression and its Role in Preeclamptic Stress. Indian Journal of Biochemistry and Biophysic 48: 243-255.

Ireland H E, Leoni F, Altaie O, ,Birch CS, Coleman RC, Hunter Lavin C, et al. 2007. Measuring the secretion of heat shock proteins from cells. Methods 43:176-183.

Febbraio MA and Koukoulas I, 2000. HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. Journal of Applied Physiology 89: 1055-1060.

Fellenberg MA and Speisky H, 2006. Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability. World Poultry Science Journal 62: 53-7.

Higdon JV and Frei B, 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 43: 89-143.

Hooper PL and Hooper JJ, 2005. Loss of defense against stress: Diabetes and heat shock proteins. Diabetes Technology and Therapeutic. 7: 204-208.

Iwagami Y, 1996. Changes in the ultrastructure of human cells related to certain biological responses under hyperthermic culture conditions. Human Cell, 9: 353-366.

Lee KW, Everts H and Beyen AC, 2003. Dietary carvacrol lowers body gain but improves feed conversion in female broiler chickens. Journal of Applied Poultry Research 12: 394-399.

Lio M, Moriyama A, Matsumoto Y, Takakin N and Fukumoto M, 1985. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. Agricultural and Biological Chemistry 49: 2173–2176.

Livak KJ and Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. Methods 25: 402-408.

Kregel KC, 2002. Heat shock proteins: Modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. Journal of Applied Physiology 92:2177-2186.

Khan SH, Hasan S, Sardar R, Anjum MA, 2008. Effects of dietary garlic powder on cholesterol concentration in Native Desi laying hens. Journal of Food Technology 3: 207-213.

Konca Y and Kirkpinar F, 2008. Effect of betaine on performance, carcass, bone and blood characteristics of broilers during natural summer temperatures. Journal of Animal Veterinary Advance 7: 930-937

Lemhadri AL, Hajji JB and Eddouks M, 2006. Cholesterol and triglycerides lowering activities of caraway fruits in normal and streptozotocin diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology 106: 321-326.

Mahmoud KZ and Edens FW, 2005. Influence of organic selenium on HSP70 response of heat stress and entropathogenic Escherichia Coli-challenged broiler chicken. Journal of Comparative Biochemistry and Physiology 141: 69-75.

Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez De and Castro I, 1999. Antioxidant enzymes in human diseases. Clinical Biochemistry 32: 595-603

Mujahid A, Sato K, Akiba Y and Toyomizu M, 2006. Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via down-regulation of uncoupling protein content. Poultry Science 85: 1259-1265.

Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez De and Castro I, 1999. Antioxidant enzymes in human diseases. Clincal Biochemistry 32: 595-603.

Null G, 2001.The antioxidant vitamin-vitamin C, in WWW.Vitamincfoundaion.org.

Padmini E, Prema K, Vijaya Geetha B and Usha Rani M, 2008. Comparative study on composition and antioxidant properties of mint and tea extract. Internatinal Journal of Food Science and Technology 43: 1887-1895.

Sahin K and Kucuk O, 2003. Heat stress and dietary vitamin supplementation of poultry diets. Nutrition Abstracts and Reviews Series B: Livestock Feeds and Feeding 73:41R–50R.

SAS Institute. 2002. SAS Users Guide Statistics. Version 8. 1 Ed. SAS institute Inc. Cary. Nc. USA.

Samarth RM, Panwar M, Kumar M, Soni A, Kumar M and Kumar, A, 2008. Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extracts. Food Chemistry 106: 868-873.

Senanayake GV, Maruyama M, Sakono M, Fukuda N, Morishita T, Yukizaki C, Kawano M and Ohta H, 2004. The effects of bitter melon (*Momordica charantia*) extracts on serum and liver lipid parameters in hamsters fed cholesterol free and cholesterol-enriched diets. Journal of Nutrition Science and Vitaminology 50: 4253-4257.

Sturkie PD, 1995. Avian Physiologhy. 4th ed. Springer Verlag. New York, pp: 115-270.

Yabunaka N, Ohtsuka Y, Watanabe I, Noro H, Fujisawa H and Agishi Y, 1995. Elevated levels of heatshock protein 70 (HSP70) in the mononuclear cells of patients with non- insulin – dependent diabetes mellitus. Diabetes Research and Clinical Practice 30: 143-147.

Effect of *Mentha piperita* powder and *Citrus aurantium* extract on heat shock protein (HSP70) gene expression and some blood parameters of broilers chickens in heat stress condition

M Smaili[1], H Deldar[*2] and Z Ansari Pirsaraei[2]

Received: March 16, 2015 Accepted: January 26, 2016
[1]MSc Graduated Student, Animal Science Department, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
[2]Assistant Professor and Associated Professor, respectively, Animal Science Department, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
[*]Corresponding author: Hamid Deldar, email address: h.deldar@sanru.ac.ir

Abstract
BACKGROUND: The application of medicinal herbs has a meaningful importance in human health because of their compounds have the minimal side effects on human body. This study was conducted to evaluate the effects of peppermint powdered extract, orange flower extract and neomycin on Heat Shock Protein (HSP70) gene expression and some blood parameters of broilers chickens under heat stress conditions. **METHODS:** In this study, 120 one – day old Ross 308 broiler chicks have been used. The research has been performed during 6 weeks in a completely randomized design (CRD) with and 4 treatments 3 replicates and 10 chicks per each replicate. The experimental treatments include: control treatment, peppermint powdered extract (2 % of feed), orange blossom extract (2% of the consumed water) and neomycin antibiotic (0.2 g/kg of feed). The relative gene expression of heat shock protein 70 (HSP70) and some blood parameters have been examined in the blood. **RESULTS:** The highest concentration of triglyceride was observed in orange blossom extract treatment ($P<0.05$).The gene expression of HSP70 in all treatments were significantly ($P<0.05$) lower than the control treatment. **CONCLUSIONS:** The findings of this research suggested that the medicinal herbs namely peppermint and orange blossom extract are capable to control the negative effect of heat stress on chicken performance.

Key words: Peppermint, Orange blossom extract, Heat stress conditions, HSP70, Broilers