

Priming jelitowych genów cytoprotekcyjnych i pojemności antyoksydacyjnej poprzez fitogeniczne dodatki do paszy brojlerów

Czasopismo *Animal Nutrition* opublikowało artykuł naukowy zawierający wyniki badań dotyczące stosowania Anco FIT Poultry u brojlerów i jego wpływu na ekspresję genów cytoprotekcyjnych na poziomie jelitowym. Niniejszy artykuł stanowi skrócone tłumaczenie i jest prezentowany w *Polskim Drobniarstwie* za zgodą autorów.

Streszczenie

W niniejszym badaniu oceniano potencjał premiksu fitogenicznego (PF) na bazie imbiru, melisy, oregano i tymianku w stymulowaniu ekspresji genów cytoprotekcyjnych na poziomie jelita brojlerów. Wpływ różnych dawek PF na wybrane geny (związane z ochroną organizmu gospodarza przed utlenianiem, ze stresem i stanem zapalnym) był profilowany wzdłuż jelit brojlerów. Badane geny związane z ochroną przed utlenianiem to: *CAT*, *SOD1*, *GPX2*, *HMOX1*, *NQO1*, *Nrf2* i *Keap1*. Geny związane ze stresem: białka szoku cieplnego *HSP70* i *HSP90*. Geny związane ze stanem zapalnym: *NF-kB1*, *TLR4*. Dodatkowo, wycinki jelit brojlerów zbadano pod kątem ich całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAC). W zależności od dawki PF (tj. 0, 750, 1000 i 2000 mg/kg paszy) w paszach pełnoporcjowych, 1-dniowe kurczęta brojlery Cobb (n = 500) przydzielono do następujących 4 grup żywieniowych: kontrolna (KON), PF-750, PF-1000 i PF-2000. Każda grupa obejmowała 5 powtórzeń po 25 kurcząt z dostępem *ad libitum* do paszy i wody. Dane przeanalizowano za pomocą ANOVA, a średnie porównano za pomocą testu Tukeya (HSD).

Wprowadzenie

W intensywnej hodowli drobiu ptaki stoją przed szeregiem wyzwań związanych ze stresora-

Animal Nutrition 6 (2020) 305–312

Contents lists available at ScienceDirect

Animal Nutrition

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/jan>

Original Research Article

Priming of intestinal cytoprotective genes and antioxidant capacity by dietary phytochemical inclusion in broilers

Konstantinos C. Mountzouris^a, Vasileios V. Paraskeuas, Konstantinos Fegeros

^aDepartment of Nutritional Physiology and Feeding, Agricultural University of Athens, Greece

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Article history: Received 11 October 2019 Received in revised form 8 April 2020 Accepted 21 April 2020 Available online 26 June 2020</p> <p>Keywords: Poultry Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 Antioxidant Phytochemical Gut</p>	<p>The potential of a phytochemical premix (PP) based on ginger, lemon balm, oregano and thyme to stimulate the expression of cytoprotective genes at the broiler gut level was evaluated in this study. In particular, the effects of PP inclusion levels on a selection of genes related to host protection against oxidation (catalase [CAT], superoxide dismutase 1 [SOD1], glutathione peroxidase 2 [GPX2], heme oxygenase 1 [HMOX1], NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 [NQO1], nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 [Nrf2] and kelch like ECH associated protein 1 [Keap1]), stress (heat shock 70 kDa protein 2 [HSP70] and heat shock protein 90 alpha family class A member 1 [HSP90]) and inflammation (nuclear factor kappa B subunit 1 [NF-κB1], Toll-like receptor 2 family member B [TLR2B] and Toll-like receptor 4 [TLR4]) were profiled along the broiler intestine. In addition, broiler intestinal segments were assayed for their total antioxidant capacity (TAC). Depending on PP inclusion level (i.e. 0, 750, 1000 and 2000 mg/kg diet) in the basal diets, 1-d-old Cobb broiler chickens (n = 500) were assigned into the following 4 treatments: CON, PP-750, PP-1000 and PP-2000. Each treatment had 5 replicates of 25 chickens with <i>ad libitum</i> access to feed and water. Data were analyzed by ANOVA and means compared using Tukey's honest significant difference (HSD) test. Polynomial contrasts tested the linear and quadratic effect of PP inclusion levels. Inclusion of PP increased ($P < 0.05$) the expression of cytoprotective genes against oxidation, except CAT. In particular, the cytoprotective against oxidation genes were up-regulated primarily in the duodenum and the ceca and secondarily in the jejunum. Most of the genes were up-regulated in a quadratic manner with increasing PP inclusion level with the highest expression levels noted in treatments PP-750 and PP-1000 compared to CON. Similarly, intestinal TAC was higher in PP-1000 in the duodenum ($P = 0.011$) and the ceca ($P = 0.050$) compared to CON. Finally, increasing PP inclusion level resulted in linearly reduced ($P < 0.05$) expression of <i>NF-κB1</i>, <i>TLR4</i> and <i>HSP70</i>, the former in the duodenum and the latter 2 in the ceca. Overall, PP inclusion consistently up-regulated cytoprotective genes and down-regulated stress and inflammation related ones. The effect is dependent on PP inclusion level and the intestinal site. The potential of PP to beneficially prime bird cytoprotective responses merit further investigation under stress-challenge conditions.</p> <p>© 2020, Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of KeAi Communications Co., Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).</p>

* Corresponding author.
E-mail address: konstantin@vet.uoi.gr (K.C. Mountzouris).
Peer review under responsibility of Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine.

Production and Hosting by Elsevier on behalf of KeAi

https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.04.003
2405-4545/© 2020, Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of KeAi Communications Co., Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

mi pochodzenia endogenego (np. metabolicznego) i środowiskowego (np. temperatura, skład paszy i ksenobiotyki), które, jeśli nie zostaną szybko i odpowiednio opanowane, prowadzą do stresu oksydacyjnego. Może on skutkować utlenianiem

białek komórkowych, peroksydacja lipidów, uszkodzeniem DNA i stanem zapalnym. Ma to szkodliwy wpływ na wydajność i zdrowie ptaków oraz jakość produktów drobiowych (Adly, 2010; Sahin i wsp., 2013; Lee i wsp., 2017; Da Silva i wsp., 2018; Carvalho i wsp., 2019).

Pasza poza jej standardową zawartością związków antyoksydacyjnych takich jak witaminy, polifenole, pierwiastki śladowe, karotenoidy i ko-faktory (Allen i Tresini, 2000; Adly, 2010; Lee i wsp., 2017), może zawierać związki bioaktywne posiadające dodatkowe działanie antyoksydacyjne poprzez stymulację wrodzonego systemu detoksykacji i obrony antyoksydacyjnej. Ta ostatnia obejmuje indukowaną ekspresję genów białek cytoprotekcyjnych o działaniu detoksykującym, przeciwutleniającym i przeciwzapalnym (Kohle i Bock, 2006; Wullaert i wsp., 2011; Huang i wsp., 2015). Współczesna wiedza sugeruje, że fitogeniczne związki pochodzące z różnych warzyw, owoców, przypraw i ziół aktywują ścieżkę sygnalizacyjną znaną jako *Keap1/Nrf2/ARE* i indukują ekspresję enzymów antyoksydacyjnych i detoksykujących fazy II (Stefanson i Bakovic, 2014; Ahmed i wsp., 2017; Lee i wsp., 2017). Co więcej, szlak *Keap1/Nrf2/ARE* jest ściśle powiązany ze szlakiem *NF-kB1*, o którym wiadomo, że pośredniczy w odpowiedzi immunologicznej na infekcje i stany zapalne, tym samym aktywnie wpływając na homeostazę nabłonka (Wullaert i wsp., 2011; Stefanson i Bakovic, 2014; Wardyn i wsp., 2015).

Jak dotąd ograniczona liczba badań dotyczyła modulacji szlaku *Keap1/Nrf2/ARE* u brojlerów. Na przykład aktywacja niektórych genów *ARE* przez fitogeniki paszowe w tkankach jelita czczego i jelita ślepego brojlerów była skorelowana ze zmniejszonym stresem oksydacyjnym (Mueller i wsp., 2012). Dodatki fitogeniczne u brojlerów poddanych stresowi termicznemu łagodziły stres poprzez stymulację szlaku *Nrf2/ARE* oraz zwiększenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych i detoksykujących (Sahin i wsp., 2013; Liu i wsp., 2014; Song i wsp., 2017; Zhang i wsp., 2018). Ponadto aktywacja szlaku *Nrf2* przez fitogeniki paszowe, takie jak kurkumina i ekstrakt z pestek winogron, łagodziła immunotoksyczność indukowaną przez aflatoksynę B1 i stres oksydacyj-

ny u brojlerów (Wang i wsp., 2018; Rajput i wsp., 2019). Jest jednak jasne, że zdolności przeciwutleniające i przeciwzapalne fitogeników będą w dużej mierze zależeć od chemicznych właściwości składników fitogenicznych, poziomu ich użycia w paszy, absorpcyjnej i postabsorpcyjnej kinetyki fitogenicznej oraz fizjologii przewodu pokarmowego organizmu gospodarza (Brenes i Roura, 2010; Mueller i wsp., 2012; Sahin i wsp., 2013; Stefanson i Bakovic, 2014; Paraskeuas i wsp., 2016, 2017; Lee i wsp., 2017; Huang i Lee, 2018).

Dlatego potencjał fitogeników do aktywacji szlaku *Keap1/Nrf2/ARE* na poziomie jelitowym może być dodatkowym atutem w ochronie wydajności i zdrowia ptaków, który zasługuje na dalsze badania. Niedawno wykazaliśmy, że włączenie do paszy premiksu fitogenicznego (PF) na bazie imbiru, melisy, oregano i tymianku w brojlerach zwiększyło wydajność mięsną tuszy i uzysk mięsa, a dodatkowo PF zwiększył odporność tkanek mięśni i wątroby na utlenianie (Mountzouris i wsp., 2019). Celem niniejszej pracy było uzyskanie dalszej wiedzy na temat potencjału PF do modulowania ekspresji kluczowych genów szlaku *Keap1/Nrf2/ARE* wzdłuż jelita brojlerów. Co więcej, ekspresja innych genów istotnych dla stanów zapalnych i stresu, takich jak *NF-kB1*, *TLR2* i *TLR4* oraz *HSP70* i *HSP90* była również profilowana w jelicie brojlerów. Na koniec, oprócz ocenionych markerów molekularnych, określono całkowitą pojemność antyoksydacyjną (TAC) każdego odcinka jelita.

Premiks fitogeniczny użyty w tym badaniu (**Anco FIT Poultry**, Anco Animal Nutrition Competence, GmbH, Sankt Poelten, Austria) to zastrzeżona mieszanka substancji fitogenicznych sprzedawana jako „aktywator mechanizmów adaptacyjnych w jelitach” o stężeniu składnika aktywnego 70 g/kg. PF użyty w tym badaniu składał się z funkcjonalnych substancji smakowych imbiru, melisy, oregano i tymianku na nośnikach funkcjonalnych: 1m558 bentonitu i klinoptylolitu.

Wyniki

Efekt liniowy i kwadratowy różnych dawek PF analizowano statystycznie za pomocą kontrastów wielomianowych.

Tab. 1. Całkowita pojemność antyoksydacyjna (TAC) wzdłuż błony śluzowej jelit 42-dniowych brojlerów (mmol TE na 1g tkanki)

	Grupa żywieniowa ¹				SEM	Wartości P ²		
	KON	PF-750	PF-1000	PF-2000		P _{ANOVA}	P _{lin}	P _{quad}
Dwunastnica	37,76^a	47,86^{ab}	54,94^b	50,45^{ab}	4,981	0,011	0,007	0,046
Jelito cienkie	52,67	52,99	55,75	48,35	7,781	0,819	0,681	0,488
Jelito czcze	43,19	46,45	44,47	52,23	7,092	0,598	0,270	0,657
Jelito ślepe	29,41^a	39,98^{ab}	44,58^b	35,45^{ab}	5,569	0,050	0,193	0,014

TE = równoważniki Troloxu

¹ KON, pasza pełnoporcjowa bez dodatku premiksu fitogenicznego (PF); PF-750, pasza pełnoporcjowa zawierająca PF w ilości 750 mg/kg; PF-1000, pasza pełnoporcjowa zawierająca PF w ilości 1000 mg/kg; PF-2000, pasza pełnoporcjowa zawierająca PF w ilości 2000 mg/kg. Dane przedstawiają średnie z n=10 brojlerów analizowanych z każdej grupy.

² Analiza statystyczna objęła różnice między grupami (ANOVA) oraz liniowym (lin) i kwadratowym (quad) wpływem poziomu dodatku PF (kontrasty wielomianowe). Średnie w tym samym wierszu z różnymi indeksami górnymi (a, b) różnią się przy P < 0,05

Profil ekspresji wybranych genów wzdłuż jelita brojlerów

Dodatek PF zwiększył (P<0,05) ekspresję genów szlaku *Keap1/Nrf2/ARE*, cytoochronnych przed utlenianiem, z wyjątkiem *CAT* (dane dostępne w pełnym artykule). W szczególności, aktywność genów cytoochronnych przed utlenianiem *SOD1*, *GPX2*, *HMOX1*, *NQO1*, *Nrf2* oraz *Keap1* była zwiększona głównie w dwunastnicy i jelicie ślepym, jak również w jelicie czczym. Większość genów uległa zwiększonej aktywacji wraz ze wzrostem dawki PF w sposób kwadratowy, a najwyższe poziomy ekspresji odnotowano w grupach PF-750 i PF-1000 w porównaniu z grupą kontrolną.

Wreszcie, rosnąca dawka PF spowodowała linio-wno zmniejszoną (P<0,05) ekspresję genów *NF-kB1* (stany zapalne) w dwunastnicy i jelicie ślepym oraz *TLR4* (stany zapalne) i *HSP70* (stres) w jelicie ślepym (dane dostępne w pełnym artykule).

Profil całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) w jelicie

Istotne różnice w TAC między grupami stwierdzono w dwunastnicy (P=0,011) i jelicie ślepym (P=0,050), jak pokazano w tabeli 1. W obu przypadkach grupa PF-1000 miała najwyższy TAC w porównaniu z grupą kontrolną.

Wnioski

Praca ta dostarczyła nowych informacji na temat działania PF w jelicie brojlerów. Wykazano, że dodanie PF pobudza ekspresję genów niezbędnych dla ochrony organizmu gospodarza przed utlenianiem oraz genów podlegających własnej regulacji, istotnych dla stanów zapalnych (*NF-kB1* i *TLR4*) oraz stresu (*HSP70*). Efekt ten jest zależny od poziomu dawki PF i miejsca w jelicie. Profilowanie jelit ukazało dwunastnicę i jelito ślepe, a następnie jelito czcze, jako segmenty jelitowe najbardziej podatne na modulację przez PF. Poprawiona odpowiedź jelit brojlerów na włączenie PF została dodatkowo udokumentowana przez podwyższony TAC dwunastnicy i jelita ślepego przy dodaniu PF wynoszącym 1000 mg/kg diety. Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe razem, **użycie Anco FIT Poultry spowodowało powtarzalną aktywację genów cytoprotekcyjnych i wyciszenie genów związanych ze stresem i stanem zapalnym**. Podsumowując, wyniki badań wykazały potencjał fitogeniczny do korzystnego stymulowania wyjściowej odpowiedzi cytoochronnej ptaków, która zasługuje na dalsze badania w obliczu różnych wyzwań związanych ze stresorami.

Artykuł sponsorowany.

Dystrybutorem badanego premiksu fitogenicznego Anco FIT Poultry na terenie Polski jest firma NOACK Polen. Zapraszamy do kontaktu.

dr inż. Katarzyna Sartowska-Żygowska | Product Manager Poultry Feed Additives
 NOACK Polen Sp. z o.o. | ul. Poloneza 93 | 02-826 Warszawa
 Tel.: +48 22 853 37 92 | Mob: +48 512 581 224 | Fax: +48 22 853 77 26
 Web: www.noackgroup.com | Mail: ksartowska@noackgroup.com