16(3) 51-60, Autumn 2024

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Effect of Dietary Encapsulated Lavender Essential Oil on Lymphoied Organ, Liver Enzyme and Antioxidant Property, Intestinal Microbial Population and MUC_2 Gene Expression in Broiler Japanese Quails

Amir Naghieeh*, Sayed Nouraldin Tabatabaee, Majid Toghiyani, Amirdavar Forouzandeh Shahraki

Department of Animal Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Key Words

Herbal essential oil
Immune system
Encapsulation
Gene expression
Intestine

Abstract

Introduction: Lavender essential oil has antioxidant, antimicrobial, immune system enhancing and digestion and absorption propertie; hence the aim of this study was to determine effect of dietary encapsulated lavender essential oil on lymphoied organ, liver enzyme and antioxidant property, intestinal microbial population and MUC2 gene expression in broiler Japanese quails.

Materials & Methods: The experiment was done with five hundred one days old quail with 5 treatments including the control group and others those consuming encapsulated lavender essential oil levels of 100 200,300 and 400 mg per kg of standard diet with 5 repetitions and 20 quail each. At the end of the study period, the thymus, spleen, and bursa of fabricius relative weight of of two birds from each repetition was examined. Alkaline phosphatase, alanine transaminase and aspartate transaminase and such as glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase and total antioxidant capacity were examined. Responses to the dinitrochlorobenzene sensitization challenge and mitogen injection of phytohemagglutinin into the left-wing web test were investigated. To investigate the expression of the MUC2 gene, samples from jejunum of two quails were collected. MUC2 gene expression analysis was done using Fermentase company's RNA extraction kit and after RNA extraction and removal of genomic DNA residues and cDNA synthesis for RT-PCR reactions, values related to threshold cycle and CTΔ for technical repetitions of MUC2 gene and β-actin It was calculated.

Results: The results of this study showed that encapsulated lavender essential oil supplementation increased thymus, spleen, and bursa of fabricius relative weight compared to the control ($P\leq0.05$). Liver enzyme activities of ALT, AST and ALP decrease and there were GPX, CAT, SOD and TAC significantly increased instead ($P\leq0.05$). Data showed significant increase in the Lactobacillus colones in contrast to E. coli and Salmonella colonies ($P\leq0.05$). Villi depth and surface, crypth deptht and the number of goblet cells indicate that the beneficial effects of the lavender essential oil on improvment the health status of experimental quails ($P\leq0.05$). MUC2 gene expression increased under influnce of dietary lavender essential oil supplemented diets ($P\leq0.05$).

Conclusion: In conclusion the results of current study showed the beneficial effect of dietary encapsulated lavender essential oil on lymphoied organ relative weights, liver enzyme and antioxidant property, intestinal microbial population, intestinal morphology and MUC2 gene expression in experimental broiler quails.

* Corresponding Author's email: amirnaghieeh@gmail.com
Received: 6 April 2023; Reviewed: 10 May 2023; Revised: 6 June 2023; Accepted: 20 August 2023
(DOI): 10.70102/AEJ.2025.16.3.7

مقاله پژوهشی

تاثیر مصرف اسانس اسطوخودوس ریز پوشانی شده بر اندام های لمفوئیدی، فعالیت آنزیم های کبدی، پاد اکسندگی و بیان ژن MUC_2 در بلدرچین های نر ژاپنی

امیر نقیه**، سیدنورالدین طباطبایی، مجید طغیانی، امیر داورفروزنده‌شهرکی

گروه علوم دامی، واحد (خوراسگان) اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

کلمات کلیدی

اسانس گیاهی
سیستم ایمنی
ریز پوشانی
بیان ژن
روده

چکیده

مقدمه: اسانس اسطوخودوس دارای خواص پاد اکسندگی، ضدمیکروبی و سیستم ایمنی می‌باشد و هدف از این مطالعه بررسی تاثیر مصرف جیره‌های حاوی سطوح مختلف اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده بروزن نسبی اندام‌های لمفوئیدی، فعالیت آنزیم‌های کبدی، پاداکسندگی و بیان ژن MUC2 در بلدرچین‌های نر ژاپنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۵۰۰ قطعه بلدرچین ژاپنی در سن یک روزگی با ۵ تیمار آزمایشی شامل گروه شاهد و تیمارهای مصرف‌کننده سطوح ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده در هر کیلوگرم خوراک پایه با ۵ تکرار و ۲۰ قطعه بلدرچین در هر تکرار استفاده گردید. در انتهای دوره (۳۵ روزگی) پس از کشتار دو قطعه پرنده نر از هر تکرار، وزن نسبی اندام‌های تیموس، طحال و بورس فابریسیوس محاسبه شد. فعالیت شاخص‌های کبدی نظیر آلکالین فسفاتاز، آلانین ترانس آمیناز وآسپارتات ترانس آمیناز و آنزیم‌های پاداکسندگی سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پروکسیداز، کاتالاز و ظرفیت پاداکسندگی تام پلاسما مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی میکروفلور روده از ایلئوم و ریخت‌شناسی بافت روده توسط نمونه‌برداری از ژوژنوم بلدرچین‌های ذبح شده صورت گرفت. آنالیز بیان ژن MUC_2 با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت فرمنتاز انجام شد و پس از مراحل استخراج RNA و حذف باقی‌مانده‌های DNA ژنومی و سنتز cDNA برای واکنش‌های RT-PCR مقادیر مربوط به چرخه آستانه و میزان ΔCT برای تکرارهای تکنیکی ژن MUC_2 و β-actin محاسبه گردید.

نتایج: مصرف جیره‌های حاوی سطوح مختلف اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده سبب افزایش وزن نسبی تیموس، طحال و بورس فابریسیوس در بلدرچین‌های ژاپنی گردید ($P\leq ۰/۰۵$). کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی و بهبود شاخص‌های پاداکسندگی و ظرفیت پاداکسندگی تام پلاسما در اثر مصرف سطوح ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده مشاهده گردید ($P\leq ۰/۰۵$). بررسی جمعیت میکروبی روده نشان‌دهنده افزایش جمعیت لاکتوباسیلوس و کاهش جمعیت اشرشیاکلی و سالمونلا انتریکا در گروه‌های مصرف‌کننده اسانس در مقابل گروه کنترل بود ($P\leq ۰/۰۵$). افزایش معنی‌دار سطح خمل‌ها و تراکم بیش‌تر سلول‌های جامی نشان‌دهنده اثرات مفید اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده در بهبود وضعیت سلامت روده بلدرچین‌های مصرف‌کننده جیره‌های آزمایشی بود ($P\leq ۰/۰۵$). با مصرف سطوح ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده افزایش حداکثری بیان mRNA ژن MUC_2 در بلدرچین‌های آزمایشی مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده با داشتن اثرات مفید بر سیستم ایمنی، تحریک انتخابی رشد، بهبود جمعیت میکروبی دستگاه گوارش و افزایش تراکم سلول‌های جامی و با تحت تأثیر قرار دادن ویسکوزیته موکوس و افزایش لایهٔ موکوسی منجر به ایجاد تغییرات دینامیکی در ترشح موسین و افزایش بیان ژن موسین ۲ در بلدرچین‌های ژاپنی نر تحت مطالعه شد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: amirnaghieeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۷ فروردین ۱۴۰۲؛ تاریخ داوری: ۲۰ اردیبهشت ۱۴۰۲؛ تاریخ اصلاح: ۱۶ خرداد ۱۴۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۲۹ مرداد ۱۴۰۲
(DOI): 10.70102/AEJ.2025.16.3.7

مقدمه

در سال های اخیر افزایش کمی و کیفی فرآورده‌های طیور به منظور تامین نیاز پروتیینی جامعه، مورد توجه ویژه و جهانی قرار گرفته است (۳). با توجه به رشد سریع، پایین بودن سن بلوغ جسمی و جنسی، فاصله نسلی کوتاه، میزان تخم‌گذاری بالا، ویژگی‌های غذایی گوشت بلدرچین پرورش آن به صنعتی سودآور تبدیل شده است و در میان سبد غذایی مصرف کنندگان از جایگاه خاصی برخوردار است (۴۴). از زمان ممنوعیت مصرف پادزی های محرک رشد و تلاش به جهت جایگزینی افزودنی‌های جدید به‌عنوان یک منبع بهداشتی و یا دارویی، استفاده از ترکیبات گیاهی و اجزای مشتق شده آن ها در جیره پرندگان مورد توجه محققان تغذیه طیور قرار گرفته است (۹). اسانس‌های گیاهی مایعات آب گریز تغلیظ شده‌ای هستند که حاوی ترکیبات فرار آروماتیک می‌باشند که خاصیت ضدمیکروبی و محافظت کننده آن‌ها، از دیر باز شناسایی شده است (۲)، این ترکیبات حاوی زنجیره‌های کربن غیراشباع می‌باشند و توسط نور و حرارت به‌راحتی اکسید می گردند و منجر به ایجاد واکنش‌هایی با حساسیت بالا می‌شوند (۱۵). به‌دلیل پائین بودن حلالیت اسانس‌های در آب، معمولا دسترسی و جذب زیستی آن ها اندک بوده در صورت عدم استفاده از روش مناسب استفاده، ممکن است این ترکیبات نتوانند اثرات مورد انتظار خود را در قسمت هدف برجای بگذارند (۴). تکنیک ریز پوشانی یا کپسوله کردن مواد معطر و اسانس‌های گیاهی سبب محافظت آن‌ها در برابر نور، حرارت، اکسیژن و حفظ مواد موثره آن‌ها می گردد (۱۲). این موضوع فرصت مناسبی را به‌منظور بررسی این ریز کپسول‌ها در تغذیه پرندگان که ظرفیت آنزیمی و به تبع آن هضم و جذب نسبتا پایینی دارند، ایجاد می کند و هم‌چنین می‌تواند از اثرات متقابل مواد موثره آن ها با دیگر اجزای موجود در خوراک محافظت کند (۱۵). علاوه بر این ریز پوشانی نمودن اسانس های گیاهی سبب افزایش مکانیسم جذب سلولی و بهبود خاصیت درمانی و سهولت دسترسی آن ها می گردد (۱۸). دستگاه گوارش اولین محل اثر مورد انتظار برای افزودنی‌های مشتق شده از گیاهان و سامانه‌ای است که دو هدف متفاوت یعنی افزایش جذب مواد مغذی (۶) و کاهش زیان های آنتی‌ژنی را دنبال می کند (۱۹). سد حفاظتی لوله گوارش به طور اختصاصی و غیراختصاصی و پویا عمل می کند (۴۳) و توانایی تغییر سرعت حرکات دودی، تغییر روند تجزیه و بازسازی سلول‌های روده اعم از تغییر در تکثیر، مهاجرت و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، تنظیم نفوذپذیری اتصالات محکم بین سلول های روده، تغییر در تولید و ترکیب موکوس تغییر روند تمایز سلول‌های بنیادی به سمت ایمنی‌زایی بیش‌تر با پاسخ‌های ذاتی و اکتسابی (۱۶) و امکان تکثیر میکروفلور همزیست را از طریق ترشحات روده را دارد (۳). ساختمان شیمیایی موکوس نقش مهمی به‌عنوان یک سد دفاعی در روده دارد زیرا از یک طرف گلیکوپروتیین‌های موجود در ساختمان موکوس به وسیله زنجیرهای الیگوساکاریدی هتروژن برای چسبیدن به باکتری‌های وارد شده به‌روده در رقابت هستند و مانع رسیدن عوامل بیماری‌زا به سلول های بافت پوششی می شوند و از طرفی دیگر به‌واسطه وجود کربوهیدرات در ساختمان خود محیط مناسبی را برای تکثیر میکروفلورهای خاص روده فراهم می آورد و از این‌رو لایه موکوسی به‌عنوان بخشی از سیستم ایمنی ذاتی عمل می نماید (۱۳). موسین ها اصلی ترین ترکیبات مخاطی و موکوسی و اولین خط دفاعی غیرایمنی مربوط به عملکرد حفاظتی دستگاه گوارش هستند که توسط سلول‌های گابلت ساخته می‌شوند (۳۸). این ساختارهای عمدتا گلیکوپروتیینی با وزن مولکولی بالا، نقش مهمی در حفاظت از لایه پوششی مجاری گوارشی (۲۹)، تنفس سلولی، فرآیندهای تولیدمثلی و جلوگیری از ورود اجرام بیماری‌زا (۳۳) و جذب مواد غذایی در دستگاه گوارش پرندگان را دارند (۴۲). موسین‌ها در حقیقت دسته‌ای از ترکیبات زیستی می‌باشند که دارای دو جزء کربوهیدراتی و پروتیینی هستند و با پیوند گلیکوزیدی به هم اتصال دارند و موسین پس از ترشح، لایه موکوس را در روده به‌وجود می‌آورد (۳۷). موسین هم‌چنین نقش مهمی در انتقال مواد مغذی از درون کانال گوارشی به غشاء داخلی (۲۶) دارد و کاهش سنتز موسین موجب کاهش جذب مواد مغذی موجود در جیره می شود (۷). MUC_2 یکی از مهم‌ترین انواع موسین‌های ترشح شده توسط سلول‌های گابلت دستگاه گوارش در پرندگان است که به فرم ژل بوده و بر روی کروموزوم شماره ۵ در روده پرندگان قرار داد (۳۶). اسطوخودوس با نام علمی *Lavandul stuechas* گیاهی بوته‌ای و پر پشت از تیره نعناع می‌باشد (۴۵). اسانس گیاه اسطوخودوس حاوی بورنئول،۱و۸ سینئول، لینالول، لینالیل استات، آلفا کادینول، اوسیمن، کامفرو کاریوفیلن اکساید است (۲۷). از دیگر ترکیبات موجود در این گیاه، می‌توان به تانن، کومارین، فلاوونوییدها و فیتواسترول‌ها اشاره نمود (۶). برخی محققان نشان دادند لینانول و لینالین استات موجود در اسانس اسطوخودوس دارای اثرات محرک در سیستم پاراسمپاتیک می‌باشند و سبب فعالیت آرام‌بخشی و ضدانقباضی می گردند (۳۱). یافته‌های حاصل از مطالعات کاهش معنی‌داری در بیان ژن MUC_2 در جوجه‌های تغذیه شده با جیره پایه و بدون مکمل گیاهان داروئی نظیر اسطوخودوس را نشان داد (۳۳). در مطالعات دیگر مصرف ۱۰۰ میلی گرم پروبیوتیک، ۱۵۰ میلی گرم آنتی بیوتیک و ۲۰۰ تا ۴۰۰ میلی گرم اسطوخودوس در هر کیلوگرم خوراک سبب ایجاد اختلاف معنی‌دار در بیان ژن MUC_2 در جوجه‌های گوشتی تحت مطالعه نشد ولی میزان بیان ژن MUC_2 در تیمارهای سطوح مختلف اسطوخودوس و پروبیوتیک

نسبت به گروه شاهد افزایش یافت (۳۶). شناسایی پروموترهای روده‌ای خاص، نه تنها عواملی را که نقش مهمی در تنظیم و بیان ژن های مختص روده ایفا می کنند را آشکار می کند (۸)، بلکه می تواند مکانیسم‌های مسئول الگوهای تمایز منحصر به فرد مشاهده شده در اپیتلیوم مخاط روده را نیز روشن کند و بنابراین مطالعات روی توالی‌های تنظیمی MUC_2 درک بهتری از نقش مستقیم و دقیق توالی‌های تنظیم‌کننده در تعدیل بیان فاکتورهای کدکننده سیستم هضم و جذب در روده و جنبه‌های غدد درون ریز و ترشحی فیزیولوژی روده ارائه می‌کنند (۳۹). از آن‌جایی که تا کنون هیچ نوع آزمایش و مطالعه‌ای برای بررسی سطوح مختلف اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده بر سلامت و بیان ژن MUC_2 در بلدرچین های ژاپنی صورت نپذیرفته است، هدف پژوهش حاضر ارزیابی اثر استفاده از جیره‌های حاوی سطوح مختلف اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده بر اندام‌های لمفوئیدی، آنزیم های کبدی، فعالیت پاداکسندگی، جمعیت میکروبی و ریخت شناسی روده همراه با ارزیابی بیان ژن MUC_2 در بلدرچین های نر ژاپنی بود.

مواد و روش‌ها

گیاه اسطوخودوس برداشت شده از مزرعه آزمایشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان چهارمحال و بختیاری توسط کارشناسان گیاه دارویی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مورد ارزیابی و تایید قرار گرفت و عملیات عصاره گیری و تخلیص روغن بعد از خرد کردن به روش تقطیر با آب هیدرو دیستیلاسیون و با استفاده از دستگاه کلونجر به مدت ۴ ساعت برای هرکدام از نمونه ها انجام شد. عصاره به دست آمده در محدوده بالای سولفات سدیم بدون آب خشک و استخراج شد و درصد اجزای آن بر اساس وزن خشک بذور محاسبه گردید (۲). تفکیک ترکیبات اسانس توسط روش کروماتوگرافی گازی با مشخصات کروماتوگراف شیمادزو ژاپن و شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده با استفاده از روش شاخص بازداری و طیف های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه رایانه‌ای و مراجع موجود در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، صورت پذیرفت. ترکیبات شاخص اسانس گیاه اسطوخودوس مورد مطالعه شامل اندوبورنئول(۲۲/۴۰) درصد، ۱و۸ سینئول(۲۰/۱) درصد، کامفور (۸/۵۲) درصد، آلفاکادینول (۷/۵۵) درصد، کاریوفیلن اکسید (۵/۱) درصد و پروپانال (۴/۱۲) درصد بود. تعداد ۵۰۰ قطعه بلدرچین ژاپنی در سن (۱لغایت ۳۵روزگی) در ابتدای دوره آزمایش به‌صورت دسته‌جمعی وزن‌کشی شده و در گروه‌های با میانگین وزنی یکسان در بین تیمارهای مختلف، تقسیم شده و براساس استانداردهای درجه حرارت، رطوبت، نور، تهویه و تغذیه مورد آزمایش قرار گرفتند. در این پژوهش تیمارها شامل گروه شاهد و گروه‌های مصرف کننده سطوح ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم اسانس اسطوخودوس ریز پوشانی شده با آلژینات سدیم در هر کیلوگرم خوراک با ۵ تکرار و ۲۰ قطعه بلدرچین در هر تکرار استفاده بودند. عملیات ریزپوشانی کردن با استفاده از ۳۰ گرم پودر آلژینات‌سدیم در یک لیتر آب مقطر و تهیه محلول سه درصد آلژینات سدیم صورت گرفت و اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده در سطوح مورد نیاز همراه با هم‌زدن و گرمای ملایم ۵۵ درجه سانتی گراد تهیه شد (۱۵). از آن جاکه پوشش آلژینات سدیم شکننده می‌باشد دو درصد گلیسرول به‌عنوان نرم کننده به محلول اضافه شد. هم زمان محلول دو درصد کلرید کلسیم تهیه و به منظور تشکیل ژل و انسجام آن به محلول فوق اضافه گردید. میکروکپسول‌های تولید شده با آب مقطر شستشو و به مدت ۴۸ ساعت در معرض هوا خشک شدند و مورد استفاده قرار گرفتند. کلیه اجزای جیره بلدرچین‌های تحت مطالعه براساس روش تجزیه و تحلیل ترکیبات شیمیایی خوراک (۱) مورد آنالیز قرار گرفت و جیره بلدرچین‌های آزمایشی براساس توصیه‌های تغذیه‌ای مربوط به بلدرچین ژاپنی (۳۰) با استفاده از نرم افزار UFFDA متعادل گردید (جدول۱) و همراه آب تازه و سالم آشامیدنی به‌صورت آزاد و نامحدود در اختیار بلدرچین‌ها قرارداده شد. در انتهای دوره آزمایش (۳۵ روزگی) تعداد ۲ بلدرچین نر از هر جایگاه آزمایشی انتخاب و پس از وزن کشی، برای تعیین وزن نسبی اندام‌های لمفوئیدی ذبح شده و امعا و احشا داخلی بدن آن‌ها تخلیه گردید و تیموس، بورس و طحال جدا و توزین شدند (۱۲). جهت انجام چالش سیستم ایمنی سلولی در ۳۵ روزگی میتوژن فیتوهماگلوتینین-P به شبکه بال چپ دو بلدرچین تزریق شد و ضخامت قبل از تزریق و ۲۴ ساعت و بعد از تزریق با کولیس دیجیتال اندازه گیری شد (۱۱). هم چنین به منظور ارزیابی پاسخ حساسیت به دی نیتروکلروبنزن یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از محلول دی‌نیتروکلروبنزن بر روی یک ناحیه دو سانتی‌متر مربعی از ۰/۰۵ میلی متر از پوست فاقد پوشش در دو بلدرچین استفاده شد و ضخامت پوست با میکرومتر الکترونیکی با دقت ۰/۰۱ میلی متر و با توجه به تغییرات ضخامت پوست قبل و ۲۴ ساعت بعداز تجویز دی‌نیتروکلروبنزن اندازه‌گیری شد (۳۲، ۴۱).

اندازه گیری و ارزیابی فعالیت سرمی آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراس و آلکانین فسفاتاز و فعالیت آنزیم های پاداکسنده با استفاده از دستگاه آنالایزر خودکار و کیت های تجاری پارس آزمون طبق دستورالعمل شرکت سازنده تعیین شد. به منظور بررسی و تعیین پارامترهای ریخت شناسی ژوژنوم روده، بخش‌های مختلف روده‌ای از دو قطعه بلدرچین ذبح شده از هر تکرار جدا شد

و تجزیه و تحلیل بر روی مقاطع بافت هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شده گردید و ارتفاع خمل، عمق کریپت، سطح خمل و هم چنین طول و عرض پرزهای عمودی برای هر بلدرچین محاسبه شد. تعداد سلول‌های گابلت یا جامی از ۵ خمل مشابه تعیین شد و تعداد و تراکم سلول‌های گابلت با واحد میلی‌متر مربع به‌عنوان تراکم سلول های مذکور ذکر شد (۴۰). تشخیص موسین های خنثی از کیت رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف و موسین های اسیدی در اسیدیته ۲/۵ با استفاده از روش رنگ‌آمیزی آلکالین بلو مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۶). برای تعیین فلور میکروبی روده و ارزیابی جمعیت باکتری‌های اشرشیاکلی، لاکتو باسیلوس و سالمونلا انتریکا، یک گرم از نمونه مواد هضمی از روده بلدرچین‌ها جمع‌آوری شد و با ۰/۰۹ درصد NaCl استریل تا ده برابر رقیق شد (۱۸). برای انجام شمارش جمعیت باکتریایی سالمونلا انتریکا با استفاده از محیط -MRS-Agar LAB و روش انکوباسیون در محیط بی‌هوازی به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، شمارش باکتری های اشرشیاکلی انکوباسیون به‌مدت ۴۸ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و برای تعیین جمعیت کلونی باکتریایی لاکتوباسیلوس از محیط کشت MRS1-Agar به مدت ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد استفاده شد. پس از انکوباسیون، باکتری‌ها در ظروف پتری‌دیش شمارش شدند و با محاسبه باکتری‌ها در حجم اولیه و شمارش‌ها به صورت log10 CFU در هر گرم گزارش شد (۳۴). برای بررسی بیان mRNA ژن MUC_2 بلافاصله نمونه هایی از ژژنوم دو بلدرچین نر ذبح شده جمع‌آوری و در نیتروژن مایع منجمد شد. بررسی بیان ژن MUC_2 با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت فرمنتاز صورت گرفت و مجموع RNA مورد نیاز از بافت روده استخراج گردید. ارزیابی کیفیت و کمیت RNA با استفاده از اسپکتروفوتومتر نانودراپ Thermo انجام شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت ساخت شرکت فرمنتاز و ارزیابی، رقیق سازی و همسان سازی آن (۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) صورت گرفته و توسط نانودراپ تایید گردید و در ادامه mRNA موجود با استفاده از Real Time PCR و با استفاده از کیت Cyber-Green اندازه‌گیری شد. برای انجام آنالیز بیان ژن، پس از مراحل استخراج RNA و حذف باقی‌مانده‌های DNA ژنومی، اقدام به سنتز cDNA به‌عنوان الگوی اولیه برای واکنش‌های RT-PCR گردید (۳۳). تعیین کمیت نسبی در Real time RT PCR به‌وسیله افزایش تشعشع نور فلورسانس در نتیجه اتصال رنگ SYBER-green صورت پذیرفت و مقادیر مربوط به چرخه آستانه (Ct) حاصل از تکرارهای بیولوژی و تکنیکی هر تیمار برای محاسبه میزان بیان نسبی ژن MUC_2 در بافت روده بلدرچین های مورد مطالعه ثبت گردید. میانگین Ct، برای تکرارهای تکنیکی ژن MUC_2 و β-actin محاسبه شد و نهایتا میزان ΔCT توسط کسر (Ct) هدف و (Ct) مرجع برآورد و بیان نسبی ژن MUC_2 محاسبه گردید(۳۴).

جدول ۱: درصد ترکیبات و محتوی مواد مغذی جیره آزمایشی مورد استفاده در بلدرچین‌های تحت مطالعه *

اقلام جیره (گرم بر کیلوگرم)	مقادیر مورد استفاده
ذرت	۵۴۸/۲
کنجاله سویا	۳۷۰
پودر ماهی	۳۰
روغن سویا	۲۳/۸
دی ال متیونین	۰/۲
ال لیزین	۰/۹
ال ترئونین	۱/۲
کولین کلراید	۱/۸
دی کلسیم فسفات	۸
کربنات کلسیم	۱۱
کلرید سدیم	۰/۹
بی‌کربنات سدیم	۲
مکمل معدنی و ویتامینه**	۲
مجموع اقلام جیره	۱۰۰۰
ترکیبات مغذی محاسبه شده	
انرژی قابل سوخت و ساز (کیلو کالری برکیلوگرم)	۲۹۰۰
پروتئین (درصد)	۲۴
کلسیم (درصد)	۰/۸
فسفر قابل دسترس (درصد)	/۳
متیونین (درصد)	۰/۳۷
متیونین و سیستئین (درصد)	۰/۷۵
لیزین (درصد)	۱/۳
ترئونین (درصد)	۱/۰۲

*جیره متعادل شده براساس NRC (۳۰). ** هر کیلوگرم جیره شامل ترکیبات معدنی و ویتامینه به‌شرح: ۱۶۵۰ واحد بین‌المللی ویتامین رتیونل، ۷۵۰ واحد بین‌المللی ویتامین دی هیدروکسی کوله کلسیفیرول، ۱۲واحد بین‌المللی ویتامین آلفا توکوفرول، ۱ میلی‌گرم ویتامین فیتونادیون، ۴ میلی‌گرم ریبوفلاوین، ۰/۰۰۳ میلی‌گرم ویتامین سیانوکوبالامین، ۱۰ میلی‌گرم پانتوتنیک اسید، ۴۰ میلی‌گرم نیکوتنیک اسید، ۱ میلی‌گرم فولیک اسید، ۶۰ میلی‌گرم منیزیوم، ۱۲۰ میلی‌گرم آهن، ۵ میلی‌گرم مس، ۲۵ میلی‌گرم روی و ۰/۳ میلی‌گرم ید، بود.

جدول ۲: پرایمرهای انتخابی برای بررسی کمی بیان mRNA ژن MUC_2 در بلدرچین‌های تخم‌گذار

ژن هدف	ثبت بانک ژن	توالی رفت (۳' به ۵')	توالی برگشت(۳' به ۵')
MUC_2	NM_001318434	CCACAAGTCCTCCAGTACCTACA	AGGTTTCATAGTCACCACCATCTTC
Beta-actin	NM_205518	CTGGCACCTAGCACAATGAA	CTGGTTGCTGATCCACATCT

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های این تحقیق در قالب یک طرح آزمایشی با ۵ تیمار و ۵ تکرار مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده‌از بسته نرم‌افزار آماری SAS نسخه۹/۱ با رویه خطی عمومی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند (۳۵) و مقایسه بین میانگین‌ها در تیمارهای آزمایشی به وسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام پذیرفت (۱۰). مدل آماری طرح آزمایشی حاضر به‌شرح زیر بود.

$Yijk = \mu + \alpha i + eijk$

که‌در آن :Yijk: مقدار هر مشاهده. μ: میانگین جامعه. αi: اثر اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده و eijk: اثر اشتباه در آزمایش، بودند.

نتایج

اثر تیمارهای آزمایشی بر وزن نسبی اندام‌های لمفوئیدی: نتایج اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر وزن نسبی اندام های لمفوئیدی ایمنی در بلدرچین های تحت مطالعه در جدول ۳ نشان داده‌شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد با مصرف‌سطوح مختلف اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی‌شده وزن نسبی اندام‌های لمفوئیدی تیموس، طحال و بورس فابرسیوس در بلدرچین‌های تحت مطالعه به طور معنی‌دار افزایش یافت (P≤۰/۰۵).

اثر تیمارهای آزمایشی بر پاسخ به چالش‌های ایمنی با واسطه سلولی: براساس نتایج مکتسبه در جدول ۴ مصرف سطوح مختلف اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده سبب تغییر پاسخ به حساسیت به دی نیتروکلروبنزن و پاسخ کم‌تر به تزریق میتوژن در بال گردید. درخصوص پاسخ به دی‌نیتروکلروبنزن بیش‌ترین حساسیت در گروه کنترل و بیش‌ترین آن مربوط به گروه‌های مصرف‌کننده سطح ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسانس‌اسطوخودوس ریزپوشانی بود و درخصوص‌حساسیت به تزریق میتوژن در بال کم‌ترین آن در گروه شاهد و بیش‌ترین آن در گروه مصرف‌کننده سطح ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی مشاهده شد (P≤۰/۰۵).

اثر تیمارهای آزمایشی بر فعالیت آنزیم‌های کبدی: با توجه به نتایج به‌دست آمده در جدول ۵ میزان سرمی آنزیم‌های کبدی آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارتات آمینو ترانسفراز به‌عنوان‌شاخصی برای تعیین‌فعالیت و سلامت‌کبد تحت‌تاثیر مصرف سطوح‌مختلف‌اسانس‌اسطوخودوس ریزپوشانی‌شده به‌طور‌معنی‌داری کاهش یافت (P≤۰/۰۵).

اثر تیمارهای آزمایشی بر فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده: نتایج‌مندرج در‌جدول ۶ نشان‌داد مصرف‌سطوح‌مختلف اسطوخودوس ریزپوشانی‌شده سبب‌افزایش‌فعالیت‌پاداکسندگی‌سرم‌نظیر گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و ظرفیت ضداکسندگی تام پلاسما در بلدرچین‌های تحت مطاله شد (P≤۰/۰۵).

جدول ۳: اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر درصد وزن نسبی اندام‌های لمفوئیدی در بلدرچین‌های تحت مطالعه

تیمار	طحال	تیموس	بورس فابرییوس
کنترل	۰/۱۱۳e*	۰/۱۰۷d	۰/۱۳۸e
اسطوخودوس (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۰/۱۲۶d	۰/۱۱۵d	۰/۱۵۰d
اسطوخودوس (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۰/۱۴۶c	۰/۱۳۱c	۰/۱۶۴c
اسطوخودوس (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۰/۱۵۶b	۰/۱۵۱b	۰/۱۸۹b
اسطوخودوس (۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۰/۱۸۲a	۰/۱۸۷a	۰/۲۰۵a
خطای استاندارد میانگین	۰/۰۰۲	۰/۰۰۴	۰/۰۰۳

*تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف غیرمشترک نشان‌دهنده معنی‌داری است (P≤۰/۰۵).

جدول ۴: اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر چالش ایمنی با واسطه سلولی در بلدرچین های تحت مطالعه

تیمار	حساسیت به دی نیتروکلروبنزن	حساسیت به تزریق میتوژن
کنترل	۱/۵۲d*	۰/۸۶a
اسطوخودوس (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱/۷۳c	۰/۷۲b
اسطوخودوس (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۲/۱۳b	۰/۵۷c
اسطوخودوس (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۲/۲۴b	۰/۴۶d
اسطوخودوس (۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۲/۵۱a	۰/۴۲d
خطای استاندارد میانگین	۰/۰۴۸	۰/۰۱۶

*تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف غیرمشترک نشان‌دهنده معنی‌داری است (P≤۰/۰۵).

جدول ۵: اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر فعالیت آنزیم‌های کبدی در بلدرچین‌های تحت مطالعه

تیمار	آلکالین فسفاتاز (واحد بر لیتر)	آلانین آمینو ترانسفراز (واحد بر لیتر)	آسپارتات آمینو ترانسفراز (واحد بر لیتر)
کنترل	۹۵/۸^{a*}	۳۱/۲^{a}	۳۷/۴^{a}
اسطوخودوس (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۹۱/۶^{b}	۲۸/۵^{b}	۳۴/۵^{b}
اسطوخودوس (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۸۷/۸^{c}	۲۴/۷^{c}	۳۱/۵^{c}
اسطوخودوس (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۸۳/۴^{d}	۲۲/۳^{d}	۲۷/۶^{d}
اسطوخودوس (۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۷۹/۲^{e}	۲۰/۸^{e}	۲۵/۷^{e}
خطای استاندارد میانگین	۰/۴۴۶	۰/۴۰۰	۰/۴۳۳

*تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف غیرمشترک نشان‌دهنده معنی‌داری است (P≤۰/۰۵).

اثر تیمارهای آزمایشی بر جمعیت میکروبی روده: اثرات مصرف سطوح مختلف اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده بر جمعیت میکروبی روده در جدول ۷ نشان داده شده است افزایش جمعیت کلونی باکتری لاکتوباسیلوس به‌عنوان فلور میکروبی مناسب و در مقابل کاهش جمعیت سالمونلا انتریکا و جمعیت باکتری اشرشیا کلی که به‌عنوان باکتری‌های مضر و بیماری‌زا در محیط روده مورد توجه می‌باشند، مشاهده شد (P≤۰/۰۵).

اثر تیمارهای آزمایشی بر ریخت‌شناسی بافت روده: اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر ریخت‌شناسی روده در بلدرچین‌های آزمایشی در جدول ۸ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که با سطوح مختلف اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده ارتفاع، سطح خمل و عمق کریپت نسبت به گروه کنترل افزایش یافت و بررسی تعداد و تراکم سلول های جامی ترشح کننده موسین به دو روش پریودیک اسید شف و آلکالین بلو نشان‌دهنده افزایش تراکم آن‌ها با توجه به افزایش سطح مصرف اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده نسبت به گروه کنترل بود (P≤۰/۰۵).

اثر تیمارهای آزمایشی بیان mRNA ژن MUC_2: در این مطالعه تیمار شاهد به‌عنوان مرجع درنظر گرفته شده و سایر تیمارهای آزمایشی سطوح مختلف اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده با آن مقایسه شدند. براساس نتایج مندرج در جدول ۹ بیان mRNA ژن MUC_2 به‌عنوان یک عامل موثر در بهبود فعالیت دستگاه گوارش با بازدهی سطح هضم و جذب در مجرای گوارش و بهبود سیستم ایمنی توسط تحریک سایتوکین های روده، تحت تاثیر افزایش سلول های گابلت ترشح کننده موسین با افزایش مصرف سطح اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده افزایش معنی‌دار یافت (P≤۰/۰۵).

جدول ۶: اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر فعالیت آنزیم‌های کبدی در بلدرچین‌های تحت مطالعه

تیمار	گلوتاتیون پراکسیداز (میکرومول بر میلی‌لیتر)	سوپر اکسیددیسموتاز (واحد برگرم)	کاتالاز (واحد بر میلی‌گرم)	ظرفیت ضد اکسندگی تام پلاسما (میکرومول بر لیتر)
کنترل	۱/۳۷^{e*}	۱/۵۸^{e}	۴/۰۳^{d}	۰/۷۱^{e}
اسطوخودوس (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱/۶۱^{d}	۱/۸۵^{d}	۴/۶۲^{c}	۰/۸۷^{d}
اسطوخودوس (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱/۸۸^{c}	۲/۱۵^{c}	۵/۱۰^{b}	۱/۰۴^{c}
اسطوخودوس (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۲/۰۷^{b}	۲/۴۶^{b}	۵/۳۴^{b}	۱/۲۲^{b}
اسطوخودوس (۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۲/۳۳^{a}	۲/۸۶^{a}	۵/۸۰^{a}	۱/۳۹^{a}
خطای استاندارد میانگین	۰/۳۶۹	۰/۴۲۰	۰/۹۰۲	۰/۲۴۸

*تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف غیرمشترک نشان‌دهنده معنی‌داری است (P≤۰/۰۵).

جدول ۷: اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر جمعیت میکروبی روده در بلدرچین‌های تحت مطالعه

تیمار	لاکتوباسیلوس (واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم)	سالمونلا انتریکا (واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم)	اشرشیاکلی (واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم)
کنترل	۵/۱۸^{e*}	۶/۱۴^{a}	۵/۹۴^{a}
اسطوخودوس (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۵/۳۲^{d}	۵/۷۸^{b}	۵/۶۰^{b}
اسطوخودوس (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۵/۶۰^{c}	۵/۵۰^{c}	۵/۲۷^{c}
اسطوخودوس (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۵/۷۹^{b}	۵/۱۹^{d}	۵/۱۶^{c}
اسطوخودوس (۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۶/۰۳^{a}	۵/۰۱^{e}	۴/۸۷^{d}
خطای استاندارد میانگین	۰/۰۳۴	۰/۰۳۲	۰/۰۵۸

*تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف غیرمشترک نشان‌دهنده معنی‌داری است (P≤۰/۰۵).

جدول ۸: اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر مورفولوژی روده در بلدرچین‌های تحت مطالعه

تیمار	ارتفاع خمل (میکرومتر)	سطح خمل (میکرومتر)	عمق کریپت (میکرومتر)	تراکم سلول‌های جامی (پریودیک اسید شف)	تراکم سلول‌های جامی (آلکاین بلو)
کنترل	۵۷۳/۵^{e*}	۰/۵۸^{e}	۱۳۳/۲^{e}	۱۰/۶^{e}	۱۰/۴^{e}
اسطوخودوس (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۵۸۸/۴^{d}	۰/۶۱^{d}	۱۴۲/۹^{d}	۱۱/۲^{d}	۱۱/۵^{d}
اسطوخودوس (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۵۹۸/۹^{c}	۰/۶۳^{c}	۱۵۱/۴^{c}	۱۲/۴^{c}	۱۲/۲^{c}
اسطوخودوس (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۶۲۶/۲^{b}	۰/۶۷^{b}	۱۶۱/۹^{b}	۱۳/۱^{b}	۱۳/۱^{b}
اسطوخودوس (۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۶۴۴/۳^{a}	/۷۰^{a}	۱۷۰/۶^{a}	۱۴/۴^{a}	۱۳/۶^{a}
خطای استاندارد میانگین	۱/۶۴	۰/۰۰۴	۱/۵۹	۰/۱۴۳	۰/۰۷۹

*تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف غیرمشترک نشان‌دهنده معنی‌داری است (P≤۰/۰۵).

جدول ۹: اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر بیان ژن MUC_2 در بلدرچین‌های تحت مطالعه

تیمار	MUC_2 average CT	β-actin average CT	ΔCT (MUC_2-β-actin)	ΔΔCT (ΔCT-ΔCT^{0})	MUC_2 بیان ژن
کنترل	۱۵/۲۸	۱۲/۴۹	۳/۰۸	۰	۲/۲^{d*}
اسطوخودوس (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱۵/۴۳	۱۲/۳۱	۳/۱۹	-۰/۱۷	۲/۳^{d}
اسطوخودوس (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱۵/۶۹	۱۲/۳۸	۳/۴۱	-۰/۱۹	۲/۵^{c}
اسطوخودوس (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱۵/۵۵	۱۲/۲۱	۳/۳۴	-۰/۲۱	۲/۸^{b}
اسطوخودوس (۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱۵/۷۹	۱۲/۲۸	۳/۴۸	-۰/۲۲	۳/۲^{a}
خطای استاندارد میانگین	۱۵/۶۱	۱۲/۳۵	۳/۲۱	-۰/۲۴	۰/۵۰۶

*تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف غیرمشترک نشان‌دهنده معنی‌داری است (P≤۰/۰۵).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد با مصرف سطوح مختلف اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده وزن نسبی اندام های لمفوئیدی در بلدرچین‌های ژاپنی تحت مطالعه افزایش یافت (P≤۰/۰۵). نتایج این مطالعه در راستای نتایج مطالعات دیگر که بیان کردند مصرف سطوح مختلف اسانس گیاهان دارویی سبب افزایش وزن نسبی اندام های طحال و بورس فابرسیوس می گردد، بود (۱۲، ۱۶). با توجه به نتایج مکتسبه از تحقیق حاضر مصرف سطوح مختلف اسانس ریزپوشانی شده اسطوخودوس سبب بهبود فعالیت آنزیمی در کبد و تعدیل وضعیت پاد اکسندگی در بلدرچین های تحت مطالعه شد. از قدیم الایام گیاهان دارویی به‌طور سنتی به‌عنوان ترکیبات طبیعی (۲۱) برای تحریک نمودن تولید ترشحات درون‌زادی در مخاط روده کوچک، پانکراس و کبد و در نتیجه بهبود هضم استفاده می‌شدند (۹) و اثرات افزودن اسانس گیاهان دارویی سبب افزایش ترشح اندوژنوس یا درون‌زادی، آنزیم‌ها، اسیدهای صفراوی و شیره لوزالمعده و کاهش سرعت عبور مواد هضمی ذکر شده است (۲۵). نتایج مطالعات صورت گرفته با استفاده از مشتقات گیاهی نشان داده است که مصرف ترکیبات گیاهی سبب افزایش ترشحات روده، صفرا و افزایش فعالیت آنزیم های پانکراس (۱۹) و در مقابل تعدیل سرعت عبور مواد در دستگاه گوارش شده و با اثر مثبت بر تغیر ساختار خمل های روده (۴۰)، موجب افزایش جذب و دسترسی به مواد مغذی (۴۱) و بهبود وضعیت سیستم ایمنی در پرنده می‌شوند (۲۳). نتایج مطالعه حاضر حاکی از کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی به‌عنوان یک عامل کلیدی نشان دهنده سلامت و بهبود ظرفیت پاد اکسندگی تام پلاسما در بلدرچین های تحت مطالعه بود. در راستای نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر محققان نشان دادند بسیاری از اجزای فعال گیاهان و ادویه‌ها از پراکسیداسیون لیپید جلوگیری می کنند که این از طریق دفع رادیکال‌های آزاد یا از طریق فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز انجام می شود (۲۴). نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد مصرف سطوح مختلف اسانس ریزپوشانی شده اسطوخودوس سبب افزایش تعداد کلونی های لاکتوباسیلوس و کاهش جمعیت باکتریایی اشرشیاکلی و سالمونلا انتریکا شد. طریقه عمل اسانس‌ها به عنوان محرک رشد، می‌تواند ناشی از توانایی آن ها در تثبیت اکوسیستم میکروبی دستگاه گوارش باشد (۱۲) و در واقع این ترکیبات قادر هستند فعالیت میکروبی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای دستگاه گوارش را کنترل کرده و کاهش دهند (۱۴). باکتری‌های گونه باسیلوس به‌دلیل توانایی در تشکیل اندوسپورهایی که در برابر تغییرات محیطی و پردازش مواد غذایی مقاوم هستند، نامزدهای پروبیوتیکی جذابی هستند (۱۸)، چنان‌چه در مطالعه‌ای جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با پروبیوتیک تک سویه شامل باسیلوس سابتیلوس فلور میکروبی بهتر و بیان ژن MUC_2 بالاتر در مقایسه با گروه کنترل داشتند (۳). برخی محققان نشان دادند افزودن مخلوط اسانس‌های گیاهی به جیره ذرت و کنجاله سویا، سطوح کلونی‌های اشرشیاکلی و لاکتوباسیلوس را در روده کوچک جوجه‌های گوشتی به‌ترتیب کاهش و افزایش داد (۲۵، ۲۳). در مطالعه حاضر مصرف سطوح مختلف اسانس ریزپوشانی شده اسطوخودوس سبب تاثیر معنی‌دار بر ریخت‌شناسی روده و تعداد و تراکم سلول های گابلت شد (P≤۰/۰۵). اثرات سودمند ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی در رابطه با حفاظت از پرزهای روده‌ای

از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانی بین سلولی صورت می‌گیرد (۱۷) و در نتیجه اثرات آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های پرز روده، جذب مواد مغذی بهبود می‌یابد (۳۴). بیان نسبی m-RNA ژن MUC_2 تحت تاثیر سطوح مختلف اسانس ریزپوشانی شده اسطوخودوس افزایش یافت ($P\leq ۰/۰۵$). تنظیم بیولوژیک میزان گلیکوزیله شدن کربوهیدرات و پروتئین به‌منظور سنتز MUC_2 تحت تاثیر عواملی چون قابلیت دسترسی سوبستراهای آنزیم های گلیکوزیل ترانسفراز، انتقال گلیکوپروتیین‌ها و تجزیه آن‌ها قرار دارد (۱۹). بررسی‌های به‌عمل آمده با استفاده از گلوکز نشان‌دار شده نشان داد که سلول‌های گابلت با استفاده از گلوکز و تبدیل آن به کربوهیدراتی که توانایی شرکت‌در ساختمان‌نوکلئوتید را دارد، برای گلیکولیزه‌نمودن پروتیین موسین استفاده می نمایند (۴۰). در مطالعه حاضر به استناد شواهد فوق الذکر به‌نظر می رسد استفاده از جیره های مکمل با سطوح مختلف اسانس اسطوخودوس ریزپوشانی شده سبب بهبود کارایی استفاده از کربوهیدرات و پروتیین و به‌دنبال آن افزایش تولید ترشح MUC_2 در ژوژنوم شده است. تغییر در سنتز و ترشح موسین سبب تغییر ضخامت، ویسکوزیته و ساختمان موکوس روده می شود و کاهش سنتز موسین، میزان استحکام لایه موکوسی و انتقال مواد مغذی را به سطح آپیکال سلول‌های پرز روده تحت تاثیر قرار داده و هم‌چنین وظیفه کانال گوارشی را به‌عنوان بخشی از سیستم ایمنی بدن تحت تاثیر قرار می‌دهد (۴۱). سیستم ایمنی از طریق ترشح پپتیدهای آنتی‌میکروبیال و سیتوکین‌های پیش التهابی نقش مهمی در بیان mRNA پروتیین‌ها دارد و بررسی آن‌ها نشان می‌دهد که سیتوکین‌ها سبب افزایش تولید موسین، ازدیاد سلول‌های جامی و ایجاد تغییر در گلیکوزیلاسیون موسین می‌شوند (۴۲). محققان در این راستا هم‌چنین نشان دادند که کلونیزاسیون باکتری‌ها در روده می‌تواند تولید موسین را با فعال کردن آبشارهای سیگنالینگ مختلف و عوامل شیمیایی ترشحی تنظیم کند (۸) و لاکتوباسیلوس‌ها ممکن است با اتصال به مکان‌های گیرنده خاصی روی انتروسیت سبب تحریک و تنظیم مثبت MUC_2 شوند (۴۲). نتایج برخی دیگر از تحقیقات نشان داد که مصرف خوراک‌های پروبیوتیکی که به‌طور طبیعی‌حاوی برخی باکتری‌های مفید روده می‌باشد قادر است سبب تحریک بیان ژن موسین در سلول‌های اپیتلیال روده شود (۱۳). نتایج برخی مطالعات، نشان‌دهنده افزایش MUC_2 mRNA در ژژنوم روده‌جوجه‌های گوشتی‌مصرف‌کننده سطوح‌مختلف‌زردچوبه، آویشن و دارچین بود (۲۲). درمطالعه دیگر اثر تیمار سطوح مختلف اسانس اسطوخودوس در جیره‌های حاوی غلظت‌های بالا و پایین پروتیین و انرژی، باعث باعث توسعه فلور روده و بهبود بیان نسبی ژن MUC_2 در پرندگان تحت مطالعه گردید که احتمالا به‌دلیل‌نقش پروبیوتیکی اسطوخودوس در بهبود سیستم ایمنی و جلوگیری از بیماری‌ها و اثرات مثبت آن بر سلامت دستگاه گوارش پرندگان، می‌باشد (۳۳). در تحقیقی که بر روی اثر مصرف ترئونین جیره بر دینامیک موسین و میزان فراوانی mRNA ژن MUC_2 صورت گرفت، نتایج نشان داد که افزایش ترئونین جیره سبب افزایش فراوانی mRNA برای MUC_2 در ۱۴ روزگی شد، بنابراین با توجه به آن که اسانس اسطوخودوس به‌علت خواص پروبیوتیکی سبب بهبود سیستم هضمی و دسترسی بیش‌تر مواد مغذی نظیر پروتیئن و آمینواسیدها برای پرنده می‌شوند، افزایش بیان ژن MUC_2 منطقی به‌نظر می‌رسد (۲۴). بررسی‌های به عمل آمده نشان می‌دهد که موسین اسیدی به‌دلیل مقاومتی که در برابر پروتئازهای‌حیوان میزبان و آنزیم‌های‌باکتریایی‌دارد‌نقش مهمی را در ایمنی ذاتی پرنده به‌عهده دارد (۳). حرکات دودی روده، ترکیبات اسیدی و عوامل محرک‌مانند‌ترکیبات ضدتغذیه جیره‌سبب ازبین رفتن بافت موکوسی و ناپایداری آن در روده می‌شوند و به دلیل این که نیاز است تا موکوس همیشه سطح روده را بپوشاند، سلول‌های گابلت دائم در حال ترشح موسین هستند (۳۹). نتایج برخی مطالعات دیگر نشان‌دهنده افزایش و بهبود الگوی بیان ژن MUC_2 در جوجه‌های تغذیه شده با محرک‌های رشد آنتی بیوتیکی و پروبیوتیک‌ها در مقایسه با گروه شاهد به‌دلیل اثر ترکیبات مواد خوراکی بر میکروفلور روده جوجه‌های آزمایشی بود (۳۷). در مقابل در بررسی‌های صورت گرفته توسط سایر محققان دیگر نتایج نشان داد تعداد سلول‌های جامی محتوی موسین‌های اسیدی و خنثی در ژوژنوم و ایلئوم تحت تاثیر فلور میکروبی محیط، تحت تاثیر قرار نگرفت (۱۴). نتایج این مطالعه، در راستای نتایج مطالعه‌ای بود، که نشان داد هر جزء خوراک یا تغییرات محیط باعث تغییر بیان ژن MUC_2 می‌شود و احتمالاً تنظیم‌ژن MUC_2 بر تعادل بین فاکتورهای رونویسی تنظیمی مثبت و منفی استوار است که این پتانسیل را دارد تا بر یکپارچگی لایه مخاطی و جذب مواد مغذی تأثیر بگذارد و معمولا تحت تاثیر فاکتور و عامل شروع ۵ که بر چرخش و ترن آور mRNA موثر است واقع می‌شود (۱۶). محققان نشان دادند سایتوکین‌ها، فاکتورهای محرک‌رشد، تولیدات‌باکتریایی (۴۳) و هر عاملی که باعث ایجاد تغییر در سلول‌های گابلت شود، می‌توانند بیان ژن MUC2 را تحت تاثیر قرار دهند (۹). ترکیبات فعال موجود در گیاهان ممکن است با اثرات تجمعی بر Hap A که یک پروتیین‌ناز خارج سلولی است سبب افزایش و تجمع MUC_2 در مجرای گوارشی شوند (۲۹). برخی دیگر محققان نیز در این راستا بیان کردند که احتمالا افزایش بیان MUC_2 در تیمارهای تغذیه شده با مکمل گیاهان دارویی می‌تواند به علت تاثیر مواد موثر موجود با تولید یا تغییر فعالیت فاکتورهای رونویسی موثر در رونوشت برداری ژن MUC_2 از جمله GATA و FOX باشد (۴۳). به‌طورکلی نتایج پژوهش حاضر نشان‌دهنده اثرات مثبت مصرف سطوح مختلف اسانس ریزپوشانی شده اسطوخودوس بر فعالیت آنزیم‌های کبدی، پاداکسندگی، ریخت‌شناسی روده و بیان ژن MUC_2 در بلدرچین‌های نر ژاپنی بود. وجود خواص پادزی، ضد میکروبی، محرک سیستم ایمنی و افزایش دهنده هضم و جذب ترکیبات مغذی در مجرای دستگاه گوارش در اسانس اسطوخودوس

و احتمالا به دلیل وجود اثرات مفید بر تحریک انتخابی رشد و افزایش باکتری‌های مفید دستگاه گوارش و ایجاد افزایش تراکم در سلول‌های جامی سبب ایجاد تغییرات دینامیکی در ترشح موسین شده و با تحت تأثیر قرار دادن ویسکوزیته موکوس و افزایش لایهٔ موکوسی، افزایش هضم و جذب، بهبود سیستم آنزیمی و پاداکسندگی را منجر شد. با توجه به تنوع زیاد اجزای فعال مشتق شده از اسطوخودوس و نتایج یافته‌های متعدد محققان درخصوص به‌کارگیری این مشتقات در تغذیه پرندگان و وجود نتایج متفاوت در این زمینه، به‌منظور دسترسی به اطلاعات بیش‌تر و دقیق‌تر، مطالعات تکمیلی با توجه به مواد موثره اسانس اسطوخودوس در سطوح مختلف مورد نیاز می‌باشد.

منابع

1. **AOAC. 2005.** Official methods of analysis, Association of official analytical chemists. AOAC Press, Gaithersburg, USA.
2. **Akbarinia, A., Sefidkon, F., Ghalavand, A., Tahmasebi, Z. and Sharifi, A., 2005.** Chemical composition of seed essence of Trachyspermum copticum produced in Qazvin Province. Scientific Journal of Medical University of Qazvin. 36: 22-24. (In Persian)
3. **Aliakbarpour, H.R., Chamani, M., Rahimi, M., Sadeghi, A.A. and Qujeq, D., 2012.** The Bacillus subtilis and lactic acid bacteria probiotics influences intestinal mucin gene expression, histomorphology and growth performance in broilers. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 25(9): 1285-1293.
4. **Amin, Gh., 1991.** Iranian ancient medicinal plants. Ministry of Health and Medical Education publication. 115. (In Persian)
5. **Azzam, M.M., Zou, X.T., Dong, X.Y. and Xie, P., 2011.** Effect of supplemental L-threonine on mucin 2 gene expression and intestine mucosal immune and digestive enzymes activities of laying hens in environments with high temperature & humidity. Poultry Science. 90(10): 2251-2256.
6. **Bidar, N., Hassanabadi, A., Nasiri Moghaddam, H., Varidi, M. and Mohsen Zadeh, M., 2017.** The effect of Lavandula angustifolia essential oil on performance, blood metabolites and nutrient digestibility in broiler chickens. Iranian Journal of Animal Science Research. 9(3): 328-339.
7. **Birchenough, G.M., Nystrom, E.E., Johansson, M.E. and Hansson, G.C., 2016.** A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. Science. 352: 1535-1542.
8. **Cheadle, C., Fan, J., Cho-Chung, Y.S., Werner, T. and Ray, J., 2005.** Stability regulation of mRNA and the control of gene expression. Annual Academy of Sciences. 1058: 196-204.
9. **Dorman, H.J. and Deans, S.G., 2000.** Antimicrobial agents from plants. Antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology. 88: 308-316.
10. **Duncan, D.B., 1995.** Multiple range test and F-test. Biometrics. 11: 1-42.
11. **Erf, G.F., 2004.** Cell-mediated immunity in poultry. Poultry Science. 83: 580-590.
12. **Eyvazzadeh, M., Nobakht, A., Safamehr, A., Mehman Navaz, Y. and Zanebure, A., 2020.** The effects of common and encapsulated thyme essential oil with fats on blood and immunity parameters of broilers with diets formulated with normal and low crude protein levels. Journal of Animal Environment. 15(3): 11-26. (In Persian)
13. **Flint, J.F. and Garner, M.R., 2009.** Feeding beneficial bacteria: a natural solution for increasing efficiency and decreasing pathogens in animal agriculture. Journal of Applied Poultry Research. 18: 367-378.
14. **Forder, R.E.A., Howarth, G.S., Tivey, D.R. and Hughes, R.J., 2007.** Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early post-hatch development of poultry. Poultry Science. 86: 2396-2403.
15. **Ghalamkari, G.R., Landy, N., Toghyani, M., Moatar, F., Abed Esfahani, A. and Araj Shirvani, M., 2011.** Efficiency of *Echinacea purpurea* L. on total antioxidant activity in serum of broiler chicks. Journal of Medicinal Herbs. 1(4): 7-14.
16. **Hernandez, F., Madrid, J., Garcia, V., Orengo, J. and Megias, M.D., 2004.** Influence of two plant extracts on broiler performance, digestibility and digestive organ size. Journal of Poultry Science. 83: 169-174.
17. **Horn, N.L., Donkin, S.S., Applegate, T.J. and Adeola, O., 2009.** Intestinal mucin dynamics: response of broiler chicks and white Pekin ducklings to dietary threonine. Poultry Science. 88: 1906-1914.
18. **Horosova, K., Bujnakova, H. and Kmet, V., 2006.** Effect of oregano essential oil on chicken *lactobacilli* and *E. coli*. Journal of flora microbiology. 51(4): 278-280.
19. **Jamroz, D., Wertelecki, T., Houszka, M. and Kamel, C., 2006.** Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 90: 255-268.
20. **Johansson, M.E., Sjovall, H. and Hansson, G.C., 2013.** The gastrointestinal mucus system in health and disease. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. 10: 352-361.
21. **Kabir, S.M.L., 2009.** The role of probiotics in the poultry industry. International Journal of Molecular Sciences. 10: 3531–3546.
22. **Kamali-Sangani, A., Masoudi, A. and Hosseini, S., 2014.** The effects of herbal plants on Mucin 2 gene expression and performance in ascitic broilers. Iranian Journal of Veterinary Medicine. 8(1): 47-52.
23. **Kagnoff, M.F., 1993.** Immunology of the intestinal tract: antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medical Chemistry. 10: 813-829.
24. **Law, G.K., Bertolo, R.F., Adjiri Awere, A., Pencharz, P.B. and Ball, R.O., 2006.** Adequate oral threonine is critical for mucin production and gut function in neonatal piglets. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology. 292: G1293-G1301.
25. **Lee, K.W. and Beynen, A.C., 2004.** Essential oils in broiler nutrition. International Journal of Poultry Science. 3(1): 738-752.
26. **Lev, R. and Spicer, S.S., 1964.** Specific staining of sulfate groups with Alcian blue at low pH. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 12: 309-310.
27. **Mohammadnejad Ganji, S.M., Moradi, H., Ghanbari, A. and Akbarzadeh, M., 2017.** Quantity and quality of secondary metabolites in lavender plant under the influence of ecological factors. Nova Biologica Reperta. 4(2): 166-172.
28. **Mohiti-Asli, M., Hoseini, A., Meimandipor, A. and Mahdavi, A., 2010.** Photogenics in animal nutrition. Press of Animal Science Research Institute of Iran, First Edition. 317 p.
29. **Montagne, L., Piel, C. and Lalles, J.P., 2004.** Effect of diet on mucin kinetics and composition: nutrition and health implications. Nutrition Reviews. 62: 105-114.
30. **NRC. 1994.** Nutrient requirements of poultry. 9th Rev. Ed., Washington, DC: National Academy Press.
31. **Nikfarjam, M., Parvin, N. and Asarzadegan, N., 2011.** The effect of Lavandula angustifolia in the treatment of mild to moderate depression. Journal of Shahrekord University of medical sciences. 11(4): 66-73. (In Persian)
32. **Nikzad, M. and Mirdar, S., 2020.** Inhibitory effects of Nigella sativa nano-capsule on the expression of cyclin D1 in the lungs of Wistar rats exposed to nicotine-derived nitrosamine ketone. Journal of Medicinal Plants. 19(74): 118-128.
33. **Pahlavan-Afshari, K. and Sanaan, H., 2022.** Effect of dietary levels of lavender oil on Muc2 gene expression in

broiler chickens. Journal of Animal Environment. 14(2): 113-122. (In Persian)

34. **Salim, H., Kang, H., Akter, N., Kim, D., Kim, J., Kim, M., Na, J., Jong, H., Choi, H. and Suh, O., 2013.** Supplementation of direct-fed microbial as an alternative to antibiotics on growth performance, immune response, cecal microbial population and ileal morphology of broiler chickens. Poultry Science. 92: 2084-2090.
35. **SAS Institute. 2001.** SAS/STAT user's guide for personal computer. Release 6.12. SAS Institute, Inc., Cary, N.C., USA.
36. **Sepehri-Moghaddam, H., Kermanshahi, H., Heravi, A. and Raji, A., 2010.** The effect of vitamin A on mucin 2 gene expression, intestinal histology and performance of broiler chickens. Global Veterinaria. 5: 168-174.
37. **Smirnov, A., Sklan, D. and Uni, Z., 2004.** Mucin dynamics in the chick small intestine is altered by starvation. Journal of Nutrition. 134: 736-742.
38. **Smirnov, A., Perez, R., Romach, E.A., Sklan, D. and Uni, Z., 2005.** Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. American Society for Nutritional Sciences. 67: 90-105.
39. **Smirnov, A., Tako, E., Ferket, P.R. and Uni, Z., 2006.** Mucin gene expression and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by in-ovo feeding of carbohydrates. Poultry Science Journal. 85: 669-673.
40. **Soltani Raber, H., Khodaei Motlagh, M., HajKhodadadi, I. and Moradi, M. H., 2021.** The effect of adding different levels of rosemary powder with oil on changes in intestinal morphology, meat quality and some blood indices in Japanese quail. Journal of Animal Environment. 13(2): 179-186. (In Persian)
41. **Tork, A., Khatibjoo, A., Akbari Gharaei, M., Taherpour, K. and Soltani, M., 2022.** Effect of different levels of Tanacetum balsamita hydroalcoholic essential oil on broiler chickens' performance and humoral and cell-mediated immunity. Journal of Animal Environment. 14(3): 155-162. (In Persian)
42. **Thompson, K.L. and Applegate, T.J., 2006.** Food withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broilers. Poultry Science. 85: 1535-1540.
43. **VanDerSluis, M., Vincent, A. and Bouma, J., 2008.** Forkhead box transcription factors Foxa1 and Foxa2 are important regulators of Muc2 mucin expression in intestinal epithelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 369: 1108-1113.
44. **Vali, N., 2008.** The Japanese quail: A review. International Journal of Poultry Science. 7: 925-931.
45. **Zargari, A., 2001.** Medical plants. Second edition. Tehran University Press. 25-150.