14(2) 113-122, Summer 2022

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

Original Research Paper

Effect of dietary levels of lavender oil on Muc2 gene expression in broiler chickens

Kian Pahlavan Afshari [*1], *Hossein Sanaan* [2]

[1] *Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran*
[2] *Department of Animal Science, Abhar Branch, Islamic Azad University, Abhar, Iran*

Key Words
Lavender oil
Gene MUC2
Poultry
Real-Time PCR

Abstract

Introduction: In this study, the expression of MUC2 gene related to immunity in Arian strain broiler chickens was investigated and its expression changes were investigated by adding different levels of lavender essential oil.

Materials & Methods: The experiment was conducted in the form of a completely randomized design with 5 treatments and 4 repetitions, and each repetition included 25 pieces of chicken. Experimental treatments included: basic diet, basic diet containing 100 mg of probiotic, 150 mg of antibiotic, 200 mg of lavender essential oil and 400 mg of lavender essential oil. In order to investigate the expression of the MUC2 gene, first, total RNA was extracted from the genome part of the intestinal tissue of chickens of different treatments, and after making cDNA from the samples, the expression of the gene was analyzed using Real Time PCR method. The findings were analyzed using the GLM method of SAS statistical software (9.1) and the mean of the treatments were compared using Duncan's test.

Results: The results showed that the expression of MUC2 gene in intestinal tissue increased, but there was no significant difference in different levels of treatments. The findings of this study showed that the response to sheep red blood cells, immunoglobulin G and immunoglobulin M was not affected by the treatments and the expression of the MUC2 gene increased in the treated broilers. Therefore, according to the fact that the use of lavender medicinal plant causes the development of intestinal flora and this also causes the increase of mucin secretion in the intestine.

Conclusion: Therefore, adding lavender to the diet of broiler chickens due to its probiotic role improves the immune system and prevents diseases such as ascites, and also causes positive effects on the health of the digestive system.

* Corresponding Author's email: kianpahlevnafshar@gmail.com
Received: 24 February 2021; Reviewed: 3 April 2021; Revised: 24 May 2021; Accepted: 4 July 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2022.340130.2797

مقاله پژوهشی

بررسی سطوح مختلف اسانس اسطوخدوس بر بیان ژن موسین در جوجه‌های گوشتی

کیان پهلوان‌افشاری[۱]، حسین صنعان[۲]*

[۱] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

[۲] گروه علوم دامی، واحد ابهر، دانشگاه آزاد اسلامی، ابهر، ایران

کلمات کلیدی

اسانس اسطخدوس
ژن MUC2
طیور
Real Time PCR

چکیده

مقدمه: در این مطالعه، بیان ژن MUC2 مرتبط با ایمنی در جوجه‌های گوشتی سویه آرین بررسی و تغییرات بیان آن با افزودن سطوح مختلف اسانس اسطوخدوس مورد تحقیق قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: آزمایش درقالب طرح کاملاً تصادفی با ٥ تیمار و ٤ تکرار و هرتکرارشامل ۲٥ قطعه جوجه انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل: جیره پایه، جیره پایه حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم پروبیوتیک، ۱٥۰ میلی‌گرم آنتی بیوتیک، ۲۰۰ میلی‌گرم اسانس اسطوخدوس و٤۰۰ میلی‌گرم اسانس اسطخدوس بودند. به‌منظور بررسی بیان ژن MUC2 ابتدا کل RNA از قسمت ژنوم بافت روده جوجه‌های تیمارهای مختلف، استخراج و بعد از ساخت cDNA از نمونه‌ها، بیان ژن با استفاده از روش Real Time PCR به‌صورت نسبی بررسی شد. یافته‌های حاصله با استفاده از روش GLM نرم‌افزار آماری (۹,۱) SAS مورد تجزیه و میانگین تیمارها با استفاده از آزمون دانکن مقایسه شدند.

نتایج: یافته‌ها نشان داد که بیان ژن MUC2 در بافت روده افزایش ولی در سطوح مختلف تیمارها تفاوت معنی‌داری ندارد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که پاسخ به گلبول قرمز گوسفندی، ایمنوگلوبولین G و ایمنوگلوبولین M تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفت و بیان ژن MUC2 درجوجه‌های گوشتی تحت تیمار افزایش یافت. لذا با توجه به این‌که استفاده از گیاه داروئی اسطخدوس باعث توسعه فلور روده و این امر نیز خود سبب افزایش ترشح موسین در روده می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری: بنابراین افزودن اسطوخدوس به جیره جوجه‌های گوشتی به‌دلیل نقش پروبیوتیکی سبب بهبود سیستم ایمنی و جلوگیری از بیماری‌هایی از قبیل آسیت و هم‌چنین سبب اثرات مثبتی بر سلامت دستگاه گوارش می‌شود.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: kianpahlevnafshar@gmail.com

تاریخ دریافت: ٦ اسفند ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۱٤ فروردین ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۳ خرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳ تیر ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2022.340130.2797

مقدمه

اسطوخدوس گیاهی است که به‌حالت خودرو در تپه‌ها و کوه‌ها وجود دارد و روی برگ‌های آن کرک‌های به‌خصوصی دیده می‌شود، که روی آن‌ها کیسه‌های بسیار ریز ذره‌بینی، محتوی اسانس‌های معطر قرار گرفته است و اگر دست به برگ‌ها برسد، کیسه پاره و اسانس پراکنده می‌شود. این گیاه از تیره نعناعیان است. نخستین خاصیت اسطوخدوس که بسیار جالب و حائز اهمیت است، خاصیت ضدعفونی آن است. بنابراین اسطخدوس را می‌توان به‌عنوان یک داروی مؤثر برای درمان تیفوئید تجویز کرد و اثر آن در این بیماری، مانند آنتی‌بیوتیک‌های جدید (انواع کلرامفنیکل) است. اسطخدوس علاوه بر تأثیری که روی باسیل‌های تیفیک دارد، بر استافیلوکوک و سایر میکروب‌های عمومی نیز مؤثر است، به این جهت این گیاه برای درمان تمام عفونت‌های مجاری تنفس، آسم، سیاه‌سرفه و گریپ مفید واقع می‌شود (۱). موسین گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی بالا می‌باشد که نقش مهمی در خاصیت حفاظت موکوس از لایه پوششی مجاری گوارشی، تنفس، تولیدمثلی و جلوگیری از ورود پاتوژن‌ها دارد، که نقش بارزی در جذب مواد غذایی در دستگاه گوارش دارد. گزارش شده است که فعالیت ضدباکتریایی بیش‌تر اسانس‌های گیاهی علیه باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی اندکی بیش‌تر است (۲). بررسی‌ها اثرات شدید باکتری‌کشی سطح بسیار بالای اسانس مرزن جوش علیه ۵ سویه لاکتوباسیلوس جدا شده از فضولات جوجه‌ها را در کنار اثرات ضدمیکروبی برعلیه کلستریدیوم پرفریژنس نشان داده است (۳). افزودن یک مخلوط تجاری اسانس‌های گیاهی به جیره ذرت- کنجاله سویا سطوح اشرشیا کلی و لاکتوباسیلوس را در روده کوچک جوجه‌های گوشتی به‌ترتیب کاهش و افزایش داد (۴). گزارش شده مخلوط معینی از فعالیت ضد باکتریایی بیش‌تر اسانس‌های گیاهی علیه باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی اندکی بیش‌تر است (۲). بررسی‌ها اثرات شدید باکتری‌کشی سطح بسیار بالای اسانس مرزن جوش علیه ۵ سویه لاکتوباسیلوس جدا شده از فضولات جوجه‌ها را در کنار اثرات ضدمیکروبی بر علیه کلستریدیوم پرفریژنس نشان داده است (۳). در تحقیقات مختلف اسانس اسطوخدوس مورد مطالعه قرار گرفته و اثرات آن بر عملکرد، ایمنی و دستگاه گوارش مورد بررسی قرار گرفته است، ولی اثرات آن بر روی بیان ژن‌های مرتبط با عملکرد دستگاه گوارش به‌صورت جامع مورد بررسی قرار نگرفته لذا در این تحقیق تأثیر سطوح مختلف این اسانس بر روی بیان ژن موسین مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق تاثیر اسانس گیاه داروئی اسطخدوس بر بیان ژن کد کنندهٔ موسین (MUC2) که نقش بارزی در جذب مواد غذائی در دستگاه گوارش دارد، بررسی می‌شود. یافته‌های حاصل علاوه بر افزایش آگاهی از اثرات نوتروژنومیکی کاربرد جیره‌های متفاوت در طیور، می‌تواند دیدگاه مناسبی از مسیرهای بیولوژیکی سنتز موسین را برای محققان علوم زیستی مشخص نماید.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش جوجه‌های گوشتی از سویه تجاری آرین تهیه شد. این آزمایش با ۵ گروه آزمایشی در ۴ تکرار که هر تکرار شامل ۲۵ قطعه جوجه بود انجام گرفت. در شروع آزمایش تمام جوجه‌ها به‌صورت دسته‌جمعی توزین و براساس اوزان به‌دست آمده به ۲۰ گروه ۲۵ قطعه‌ای که میانگین وزن آن‌ها در گروه‌های مختلف یکسان بود، تقسیم شدند. هر یک از گروه‌های یاد شده به‌صورت تصادفی در هر یک از واحدهای آزمایشی قرار گرفتند. برای تصادفی کردن از روش قرعه‌کشی استفاده شد. در طول مدت پرورش از ۳ نوع جیره غذایی (جداول ۱و۲) استفاده شد. احتیاجات غذایی جوجه‌های گوشتی در دوره‌های مختلف آزمایش: آغازین (۰-۲ هفتگی)، رشد (۴-۲ هفتگی) و پایانی (۶-۴ هفتگی) از جداول راهنمای پرورش جوجه‌های گوشتی آرین استخراج شد. با استفاده از مواد خوراکی موجود و با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتری جیره‌نویسی UFFDA جیره‌های آزمایشی تنظیم گردیدند.

جدول ۱: ترکیب مواد تشکیل‌دهنده جیره‌های آزمایشی

ماده خوراکی (درصد)	جیره ۱۴-۰	جیره ۲۸-۱۴	جیره ۴۲-۲۸
ذرت	۴۸/۶	۴۵/۷	۴۵/۵۵
گندم	۶/۷۸	۱۵	۲۰
کنجاله سویا	۳۶/۵	۳۲	۲۷/۹
پودر ماهی	۱/۲	۱/۴	۰/۵
چربی	۱/۶	۱/۲	۲
جوش شیرین	۰/۲	۰/۱۵	۰/۱۵
دی کلسیم فسفات	۱/۹	۱/۶۸	۱/۸
پوسته صدف	۱/۲۵	۱/۰۵	۱/۱
نمک	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
دی ال- متیونین	۰/۲۷	۰/۱۷	۰/۱۸
ال- لایزین	۰/۰۵	۰	۰/۰۷
مکمل ویتامینی و معدنی	۰/۵	۰/۵	۰/۵

ترکیب شیمیایی اقلام خوراکی مورد استفاده در جیره آزمایشی از جداول استاندارد غذایی (۵) استخراج شد. مکمل ویتامینی در هر کیلوگرم خوراک مقادیر زیر را تامین می‌نمود: ویتامین A، ۹۰۰۰ واحد بین‌المللی. ویتامین B_1، ۱/۸ میلی‌گرم. ویتامین B_2، ۶/۶ میلی‌گرم. نیاسین، ۳۰ میلی‌گرم. کلسیم پانتوتنات، ۱۰ میلی‌گرم. ویتامین B_6، ۳ میلی‌گرم. فولیک اسید ۱ میلی‌گرم. ویتامین B_{12}، ۰/۰۱۵ میلی‌گرم. بیوتین ۰/۱ میلی‌گرم. ویتامین D_3، ۲۰۰۰ واحد بین‌المللی. ویتامین E، ۱۸ واحد بین‌المللی. ویتامین K_3، ۲ میلی‌گرم. کولین کلراید ۵۰۰ میلی‌گرم است. مکمل مواد معدنی در هر کیلوگرم خوراک مقادیر زیر را تامین می‌نمود. منگنز (اکسیدمنگنز)، ۱۰۰ میلی‌گرم. آهن (سولفات آهن)، ۵۰ میلی‌گرم. روی (اکسیدروی)، ۱۰۰ میلی‌گرم. مس (سولفات مس)، ۱۰میلی‌گرم. ید (یدات کلسیم)، ۱ میلی‌گرم. سلنیوم (سدیم سلنیت)، ۰/۲ میلی‌گرم است.

جدول ۲: آنالیز مواد مغذی جیره‌های پایه

ترکیب شیمیایی جیره	جیره۱۴-۰	جیره۲۸-۱۴	جیره۴۲-۲۸
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری)	۲۸۵۱	۲۹۳۷	۲۹۶۵
پروتئین (درصد)	۲۲/۲۳	۲۰/۳۹	۱۸/۵
ترئونین (درصد)	۰/۸۵	۰/۷۷	۰/۶۹
متیونین+سیستین (درصد)	۰/۹۹	۰/۸۳	۰/۷۸
لایزین (درصد)	۱/۲۸	۱/۱۰	۱
فسفر قابل دسترس (درصد)	۰/۵۰	۰/۴۵	۰/۴۵
کلسیم (درصد)	۱/۰۶	۰/۹۰	۰/۹
سدیم (درصد)	۰/۱۸	۰/۱۶	۰/۹۱
تعادل آنیون- کاتیون	۲۵۸	۲۳۴	۱/۰۶

در این طرح از پنج گروه آزمایشی استفاده شده است. بر این اساس گروه‌ها شامل موارد زیر می‌باشند:۱- جیره پایه (گروه شاهد) ۲- جیره پایه+۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پروبیوتیک (کنترل مثبت) ۳- جیره پایه+۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آنتی بیوتیک آویلامایسین (کنترل مثبت) ۴- جیره پایه+۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس اسطوخدوس ۵-جیره پایه+۴۰۰میلی گرم در کیلوگرم اسانس اسطوخدوس در پایان هر دوره هفت روزه، وزن‌کشی جوجه‌های هر تکرار به‌صورت گروهی و دو ساعت بعد از قطع دان، با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۱۰ گرم انجام گردید. متوسط وزن بدن هر جوجه در هرسن از تقسیم وزن جوجه‌های هر تکرار در آن سن بر تعداد پرنده‌های زنده در همان سن محاسبه شد. مقدار خوراک مصرفی هر تکرار به‌طور هفتگی اندازه‌گیری شد. به‌طوری‌که هر هفته با توجه به هفته قبل مقدار مشخصی خوراک توزین و در هر باکس توزیع گردید. در پایان هرهفته نیز قبل از وزن‌کشی جوجه‌ها، دان باقی‌مانده در دانخوری‌ها جمع‌آوری و بعد از وزن‌کشی جوجه‌ها، توزین شد. متوسط خوراک مصرفی روزانه هر جوجه به‌صورت هفتگی و هم‌چنین در کل دوره مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای تعیین تیتر پاسخ کل (IgG + IgM) از روش هماگلوتیناسیون (۶ و ۷) میکروتیتر استفاده‌شد. ابتدا نمونه‌های سرم جهت خنثی شدن سیستم کمپلمان و عدم تداخل آن با پادتن ضدگلبول قرمز گوسفند به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه گذاشته شد. در هنگام قرائت نمونه‌ها لگاریتم در مبنای دوعکس آخر رقتی که‌درآن هماگلوتیناسیون دیده شد به‌عنوان عیار پادتنی ثبت شد. برای تعیین اندازه‌گیری IgG و IgM که اجزاء پاسخ به SRBC هستند با جداسازی آنتی‌بادی مقاوم به مرکاپتا اتانول(MER) که در حقیقت IgG هست و کسر این مقدار از پاسخ کل آنتی‌بادی حساس به مرکاپتا اتانول (MES) به‌دست آمد که معرف IgM می‌باشد (۸). در سن ۴۲ روزگی دوره پرورش تعداد ۳ قطعه پرنده از هر تیمار آزمایشی انتخاب شده و بعد از وزن‌کشی، کشتار و نمونه‌هایی از بافت روده(ژئوژنوم)برای بررسی بیان ژن MUC2 جدا و نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

طراحی آغازگرها: معیارهای عمومی برای آغازگرها بسیار ساده است، با این‌حال انتخاب آغازگر خوب برای داشتن محصول اختصاصی دشوار است. از آن‌جاکه یک جفت آغازگر اختصاصی باید فقط یک قطعه منحصر به‌فرد از کل ژنوم را تکثیر کند، انتخاب آغازگر مناسب برای PCR، هیبریدسازی توالی‌های کوچک و توالی‌یابی DNA بسیار مهم می‌باشد. به این منظور با درنظرگرفتن شرایط و ویژگی‌های یک آغازگر مناسب برای واکنش RT-PCR، اقدام به طراحی آغازگرها شد. در مرحله اول، توالی نوکلئوتیدی ژن‌های هدف و مرجع از بانک اطلاعات ژنی، پایگاه NCBI به فرمت FASTA دریافت گردید.سپس با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier نسبت به طراحی آغازگرهای اختصاصی‌اقدام شد. سپس با استفاده از ابزار قدرتمند Blast و پایگاه داده‌ای هم‌چون PT Primer Data base از یکتا بودن محل اتصال جفت آغازگرها و ساختمان فضایی آن‌ها اطمینان حاصل شد. سنتز آغازگرها توسط شرکت سینا کلون صورت گرفت. اطلاعات مربوط به آغازگرهای طراحی شده اختصاصی برای ژن MUC۲ و GAPDH به‌شرح جدول ۳ می‌باشد.

جدول۳: آغازگرهای مورد استفاده در فرآیند Real – Time PCR

نام ژن	توالی آغازگر	شماره بانک ژن	دمای اتصال آغازگر(°C)	طول محصول(bp)
GAPDH	F 5´- TGAAGGGTGGTGCTAAGCGTG-3´ R 5´- GGATGATGTTCTGGGCAGCAC-3´	NM_204305.1	۶۰	۲۸۸
MUC2	F 5´-CTGTTGTGGATGGGCGGATTG-3´ R 5´- CCAAACTTGCTGTCCAGCTCC-3´	XM-4210350.2	۶۰	۱۵۷

واکنش Real – time PCR: تعیین کمیت نسبی در Real time RT-PCRبه‌وسیله‌اندازه‌گیری‌افزایش تشعشع نور فلورسنس، درنتیجه اتصال رنگ SYBRGreen انجام گرفت. طی این مرحله، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای نمونه‌های cDNA حاصل از بافت کبد، با ۷ تیمار و ۴ تکرار، برای ژن MUC۲ و ژن مرجع GAPDH با استفاده ازدستگاه ABI ۷۳۰۰ (Applied Biosystems) انجام شد.

محاسبه بیان نسبی ژن MUC 2: پس از بررسی و تحلیل مراحل فوق مقادیر مربوط به چرخه آستانه (Ct) حاصل از تکرارهای

بیولوژی و تکنیکی هر تیمار برای محاسبه میزان بیان نسبی ژن MUC2 در بافت روده مورد مطالعه، وارد نرم‌افزار Excel گردید. میانگین CT، برای تکرارهای تکنیکی ژن MUC2 و GAPDH محاسبه شد. سپس با استفاده از رابطه ذیل میزان ΔCT، تعیین گردید:

$$\Delta C_T = C_{T\,(Target)} - C_{T\,(Refrence)}$$

$$C_T\Delta = C_{T\,(GAPDH)} - C_{T\,(MUC2)}$$

طرح آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی طی ۵ تیمار و ۳ تکرار با مدل آماری زیر بود: $Yij=\mu+Ti+\varepsilon ij$

Yij: میزان بیان ژن MUC2 در بافت روده، μ: میانگین جمعیت، Ti: اثر تیمار، εij: اثر خطای آزمایش

داده‌ها ابتدا در نرم‌افزار اکسل دسته‌بندی شده، و برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار آماری SAS استفاده شد. جهت مقایسه بین میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج

یافته‌های مربوط به شاخص فراسنجه‌های ایمنی در جدول ۴ ارائه شده است. طبق یافته‌های جدول پاسخ به گلبول قرمز گوسفندی، ایمنوگلبولین G و ایمنوگلبولین M تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (P>۰/۰۵)، اما بالاترین پاسخ به گلبول قرمز گوسفندی در تیمار اسانس اسطخدوس در سطح ۴۰۰ و کم‌ترین در تیمار شاهد، بالاترین ایمنوگلبولین G در تیمار شاهد و کم‌ترین در تیمار اسطوخدوس در سطح ۴۰۰، بالاترین ایمنوگلبولین M در تیمار اسانس اسطخدوس در سطح ۴۰۰ و کم‌ترین در تیمار شاهد بود.

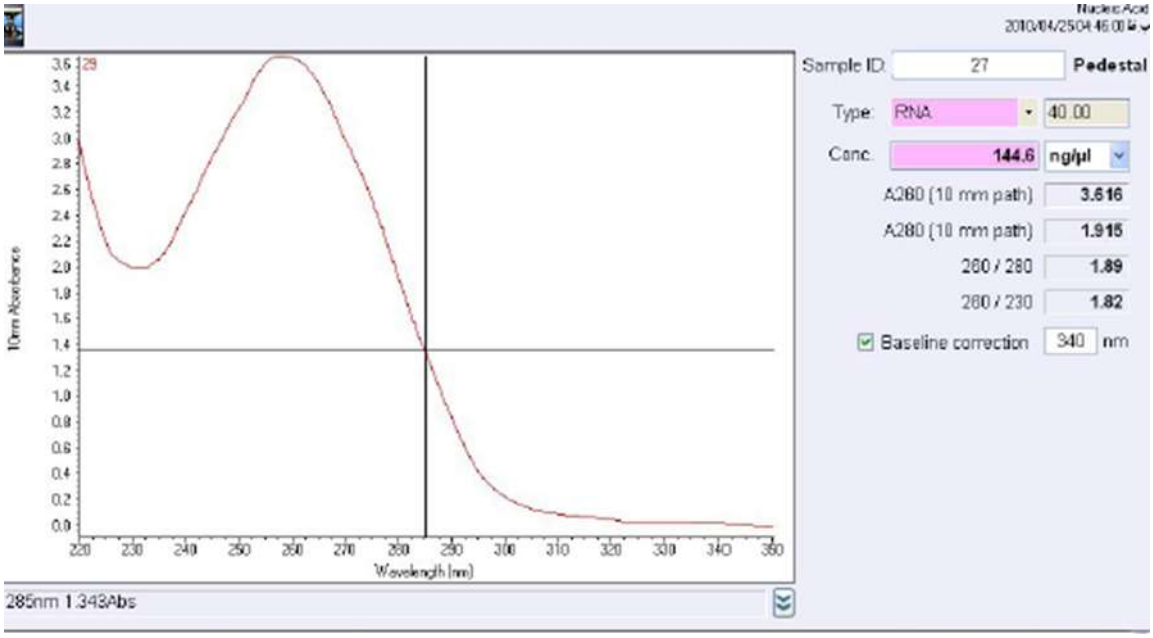
جدول ۴: اثر تیمارهای مختلف بر شاخص فراسنجه های ایمنی

تیمار	عیار پادتن بر ضد گلبول قرمز گوسفند (SRBC)	ایمنوگلبولین (IgG) G	ایمنوگلبولین (IgM) M
شاهد	۴/۵	۲/۵	۲
آنتی‌بیوتیک	۴/۶	۲/۲	۲/۴
پروبیوتیک	۴/۶	۲/۴	۲/۲
اسطخدوس(۲۰۰)	۵	۲/۳	۲/۷
اسطخدوس(۴۰۰)	۵/۳	۲/۱	۳/۲
SE	۰/۸۹	۰/۵۲	۰/۵۵
معنی‌داری	۰/۹۶	۰/۹۸	۰/۵۹

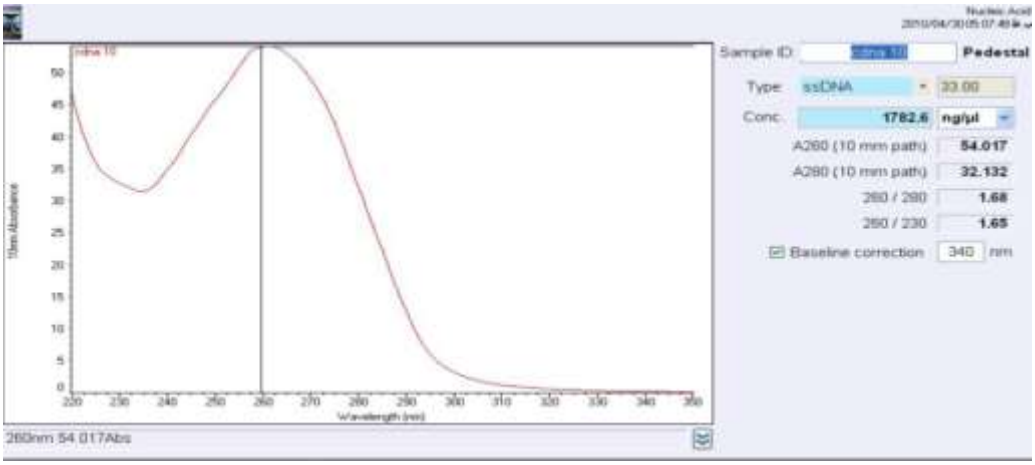
یافته‌های بیان ژن: یافته‌های نورسنجی با دستگاه اسپکتوفتومتری نانودراپ نشان داد که RNA استخراج شده از بافت روده جوجه گوشتی سویه آرین دارای کیفیت و کمیت مناسبی است. در شکل ۱، نمودار جذب نوری مربوط به RNA استخراج شده نمایش داده شده است. پروتئین‌ها متداول‌ترین آلوده‌کننده‌های اضافی در نمونه‌های DNA و RNA می‌باشند که نور فرابنفش را در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر جذب می‌کنند. هم‌چنین بقایای فنلی و الکلی که از منابع آلوده‌کننده بیولوژی برای نمونه‌های DNA و RNA محسوب می‌شوند قادر به جذب طول موج ۲۳۰ نانومتر می‌باشند. لذا با محاسبه جذب نوری نمونه اسیدنوکلئیک در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر و محاسبه نسبت‌های جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ می‌توان خلوص اسیدهای نوکلئیک را مشخص نمود. به‌طور ایده‌آل نسبت ۲۶۰OD به ۲۸۰OD که برآوردی از نسبت اسیدهای نوکلئیک به پروتئین‌ها در نمونه است و درجه خلوص RNA را مشخص می‌نماید. این نسبت برای RNA خالص تقریباً برابر با ۱/۸ تا ۲ می‌باشد. درصورتی‌که کم‌تر از این مقدار باشد مقدار اسیدنوکلئیک بسیار کم‌تر از آن خواهد بود که بتوان با آن کارکرد کمیت و کیفیت RNA استخراجی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ Thermo تعیین شد. در مورد نمونه استخراج شده از بافت روده نسبت به‌دست آمده برابر با ۱/۹۶ بود، که این یافته‌ها حاکی از خلوص بالا و عدم‌وجود آلوده‌کننده‌های فنلی و الکلی می‌باشد.

سنتز cDNA: پس از ساخت cDNA برای اطمینان از یافته‌های کار غلظت cDNA های سنتز شده با استفاده از نانودراپ تعیین گردید. یافته‌های نورسنجی cDNA های ساخته شده از RNA استخراجی بافت روده نشان داد که cDNA ها از کمیت و کیفیت مناسبی برخوردار هستند. نمودار جذب نوری مربوط به cDNA ها آمده است (شکل ۲).

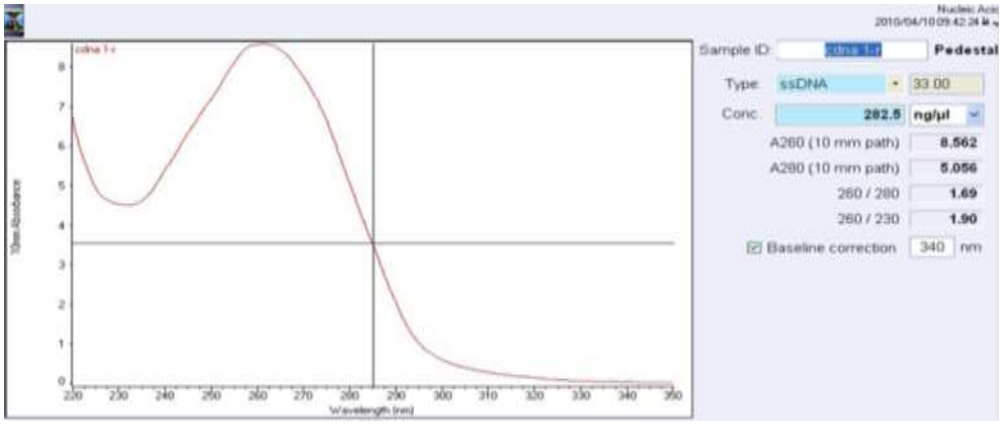
ارزیابی و رقیق‌سازی و همسان‌سازی غلظت cDNA: پس از تعیین کمیت و کیفیت cDNA سنتز شده از نمونه‌های مربوط به بافت روده با نانودراپ برای انجام Real time PCR باید تمام cDNA ها، رقیق شده و به یک غلظت مشخص رسانده شود که در این مطالعه تمام cDNA ها رقیق شد و به غلظت حدود ۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر رسید و سپس غلظت cDNA ها توسط نانودراپ تایید شد (شکل ۳).



شکل ۱: نمودار کمیت وکیفیت RNA استخراجی از بافت روده

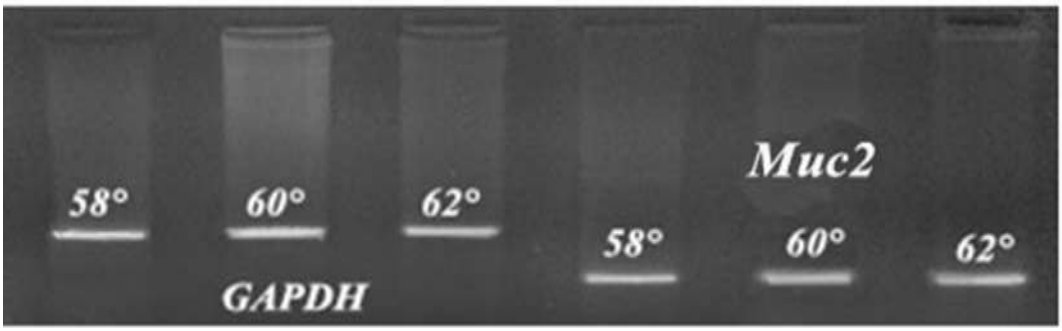


شکل۲: نمودار کمیت وکیفیت cDNA سنتز شده از RNA استخراجی از بافت روده



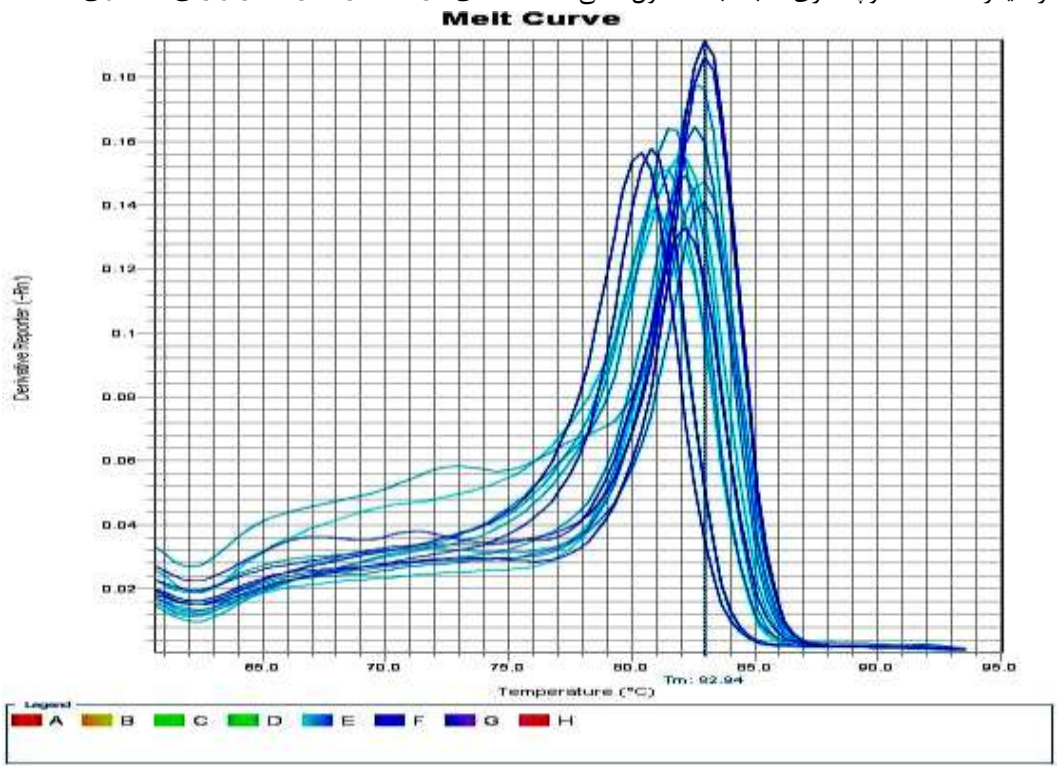
شکل ۳: نمودار کمیت وکیفیت cDNA رقیق شده

دمای بهینه اتصال پرایمرهای اختصاصی ژن: به‌منظور تعیین دمای بهینه اتصال پرایمرهای اختصاصی ژن، یک واکنش PCR با شیب دمایی ۵۸°C، ۶۰°C و ۶۲°C انجام شد. با توجه به این‌که ژن MUC2 و GAPDH بهترین باند را در دمای ۶۰°C نشان دادند این دما برای اتصال پرایمرها انتخاب شد (شکل ۴).



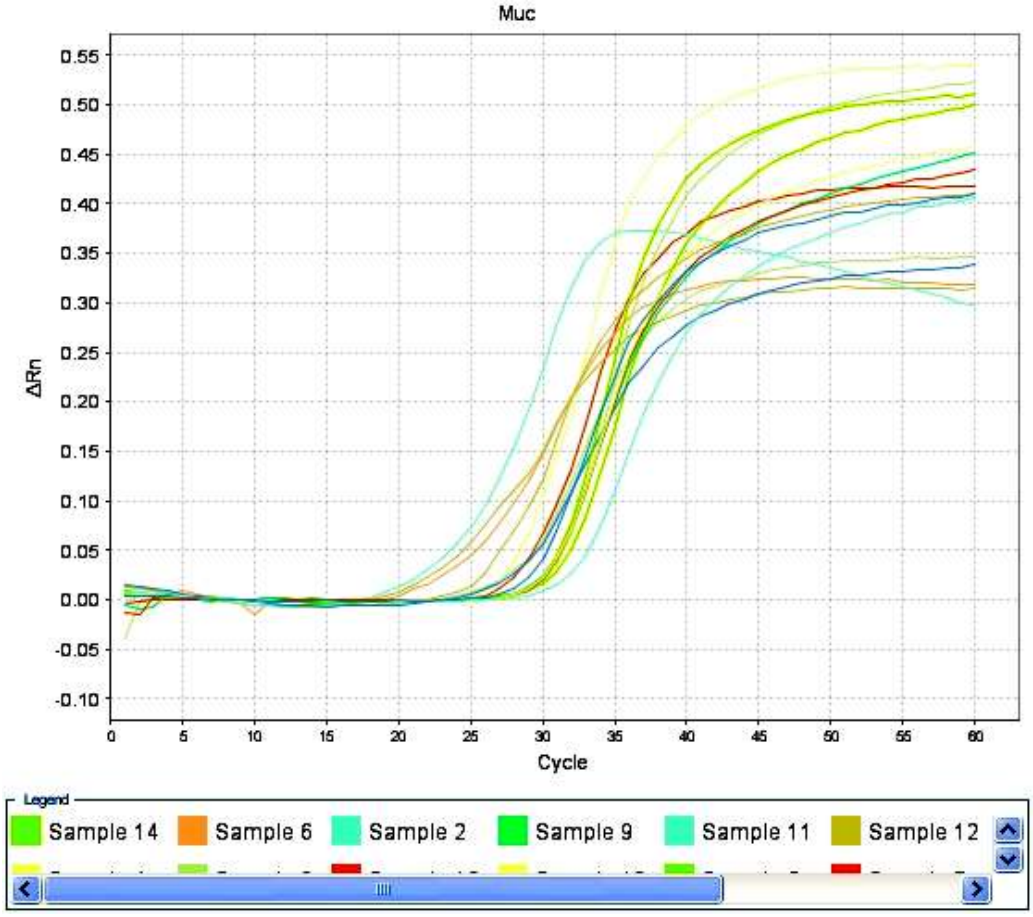
شکل ۴: محصولات واکنش PCR ژن‌های MUC2 و GAPDH

منحنی ذوب: این آزمون برای ژن‌های MUC2 و GAPDH در طیف حرارتی ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. با توجه به منحنی ذوب برای آغازگرها می‌توان گفت که آغازگرها به‌صورت اختصاصی عمل کرده‌اند و یک نمونه منفرد را از cDNA تکثیر نموده‌اند، همان‌طورکه در شکل دیده می‌شود پیک اضافی کوچک‌تر از پیک محصولات که نشانگر وجود پرایمر دایمر می‌باشد، وجود ندارد و این نشانگر این موضوع است که آغازگرها تقابلی با هم ندارند. از آن‌جا که پرایمر دایمرها قطعات کوچک‌تری نسبت به محصول اصلی تولید می‌کنند بنابراین دمای ذوب پایین‌تری نسبت به محصول اصلی دارند درنتیجه منحنی ذوب پرایمر دایمرها کوچک‌تر و قبل از منحنی ذوب محصول اصلی می‌باشد. درصورتی که محصولی به‌صورت غیراختصاصی تکثیر شود که دمای ذوب آن بالاتر از محصول اصلی باشد منحنی ذوب بعد از منحنی ذوب محصول اصلی دیده می‌شود. منحنی ذوب مناسب دارای ویژگی‌هایی نظیر کشیده و نوک تیز بودن می‌باشد و هم‌چنین منحنی ذوب تکرارهای یک نمونه کاملاً بر روی هم قرار می‌گیرند که در شکل ۵ این ویژگی‌ها به‌خوبی مشاهده می‌شود.



شکل ۵: منحنی ذوب واکنش Real-Time PCR

بیان ژن MUC2: باتوجه به این‌که در این آزمایش سطوح مختلف اسطوخدوس، پروبیوتیک و آنتی‌بیوتیک موردبررسی قرار گرفت و برای بیان نسبی ژن نیاز به گروه کنترل بود، لذا جیره پایه (شاهد) به‌عنوان معیار سنجش بیان ژن قرار گرفت. همان‌طورکه در جدول ۵ دیده می‌شود بیان ژن Muc2 در سطوح مصرف ۱۰۰ میلی‌گرم پروبیوتیک، ۱۵۰ میلی‌گرم آنتی‌بیوتیک، ۲۰۰ میلی‌گرم اسطوخدوس و ۴۰۰ میلی‌گرم اسطوخدوس (P<۰/۰۵) اختلاف معنی‌داری را نشان نداد اما میزان بیان ژن Muc2 در تیمارهای سطوح مختلف اسطوخدوس و پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است. به‌طوری‌که کم‌ترین بیان مربوط به گروه آنتی‌بیوتیک و بالاترین بیان مربوط به اسطخدوس (۴۰۰) می‌باشد. شکل ۶ منحنی تکثیر واکنش Real-Time PCR برای ژن Muc2 را نشان می‌دهد.



شکل ۶: منحنی تکثیر واکنش Real-Time PCR برای ژن Muc2

جدول ۵: میزان بیان mRNA Muc2 روده در تیمارهای مختلف

	گروه‌های آزمایشی						
تیمار	شاهد	آنتی‌بیوتیک	پروبیوتیک	اسطوخدوس (۲۰۰)	اسطخدوس (۴۰۰)	SEM	Value
میانگین	-۵/۳[a]	-۵/۴[a]	-۵/۹۵[a]	-۷/۱[a]	-۹/۹[a]	۲/۶۵	۰/۶۵

بحث

موسین ساخته شده توسط سلول‌های گابلت با آغشته کردن سطح مجاری گوارشی، به‌عنوان واسطه در جذب مواد مغذی از این مجاری نقش دارد. بنابراین تغییر میزان و غلظت موسین دستگاه گوارش هضم و جذب را تحت تاثیر قرار می‌دهد. با توجه به یافته‌ها می‌توان دریافت که مواد مغذی موجود در مجاری گوارشی در تحریک ساخت و ترشح موسین و یا عدم ساخته شدن آن موثر می‌باشند. دستگاه

گوارش سامانه‌ای است که نه تنها در افزایش جذب مواد مغذی موثر است بلکه تنظیم نفوذپذیری اتصالات محکم بین سلول‌های روده، تولید موسین و میکروفلور هم‌زیست را از طریق ترشحات در حفره روده تسهیل می‌کند (۹). این یافته‌ها با یافته‌های تحقیق دیگری که با اعمال محدودیت غذایی باعث افزایش بیان موسین و در نتیجه افزایش انتقال‌دهنده‌های پپتیدی و گلوکز سدیم و فعالیت آنزیم‌هایی ازقبیل آمینوپپتیدازها شده است، یکسان می‌باشد (۱۰). با توجه به این‌که اثرات استفاده از گیاهان دارویی در خوک‌های جوان و جوجه‌های گوشتی بر فعالیت میکروب‌های دستگاه گوارش مشخص شده است (۱۱). اسانس‌های گیاهی با تغییر فلورمیکروبی دستگاه گوارش و متابولیت‌های تولیدی آن‌ها، مورفولوژی بافت‌های دستگاه گوارش را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهند. این تحقیق به‌وضوح نشان‌دهنده تاثیر مکمل گیاهان دارویی بر جمعیت میکروبی روده کوچک و متعاقباً ساخت و ترشح موسین می‌باشد. مقدار کل موسین موجود در روده کوچک درنتیجه تعادل بین ساخت و ترشح موسین توسط سلول‌های گابلت و از بین روی آن‌ها توسط آنزیم‌های مترشحه از فلورمیکروبی روده می‌باشد. چراکه موسین در مقابل آنزیم‌های مترشحه از مجاری گوارشی میکروبی مقاوم است. گیاهان دارویی از طریق تغییر اکولوژی میکروبی روده کوچک باعث از بین رفتن باکترهای مضر و تحریک فعالیت باکتری‌های مفید برای بدن می‌شوند به‌عبارتی دارای خواص پروبیوتیکی می‌باشند و اثرات متبتی بر سلامت دستگاه گوارش و ایمنی بدن دارند (۱۲). فلور میکروبی روده از چند طریق بر میزان روتوشت‌برداری و ترشح موسین روده می‌تواند موثر باشد ازجمله تاثیر بر تکثیر و تمایز سلول‌های گابلت، ترشح آنزیم‌های تخریب‌کننده موسین که ساخت و از بین روی موسین را تغییر داده و باعث تحریک رونوشت‌برداری می‌شود (۱۰). گیاهان دارویی ممکن است از طریق تاثیر بر مورفولوژی روده از قبیل ضخامت دیواره روده، سطح ویلوس، ارتفاع و عمق کریپت‌ها، تراکم و اندازه سلول‌های گابلت نیز بر ساخت و ترشح موسین موثر می‌باشند. با توجه به این‌که موسین به‌عنوان عامل حفاظتی موثر در جهت ورود پاتوژن‌ها به بخش‌های داخلی دستگاه گوارش عمل می‌کنند افزایش ترشح آن‌ها درنتیجه مکمل‌سازی گیاهان دارویی به جیره می‌تواند از طریق بهبود وضعیت ایمنی بدن و بهبود جذب مواد مغذی در جوجه‌های دارای پتانسیل بالای رشد شرایط مناسبی برای سرعت رشد بالا و جلوگیری از بیماری‌ها ازجمله آسیت داشته باشد. بنابراین افزودن گیاهان دارویی ازقبیل اسطوخدوس به جیره جوجه‌های گوشتی از طریق تغییر فلور میکروبی، ساخت و ترشح موسین را تحت تاثیر قرار داده و از بروز آسیت جلوگیری می‌کند. افزودن اسطوخدوس بیان ژن Muc2 را افزایش داده است که نشان دهنده اثر محرک مواد موثر موجود در این گیاهان بر دستگاه گوارش ازجمله ترشح موسین مجاری گوارشی شود. یافته‌های حاصل مشابه بررسی تاثیر فراورده‌های حاوی ۵، ۳ و ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره آویشن، عصاره دارچین، و عصاره بابونه تغذیه شده به جوجه‌های گوشتی است که این ترکیبات تعدادی سلول‌های جامی و موسین را در سطح پرزهای روده افزایش دادند (۱۳). گیاهان دارویی باعث افزایش ترشح بزاق، صفرا، جذب مواد مغذی، تحریک ترشح مخاط روده و فعالیت آنزیم‌های گوارشی از قبیل فعالیت تریپسین، آمیلاز در بافت‌های همژنیزه شده پانکراس، رودۀ کوچک، محتویات ژئوژنوم (۱۴) و بهبود وظایف روده از قبیل سرعت عبور محتویات دستگاه گوارش می‌شوند (۱۵). ازطرف دیگر یکی از وظایف موسین محافظت از دیواره دستگاه گوارش در برابر اسیدهای صفراوی، آنزیم‌های دستگاه گوارش می‌باشد لذا با توجه به یافته‌های حاصله می‌توان گفت افزایش ترشح موسین ناشی از اثرات گیاهان دارویی بر میزان ترشح این مواد باشد. از طرف دیگر برخی گیاهان دارویی دارای خاصیت پری بیوتیکی هستند که سبب توسعه فلور مطلوب شده و این امر نیز خود سبب افزایش ترشح موسین در روده می‌شود. در واقع ممکن است کارواکرول موجود اسطخدوس از طریق تاثیر بر تعداد سلول‌های گابلت، سرعت رشد و از بین روی آن‌ها و در نتیجه میزان ساخت و ترشح موسین را تحت تاثیر قرار دهند (۱۶). هم‌چنین گیاه داروئی استفاده شده می‌تواند در افزایش ترشح آنزیم HapA که یک پروتئیناز خارج سلولی بوده و باعث افزایش ترشح و تجمع موسین می‌شود، موثر باشد. بیان ژن موسین توسط فاکتورهای رونوشت‌برداری، سیتوکین‌ها، محصولات اولیه و ثانویه حاصل از فعالیت میکروفلور روده و فاکتورهای رشد تنظیم می‌شود. هم‌چنین ساخت موسین توسط هر عامل یا وضعیتی که به‌عنوان پیش‌ماده یا تحریک تمایز سلول‌های گابلت یا گلیکوزیلاسیون و سنتز پروتئین‌ها باشد تحت تاثیر واقع می‌شود (۱۷). افزایش بیان Muc2 در تیمارهای تغذیه شده با مکمل گیاهان دارویی می‌تواند به‌علت تاثیر این گیاهان از طریق تاثیر احتمالی مواد موثر موجود با تولید یا تغییر فعالیت فاکتورهای رونویسی موثر در رونوشت‌برداری ژن Muc2 ازجمله GATA و FOX نیز باشد. تاثیر ژن‌های GATA4 و FOX1 در بیان و ترشح موسین در سلول‌های روده در موش مشخص شده است (۱۸). اعمی‌ازغدی و همکاران تاثیر سطوح مختلف عصاره آویشن و زیره سبز را بر پاسخ ایمنی هومورال در مرغ‌های نژادهای لاین (۵۴ هفتگی) ارزیابی کردند (۱۹). براساس گزارشات آن‌ها پاسخ اولیه و ثانویه ایمنوگلوبولین کل، IgG و IgM تحت تاثیر سطوح مختلف عصاره آویشن و زیره سبز قرار نگرفته بود (۱۹). یافته‌های این پژوهش در زمینه بررسی اثرات سطوح تغذیه اسطوخدوس، پروبیوتیک و آنتی‌بیوتیک در جوجه‌های گوشتی لاین آرین، با برخی تحقیقات مشابه صورت گرفته مطابقت داشت. یافته‌های

این مطالعه نشان داد که پاسخ به گلبول قرمز گوسفندی، ایمنوگلوبولین G و ایمنوگلوبولین M تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفت و بیان ژن Muc2 در جوجه‌های گوشتی تحت تیمار افزایش یافت. لذا با توجه به این‌که استفاده از گیاه داروئی اسطوخدوس باعث توسعه فلور روده و این امر نیز خود سبب افزایش ترشح موسین در روده می‌شود. بنابراین افزودن اسطوخدوس به جیره جوجه‌های گوشتی به‌دلیل نقش پروبیوتیکی سبب بهبود سیستم ایمنی و جلوگیری از بیماری‌هایی از قبیل آسیت و هم‌چنین سبب اثرات مثبتی بر سلامت دستگاه گوارش می‌شود.

منابع

1. **Duke, J. and Beckstrom-Stenberg, S.M., 1994.** Acceptable levels of flavoring ingredients., In: charalammbous G (Ed). Developments in Food Science. 34: 741-758.
2. **Soltan, M.A., Shewita, R.S. and El-Katcha, M.I., 2008.** Effects of dairy anise seeds supplementation on growth performance, immune response, carcass traits and some blood parameters of broiler chickens. Journal of Poultry Science. 7(11): 1078-1088.
3. **Horosova, K., Bujnakova, H. and Kmet, V., 2006.** Effect of oregano essential oil on chicken lactobacilli and *E. Coli* Journal of Floia Microbiology. 51(4): 278-280.
4. **Jamroz, D., Wiliczkiewicz, A., Wertelecki, T., Orda, J. and Scorupinska, J., 2005.** Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and domestic grains. Journal of Poultry Science. 46(4): 485-493.
5. **NRC. 1994.** Nutrient Requirements of Poultry. 9th Ed. Natl. Acad. Sci., Washington DC. 114 p.
6. **Ambrose, C.T. and Donner, A., 1973.** Application of the analysis of variance to hemagglutination titrations. J Immunol Methods. 3(2):165-209. doi: 10.1016/0022-1759(73)90031-8.
7. **Hisako, S., Yamagishi, A., Yoshida, J., Nakano, H. and Hoshino, N., 2005.** A Microscopic Model for Helical Twisting Power by the Optical Isomers of an Octahedral Metal Complex. Japanese Journal of Applied Physics. 44(6): 40-67.
8. **Delahunty, C. and Salmon, J.R., 1996.** Protein identification using 2D-LC-MS/MS. Methods. 35: 248-255.
9. **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. 135(2): 187-192.
10. **Smirnov, A., Sklan, D. and Uni, Z., 2004.** Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. J. Nutr. 134(4):736-742.
11. **Lee, K.W. and Beynen, A.C., 2004.** Essential oils in broiler nutrition. International Journal of Poultry Science. 3(1): 738-752.
12. **Gibson, G.R. and Roberfroid, BM., 1995.** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition. 125(6): 1401-1412.
13. **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 (5-6): 255-268.
14. **Lee, K.W., Everts, H., Kappert, H.J., Frehner, M., Losa, R. and Beynen, A.C., 2003.** Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. British Poultry Science. 44(3): 450-457.

15. **Jamroz, D., Wiliczkiewicz, A., Wertelecki, T., Orda, J. and Scorupinska, J., 2005.** Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and domestic grains. Journal of Poultry Science. 46(4): 485-493.

16. **Jamroz, D. and Kamel, C., 2002.** Plant extracts enhance broiler performance. Journal of Animal Science. 80(4): 140-148.

17. **Smirnov, E., Tako, PR. 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. 85(4): 669-673.

18. **Van der Sluis, M., Melis, H.M., Jonckheerec, N., Marie-Paule, D.A., Bullera, H. and Van Seuningenc, I., 2004.** The murine Muc2 mucin gene is transcriptionally regulated by the zinc-finger GATA-4 transcription factor in the intestinal cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 325(3): 952-996.

19. **Ami Azghadi, M., Pilehvar, M., Arshami, J. and Khani, A.M., 2010.** Effect of different levels of thyme and cumin extracts on production performance, egg quality and humoral immune response in laying hens. Proceedings of the 4th Congress of Animal Sciences of Iran. Karaj. (In Persian)