Archive of SID

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹، ص. ۵۶۳-۵۴۹

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 12, No. 4, Winter 2021, p. 549-563

مقاله علمی- پژوهشی

تأثیر مکمل‌های ضد میکروبی بر عملکرد، مرفولوژی روده و بیان ژن‌های PepT1، PepT2 و LEAP2 در دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی

سجاد حسن زاده[۱] – رضا مجیدزاده هروی[۲*] – علی جوادمنش[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۲۱

چکیده

این مطالعه به منظور تعیین اثر استفاده از مکمل‌های ضد میکروبی بر بیان حامل‌های پپتیدی در زمان اعمال چالش میکروبی، بررسی عملکرد تیمارهای آزمایشی و بررسی مؤلفه‌های بافت‌شناسی در دستگاه گوارش بر روی ۴۰۰ قطعه جوجه گوشتی نژاد راس ۳۰۸ انجام گردید. این طرح در ۴ تیمار آزمایشی با ۵ تکرار و ۲۰ پرنده در هر تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. در ۷ روزگی ۱۰ جوجه از هر تکرار جدا و با 10^7 سلول k99 Escherichia coli بصورت دهانی آلوده شدند و تیمار به دو دسته تحت چالش و سالم تقسیم شدند. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱- شاهد (جیره پایه)، ۲- پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس سالیوواریوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم به میزان 10^9 cfu/kg) ۳- مکمل گیاهی با نام تجاری X-Tract (مخلوطی از عصاره آویشن۲٪، فلفل۲٪ و دارچین۵٪ به میزان ۱۰۰ گرم در هر تن به صورت پودر گرانول)، ۴- آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین۵۰٪ به میزان۲۰۰-۴۰۰ گرم در هر تن خوراک به مدت ۱ تا ۲ هفته. در ۷ روز بعد از چالش میکروبی، نمونه برداری از روده و کبد پرندگان در همه تیمارها، در سن ۱۴ روزگی انجام شد. عملکرد و مصرف خوراک در انتهای هر دوره پرورشی اندازه گیری شد. با توجه به نتایج حاصل از این طرح در بررسی اثر متقابل بین تیمار های سالم و درگیر بر وزن بدن در دوره ۱۱ تا ۲۴ روزگی، وزن زنده در گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک به طور معنی داری افزایش یافت. همچنین در تیمارهای سالم مکمل پروبیوتیکی نسبت به سایر مکمل ها باعث افزایش وزن روزانه در پرنده ها شد اما این میزان از گروه کنترل کمتر بود. در گروه درگیر با باکتری ایکولای، پروبیوتیک در دوره ۱۱ تا۲۴ روزگی نسبت به سایر تیمارها سبب افزایش میزان وزن روزانه شد. در بررسی اثر مکمل نشان داده شد استفاده از مکمل پروبیوتیکی در دوره ۱۱ تا ۲۴ روزگی باعث افزایش معنی داری در میزان مصرف خوراک شد که این میزان مشابه گروه کنترل بود. اما مکمل گیاهی نسبت به سایر تیمار ها سبب کاهش مصرف خوراک روزانه در ۱۱ تا ۲۴ روزگی گردید. بررسی نتایج این آزمایش نشان داد استفاده از مکمل پروبیوتیکی در تیمارهای تحت چالش سبب افزایش معنی‌داری در ارتفاع ویلی در ژژنوم می‌گردد و همچنین مکمل پروبیوتیکی در مقایسه با سایر تیمارها به میزان بیشتری عرض پرزهای بافت روده را افزایش دادند. در بررسی اثر ساده میزان بیان ژن‌های PepT1 و PepT2 در روده باریک و ژن LEAP2 در کبد نشان داده شد که در همه تیمارهایی که تحت چالش با ایکولای بودند میزان بیان ژن‌های مورد نظر در بافت‌های ذکر شده از گروه سالم کمتر بود. نتایج این مطالعه پیشنهاد می کند که استفاده از مکمل گیاهی و پروبیوتیک در زمان مقابله میکروبی می تواند از خطر ناشی از آلودگی با باکتری های پاتوژن بکاهد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، پروبیوتیک، جوجه‌های گوشتی، PepT1، LEAP2، X-Tract

مقدمه

در بسیاری از کشورها پرورش صنعتی طیور یکی از مولد های مهم اقتصادی است. در مقیاس بزرگ پرورش، طیور به راحتی می‌توانند در معرض شرایط تنش‌زا قرار گیرند. اغلب مشکلات ناشی از زیان‌های این صنعت، عدم مدیریت وضعیت طیور در شرایط مختلف است که بخش بیشتر آن در زمان درگیری با عوامل مختلف بیماری و

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی دام، دانشکده کشاورزی، فردوسی مشهد
۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
(*- ایمیل نویسنده مسئول: rmajidzadeh@um.ac.ir)
DOI:10.22067/ijasr.v12i4.79724

www.SID.ir

Archive of SID

تغییر در شرایط محیطی رخ می‌دهد و در نتیجه باعث ایجاد زیان‌های اقتصادی بسیار سنگین می‌گردد. یکی از اقدامات موثر در زمان بروز بیماری استفاده از آنتی بیوتیکها است که اثرات سوء جانبی از جمله صدمه به فلور میکروبی را بروز می دهد. به دنبال اثرات مضر استفاده از انتی بیوتیک ها دانشمندان بدنبال روشهای جایگزین برای حل این مشکلات بوده‌اند. یکی از این روشها استفاده از پروبیوتیک‌ها و یا مکمل‌های گیاهی است که برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها تأثیر منفی بر جمعیت میکروبی روده ندارند و به فرآیند گوارش بسیار کمک می‌کنند. پروبیوتیک‌ها بر تعادل باکتری‌های مفید و مضر روده تأثیر می‌گذارند (۱۰) و این تعادل را به نفع افزایش جمعیت باکتری‌های مفید تغییر می‌دهند، در حقیقت پروبیوتیک‌ها از این طریق اثرات سلامت بخش خود را در بدن القا می‌کنند و می‌توانند به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک محرک رشد باشند (۳۳). مکمل های پروبیوتیکی ممکن است دارای یک یا تعداد بیشتری سویه میکروارگانیسمی باشند و می توانند به شکل پودر، قرص، گرانول و همراه آب یا غذا مصرف شوند (۳۴). مهم ترین مکانیسم بازدارنده ی پروبیوتیک ها در برابر بیماری ها شامل رقابت بر سر مواد مغذی، تولید سموم و ترکیباتی مانند باکتریوسین ها و رقابت بر سر مکان های اتصال در اپیتلیوم روده است (۲۲). همچنین نشان داده شده است که استفاده از پروبیوتیک‌ها می تواند بیان ژن حامل های پپتیدی را تحت تاثیر قرار دهد (۲۳). همچنین طی سالیان اخیر، روغن‌های ضروری گیاهی به عنوان جدیدترین محرک رشد، توجه بسیار زیادی را به عنوان جایگزین طبیعی آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد به خود اختصاص داده‌اند. روغن‌های ضروری ترکیبات آروماتیک گیاهی هستند که فعالیت بیولوژیکی آنها از مدت‌ها پیش شناخته شده است. ترکیب استانداردی از عصاره‌های گیاهی شامل Carvacrol 2%، Cinnamaldehyde 5% و Capsicum Oleoresin 2% است که به ترتیب از گیاهان دارچین، آویشن و فلفل استخراج شده‌اند. این عصاره‌ها به طور کلی از طریق دو مکانیسم افزایش ترشحات گوارشی و تعدیل پاسخ‌های ایمنی سیستم گوارش، موجب بهبود هضم و جذب مواد مغذی و ایجاد تعادل میکروبی و بهبود در وضعیت ایمنی این اندام‌ها می‌شوند. ضمن اینکه نیاز انرژی نگهداری کاهش یافته، انرژی بیشتری صرف رشد پرنده گردیده و نهایتاً منجر به افزایش راندمان تولید و سودآوری اقتصادی می‌گردند (۴).

انتقال پپتیدها به داخل سلول، به شکل دی و تری‌پپتید، توسط پروتئین‌های حامل در سطح غشای سلول انجام می گیرد. این پروتئین‌های حامل با توانایی انتقال خود و دیگر فعالیت‌های درمانی به عنوان پیش‌ساز داروها از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند. چند نوع پروتئین‌های حامل که در انتقال پپتید ها نقش دارند شامل PepT1(intestinal oligopeptide transporter) ، PepT2 (renal oligopeptide transporter) و LEAP2 (Liver expressed antimicrobial peptide 2) هستند. این پروتئین‌های انتقال‌دهنده نقش مهمی در جذب پپتیدهای کوچک در روده، کلیه و کبد داشته و نیز در جذب داروهایی با ماهیت پپتیدی اهمیت دارند (۲۶). PepT1 و PepT2 پروتئین‌های حاملی هستند که مسئول جابه‌جایی و انتقال دی و تری‌پپتیدها هستند. محل بیان PepT1 عمدتا در غشای پلاسمایی ناحیه راسی انتروسیت در روده کوچک است. بیان این حامل پروتئینی تحت تاثیر عوامل مختلف مانند ترکیب پروتئین خوراک، مکمل های آنزیمی، محدودیت غذایی، شرایط آسیب شناختی یا مصرف دارو است (۱۸). بطوریکه نشان داده شده که استفاده از مکمل های میکروبی لاکتوباسیلی بیان PepT1 را در ناحیه ژژنوم روده باریک می‌تواند افزایش دهد (۹). همچنین مدسن و وانگ (۱۶) نشان دادند که در زمان ایجاد محدودیت غذایی میزان بیان ژن PepT1 و گیرنده‌های پروتینی PPRα به میزان دو برابر در جوجه‌های گوشتی افزایش می‌یابد. PepT2 یک حامل با تمایل ترکیبی بالا نسبت به سوبسترا ولی با ظرفیت کم برای انتقال پپتیدها می باشد. ۷۰ درصد شباهت ژنی و ۵۰ درصد شباهت اسید آمینه ای با PepT1 دارد. بیشتر سوبستراهای PepT2 همان سوبسترای PepT1 است علاوه بر اینکه این حامل ۴۰ برابر تمایل بیشتری برای اتصال با آنها دارد. در دوره جنینی جوجه، بیان این پروتئین در روده باریک زیاد است و بعد از هچ به تدریج از بیان آن کاسته می گردد ولی بیان ثابتی در روده بزرگ و سکوم ها از جنینی تا ۲ هفته بعد از هچ برای آن گزارش شده است (۳۷). تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با تغییرات بیان این ژن در شرایط چانج و یا استفاده از مکمل های میکروبی گزارش نشده است. این حامل در کلیه، مغز و بافتهای دیگری چون سیستم عصبی دستگاه گوارش، ریه، غدد پستانی و طحال بیان می شود (۳۷). پپتید دیگری نیز در بافت کبد مشاهده شده است که با نام LEAP2 شناسایی گردید. نقش بیولوژیکی آن کاملا شناخته شده نیست اما در مطالعات قبلی نشان داده شده است که از نظر شیمیایی در مقابل چندین باکتری گرم مثبت فعالیت ضد

www.SID.ir

Archive of SID

میکروبی دارد (۱۳). هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر مکمل‌های ضد میکروبی همچون پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلی، مکمل‌های گیاهی (X-Tract) و آنتی‌بیوتیک‌ها بر عملکرد رشد، مورفولوژی روده و بررسی میزان بیان حامل‌های پروتئینی PepT1، PepT2، LEAP2 در دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی می‌باشد که در شرایط درگیری و بدون درگیری با عامل پاتوژن مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تیمار آزمایشی با ۵ تکرار و در هر تکرار ۲۰ پرنده در پن‌های با مساحت یک متر انجام شد. مقابله میکروبی جوجه ها بر اساس روش ژانگ و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد (۳۶). بر این اساس در ۷ روزگی ۱۰ قطعه از جوجه‌های هر پن جدا و دو نوبت به فاصله ۳ روز با باکتری پاتوژن ایکولای k99 به مقدار 10^7 باکتری تلقیح شدند و پرندگان تلقیح شده در پن‌های جدا قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: ۱- جیره پایه (شاهد) ۲- جیره پایه حاوی مکمل پروبیوتیکی (حاوی ۲ سویه لاکتوباسیلیوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس سالیواریوس) به میزان 10^9 cfu/kg ۳- جیره پایه حاوی مکمل عصاره گیاهی با نام تجاری X-TRACT®[1] (مخلوطی از عصاره آویشن۲٪، فلفل۲٪ و دارچین۵٪) ۴- جیره پایه حاوی آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین. مکمل گیاهی X-TRACT® بر اساس توصیه شرکت سازنده ۱۰۰ گرم در هر تن خوراک اضافه شد و همچنین در جیره حاوی آنتی-بیوتیک از آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین ۵۰٪ به میزان ۲۰۰ گرم در هر تن خوراک به مدت ۱ هفته استفاده شد. جیره غذایی پایه بر اساس کاتالوگ نژاد راس (۲۰۱۴) و برای دوره‌های آغازین (۱ تا ۱۰ روزگی)، رشد (۱۱تا۲۴روزگی) و دوره پایانی (۲۵ تا ۴۲روزگی) تهیه شد (جدول۱).

صفات عملکردی

درروز اول آزمایش وزن گروهی هر واحد آزمایشی ثبت گردید. در پایان هر دوره بعد از سه ساعت گرسنگی (به منظور حذف خطای ناشی از پر بودن دستگاه گوارش) وزن گروهی جوجه های هر واحد و خوراک باقی مانده جهت محاسبه افزایش وزن روزانه، مصرف خوراک روزانه و ضریب تبدیل غذایی هر واحد آزمایشی، اندازه‌گیری شد. وزن و زمان دقیق تلفات هر واحد آزمایشی به منظور محاسبات روز مرغ ثبت و در محاسبه صفات ذکر شده از روش روز مرغ استفاده شد.

مؤلفه‌های بافت‌شناسی روده

به منظور ارزیابی خصوصیات بافت شناسی روده در ۲۱ روزگی دوره پرورش، یک جوجه از هر پن با وزن نزدیک به میانگین وزنی آن پن انتخاب شد و پس از ذبح و باز شدن حفره شکمی ۰/۵ سانتی‌متر از بافت ژژنوم جدا گردید و پس از شستشو با آب مقطر، به منظور ثابت شدن بافت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. پس از آن نمونه را به صورت شناور در محلول فیکساتوری که حجم آن ۵ برابر نمونه است نگهداری کرده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری و بعد از آن برای برش و تهیه مقطع به شرکت جهان سلول توس (مشهد- ایران) منتقل شد. برای بررسی اجزای بافت روده از میکروسکوپ نوری (Olympus-D12, Japan) متصل به کامپیوتر و نرم‌افزار DP2_BSW استفاده شد و اندازه اجزای بافت براساس میکرومتر گزارش شد. شاخصه های مورد ارزیابی شامل: ۱- ارتفاع پرزهای روده (از نوک ویلی تا ناحیه اتصال به کریپت) ۲- عرض ویلی (عرض سه قسمت بالایی، میانی و پایینی اندازه‌گیری و میانگین آنها به عنوان عرض ویلی در نظر گرفته شد) ۳- عمق کریپت (از پایه ویلی تا لایه زیر مخاطی) ۴- نسبت ارتفاع ویلی به عمق کریپت (تقسیم ارتفاع ویلی به عمق کریپت) می‌باشد.

استخراج RNA از بافت کبد و ناحیه ژژنوم روده باریک

به منظور تهیه نمونه بافت جهت استخراج RNA، در سن ۱۴ روزگی بافت‌های ناحیه ژژنوم روده باریک و کبد به اندازه ۰/۵سانتی متر جدا شدند. از هر تیمار ۴ پرنده به صورت تصادفی جدا شدند که ۲ پرنده از گروه چالش میکروبی و ۲ پرنده از گروه سالم بودند. سپس نمونه در میکروتیوب حاوی ۱/۵میلی لیتر RNA Shield شرکت دنازیست قرار گرفت و پس از ۲ ساعت در یخچال و سپس در فریز۷۰- نگهداری شد. برای استخراج RNA از بافت های نامبرده از کیت استخراج RNA شرکت پارس توس (مشهد- ایران) استفاده شد. سنتز cDNA از RNA استخراج شده از بافت های مورد نیاز طبق پروتکل کیت شرکت پارس توس انجام گرفت. همچنین توالی های مربوط به آغازگر ژن‌های PepT1، PepT2، LEAP2 و ژن مرجع GAPDH توسط شرکت پیشگام بایوتک سنتز شد (جدول۲).

1- Pancosma LTD, Geneva, Switzerland

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- اجزای تشکیل دهنده جیره پایه جوجه های گوشتی در طی دوره‌های آغازین، رشد و پایانی (درصد)

Table 1- Composition of basal diet of broiler chickens at starter, grower and finisher phase (%)

اجزای خوراک Ingredients	۱۰-۰ روزگی 1-10 days of age	۲۴-۱۱ روزگی 11-24 days of age	۴۱-۲۵ روزگی 25-41 days of age
ذرت Corn	50.47	56.02	59.63
کنجاله سویا (پروتئین خام۴۴٪) Soybean Meal (44% CP)	39.15	34.77	30.67
روغن سویا Soybean Oil	5.43	5.0	5.87
دی کلسیم فسفات Di-calcium Phosphate	2.08	1.77	1.67
کلسیم کربنات Calcium Carbonate	1.33	0.99	0.97
مکمل معدنی Mineral Premix	0.25	0.25	0.25
مکمل ویتامین Vitamin Premix	0.25	0.25	0.25
نمک طعام Salt	0.37	0.35	0.37
دی – ال – متیونین DL-Methionine	0.37	0.34	0.23
ال- لیزین هیدروکلراید L-Lysine Hydrochloride	0.3	0.26	0.09
ترکیب شیمیایی Chemical composition			
انرژی قابل متابولیسم Metabolizable energy (Kcal/kg)	3000	3100	3200
پروتئین خام CP (%)	22.0	20.49	18.78
کلسیم Ca (%)	1.05	0.88	0.81
فسفر قابل دسترس Available Phpsphorus (%)	0.5	0.44	0.41
آرژنین Arginine (%)	1.52	1.37	1.26
ترئونین Threonine (%)	0.97	0.88	0.81
لیزین Lysine (%)	1.40	1.27	1.05
متیونین Methionine	0.68	0.63	0.50
متیونین+ سیستین Methionine + Cystine (%)	1.05	0.98	0.83

هر کیلوگرم مکمل ویتامینه شامل: ۱۱۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۸۰۰واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۸۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۵ میلی‌گرم ویتامین K3، ۳ میلی‌گرم تیامین، ۸/۵ میلی‌گرم ریبوفلاوین، ۱۷ میلی‌گرم پنتوتونات، ۵۵ میلی‌گرم نیاسین، ۴/۳ میلی‌گرم پیردوکسین، ۱/۹ میلی‌گرم اسید فولیک، ۰/۰۱۷ میلی‌گرم ویتامین B12، ۰/۲۵ میلی‌گرم بیوتین، ۱۶۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید، و هرکیلوگرم مکمل معدنی شامل: ۱۲۰ میلی‌گرم منگنز، ۱۱۰ میلی‌گرم روی، ۲۰ میلی‌گرم آهن، ۱۶میلی‌گرم مس، ۳۰ میلی‌گرم سلنیم و ۲۰ میلی‌گرم ید.

Each kilogram vitamin supplement contains: 11000 IU Vitamin A, 1800 IU Vitamin D3, 80 IU Vitamin E, 5 mg Vitamin K3 / 3 mg Thiamine, 8.5 mg Riboflavin, 17 mg Pentotonate, 55 mg Niacin, 4.3 mg pyridoxine, 1.90 mg folic acid, 0.017 mg of vitamin B12, 0.25 mg of biotin, 1600 mg of choline chlorid, and one kilogram of mineral supplement containing: 120 mg manganese, 110 mg of zinc, 20 mg Iron, 16 mg of copper, 30 mg of selenium and 20 mg of iodine.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- توالی آغازگرهای اختصاصی ژنهای مطالعه شده در این تحقیق
Table 2- Specific gene primers used in the study

ژن Gene	دمای اتصال At (°C)	شماره دسترسی NCBI accession number	آغازگر های رفت و برگشت Forward and reverse primers, 5' → 3'
PepT1	57 °C	NM_204365.1	5-AAAGTTTAAGACCATTGTCTCCCT-3 5-ATGTGCACCGCAATATTATCAG-3
PepT2	57 °C	NM_001319028.1	5-TATTCTCAGTCTCCAGCCAGC-3 5-GCAGCCTGGGCAACAACA-3
LEAP2	59 °C	NM_001001606.1	5-TTCCCTGCACCAACCACAG-3 5-CGGTTCTTCCTGCATAGCATT-3
GAPDH	57 °C	NC_006088.5	5-TGTTTCCTGGTATGACAATGAGTT-3

تعیین کمیت نسبی بیان ژن های PepT1، PepT2، LEAP2 به روش Real Time-PCR

واکنش Real time PCR با استفاده از کیت پارس توس انجام شد. محلول واکنش بر اساس دستورالعمل کیت و کیفیت cDNA در حجم ۱۵ میکرولیتر ساخته شد. اجزای واکنش شامل ۰/۴ میکرولیتر آغازگر های رفت و برگشت، ۲/۸ میکرولیتر آب مقطر، ۰/۳ میکرولیتر Rox dye و ۷/۵ میکرولیتر SYBR بود که به هر کدام از میکروتیوپ های مخصوص Real Time-PCR ریخته شد و در پایان ۴ میکرولیتر cDNA به هر تیوب اضافه گردید. هرنمونه cDNA بر اساس استاندارد مایکی با دوتکرار انجام شد (۵). از رقت های یک هشتم، یک چهارم، یک دوم و یک cDNA ها و هر کدام با سه تکرار جهت محاسبه راندمان واکنش و رسم منحنی استاندارد استفاده شد. برنامه PCR مطابق با جدول ۳ در ۴۵ سیکل با دستگاه ABI 7300 انجام گرفت و برای تعیین اختصاصی بودن تکثیر، آنالیز منحنی ذوب محصولات PCR بعد از آخرین سیکل در هر تکثیر انجام شد. از کنترل منفی (نمونه بدون cDNA) جهت نشان دادن عدم وجود آلودگی استفاده شد. از ژن GAPDH به عنوان رفرنس استفاده گردید و بیان تیمارها نسبت به تیمار شاهد سالم با استفاده از فرمول $^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ۲ محاسبه شدند.

جدول۳- برنامه مورد استفاده در Real Time PCR
Table3- The program used in Real Time PCR

مراحل انجام واکنش Steps of reaction	تعداد سیکل Number of cycles	دما (درجه سانتی گراد) Temperature (°C)	زمان time
تجزیه اولیه Initial denaturation	1	95	5 min
تجزیه Denaturation	45	95	45 min
اتصال Annealing	45	57	30 min
توسعه Extension	45	72	30 min
توسعه نهایی Final extension	1	72	5 min

دمای اتصال برای ژن LEAP2، ۵۹ درجه و برای سایر ژن ها ۵۷ درجه بود.
The annealing temperature of LEAP2 gene was 59 and other temperatures were 57°C.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های طرح تا ۷ روزگی که چالش میکروبی ندارند بصورت طرح کاملا تصادفی و بعد از چالش میکروبی از روش فاکتوریل ۴×۲ با دو فاکتور چالش و بدون چالش با سطوح مکمل های مختلف با استفاده از طرح کاملا تصادفی آنالیز شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 (SAS Institute, 2008) با رویه GLM (۲۹) و مقایسات میانگین داده ها با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵ درصد انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

نتایج مربوط به اندازه گیری افزایش وزن روزانه، ضریب تبدیل خوراک و مصرف خوراک در جدول ۴ و ۵ نشان داده شده است. اثر متقابل اعمال چالش و مصرف مکمل بر میانگین افزایش وزن روزانه در دوره ۱۱تا ۲۴ روزگی نشان داد که جوجه هایی که مصرف پروبیوتیک داشتند در شرایط چالش تفاوت آماری معنی داری با گروه شاهد سالم در افزایش وزن روزانه نداشتند، اما میانگین افزایش وزن در تیمارهای دریافت‌کننده مکمل گیاهی نسبت به جوجه های تیمار شاهد سالم کاهش نشان داد (P <۰/۰۵). در بررسی اثر متقابل در تیمارها در هر دوره تغییری در میزان مصرف خوراک در تیمارها مشاهده نشد. مصرف خوراک تحت تاثیر نوع مکمل قرار گرفت (P <۰/۰۵) بطوریکه استفاده از مکمل پروبیوتیکی در دوره ۱۱ تا ۲۴ روزگی باعث افزایش معنی داری در میزان مصرف خوراک شد که این میزان مشابه گروه کنترل بود (جدول ۵). اما مکمل گیاهی نسبت به سایر تیمار ها سبب کاهش مصرف خوراک روزانه در ۱۱ تا ۲۴ روزگی گردید. در بررسی اثر متقابل اعمال چالش و مصرف مکمل بر وزن بدن، گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک در دوره ۱۱ تا ۲۴ روزگی وزن بدن بیشتری داشت (P <۰/۰۵) و در تیمارهای دریافت‌کننده آنتی‌بیوتیک وزن بدن نسبت به تیمار پروبیوتیک کاهش معنی دار نشان داد (P <۰/۰۵). در بررسی اثرات اصلی مکمل و اثر چالش در تمام سنین مورد اندازه‌گیری، تاثیری بر وزن بدن مشاهده نشد.

مصرف پروبیوتیک و مکمل گیاهی در شرایط درگیری با عامل باکتریایی موجب شد تا افزایش وزن و همچنین وزن بدن جوجه‌ها تفاوتی با شاهد سالم در دوره درگیری (۱۱-۲۴ روزگی) نداشته باشند. این عکس‌العمل نشان می‌دهد که پروبیوتیک و مکمل گیاهی X-Tract بخوبی توانسته تا در شرایط درگیری منبع بیماری را مهار نماید بطوریکه این دو مکمل عملکردی نزدیک به آنتی بیوتیک داشتند. در مطالعات متعددی که اثر مکمل‌های گیاهی را بر عملکرد جوجه های گوشتی بررسی کرده‌اند، نشان داده شده که مصرف دارچین (۳۱)، فلفل سیاه (۸) و آویشن(۲۷) بطور جداگانه باعث بهبود افزایش وزن در جوجه های گوشتی می‌شود بطوریکه وزن بدنی مشابه با تیمار آنتی‌بیوتیک ایجاد کردند. در مطالعات فوق الذکر مصرف این مکمل های گیاهی موجب بهبود شاخص های عملکردی مانند ضریب تبدیل و کاهش مصرف خوراک گردید که در مورد دو شاخص اخیر در مطالعه حاضر تفاوتی بین تیمار مکمل گیاهی و سایر تیمار ها مشاهده نشد ولی در گروه سالم، مصرف خوراک و ضریب تبدیل غذایی در تیمار مکمل گیاهی کمتر از سایر تیمار ها بود که نتیجه ای مطابق با نتایج سایر محققان بود (۸، ۲۷، ۳۱). پژوهش های متعددی اثر مکمل های ضد میکروبی به خصوص پروبیوتیک ها را مورد بررسی قرار داده اند. در اکثر آنها افزایش وزن روزانه، افزایش مصرف خوراک و بهبود قابلیت هضم تایید گردید (۱۲، ۳۳، ۳۵). البته این تاثیرات به نوع سویه های استفاده شده در مکمل پروبیوتیکی ارتباط دارد بطوریکه موری و همکاران نشان داد استفاده از پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس، در ۲۴ تا ۴۲ روزگی مصرف خوراک را نسبت به گروه شاهد کاهش می‌دهد (۲۰). در مطالعه ای نشان داده شد که استفاده از سین‌بیوتیک و یا اسیدی‌فایر توانسته تا عملکرد مرغهای گوشتی را در شرایط درگیری با عفونت ایکولای بهبود بخشد (۲). این در حالی است که توانایی مهار پاتوژن ایکولای توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم* و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* که در این مطالعه استفاده شده، روشن شده است (۱۷، ۲۱).

فراسنجه‌های بافت شناسی

نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که استفاده از مکمل پروبیوتیکی سبب افزایش معنی‌داری در ارتفاع ویلی نسبت به تیمارهای دریافت‌کننده مکمل گیاهی، آنتی‌بیوتیک و کنترل گردید. همچنین ارتفاع ویلی در پرنده های مصرف کننده مکمل گیاهی و آنتی‌بیوتیک بالاتر از گروه شاهد بود (P< ۰/۰۵). استفاده از مکمل های ضد میکروبی تأثیر معنی‌داری بر میزان عرض ویلی در تیمارهای آزمایشی در مقابل گروه شاهد نداشت. کاهش معنی‌داری در میزان عمق کریپت در تیمار دریافت‌کننده مکمل گیاهی درمقایسه با تیمار پروبیوتیک مشاهده شد (P< ۰/۰۵). در مطالعه‌ای که اثر پروبیوتیک و آنتی‌بیوتیک و اسید آلی بر عملکرد و مورفولوژی روده مورد بررسی قرار گرفت مشخص شد که چند گونه از پروبیوتیک مورد استفاده سبب افزایش ارتفاع پرز در ژژنوم و ایلئوم نسبت به شاهد در ۲۱ و ۴۲ روزگی گردید(۱۱).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤- تاثیر مکمل گیاهی، پروبیوتیک و آنتی بیوتیک در شرایط چالش و بدون چالش میکروبی بر افزایش وزن، و ضریب تبدیل خوراک، مصرف خوراک و وزن بدن جوجه های گوشتی

Table 4- Influence of herbal supplement, probiotic and antibiotic on gain, feed conversation, feed intake and body weight of broiler chickens in microbial challenge and safe condition.

	safe سالم				Challengدرگیر					
سن Age	کنترل Control	آنتی‌بیوتیک Antibiotic	مکمل گیاهی Herbal Supplement	پروبیوتیک Probiotic	کنترل Control	آنتی‌بیوتیک Antibiotic	مکمل گیاهی Herbal Supplement	پروبیوتیک Probiotic	MSE	سطح احتمال probability level
افزایش وزن(گرم) Weight gain (g)										
1-10	16.61	17.21	17.41	16.17	16.49	16.04	16.50	16.13	0.6963	0.80
11-24	79.35 a	71.54 abc	67.80 c	70.57 bc	72.62 abc	69.66 bc	71.07 abc	76.81 ab	2.581	0.03
25-42	64.50	72.33	69.43	68.82	69.52	67.17	67.74	74.06	4.802	0.63
ضریب تبدیل Feed conversion ratio										
1-10	1.14	1.07	1.10	1.18	1.11	1.14	1.20	1.13	0.040	0.19
11-24	1.17	1.17	1.13	1.20	1.22	1.19	1.13	1.19	0.040	0.86
25-42	1.72	1.61	1.67	1.70	1.61	1.73	1.67	1.59	0.046	0.06
مصرف خوراک(گرم) Feed intake (g)										
1-10	18.81	18.36	19.32	19.10	18.33	18.27	19.89	18.25	0.827	0.85
11-24	94.22	86.22	79.57	84.61	89.40	85.91	80.94	93.93	3.537	0.26
25-42	110.76	115.89	115.16	116.45	111.45	116.74	112.22	117.66	5.574	0.98
وزن بدن (گرم) Body weight (g)										
10	201.30	207.76	209.54	196.60	199.90	196.95	200.70	196.50	6.860	0.82
24	1098.02 ab	1048.98 ab	1025.14 ab	1003.27 ab	1009.04 ab	991.66 b	1057.46 ab	1101.39 a	32.761	0.02
42	2456.00	2574.09	2567.00	2452.01	2456.33	2386.28	2516.10	2665.65	122.50	0.43

a-b اعداد با حروف غیر مشترک در هر ردیف تفاوت معنی دار دارند

میانگین خطای استاندارد،SEM

a-b the numbers with non-common letter in the row indicates significant different.

SEM: standard error mean

پروبیوتیک ها با تأثیر بر بافت روده از جمله افزایش طول پرزها، کاهش ضخامت اپیتلیوم روده و کاهش بازچرخ سلولی در اپیتلیوم روده (۳، ۱۹) تحریک سیستم ایمنی و افزایش ترشح آنزیم های هضمی از معده و پانکراس وموکوس روده (۱۴)، عمل هضم و جذب مواد مغذی را بهبود می بخشند. با این وجود، عملکرد سودمند محافظتی پروبیوتیک ها ممکن است برای میزبان، هزینه ی نگهداری و تغذیه‌ای داشته باشد. به نظر می رسد تحریک تکثیر سلول‌های اپیتلیومی روده، به یکی از مکانیسم های عمل پروبیوتیک های حاوی لاکتوباسیل ها مربوط باشد. زیرا این پروبیوتیک ها با افزایش سطوح اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، تکثیر سلول های اپیتلیوم روده ای را تحریک می کنند (۲۸). تأثیر مثبت پروبیوتیک ها در افزایش ارتفاع پرزهای روده و فعال شدن عملکرد ویلی ها در جوجه های دریافت‌کننده جیره های مکمل شده با پروبیوتیک، در مطالعات محققین مختلف نشان داده شده است (۵، ۱۱، ۲۶) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. بنابراین، ارتفاع زیادتر ویلی‌ها شاخصی از عملکرد فعال آنها است (۳۰) و به موازات افزایش ارتفاع ویلی، عملکرد هضم و جذب مواد مغذی نیزبه دلیل افزایش مساحت سطح جذب، بیان آنزیم های پرز مسواکی و سیستم های حمل و نقل مواد مغذی، افزایش می یابد (۳۳).

تاثیر عصاره گیاهی بر افزایش طول ویلی نیز توسط بخوبی شناخته شده است. در مطالعه‌ای نشان داده شد که استفاده از مخلوط روغنهای ضروری چند گونه گیاهی (بادیان، پوست مرکبات و پونه) از

www.SID.ir

Archive of SID

کاهش ارتفاع ویلی در حین مقابله با عامل کوکسیدیوز جلوگیری کرده است (۲۵). اگرچه در شرایط سلامت حیوان نیز استفاده از مخلوط گیاهان ادویه‌ای و دارویی توانست رشد ویلی‌های روده را نسبت به شاهد افزایش دهد که با نتیجه این مطالعه مطابقت داشت (۱).

جدول ۵- اثرات اصلی مکمل های ضد میکروبی یا چالش میکروبی بر افزایش وزن، ضریب تبدیل خوراک، مصرف خوراک و وزن بدن جوجه های گوشتی.

Table 5- The main effect of antimicrobial supplements on gain, feed conversation, feed intake and body weight of broiler chickens

	اثر مکمل Supplements effect						اثر چالش میکروبی challenge effect			
سن Age	کنترل Control	آنتی‌بیوتیک Antibiotic	مکمل گیاهی Herbal Supplement	پروبیوتیک Probiotic	MSE	سطح احتمال probability level	سالم	درگیر Challenge	MSE	سطح احتمال probability level
افزایش وزن(گرم) Weight gain (g)										
1-10	16.55	16.63	16.95	16.15	0.492	0.71	16.85	16.29	0.348	0.26
11-24	75.15	70.60	69.62	72.91	1.825	0.07	72.21	71.77	1.290	0.98
25-42	67.01	68.58	71.44	67.01	3.395	0.82	68.77	69.62	2.401	0.80
ضریب تبدیل Feed conversion ratio										
1-10	1.12	1.10	1.15	1.15	0.028	0.57	1.12	1.14	0.02	0.41
11-24	1.20	1.18	1.13	1.19	0.028	0.34	1.17	1.18	0.020	0.50
25-42	1.67	1.68	1.67	1.65	0.033	0.94	1.67	1.65	0.023	0.48
مصرف خوراک(گرم) Feed intake (g)										
1-10	18.57	18.31	19.60	18.67	0.585	0.43	18.90	18.68	0.413	0.72
11-24	91.81[a]	86.07[ab]	80.26[b]	89.27[a]	2.501	0.016	86.15	87.55	1.768	0.58
25-42	111.11	116.31	113.69	117.05	3.941	0.70	114.56	114.52	2.787	.990
وزن بدن(گرم) Body weight (g)										
10	200.60	202.35	205.12	196.55	4.850	0.65	203.80	198.51	3.430	0.28
24	1053.53	1020.32	1041.30	1052.33	23.166	0.72	1043.85	1039.39	16.380	0.86
42	2448.16	2480.19	2541.55	2558.83	86.624	0.78	2508.27	2506.09	61.252	0.98

a-b اعداد با حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی دار دارند

SEM میانگین خطای استاندارد،

a-b the numbers with non-common letter in the row indicates significant different.
SEM: standard error mean

جدول ٦- تأثیر مکمل های ضدمیکروبی بر مؤلفه‌های بافت‌شناسی روده در ناحیه ژژنوم جوجه های گوشتی در ۲۱ روزگی

Table 6-The effect of antimicrobial supplements on histological components of intestine in gegenum region of broiler chickens in 21 days of age

	کنترل control	آنتی‌بیوتیک antibiotic	مکمل گیاهی Herbal supplement	پروبیوتیک probiotic	MSE	سطح احتمال probability level
ارتفاع ویلی villi Height(Mm)	425.75[c]	542.00[b]	554.00[b]	711.63[a]	19.36	0.0001
عرض ویلی villi width(Mm)	124.75	158.5	187.00	136.75	17.86	0.12
عمق کریپت crypt depth	130.25[ab]	119.00[ab]	101.25[b]	143.00[a]	8.67	0.03
ارتفاع ویلی/کریپت Villi Heights / Crypt	3.41[b]	4.65[ab]	5.46[a]	4.97[a]	0.33	0.005

a-b اعداد با حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی دار دارند

SEM میانگین خطای استاندارد،

a-b the numbers with non-common letter in the column indicates significant different.
SEM: standard error mean

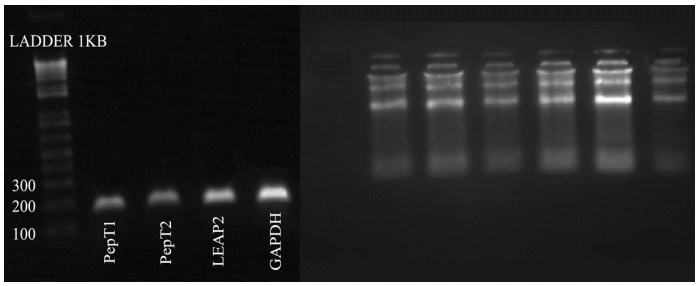
www.SID.ir

Archive of SID

در مطالعه حاضر افزایش ارتفاع ویلی در شرایط استفاده از مکمل گیاهی با کاهش عمق کریپت همراه بود که با تیمار حاوی پروبیوتیک تفاوت معنی دار داشت و این کاهش عمق کریپت در افـزایش ارتفـاع ویلی به عمق کریپت انعکاس پیدا کرده و موجب افزایش این نسـبت در تیمار های حاوی مکمل گیاهی و پروبیوتیک شـد. ایـن نتـایج بـا گزارشات عامد و همکاران (۲۰۱۳) که نشان دادند افزایش ارتفاع ویلی با کاهش عمق کریپت همراه است مطابق است.

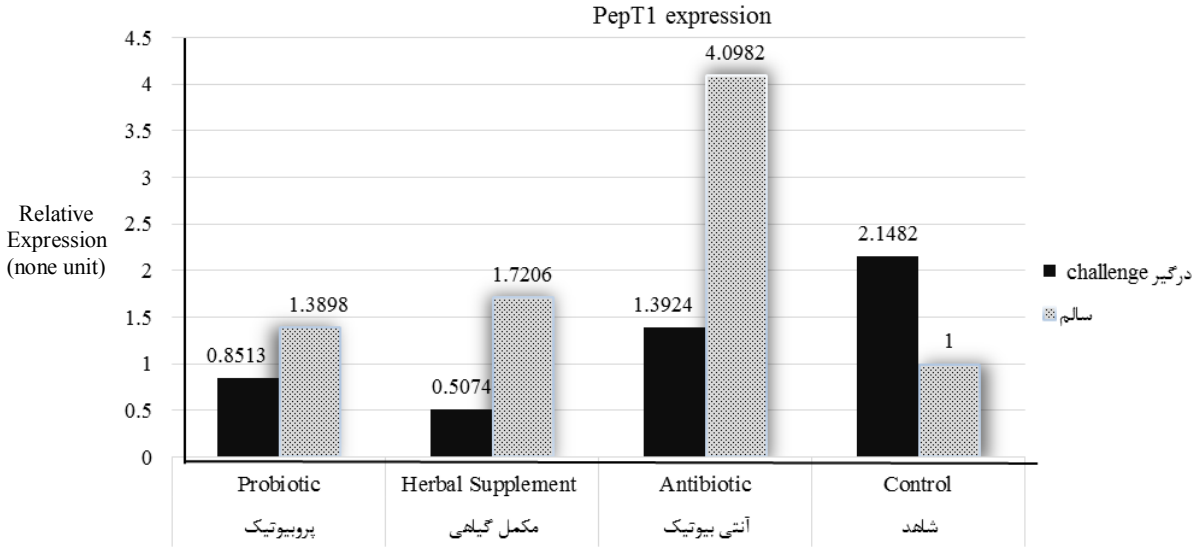
بیان ژن‌های LEAP2, PepT1, PepT2

در شـکل ۱ کیفیـت RNA اسـتخراج شـده بـرای سـاخت cDNA(شکل راست) و محصول حاصل از pcr (شکل چپ) cDNA تهیه شده در ژل الکتروفورز مشخص شده‌اند. در پرندگان سالم میزان بیان ژن PepT1 در تیمارهای دریافت کننده مکمل نسبت به شاهد بیشتر بود. با آلوده شدن پرندگان با ایکولای، در گروه دریافت کننده پروبیوتیک و مکمل گیاهی میزان بیان ژن PepT1 نسبت بـه گـروه شاهد سالم کاهش یافت، ولی میزان بیـان در تیمـار آنتـی بیوتیـک همچنان بالاتر از شاهد سالم بود هرچند نسبت به گروه سالم مصرف کننده آنتی بیوتیک کاهش چشمگیری نشان داد(شکل ۲). در حالیکه در گروه شاهد، ایجاد چالش میکروبـی بیـان ایـن ژن را افـزایش داد (شاهد آلوده) که نشان می دهد مکمل های ضـد میکروبـی اسـتفاده شده در این مطالعه اثر کاهنده ای در بیان ژن PepT1 در زمان مقابله میکروبی در حیوان ایجاد کرده است.



شکل ۱ – RNA استخراج شده از بافتهای کبد و ژژنوم (راست) و محصول حاصل از pcr نمونه های cDNA (چپ)

Figure 1- The extracted RNA from liver and jejunum (right) and the PCR product from cDNA samples (left)

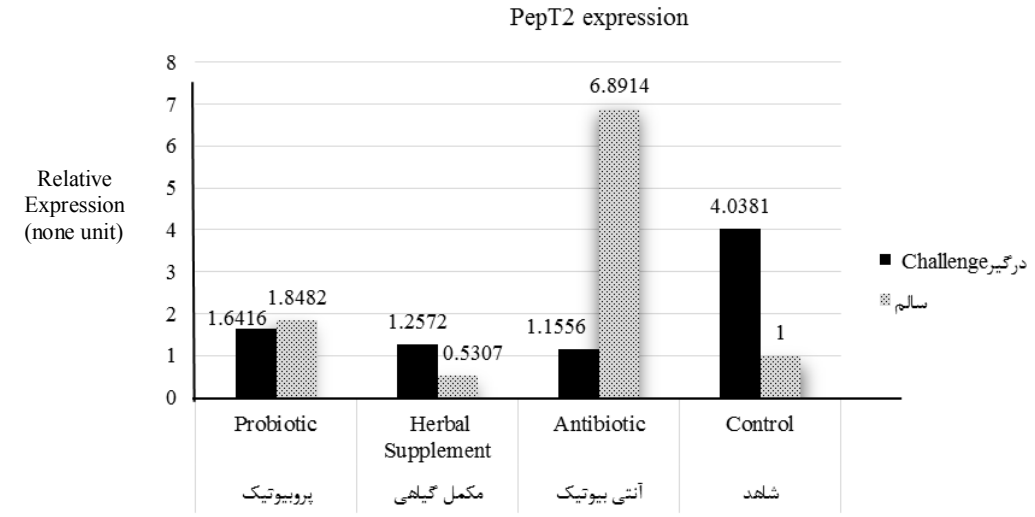


شکل ۲- اثر متقابل مکمل‌های ضد میکروبی و چالش میکروبی بر بیان ژن PepT1 در بافت ژژنوم روده جوجه های ۱۴ روزه

Figure 2- Interaction effects of the antimicrobial supplements and microbial challenge on PepT1 gene expression in jejenum tissue of 14 days old chicks

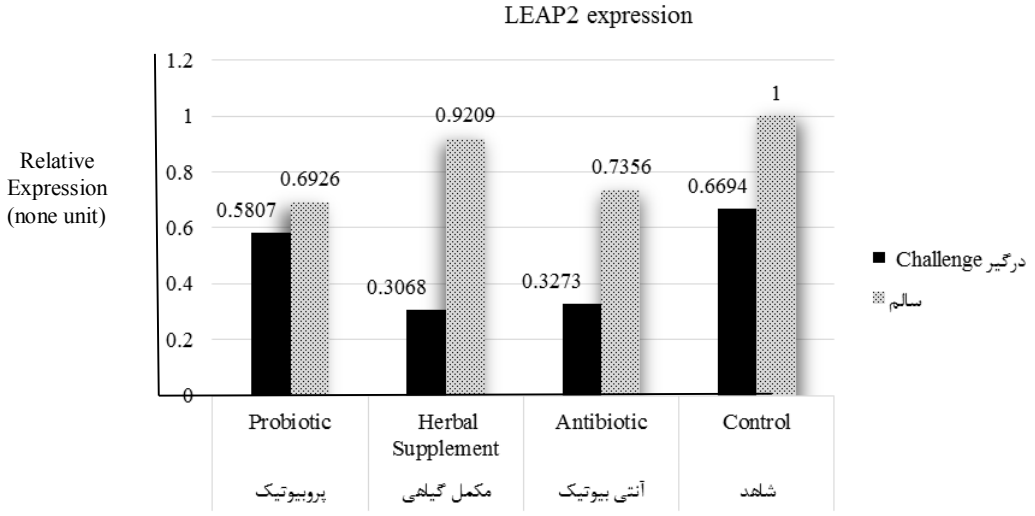
www.SID.ir

Archive of SID



شکل۳- اثر متقابل مکمل‌های ضد میکروبی و چالش میکروبی بر بیان ژن PepT2 در بافت ژژنوم روده جوجه های ۱۴ روزه

Figure 3- Interaction effects of the antimicrobial supplements and microbial challenge on PepT2 gene expression in jejenum tissue of 14 days old chicks



شکل ٤- اثر متقابل مکمل‌های ضد میکروبی و چالش میکروبی بر بیان ژن LEAP2 در بافت کبد جوجه های ۱۴ روزه

Figure 4- Interaction effects of the antimicrobial supplements and microbial challenge on LEAP2 gene expression in liver tissue of 14 days old chicks

عکس العمل مشابهی در ارتباط با بیان ژن PepT2 قابل مشاهده است و فقط مکمل گیاهی باعث تغییرات متفاوتی در مقایسه با تیمار آنتی بیوتیک و پروبیوتیک شد بطوریکه در شرایط چالش میکروبی مانند شاهد عمل کرده و بیان ژن PepT2 افزایش یافت (شکل ۳). در پرندگان سالم در تیمارهای دریافت‌کننده آنتی‌بیوتیک و پروبیوتیک بیان این ژن نسبت به شاهد افزایش داشته است. همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، در پرندگان سالم استفاده از مکمل ضد میکروبی باعث کاهش بیان Leap2 در کبد پرندگان

www.SID.ir

Archive of SID

نسبت به شرایط عدم استفاده از مکمل شد. ایجاد چالش باعث کاهش بیشتر بیان این ژن در کبد نسبت به شرایط سالم شد که البته میزان کاهش در تیمار مصرف کننده پروبیوتیک کمتر بوده است.

ایولیان و همکاران نشان دادند که استفاده از آنتی بیوتیک انروفلوکساسین یا پروبیوتیک لاکتوباسیلی در میزان بیان PepT1 موثر بود بطوریکه مصرف آنتی بیوتیک باعث افزایش بیان این ژن در مرغهای گوشتی سالم شد درحالیکه بر بیان LEAP2 در کبد و یا روده تاثیری نداشت (۲۳). بر این اساس پیشنهاد شد که استفاده از آنتی بیوتیک با توجه به محرک بودن رشد باعث افزایش تقاضای بیشتر برای جذب پروتئین میگردد و بیان حامل های پپتید نظیر PepT1 را افزایش می دهد. اما در شرایط چالش میکروبی با آیمریا یا سالمونلا بر خلاف مطالعه حاضر نشان داده شده است که بیان PepT1 در دئودنوم افزایش می یابد (۱۸، ۳۲) که این افزایش در نتیجه کاهش مصرف غذا ناشی از بیماری و واکنش روده برای افزایش جذب ماده مغذی است. نتایج این مطالعه در مورد LEAP2 منطبق با تحقیقات میلونوا و همکاران (۲۰۱۶) می باشد که نشان داد چالش مرغ گوشتی با ایمریا باعث کاهش بیان LEAP2 در کبد می شود. این پروتئین بخشی از سیستم ایمنی ذاتی می باشد و روشن شده است که بیان این پروتئین همبستگی منفی با شدت عفونت کوکسیدیوز داشته است (۶). ولی در چالش پرنده با سالمونلا بیان این ژن در کبد و روده افزایش یافته بود (۳۲). بر این اساس پیشنهاد می شود که احتمالا میزان بیان LEAP2 به نوع پاتوژن یا عامل بیماری بستگی دارد که تحقیقات بیشتری باید انجام شود. البته یادآوری می شود که LEAP2 پپتید ضدمیکروبی بیان شده در کبد است که پپتیدی کاتیونی و ساختاری منحصر به فرد دارد از جمله آن پیوند دی سولفیدی آن می‌باشد (پیوند دی‌سولفید در موقعیت ۱-۳ و ۲-۴ اسیدآمینه سیستین) و نقش بیولوژیکی آن کاملاً شناخته شده نیست؛ ولی نشان داده شده است که از نظر شیمیایی در مقابل چندین باکتری گرم مثبت فعالیت ضدمیکروبی داشته است.

نتیجه‌گیری کلی

در شرایط چالش میکروبی استفاده از مکمل پروبیوتیکی توانست تا افزایش وزن بدن برابر با تیمار شاهد سالم ایجاد نماید و به نظر می‌رسد نوع مکمل گیاهی تأثیری بر عملکرد حیوانات مورد آزمایش جز میزان مصرف خوراک نداشته است. بررسی نمونه‌های بافتی نشان می‌دهد که مکمل پروبیوتیکی می‌تواند ارتفاع و عمق کریپت‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. بررسی نتایج بیان ژن نشان داد که چالش در پرندگان دریافت کننده مکمل (گیاهی، آنتی بیوتیک و پروبیوتیک) موجب کاهش بیان PepT1 و LEAP2 گردید و این روند در مورد PepT2 نیز به غیر از گروه دریافت کننده مکمل گیاهی مشاهده شد. در مجموع استفاده از مکمل های ضد میکروبی در شرایط چالش باعث کاهش بیان ژنهای مورد مطالعه نسبت به شرایط سالم گردید. البته به غیر از تیمار شاهد، بطوریکه که چالش، باعث افزایش بیان ژنهای PepT1, PepT2نسبت به شرایط سالم شد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد و با گرنت شماره ۳/۴۴۲۳۵ انجام شد. همچنین از آقای دکتر امیر عطار به جهت حمایتهای ارزشمند ایشان قدردانی می‌شود.

منابع

1. Amad, A. A., K. Wendler, and J. Zentek. 2013. Effects of a phytogenic feed additive on growth performance, selected blood criteria and jejunal morphology in broiler chickens. Emirates Journal of Food and Agriculture, 25(7):549-554.
2. Ateya, A. I., N. Arafat, R. M. Saleh, H. M. Ghanem, D. Naguib, H. A. Radwan, and Y. Elseady. 2019. Intestinal gene expressions in broiler chickens infected with Escherichia coli and dietary supplemented with probiotic, acidifier and synbiotic. Veterinary Research Communications, 43(2):131-142.
3. Barton, M. D. 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human healt. Nutrition Research Reviews, 13(2):279-299.
4. Bravo, D., V. Pirgozliev, and S. P. Rose. 2014. A mixture of carvacrol, cinnamaldehyde, and capsicum oleoresin improves energy utilization and growth performance of broiler chickens fed maize-based diet. Journal of Animal Science, 92(4):1531-1536.

www.SID.ir

Archive of SID

5. Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele, and C. T. Wittwer. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry, 55(4):611-622.
6. Casterlow, S., H. Li, E. R. Gilbert, R. A. Dalloul, A. P. McElroy, D. A. Emmerson, and E. A. Wong. 2011. An antimicrobial peptide is downregulated in the small intestine of Eimeria maxima-infected chickens. Poultry Science, 90(6):1212-1219.
7. Chichlowski, M., J. Croom, B. McBride, G. Havenstein, and M. Koci. 2007. Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-fed-microbials on poultry: a brief review of current knowledge. International Journal of Poultry Science, 6(10):694-704.
8. El-Deek, A., M. Al-Harthi, M. Osman, F. Al-Jassas, and R. Nassar. 2012. Hot pepper (Capsicum Annum) as an alternative to oxytetracycline in broiler diets and effects on productive traits, meat quality, immunological responses and plasma lipids. European Poultry Science, 76:73-80.
9. Etmektedir, S. İ. İ. 2017. The Increase in LEAP-2 mRNA Suggests a Synergistic Probiotics-Doxycycline Interaction in Chickens. Turkish Journal of Immunology, 5(1):5-12.
10. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology 66(5):365-378.
11. Gunal, M., G. Yayli, O. Kaya, N. Karahan, and O. Sulak. 2006. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. International Journal of Poultry Science, 5(2):149-155.
12. He, C. L., B. D. Fu, H. Q. Shen, X. L. Jiang, C. S. Zhang, S. C. Wu, W. Zhu, and X. B. Wei. 2011. Xiang-qi-tang increases avian pathogenic Escherichia coli-induced survival rate and regulates serum levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 and soluble endothelial protein C receptor in chicken. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 34(3):379-382.
13. Hocquellet, A., B. Odaert, C. Cabanne, A. Noubhani, W. Dieryck, G. Joucla, C. Le Senechal, M. Milenkov, S. Chaignepain, J. M. Schmitter, S. Claverol, X. Santarelli, E. J. Dufourc, M. Bonneu, B. Garbay, and P. Costaglioli. 2010. Structure-activity relationship of human liver-expressed antimicrobial peptide 2. Peptides, 31(1):58-66.
14. Huang, R. L., Y. L. Yin, G. Y. Wu, Y. G. Zhang, T. J. Li, L. L. Li, M. X. Li, Z. R. Tang, J. Zhang, B. Wang, J. H. He, and X. Z. Nie. 2005. Effect of dietary oligochitosan supplementation on ileal digestibility of nutrients and performance in broilers. Poultry Science, 84(9):1383-1388.
15. Jin, L., Y. Ho, N. Abdullah, and S. Jalaudin. 1996. Influence of dried Bacillus substillis and lactobacilli cultures on intestinal microflora and performance in broilers. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 9(4):397-404.
16. Madsen, S. L. and E. A. Wong. 2011. Expression of the chicken peptide transporter 1 and the peroxisome proliferator-activated receptor alpha following feed restriction and subsequent refeeding. Poultry Science, 90(10):2295-2300.
17. Majidzadeh Heravi, R., H. Kermanshahi, M. Sankian, M. Nassiri, A. H. Moussavi, L. R. Nasiraii, and A. Varasteh. 2011. Screening of lactobacilli bacteria isolated from gastrointestinal tract of broiler chickens for their use as probiotic. African Journal of Microbiology Research, 5(14):1858-1868.
18. Milanova, A., R. Santos, L. Lashev, V. Koinarski, and J. Fink-Gremmels. 2016. Influence of experimentally induced Eimeria tenella infection on gene expression of some host response factors in chickens. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 19:47-56.
19. Miles, R. D., G. D. Butcher, P. R. Henry, and R. C. Littell. 2006. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. Poultry Science, 85(3):476-485.
20. Murry, A., A. Hinton, and R. Buhr. 2006. Effect of botanical probiotic containing lactobacilli on growth performance and populations of bacteria in the ceca, cloaca, and carcass rinse of broiler chickens. International Journal of Poultry Science, 5(4):344-350.
21. Palaniyandi, S. A., K. Damodharan, J.-W. Suh, and S. H. Yang. 2017. In vitro characterization of Lactobacillus plantarum strains with inhibitory activity on enteropathogens for use as potential animal probiotics. Indian journal of microbiology, 57(2):201-210.
22. Patterson, J. A. and K. M. Burkholder. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. Poultry Science, 82(4):627-631.
23. Pavlova, I., A. Milanova, S. Danova, and J. Fink-Gremmels. 2016. Enrofloxacin and Probiotic Lactobacilli Influence PepT1 and LEAP-2 mRNA Expression in Poultry. Probiotics Antimicrobial Proteins, 8(4):215-220.

www.SID.ir

Archive of SID

24. Pluske, J. R., M. J. Thompson, C. S. Atwood, P. H. Bird, I. H. Williams, and P. E. Hartmann. 1996. Maintenance of villus height and crypt depth, and enhancement of disaccharide digestion and monosaccharide absorption, in piglets fed on cows' whole milk after weaning. British Journal of Nutrition, 76(3):409-422.
25. Reisinger, N., T. Steiner, S. Nitsch, G. Schatzmayr, and T. Applegate. 2011. Effects of a blend of essential oils on broiler performance and intestinal morphology during coccidial vaccine exposure. Journal of Applied Poultry Research, 20(3):272-283.
26. Rubio-Aliaga, I. and H. Daniel. 2008. Peptide transporters and their roles in physiological processes and drug disposition. Xenobiotica, 38(7-8):1022-1042.
27. Saki, A., M. Kalantar, and V. Khoramabadi. 2014. Effects of drinking thyme essence (Thymus vulgaris L.) on growth performance, immune response and intestinal selected bacterial population in broiler chickens. Poultry Science Journal, 2(2):113-123.
28. Samli, H. E., N. Senkoylu, F. Koc, M. Kanter, and A. Agma. 2007. Effects of Enterococcus faecium and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota. Archives of Animal Nutrition, 61(1):42-49.
29. SAS Institute and 2008. SAS/STAT User's Guide: Statistics. Version 9.2 Edition. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
30. Shamoto, K. and K. Yamauchi. 2000. Recovery responses of chick intestinal villus morphology to different refeeding procedures. Poultry Science, 79(5):718-723.
31. Singh, J., A. Sethi, S. Sikka, M. Chatli, and P. Kumar. 2014. Effect of cinnamon (cinnamomum cassia) powder as a phytobiotic growth promoter in commercial broiler chickens. Animal Nutrition and Feed Technology, 14(3):471-479.
32. Townes, C. L., G. Michailidis, C. J. Nile, and J. Hall. 2004. Induction of cationic chicken liver-expressed antimicrobial peptide 2 in response to Salmonella enterica infection. Infection and Immunity, 72(12):6987-6993.
33. Tsirtsikos, P., K. Fegeros, C. Balaskas, A. Kominakis, and K. C. Mountzouris. 2012. Dietary probiotic inclusion level modulates intestinal mucin composition and mucosal morphology in broilers. Poultry Science, 91(8):1860-1868.
34. Watkins, B. A. and F. H. Kratzer. 1983. Effect of oral dosing of Lactobacillus strains on gut colonization and liver biotin in broiler chicks. Poultry Science, 62(10):2088-2094.
35. Yoon, C., C. Na, J. Park, S. Han, Y. Nam, and J. Kwon. 2004. Effect of feeding multiple probiotics on performance and fecal noxious gas emission in broiler chicks. Korean Journal of Poultry Science, 31(4):229-235.
36. Zhang, L., L. Zhang, X. Zhan, X. Zeng, L. Zhou, G. Cao, A. Chen, and C. Yang. 2016. Effects of dietary supplementation of probiotic, Clostridium butyricum, on growth performance, immune response, intestinal barrier function, and digestive enzyme activity in broiler chickens challenged with Escherichia coli K88. Journal of Animal Science and Biotechnology, 7:3.
37. Zwarycz, B. and E. A. Wong. 2013. Expression of the peptide transporters PepT1, PepT2, and PHT1 in the embryonic and post-hatch chick. Poultry Science, 92(5):1314-1321.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 12, No. 4, Winter 2021, p. 549-563

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹، ص. ۵۶۳-۵۴۹

Effect of Antimicrobial Supplementation on Expression of Pept1, PepT2 and LEAP2 Transcripts in Gastrointestinal Tract of Broiler Chickens

Sajjad Hassanzadeh[1], Reza Majidzadeh Heravi[2*] and Ali Javadmanesh[2]

Submitted: 15-03-2019
Accepted: 12-11-2019

Introduction Unlike antibiotics, probiotic shows not only positive effects on microbiota in digestive tract but also helps in digestion process. Probiotic affects the commensal and pathogen bacterial balance in intestine and make changes in benefit of useful bacteria. On the other hand, the biological activity of herbal essential oils is discovered since many years ago. Herbal essential oils were suggested as the newest growth promoter replaced with traditional growth promoters such as antibiotics in animal production. It was showed that the use of probiotic can impact the expression of peptide carriers in the cytoplasmic membrane cells. On the cell membrane, the carrier proteins transfer the peptides as tri or di-peptides into the cell. The potential of carrier proteins in material transfer and other remedy activity attracted the attentions to use them as drug precursors. Some carrier proteins that shows the main role in peptide transfer included: Pept1 (intestinal oligopeptide transporter), PepT2 (Renal oligopeptide transporter) and LEAP2 (Liver expressed antimicrobial peptide 2). This study conducted to determine the effect of using antimicrobial supplements on the transcription of intestinal peptide carriers, the performance of broiler chickens and the histological components of intestine in condition of *Escherichia coli* K99 contamination.

Materials and Methods The experiment was designed on 400 Ross 308 broiler chicks with 8 experimental treatments including 5 replications and 20 birds per replicate. At 7 days of age, 10 pieces of each broiler chickens were isolated and inoculated with 10^7 *Escherichia coli* K99 pathogenic bacteria in a 2-times with interval of 3 days. Following the inoculation, the treatments were divided into two groups: challenged with *Escherichia coli* K99 and no challenge. The treatments were: 1- Basal diet (control), 2- Basal diet and probiotics (*Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*, 10^9 cfu / kg) 3- Basal diet and herbal supplement with X-Tract (Pancosma LTD, Geneva, Switzerland) (a mixture of 2% thyme extract, 2% pepper and 5% cinnamon) 100 grams per ton in granular powder 4 - Basal diet and Oxytetracycline antibiotic 200-400 g per ton fed for 2 weeks. Body weight, feed intake, FCR and daily body weight gain was recorded at 10, 24 and 42 days. Chickens were slaughtered at 14 days and 21 days and jejunum and liver tissues sampled for gene expression and histomorphological evaluation respectively. Expression of PepT1and PepT2 in the jejunum and LEAP2 in the liver were measured and GAPDH was used as reference gene. Real time PCR reactions were done by ABI 7300 instrument. The chickens were brood based on Ross 308 manual (2014) and performance of birds include of body weight, average daily gain, feed intake and feed conversion ratio (FCR) were measured after end of each breeding period. The experiment was performed by completely random design in 8 treatments and analyzed by a 2*4 factorial method including challenge (2 levels) and supplement (4 levels) factors. The data was analyzed using SAS 9.2 with GLM procedure and the means compare by Tukey test.

Results and discussion The results of this study showed that the average daily gain in the probiotic group increased significantly in the challenge condition during the period of 11 to 24 days. In 25-42 period, the chickens were fed the diet contained probiotic showed the highest average daily gain although, there was no significant difference between the treatments in this period. In addition, the use of probiotic supplementation in challenge condition during the period of 11 to 24 days showed an increase in feed intake, which was similar to that of the control group in healthy group. The herbal supplement reduced daily intake in period of 11 to 24 days compared to other treatments. The use of probiotic in the feed under challenge induced a significant increase in the villi's height in jejunum. The supplementation of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus salivariuos* increased the width of villi on intestinal epithelium more than the other treatments. Depth of crypt of lieberkuhn was the least in the chickens feed by herbal supplement of X-tract. The expression levels of PepT1 and PepT2 transcripts in the intestinal tract and the LEAP2 transcript in the liver, it was shown that challenge in the chickens fed by supplements reduced the PepT1 expression whereas expression of this gene increased in control treatment. Similar interaction was observed in PepT2 expression except for chicken fed by herbal

1- Master of Science Graduated of Animal Physiology, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

2- Assistant professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(*- Corresponding Author Email: rmajidzadeh@um.ac.ir)

DOI:10.22067/ijasr.v12i4.75166

www.SID.ir

Archive of SID

supplement that showed an effect similar to control. Expression of LEAP2 reduced in all treatments under challenge with the *E .coli*, in comparison to healthy groups but reduction was minimum in the chickens fed by diet contained with probiotic.

Conclusion The results of this study suggested that the use of probiotic supplement can decrease the risk effects of microbial challenge and recovery period was probably shortened using probiotic in the diet.

Key words: Broiler chicken, Gene expression, Probiotic, PepT, LEAP2, X-Tract.

www.SID.ir