

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 جوادمش^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 کاملاً تصادفی انجام شد. در ۷ روزگی ۱۰ جوجه از هر تکرار جدا و با 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 سالیواریوس و لاکتوباسیلوس پلانناروم به میزان 10^9 cfu/kg) -۳ مکمل گیاهی با نام تجاری X-Tract (مخلوطی از عصاره آویشن ۲٪، فلفل ۲٪ و دارچین ۵٪ به میزان ۱۰۰ گرم در هر تن به صورت پودر گرانول)، ۴- آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین ۵۰٪ به میزان ۲۰۰-۴۰۰ 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 تیمارهای 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 پروبیوتیکی نسبت به سایر مکمل‌ها باعث افزایش وزن روزانه در پرنده‌ها شد اما این میزان از گروه کنترل کمتر بود. در گروه درگیر با باکتری ایکولای، پروبیوتیک در دوره ۱۱ تا ۲۴ 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 تیمارها 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 معنی داری در ارتفاع ویلی در ژنوم 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 می‌کند که استفاده از مکمل گیاهی و پروبیوتیک در زمان مقابله میکروبی می‌تواند از خطر ناشی از آلودگی با باکتری‌های پاتوژن بکاهد.

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

مقدمه

در بسیاری از کشورها پرورش صنعتی طیور یکی از مولد‌های 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

پروتئین‌های حامل در سطح غشای سلول انجام می‌گیرد. این پروتئین‌های حامل با توانایی انتقال خود و دیگر فعالیت‌های درمانی به عنوان پیش‌ساز داروها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. چند نوع پروتئین‌های حامل که در انتقال پپتیدها 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 عمدتاً در غشای پلاسمایی ناحیه راسی انتروسیت در روده کوچک است. بیان این حامل پروتئینی تحت تاثیر عوامل مختلف مانند ترکیب پروتئین خوراک، مکمل‌های آنزیمی، محدودیت غذایی، شرایط آسیب‌شناختی یا مصرف دارو است (۱۸). بطوریکه نشان داده شده که استفاده از مکمل‌های 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 پروتئینی $\text{PPR}\alpha$ 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 می‌باشد. ۷۰ درصد شباهت ژنی و ۵۰ درصد شباهت اسید آمینه‌ای 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 هج به تدریج از بیان آن کاسته می‌گردد ولی بیان ثابتی در روده بزرگ و سکوم‌ها از جنینی تا ۲ هفته بعد از هج برای آن گزارش شده است (۳۷). تاکنون مطالعاتی در ارتباط با تغییرات بیان این ژن در شرایط چنانچ و یا استفاده از مکمل‌های میکروبی گزارش نشده است. این حامل در کلیه، مغز و بافتهای دیگری چون سیستم عصبی دستگاه گوارش، ریه، غدد پستانی و طحال بیان می‌شود (۳۷). پپتید دیگری نیز در بافت کبد مشاهده شده است که با نام LEAP2 شناسایی گردید. نقش بیولوژیکی آن کاملاً شناخته شده نیست اما در مطالعات قبلی نشان داده شده است که از نظر شیمیایی در مقابل چندین باکتری گرم مثبت فعالیت ضد

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 آنتی‌بیوتیکها است که اثرات سوء جانبی از جمله صدمه به فلور میکروبی را بروز می‌دهد. به دنبال اثرات مضر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها دانشمندان دنبال 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). مکمل‌های پروبیوتیکی ممکن است دارای یک یا تعداد بیشتری سویه میکروارگانیزی باشند و می‌توانند به شکل پودر، قرص، گرانول و همراه آب یا غذا مصرف شوند (۳۴). مهم‌ترین مکانیسم بازدارنده پروبیوتیک‌ها در برابر بیماری‌ها شامل رقابت بر سر مواد مغذی، تولید سموم و ترکیباتی مانند باکتریوسین‌ها و رقابت بر سر مکان‌های اتصال در اپیتلیوم روده است (۲۲). همچنین نشان داده شده است که استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند بیان ژن حامل‌های 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 استاندارد از عصاره‌های گیاهی شامل Carvacrol 2%، Cinnamaldehyde 5% و $\text{Capsicum Oleoresin}$ 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 پرند گردیده و نهایتاً منجر به افزایش راندمان تولید و سودآوری اقتصادی می‌گردند (۴). انتقال پپتیدها به داخل سلول، به شکل دی و تری‌پپتید، توسط

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 بافت‌شناسی 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. شاخصه‌های 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 ۰/۵ سانتی‌متر 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 ۱/۵ میلی لیتر RNA Shield شرکت دنازیست قرار گرفت و پس از ۲ ساعت در یخچال و سپس در فریزر -۷۰ نگهداری شد. برای استخراج RNA از بافت‌های نامبرده از کیت استخراج RNA شرکت پارس توس (مشهد- ایران) استفاده شد. سنتز cDNA از RNA استخراج شده از بافت‌های مورد نیاز طبق پروتکل کیت شرکت پارس توس انجام گرفت. همچنین توالی‌های مربوط به آغازگر ژن‌های LEAP2, PepT2, PepT1 و ژن مرجع GAPDH توسط شرکت پیشگام بایوتک سنتز شد (جدول ۲).

میکروبی دارد (۱۳). هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر 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 جوجه‌ها 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 ۹۹k 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 سوبه لاکتوباسیلیوس پلاننتاروم و لاکتوباسیلوس سالیواریوس) به میزان 10^9 cfu/kg ۳- جیره پایه حاوی مکمل عصاره گیاهی با نام تجاری X-TRACT[®] (مخلوطی از عصاره آویشن ۲٪، فلفل ۲٪ و دارچین ۵٪) 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 آنتی‌بیوتیک 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 (۱۱ تا ۲۴ روزگی) و دوره پایانی (۲۵ تا ۴۲ روزگی) تهیه شد (جدول ۱).

صفات عملکردی

در روز 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 جوجه‌های هر واحد و خوراک باقی مانده جهت محاسبه افزایش وزن روزانه، مصرف خوراک

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	۰-۱۰ روزگی 1-10 days of age	۱۱-۲۴ روزگی 11-24 days of age	۲۵-۴۱ روزگی 25-41 days of age
ذرت Corn	50.47	56.02	59.63
کنجاله سویا (پروتئین خام ۴۴٪) 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 Phosphorus (%)	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، ۱۸۰۰ واحد 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 پیریدوکسین، ۱/۹ میلی‌گرم اسید فولیک، ۰/۱۷ میلی‌گرم ویتامین B12، ۰/۲۵ میلی‌گرم بیوتین، ۱۶۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید، و هر کیلوگرم مکمل معدنی شامل: ۱۲۰ میلی‌گرم منگنز، ۱۱۰ میلی‌گرم روی، ۲۰ میلی‌گرم آهن، ۱۶ میلی‌گرم 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 Pentotenate, 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.

جدول ۲- توالی آغازگرهای اختصاصی ژنهای مطالعه شده در این تحقیق

Table 2- Specific gene primers used in the study

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

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 $(\Delta\Delta C_t)^{-1}$ محاسبه شدند.

تعیین کمیت نسبی بیان ژن های LEAP2, PepT2, PepT1

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 تیوپ اضافه گردید. هر نمونه cDNA بر اساس استاندارد مایکی با دوتکرار انجام شد (۵). از رقت های یک

جدول ۳- 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.

استفاده از طرح کاملاً تصادفی آنالیز شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 (SAS Institute, 2008) با رویه GLM (۲۹) و مقایسات میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵ درصد انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های طرح تا ۷ روزگی که چالش میکروبی ندارند بصورت طرح کاملاً تصادفی و بعد از چالش میکروبی از روش فاکتوریل ۲×۴ با دو فاکتور چالش و بدون چالش با سطوح مکمل‌های مختلف با

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 ۱۱ تا ۲۴ روزگی نشان داد که جوجه‌هایی 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 جوجه‌های تیمار شاهد سالم کاهش نشان داد ($P < 0/05$). در بررسی اثر متقابل در تیمارها در هر دوره تغییر در میزان مصرف خوراک در تیمارها مشاهده نشد. مصرف خوراک تحت تاثیر نوع مکمل قرار گرفت ($P < 0/05$) 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 تیمارها 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 ($P < 0/05$) و در تیمارهای دریافت‌کننده آنتی‌بیوتیک وزن بدن نسبت به تیمار پروبیوتیک کاهش معنی دار نشان داد ($P < 0/05$). در بررسی اثرات اصلی مکمل و اثر چالش در تمام سنین مورد اندازه‌گیری، تاثیر 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 آنتی‌بیوتیک داشتند. در مطالعات متعددی که اثر مکمل‌های گیاهی را بر عملکرد جوجه‌های گوشتی بررسی کرده‌اند، نشان داده شده که مصرف دارچین (۳۱)، فلفل سیاه (۸) و آویشن (۲۷) بطور جداگانه باعث بهبود افزایش وزن در جوجه‌های گوشتی می‌شود بطوریکه وزن بدنی مشابه با تیمار آنتی‌بیوتیک ایجاد کردند. در مطالعات فوق‌الذکر مصرف این مکمل‌های گیاهی موجب بهبود شاخص‌های 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 تیمارها مشاهده نشد ولی در گروه سالم، مصرف خوراک و ضریب تبدیل غذایی در تیمار مکمل گیاهی کمتر از سایر تیمارها بود که نتیجه‌ای مطابق با نتایج سایر محققان بود (۸، ۲۷، ۳۱). پژوهش‌های متعددی اثر مکمل‌های ضد میکروبی به خصوص پروبیوتیک‌ها را مورد بررسی قرار داده‌اند. در اکثر آنها افزایش وزن روزانه، افزایش مصرف خوراک و بهبود قابلیت هضم تایید گردید (۱۲، ۳۳، ۳۵). البته این تاثیرات به نوع سویه‌های 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 مطالعه‌ای 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 پالاتاریوم 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 پرندگی مصرف‌کننده مکمل گیاهی و آنتی‌بیوتیک بالاتر از گروه شاهد بود ($P < 0/05$). استفاده از مکمل‌های 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 در مقایسه با تیمار پروبیوتیک مشاهده شد ($P < 0/05$). 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).

جدول ۴- تأثیر 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 conversion, feed intake and body weight of broiler chickens in microbial challenge and safe condition.

سن Age	safe سالم				Challeng درگیر				MSE	سطح احتمال probability level
	کنترل Control	آنتی بیوتیک Antibiotic c	مکمل گیاهی Herbal Supplemen t	پروبیوتیک Probiotic	کنترل Control	آنتی بیوتیک Antibiotic	مکمل گیاهی Herbal Supplemen t	پروبیوتیک Probiotic		
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
SEM: میانگین خطای استاندارد

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

پرزهای روده و فعال شدن عملکرد ویلی ها در جوجه های دریافت کننده 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 ویلی ها شاخصی از عملکرد فعال آنها است (۳۰) و به موازات افزایش ارتفاع ویلی، عملکرد هضم و جذب مواد مغذی نیز به دلیل افزایش مساحت سطح جذب، بیان آنزیم های پرز مسواکی و سیستم های حمل و نقل مواد مغذی، افزایش می یابد (۳۳).

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

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 و موکوس روده (۱۴)، عمل هضم و جذب مواد مغذی را بهبود می بخشد. با این وجود، عملکرد سودمند محافظتی پروبیوتیک ها ممکن است برای میزبان، هزینه ی نگهداری و تغذیه ای داشته باشد. به نظر می رسد تحریک تکثیر سلول های 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

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 مکمل‌های ضد میکروبی یا چالش میکروبی بر افزایش وزن، ضریب تبدیل خوراک، مصرف خوراک و وزن بدن جوجه‌های گوشتی.

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

سن Age	اثر مکمل Supplements effect				MSE	سطح احتمال probability level	اثر چالش میکروبی challenge effect		MSE	سطح احتمال probability level
	کنترل Control	آنتی‌بیوتیک Antibiotic	مکمل گیاهی Herbal Supplement	پروبیوتیک Probiotic			سالم	درگیر Challenge		
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	0.990
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 ۶- تأثیر مکمل‌های ضد میکروبی بر مؤلفه‌های بافت‌شناسی روده در ناحیه ژژنوم جوجه‌های گوشتی در ۲۱ روزگی

Table 6- The effect of antimicrobial supplements on histological components of intestine in gegerum 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.

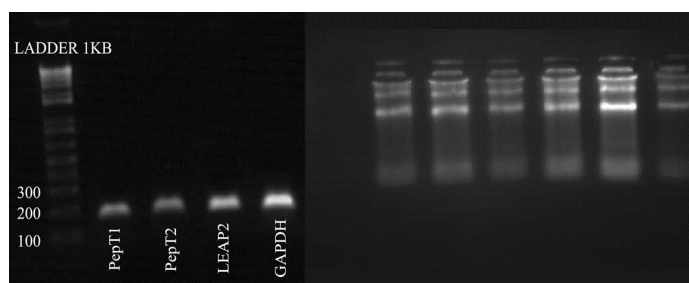
SEM: standard error mean

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 به گروه شاهد سالم کاهش یافت، ولی میزان بیان در تیمار آنتی بیوتیک 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 میکروبی بیان این ژن را افزایش داد (شاهد آلوده) که نشان می دهد مکمل های ضد میکروبی استفاده شده در این مطالعه اثر کاهنده ای در بیان ژن *PepT1* در زمان مقابله میکروبی در حیوان ایجاد کرده است.

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 افزایش ارتفاع ویلی به عمق کریپت انعکاس پیدا کرده و موجب افزایش این نسبت در تیمار های حاوی مکمل گیاهی و پروبیوتیک شد. این نتایج با گزارشات عامد و همکاران (۲۰۱۳) که نشان دادند افزایش ارتفاع ویلی با کاهش عمق کریپت همراه است مطابق است.

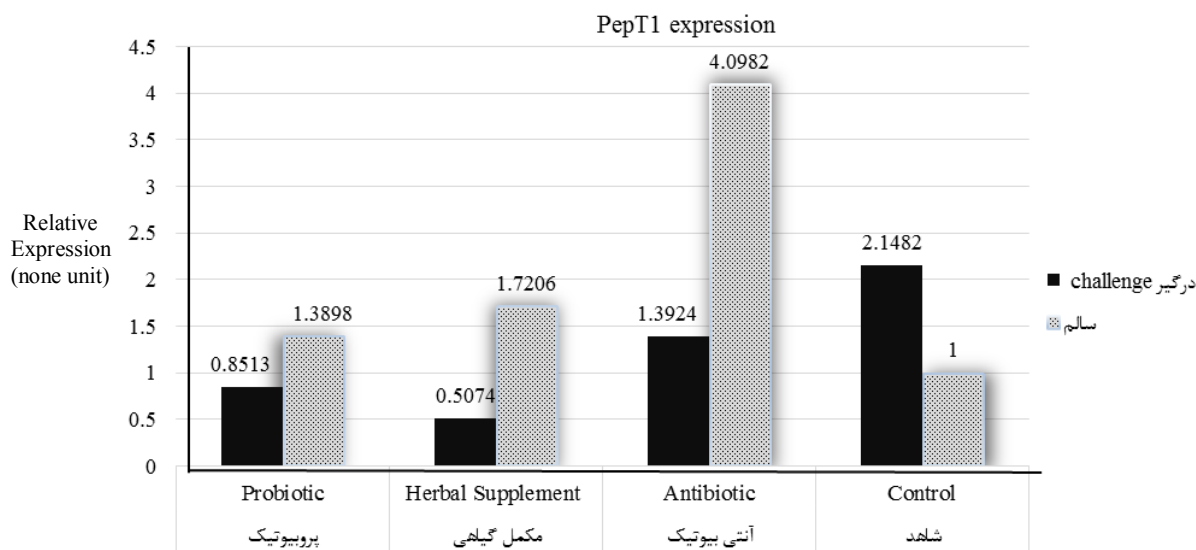
بیان ژن‌های *LEAP2*, *PepT1*, *PepT2*

در شکل ۱ کیفیت RNA استخراج شده برای ساخت cDNA (شکل راست) و محصول حاصل از pcr (شکل چپ) cDNA



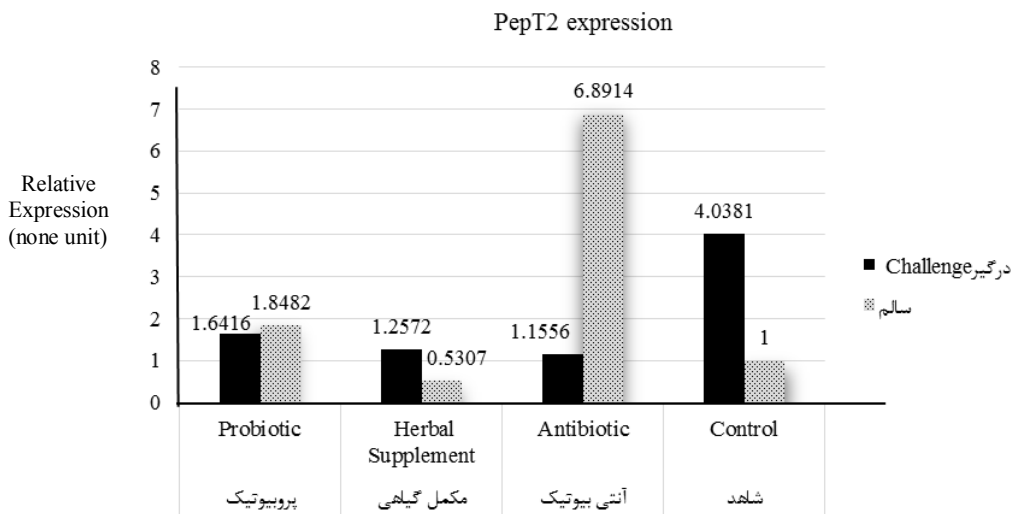
شکل ۱- RNA استخراج شده از بافتهای کبد و ژژنوم (راست) و محصول حاصل از pcr نمونه های cDNA (چپ)

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

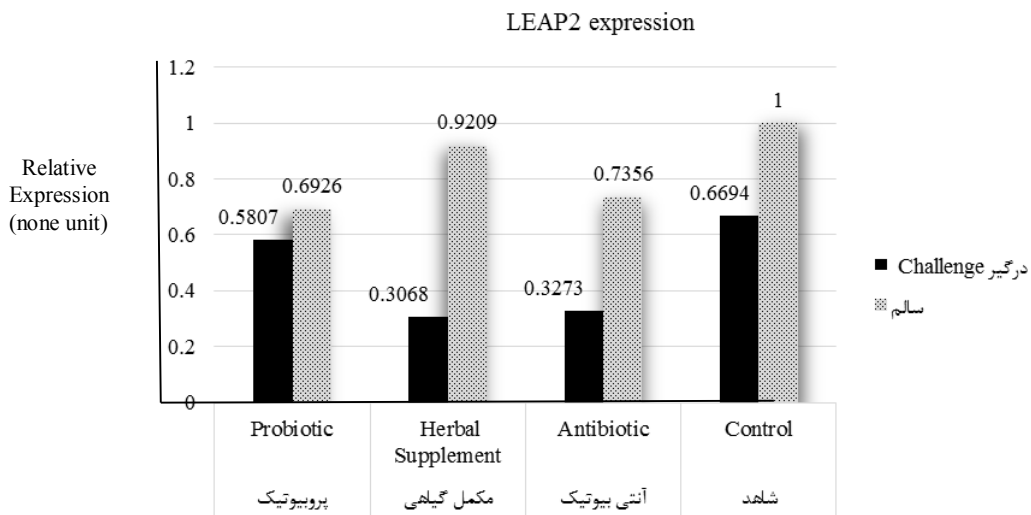


شکل ۲- اثر متقابل مکمل‌های ضد میکروبی و چالش میکروبی بر بیان ژن *PepT1* در بافت ژژنوم روده جوجه های ۱۴ روزه

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



شکل ۳- 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 ۴- 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

(شکل ۳). در پرندگان سالم در تیمارهای دریافت کننده آنتی بیوتیک 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

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

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 ضد میکروبی 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 تأثیر 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 مکمل‌های 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*, *PepT2* نسبت 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.

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 تأثیری 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 حامل‌های پپتید نظیر *PepT1* را افزایش می‌دهد. اما در شرایط چالش میکروبی با ایمریا یا سالمونلا بر خلاف مطالعه حاضر نشان داده شده است که بیان *PepT1* در دودنوم افزایش می‌یابد (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) می‌باشد که نشان داد چالش مرغ گوشتی با ایمریا باعث کاهش بیان *LEAP2* در کبد می‌شود. این پروتئین بخشی از سیستم ایمنی ذاتی می‌باشد و روشن شده است که بیان این پروتئین همبستگی منفی با شدت عفونت کوکسیدیوز داشته است (۶). ولی در چالش پرند با سالمونلا بیان این ژن در کبد و روده افزایش یافته بود (۳۲). بر این اساس پیشنهاد می‌شود که احتمالاً میزان بیان *LEAP2* به نوع پاتوژن یا عامل بیماری بستگی دارد که تحقیقات بیشتری باید انجام شود. البته یادآوری می‌شود که *LEAP2* پپتید ضد میکروبی بیان شده در کبد است که پپتیدی کاتیونی و ساختاری منحصر به فرد دارد از جمله آن پیوند دی

منابع

1. Amad, A. A., K. Wendler, and J. Zentek. 2013. Effects of a phytogetic 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 health. *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.

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-Harathi, 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 subtilis* 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.

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.



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

Sajjad Hassanzadeh¹, Reza Majidzadeh Heravi^{2*} and Ali Javadmanesh²

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 PepT1 and 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 salivarius* increased the width of villi on intestinal epithelium more than the other treatments. Depth of crypt of lieberkuhn was the least in the chickens fed 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

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.