زیست‌شناسی جانوری، سال شانزدهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۲، صفحات ۲۰۲-۱۸۹

مقاله پژوهشی

# اثر مصرف جیره‌های مکمل‌شده با سطوح مختلف ویتامین E، سیزامین و تیموکوئینون بر چالش پاسخ سیستم ایمنی سلولی، ریخت شناسی روده، جمعیت میکروبی روده و بیان ژن $MUC_2$ در بلدرچین‌های ژاپنی تخم‌گذار

**یاسر رحیمیان، فرشید خیری*، مصطفی فغانی**

گروه علوم دامی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

*مسئول مکاتبات: Farshid_kheiri@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۵

DOI: 10.22034/ascij.2023.1988241.1497

## چکیده

به منظور بررسی اثر مصرف جیره‌های مکمل شده با سطوح مختلف ویتامین E، سیزامین و تیموکوئینون بر چالش پاسخ سیستم ایمنی سلولی ، ریخت شناسی، جمعیت میکروبی روده و بیان ژن $MUC_2$ در بلدرچین‌های ژاپنی تخم‌گذار، تعداد۲۱۰ قطعه بلدرچین ژاپنی ماده در سن ۳۵-۸۵ روزگی با ۷ تیمار آزمایشی شامل گروه شاهد و مصرف کننده ویتامین E، تیموکوئینون و سیزامین با سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از خوراک استاندارد با ۵ تکرار و ٦ قطعه بلدرچین تخم‌گذار در هر تکرار استفاده گردید. در انتهای دوره (۸۵ روزگی) پس از کشتار دو قطعه پرنده از هر تکرار وزن نسبی اندام‌های ایمنی (تیموس، طحال و بورس فابریسیوس) و فعالیت شاخص‌های کبدی نظیر آلبومین، آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین‌ترانس‌آمیناز (ALT) و آسپارتات ترانس آمیناز (AST) بررسی شد. پاسخ‌های ایمنی سلولی نظیر تست چالش حساسیت به دی نیتروکلروبنزن و پاسخ به تزریق میتوژن فیتوهماگلوتینین به وب بال چپ مطالعه شد. برای ارزیابی مورفولوژی بافت روده و جمعیت فلور میکروبی روده باریک، نمونه برداری صورت گرفت. برای بررسی بیان ژن $MUC_2$ نمونه‌هایی از ژژنوم جمع‌آوری و از روش RT-PCR استفاده شد. نتایج نشان داد مصرف جیره‌های مکمل شده سبب افزایش وزن نسبی معنی‌دار بورس فابرسیوس ($p \leq$ ۰/۰۵) و کاهش غیرمعنی‌داری فعالیت آنزیم‌های کبدی گردید ($p \geq$ ۰/۰۵). افزایش معنی‌دار فلور میکروبی مفید (*لاکتوباسیلوس‌ها*) و در مقابل کاهش جمعیت کلونی باکتری‌های *اشرشیاکولی* و *سالمونلا انتریکا* در روده همراه با افزایش سطح ویلی‌ها و تراکم تعداد سلول‌های گابلت نشان دهنده اثرات مفید ترکیبات فعال استفاده شده در بهبود وضعیت سلامت بلدرچین‌ها بود ($p \leq$ ۰/۰۵). مصرف جیره‌های مکمل شده با سطوح ویتامین E، سیزامین و تیموکوئینون سبب افزایش بیان mRNA ژن MUC2 در روده شد. نتایج نشان‌دهنده‌ی سودمندی مصرف ویتامین E، سیزامین و تیموکوئینون بر پاسخ سیستم ایمنی سلولی، مورفولوژی، فلور میکروبی روده و بیان mRNA ژن $MUC_2$ در بلدرچین‌های ژاپنی تخم‌گذار بود.

**کلمات کلیدی:** سیزامین، تیموکوئینون، ویتامین E، سیستم ایمنی سلولی، بیان ژن $MUC_2$، بلدرچین ژاپنی تخم‌گذار.

## مقدمه

با توجه به خصوصیات منحصر به فرد بلدرچین نظیر رشد سریع، پایین بودن سن بلوغ جسمی و جنسی، فاصله نسلی کوتاه، میزان تخم گذاری بالا، کیفیت عالی محصولات تولیدی و ویژگی‌های غذائی بی‌نظیر گوشت و تخم، پرورش بلدرچین به صنعتی سودآور تبدیل شده است(٤٧). امروزه، گوشت و تخم

بلدرچین به دلایلی چون تامین پروتئین، قیمت مناسب و ارزان در مقایسه با گوشت قرمز و همچنین میزان پایین کلسترول از جایگاه خاصی برخوردار است (۵۰). برای تعیین جایگزین‌های احتمالی آنتی‌بیوتیک-ها و پیشگیری از اثرات مضر آنها در پرندگان پرورشی توجه خاصی به ترکیبات گیاهی شده است (۱). دستگاه گوارش حدود ۲۰ درصد انرژی جیره و ۵۰ تا ۷۵ درصد پروتئینی که روزانه تجزیه و بازسازی می‌شود را مصرف می‌کند (٤). لوله گوارش محل سکونت سلوله‌ای باکتریایی است که ۱۰ برابر بیشتر از ۷۰ درصد کل سلول‌های ایمنی هستند. سد حفاظتی لوله گوارش هم به طور اختصاصی و هم غیراختصاصی عمل می‌کند (۳۷). موسین‌ها اصلی‌ترین ترکیبات موکوس و اولین خط دفاعی غیر ایمنی مربوط به عملکرد حفاظتی دستگاه گوارش هستند که توسط سلول‌های گابلت ساخته می‌شوند (٤۲). این ساختارهای گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی بالا نقش مهمی در حقاظت از لایه پوششی مجاری گوارشی، تنفس، فرآیندهای تولیدمثلی و جلوگیری از ورود پاتوژن‌ها و نقش مهمی در جذب مواد غذایی در دستگاه گوارش پرندگان را دارد (۷). کاهش ساخت و ترشح موسین در جوجه‌ها باعث کاهش لایه موکوسی، آسیب روده و کاهش جذب مواد مغذی جیره می‌شود (٦، ٤۳). موسین اسیدی به دلیل مقاومتی که در برابر پروتئازهای حیوان میزبان و آنزیم‌های باکتریایی دارد نقش مهمی را در ایمنی ذاتی پرنده به عهده دارد. حرکات دودی روده، ترکیبات اسیدی و عوامل محرک مانند ترکیبات ضد تغذیه‌ی جیره سبب از بین رفتن بافت موکوسی و ناپایداری آن در روده می‌شوند و نیاز است تا موکوس همیشه سطح روده را بپوشاند لذا سلول‌های گابلت دائم در حال ترشح موسین هستند (٤۱). ترکیب جیره و سطح گلوکز جیره و آمینو اسیدهای محدود کننده می‌تواند بر سنتز موسین در پرندگان موثر واقع شوند (۲۳). ویتامین E یا آلفا توکوفرول به عنوان یکی از مهمترین آنتی-اکسیدان‌های بیولوژیک جهت پیشگیری از اکسیداسیون چربی‌های غیراشباع در بدن است که با حفظ یکپارچگی غشاهای زیستی، منجر به افزایش تنفس داخل سلولی شده و با تاثیر بر سلول‌های ایمنی، پارامترهای آندوکرینی و متابولیکی اثرات مفید خود را بر سیستم ایمنی طیور ایفا می‌نماید (٤۹). سیاه‌دانه با نام علمی *Nigella Sativa L* دارای ترکیباتی مهمی نظیر تیموکوئینون و دی‌تیموکوئینون، پی سیمین، کارواکرول، تی‌آنتول و سیس‌کوئی‌ترپن می‌باشد (۱). تیموکوئیونون ($C_{10}H_{12}O_2$) یک ترکیب فتوشیمیایی است که جز اصلی و فعال سیاه‌دانه می‌باشد و اثرات آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌هیستامینی، ضدالتهابی و ضدسرطانی دارد (۸). کنجد با نام علمی *Sesamum Indicum L* غنی از اسیدهای چرب امگا۳ و امگا ٦ بوده و دارای ترکیبات لیگنانی فنیل پروپانی سیزامین و سیزامولین می‌باشد (٤۹). این ترکیبات اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی داشته و از تکثیر سلول‌های سرطانی ممانعت می‌کنند (۹)، کاهنده فشار خون و ممانعت‌کننده ملانوژنز می‌باشند. (۳). موسین-ها دارای دو جزء کربوهیدراتی و پروتئینی هستند و با پیوند گلیکوزیدی به هم اتصال دارند (۳۸). مهمترین موسین دستگاه گوارش، $MUC_2$ نام دارد که توسط سلول‌های گابلت روده تولید می‌شود. موسین پس از ترشح، لایه موکوس را در روده به وجود می-آورد (۲۳). مهمترین ژن تولید کننده موسین به فرم ژل که $MUC_2$ نام دارد در پرندگان بر روی کروموزوم شماره ۵ بوده و در روده قرار داد (٤۱). گلیکوپروتئین‌های موجود در ساختمان موکوس توسط زنجیرهای اولیگوساکاریدی هتروژن برای چسبیدن به باکتری‌های روده در رقابت هستند و مانع رسیدن عوامل پاتوژن به بافت زیر موکوس و ورود آن

به سلول‌های اپیتلیال می‌شوند و از طرفی به واسطه کربوهیدرات زیادی ساختمان خود محیط مناسبی را برای تکثیر میکروفلور خاص روده فراهم می‌آورند از این رو به عنوان بخشی از سیستم ایمنی ذاتی عمل می‌کند (۱۱). سیستم ایمنی از طریق ترشح پپتیدهای آنتی میکروبیال و سیتوکین‌های پیش التهابی نقش مهمی در بیان mRNA پروتئین‌ها دارد و سیتوکین‌ها سبب افزایش تولید موسین، ازدیاد سلول‌های گابلت و ایجاد تغییر در گلیکوزیلاسیون موسین می‌شوند (۱۰). بهبود عملکرد پرندگان تخم‌گذار تحت تاثیر تغذیه با فیتواسترول‌ها و محرک‌های ترشح انسولین یعنی پیش‌سازها و فعال‌کننده‌های هیدروکسی ایزولوسین مرتبط باشد که باعث تقویت سنتز پروتئین و بهبود انتقال غشایی پتاسیم، اسیدهای چرب، گلوکز و اسیدهای آمینه می‌شود (۵). شناسایی پروموترهای روده‌ای خاص می‌تواند مکانیسم‌های مسئول الگوهای تمایز منحصر به فرد مشاهده شده در اپیتلیوم مخاط روده را نیز روشن کند (۳٤). امروزه یکی از کاربردهای احتمالی توالی پروموتر MUC2 برای دام-های تراریخته به منظور تولید حیواناتی است که پروتئین‌های مطلوب را در دستگاه گوارش بیان می‌کنند و مطالعه میزان نسخه برداری MUC به درک مکانیزم عواملی که بر سنتز آن نقش دارند کمک می‌کند (٤۲).

هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثرات سیزامین و تیموکوئینون و ویتامین E بر روی پاسخ سیستم ایمنی سلولی، ریخت‌شناسی، جمعیت میکروبی روده و بیان ژن $MUC_2$ در بلدرچین‌های ژاپنی تخم‌گذار بود.

## مواد و روش‌ها

بذر کنجد و سیاه دانه تهیه شده توسط کارشناسان گیاه داروئی مرکز تحقیقات گیاهان داروئی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مورد ارزیابی و تائید قرار گرفت و عصاره‌گیری از بذور بعد از خرد کردن به روش تقطیر با آب هیدرو دیستیلاسیون و دستگاه کلونجر به مدت ٤ ساعت برای هرکدام از نمونه‌ها انجام شد. عصاره به دست آمده در محدوده بالای سولفات سدیم بدون آب خشک شد و درصد اجزای آن بر اساس وزن خشک بذور محاسبه گردید. تفکیک ترکیبات توسط کروماتوگرافی گازی و شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس با استفاده از روش شاخص بازداری و طیف‌های جرمی استاندارد و مراجع موجود در مرکز تحقیقات گیاهان داروئی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، صورت پذیرفت. تعداد۲۱۰ قطعه بلدرچین ژاپنی ماده بالغ با میانگین وزنی مشابه (۱۵ ± ۲٦۰) گرم و در مرحله تخم گذاری (۳۵ لغایت ۸۵ روزگی) استفاده گردید که در ابتدای دوره آزمایش به صورت دسته جمعی وزن کشی شده و گروه‌های با میانگین وزنی یکسان در بین تیمارهای مختلف، تقسیم شدند و استانداردهای درجه حرارت، رطوبت، نور، تهویه و تغذیه مورد توجه قرار گرفت. هفت تیمار آزمایشی شامل گروه شاهد و گروه‌های مصرف کننده ویتامین E، تیموکوئنیون و سیزامین با سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم خوراک با ۵ تکرار و ٦ قطعه بلدرچین در هر تکرار استفاده گردید. کلیه اجزای جیره بلدرچین‌های تحت مطالعه بر اساس روش تجزیه و تحلیل ترکیبات شیمیایی خوراک (۲) مورد آنالیز قرار گرفت و جیره بلدرچین‌های آزمایشی بر اساس توصیه‌های تغذیه ای مربوط به بلدرچین‌های تخم گذار (۳٤) با استفاده از نرم‌افزار UFFDA متعادل گردید (جدول ۱). جیره‌های آزمایشی، آب تازه و سالم آشامیدنی به صورت آزاد و نامحدود در اختیار بلدرچین‌ها قرار داده شد. در انتهای دوره آزمایش تعداد ۲ بلدرچین از هر جایگاه آزمایشی انتخاب و پس از وزن کشی، برای تعیین وزن نسبی اندام‌های لمفوئیدی ذبح شده و امعا و

احشا داخلی بدن آنها تخلیه گردید و اعضای تیموس، بورس و طحال جدا و توزین شدند. به منظور اندازه-گیری میزان آلبومین از روش اسپکتروفتومتری و برای ارزیابی فعالیت سرمی آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات، آمینوترانسفراس (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) با استفاده از دستگاه آنالایزر خودکار با استفاده از کیت‌های تجاری پارس آزمون طبق دستورالعمل سازنده تعیین شد. چالش حساس‌سازی به دی‌نیترو کلروبنزن، با استفاده از یک میلی‌گرم/میلی‌لیتر از محلول دی‌نی‌تروکلروبنزن که روی یک ناحیه دو سانتی‌متر مربعی از پوست برهنه (۰/۰۵ میلی‌لیتر) در سمت راست دو بلدرچین هر تیمار در ۸۰ روزگی پخش شد و تورم پوست با استفاده از کولیس دیجیتال با منهای ضخامت پوست قبل و بعد از دی نیتروکلروبنزن پخش شده بررسی شد و به منظور ارزیابی پاسخ ایمنی سلولی، تزریق میتوژن فیتوهماگلوتینین (۵۰ میکرولیتر از یک سوسپانسیون ۵۰ میکروگرم PHA-M در ۵۰ میکرولیتر سالین بافر فسفات) به داخل پوست بال چپ صورت گرفت و اندازه‌گیری ضخامت تار بال قبل از تزریق به عنوان اندازه‌گیری کنترلی و در ۲٤ ساعت و بعد از تزریق با استفاده از کولیس دیجیتال صورت گرفت (۱٦). به منظور ارزیابی فلور میکروبی روده و تخمین جمعیت باکتری‌های *اشریشیاکولی*، *لاکتوباسیلوس* و *سالمونلا*، یک گرم از نمونه‌های گوارشی روده جمع‌آوری‌شده با ۰/۰۹ درصد NaCl استریل تا ده برابر رقیق شد. برای انجام شمارش جمعیت باکتریایی سالمونلا اینتریکا با استفاده از محیط MRS-Agar-LAB و انکوباسیون در محیط بی هوازی به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، شمارش باکتری‌های *اشرشیاکولی* انکوباسیون به مدت ٤۸ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و برای تعیین جمعیت کلونی باکتریایی *لاکتوباسیلوس* از محیط کشت MRS1-Agar به مدت ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد استفاده شد. پس از انکوباسیون، باکتری‌ها در ظروف پتری دیش شمارش شدند و با محاسبه باکتری‌ها در حجم اولیه و شمارش‌ها به صورت $\log^{10}$ CFU در هر گرم گزارش شد (۳۸). برای تعیین پارامترهای هیستومورفولوژیکی ژوژنوم، بخش‌های مختلف روده‌ای از دو قطعه بلدرچین ذبح شده از هر تکرار جدا شد. و تجزیه و تحلیل بر روی مقاطع بافت هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شده گردید و ارتفاع پرز، عمق کریپت و سطح پرز اندازه‌گیری شد و همچنین طول و عرض پرزهای عمودی کامل از پنج پرز برای هر بلدرچین محاسبه شد. تعداد سلول‌های گابلت (جامی) از پنج پرز مشابه تعیین شد و تعداد و تراکم سلول‌های گابلت با واحد میلی متر مربع به عنوان تراکم سلول‌های مذکور ذکر شد (۳۲). تشخیص موسین‌های خنثی با استفاده از کیت رنگ-آمیزی پریودیک اسید شیف (PAS) و موسین‌های اسیدی در اسیدیته ۲/۵ با استفاده از روش رنگ امیزی آلکالین بلو (AB) مورد ارزیابی قرار گرفت (۳۳). برای بررسی بیان mRNA ژن $MUC_2$ بلافاصله نمونه-هایی از ژوژنوم دو بلدرچین ذبح شده جمع‌آوری و در نیتروژن مایع منجمد شد. بررسی بیان ژن MUC2 با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت فرمنتاز صورت گرفت و مجموع RNA مورد نیاز از بافت روده استخراج گردید. ارزیابی کیفیت و کمیت RNA با استفاده از اسپکتروفوتومتر نانودراپ Thermo انجام شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت ساخت شرکت فرمنتاز و ارزیابی، رقیق‌سازی و همسان سازی آن (۳۰۰ نانوگرم/میکرولیتر) صورت گرفته و توسط نانودراپ تایید گردید و در ادامه mRNA موجود با استفاده از Real Time PCR و با استفاده از کیت سایبرگرین اندازه‌گیری شد. برای انجام آنالیز بیان ژن،

پس از مراحل استخراج RNA و حذف باقیمانده‌های DNA ژنومی، اقدام به سنتز cDNA به عنوان الگوی اولیه برای واکنش‌های RT-PCR گردید (۴۲). تعیین کمیت نسبی در Real time RT PCR به وسیله افزایش تشعشع نور فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ SYBER-green صورت پذیرفت و مقادیر مربوط به چرخه آستانه (Ct) حاصل از تکرارهای بیولوژی و تکنیکی هر تیمار برای محاسبه میزان بیان نسبی ژنMUC2 در بافت روده ثبت گردید. میانگین Ct، برای تکرارهای تکنیکی ژن MUC2 و β-actin محاسبه شد و نهایتا میزانΔCT توسط کسر (Ct) هدف و (Ct) مرجع برآورد و بیان نسبی ژن MUC2 محاسبه گردید. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS ۹/۱ با رویه GLM آنالیز شدند. مقایسه بین میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. مدل آماری طرح به شرح : $Yijk = \mu + \alpha i + eijk$ بود که در آن Yijk مقدار هر مشاهده. μ: میانگین جامعه. $\alpha i$: اثر مکمل‌سازی باویتامین E ، سیزامین، تیموکوئینون و eijk: اثر اشتباه در آزمایش، بود.

جدول ۱- درصد ترکیبات و محتوی مواد مغذی جیره آزمایشی مورد استفاده در بلدرچین‌های تخم‌گذار*

| اقلام جیره ( گرم بر کیلو گرم) | درصد مقادیر مورد استفاده |
|---|---|
| ذرت | ۵۵/۰۷ |
| کنجاله سویا | ۳۲/۵۱ |
| روغن گیاهی(سویا) | ۲/۸۵ |
| گلوتن ذرت | ۱/۸۶ |
| پودر صدف (کربنات کلسیم) | ۵/۵۸ |
| دی‌کلسیم فسفات | ۱/۲ |
| نمک (سدیم کلراید) | ۰/۳۴ |
| مکمل معدنی و ویتامینه** | ۰/۵۰ |
| دی ال متیونین | ۰/۰۹ |
| مجموع اقلام جیره | ۱۰۰ |
| مواد مغذی محاسبه شده | |
| انرژی قابل سوخت وساز (کیلوکالری بر کیلوگرم) | ۲۹۰۰ |
| پروتئین خام | ۲۰ |
| کلسیم | ۲/۵ |
| فسفر قابل دسترس | ۰/۳۵ |
| ترئونین | ۰/۷۵ |
| متیونین+ سیستئین | ۰/۷۵ |
| لیزین | ۱/۰۲ |
| آرژنین | ۱/۲۶ |
| والین | ۰/۹۴ |
| لوسین | ۱/۸۳ |
| ایزولوسین | ۰/۸۴ |
| سدیم | ۰/۱۵ |
| کلر | ۰/۲۸ |

*جیره متعادل شده بر اساس NRC، ۱۹۹۴. ** هر کیلوگرم مکمل ویتامنه شامل ۹۰۰۰واحد بین‌المللی ویتامین A، ۲۰۰۰ واحد ویتامین $D_3$، ۲۵واحد ویتامین E، ۲ میلی‌گرم ویتامین $K_3$، ۲ میلی‌گرم تیامین، ۶/۶ میلی‌گرم ریبوفلاوین، ۳۰/۲۵ میلی‌گرم پانتوتنیک اسید، ۳/۱ میلی‌گرم پیروکسیدین، ۰/۰۱۵ میلی‌گرم سیانو کوبالامین، ۱۸ میلی‌گرم نیاسین، ۰/۳ میلی‌گرم بیوتین، ۱/۱ میلی‌گرم فولیک اسید و ۵۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید بود و هر کیلوگرم مکمل معدنی شامل ۵۰ میلی گرم آهن، ۹۹میلی‌گرم منیزیوم، ۸۵میلی‌گرم روی،۱۰ میلی‌گرم مس، ۱/۹۹میلی‌گرم ید و۰/۲۰ میلی‌گرم سلنیوم بود.

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

| ژن هدف | ثبت بانک ژن | توالی رفت (5’ to 3’) | توالی برگشت (5’ to 3’) |
|---|---|---|---|
| MUC-2 | NM_001318434 | CCACAAGTCCTCCAGTACCTACA | AGGTTTCATAGTCACCACCATCTTC |
| Beta-actin | NM_205518 | CTGGCACCTAGCACAATGAA | CTGGTTGCTGATCCACATCT |

## نتایج

**وزن نسبی اندام‌های لمفوئیدی**: جدول ۳ نشان می‌دهد با مصرف سطوح مختلف ویتامین E، سیزامین و تیموکوئینون وزن نسبی اندام‌های لمفوئیدی تیموس و طحال تحت تاثیر قرار نگرفت ولی وزن نسبی بورس فابرسیوس به طور معنی‌دار افزایش یافت ($p \leq ۰/۰۵$).

**چالش ایمنی با واسطه سلولی**: جدول ٤ نشان می‌دهد در پرندگان مصرف کننده سطوح مختلف ویتامین E، سیزامین و تیموکوئینون حساسیت به دی نیتروکلروبنزن افزایش معنی‌دار و پاسخ حساسیت به تزریق میتوژن کاهش معنی‌دار یافت که کمترین آن در گروه‌های مصرف کننده سطح ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین E، سیزامین و تیموکوئینون بود ($p \leq ۰/۰۵$).

**فعالیت آنزیم‌های کبدی**: طبق جدول ۵، میزان آلبومین و آنزیم‌های کبدی آلکالین‌فسفاتاز، آلانین-آمینوترانسفراز و آسپارتات‌آمینوترانسفراز تحت تاثیر مصرف ویتامین E، سیزامین و تیموکوئینون به‌طور غیرمعنی‌داری کاهش یافت ($p \geq ۰/۰۵$).

**جمعیت میکروبی روده**: جدول ٦ نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار جمعیت کلونی باکتری لاکتوباسیلوس به عنوان فلور میکروبی مناسب و در مقابل کاهش معنی-دار جمعیت *سالمونلا انتریکا* و جمعیت باکتری *اشرشیاکولی* که به عنوان باکتری‌های مضر و پاتوژن در محیط روده محسوب می‌گردند، بود ($p \leq ۰/۰۵$).

**مورفولوژی بافت روده**: جدول ۷ نشان می‌دهد که با مصرف سطوح مختلف ویتامین E، سیزامین و تیموکوئینون ارتفاع ویلی، عمق کریپت و سطح ویلی-ها نسبت به گروه کنترل افزایش یافت و بررسی تعداد سلول‌های گابلت رنگ‌آمیزی شده به دو روش اسید شف و آلکالین بلو نشان دهنده افزایش تراکم سلول‌های گابلت با توجه به تغییرات سطوح جیره-های مکمل شده با ویتامین E، سیزامین و تیموکوئینون بود ($p \leq ۰/۰۵$).

**بیان ژن MUC2**: بر اساس جدول ۸ بیان mRNA ژن MUC2 با افزایش مصرف سطح ویتامین E، سیزامین و تیموکوئینون افزایش معنی‌دار یافت ($p \leq ۰/۰۵$).

جدول ۳- اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر درصد وزن نسبی اندام‌های لمفوئیدی ایمنی در بلدرچین‌های تخم‌گذار

| تیمار | میزان مکمل سازی | تیموس ٪ | طحال ٪ | بورس فابریسیوس ٪ |
|---|---|---|---|---|
| کنترل | صفر | ۰/۲۵ | ۰/۰۹۹ | ۱/۲۱[b] |
| ویتامینE | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۰/۲٦ | ۱/۰۸ | ۱/۲٤[b] |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۰/۲۹ | ۱/۱۲ | ۱/۲۷[b] |
| سیزامین | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۰/۳۱ | ۱/۱٤ | ۱/۳۱[a] |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۰/۳۳ | ۱/۱۵ | ۱/۳۵[a] |
| تیموکوئینون | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۰/۳۳ | ۱/۱٦ | ۱/۳۷[a] |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۰/۳٦ | ۱/۱۹ | ۱/٤۲[a] |
| SEM** | ----- | ۰/۱۵۲ | ۰/۳۲۱ | ۰/۰۱۲ |

*تفاوت میانگین‌ها در هر ردیف باحروف غیر مشترک نشان دهنده معنی داری است ($p \leq ۰/۰۵$).**SEM: خطای معیار میانگی

جدول ٤- اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر چالش ایمنی با واسطه سلولی در بلدرچین‌های تخم‌گذار

| تیمار | میزان مکمل سازی | چالش حساسیت به دی نیتروکلروبنزن | تورم تار بال در پاسخ به میتوژن |
|---|---|---|---|
| کنترل | صفر | ۱/۵۲$^{b}$ | ۰/۸۱$^{a}$ |
| ویتامین E | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۱/۵۳$^{b}$ | ۰/۷۵$^{a}$ |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۱/۵۹$^{b}$ | ۰/۷۱$^{b}$ |
| سیزامین | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۱/۵۵$^{b}$ | ۰/۷۲$^{b}$ |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۱/٦٤$^{a}$ | ۰/۷۰$^{b}$ |
| تیموکوئینون | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۱/٦۱$^{a}$ | ۰/۷۱$^{b}$ |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۱/٦٥$^{a}$ | ۰/٦۸$^{b}$ |
| SEM | ----- | ۰/۰۱۷ | ۰/۰۱۱ |

جدول ٥- اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر فعالیت آنزیم‌های کبدی در بلدرچین‌های تخم‌گذار

| تیمار | میزان مکمل سازی | آلکالین فسفاتاز (IU/L) | آلانین آمینوترانسفراز (IU/L) | آسپارتات آمینوترانسفراز (IU/L) | آلبومین (g/dL) |
|---|---|---|---|---|---|
| کنترل | صفر | ۹٦/٥٤ | ۳۰/۱۱ | ۳۸/٥۲ | ۲/٤۱ |
| ویتامین E | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۹٥/۲۸ | ۲۹/۹٤ | ۳۸/٤۱ | ۲/۳۸ |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۹٥/۱٦ | ۲۹/٥٥ | ۳۸/۲۹ | ۲/۲٦ |
| سیزامین | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۹٤/٦۸ | ۲۹/۲۷ | ۳۷/٦٥ | ۲/۲۱ |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۹٤/٥۱ | ۲۹/۱٦ | ۳۷/۲۲ | ۲/۱۸ |
| تیموکوئینون | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۹٤/۳۹ | ۲۹/۲٦ | ۳۷/۲۸ | ۲/۱٦ |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۹۳/۷۱ | ۲۸/۷۷ | ۳٦/۹٦ | ۱/۹٦ |
| SEM | ----- | ٤/۷۳ | ۳/۳٦ | ۱/۹۲ | ۰/٦۳٥ |

جدول ٦- اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر جمعیت میکروبی روده در بلدرچین‌های تخم‌گذار

| تیمار | میزان مکمل سازی | *لاکتوباسیلوس* (CFU/g) | *سالمونلا اینتریکا* (CFU/g) | *اشرشیاکولی* (CFU/g) |
|---|---|---|---|---|
| کنترل | صفر | ٥/٤۱$^{c}$ | ٥/۷۲$^{a}$ | ٥/۹۹$^{a}$ |
| ویتامین E | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ٥/٤٤$^{c}$ | ٥/٦٥$^{b}$ | ٥/۸٦$^{b}$ |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ٥/٤۹$^{b}$ | ٥/٦۰$^{b}$ | ٥/۸۲$^{b}$ |
| سیزامین | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ٥/٤٦$^{b}$ | ٥/٥٥$^{c}$ | ٥/۷۱$^{bc}$ |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ٥/٥۱$^{a}$ | ٥/٤۸$^{c}$ | ٥/٦۹$^{c}$ |
| تیموکوئینون | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ٥/٤۹$^{b}$ | ٥/٥۱$^{c}$ | ٥/٥۸$^{cd}$ |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ٥/٥٥$^{a}$ | ٥/۳۹$^{d}$ | ٥/٤٤$^{c}$ |
| SEM | ----- | ۰/۰۱۲ | ۰/۰۲۱ | ۰/۰۱۸ |

جدول ۷- اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر مورفولوژی روده در بلدرچین‌های تخم‌گذار

| تیمار | میزان مکمل سازی | ارتفاع ویلی (µm) | سطح ویلی (µm) | عمق کریپت (µm) | تراکم سلول‌های گابلت (پریودیک اسید شف) | تراکم سلول‌های گابلت (آلکالین‌بلو) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| کنترل | صفر | ۵۹۱/۹$^{b}$ | ۰/۵۹۴$^{c}$ | ۱۳۹/۲$^{b}$ | ۱۲/۶$^{c}$ | ۱۰/۹$^{c}$ |
| ویتامین E | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۵۹۵/۳$^{b}$ | ۰/۵۹۹$^{c}$ | ۱۴۰/۳$^{b}$ | ۱۲/۸$^{c}$ | ۱۱/۱$^{c}$ |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۶۰۱/۴$^{a}$ | ۰/۶۰۲$^{b}$ | ۱۴۲/۵$^{a}$ | ۱۳/۲$^{b}$ | ۱۱/۸$^{b}$ |
| سیزامین | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۶۰۲/۲$^{a}$ | ۰/۶۰۴$^{b}$ | ۱۴۳/۶$^{a}$ | ۱۳/۳$^{b}$ | ۱۱/۶$^{b}$ |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۶۰۴/۳$^{a}$ | ۰/۶۰۶$^{b}$ | ۱۴۶/۵$^{a}$ | ۱۴/۲$^{a}$ | ۱۲/۲$^{a}$ |
| تیموکوئینون | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۶۰۳/۵$^{a}$ | ۰/۶۰۵$^{b}$ | ۱۴۳/۴$^{a}$ | ۱۴/۱$^{a}$ | ۱۱/۷$^{b}$ |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۶۰۴/۶$^{a}$ | ۰/۶۱۱$^{a}$ | ۱۴۵/۵$^{a}$ | ۱۴/۵$^{a}$ | ۱۲/۶$^{a}$ |
| SEM | ----- | ۰/۰۶۹ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۵۲ | ۰/۰۴۲ | ۰/۰۱۹ |

جدول ۸- اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر بیان ژن $MUC_2$ در بلدرچین‌های تخم‌گذار

| تیمار | میزان مکمل سازی | $MUC_2$ average CT | β-actin average CT | ΔCT (MUC2-β-actin) | ΔΔCT ($\Delta CT-\Delta CT^{0}$) | بیان ژن $MUC_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| کنترل | صفر | ۱۵/۵۱ | ۱۲/۵۱ | ۳/۱۱ | ۰ | ۲/۵۰$^{c}$ |
| ویتامین E | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۱۵/۶۲ | ۱۲/۳۴ | ۳/۲۶ | -۰/۱۸ | ۲/۶۱$^{c}$ |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۱۵/۹۱ | ۱۲/۴۲ | ۳/۴۵ | -۰/۲۰ | ۲/۶۷$^{b}$ |
| سیزامین | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۱۵/۵۷ | ۱۲/۲۵ | ۳/۳۷ | -۰/۲۲ | ۲/۶۳$^{c}$ |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۱۵/۸۲ | ۱۲/۳۱ | ۳/۵۲ | -۰/۲۳ | ۲/۶۹$^{b}$ |
| تیموکوئینون | ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۱۵/۶۴ | ۱۲/۳۷ | ۳/۲۶ | -۰/۲۵ | ۲/۶۸$^{b}$ |
| | ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم | ۱۵/۹۶ | ۱۲/۴۴ | ۳/۵۴ | -۰/۲۷ | ۲/۷۵$^{a}$ |
| SEM | -- | -- | -- | -- | -- | ۰/۰۱۲ |

**بحث**

برخی از ترکیبات موجود در سیاه دانه نظیر تیموکوئینون باعث افزایش دو برابری سلول‌های کشنده طبیعی در طحال و افزایش عملکرد سلول‌های T و تقویت سیستم ایمنی در آنها می‌شود (۷). در پرندگان مصرف کننده سطوح مختلف تیموکوئینون حساسیت به دی‌نیتروکلرو بنزن افزایش و پاسخ به تزریق میتوژن کاهش معنی‌دار یافت که کمترین آن در گروه شاهد و بیشترین آن در گروه‌های مصرف کننده ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین E، سیزامین و تیموکوئینون بود. مصرف سیزامین در پرندگان ماده، سبب تجمع و انتقال ویتامین E در سلول‌های گرانولوز و فولیکول‌های فعال شده و از اثرات مخرب رادیکال-های آزاد و پروکسید هیدروژن که در طی دوره بلوغ به طور فزاینده‌ای تجمع پیدا می‌کنند، ممانعت کرده و باعث افزایش سیستم ایمنی می‌گردد (۴۹). در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم‌های کبدی به طور معنی‌دار تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. بی‌اثر بودن مصرف سیاه دانه بر سطح آلبومین، آنزیم‌های کبدی و تعداد پلاکت‌ها در خون پرندگان مشخص شده است (۳). اثرات ضد اکسایشی سیاه دانه در مسمومیت کبدی با عوامل متعدد نظیر مواجه به تتراکلریدکربن، آفلاتوکسین، سرب و جنتامایسین گزارش شده و نشان دهنده بهبود وضعیت کبدی با توجه به مصرف سطوح مختلف روغن سیاه دانه بود (۱۷). مطالعه

حاضر نشان داد مصرف ویتامین E، سیزامین و تیموکوئینون سبب افزایش تعداد کلونی‌های *لاکتوباسیلوس* و کاهش *اشرشیاکولی* و *سالمونلا انتریکا* شد. دی تیموکنیون و تیموکوئیون موجود در سیاه دانه علیه باکتری‌های *اشرشیاکولی*، *سالمونلا اورئوس* و *باسیلوس سابتلیس* در شرایط آزمایشگاهی موثر می‌باشند (۲۹). گونه‌های *باسیلوس* به دلیل توانایی تشکیل اندوسپورهایی که در برابر تغییرات محیطی و پردازش مواد غذایی مقاوم هستند، نامزدهای پروبیوتیکی جذابی هستند و جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با پروبیوتیک تک سویه شامل *باسیلوس سابتیلوس* نرخ تبدیل غذایی بهتر و بیان ژن موسین بالاتر در مقایسه با گروه کنترل داشتند (٤). مصرف خوراکی روغن سیاه‌دانه در ضایعات پیش بدخیم روده القاء شده در موش‌های نر اثرات واضح در بهبود سیستم ایمنی داشته است (۹). مصرف مقادیر متوسط دانه کنجد به طور قابل توجهی گاما توکوفرول پلاسما را افزایش می‌دهد و نسبت آن به پلاسماتوکوفرول را تغییر می‌دهد که منجر به افزایش افزایش فعالیت زیستی ویتامین E می‌شود (١٤). لیگنان‌های کنجد نظیر سیزامین، س‌ی‌زامینول، س‌ی‌زامولینول و س‌ی‌زامولین، از جمله انواع آنتی‌اکسیدان‌های محلول در چربی هستند و از تشکیل رادیکال‌های آزاد، پراکسیداسیون اسیدهای چرب و ایجاد استرس اکسیداتیو دربدن ممانعت کرده و سبب تعدیل فلور میکروبی و بهبود سیستم ایمنی می‌گردند (۲۲). در مطالعه حاضر مکمل‌سازی جیره‌ها با ویتامین E، سیزامین و تیموکوئینون سبب تاثیر معنی‌دار بر مروفولوژی روده، تعداد و ترام سلول‌های گابلت شد. در برخی مطالعات گنجاندن پروبیوتیک‌های گیاهی مبتنی بر باکتری اسید لاکتیک در جیره به طور قابل توجهی تعداد سلول‌های جام و طول پرز را افزایش داده بود (٤). اثر بالقوه‌ی باکتری‌های لاکتوباسیلوس، استرپتوکوک و بیفیدوباکتریوم بر تعدیل وضعیت میکرو فلور روده و مهار پاتوژن‌ها نشان داده شده است (۲۷). افزودن مخلوط اسانس‌های گیاهی به جیره ذرت و کنجاله سویا، سطوح *اشرشیاکولی* و *لاکتوباسیلوس* را در روده کوچک جوجه‌های گوشتی به ترتیب کاهش و افزایش داد (۲۵). مصرف ترکیبات گیاهی سبب افزایش ترشحات روده، صفرا و افزایش فعالیت آنزیم‌های پانکراس و در مقابل تعدیل سرعت عبور مواد در دستگاه گوارش شده و با اثر مثبت بر تغیر ساختار ویلی‌ها و پرزهای روده، موجب افزایش جذب و دسترسی به مواد مغذی و بهبود وضعیت سیستم ایمنی در پرنده می‌شوند (۲۱). بسیاری از اجزای فعال گیاهان و ادویه‌ها از پراکسیداسیون لیپید جلوگیری می‌کنند که این از طریق دفع رادیکال‌های آزاد یا از طریق فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز انجام می‌شود. اثرات سودمند ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی در رابطه با حفاظت از پرزهای روده‌ای از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانی بین سلولی صورت می‌گیرد ودر نتیجه آن با اثرات آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های پرز روده، جذب مواد مغذی بهبود می‌یابد (۲۹). در مطالعه حاضر، بیان ژن m-RNA ژن $MUC_2$ تحت تاثیر جیره‌های مکمل شده با سطوح مختلف ویتامین E، سیزامین و تیموکوئینون افزایش یافت. کلونیزاسیون باکتری‌ها در روده می‌تواند تولید موسین را با فعال کردن آبشارهای سیگنالینگ مختلف و عوامل شیمیایی ترشحی تنظیم کند (۱۳). *لاکتوباسیلوس* ممکن است به مکان‌های گیرنده خاصی روی انتروسیت متصل شود و تنظیم مثبت $MUC_2$ را تحریک کند (۱۸). استفاده از مکمل سیاه‌دانه به علت برخورداری از خاصیت ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانتی ترکیبات آن قادر به تنظیم کاهشی عوامل پیش التهابی و میانجی‌گرهای

تکثیر سلولی مانند سیکلوژناز و فاکتور های نکروزکننده تومور و پروتئین کیناز در شرایط پاتولوژیک می‌شود (۳۶). تجویز خوراکی روغن سیاه دانه باعث کاهش هیستامین‌ها، بهبود زخم دستگاه گوارش و افزایش سطح گلوتاتیون و افزایش غلظت موسین در موش‌های تحت مطالعه شد (۲۶). تغییر در سنتز و ترشح موسین سبب تغییر ضخامت، ویسکوزیته و ساختمان موکوس روده می‌شود و کاهش سنتز موسین، میزان استحکام لایه موکوسی و انتقال مواد مغذی را به سطح آپیکال سلول‌های پرز روده تحت تاثیر قرار داده و همچنین وظیفه کانال گوارشی را به عنوان بخشی از سیستم ایمنی بدن تحت تاثیر قرار می‌دهد. سیستم ایمنی از طریق ترشح پپتیدهای آنتی‌میکروبی و سیتوکین‌های پیش التهابی نقش مهمی در بیان mRNA پروتئین‌ها دارد و بررسی آنها نشان می‌دهد که سیتوکین‌ها سبب افزایش تولید موسین، ازدیاد سلول‌های گابلت و ایجاد تغییر در گلیکوزیلاسیون موسین می‌شوند (۴۱). استفاده از سطوح مختلف مکمل گیاهی زردچوبه، آویشن و دارچین در جوجه‌های گوشتی باعث افزایش $MUC_2$ mRNAدر ژوژنوم شد (۲۸). اثر تیمار سطوح مختلف اسانس اسطوخودوس در جیره‌های حاوی غلظت‌های بالا و پائین پروتئین و انرژی، باعث بهبود بیان نسبی ژن $MUC_2$ و توسعه فلور روده و افزایش ترشح $MUC_2$ گردید (۳۶). با افزایش سطح ترئونین جیره از ۰/۴۸ تا ۰/۸۵ بیان mRNA ژن $MUC_2$ به طور خطی در ژوژنوم و ایلئوم جوجه‌های گوشتی افزایش یافت (۲۳). افزایش ترئونین جیره سبب افزایش فراوانی mRNA این ژن در ۱۴ روزگی شد، لذا با توجه به آن که ویتامینE، سیزامین و تیموکوئین احتمالا سبب بهبود سیستم هضمی و دسترسی بیشتر مواد مغذی نظیر پروتیئن و آمینواسیدها برای پرنده می‌شوند، افزایش بیان ژن $MUC_2$ منطقی به نظر می‌رسد (۸). تنظیم بیولوژیک میزان گلیکوزیله شدن کربوهیدرات و پروتئین به منظور سنتز موسین تحت تاثیر عواملی چون قابلیت دسترسی سوبستراهای آنزیم‌های گلیکوزیل ترانسفراز، انتقال گلیکوپروتئین‌ها و تجزیه آنها قرار دارد (۲۳). سلول‌های گابلت با استفاده از گلوکز و تبدیل آن به کربوهیدراتی که توانایی شرکت در ساختمان نوکلئوتید را دارد، برای گلیکولیزه نمودن پروتئین موسین استفاده می‌نمایند (۴۱). در این مطالعه استفاده از جیره‌های مکمل با سطوح مختلف ویتامین E، سیزامین و تیموکوئین سبب بهبود کارایی استفاده از کربوهیدرات و پروتئین و به تبع از آن افزایش تولید ترشح $MUC_2$ در ژوژنوم شده است. میکروفلور روده می‌تواند روی ترکیب موکوس سلول‌های گابلت تاثیر بگذارد، ولی تعداد سلول‌های گابلت محتوی موسین‌های اسیدی و خنثی در ژوژنوم و ایلئوم تحت تاثیر فلور میکروبی محیط تغییری ننمود (۱۹). احتمالاً تنظیم ژن $MUC_2$ بر تعادل بین فاکتورهای رونویسی تنظیمی مثبت و منفی استوار است که بر یکپارچگی لایه مخاطی و جذب مواد مغذی تأثیر گذاشته و معمولا تحت تاثیر فاکتور و عامل شروع ۵ که بر میزان چرخش و ترنآور mRNA موثر است واقع می‌شود (۱۲). سایتوکین‌ها، فاکتورهای محرک رشد، تولیدات باکتریایی (۴۵) و هر عاملی که باعث ایجاد تغییر در سلول‌های گابلت شود، می‌توانند بیان ژن $MUC_2$ را تحت تاثیر قرار دهند (۱۲). ترکیبات فعال موجود در گیاهان ممکن است با اثرات تجمعی برHap A که یک پروتئیناز خارج سلولی است سبب افزایش و تجمع $MUC_2$ در مجرای گوارشی شوند (۳۵). احتمالا افزایش بیان $MUC_2$ در تیمارهای تغذیه شده با مکمل گیاهان دارویی می‌تواند به علت تاثیر مواد موثر موجود با تولید یا تغییر فعالیت فاکتورهای رونویسی موثر در

رونوشت‌برداری ژن MUC 2 از جمله GATA و FOX باشد (٤٦).

## نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که اغلب صفات مورد مطالعه به صورت مثبت تحت تاثیر پاسخ به تیمارها قرار گرفتند. اثرات مشاهده شده احتمالا به دلیل وجود خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، کاهنده هیستامین، افزایش دهنده سیستم ایمنی و موثر بر هضم و جذب ترکیبات مغذی در مجرای دستگاه گوارش، می‌باشد. ترکیبات سیزامین و تیموکوئینون دارای اثرات پری‌بیوتیکی هستند که از طریق تحریک انتخابی رشد و فعالیت باکتری‌های مفید دستگاه گوارش اثرات مفیدی را برای حیوان میزبان ایجاد می‌نمایند و با تاثیر افزایشی در تراکم سلول‌های گابلت سبب ایجاد تغییرات دینامیکی در ترشح موسین شده و با تحت تأثیر قرار دادن ویسکوزیته موکوس و افزایش لایهٔ موکوسی، بهبود سیستم ایمنی را منجر شدند.

## منابع


1. Abbasnezhad A.A. 2015. Physiological effects of *Nigella sativa* seed on different body systems: A review study. *The Horizon of Medical Sciences*, 21:71-81.

2. AOAC. 2005. Official methods of analysis, Association of official analytical chemists. AOAC Press, Gaithersburg, USA.

3. Al-Jishi S.A., Abuo Hozaifa B .2003. Effect of *Nigella sativa* on blood hemostatic function in rats. *Journal of Ethnopharmacolgy*, 85(1):7-14.

4. Aliakbarpour H.R., Chamani M., Rahimi M., Sadeghi A.A., Qujeq D. 2012. The bacillus subtilis and lactic acid bacteria probiotics influences intestinal mucin gene expression, histomorphology and growth performance in broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(9):1285-1293.

5. Ashayerizadeh O., Dastar B., Shams Shargh M. 2009. Use of garlic (Allium sativum), black cumin seeds (*Nigella sativa L.*) and wild mint (*Mentha longifolia*) in broiler chickens' diets. *Journal of Animal Veterinary Advance*, 8(9):1860-1863.

6. Ait M.L., Ait M. H., Elabbadi N .2007. Anti-tumor properties of black seed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(6):839-847.

7. Azzam M.M., Zou X.T., Dong X.Y., Xie P. 2011. Effect of supplemental L-threonine on mucin 2 gene expression and intestine mucosal immune and digestive enzymes activities of laying hens in environments with high temperature and humidity. *Poultry Sciences*, 90(10):2251-2256.

8. Azeem T., Zaib UrRehman, Umar S., Asif M., Arif M., Rahman A. 2014. Effect of *Nigella Sativa* on poultry health and production: *A Review of Scientifics Letters*, 2(2):76-82.

9. Badary O.A., Gamal El-Din A.M. 2001. Inhibitory effects of thymoquinone against 20-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis. *Cancer Detection Prevention*, 25:362 –328.

10. Barnett T.C., Bugrysheva J., VScott J.R. 2007. Role of mRNA stability in growth phase regulation of gene expression in the group A streptococcus. *Journal of Bacteriology*, 189:1866-1873.

11. Birchenough G.M., Nystrom E.E., Johansson M.E., Hansson G.C. 2016. A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. *Science*, 352:1535-1542.

12. Cheadle C., Fan J., Cho-Chung Y.S., Werner T., Ray J.2005. Stability regulation of mRNA and the control of gene expression. *Annual Academy Sciences*, 1058:196-204.

13. Chen K.L., Kho W.L., You S.H. 2009. Effects of Bacillus subtilis var. natto and Saccharomyces cerevisiae mixed fermented feed on the enhanced growth performance of broilers. *Poultry Science*, 88:309-315.

total extracts and essential oil of *Nigella sativa* L seeds in mice. *Pharmacology Online*, 2:429-435.

25. Jamroz D., Wertelecki T., Houszka M., Kamel C. 2006. Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90:255-268.

26. Johansson M.E., Sjovall H., Hansson G.C. 2013. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatology*, 10:352-361.

27. Kabir S.M.L. 2009. The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molocular Sciences*, 10:3531-3546.

28. Kamali-Sangani A., Masoudi A., Hosseini. S. 2014. The effects of herbal plants on Mucin 2 gene expression and performance in ascetic broilers. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 8(1):47-52.

29. Kagnoff M.F. 1993. Immunology of the intestinal tract antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medical Chemistry*,10.813-829.

30. Kato J.M., Alex C., Laurence B. D., Norman G.L. 1988. Biosynthesis of antioxidant lignans in *Sesamum indicum* seeds. *Photochemistry*, 47:583-592.

31. Khan S.H., Anjum M.A., Parveen A., Khawaja T., Ashraf N.M. 2013. Effects of black cumin seed (*Nigella sativa* L.) on performance and immune system in newly evolved crossbred laying hens. *Veterinary Quart*, 33(1):13-19.

32. Law G.K., Bertolo R.F., Adjiri Awere A., Pencharz P.B., Ball R.O. 2007. Adequate oral threonine is critical for mucin production and gut function in neonatal piglets. *American Journal of Physiology Gastrology*, 292:1293-1301.

33. Lev R., Spicer S.S. 1964. Specific staining of sulphate groups with Alcian blue at low pH. *Journal of Histochemical and Cytochemistry*, 12:309-310.

14. Cooney R.V., Custer L.J., Okinaka L., Franke A.A. 2001. Effects of dietary sesame seeds on plasma tocopherol levels. *Nutrition and Cancer*, 39(1):66-71.

15. Duncan D.B. 1995. Multiple range test and F-test. *Biometrics*, 11:1-42.

16. Erf G.F. 2004. Cell-Mediated immunity in poultry. *Poultry Science*, 83:580-590.

17. Farrag A.R., Mahdy K.A., Abdel Rahman G.H., Osfor M.M. 2007. Protective effect of *Nigella sativa* seeds against lead-induced hepatorenal damage in male rats. *Pakistan Journal of Biology Sciences*, 10(17):2809-2816.

18. Flint J.F., Garner M.R. 2009. Feeding beneficial bacteria: A natural solution for increasing efficiency and decreasing pathogens in animal agriculture. *Journal of Applied Poultry Reproduction*, 18:367-378.

19. Forder R.E.A., Howarth G. S., Tivey D.R., Hughes. R.J. 2007. Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early post-hatch development of poultry. *Poultry Science*, 86:2396-2403.

20. Gilani A., Jabeen Q., Ullah Khan M. 2004. A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Nigella sativa*. *Pakistan Journal of Biology Sciences*,7441–451.

21. Hernandez F., Madrid J., Garcia V., Orengo J., Megias M.D. 2004. Influence of two plant extracts on broiler performance digestibility and digestive organ size. *Journal of Poultry Science*, 83:169-174.

22. Hoan N., Khoa M. 2016. The Effect of different levels of sesame oil on productive performance, egg yolk and blood serum lipid profile in laying hens. *Open Journal of Animal Sciences*, 6:85-93.

23. Horn N.L., Donkin S.S., Applegate T.J., Adeola O. 2009. Intestinal mucin dynamics. Response of broiler chicks and white Pekin ducklings to dietary threonine. *Poultry Sciences*, 88:1906-1914.

24. Hosseinzadeh H., Fazl Bazzaz B.S., Haghi M.M. 2007. Antibacterial activity of

supplementation. *American Society for Nutritional Sciences*, 67:90-105.

43. Smirnov A., Tako E., Ferket., P.R, Uni Z. 2006. Mucin gene expression and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by In-ovo feeding of carbohydrates. *Poultry Science Journal*, 85:669-673.

44. Talebi A., Maham M., Asri-Rezaei S. 2021. Effects of *Nigella sativa* on performance, blood profiles, and antibody titer against Newcastle disease in broilers. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 10:2-15.

45. Thompson K.L., Applegate T.J. 2006. Food withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broilers. *Poultry Sciences*, 85:1535-1540.

46. Van Der Sluis M., Vincent A., Bouma J. 2008. Forkhead box transcription factors Foxa1 and Foxa2 are important regulators of Muc2 mucin expression in intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Research Communication*, 369:1108-1113.

47. Vali N. 2008. The Japanese quail. A Review. *International Journal of Poultry Science*, 7:925-931.

48. Verma J., Johri T.S., Swain B. 2004. Effect of graded levels of aflatoxin, ochratoxin and their combinations on the performance and immune response of broilers. *British Poultry Sciences*, 45:512-518.

49. Yamashita K., Nohara Y., Katayama Y., Namiki M. 1992. Sesame seed lignans and gamma tocopherol act synergistically to produce vitamin E activity in rats. *Journal of Nutrition*, 122(12):2440-2446.

50. Yesilbag D., Gezen S.S, Biricik H., Bulbul T. 2012. Effects of a rosemary and oregano volatile oil mixture on performance, lipid oxidation of meat and hematological parameters in Pharaoh quails. *British Poultry Science*, 53:89-97.

34. NRC, National Research Council. 1994. Nutrient requirements of poultry.9th Rev.Ed., Washington, DC. National Academy Press.

35. Montagne L., Piel C., Lalles J.P. 2004. Effect of diet on mucin kinetics and composition: nutrition and health implications. *Nutrition Reviews*, 62:105–14.

36. Nikzad M., Mirdar S. 2020. Inhibitory effects of *Nigella sativa* nano-capsule on the expression of cyclin D1 in the lungs of wistar rats exposed to nicotine-derived nitrosamine ketone. *Journal of Medicinal Plants*,19(74):118-128.

37. Pahlavan-Afshari K., Sanaan H. 2022. Effect of dietary levels of lavender oil on Muc2 gene expression in broiler chickens', *Journal of Animal Environment*, 14(2):113-122.

38. Salim H., Kang H., Akter N., Kim D., Kim J., Kim M., Na J., Jong H., Choi H. and Suh O. 2013. Supplementation of direct fed microbials as an alternative to antibiotic on growth performance, immune response, cecal microbial population and ileal morphology of broiler chickens. *Poultry Sciences*, 92:2084-2090.

39. SAS Institute. 2001. SAS.STAT user's guide for personal computer. Release 6.12 SAS Institute, Inc., Cary, N.C., USA.

40. Sepehri-Moghaddam H., Kermanshahi H., Heravi A., Raji A. 2010. The effect of vitamin A on mucin 2 gene expression, intestinal histology and performance of broiler chickens. *Global Veterinaria*, 5:168-174.

41. Smirnov. A, Sklan. D, Uni Z. 2004. Mucin dynamics in the chick small intestine is altered by starvation. *Journal of Nutrition*,134:736-742.

42. Smirnov A., Perez R., Romach E.A, Sklan D., Uni Z. 2005. Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter

# Effect of Different Levels of Dietary Vitamin E, Sesamin and Thymoquinone Supplementation on Cell Mediated Immunity Challenges, Morphology, Intestinal Microbial Population and MUC2 Gene Expression in Laying Japanese Quails

**Yaser Rahimian, Farshid. Kheiri*, Mostafa. Faghani**

Department of Animal Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

## Abstract

In order to investigate the effect of consuming diets supplemented with different levels of vitamin E, sesamin and thymoquinone on cellular immune system challenges, intestinal morphology, intestinal microbial population and MUC2 gene expression in laying Japanese quails, 210 female Japanese quails aged 85-35 days with 7 experimental treatments including the control group and those consuming vitamin E, thymoquinone and sesamin at levels of 100 and 200 ml.gram/kg of standard feed was used with 5 repetitions and 6 pieces of laying quail in each repetition. At the end of the period (85 days), after killing two quails from each repetition, the relative weight of thymus, spleen and bursa of fabricius and the liver enzymes activity indices such as albumin, alkaline phosphatase (ALP), alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) were investigated. Dinitrochlorobenzene sensitization challenge test and response to the injection of mitogen phytohemagglutinin into the left wing web were studied. Sampling was done to evaluate the morphology of the intestinal tissue and the microbial flora population of the small intestine. To investigate the expression of MUC2 gene, samples from jejunum were collected and RT-PCR method was performed. The results showed that the consumption of supplemented diets caused a significant increase in the bursa.f relative weight ($p \leq 0.05$) and a non-significant improvement of the liver enzyemes activity ($p \geq 0.05$). The significant increase of beneficial microbial flora (Lactobacillus) and decrease of the colony population of (Escherichia coli and Salmonella enterica) bacteria in the intestine along with the increase in the surface of the villi and the density of the number of goblet cells indicated the beneficial effects of the active compounds used in improving the health status of quails ($p \leq 0.05$). Consuming supplemented diets with levels of vitamin E, sesamin and thymoquinone caused an increase in MUC2 mRNA expression in the intestine. The results showed the benefits of vitamin E, sesamin and thymoquinone consumption on cell mediated mediated immunity, intestinal morphology, intestinal microbial flora and MUC2 mRNA expression in laying Japanese quails.

**Keywords:** Sesamin, Thymoquinone, Vitamin E, Cell mediated immunity, MUC2 gene expression, Laying Japanese quail.