

بررسی بیان ژن پروتئین شوک حرارتی 70 (HSP70) مغز، هورمون تیروئیدی T4، صفات ایمنی و عملکردی جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح مختلف خاکشیر (*Descurainia sophia*) در شرایط تنش گرمایی

• محمد کاظم نطافی

گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

• سید رضا هاشمی (نویسنده مسئول)

گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

• یوسف جعفری آهنگری

گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

• سعید حسینی

گروه ژنتیک و اصلاح نژاد دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

• احد یامچی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

• پویا پارسایی

دامپزشکی، گرگان، گلستان



تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۰۴-۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹-۰۸-۰۳

Email: hashemi711@yahoo.com

چکیده

تنش گرمایی یکی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر عملکرد و سلامت طیور بوده و مواجهه با آن از چالش‌های مهم در صنایع پرورش طیور است. استفاده از ترکیباتی با خواص آنتی‌اکسیدانی مانند گیاهان دارویی در جهت کاهش آثار تنش گرمایی در طیور توصیه می‌شود. به منظور بررسی اثرات سطوح مختلف خاکشیر بر صفات عملکردی، هورمون تیروکسین و پاسخ HSP70 در جوجه‌های گوشتی در زمان تنش حرارتی حاد، تعداد ۳۰۰ قطعه جوجه گوشتی یک‌روزه سویه هوبارد در چهار تیمار و پنج تکرار در نظر گرفته شد. گروه‌های آزمایشی شامل: گروه شاهد یا جیره پایه، جیره پایه مکمل شده با نیم درصد خاکشیر، جیره پایه مکمل شده با یک و دو درصد خاکشیر بودند. تنش گرمایی از روز ۳۵ تا ۴۲ دوره پرورش روزانه چهار ساعت با دمای 34 ± 1 درجه سانتی‌گراد اعمال شد. به منظور بررسی پارامترهای هورمونی، سیستم ایمنی و آزمایشات مولکولی در روز ۴۲ پرورش خونگیری انجام و از مغز پنج جوجه از هر تیمار نمونه‌برداری شد. نتایج پژوهش بیانگر این است که سطوح مختلف خاکشیر بر صفات عملکردی و وزن اندام‌های لنفوای در طیور اثر معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). کمترین میزان هتروفیل و بیشترین میزان لنفوسیت در تیمار خاکشیر ۱٪ و ۲٪ مشاهده شد ($P < 0.05$) و افزایش بیان HSP70 و افزایش غلظت هورمون T4 در تیمار ۲٪ خاکشیر مشاهده شد ($P < 0.05$). به طور کلی اضافه کردن خاکشیر (۱٪ و ۲٪) به عنوان عامل کاهش دهنده آسیب‌های ناشی از تنش گرمایی محسوب شده و می‌تواند به عنوان افزودنی و مکمل در خوراک طیور مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: پروتئین شوک حرارتی، خاکشیر، هورمون T4، جوجه گوشتی، تنش گرمایی حاد

• Veterinary Researches & Biological Products No 133 pp: 158-167

Evaluation of the heat shock protein 70 gene expression in brain, T4 hormone, immune characterization and performance parameters on broilers chicken fed different levels of *Descurainia sophia* under acute heat stress conditions

By: Nataghi, M. K., Department of Animal Physiology, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural and Natural Resources. Hashemi, S. R., (Corresponding Author) Department of Animal Physiology, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural and Natural Resources. Jafari Ahangari, Y., Department of Animal Physiology, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural and Natural Resources. Hasani, S., Department of Genetics and Animal Breeding, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural and Natural Resources. Yamchi, A., Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural and Natural Resources. and Parsaei, P., Doctor of Veterinary Medicine, Gorgan, Golestan.

Received: 2020-07-11

Accepted: 2020-10-24

Email: hashemi711@yahoo.com

Heat stress is one of the most important effective factors on performance and health and exposure to heat stress is one of the major challenges in poultry industry. Therefore, consuming compounds with antioxidant properties such as herbs are recommended to reduce heat stress effects. A total of 300 one-day-old broiler chicks (Hubbard) were randomly divided to four treatments and five replicates due to the investigate of different levels *Descurainia sophia* on performance, immune system, T4 thyroid hormone and responses of HSP70 in broiler's brain under acute heat stress condition. Treatments were included: control treatment (basal diet), basal diet with 0.5% *Descurainia sophia*, basal diet with 1% *Descurainia sophia* and basal diet with 2% *Descurainia sophia*. Heat stress were exposed on d 35 to 42 ($34 \pm 1^\circ\text{C}$) for 4 hours. In order to evaluate the hormone parameters, immune system and molecular experiments five chickens from each treatment were slaughtered and blood and brain sampling were performed on d 42 of experiment. The results of experiment showed that the treatments had no significant difference on performance parameters and lymphoid organs weight in poultry ($P > 0.05$). The least ratio of heterophile and the maximum ratio of lymphocyte were observed in 1% and 2% *Descurainia sophia* treatments and increasing the expression of HSP70 and T4 hormone concentration were observed in 2% *Descurainia sophia* treatment ($P < 0.05$). In conclusion, the results showed that 1% and 2% *Descurainia sophia* is considered as a reducing agent in heat stress injuries and could be used as supplement and feed additive in poultry nutrition.

Keyword: Heat shock protein, *Descurainia sophia*, T4 hormone, Broiler chickens, Acute heat stress

مقدمه

فابرسیوس) می‌گذارد (۱۳). یکی از پیامدهای اصلی تنش حرارتی بر سلول‌ها، دناتوره شدن پروتئین‌ها و به دنبال آن تخریب پروتئین‌ها می‌باشد (۱۵). علاوه بر تخریب پروتئین‌ها، تولید پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) عکس‌العمل مولکولی در طیور در پاسخ به تنش حرارتی است. این پروتئین‌ها عضوی از خانواده بزرگ پروتئین‌های تنش می‌باشند که در پاسخ به تنش‌هایی همچون کمبود مواد غذایی، کمبود اکسیژن، اختلالات متابولیکی، فاگوسیتوز، حضور رادیکال‌های آزاد و تنش حرارتی تولید می‌شوند. تنش حرارتی به نوبه خود می‌تواند موجب افزایش رادیکال‌های آزاد و تنش آکسایشی در طیور باشد. بدین منظور، امروزه از راهکارهای مختلفی برای تقویت سیستم ایمنی در شرایط تنش گرمایی برای مقابله با افزایش استرس‌های فیزیولوژیکی، گرمایی و آکسایشی استفاده می‌شود

تنش‌های فیزیولوژیکی در صنعت طیور یک مسئله اجتناب ناپذیر بوده و هر عاملی که سبب انحراف پرندگی از محدوده رفاه و آسایش شود، عامل تنش‌زا یا تنش نامیده می‌شود. عوامل بسیاری سبب تنش‌های فیزیولوژیکی می‌شوند. پرندگان در منطقه‌ای از درجه حرارت محیط به نام منطقه آسایش حرارتی (۲۲ تا ۲۳ درجه سانتیگراد) با صرف کمترین مقدار انرژی درجه حرارت بدن خود را ثابت نگه می‌دارند. درجه حرارت بالاتر از این منطقه حرارتی، باعث آثار نامطلوب گرما یا تنش حرارتی خواهد شد (۱۰). تنش حرارتی حاد اشاره به دوره‌های کوتاه مدت و ناگهانی درجه حرارت بسیار بالا دارد و آثار نامطلوبی بر عملکرد، سیستم ایمنی طیور، هورمون‌های تیروئیدی و اندام‌های لنفاوی (تیموس، طحال و بورس

هورمون تیروئیدی T4، صفات ایمنی و عملکردی جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح مختلف خاکشیر (*Descurainia sophia*) در شرایط تنش گرمایی حاد بوده است.

مواد و روش‌ها

شرایط پرورش و گروه‌های آزمایشی

پژوهش حاضر در یک فارم تجاری در استان گلستان، شهرستان گرگان به مدت ۴۲ روز انجام گردید. آزمایش حاضر با تعداد ۳۰۰ قطعه جوجه گوشتی یک روزه سویه هوبارد در چهار تیمار و پنج تکرار (هر تکرار حاوی ۱۵ قطعه جوجه) تنظیم گردید. جیره پایه برای هر یک از دوره‌های آغازین و رشد براساس راهنمای نگهداری سویه هوبارد فراهم شد (جدول- ۱). گروه‌های آزمایشی شامل: گروه شاهد (C) یا جیره پایه بدون خاکشیر، جیره پایه مکمل شده با ۵٪ خاکشیر، جیره پایه مکمل شده با ۱٪ خاکشیر و جیره پایه مکمل شده با ۲٪ خاکشیر بودند. به منظور اعمال تنش حرارتی از روز ۳۵ تا ۴۲ دوره‌ی پرورش، دمای سالن روزانه از ساعت ۱۲ الی ۱۶ به مدت چهار ساعت با استفاده از هیتر به 34 ± 1 درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد.

بررسی پارامترهای عملکردی، ایمنی و هورمونی

به منظور اندازه‌گیری پارامترهای عملکردی (افزایش وزن، خوراک مصرفی و ضریب تبدیل غذایی) میانگین وزن بدن، متوسط خوراک مصرفی و تفاضل مقدار خوراک مصرفی بر افزایش وزن در پایان هر هفته، محاسبه گردید (۲۴). به منظور بررسی نسبت هتروفیل به لنفوسیت در روز ۴۲ دوره پرورش، پنج پرند از هر واحد آزمایشی انتخاب و ۳۰ دقیقه قبل از پایان تنش، خونگیری از سیاهرگ بال انجام شد و برای اندازه‌گیری نسبت هتروفیل به لنفوسیت به لوله آغشته به EDTA منتقل گردید. تعیین نسبت هتروفیل به لنفوسیت، با روش رنگ‌آمیزی گیمسای انجام شد و برای تعیین نسبت هتروفیل به لنفوسیت از میکروسکوپ نوری مدل Carl Zeiss Germany با عدسی ۱۰۰ و شمارش به شیوه ماریچی شکل استفاده شد (۲۰). در پایان دوره پرورش، از هر واحد آزمایشی دو قطعه جوجه که از نظر وزنی به میانگین وزن آن واحد آزمایشی نزدیک بودند، انتخاب و توزین شدند و پس از کشتار وزن اندام‌های لنفی (بورس فابریسیوس و طحال) با استفاده از ترازوی دیجیتال (Germany, gf600) با دقت gr ۰/۰۰۱ اندازه‌گیری شدند و وزن اندام‌های مورد نظر با توجه به وزن پرندگان بیان شدند. در روز ۴۲ دوره پرورش برای بررسی میزان هورمون تیروئیدی T4 از هر تکرار دو پرند انتخاب و از هر کدام ۲ سی‌سی از سیاهرگ بال خونگیری شد که پس از جداسازی سرم با استفاده از کیت الایزا (ELISA Kit-T4- ab108661) میزان هورمون T4 اندازه‌گیری شد.

بررسی مولکولی

به منظور آزمایشات مولکولی و بررسی پروتئین شوک حرارتی ۷۰ در روز ۴۲ دوره پرورش پس از تنش حرارتی نمونه‌برداری از بافت مغز پنج طیور از هر تیمار انجام شد. استخراج RNA کل با استفاده از کیت ترایزول شرکت سیگما آلدریج امریکا (SIGMA-ALDRICH-) با استفاده از کیت ترایزول (100ml-T9242) صورت گرفت (۶). بررسی تعیین کیفیت RNA با

(۲۲). یکی از این راهکارها استفاده از انواع آنتی‌اکسیدان‌ها و یا گیاهان حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند گیاهان دارویی می‌باشد. گیاهان دارویی گیاهانی هستند که در آنها مواد خاصی به نام مواد مؤثره (مواد فعال) ساخته و ذخیره می‌شوند که این مواد تأثیر فیزیولوژیکی بر بدن موجودات زنده می‌گذارند. از بسیاری از این گیاهان برای مداوای برخی بیماری‌ها استفاده می‌شود. مواد فعال در طی یک سلسله فرآیندهای ویژه و پیچیده، به مقدار بسیار کم ساخته می‌شوند و به متابولیت‌های ثانویه (Secondary metabolite) معروف‌اند. متابولیت‌های ثانویه در گیاهان شامل آلکالوئیدها (Alkaloid)، گلیکوزیدها (Glycoside)، فلاونوئیدها (flavonoids)، اسانس‌ها (Essence)، تانن‌ها (Tannin) و ترکیبات فنلی (Phenol) می‌باشند. از جمله فعالیت‌های مهم بیولوژیکی گیاهان دارویی می‌توان به خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریالی آنها اشاره کرد که به دلیل وجود ترکیباتی مانند کارواکرول، تیمول، سینول، آلیسین، کاپسایسین و پیرین می‌باشد (۵). انواعی از گیاهان دارویی که در تنش‌های فیزیولوژیکی و گرمایی در جوجه‌های گوشتی مد نظر قرار می‌گیرند: آویشن، نعناع، پونه کوهی، رزماری، خار مریم، رازیانه، سیر و خاکشیر می‌باشند. اضافه کردن این افزودنی‌های غذایی در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی، به منظور بهبود عملکرد و سلامت حیوان صورت می‌گیرد. با توجه به مواد بیولوژیکی خاصی که در هر گیاه دارویی وجود دارد، تأثیرات متفاوتی از آنها به اثبات رسیده است. بعضی از گیاهان دارویی مانند پونه و نعناع قابلیت دسترسی مواد غذایی ضروری را در روده افزایش داده و باعث تقویت سیستم ایمنی بدن حیوان می‌گردند که این امر خود به رشد بهتر و سلامت حیوان کمک می‌کند (۹). همچنین مخلوطی از گیاهان گزنه، پونه و کاکوتی در جوجه‌های گوشتی موجب بهبود عملکرد و صفات لاشه در جوجه‌های گوشتی می‌گردد. در میان انواع گیاهان دارویی، خاکشیر (*Descurainia sophia*) با نام قدیمی *Sisymbrium sophia* از خانواده شب بویان (Cruciferae) است و طول عمر یک تا دو ساله داشته، منبع غنی از انواع ترکیبات مانند قندهای ساده، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب بوده و سه فلاونوئید یعنی کامفرول، کوارستین و مشتقات ایزورامنتین و ۱۵ مشتق فلاونوئید در ترکیب دانه خاکشیر مشخص شده است (۱۴). دانه خاکشیر در اکثر مناطق جغرافیایی به خصوص در چین و هند با تراکم بالا یافت می‌شود و در برخی مناطق به علت تلخی آن کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. از زمان قدیم در چین از آن برای رفع مشکلاتی مانند سرفه و جلوگیری از آسم استفاده می‌شد. همچنین از آن به عنوان ملین، تب‌بر، ضد خارش و دیگر موارد استفاده می‌گردد. حکمای طب سنتی معتقدند که خاکشیر برای تقویت معده و هاضمه و برای کاهش عوارض بیماری‌هایی مانند سرخجه، سرخک، آبله و مخمک مفید می‌باشد. گیاه دارویی خاکشیر به علت داشتن غلظت بالای پرولین در مکانیسم محافظت از متابولیسم سلولی و بهبود وضعیت بعد از تنش در طیور گوشتی دخالت داشته و مانند انواع متنوعی از گیاهان دارویی می‌تواند اثرات تنش گرمایی را در طیور کاهش دهند (۱۱). همچنین خاکشیر می‌تواند موجب بهبود عملکرد، افزایش وزن، افزایش اشتها پرندگان و بهبود رشد شود. همچنین اثر مثبت خاکشیر بر بهبود و تقویت سیستم ایمنی طیور نیز گزارش شده است (۱۸). بنابراین هدف پژوهش حاضر، بررسی بیان ژن پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (HSP70) مغز،

منتقل و تکثیر شد (۲). طراحی آغازگرهای اختصاصی و مرجع به کمک اطلاعات موجود در پایگاه اینترنتی NCBI و همچنین نرم افزار AllelID 7.5 صورت گرفت. ساخت آغازگرها توسط شرکت پیشگامان انجام شد. مشخصات آغازگرها در جدول دو نشان داده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی (Quantitative real-time PCR) با استفاده از تکنولوژی رنگ سایپرگرین (SYBR Green I بیوپارس) با

استفاده از ژل آگارز (Type I- Merck) در تانک الکتروفورز (Bio-Rad-) انجام و صحت استخراج Total RNA تأیید شد. ساخت رشته اول و دوم cDNA با استفاده از آغازگر Oligo dT (Oligo dT 18Primer SO132- Fermentas-USA)، آنزیم RT Reverse (Transcriptase-0441 Fermentas-USA) انجام به دستگاه PCR (Thermal Cycler)، مدل T100™، ساخت شرکت BIO-RAD آمریکا)

جدول ۱- ترکیب جیره‌های آزمایشی (بر حسب درصد هوا خشک).

ترکیبات جیره	آغازین (۱-۲۱)	رشد (۲۲-۴۲)
ذرت	۵۳/۷	۵۹/۹۶
کنجاله سویا	۳۹/۵۲	۳۳/۲۵
روغن سویا	۳	۳/۴۱
دی کلسیم فسفات	۱/۴۷	۱/۰۹
سنگ آهک	۱/۱۹	۱/۲۹
نمک	۰/۴۳	۰/۳۲
مکمل ویتامینی	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل معدنی	۰/۲۵	۰/۲۵
DL متیونین	۰/۱۳	۰/۰۵
L لیزین	۰/۰۶	۰/۱۳
آنالیز خوراک		
انرژی قابل متابولیسم (Kcal/Kg)	۳۹۵۰	۳۰۵۰
پروتئین خام (%)	۲۱/۲	۱۹/۰۶
کلسیم (%)	۰/۹۲	۰/۸۶
فسفر (%)	۰/۴۱	۰/۳۳
سدیم (%)	۰/۱۸	۰/۱۴
لیزین (%)	۱/۰۱	۰/۹۵
متیونین (%)	۰/۴۷	۰/۳۶
سیستئین (%)	۰/۳۶	۰/۳۷
آرژنین (%)	۱/۴۵	۱/۲۷
ترئونین (%)	۰/۸۴	۰/۷۴

هر Kg خوراک حاوی: ویتامین A ۱۵۰۰ واحد بین‌المللی، کوله کلسیفرول ۲۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین E ۱۰ واحد بین‌المللی، ریوفلاوین mg ۳/۵، پانتوتنیک اسید mg ۱۰، نیاسین mg ۳۰، کولین کلرید mg ۱۰۰۰، بیوتین mg ۰/۱۵، اسید فولیک mg ۰/۵، پیریدوکسین mg ۳، آهن mg ۸۰، روی mg ۴۰، منگنز mg ۶۰، ید mg ۰/۱۸، مس mg ۸، سلنیوم mg ۰/۱۵ و کوبالامین mg ۱۵.

که سطوح مختلف خاکشیر بر عملکرد جوجه‌های گوشتی تحت تنش حرارتی حاد اثر معنی‌داری نداشته است ($P > 0.05$).

تعداد و نسبت هتروفیل به لنفوسیت

اثر گروه‌های آزمایشی بر تعداد و نسبت هتروفیل به لنفوسیت در روز ۴۲ دوره پرورش در جدول ۵ نشان داده شده است. سطوح مختلف خاکشیر بر میزان هتروفیل، لنفوسیت و همچنین نسبت هتروفیل به لنفوسیت اثر معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$). کمترین میزان هتروفیل و بیشترین میزان لنفوسیت در مقایسه با تیمار شاهد در گروه‌های آزمایشی حاوی ۱٪ و ۲٪ خاکشیر مشاهده شد ($P < 0.05$).

وزن اندام‌های لنفاوی (بوس فابرسیوس و طحال)

اثر گروه‌های آزمایشی بر وزن اندام‌های لنفاوی (بوس فابرسیوس و طحال) در روز ۴۲ دوره پرورش در جدول ۶ گزارش شده است. گروه‌های آزمایشی بر وزن طحال و بوس فابرسیوس جوجه‌های گوشتی

تکنیک Real-Time PCR (Thermal Cycler iQ5 Multicolor Real-Time PCR، ساخت شرکت BIO-RAD آمریکا) انجام شد (جدول ۳ - ۲). اندازه‌گیری مقادیر افزایش یا کاهش میزان بیان ژن‌های مورد نظر در تیمارهای مختلف توسط نرم‌افزار GenEX و با استفاده از فرمول لیواک $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برابر است با ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیبراتور (۱۲) و با استفاده از داده‌های خروجی از نرم‌افزار iQ5 انجام گرفت. داده‌های بدست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS (SAS 9.1) (Statistical Analysis System)، تجزیه واریانس شد و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۰/۰۵ صورت گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

پارامترهای عملکردی

اثر گروه‌های آزمایشی بر خصوصیات عملکردی جوجه‌های گوشتی در دوره‌های مختلف در جدول ۴ گزارش شده است. نتایج بیانگر این است

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای اختصاصی و خانه‌دار.

نام ژن	توالی آغازگر	دمای اتصال (°C)	طول محصول (bp)
HSP70	5'-TGTGTCCATCCTTACCATTGAG-3' 5'-GCTTGTGCTTACCCTTGAAGCTC-3'	۵۹	۱۴۵
Beta-Actin	5'-GTGATGGACTCTGGTGATGG-3' 5'-TGGTGAAGCTGTAGCCTCTC-3'	۵۹	۱۵۰

جدول ۳- شرایط دمایی Real time PCR.

فرآیند	تعداد چرخه	دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)	مدت زمان
واسرشت	۱	۹۴	۳ دقیقه
واسرشت	۴۰	۹۴	۱۰ ثانیه
اتصال	۴۰	*	۱۵ ثانیه
تکثیر	۴۰	۷۲	۱۵ ثانیه
خوانش سیگنال	۱	۷۸	۲۰ ثانیه
منحنی ذوب	۸۱	۵۵-۹۵	۵ دقیقه

* دمای اتصال بسته به نوع پرایمر مورد بررسی متغیر می‌باشد.

میزان بیان ژن HSP70 در بافت مغز

اثر گروه‌های آزمایشی بر میزان بیان ژن HSP70 در شکل- ۱ مشخص شده است. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که بیشترین میزان بیان ژن HSP70 مربوط به جیره حاوی ۲٪ خاکشیر بوده ($P < 0/05$) و گروه‌های حاوی ۱/۵٪ درصد خاکشیر تفاوت معنی‌داری در میزان بیان ژن HSP70 با گروه شاهد نداشته‌اند ($P > 0/05$).

بحث

تنش گرمایی در محدوده ۳۲ درجه سانتی‌گراد سبب کاهش مصرف خوراک به میزان ۱۴٪ در سن چهار هفتگی و ۲۴٪ در سن شش هفتگی

تحت تنش حرارتی حاد اثر معنی‌داری نداشتند ($P > 0/05$).

میزان هورمون تیروکسین (T4) پلاسما

جدول- ۷ بیانگر میزان هورمون تیروکسین در پلاسما خون جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح مختلف خاکشیر، قبل و بعد از تنش حرارتی حاد در روز ۳۵ و ۴۲ دوره پرورش می‌باشد. نتایج بیانگر آن است که گروه‌های آزمایشی بر میزان هورمون تیروکسین جوجه‌های گوشتی تحت تنش حرارتی حاد در روز ۴۲ دوره پرورش اثر معنی‌داری دارد ($P < 0/05$) و گروه آزمایشی حاوی خاکشیر ۲٪ بیشترین غلظت هورمون تیروکسین را در مقایسه با دیگر گروه‌های آزمایشی و گروه شاهد دارد ($P < 0/05$).

جدول ۴- تأثیر گروه‌های آزمایشی بر پارامترهای عملکردی جوجه‌های گوشتی.

P-Value	SEM	K2	K1	K0.5	C	تیمارهای آزمایشی
روزهای ۲۸ تا ۳۵ دوره پرورش						
۰/۸۶	۳۲/۶۲	۵۱۱/۳۳	۵۴۳/۲۷	۵۲۸/۸۰	۵۴۶/۱۳	افزایش وزن (g)
۰/۱۵	۹/۷۵	۹۵۳/۷۳	۹۴۵/۳۳	۹۲۳/۶۰	۹۵۱/۸۷	مصرف خوراک (g)
۰/۷۰	۰/۱۱	۱/۹۱	۱/۷۴	۱/۷۶	۱/۷۸	ضریب تبدیل
روزهای ۳۵ تا ۴۲ دوره پرورش						
۰/۳۵	۶۸/۱۳	۶۱۰/۱۳	۵۴۵/۰۷	۷۲۱/۰۷	۶۰۹/۳۳	افزایش وزن (g)
۰/۱۷	۲۹/۹۹	۱۰۵۶/۰۰	۱۰۴۲/۱۳	۹۶۸/۲۷	۱۰۵۱/۲۰	مصرف خوراک (g)
۰/۲۳	۰/۱۴	۱/۷۴	۱/۹۲	۱/۴۹	۱/۷۵	ضریب تبدیل

C: جیره پایه، K0.5: جیره پایه مکمل‌شده با ۰/۵٪ خاکشیر، K1: جیره پایه مکمل‌شده با یک درصد خاکشیر و K2: جیره پایه مکمل‌شده با دو درصد خاکشیر. * جوجه‌ها از روز ۳۵ دوره پرورش تا روز ۴۲ به مدت چهار ساعت تحت تنش حرارتی $1 \pm 34^{\circ}C$ قرار گرفتند.

جدول ۵- تأثیر گروه‌های آزمایشی بر تعداد و نسبت هتروفیل به لنفوسیت در روز ۴۲ دوره پرورش.

P-Value	SEM	K2	K1	K0.5	C	تیمارهای آزمایشی
۰/۰۰۵	۱/۹۳	۱۰/۰۰ ^b	۹/۸۰ ^b	۱۷/۸۰ ^a	۱۸/۶۰ ^a	هتروفیل (%)
۰/۰۰۵	۱/۹۳	۵۰/۰۰ ^a	۵۰/۲۰ ^a	۴۲/۲۰ ^b	۴۱/۴۰ ^b	لنفوسیت (%)
۰/۰۱۰	۰/۰۶	۰/۲۰ ^b	۰/۲۰ ^b	۰/۴۳ ^a	۰/۴۶ ^a	هتروفیل به لنفوسیت

در هر ردیف میانگین‌های با حروف متفاوت، دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($P < 0/05$). C: جیره پایه، K0.5: جیره پایه مکمل‌شده با ۰/۵٪ خاکشیر، K1: جیره پایه مکمل‌شده با یک درصد خاکشیر و K2: جیره پایه مکمل‌شده با دو درصد خاکشیر. * جوجه‌ها از روز ۳۵ دوره پرورش تا روز ۴۲ به مدت چهار ساعت تحت تنش حرارتی $1 \pm 34^{\circ}C$ قرار گرفتند.

است که استفاده از سطوح مختلف گیاه داروئی پونه، افزایش متوسط خوراک مصرفی، افزایش وزن روزانه و بهبود ضریب تبدیل با استفاده از سطوح مختلف پونه در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شده است (۷). شرایط محیطی نامساعد میزان حساسیت به بیماری‌ها را افزایش می‌دهد. مطالعات گسترده‌ای تأثیر تنش گرمایی بر فعالیت گلبول‌های سفید را مورد بررسی قرار داده‌اند و نشان داده شده است که تنش گرمایی باعث کاهش تعداد گلبول‌های سفید و افزایش نسبت هتروفیل به لنفوسیت در گردش خون می‌شود (۲۰). بیماری و تنش‌های گرمایی و آکسایشی سبب افزایش شمار هتروفیل‌ها و موجب سرکوب هتروفیل‌ها می‌شود (۲۵). در شرایط تنش گرمایی گلوکوکورتیکوئیدها در خون آزاد می‌شوند و باعث افزایش آزادسازی هتروفیل‌ها از مغز استخوان در نتیجه افزایش شمار هتروفیل‌ها در گردش خون می‌گردد (۲۳). رابطه نزدیکی بین شمار گلبول‌های سفید و تنش در پرندگان وجود دارد. عوامل تنش‌زا با تحریک ACTH و ترشح هورمون‌های غدد فوق‌کلیوی موجب افزایش نسبی تعداد هتروفیل به لنفوسیت در پرندگان می‌شوند. همچنین تنش‌های مختلف همانند تنش گرمایی سبب افزایش نسبت هتروفیل به لنفوسیت می‌شوند (۲۰). تنش حرارتی تأثیر منفی بر تعداد گلبول‌های سفید، تعداد لنفوسیت‌های

می‌شود. تنش حرارتی سبب کاهش مصرف خوراک، کاهش رشد، کاهش کیفیت لاشه، افزایش تلفات، افزایش ضریب تبدیل و کاهش عملکرد طیور می‌شود (۸). تا کنون گزارشی در مورد اثر خاکشیر بر روی طیور گوشتی و تخم‌گذار در شرایط نرمال و تنش گرمایی و سایر تنش‌های فیزیولوژیک ارایه نشده است، با این حال استفاده از پودر نعنای فلفلی به میزان یک درصد چیره با بهبود عملکرد و قابلیت هضم پروتئین به واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی، به عنوان محرک رشد در جوجه‌های گوشتی در شرایط تنش گرمایی پیشنهاد شده است (۳). بر اساس مطالعاتی که بر روی اثرات دارچین و زردچوبه بر جوجه‌های گوشتی تحت تنش حرارتی صورت گرفت، مشاهده شد که مقادیر مشخصی از زردچوبه و دارچین در جیره جوجه‌های گوشتی تحت تنش، منجر به بهبود عملکرد آنها شده است (۴). براساس نتایج پژوهش تهامی و همکاران (۲۰۱۸)، استفاده از مخلوط عصاره گیاهان داروئی گیاهان دارچین، پونه و فلفل منجر به افزایش وزن بدن در کل دوره آزمایش و بهبود ضریب تبدیل خوراک در جوجه‌های گوشتی در مقایسه با جوجه‌های دریافت‌کننده جیره حاوی آنتی‌بیوتیک شدند (۲۱). همچنین در پژوهشی دیگر بررسی سطوح مختلف گیاه داروئی پونه بر جوجه‌های گوشتی و تخم‌گذار نشان داده

جدول ۶- تأثیر گروه‌های آزمایشی بر وزن بورس فابرسیوس و طحال در روز ۴۲* دوره پرورش.

تیمارهای آزمایشی	C	K0.5	K1	K2	SEM	P-Value
بورس فابرسیوس	۰/۰۹	۰/۰۶	۰/۰۹	۰/۸۷	۰/۰۰۸	۰/۰۸
طحال	۰/۱۱	۰/۱۰	۰/۰۸	۰/۰۹	۰/۰۱۰	۰/۴۴

C: جیره پایه، K۰.۵: جیره پایه مکمل شده با ۰/۵٪ خاکشیر، K1: جیره پایه مکمل شده با یک درصد خاکشیر و K2: جیره پایه مکمل شده با دو درصد خاکشیر. *جوجه‌ها از روز ۳۵ دوره پرورش تا روز ۴۲ به مدت چهار ساعت تحت تنش حرارتی $1 \pm 34^{\circ}\text{C}$ قرار گرفتند.

جدول ۷- تأثیر گروه‌های آزمایشی بر غلظت تیروکسین (T4).

تیمارهای آزمایشی	C	K0.5	K1	K2	SEM	P-Value
روز ۳۵ دوره پرورش قبل از تنش						
(Nmol/l) T4	۱۰/۱۹	۱۰/۲۶	۱۰/۰۴	۱۰/۱۰	۰/۴۳	۰/۹۸
روز ۴۲* دوره پرورش پس از تنش						
(Nmol/l) T4	۱۱/۲۶ ^c	۱۲/۳۱ ^b	۱۲/۵۳ ^b	۱۴/۲۹ ^a	۰/۳۳	۰/۰۰۰۱

در هر ردیف میانگین‌های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($P < 0.05$). C: جیره پایه، K0.5: جیره پایه مکمل شده با ۰/۵٪ خاکشیر، K1: جیره پایه مکمل شده با یک درصد خاکشیر و K2: جیره پایه مکمل شده با دو درصد خاکشیر. *جوجه‌ها از روز ۳۵ دوره پرورش تا روز ۴۲ به مدت چهار ساعت تحت تنش حرارتی $1 \pm 34^{\circ}\text{C}$ قرار گرفتند.

بوس فابریسیوس) آسیب وارد کند و طیور را برای پذیرش انواع گوناگون بیماری‌های باکتریایی، ویروسی و انگلی مستعد کند (۱۹). تا کنونی هیچ گونه گزارشی مبنی بر معنی‌داری خاکشیر بر وزن اندام‌های لنفاوی جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی گزارش نشده است ولی با توجه به نتایج تحقیق حاضر می‌توان بیان کرد سطوح مختلف خاکشیر هیچ‌گونه اثر معنی‌داری بر وزن اندام‌های لنفاوی جوجه‌های گوشتی تحت تنش حرارتی حاد نداشته است ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری کلی

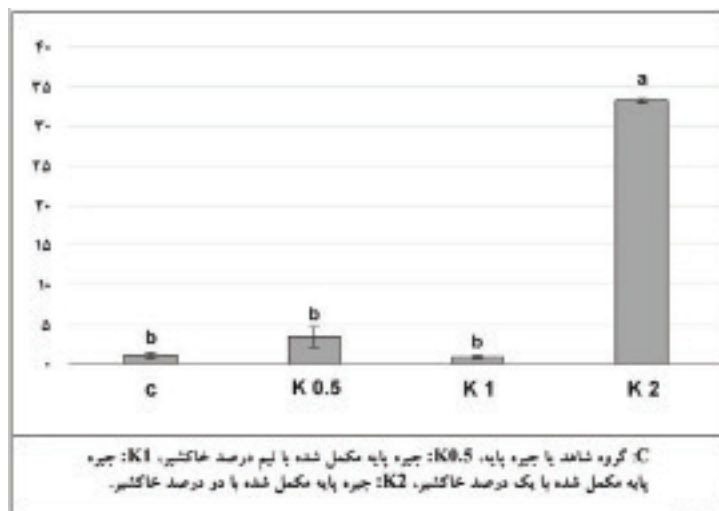
با توجه به اطلاعات بدست آمده از پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت اضافه کردن خاکشیر ۲٪ در جیره جوجه‌های گوشتی تحت تنش حرارتی حاد با داشتن اثرات معنی‌دار بر میزان بیان ژن HSP70 و غلظت هورمون تیروکسین و اضافه کردن خاکشیر ۱٪ در تعداد و نسبت هتروفیل به لنفوسیت می‌تواند به عنوان عامل کاهش دهنده آسیب‌های ناشی از تنش حرارتی محسوب شود و به عنوان افزودنی و مکمل در خوراک طیور مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

در پایان از همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و همچنین اساتید و مسئولان آزمایشگاه‌های دانشکده علوم دامی و تولید گیاهی که شرایط لازم جهت این پژوهش را فراهم نمودند، قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

خون محیطی و میزان ترشح پادتن در جوجه‌ها می‌گذارد (۱۳). تاکنون گزارشی در مورد اثر خاکشیر بر نسبت هتروفیل به لنفوسیت گزارش نشده است ولی نتایج تحقیق نوبخت و همکاران (۲۰۱۲) بیانگر آن است که افزودن گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis L.*)، گیاه شاه اسپرم (*Tanacetum balsamita L.*) و گیاه کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides L.*) در جیره مرغ‌های تخم‌گذار تأثیر معنی‌داری بر بهبود سیستم ایمنی و پارامترهای شیمیایی خون آنان داشته است و همچنین موجب بهبود عملکرد در مرغ‌های تخم‌گذار نیز شده است. همچنین بیان کردند استفاده از گیاهان دارویی آپیشن (*Thymus vulgaris*)، سیر (*Allium sativum*)، کاکوتی (*Thymus kotschyanus*)، مریم گلی (*Salvia officinalis*)، نعناع (*Mentha piperita*) و آنتی‌بیوتیک ویرجینیامایسین، موجب تغییری در نسبت هتروفیل به لنفوسیت در مقایسه با تیمار شاهد نشده است (۱۷). کاهش وزن نسبی اندام‌های لنفاوی در جوجه‌های پرورش یافته تحت شرایط تنش گرمایی نیز در طی پژوهش‌های متعددی نشان داده شده است (۱۶). کاهش وزن اندام‌های لنفاوی ممکن است نتیجه کاهش مصرف غذا باشد. زیرا به دنبال کاهش مصرف غذا میزان مواد مغذی مورد نیاز برای توسعه این اندام‌ها کاهش می‌یابد. علاوه بر این بیان شده است که قرار گرفتن در معرض تنش گرمایی گذشته از تحلیل بوس فابریسیوس موجب افزایش سطح ناحیه قشری و کاهش سطح ناحیه مرکزی آن می‌گردد. همچنین یافته‌های این پژوهش بیانگر آن است که قرار گرفتن در شرایط تنش گرمایی باعث کاهش شمار لنفوسیت‌ها در هر دو ناحیه مرکز و قشری ناحیه بوس شده است (۱). تنش گرمایی ممکن است به طور موقت و یا حتی دائمی به اندام‌های لنفاوی اولیه (تیموس و



شکل ۱- اثر گروه‌های آزمایشی بر میزان بیان ژن HSP70 در بافت مغز جوجه‌های گوشتی در روز ۴۲ دوره پرورش.

- 1- Aengwanich, W. 2010. Pathological changes and the effects of ascorbic acid on lesion scores of bursa of fabricius in broilers under chronic heat stress. *Research Journal of Veterinary Sciences* 3: 74-78.
- 2- Arabiyan, E., S.R. Hashemi, A. Yamchi, H. Davoodi and S. Rostami. 2019. Evaluation of cytochrome P450 gene expression as physiological pollution biomarkers in broiler chickens fed silver nanoparticles. *Journal of Veterinary Research* 75: 233-241. (In Farsi).
- 3- Asadi, N., S.D. Husseini, M.T. Tohidian, N. Abdali, A. Miman-dipoure, M. Rafeian-Kopaei and M. Bahmani. 2017. Performance of broilers supplemented with peppermint (*Mentha piperita L.*) powder. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine* 22: 703-706.
- 4- Baghban Kanani, P., M. Daneshyar and R. Najafi. 2016. Effects of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and turmeric (*Curcuma longa*) powders on performance, enzyme activity, and blood parameters of broiler chickens under heat stress. *Poultry Science Journal* 4: 47-53. (In Farsi).
- 5- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods. A review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
- 6- Buštin, S. A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29: 23-39.
- 7- Ghalamkari, G., M. Toghyani, N. Landy and E. Tavalaeian. 2012. Investigation the effects using different levels of *Mentha pulegium L.* (pennyroyal) in comparison with an antibiotic growth promoter on performance, carcass traits and immune responses in broiler chickens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2: S1396-S1399.
- 8- Gu, X.H., Y. Hao and X.L. Wang. 2012. Overexpression of heat shock protein 70 and its relationship to intestine under acute heat stress in broilers: 2. Intestinal oxidative stress. *Poultry Science* 91: 790-799.
- 9- Hashemi, S.R. and H. Davoodi. 2011. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Veterinary Research Communication* 35: 169-180.
- 10- Jahejo, A.R., N. Rajput. N.M. Rajput, I.H. Leghari, R.R. Kaleri, R. Mangi, M.K. Sheikh and M.Z. Pirzado. 2016. Effects of heat stress on the performance of Hubbard broiler chicken. *Cells, Animal and Therapeutics* 2: 1-5.
- 11- Latheef, S.K., K. Dhama, H.A. Samad, M.Y. Wani, M.A. Kumar, M. Palanivelu, Y.S. Malik, S.D. Singh and R. Singh. 2017. Immunomodulatory and prophylactic efficacy of herbal extracts against experimentally induced chicken infectious anaemia in chicks: assessing the viral load and cell mediated immunity. *Virus Disease* 28: 115-120.
- 12- Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$. *Method* 25: 402-408.
- 13- Mashaly, M.M., G.L. Hendricks, M.A. Kalama, A.E. Gehad, A.O. Abbas and P.H. Patterson. 2004. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poultry Science* 83: 889-894.
- 14- Mohamed, N.H. and A. E. Mahrous. 2009. Chemical constituents of *Descurainia sophia L.* and its biological activity. *Records of Natural Products Journal* 3: 58-67.
- 15- Munro, S. and H.R.B. Pelham. 1984. Use of peptide tagging to detect proteins expressed from cloned genes: deletion mapping and functional domains of *Drosophila hsp70*. *European Molecular Biology Organization Journal* 3: 3087-3093.
- 16- Niu, Z.Y., F.Z. Liu, Q.L. Yan and W.C. Li. 2009. Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress. *Poultry Science* 88: 2101-2107.
- 17- Nobakht, A., N.H. mansoub and M.A. Mohammad Nezhady. 2012. Effect of *Melissa officinalis L.*, *Tanacetum balsamita L.* and *Ziziphora clinopodioides L.* on performance, blood biochemical and immunity parameters of Laying Hens. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 7: 74-79.
- 18- Okuma, E., K. Solda, M. Tada and Y. Murata. 2000. Exogenous proline mitigates the inhibition of growth of *Nicotiana tobacum* cultured cells under saline conditions. *Soil science and plant nutrition* 46: 257-263.
- 19- Pardue, S.L. and J.P. Thaxton. 1986. Ascorbic acid in poultry. A review. *World's Poultry Science* 42: 107-123.
- 20- Prieto, M.T. and J.L. Campo. 2010. Effect of heat and several additives related to stress levels on fluctuating asymmetry, heterophil: lymphocyte ratio, and tonic immobility duration in White Leghorn chicks. *Poultry Science* 89: 2071-2077.
- 21- Tahami, Z., M. Shalaei and S.M. Hosseini. 2018. Effect of use of mixture of herbal extracts on performance, carcass characteristics, blood serum metabolites and enzyme activity of broiler chickens. *Iranian Journal of Animal Science Research* 9: 446-460. (In Farsi).
- 22- Tajodini, M., F. Samadi, S.R. Hashemi, S. Hassani and A. Ghasemnejad. 2015. Effects of different levels of artichoke (*Cynara scolymus L.*) powder and vitamin E on performance and immune system response of broiler chickens. *Iranian Journal of Medicinal*

and Aromatic Plant 31: 92-101. (In Farsi).

23- Vicuña, E.A., V.A. Kuttappan, R. Galarza-Seeber, J.D. Latorre, O. B. Faulkner, B.M. Hargis, G. Tellez and L.R. Bielke. 2015. Effect of dexamethasone in feed on intestinal permeability, differential white blood cell counts, and immune organs in broiler chicks. *Poultry Science* 94: 2075-2080.

24- Zhou, X., Y. Wang, Q. Gu and W. Li. 2010. Effect of dietary probiotic, *Bacillus coagulans*, on growth performance, chemical

composition, and meat quality of Guangxi Yellow chicken. *Poultry science* 89: 588-593.

25- Zulkifili, I., P.K. Liew, D.A. Israf, A.R. Omar and M. Hair-bejo. 2003. Effects of early age feed restriction and heat conditioning on heterophil/lymphocyte ratios, heat shock protein 70 expressions and body temperature on heat stressed broiler chickens. *Journal of Thermal Biology* 28: 217-222.

