

Research Article

Addition of *Thymus kotschyanus* and *Thymus vulgaris* in the Diet of Broiler Chickens and Its Effect on Immune System and Expression of IFN- γ and IL8 Genes

Kimia Khosronejad¹, Vida Hojati^{1*}, Saman Ahani²

¹ Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

² Department of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Key Words

Immune system
Interleukin 8
Interferon gamma
Broiler
Mountain thyme
Garden thyme

Abstract

Introduction: Interferon gamma (IFN γ) and interleukin 8 (IL-8) are cytokines that are released in host cells in response to pathogens and stimulate the immune system and increase the body's resistance. Thyme plant is a medicinal plant with antioxidant, antiviral and antibacterial properties. The present research was conducted with the aim of investigating the addition of essential oil of mountain thyme (*Thymus kotschyanus*) and garden thyme (*Thymus vulgaris*) in the diet of broiler chickens and its effect on immune system and expression of IFN- γ and IL8 genes.

Materials & methods: Present research was conducted in the form of a randomized design with 7 treatments and 4 replications and 20 pieces of Arian strain broilers in each replication. The groups include: 1- control (receiving a diet without antibiotics, probiotics and herbal medicine), 2- basic diet+150 mg/kg avilamycin, 3- basic diet+150 mg/kg Protocin probiotic, 4- Base diet+200 mg/kg mountain thyme, 5- Base diet+400 mg/kg mountain thyme, 6- Base diet+200 mg/kg garden thyme and 7- Base diet+400 mg/kg garden thyme. To check the expression of IL-8 and IFN γ genes, first RNA samples were extracted from the liver tissue and gene expression was performed by Real time RT-PCR method. The data were analyzed using the GLM method of SAS statistical software and Duncan's test.

Results: The number of white blood cells, the response to sheep red blood cells and the amount of G and M immunoglobulins did not show any significant difference in the treatment groups. The number of heterophiles showed a significant increase in experimental treatments ($p < 0.05$). The highest number of lymphocytes was observed in the probiotic group and the lowest in the treatment group with 400 mg/kg garden thyme essential oil. The ratio of heterophil to lymphocyte also showed a significant difference in the groups ($p < 0.05$). The highest heterophil to lymphocyte ratio was in the treatment group with 400 mg/kg of mountain thyme essence and the lowest ratio was in the probiotic group. The expression of IFN γ and IL-8 genes in the liver tissue of broiler chickens increased after treatment with two species of thyme plant, which was not statistically significant.

Conclusion: There was no significant difference between the effects of mountain or garden thyme species and different treatment levels (200 and 400 mg/kg). Although the changes in most of the parameters were not statistically significant, the results show the positive effect of two species of mountain and garden thyme in improving the performance of the immune system of birds.

Article info

* Corresponding Author's email:
vida.hojati@iaau.ac.ir

Received: 3 January 2024

Reviewed: 8 February 2024

Revised: 17 April 2024

Accepted: 20 May 2024

مقاله علمی - پژوهشی

افزودن آویشن کوهی (*Thymus kotschyanus*) و آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی و اثر آن بر سیستم ایمنی و بیان ژن‌های IFN- γ و IL8

کیمیا خسرونژاد^۱، ویدا حجتی^{۱*}، سامان آهنی^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

^۲ گروه دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

کلمات کلیدی

چکیده

سیستم ایمنی
اینترلوکین ۸
اینترفرون گاما
جوجه گوشتی
آویشن کوهی
آویشن باغی

مقدمه: اینترفرون گاما (IFN γ) و اینترلوکین ۸ (IL-8) نوعی پروتئین از دسته سیتوکاین‌ها هستند که در سلول‌های میزبان در پاسخ به عوامل بیماری‌زا آزاد شده و موجب تحریک سیستم ایمنی و افزایش مقاومت بدن می‌شوند. گیاه آویشن یک گیاه دارویی با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدویروسی و ضدباکتریایی است. تحقیق حاضر با هدف بررسی افزودن اسانس آویشن کوهی (*Thymus kotschyanus*) و آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) در جیره جوجه‌های گوشتی و اثر آن بر سیستم ایمنی و بیان ژن‌های IFN- γ و IL8 انجام شد.

مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر در قالب طرحی تصادفی با ۷ تیمار و ۴ تکرار و ۲۰ قطعه جوجه گوشتی سویه آرین در هر تکرار انجام شد. گروه‌ها شامل: ۱- شاهد (دریافت‌کننده جیره فاقد آنتی‌بیوتیک، پروبیوتیک و داروی گیاهی)، ۲- جیره پایه + ۱۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم آویلامایسین، ۳- جیره پایه + ۱۵۰ میلی گرم/کیلو گرم پروبیوتیک پروتکسین، ۴- جیره پایه + ۲۰۰ میلی گرم/کیلو گرم آویشن کوهی، ۵- جیره پایه + ۴۰۰ میلی گرم/کیلو گرم آویشن کوهی، ۶- جیره پایه + ۲۰۰ میلی گرم/کیلو گرم آویشن باغی و ۷- جیره پایه + ۴۰۰ میلی گرم/کیلو گرم آویشن باغی بودند. برای بررسی بیان ژن‌های IL-8 و IFN γ ابتدا RNA نمونه‌ها از بافت کبد استخراج و بیان ژن با روش Real time RT-PCR اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از روش GLM و نرم‌افزار آماری SAS و آزمون دانکن آنالیز شدند.

نتایج: تعداد گلبول‌های سفید، پاسخ به گلبول‌های قرمز گوسفندی و میزان ایمونوگلوبولین‌های G و M تفاوت معنی‌داری در گروه‌های تیمار نشان نداد. تعداد هتروفیل‌ها افزایش معنی‌داری در تیمارهای آزمایشی نشان داد ($p < 0.05$). بالاترین تعداد لنفوسیت در گروه پروبیوتیک و کم‌ترین آن در گروه تیمار با ۴۰۰ میلی گرم/کیلو گرم اسانس آویشن باغی مشاهده شد. نسبت هتروفیل به لنفوسیت نیز تفاوت معنی‌داری در گروه‌ها نشان داد ($p < 0.05$). بالاترین نسبت هتروفیل به لنفوسیت در گروه تیمار با ۴۰۰ میلی گرم/کیلو گرم اسانس آویشن کوهی و کم‌ترین آن در گروه پروبیوتیک بود. بیان ژن‌های IFN γ و IL-8 در بافت کبد جوجه‌های گوشتی پس از تیمار با دو گونه گیاه آویشن افزایش یافت که از نظر آماری معنی‌دار نبود.

بحث و نتیجه‌گیری: تفاوت معنی‌داری بین اثرات آویشن کوهی یا باغی و سطوح مختلف تیمارها (۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم/کیلو گرم) وجود نداشت. با این که در اکثر پارامترها تغییرات به لحاظ آماری معنی‌دار نبود ولی نتایج حاصله بیانگر تأثیر مثبت دو گونه آویشن کوهی و باغی در بهبود عملکرد سیستم ایمنی پرندگان می‌باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:
vida.hojati@iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳ دی ۱۴۰۲

تاریخ داوری: ۱۹ بهمن ۱۴۰۲

تاریخ اصلاح: ۲۹ فروردین ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: ۳۱ اردیبهشت ۱۴۰۳

مقدمه

جوجه‌های گوشتی مرغ یکی از فراوان‌ترین حیوانات اهلی هستند و بیش‌ترین جمعیت را نسبت به جوجه‌های دیگر پرندگان دارند. جوجه‌های گوشتی، جوجه‌هایی هستند که برای تولید گوشت مرغ جهت مصرف‌کننده تولید می‌شوند. مرغ‌های گوشتی اصلاح‌نژادی هستند که برای رشد سریع طراحی شده و در مزارع کارخانه‌ای در سراسر جهان استفاده می‌شوند. با توجه به سهم قابل‌توجه پرورش طیور در تامین پروتئین جانوری، بیماری‌های ویروسی و باکتریایی تهدید بزرگی برای این صنعت محسوب می‌شوند و جلوگیری و کنترل آن‌ها امری ضروری می‌باشد. با ادامه نگرانی در رابطه با استفاده از داروهای صنعتی در بقایای تولیدات جانوری و ایجاد مقاومت دارویی، یافتن درمان‌های جایگزین مانند داروهای گیاهی برای کنترل بیماری‌ها اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است. افزودن گیاهان دارویی به جیره جوجه‌های گوشتی ساخت و ترشح این پروتئین‌ها را افزایش داده و از این راه می‌توانند منجر به کاهش بیماری در طیور پرورشی شود (۱). گیاه آویشن متعلق به جنس *Thymus* از تیره نعنائیان (Lamiaceae) یکی از مهم‌ترین و شناخته‌شده‌ترین گیاهان دارویی در ایران است. حدود ۳۵۰ گونه از این گیاه معرفی شده که ۱۴ گونه معطر چندساله از آن‌ها در ایران شناسایی شده است. آویشن به دلیل داشتن دو ترکیب تیمول و کارواکرول دارای خواص ضد میکروبی، ضدباکتریایی، ضدقارچ، ضداسپاسم، ضدعفونی‌کننده، آنتی‌اکسیدان، تقویت‌کننده سیستم ایمنی و افزایشده آنزیم‌های گوارشی می‌باشد و به عنوان یک گیاه دارویی جایگاه قابل توجهی پیدا کرده است (۲). مصرف آویشن در جیره‌های مورد استفاده در دامپزشکی و پرورش طیور صنعتی از آن جهت اهمیت مضاعف پیدا می‌کند که مانند بسیاری دیگر از گیاهان دارویی، در عین داشتن خواص ذکر شده به صورت نسبی فاقد اثرات نامطلوب داروهای صنعتی از جمله تولید متابولیت‌های سمی و ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. اصلی‌ترین ترکیب دارویی موجود در آویشن تیمول (۵-متیل-۱-۲-ایزوپروپیل فنول) و کارواکرول (۵-ایزو پروپیل-۱-۲-ایزوپروپیل فنول) می‌باشند که دارای اثرات ضدالتهابی، ضدباکتری، ضدویروس و تقویت‌کننده سیستم ایمنی می‌باشند. در صورت ترکیب آویشن با جیره غذایی حیوانات، تیمول موجود در آن باعث افزایش آنزیم‌های گوارشی، جذب مواد مغذی و کاهش رادیکال‌های آزاد می‌شود (۳). تاکنون مطالعاتی در مورد تاثیر برخی گونه‌های آویشن بر روی پرندگان انجام شده است (۴). برای مثال، مکمل‌سازی جیره غذایی با عصاره آویشن شیرازی و پونه کوهی سبب کاهش اثرات منفی آفلاتوکسین بر عملکرد و ساختار بافتی روده و بهبود فراسنجه‌های بیوشیمیایی در جوجه‌های گوشتی شده است (۵). هم‌چنین تیمار با

۰/۱ گرم/کیلوگرم اسانس آویشن توانسته بازدهی استفاده از اسانس‌های گیاهی را در جیره جوجه‌ها بهبود بخشد (۶). هم‌چنین گزارش شده عصاره آویشن در سطح ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم جیره می‌تواند به عنوان یک جایگزین مناسب برای مکمل‌های رایج غذایی برای بهبود عملکرد رشد و وضعیت سلامتی جوجه‌های گوشتی در شرایط تنش گرمایی توصیه گردد (۷). فیتوبیوتیک (عصاره آویشن) منجر به بهبود عملکرد جوجه‌های گوشتی شده و در آینده می‌تواند به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در تغذیه طیور معرفی شوند (۸). هم‌چنین استفاده از مخلوط اسانس‌های سیر و آویشن در پرندگان، تلفات را به طور چشمگیری کاهش و جمعیت میکروبی ایلئوم را بهبود بخشیده است (۹). هم‌چنین دریافت ۲۰۰ میلی‌لیتر مکمل گیاهی بیوهربال (عصاره سیر + آویشن) در هزار لیتر آب آشامیدنی، عیار پادتن ویژه ویروس نیوکاسل را به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش داده است (۱۰). اینترلوکین‌ها و اینترفرون‌ها جزو سیتوکاین‌ها و پروتئین‌های دفاعی طبیعی بدن هستند که توسط سلول‌های سیستم ایمنی مهره‌داران تولید و باعث از بین بردن بسیاری از عوامل بیماری‌زا از قبیل ویروس، باکتری، انگل و تومورها می‌شود (۱۱). در مورد اثرات آویشن بر سیستم ایمنی تحقیقاتی صورت گرفته ولی مطالعات ژنتیکی در این رابطه اندک بوده است. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر افزودن گونه‌های آویشن کوهی (*Thymus kotschymanus* Boiss) و آویشن معمولی یا باغی (*Thymus vulgaris* L.) در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی بر بیان ژن‌های IFN- γ و IL8 انجام شد.

مواد و روش‌ها

مکان و شرایط محیطی آزمایش: این آزمایش در سالن مرغداری واقع در استان البرز اجرا شد. پس از شستشو و ضدعفونی سالن و تجهیزات اقدام به جوجه‌ریزی شد. دمای سالن از دمای اولیه ۳۲ درجه به تدریج به ۲۴ درجه رسانده شد. رطوبت سالن در طول دوره پرورش حدود ۵۵-۶۵ درصد و برنامه نوردی به صورت ۲۴ ساعت در شبانه‌روز بود. ضمناً برنامه واکسیناسیون طبق جدول ۱ انجام شد.

مشخصات جیره: احتیاجات غذایی در غالب سه دوره آغازین (۰-۲ هفته‌گی)، رشد (۲-۴ هفته‌گی) و پایانی (۴-۶ هفته‌گی) از جداول راهنمای پرورش جوجه‌های گوشتی آرین استخراج و با استفاده از نرم‌افزار جیره‌نویسی UFFDA تنظیم گردید (جداول ۲ و ۳). ترکیب شیمیایی اقلام خوراکی مورد استفاده در جیره آزمایشی از جدول استاندارد غذایی NRC استخراج شد.

آنالیز اسانس آویشن کوهی و باغی: اسانس‌های آویشن کوهی و باغی توسط گروه فیتوشیمی پژوهشگاه گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی با استفاده از دستگاه GCMS آنالیز شد.

جدول ۱: برنامه واکسیناسیون جوجه گوشتی

سن (روز)	نوع واکسن	سویه	طریقه واکسیناسیون
۱	برونشیت	H120	اسپری
۷-۱۰	دوگانه نیوکاسل - آنفولانزا	HgN ₂ ulster.2c	قطره چشمی، تزریقی پشت گردن s.c
۱۲	نیوکاسل	B1	آشامیدنی
۱۶	گامبورو	D78	آشامیدنی
۱۹	نیوکاسل	Lasota	آشامیدنی
۲۳	گامبورو	D78	آشامیدنی
۲۶	نیوکاسل	Lasta	آشامیدنی

جدول ۲: مواد خوراکی مورد استفاده در جیره‌های آزمایشی دوره رشد

ماده خوراکی (درصد)	جیره ۱۴ - ۰	جیره ۲۸ - ۱۴	جیره ۴۲ - ۲۸
ذرت	۴۸/۶	۴۵/۷	۴۵/۵۵
گندم	۶/۷۸	۱۵	۲۰
کنجاله سویا	۳۶/۵	۳۲	۳۷/۹
پودر ماهی	۱/۲	۱/۴	۰/۵
چربی	۱/۶	۱/۲	۲
جوش شیرین	۰/۲	۰/۱۵	۰/۱۵
دی کلسیم فسفات	۱/۹	۱/۶۸	۱/۸
پوسته صدف	۱/۲۵	۱/۰۵	۱/۱
نمک	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
دی ال سمیتونین	۰/۲۷	۰/۱۷	۰/۱۸
ال - لایزین	۰/۰۵	۰	۰/۰۷
مکمل ویتامینی و معدنی	۰/۵	۰/۵	۰/۵

جدول ۳: آنالیز مواد مغذی جیره‌های پایه

ترکیب شیمیایی جیره	جیره ۱۴ - ۰	جیره ۲۸ - ۱۴	جیره ۴۲ - ۲۸
انرژی قابل متابولیسم کیلوکالری	۲۸۵۱	۲۹۳۷	۲۹۶۵
پروتئین (درصد)	۲۲/۲۳	۲۰/۳۹	۱۸/۵
ترئونین (درصد)	۰/۸۵	۰/۷۷	۰/۶۹
متیونین + سیستین (درصد)	۰/۹۹	۰/۸۳	۰/۷۸
لایزین (درصد)	۱/۲۸	۱/۱۰	۱
فسفر قابل دسترس و درصد	۰/۵۰	۰/۴۵	۰/۴۵
کلسیم (درصد)	۱/۰۶	۰/۹۰	۰/۹
سدیم (درصد)	۰/۱۸	۰/۱۶	۰/۹۱
تعادل آنین - کاتیون	۲۵۸	۲۳۴	۱/۰۶

گروه‌بندی جوجه‌ها: برای انجام این آزمایش، جوجه‌های گوشتی

از سویه تجاری آرین تهیه شد. این آزمایش با ۷ گروه آزمایشی ۴ تکرار در ۲۰ واحد آزمایشی که هر تکرار شامل ۲۰ قطعه جوجه بود انجام گرفت. در شروع آزمایش، جوجه‌ها به صورت دسته‌جمعی توزین و به ۲۰ گروه ۲۰ قطعه‌ای با میانگین وزن یکسان به صورت تصادفی تقسیم شدند.

گروه‌های آزمایشی: شامل هفت گروه زیر بود: ۱- جیره بدون

افزودن آنتی‌بیوتیک، پروبیوتیک یا داروی گیاهی (گروه شاهد)، ۲- جیره پایه + ۱۵۰ میلی گرم/کیلوگرم آنتی‌بیوتیک آویلامایسین، ۳- جیره پایه + ۱۵۰ میلی گرم/کیلوگرم پروبیوتیک پروتکسین و گروه‌های تیمار شامل: ۴- جیره پایه + ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم آویشن کوهی، ۵- جیره پایه + ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم آویشن کوهی، ۶- جیره پایه + ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم آویشن باغی، ۷- جیره پایه + ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم آویشن باغی.

بررسی بیان ژن: در سن ۴۲ روزگی، تعداد چهار قطعه پرنده

از هر تیمار آزمایشی انتخاب و بعد از وزن‌کشی، برای بررسی بیان ژن *IFN γ* و *IL8* نمونه‌هایی از بافت کبد آن‌ها جدا و به آزمایشگاه انتقال داده شد. ابتدا RNAها به کمک کیت از کبد استخراج گردید. پس از مراحل استخراج RNA و حذف باقی‌مانده‌های DNA ژنومی، با استفاده از کیت Revert Aid first سنتز cDNA به عنوان الگوی اولیه برای واکنش‌های RT-PCR انجام شد. کمیت و کیفیت cDNA سنتز شده از نمونه‌های مربوط به بافت کبد به کمک نانودراپ بررسی شد. تمام cDNAها رقیق و به غلظت حدود ۳۰۰ میلی گرم/میلی‌لیتر رسید. در مرحله بعد توالی نوکلئوتیدی ژن‌های هدف و مرجع دریافت شد و سپس اطلاعات مربوط به واکنش زنجیره پلیمرز برای نمونه‌های cDNA حاصل از بافت کبد، برای ژن‌های *IFN γ* ، *IL-8* و ژن مرجع GAPDH ثبت شد (جدول ۴).

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از

نرم‌افزار SAS با مدل طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه دانکن استفاده شد.

جدول ۴: آغازگرهای مورد استفاده در فرآیند Real-Time PCR

نام ژن	توالی آغازگر	دمای اتصال آغازگر (c)	طول محصول (bp)
IFN γ	F 5'-AGCTGACGGTGGACCTATTATT-3'	۸۲	۲۵۹
	R 5'-GGCTTTGCGCTGGATTTC-3'		
IL8	F 5'-GCTTGCTAGGGGAAATGA-3'	۸۵	۲۰۰
	R 5'-AGCTGACTCTGACTAGGAACTGT-3'		
GAPDH	F 5'-GGTGGTGCTAAGCGTGTAT-3'	۸۵	۲۶۴
	R 5'-ACCTCTGTCATCTCTCCACA-3'		

نتایج

ایمنی سلولی: یافته‌های مربوط به ایمنی سلولی در جدول ۵ ارائه شده است. تعداد گلبول‌های سفید تفاوت معنی‌داری تحت تأثیر تیمار با گونه‌های آویشن نشان‌نداد ($p > 0.05$)، بالاترین تعداد گلبول‌های سفید در تیمار اسانس آویش کوهی در سطح ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم و کم‌ترین در تیمار اسانس آویش باغی در سطح ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم بود. تعداد هتروفیل‌ها تفاوت معنی‌داری تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی نشان‌داد ($p < 0.05$) و بالاترین میزان در تیمارهای آزمایشی مشاهده شد. بالاترین تعداد لنفوسیت در گروه پروبیوتیک و کم‌ترین آن در گروه تیمار با ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم اسانس آویشن باغی مشاهده شد. نسبت هتروفیل به لنفوسیت نیز تفاوت معنی‌داری در گروه‌ها نشان‌داد ($p < 0.05$) به‌طوری‌که بالاترین نسبت هتروفیل به لنفوسیت در گروه تیمار با ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم اسانس آویشن کوهی و کم‌ترین آن در گروه پروبیوتیک مشاهده شد (شکل‌های ۱ و ۲).

ایمنی هومورال: یافته‌های مربوط به شاخص فرانسجه‌های ایمنی هومورال در جدول ۶ ارائه شده است. پاسخ به گلبول قرمز گوسفندی، ایمونوگلوبولین G (IgG) و ایمونوگلوبولین M (IgM) تفاوت معنی‌داری را در گروه‌ها نشان‌نداد ($p > 0.05$)، اما بالاترین پاسخ به گلبول قرمز

گوسفندی در تیمار با ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم اسانس آویشن باغی و کم‌ترین میزان در گروه شاهد بود. هم‌چنین بالاترین میزان ایمونوگلوبولین G در گروه آنتی‌بیوتیک و تیمار با ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم اسانس آویشن باغی و کم‌ترین میزان در گروه شاهد مشاهده شد. بالاترین میزان ایمونوگلوبولین M در گروه تیمار با ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم آویشن باغی و کم‌ترین میزان در گروه تیمار با ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم اسانس آویشن باغی مشاهده شد (شکل ۳).

بیان ژن‌های $IFN\gamma$ و IL-8: برای بیان ژن نیاز به گروه کنترل بود، لذا جیره پایه به‌عنوان معیار سنجش بیان ژن قرار گرفت. همان‌طور که در جدول ۷ دیده می‌شود بیان ژن‌های اینترلوکین ۸ و اینترفرون گاما در سطوح مصرف ۱۵۰ میلی گرم پروبیوتیک پروتکسین، ۱۵۰ میلی گرم آنتی‌بیوتیک آویلامایسین، جیره ۲۰۰ و ۴۰۰ آویشن کوهی و ۲۰۰ و ۴۰۰ آویشن باغی اختلاف معنی‌داری را نشان‌نداد ($p > 0.05$)، اما میزان بیان ژن‌های اینترلوکین ۸ و اینترفرون گاما در تیمارهای سطوح مختلف آویشن کوهی و باغی و پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد افزایش یافت به‌طوری‌که کم‌ترین بیان مربوط به گروه آنتی‌بیوتیک آویلامایسین و بالاترین بیان مربوط به آویشن کوهی بود.

جدول ۵: اثر تیمارهای مختلف بر ایمنی سلولی

گروه‌ها	تعداد گلبول‌های سفید $\times 10^6$ در میکرولیتر	هتروفیل‌ها (%)	لنفوسیت‌ها (%)	نسبت هتروفیل به لنفوسیت
شاهد	۲۶۸۶۶/۶۶	۲۸/۶۶ ^b	۶۸/۵۰ ^{ab}	۰/۴۲۴۷ ^b
آنتی‌بیوتیک آویلامایسین	۲۸۳۵۰/۰۰۰	۳۸/۸۳ ^{ab}	۶۵/۸۳ ^{bc}	۰/۴۷۱۳ ^{ab}
پروبیوتیک پروتکسین	۲۸۱۶۶/۶۶	۲۷/۱۶ ^b	۷۰/۶۶ ^a	۰/۳۸۵۳ ^b
آویشن باغی (۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم)	۲۶۱۵۰/۰۰	۳۰/۶۶ ^{ab}	۶۷/۰۰ ^{abc}	۰/۴۵۹۱ ^{ab}
آویشن باغی (۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم)	۲۸۶۳۳/۳۳	۳۳/۸۳ ^a	۶۴/۳۳ ^c	۰/۵۲۸۱ ^a
آویشن کوهی (۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم)	۲۸۶۳۸/۳۱	۳۳/۶۰	۶۷/۲۰	۰/۴۶۹۱
آویشن کوهی (۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم)	۲۸۸۳۴/۳۴	۳۴/۹۱ ^{ab}	۶۶/۳۴ ^c	۰/۶۳۰۰
SE	۶۴۴/۵۷	۰/۷۰۷	۰/۶۷۷	۰/۰۱۴
سطح معنی‌داری	۰/۷۲۵	۰/۰۲۵	۰/۰۲۲	۰/۰۲۳

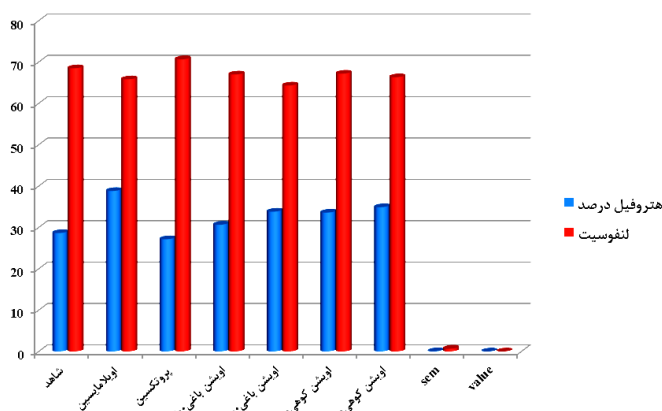
حروف متفاوت در هر ستون نشانه اختلاف معنی‌دار آماری است ($p < 0.05$)

جدول ۶: اثر تیمارهای مختلف بر شاخص فرانسجه‌های ایمنی

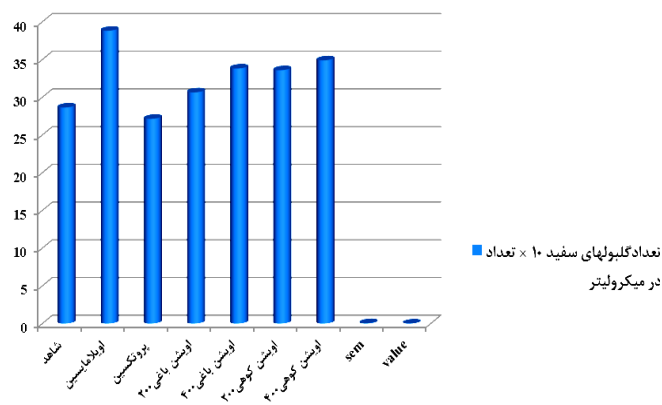
گروه‌ها	عیار پادتن بر ضد گلبول قرمز گوسفند	(mg/dl) IgG	(mg/dl) IgM
شاهد	۵/۸۳	۲/۵	۳/۲۳
آنتی‌بیوتیک آویلامایسین	۷/۷۵	۴/۵	۳/۲۵
پروبیوتیک پروتکسین	۷/۶۷	۴/۱۷	۳/۵
آویشن باغی (۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم)	۶/۲۵	۳/۶۷	۲/۵۸
آویشن باغی (۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم)	۸/۲	۴/۴	۳/۸
آویشن کوهی (۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم)	۶/۲۲	۳/۷۷	۲/۶۱
آویشن کوهی (۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم)	۸/۴	۴/۵	۳/۴
SE	۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۱۵
سطح معنی‌داری	۰/۱۱۹	۰/۳۸۴	۰/۱۰۶

جدول ۷: میزان بیان mRNA ژن‌های *IL-8* و *IFNγ* کبد در تیمارهای مختلف گروه آزمایشی

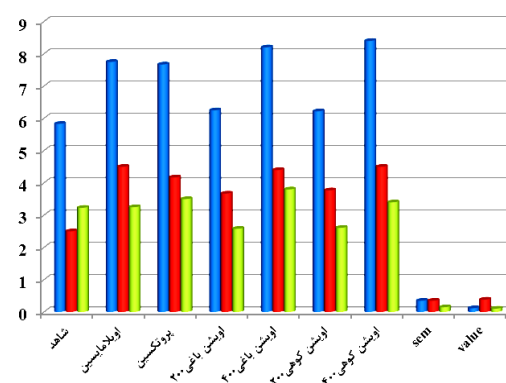
گروه‌ها	میانگین ژن <i>IFNγ</i>	میانگین ژن <i>IL-8</i>
شاهد	۶/۶۰۵ ^a	۵/۷۰۱ ^a
آنتی‌بیوتیک آویلامایسین	۶/۴۰۷ ^a	۷/۵۰۳ ^a
پروبیوتیک پروتکسین	۶/۸۹۵ ^a	۷/۳۱۰ ^a
آویشن باغی (۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم)	۸/۲۲۱ ^a	۶/۰۲۱ ^a
آویشن باغی (۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم)	۱۱/۳۰۸ ^a	۸/۱۰۳ ^a
آویشن کوهی (۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم)	۸/۳۴۱ ^a	۶/۰۰۳ ^a
آویشن کوهی (۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم)	۱۱/۴۱۹ ^a	۸/۲۰۳ ^a
SEM	۲/۶۵	۲/۶۵
Value	۰/۶۵	۰/۶۵



شکل ۲: نمودار اثر تیمارهای مختلف بر درصد هتروفیل‌ها



شکل ۱: نمودار اثر تیمارهای مختلف بر گلبول‌های سفید



شکل ۳: نمودار اثر تیمارهای مختلف بر شاخص فرانسجه‌های ایمنی

بحث

نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر تا حدودی با مطالعات پیشین در زمینه سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی هم‌سو بوده و نشان از عملکرد مثبت عصاره گیاه آویشن دارد. مطالعه‌ای نشان داد که جیره‌های

۳ و ۵ میلی گرم/کیلوگرم عصاره آویشن در جوجه‌های گوشتی تعداد سلول‌های جامی را در سطح پرزهای روده افزایش داده و از این طریق منجر به تقویت سیستم ایمنی میزبان شده‌اند (۱۲). همچنین تیمول گیاه آویشن بر کاهش جمعیت سکومی باکتری‌های سالمونلا و کامپیلو باکتر ژرونی در جوجه‌های گوشتی موثر بوده است (۱۳). تحقیق دیگری نشان داده که در چهار تیمار فاقد آویشن و آویشن با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۱۵ و ۲ میلی‌لیتر در هر لیتر آب آشامیدنی، بیش‌ترین تعداد باکتری نوع کلی‌فرم و کم‌ترین تعداد باکتری نوع لاکتوباسیل مربوط به تیمار فاقد اسانس آویشن بوده و کم‌ترین تلفات در تمامی سنین مربوط به تیمار آویشن ۰/۱ بوده است (۱۴). همچنین گزارش شده است که افزودن عصاره آبی آویشن شیرازی در آب آشامیدنی بر عملکرد و سیستم ایمنی سلولی جوجه‌های گوشتی تأثیری ندارد ولی سیستم ایمنی هومورال را بهبود می‌بخشد (۱۵). طی پژوهش دیگری، تیمارهای عصاره‌های الکلی مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) و آویشن شیرازی اثر معنی‌داری بر غلظت هموگلوبین و درصد هماتوکریت خون جوجه‌های گوشتی قبل از استرس نداشتند. تیمار ۰/۱ درصد

عصاره آویشن باعث افزایش معنی‌دار میزان گلبول‌های قرمز خون شد ولی تأثیر معنی‌داری بر میزان گلوکز خون و تعداد لنفوسیت جوجه‌های گوشتی بعد از استرس نداشتند (۱۶). هم‌چنین مشخص شد که اثر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی وابسته به دوز بوده و در غلظت‌های پایین، خاصیت تحریکی سیستم ایمنی را دارد. از این رو استفاده از آویشن شیرازی در غلظت‌های پایین برای افزایش مقاومت طیور در برابر عفونت‌های گوارشی و تنفسی توصیه شده است (۱۷). بنابر پژوهشی، افزودن اسانس ۰/۳ درصد مخلوط آویشن و کاکوتی به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی توانسته در بهبود میکروفلور مفید (لاکتوباسیلوس) و کاهش باکتری‌های مضر (اشریشیاکولای) ایلئوم جوجه‌ها موثر باشد (۱۸). هم‌چنین استفاده از تیمارهای حاوی آویشن و کاکوتی (۵۰ میلی‌گرم) سبب افزایش مصرف خوراک جوجه‌های گوشتی شد. تیمار آزمایشی حاوی اسانس آویشن در سطح ۱۵۰ میلی‌گرم و کاکوتی در سطح ۵۰ میلی‌گرم بالاترین شاخص کارایی تولید را نشان دادند. تیمارهای حاوی آویشن (۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم) به‌صورت معنی‌داری سبب افزایش جمعیت لاکتوباسیل و کاهش کلی باسیل روده شدند. سطوح مختلف اسانس آویشن به‌صورت معنی‌داری باعث تقویت پاسخ ایمنی هومورال و سلولی جوجه‌های گوشتی شد اما سطوح مختلف اسانس کاکوتی تأثیر معنی‌داری بر پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی نشان نداد (۱۹). مکمل نمودن جیره با اسانس آویشن باعث روند رو به افزایش نرخ رشد، تقویت سیستم ایمنی، کاهش سطح کلسترول و LDL در سرم گردیده و می‌تواند به عنوان محرک رشد و تقویت کننده پاسخ ایمنی در جیره جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی در نظر گرفته شود (۲۰). طی پژوهشی مشخص شد که فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز خون پرندگان تغذیه شده با عصاره آویشن بیش تر از پرندگان شاهد بوده است. میزان مالون‌دی‌آلدئید گوشت ران پرندگان دریافت‌کننده جیره حاوی عصاره آویشن کوهی در مقایسه با سایر تیمارها کاهش یافت. استفاده از ۰/۰۵ درصد عصاره آویشن دنائی در جیره جوجه‌های گوشتی ضریب تبدیل خوراک، شاخص‌های ریخت سنجی مخاط روده و وضعیت آنتی‌اکسیدانی بدن را بهبود می‌بخشد (۲۱). هم‌چنین مطالعه‌ای نشان داده که مکمل‌سازی جیره آلوده به آفلاتوکسین B1 با گیاه خارمریم و ترکیب خارمریم و آویشن به‌طور معنی‌داری سبب افزایش معنی‌دار پاسخ آزمون تکثیر لنفوسیتی شد (۲۲). گزارش شده است که اسانس نعنار و آویشن در سطح ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم با داشتن عملکرد بهینه تولید و تیترا آنتی‌بادی، جایگزین طبیعی مناسبی برای آنتی‌بیوتیک است (۲۳). استفاده از مکمل‌های پونه و آویشن در جوجه‌ها، بار میکروبی را کاهش دادند و بنابراین با جایگزینی آن‌ها

می‌توان تولید ارگانیک و ایمن را انتظار داشت (۲۴). پژوهش دیگری نشان داد که پاسخ به گلبول قرمز گوسفندی، میزان ایمونوگلوبولین‌های G و M، تعداد گلبول‌های سفید و نسبت هتروفیل به لنفوسیت تحت تأثیر تیمار با آویشن شیرازی قرار نگرفته ولی بیان ژن MUC2 در جوجه‌هایی که با جیره پایه حاوی آویشن تغذیه شده بودند به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته بود. استفاده از اسانس آویشن شیرازی اثرات تعدیلی بر سیستم ایمنی نشان داده بود و توسط افزایش بیان ژن MUC2 توانسته بود بر بهبود عملکرد سیستم گوارشی جوجه‌های گوشتی مؤثر باشد (۲۵). هم‌چنین مشخص شده استفاده پیوسته از ۰/۵ درصد آویشن یا آویشن+ دارچین در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی می‌تواند موجب بهبود شاخص‌های رشد و کاهش میزان چربی لاشه گردد (۲۶). اثر تیمارهای آویشن (۰/۲ درصد) و سرخارگل نیز بر عیار آنتی‌بادی علیه بیماری‌های نیوکاسل و آنفولانزا در جوجه‌ها معنی‌دار بوده و کم‌ترین آنتی‌بادی علیه نیوکاسل و بیش‌ترین آنتی‌بادی علیه آنفولانزا در گروه آویشن مشاهده شده است. عصاره‌های آویشن و سرخارگل باعث افزایش وزن غده بورس فابریسیوس شده ولی بر وزن طحال تأثیری نداشتند. هم‌چنین تأثیر معنی‌داری بر تراکم گلبول‌های سفید خون شامل لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها نداشتند. در کل، افزودن عصاره‌های آویشن و سرخارگل به جیره باعث افزایش عیار آنتی‌بادی علیه آنفولانزا و کاهش سطح لیپیدهای خون شده است (۲۷). براساس پژوهشی، سطوح ۲/۵ گرم/کیلوگرم پودر آویشن زوفایی و سرخارگل جهت بهبود عملکرد جوجه‌های گوشتی و کاهش مالون‌دی‌آلدئید توصیه شده است (۲۸). مشخص شده که پودر بذر آویشن اثرات مطلوبی بر روی فراسنجه‌های بیوشیمیایی و خونی جوجه‌های یک‌روزه گوشتی و محلی داشته ولی میزان ایمونوگلوبولین‌ها را تغییر چندانی نداده و به‌نظر می‌رسد که باید مقادیر بیش‌تری از پودر گیاهی استفاده شود تا پاسخ ایمنی در جوجه‌ها ایجاد شود (۲۹). بنابر تحقیقی، جوجه‌هایی که همراه با آفلاتوکسین و اکراتوکسین، عصاره الکلی آویشن دریافت کرده بودند در مقایسه با جوجه‌هایی که فقط آفلاتوکسین و اکراتوکسین را دریافت کرده بودند غلظت فراسنجه‌های خونی، آنزیم‌های کبدی و وزن اندام‌های داخلی آن‌ها بهبود یافته بود (۳۰). پژوهشی نشان داد که می‌توان از سطح سه درصد روغن کلزا + ۳۰۰ ppm اسانس آویشن باغی در جیره جوجه‌های گوشتی جهت بهبود عملکرد، توان ایمنی و صفات بیوشیمیایی خون استفاده کرد (۳۱). افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم اسانس آویشن+ ۱۰۰ میلی‌گرم پروبیوتیک به جیره جوجه‌های گوشتی برای بهبود پاسخ ایمنی هومورال و عملکرد رشد توصیه می‌شود (۳۲). اسانس آویشن و پروتیین پایین جیره‌ها، سطح LDL جوجه‌ها را کاهش داده است (۳۳). پژوهشی نشان داد که استفاده از آنزیم فیتاز میکروبی

- impact of *Thyme* and *Oregano* essential oils dietary supplementation on broiler health, growth performance, and prevalence of growth-related breast muscle abnormalities. *Animals*. 12(21): 3065. doi: 10.3390/ani12213065
5. **Manafi, M., Hedayati, M. and Arak, H. 2018.** The effect of concomitant use of ethanolic mixture extractions of *Thyme* and *Oregano* on performance and morphology of gastrointestinal tract in broilers fed contaminated feed with Aflatoxin B1. *Animal Science Research*. 28(3): 1-16. (In Persian)
 6. **Bahrami, M.R., Hajkhodadadi, I. and Ghasemi, H.A., 2020.** Evaluation of histomorphometry of gastrointestinal tract, liver and hematology of broiler chickens treated with dietary pure and encapsulated thyme essence. *Iranian Veterinary Journal*. 16(1): 15-24. (In Persian) doi: 10.22055/ivj.2019.148842.2071.
 7. **Rostami, L., Taherpour, K., Akbari Gharaei, M., Ghasemi, H.A. and Jamali, J., 2020.** Effects of Different Levels of *Thymus vulgaris* Extract in Comparison with Antibiotics, Vitamin C and Vitamin E on Performance, Blood Biochemistry and Antibody Response in Broiler Chickens Under Heat Stress Condition. *Journal of Veterinary Research*. 75(1): 26-37. (In Persian) doi: 10.22059/jvr.2019.253178.2769
 8. **Mojgani, N., Sanjabi, M.R., Dalimi A., Vaseji N. and Zarei Yousefabad, E., 2020.** Effect of Probiotic and Herbal Extracts on Performance, Blood Biochemistry and Immune System of Broiler Chicks. *Research on Animal Production*. 11(28): 1-10. (In Persian) doi: 10.52547/rap.11.28.1.
 9. **Valipourian, R., shariatmadari, F. and Karimi Torshizi, M.A. 2019.** Effect of Garlic and Thyme's essential oils blend as a feed additive after feed restriction on the Performance, Growth Rate, Mortality rate and Microbial Population of broile Chickens. *Animal Production*. 20(4): 565-576. (In Persian) doi: 10.22059/jap.2018.261252.623299
 10. **Talazadeh, F., Mayahi, M. and Houshmandi, K. 2018.** Survey on the changes of specific antibody titre against Newcastle disease vaccine in broiler chickens after receiving of biohebal® feed supplement (contains thyme and garlic extracts). *Journal of Animal Environment*. 10(1): 103-106. (In Persian)
 11. **Giansanti, F., Giardi, M.F. and Botti, D., 2006.** Avian cytokines--an overview. *Current Pharmaceutical Design*. 12(24): 3083-3099. doi: 10.2174/138161206777947542
 12. **Jamroz, D., Wartecki, T., Houszka, M. and Kamel, C., 2006.** Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 90(5-6): 255-268. doi: 10.1111/j.1439.0396.2005.00603.x
 13. **Venkitanarayanan K., Kollanoor-Johny A., Darre M.J., Donoghue A.M. and Donoghue D.J., 2013.** Use of plant-derived antimicrobials for improving the safety of poultry products. *Poultry Science*. 92(2): 493-501. doi: 10.3382/ps.2012-02764
 14. **Rahbarnia, B., Yaghobfar, A., Kardoodi, K. and Kalantar Neyestanaki, M., 2014.** Effect of thyme essence on growth traits, mortality, PH and changing of intestinal bacterial population in broiler chickens. *Animal Sciences Journal (Pajouhesh and Sazandegi)*. 101: 37-45. (In Persian)

و اسانس آویشن، جمعیت باکتری‌های کلی‌فرم‌روده را کاهش می‌دهد و استفاده از اسانس آویشن، باعث بهبود ایمنی هومورال می‌گردد (۳۴). نتایج تحقیق دیگری نشان داد که اثر ترکیب آویشن و بادرنجوبه می‌تواند باعث افزایش تراکم سلول‌های لنفوسیت B در نواحی قشر و مدولای فولیکول‌های بورس فابریسیوس در گروه تیمار با ۵ گرم/کیلوگرم پودر ترکیبی دو گیاه در مقایسه با گروه نرمال شود (۳۵). کلیه تحقیقات انجام شده مشابه تحقیق حاضر، بیانگر اثرات مطلوب این گیاه چه به صورت معنی‌دار چه به صورت غیرمعنی‌دار بوده است. بنابراین دوزهای پایین این گیاه برای بهبود عملکرد ایمنی جوجه‌های گوشتی پیشنهاد می‌شود. در تحقیق حاضر، تعداد گلبول‌های سفید، پاسخ به گلبول‌های قرمز گوسفندی و میزان ایمونوگلوبولین‌های G و M تفاوت معنی‌داری در گروه‌های تیمار با آویشن نشان نداد ولی تعداد هتروفیل‌ها و نسبت هتروفیل به لنفوسیت افزایش معنی‌داری داشته است. بالاترین تعداد لنفوسیت در گروه پروبیوتیک و کم‌ترین آن در گروه تیمار با ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم اسانس آویشن باغی بود. بالاترین نسبت هتروفیل به لنفوسیت در گروه تیمار با ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم اسانس آویشن کوهی و کم‌ترین آن در گروه پروبیوتیک بود. بیان ژن‌های اینترفرون گاما و اینترلوکین ۸ در جوجه‌های گوشتی تیمار شده با گونه‌های آویشن از نظر آماری تغییر معنی‌داری نداشت ولی تا حدودی موثر بود و سبب افزایش آن‌ها شد. هم‌چنین تفاوت معنی‌داری بین اثرات آویشن کوهی یا باغی و سطوح مختلف تیمارها (۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) مشاهده نشد. به طور کلی بهبود عملکرد سیستم ایمنی تحت تاثیر مصرف آویشن را می‌توان به بهبود عملکرد آنزیم‌های گوارشی، جذب مواد مغذی خوراک، افزایش تولید اینترلوکین ۸ و اثرات آنتی‌اکسیداتیو نسبت داد.

منابع

1. **Teymouri, P., Jafari Khorshidi, K. and Rezaei-pour, V., 2022.** Effects of different feed additives and antibiotic growth promoter on the immune response, tibia bone characteristics, meat quality and growth performance of Ross 308 broiler chickens. *Journal of Animal Environment*. 14(2): 221-230. doi: 10.22034/aej.2021.299943.2611 (In Persian)
2. **Mozafarian, V., 2015.** Knowledge of medicinal and aromatic plants of Iran. First edition, Farhange Moaser Publications. 1444 p. (In Persian)
3. **Salehi, E., Bahadoran, S., Fallah, A. and Mohebbi, A., 2016.** Effect of dietary *Zataria multiflora* on growth performance and carcass oxidation in broiler chickens. *Iranian Veterinary Journal*. 11(4): 42-51. (In Persian) doi: 10.22055/ivj.2016.12996
4. **Zaazaa A., Mudalal S., Alzuheir I., Samara M., Jalboush N., Fayyad A. and Petracci M., 2022.** The

- and abdominal fat in poultry. Iranian Journal of Veterinary Clinical Sciences. 13(2): 81-90. (In Persian)
27. **Farrokhnia, R., Moslemipur, F., Maghsoudlou, S. and ghanbari, F., 2020.** Evaluation of the effect of adding coneflower and *Thyme* extracts to diet on performance, carcass characteristics, blood parameters and immunity status of broiler chickens. Iranian Journal of Animal Science Research. 12(1): 75-86. (In Persian) doi: 10.22067/ijasr.v12 i1.70937
 28. **Shirzadi, H., Nazari, Z. and Taherpour, K., 2020.** Effect of *Thymbra spicata* and *Echinacea purpurea* powders on performance parameters and thigh muscle quality of broiler chickens challenged with *Campylobacter jejuni*. Animal Production Research. 9(1): 77-88. (In Persian) doi: 10.22124/ ar.2020.10308.1434
 29. **Mohammadi, F., Choobkar, N. and Moradi, Z., 2020.** Comparison of the effects of different levels of Shirazi thyme seed powder (*Zataria multiflora*) on hematological, biochemical and immunogenic parameters in broiler and local chickens of Kermanshah. Comparative Pathobiology of Iran. 17(1): 3067-3078. (In Persian)
 30. **Nazarizadeh, H., Hoseini, S.M. and Pourreza, J., 2021.** Effect of Thyme Alcoholic Extract on Reducing of Aflatoxin and Ochratoxin Toxicity in Broiler Chickens. Research on animal production. 12(31): 10-21. (In Persian) doi: 10.52547/rap.12.31.10
 31. **Abbasi, M.A., Ghazanfari, S., Sharifi, S.D. and Ahmadi Gavlighi, H., 2021.** Effect of different levels of rapeseed oil and garden thyme essential oil on performance, immune traits and intestinal morphology of broiler chickens. Animal Production. 23(3): 395-408. (In Persian) doi: 10.22059/ jap.2021.306922.623549
 32. **Babakhani, E. and Rostamian, R., 2021.** Investigation of the effects of adding probiotic and encapsulated thyme essential oil on growth performance and immune responses of broiler chicks by multi attribute decision making. Animal Production. 23(3): 421-431. (In Persian) doi: 10.22059/jap.2021.314954.623581
 33. **Eyvazzadeh, M., Nobakht, A., Safamehr, A.R., Mehmannavaz, Y. and Zانبوري, A., 2022.** The effects of common and encapsulated thyme essential oil with fats on blood and immunity parameters of broilers with diets formulated with normal and low crude protein levels. Animal Physiology and Development. 15(3): 11-26. (In Persian)
 34. **Ghalandari E., Safamehr A., Nobakht A., Mehmannavaz Y. and Mahdavi S., 2023.** The effects of adding essential oils (*Thymus vulgaris* L. and *Mentha pulegium* L.) and microbial phytase on intestinal microflora and immune level (humoral immunity (HI) and blood cells) in broilers. Journal of Animal Physiology and Development. 16(1): 111-128. (In Persian)
 35. **Moslemi Ahangari, S.M. and Hejazi, S., 2016.** Effects of *Thymus vulgaris* and *Melissa officinalis* on histomorphological changes of the bursa of Fabricius as well as blood titers obtained from Newcastle vaccine. Journal of Animal Environment. 8(2): 77-82. (In Persian)
 15. **Farzanfar, N., Mohammadi, M. and Roostaie Ali Mehr, M., 2015.** Effect of inclusion of Shirazi thyme (*Zataria multiflora* Boiss) aqueous extract in drinking water on performance and immune responses of broilers. Iranian Journal of animal Science. 46(2): 141-149. (In Persian) doi: 10.22059/ijas.2015.55645
 16. **Souri, H., Khatibjoo, A., Taherpour, K., Hasanabadi, A., Fattahnia, F. and Asgari, M., 2015.** Effect of *Thymus vulgaris* and *Satureja khuzestanica* ethanolic extracts on broiler chickens' performance and immune response. Iranian Journal of Applied Animal Science. 5(2): 437-446.
 17. **Staji, H., Ghazvinian, K., Mahdavi, A.L. and Keramati, K., 2016.** Effects of different concentration of Zattariamultiflora essence on immunity system of broilers. Koomesh. 18(1) :227-235. (In Persian)
 18. **Mahdavi S. and Nobakht A., 2017.** Evaluation of the effect of thyme and cockatiel essential oil on intestinal microbial flora in broilers. Veterinary Clinical Pathology. 11(4): 305-312.
 19. **Hoseinyan Bilandi, S. H., Hosseini, S.M., Mojtahedi, M. and Bashtani, M., 2018.** Effect of Thyme and Ziziphora essence on performance, microbial population and immune response of broiler chickens. Animal Production Research. 7(3): 53-65. (In Persian) doi: 10.22 124/ar.2018. 10180.1304
 20. **Mohammadi Miezaei, D., Yaghobfar, A. and Eila, N., 2018.** Effects of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil on performance, serum metabolites and immune system in broiler chickens under heat stress. Animal Sciences Journal. 31(119): 19-30. doi: 10.22092/asj.2017.109527. 1398.
 21. **Malekzadeh, M., Shakouri, M.D. and Abdi Benemar, H., 2018.** The Effect of Two *Thyme* Species Hydroalcoholic Extract on Nutrient Digestion and Antioxidant Status of Broiler Chickens. Animal Production. 20(2): 305-314. (In Persian) doi: 10.22059/ jap.2018. 245867.623240
 22. **Raei, H., Najafi-Gharajeh, R. and Karimi-Torshizi, M.A., 2018.** Effect of *Silibum marianum* seed and *Thymus vulgaris* powders and their combination on some carcass characteristics, blood metabolites and immune system responses of broilers fed aflatoxin B1 contaminated diet. Animal Production Research. 7(1): 53-66. (In Persian) doi: 10.22124/ar.2018.2858
 23. **Rezvani, M.R., Arab, M. and Kami, O., 2019.** Effect of peppermint, thyme and tarragon essential oils on the performance and antibody titer in broilers. Animal Production. 21(3): 359-369. (In Persian) doi: 10.22059/ jap.2019. 244442.623234
 24. **Goodarzi, M., Choobkar, N. and Mohammadi, F., 2018.** The effects of *Mentha pulegium* and *Zataria multiflora* on growth and carcass specifications and gut microbial count in broiler chickens. Veterinary Clinical Pathology. 12(4): 299-312. (In Persian)
 25. **Seyedabadi, H.R., Nasiri, K., Hosseini, S.A. and Roudbari, Z., 2018.** Comparison of the effect of different levels of Shirazi thyme essential oil with avilamycin and prebiotic based on *Bacillus subtilis* on immune system function and mucin gene expression in broilers. Journal of Agricultural Biotechnology. 11(1): 55-74. (In Persian) doi: 10.22103/jab.2019.13490.1115
 26. **Gholami-Ahangaran, M., Skandari, I. and Zamani Moghaddam, A., 2020.** Evaluation of *Thyme*, *Cinnamon* and *Thyme* plus *Cinnamon* effect on growth, lipid profile