علوم دامی ایران
دورۀ ۴۷، شمارۀ ۳، پاییز ۱۳۹۵ (ص ۳۵۶-۳۴۹)
DOI: 10.22059/ijas.2016.59790

بهبود سامانۀ ایمنی جوجه‌های گوشتی با استفاده از تزریق درون تخم‌مرغی ویتامین‌های ۲۵(OH)D_3 و K_3

طاهره عباسی[۱]، ملک شاکری[۲*]، مجتبی زاغری[۳] و حمید کهرام[۲]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیاران و استاد، گروه علوم دامی، دانشکدۀ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۱- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۱۸)

چکیده

هدف این پژوهش بررسی تأثیر ویتامین‌های ۲۵(OH)D_3 و K_3 با استفاده از تزریق درون تخم‌مرغی[۱] بر سامانۀ ایمنی جوجه‌های گوشتی بود. ۸۰۰ تخم بارور مرغ مادر گوشتی راس ۳۰۸ در طرح کامل تصادفی به‌صورت فاکتوریل (۳×۴) در دوازده تیمار، چهار تکرار و شانزده مشاهده، انجام گرفت. تیمارها شامل ویتامین D (۰، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ میکروگرم) و ویتامین K (۰، ۲، ۶ میکروگرم) بودند. روز ۱۸ جوجه‌کشی تخم‌های بارور، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول‌های آزمایشی و گروه کنترل ۰/۵ میلی‌لیتر آب‌مقطر دریافت کردند. پس از پایان جوجه‌کشی[۲]، جوجه‌های نر برای ۴۲ روز به سالن پرورشی منتقل شدند. برای بررسی ایمنی هومورال میزان ۰/۵ سی‌سی محلول ۱۰درصد SRBC (گلبول قرمز گوسفند) در روزهای ۲۸ و ۳۵ به یک قطعه جوجه از هر تکرار تزریق و در روزهای ۳۵ و ۴۲ خون‌گیری انجام شد. روز ۲۴ برای ارزیابی ایمنی یاخته‌ای فیتو هم‌آگلوتینین (PHA) به پردۀ انگشت پای جوجه‌ها تزریق و یک و پنج روز بعد، برای اندازه‌گیری میزان تورم پوست و ماندگاری تأثیر تیمارها، از شاخص تحریک پوستی استفاده شد. بر پایۀ نتایج، با افزایش سطح ویتامین K_3 عیار پادتن (تیتر آنتی‌بادی) علیه ویروس نیوکاسل افزایش یافت (P<۰/۰۵). بیشترین عیار پادتن علیه SRBC و غلظت IgG مربوط به سطح ۰/۴ میکروگرم D_3 و ۶ میکروگرم K_3 بود (P<۰/۰۵). بیشترین میزان شاخص تحریک مربوط به همین تیمار و کمترین میزان تحریک مربوط به تیمار ۶ میکرولیتر K_3 بود (P<۰/۰۵). درنهایت به نظر می‌رسد که سطح ۰/۴ میکروگرم ویتامین D_3 و۶ میکروگرم ویتامین K_3 با اعمال اثر هم‌افزایی، موجب تقویت پاسخ ایمنی در جوجۀ گوشتی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پاسخ ایمنی یاخته‌ای، پاسخ ایمنی هومورال، تزریق درون تخم‌مرغی، عیار پادتن.

Improvement of broiler chickens immune system by in ovo injection of 25(OH) D_3 and K_3 vitamins

Tahereh Abbasi[1], Malak Shakeri[2*], Mojtaba Zaghari[3] and Hamid Kahram[2]
1, 2, 3. M.Sc. Student, Assistant Professors and Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science & Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Jan. 31, 2016 - Accepted: Jul. 8, 2016)

ABSTRACT

This experiment was conducted to determin the effect of 25(H)D_3 and K_3 vitamins on immune system of Ross 308 broiler chicken in a completely randomized design with a 3×4 factorial arrangement with four replicates and 16 observation per replicate. Treatments included vitamine D_3 (0, 0.4, 0.6 and 0.8 µg) and vitamin K_3 (0, 2 and 6 µg). On day 180 g incubation 0.5 ml of treatment solution was injucted in fertile eggs. Male chicken were reared in experiment cages for a period of 42 days. To evaluate humoral immune system reaction 0.5 ml SRBC (10%) was injected on chickens' breast muscle at the 28th and 35th day, thereafter chicken blood samples were taken on the 35th and 42nd day. In order to evaluate the cellular immune system reaction, Phyto-hemagglutinin (PHA) was injected in the curtain chickens toe on day 24 of rearing period and skin response were studied on 1 and 5 days after injection. The results showed that with increasing levels of vitamin K_3, antibody titers against Newcastle were increased (P<0.05). Treatment of increased 0.4 µg and 6 µg K_3 in antibody levels to SRBC and IgG significantly and showed the maximum stimulation to PHA injection and treatment 12 with 6 µg K_3 and 0.8 µg D_3 showed the lowest amount of stimulation (p<0.05). Finally, it can be concluded that 0.4 µg vit D_3 and 6 µg vit K_3 can improve cellular and humoral immune response in broiler chickens.

Keywords: antibody titers, cellular immunity, humoral immune response, inovo injection, synergistic effect of vitamins.

* Corresponding author E-mail: mshaker@ut.ac.ir Tel: +98 912 5621618
1. In ovo injection
2. Hetching

مقدمه

نبود دسترسی به مواد مغذی موجب جلوگیری از پاسخ مناسب سامانهٔ ایمنی به واکسن زدن در آغاز زندگی جوجه می‌شود (Amiri, 2012). همچنین نبود مواد مغذی و پاسخ‌های هورمونی به گرسنگی، سامانهٔ ایمنی را برای مدت طولانی متأثر می‌کند. گرسنگی اولیهٔ جوجه‌ها می‌تواند بر مقاومت پرنده نسبت به بیماری در همهٔ طول زندگی تأثیرگذار باشد (Yi *et al.*, 2005)، بنابراین هرچه زودتر تغذیه صورت گیرد نتیجهٔ بهتری به دست می‌آید (Capiati *et al.*, 2002). در دهه‌های اخیر، استفاده از روش تزریق درون تخم‌مرغی برای تغذیهٔ زودهنگام در پرندگان مدنظر قرار گرفته است (Rick *et al.*, 1999). در این فرآیند مواد غذایی به رویان درون تخم در مراحل مختلف جنینی تزریق می‌شوند. از مؤثرترین زمان‌ها، هنگام انتقال تخم‌ها از محل خواباندن تخم‌مرغ[1] به دستگاه جوجه‌کشی (روز ۱۸ دورهٔ جوجه‌کشی) است. ازآنجاکه پرنده پس از خروج از تخم تا انتقال به سالن پرورش زمان به نسبت طولانی را بدون دسترسی به آب و خوراک سپری می‌کند، تزریق مواد مغذی (ویتامین‌ها و منابع انرژی) به تخم در گامه‌های پایانی دورهٔ جوجه‌کشی می‌تواند منابع غذایی در دسترس جوجه را تا هنگام انتقال به سالن پرورش بهبود بخشد (Amiri, 2012). ویتامین‌ها از جملهٔ این مواد مغذی هستند که در میزان‌های بسیار اندکی ضروری‌اند.

اگر ویتامین‌ها برای مدتی به میزان کمتر از سطوح موردنیاز استفاده شوند نشانه‌های کمبود آن‌ها دیده خواهد شد (McDowell, 2000). بر همین پایه، بررسی‌های زیادی نقش ویتامین D را در سامانهٔ ایمنی جوجهٔ گوشتی به اثبات رسانده‌اند (White, 2008). سطح پایین ویتامین D موجب ایجاد بیماری‌های خود ایمنی و عفونی می‌شود (Amiri, 2012). همچنین ویتامین D_3 در تنظیم عمل یاخته‌های ایمنی بدن نقش مهمی را ایفا می‌کند (Gerry, 2011). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که افزودن $۲۵(OH)D_3$ به جیرهٔ غذایی در جوجه‌های گوشتی موجب افزایش پاسخ ایمنی یاخته‌ای می‌شود (Gomez *et al.*, 2013). همچنین مشخص شد که اضافه کردن ویتامین K به جیرهٔ غذایی در روزهای اولیهٔ پرورش می‌تواند سودمند باشد. چون در مراحل اولیهٔ رشد جوجهٔ گوشتی جمعیت ریزجانداران (میکروارگانیسم‌های) روده به‌خوبی توسعه نیافته‌اند بنابراین جوجه‌ها به ویتامین K کمی دسترسی دارند و اضافه کردن این ویتامین می‌تواند موجب تقویت سامانهٔ ایمنی، سامانهٔ انعقاد خون و تقویت تجمع کلسیم در استخوان‌های جوجه‌ها شود (McDowell, 2000). بنابراین، این پژوهش بر پایهٔ پژوهش‌های گذشته به‌منظور ارزیابی تأثیر هم‌افزایی ویتامین‌های D_3 [$25(OH)D_3$] و K_3 بر سامانهٔ ایمنی جوجه‌های گوشتی با استفاده از به‌عنوان مادهٔ مغذی تزریق درون تخم‌مرغی در دورهٔ جوجه‌کشی تخم‌مرغ‌ها طراحی شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش با استفاده از ۸۰۰ عدد تخم بارور مرغ مادر گوشتی سویهٔ رأس ۳۰۸، به‌صورت فاکتوریل (۴×۳) و در قالب طرح کامل تصادفی و با استفاده از بررسی‌های گذشته (Bello *et al.*, 2013) با دوازده تیمار آزمایشی، چهار تکرار و شانزده عدد تخم‌مرغ در هر تکرار، در ایستگاه علوم دامی پردیس دانشگاه تهران در سال۱۳۹۴ انجام شد. تیمارها شامل: تیمارها شامل: ۱ (تزریق آب مقطر)، ۲ (۰/۴ میکروگرم ویتامین D_3)، ۳ (۰/۴ میکروگرم ویتامین D_3 + ۲ میکروگرم ویتامین K_3)، ۴ (۰/۴ میکروگرم ویتامین D_3 + ۶ میکروگرم ویتامین K_3)، ۵ (۰/۶ میکروگرم ویتامین D_3)،۶ (۰/۶ میکروگرم ویتامین D_3 + ۲ میکروگرم ویتامین K_3)، ۷ (۰/۶ میکروگرم ویتامین D_3 + ۶ میکروگرم ویتامین K_3)، ۸ (۰/۸ میکروگرم ویتامین D_3)، ۹ (۰/۸ میکروگرم ویتامین D_3 + ۲ میکروگرم ویتامین K_3) ۱۰ (۰/۸ میکروگرم ویتامین D_3 + ۶ میکروگرم ویتامین K_3)، ۱۱ (۲ میکروگرم ویتامین K_3) و ۱۲ (۶ میکروگرم ویتامین K_3) بودند. ویتامین D مورداستفاده از ویتامین D انسانی و نوع ویتامین K مورداستفاده K_3 (منادیوویت) استفاده شد. در روز ۱۸ جوجه‌کشی، درون اتاق جوجه‌کشی در دمای همسان با دمای

1. Setter

دستگاه جوجه‌کشی، در آغاز قسمت پهن تخم‌مرغ (سمت کیسهٔ هوایی) با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شد، سپس به هر یک از تخم‌مرغ‌های بارور ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول‌های آزمایشی و به گروه کنترل ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر توسط سرنگ انسولین در کیسهٔ هوایی جوجه‌ها تزریق شد. پس از تزریق، تخم‌مرغ‌ها در درون دستگاه جوجه‌کشی قرار داده شدند. پس از ۵۰ ساعت جوجه‌های تفریخ‌شده از دستگاه خارج و پس از شمارش و وزن‌کشی، شمار پنج قطعه جوجهٔ یک روزهٔ نر گوشتی برای هر یک از تکرارهای گروه‌های آزمایشی انتخاب و بی‌درنگ به واحد پرورش در سالن تحقیقاتی دام و طیور ایستگاه علوم دامی منتقل شد. جیره‌های آزمایشی برای همهٔ تیمارها یکسان و از جیرهٔ پایه در ایستگاه علوم دامی و بر پایهٔ نیازمندی‌های راس ۳۰۸ تعدیل شده، انتخاب شد (جدول۱). پرندگان در همهٔ دورهٔ آزمایش دسترسی آزاد به آب و خوراک داشتند. برنامهٔ پرورشی، بهداشتی و واکسن زدن پرندگان با استفاده از راهنمای مدیریت پرورش راس ۳۰۸ انجام گرفت.

تزریق گلبول قرمز گوسفندی (SRBC) و فیتو هم آگلوتینین (PHA) برای بررسی سامانهٔ ایمنی هومورال و یاخته‌ای صورت گرفت. برای بررسی پاسخ‌های سامانهٔ ایمنی هومورال در روزهای ۲۸ و ۳۵ دورهٔ پرورش دروایهٔ (سوسپانسیون) ۵ درصد گلبول قرمز گوسفند (SRBC) که در بافر فسفات (PBS) در شرایط سترون (استریل) تهیه و ۰/۱ میلی‌لیتر دروایهٔ SRBC در ماهیچهٔ سینهٔ همهٔ جوجه‌ها تزریق شد. در روزهای ۳۵ و ۴۲ دورهٔ پرورش از هر تکرار یک پرنده انتخاب و از راه ورید بال خون‌گیری انجام شد. نمونه‌های خون به‌مدت پنج دقیقه با سرعت (rpm) ۵۰۰۰ برای جداسازی سرم سانتریفیوژ شدند و پس از سانتریفیوژ، سرم‌های مربوط گردآوری شدند و تا تعیین عیار پادتن (تیتر آنتی‌بادی) (IgM و IgG، Anti-SRBC تام) در دمای ۸۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. اندازه‌گیری Anti-SRBC تام، ایمونوگلوبولین M و G علیه SRBC با روش هم‌اگلوتیناسیون به‌صورت زیر انجام شد. پس از یخ گشایی برای غیرفعال کردن عامل‌های سامانهٔ ایمنی (کمپلمان) نمونه‌ها به مدت سی دقیقه در دمای ۵۶ درجهٔ سلسیوس در حمام بن‌ماری نگهداری شدند. پس‌ازآن نمونه‌ها به دو بخش تقسیم شدند. بخش اول برای تعیین عیار پادتن کل و بخش دوم برای تعیین عیار IgG استفاده شد. به‌منظور غیرفعال کردن IgM و تعیین عیار IgG به نمونه‌ها محلول ۱/۴ درصد مرکاپتواتانول مخلوط شده در بافر فسفات، به‌صورت ۱:۱ (حجمی) به سرم اضافه شد و به مدت سی دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس ذخیره و آزمایش هم‌آگلوتیناسیون انجام شد. عیار پادتن‌های به‌دست‌آمده علیه گلبول قرمز بر پایهٔ لگاریتم بر پایهٔ ۲ گزارش شد (Grasman, 2010). برای بررسی، پادگن (آنتی‌ژن)های نیوکاسل با استفاده از واکسن نیوکاسل لاسوتا در سن ۱۲ روزگی به جوجه‌ها تزریق شد. سپس در سن چهل روزگی (سه هفته پس از تزریق آنتی‌ژن) خون‌گیری از سیاهرگ بال جوجه‌ها به شمار یک نمونه از هر تکرار، انجام شد و سرم هر نمونه در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس جداسازی شد. با استفاده از کیت هم اگلوتیناسیون از شرکت پارس آزمون، غلظت پادتن‌های تولیدشده بر ضد پادگن‌های نیوکاسل اندازه‌گیری شد و مقادیر بر پایهٔ $\log_2$ (لگاریتم نسبت رقیق کردن سرم در مبنای ۲) محاسبه شد (Grasman, 2010). به‌منظور بررسی سامانهٔ ایمنی یاخته‌ای با استفاده از روش Thompson *et al.* (1980)، در روز ۲۴ دورهٔ پرورش محلول ۱ میلی‌گرم PHA-P در ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین (PBS) تهیه و به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر به پردهٔ بین انگشتان پای راست تزریق شد. همچنین محلول ۰/۱ میلی‌لیتر PBS را به پردهٔ بین انگشتان پای چپ به‌عنوان شاهد تزریق شد. یک و پنج روز پس از تزریق، ضخامت پردهٔ بین انگشتان با کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد و سپس شاخص تحریک بر پایهٔ رابطهٔ زیر محاسبه شد:

شاخص تحریک پوستی =

ضخامت محل تزریق PBS- ضخامت محل تزریق PHA-P

در پایان آزمایش (روز ۴۲ پرورش) از هر واحد آزمایشی یک پرنده بر پایهٔ میانگین وزن انتخاب و برای اندازه‌گیری وزن بورس فابریسیوس، تیموس و

طحال کشتار شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها بر پایهٔ آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی و با استفاده از رویهٔ GLM نرم‌افزار آماری SAS تجزیه‌وتحلیل شد.

جدول ۱. اجزاء و ترکیب شیمیایی جیره‌های مورداستفاده در جوجه‌های گوشتی

Table 1. Ingredient and composition of the diets for broiler chickens

Ingredients (%)	0-14 days	14-28 days	28-42 days
Corn	56.7	59.65	65.57
Soybean meal	26.86	21.87	16.86
Wheat bran	5	6	5.03
Canola	3	4	5
Di-calcium phosphate	1.54	1.25	1.01
Calcium carbonate	1.22	0.96	0.87
soy oil	1	1	0.5
Mineral and vitamin supplements	0.5	0.5	0.5
L-lysine	0.4	0.21	0.18
DL-methionine	0.34	0.21	0.17
L-threonine	0.11	0.01	0.0
Salt	0.33	0.35	0.28
Energy and nutrient diet %	100	100	100
Metabolizable energy Kcal . kg	2.8	2.85	2.9
CP	20.36	19.56	18.08
Digestible lysine	1.32	1.1	0.99
Digestible methionine + cystine	0.99	0.84	0.87
Calcium	1	0.86	0.77
Total phosphorus	0.77	0.73	0.67
P	0.48	0.43	0.38

* مکمل کانی و ویتامینی مقادیر زیر را در هر کیلوگرم خوراک تأمین کرد: ۹۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۲۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D_3، ۱۸ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۲ میلی‌گرم ویتامین K_3، ۱/۸ میلی‌گرم ویتامین B_1، ۶/۶ میلی‌گرم ویتامین B_2، ۳۰ میلی‌گرم ویتامین B_3، ۱۰ میلی‌گرم ویتامین B_5، ۳ میلی‌گرم ویتامین B_6، ۱ میلی‌گرم ویتامین B_9، ۰/۰۱۵ میلی‌گرم ویتامین B_{12}، ۰/۱ میلی‌گرم ویتامین H_2، کولین کلراید ۵۰۰ میلی‌گرم، ۱۰۰ میلی‌گرم Mn، ۸۵ میلی‌گرم Zn، ۵۰ میلی‌گرم Fe، ۱۰ میلی‌گرم Cu، ۰/۲ میلی‌گرم Se و ۱ میلی‌گرم I. ۲- آمینواسیدها بر پایهٔ قابل‌هضم ایلیومی استاندارد شده است.

* The mineral and vitamin supplements per kg of feed were as follow: 9000 IU of vitamin A, 2000 IU of vitamin D_3, 18 IU of vitamin E, 2 mg vitamin K_3, 1/8 mg vitamin B_1, 6/6 mg vitamin B_2, 30 mg vitamin B_3, 10 mg vitamin B_5, 3 mg vitamin B_6, 1 mg of vitamin B_9, 0/015 mg vitamin B_{12}, 0/1 mg vitamin H_2, 500 mg choline chloride, 100 mg Mn, 85 mg Zn, 50 mg Fe, 10 mg Cu, 0/2 mg Se and 1 mg I. 2- Amino acids standardized by ileal digestible.

نتایج و بحث

تولید پادتن علیه واکسن ویروس نیوکاسل

تأثیر تزریق درون تخم‌مرغی ویتامین‌های D_3 و K_3 بر عیار تولید پادتن علیه ویروس نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی در جدول ۲ ارائه شده است. با توجه به این جدول، مشاهده شد که میزان عیار پادتن علیه ویروس نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی با افزایش سطح ویتامین K_3 افزایش یافت (P<۰/۰۵). سطح ۶ میکروگرم ویتامین K_3 موجب افزایش معنی‌دار میزان عیار پادتن نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵). افزایش سطح تزریق ویتامین D_3 نیز موجب افزایش میزان عیار پادتن علیه ویروس نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی شد. میزان عیار پادتن سطح ۰/۶ میکروگرم ویتامین D_3 به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد و دیگر گروه‌ها بود (P<۰/۰۵). اثرگذاری متقابل این دو ویتامین نیز اثر مثبتی بر میزان عیار پادتن داشت به‌طوری‌که سطح ۰/۶ میکروگرم ویتامین D_3 و ۶ میکروگرم ویتامین K_3 به تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار موجب افزایش معنی‌دار میزان این عیار در جوجه‌های گوشتی در مقایسه با تیمار شاهد شد (P<۰/۰۵). با توجه به اینکه تحقیقات نشان می‌دهد که ویتامین‌ها در پستانداران می‌توانند از راه جفت عبور کرده و در اختیار جنین قرار گیرد (Malone, 1975). تزریق ویتامین‌های محلول در چربی D_3 و K_3 به تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار توانسته است باعث تقویت سامانهٔ ایمنی در جوجه‌های گوشتی شود. افزون بر این بررسی‌های دیگری نیز گزارش کردند که ویتامین K_3 می‌تواند اثر هم‌افزایی با ویتامین ۲۵(OH)D_3 داشته باشد و لذا موجب افزایش پاسخ ایمنی یاخته‌ای در جوجه‌های گوشتی شود (Gerry, 2011; Aslam *et al*., 1998). بنابراین می‌توان گفت نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق تأییدی بر یافته‌های یادشده بوده، به‌طوری‌که باعث افزایش تولید پادتن علیه ویروس نیوکاسل شده است.

جدول ۲. تأثیر تزریق درون تخم‌مرغی ویتامین‌های ۲۵ $(OH)D_3$ و K_3 بر عیار پادتن تولیدشده علیه ویروس نیوکاسل (HI) (Log_2) در روز ۴۲ پرورش

Table 2. Effect of in ovo injection of $25(OH)D_3$ and K_3 vitamins alloy antibody production against Newcastle Disease Virus (HI) (Log_2) in 42 days

Treatment		Alloy antibody production
(μg D_3)	K_3 (μg)	Newcastle
0	0	2.00^{bc}
0	2	2.16^{ab}
0	6	2.58^{a}
0.4	0	2.45^{ab}
0.6	0	2.58^{a}
0.8	0	2.00^{bc}
0.4	2	2.16^{ab}
0.4	6	2.00^{bc}
0.6	2	1.50^{c}
0.6	6	2.58^{a}
0.8	2	2.45^{ab}
0.8	6	2.45^{ab}
SEM		0.11
p-value		0.002

حروف غیرهمسان نشان‌دهندهٔ تفاوت میانگین سطوح (با احتمال ۵ درصد) در هر ستون است.

Averages with different letters in each column represent significant differences (P<0.05).

تولید پادتن علیه SRBC

بر پایهٔ بررسی‌های ایمن‌شناختی (ایمونولوژیکی) دامی انجام‌شده، میزان پادتن یا پادتن تولیدی بر علیه SRBC می‌تواند به‌عنوان شاخصی در تعیین توانایی سامانهٔ ایمنی هومورال استفاده می‌شود (Svensson *et al.*, 2001). در این تحقیق، نتایج تزریق درون تخم‌مرغی ویتامین‌های D_3 و K_3 در جوجه‌های گوشتی و تأثیر آن بر عیار پادتن کل، IgM و IgG تولیدشده علیه SRBC در (جدول ۳) نشان می‌دهد که، تحریک سامانهٔ ایمنی توسط پروتئین خارجی موجب ایجاد واکنش پادتن شده است. قابل بیان است که، پاسخ سامانهٔ ایمنی بر پایهٔ تنوع ژنتیکی و نیز تنوع محیطی، که عامل تغذیه را نیز در بردارد متغیر خواهد بود. پاسخ قوی‌تر نشان‌دهندهٔ توان بیشتر فرد در برابر عامل بیماری‌زای خارجی است (Svensson & Sinervo, 2002). درواقع پاسخ آنتی‌بادی همبستگی مثبت با مقاومت عمومی فرد در مقابل بیماری‌ها دارد (Svensson *et al.*, 2001). در این آزمایش مشاهده شد که عیار تولید پادتن با افزایش سطح ویتامین D_3 در جوجه‌های گوشتی افزایش یافت. ولیکن ادامه افزایش سطوح این ویتامین تأثیر معکوسی بر تولید پادتن داشت به‌طوری‌که سطح ۰/۸ میکروگرم این ویتامین موجب کاهش عیار تولید پادتن جوجه‌ها شد (P<۰/۰۵). شاید بتوان گفت علت این نتیجه به دلیل آن است که میزان بالای این ویتامین به دلیل محلول در چربی بودن اثرگذاری نامطلوبی دارد. بالاترین عیار تولید پادتن تام و IgG علیه SRBC تام مربوط به سطح ۰/۴ میکروگرم ویتامین D_3 بود (P<۰/۰۵). همچنین با افزایش سطح ویتامین K_3 نیز عیار تولید پادتن‌های IgM و IgG علیه SRBC افزایش یافت و برخلاف ویتامین D_3 بیشترین میزان تولید پادتن در بالاترین سطح این ویتامین (سطح ۶ میکروگرم) مشاهده شد (P<۰/۰۵). بر همین پایه نتایج دیگر تحقیقات نیز بیان می‌کند که ویتامین ۲۵$(OH)D_3$ موجب بهبود پاسخ ایمنی هومورال در جوجه‌های گوشتی می‌شود (Chou & Chung, 2009; Khan *et al.*, 2010). لذا، نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش با دیگر تحقیقات همخوانی داشته است، هرچند که در برخی از بررسی‌های گزارش کرده‌اند که میزان تولید پادتن کل، IgM و IgG تولیدشده علیه SRBC در گروه دارای کمبود ویتامینD با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشته است (Aslam *et al.*, 1998).

ارزیابی سامانهٔ ایمنی یاخته‌ای

تأثیر تزریق درون تخم‌مرغی ویتامین‌های D_3 و K_3 بر پاسخ‌های ایمنی یاخته‌ای نسبت به تزریق فیتوهم‌آگلوتینین (PHA) در بین پردهٔ انگشتان پا در جدول ۴ نشان داده شده است. در روزهای اول و پنجم پس از تزریق بین تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری در شاخص تحریک مشاهده شد. همچنین شاخص تحریک در جوجه‌های گوشتی با افزایش سطح ویتامین D_3 افزایش یافت (P<۰/۰۵). ولی به‌نظر می‌رسد تیمار چهار (تزریق ۰/۴ ۲۵$(OH)D_3$ و ۶ میکروگرم ویتامین K_3) که ترکیب هر دو ویتامین بوده، بیشترین میزان تحریک و تیمار دوازده (تزریق ۶ میکروگرم ویتامین K_3) کمترین میزان تحریک را نشان دادند (P<۰/۰۵). در همین زمینه، Gómez *et al.* (2013) گزارش کردند که ویتامین ۲۵$(OH)D_3$ موجب افزایش پاسخ ایمنی یاخته‌ای در جوجه‌های گوشتی شده است. لذا نتایج

به‌دست‌آمده از این تحقیق تأییدی بر یافته‌های یادشده است. همچنین، برخی از بررسی‌ها گزارش کردند که کمبود ویتامینD موجب کاهش پاسخ ایمنی یاخته‌ای (۶۲ تا ۶۴ درصد) نسبت به گروه شاهد شده است (Gerry, 2011; Aslam *et al.*, 1998). البته به نظر می‌آید که میزان‌های بالای این ویتامین به دلیل محلول در چربی بودن تأثیر نامطلوبی خواهد داشت. به‌طوری‌که Bello *et al.* (2013) اعلام کردند که استفاده از میزان‌های بالای ویتامین D (دزهای بالاتر از ۱/۸ میکروگرم) می‌تواند اثرگذاری سمی به‌جا گذارد. همچنین اعلام کردند که به‌احتمال دزهای پایین از ۱/۲ میکروگرم غیر سمی است.

جدول ۳. تأثیر تزریق درون تخم‌مرغی ویتامین‌های $25(OH)D_3$ و K_3 بر عیار پادتن تولیدشده علیه گلبول قرمز گوسفند (HA) (Log_2) در روز ۴۲ پرورش

Table 3. Effect of in ovo injection of $25(OH)D_3$ and K_3 vitamins on alloy antibody production against sheep red blood cells (HA) (Log_2) in 42 days

Treatment		Alloy antibody production		
(µg D_3)	K_3 (µg)	Total Anti- SRBC	IgM	IgG
0	0	1.00^{b}	0.00^{d}	1.00^{b}
0	2	1.00^{b}	0.00^{d}	1.00^{b}
0	6	2.00^{ab}	1.00^{bc}	1.00^{b}
0.4	0	3.12^{a}	2.12^{a}	1.00^{b}
0.6	0	3.12^{a}	1.12^{bc}	2.00^{a}
0.8	0	1.50^{ab}	0.00^{d}	1.50^{ab}
0.4	2	2.06^{ab}	0.56^{cd}	1.50^{ab}
0.4	6	3.12^{a}	1.12^{bc}	2.00^{a}
0.6	2	1.00^{b}	0.00^{d}	1.00^{b}
0.6	6	2.56^{a}	0.56^{cd}	2.00^{a}
0.8	2	2.56^{a}	1.56^{ab}	1.00^{b}
0.8	6	1.00^{b}	0.00^{d}	1.00^{b}
SEM		0.12	0.02	0.01
p-value		0.002	0.001	0.001

حروف غیرهمسان نشان‌دهندهٔ تفاوت میانگین سطوح (با احتمال ۵ درصد) در هر ستون است.

Averages with different letters in each column represent significant differences (P<0.05).

جدول ۴. تأثیر تزریق درون تخم‌مرغی ویتامین‌های $25(OH)D_3$ و K_3 بر واکنش پردهٔ بین انگشت پای جوجه به تزریق PHA

Table 4. Effect of in ovo injection of $25(OH)D_3$ and K_3 vitamins on the curtain between the toes chick reaction to injection of PHA

Treatment		Stimulation Index (mm)	
(µg D_3)	K_3 (µg)	1 day after injection	5 day after injectio
0	0	2.21^{ab}	0.50^{c}
0	2	1.78^{cd}	1.09^{ab}
0	6	1.43^{d}	0.72^{bc}
0.4	0	1.98^{abc}	1.09^{ab}
0.6	0	2.36^{a}	1.10^{a}
0.8	0	2.36^{a}	1.06^{a}
0.4	2	2.36^{a}	1.07^{a}
0.4	6	2.40^{a}	1.17^{a}
0.6	2	2.20^{ab}	0.98^{ab}
0.6	6	1.88^{bc}	1.17^{a}
0.8	2	2.23^{ab}	0.99^{ab}
0.8	6	2.23^{ab}	1.29^{a}
SEM		0.12	0.11
p-value		0.0001	0.0001

* حروف غیرهمسان نشان‌دهندهٔ تفاوت میانگین سطوح (با احتمال ۵ درصد) در هر ستون است.

Averages with different letters in each column represent significant differences (P<0.05).

وزن اندام‌های لنفاوی

با توجه به جدول ۵، افزایش سطوح تزریقی ویتامین D_3 به کیسه‌های هوایی جوجه‌های گوشتی موجب افزایش وزن نسبی طحال می‌شود (*P*<۰/۰۵). هرچند که سطوح بالاتر ویتامین (سطح ۰/۸ میکروگرم ویتامین D_3) موجب کاهش وزن نسبی طحال شد. تزریق ویتامین K_3 نیز موجب افزایش درصد وزن طحال شد (*P*<۰/۰۵). اثر متقابل این دو ویتامین نیز تأثیر مثبتی بر درصد وزن نسبی طحال داشت به‌طوری‌که بیشترین وزن نسبی طحال مربوط به سطح ۰/۸ میکروگرم ویتامین D_3 و ۶ میکروگرم ویتامین K_3 بود (*P*<۰/۰۵). نتایج همچنان بیانگر آن است که درصد وزن تیموس نیز تحت تأثیر تزریق سطوح ویتامین‌های D_3 و K_3 قرار گرفته و افزایش سطوح این دو ویتامین موجب افزایش وزن نسبی تیموس شد (*P*<۰/۰۵). Aslam *et al.* (1998) گزارش کردند که

جوجه‌های گوشتی ماده با کمبود ویتامین D در جیرهٔ غذایی، وزن نسبی تیموس آن‌ها ۶۱ درصد کمتر از گروه کنترل بود. بنابراین کمبود این ویتامین موجب قابل‌توجه بودن وزن نسبی تیموس می‌شود.

جدول ۵. تأثیر تزریق درون تخم‌مرغی ویتامین‌های $۲۵(OH)D_3$ و K_3 بر وزن اندام لنفاوی در جوجه‌های گوشتی

Table 5. Effect of in ovo injection of $25(OH)D_3$ and K_3 vitamins on the Lymphoid organ weights in broiler

Treatment		Lymphoid organ weights		
(μg D_3)	K_3 (μg)	Spleen	Bursa	Thymus
0	0	0.07^{cd}	0.17	0.46^{d}
0	2	0.12^{ab}	0.21	0.63^{abc}
0	6	0.08^{bcd}	0.19	0.56^{bcd}
0.4	0	0.12^{ab}	0.20	0.59^{abcd}
0.6	0	0.12^{abc}	0.13	0.51^{bcd}
0.8	0	0.06^{d}	0.19	0.62^{abcd}
0.4	2	0.09^{abcd}	0.16	0.57^{bcd}
0.4	6	0.10^{abcd}	0.18	0.59^{abcd}
0.6	2	0.09^{abcd}	0.22	0.64^{abc}
0.6	6	0.08^{bcd}	0.20	0.76^{a}
0.8	2	0.133^{a}	0.20	0.68^{ab}
0.8	6	0.132^{ab}	0.23	0.47^{cd}
SEM		0.008	0.1	0.03
p-value		0.009	0.1	0.001

* حروف غیرهمسان نشان‌دهندهٔ تفاوت میانگین سطوح (با احتمال ۵ درصد) در هر ستون است.

Averages with different letters in each column represent significant differences (P<0.05).

شناسایی گیرندهٔ ویتامین D (VDR) در غشای هستهٔ چندین یاخته ازجمله بزرگ بیگانه‌خوار (ماکروفاژ)ها و لنفوسیت‌های B و T منجر به کشف اثر ویتامین D به‌عنوان تنظیم‌کنندهٔ سامانهٔ ایمنی بدن شد (Capiati *et al*., 2002). به نظر می‌رسد که این ویتامین بااتصال به گیرندهٔ خود در یاخته‌های ایمنی موجب فعال یا سرکوب کردن ژن‌های یاخته‌های هدف شده و باعث تنظیم سامانهٔ ایمنی می‌شود (Gerry, 2011). بنابراین در این تحقیق، تزریق $۲۵(OH)D_3$ به مایع آمنیوتیک به‌احتمال قادر به تحریک و تنظیم گیرنده‌های ویتامین D در یاخته‌های ایمنی در فرآیند دورهٔ جنینی شده، به‌طوری‌که این امر منجر به افزایش توان سامانهٔ ایمنی در دورهٔ پرورش جوجه‌های گوشتی شده است. افزایش بیان (VDR) در لنفوسیت T و یاخته‌های تولیدکنندهٔ ژن (APCs) و همچنین فعال شدن آنزیم‌های مسئول در عملکرد ویتامین $D_۳$ (توسط لنفوسیت‌ها و APCs بیان می‌شوند) تأثیر خود را بر سامانهٔ ایمنی اعمال می‌کنند (Etten *et al*., 2008). درواقع برای عملکرد مناسب سامانهٔ ایمنی (ایمنی ذاتی و اکتسابی) به‌منظور تولید آنتی‌بادی‌ها، کیموتاکسی توسط یاخته‌های ایمنی و کنترل التهاب، نیاز به مقادیر کافی ویتامین D خواهد بود. به‌رغم مطلب یادشده، تاکنون سطح لازم $۲۵(OH)D_3$ که در هر اختلال موردنیاز است مشخص نشده است. اما ممکن است به‌طور قابل‌توجهی بیشتر از حدی باشد که امروزه برای دفع بیماری‌هایی ازجمله سل موردنیاز است (Gerry, 2011).

نتیجه‌گیری کلی

درنهایت، با توجه به هم‌افزایی تأثیر ویتامین‌های D و K (Gholamzadeh, 2012)، تزریق درون تخم‌مرغی میزان مطلوب این دو ویتامین (سطح ۰/۴ میکروگرم ویتامین D_3 و ۶ میکروگرم ویتامین K_3 به‌صورت همزمان) می‌تواند موجب تقویت پاسخ ایمنی هومورال و یاخته‌ای و درمجموع بهبود سامانهٔ ایمنی جوجه‌های گوشتی شود.

REFERENCES

1. Amiri, N. (2012). *The effect of various nutrients in ovo injection and 36 hours after hatching on hatchability hunger, blood parameters, intestinal morphology and performance of broiler chickens*. M.Sc. dissertation, Faculty of Agriculture, University of Kerman, Iran. (in Farsi)
2. Aslam, S. M., Garlich, J. D. & Qureshi, M. A. (1998). Vitamin D deficiency alters the immune responses of broiler chicks. *Poulty Science*, 77, 842-849.

3. Bello, A., Zhai, W., Gerard, P. & Peebles, E. (2013). Effects of the commercial in ovo injection of hydroxycholecalciferol on the hatchability and hatching chick quality of broilers. *Poulty Science*, 92, 2551-2559.
4. Capiati, D., Benassati, S. & Boland, R.L. (2002). 1, 25$(OH)_2$-vitamins D_3 induces translocation of the vitamin D receptor (VDR) to the plasma membrane in skeletal muscle cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 86, 128-135.
5. Chou, S. & Chung, T. (2009). Effects of supplemental hydroxycholecalciferol on growth performance, small intestinal morphology, and immune response of broiler chickens. *Poultry Science*, 88, 2333-2341.
6. Chun, R. F., Adams, J. S. & Hewison, M. (2008). A new look at 'old' vitamin D. *Journal Endocrinol*, 198, 261-269.
7. Etten, V.E., Stoffels, K., Gysemans, C., Mathieu, C. & Overbergh, L. (2008). Regulation of vitamin D homeostasis: implications for the immune system. *Nutrition Reviews*, 66, 125-134.
8. Gerry, K. (2011). A review of the critical role of vitamin D in the functioning of the immune system and the clinical implications of vitamin D deficiency. *Molecular Nutrition and Food Journal*, 55, 96-108.
9. Gholamzadeh, P. (2012). *The effects of in ovo injection of 1α (OH) D_3 and k_1 vitamins on hatch rate and some physiological factors on the growth of broiler chickens*. M.Sc. dissertation, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Iran. (in Farsi)
10. Gómez, V. G., Morales, L. R. & Avila, G. E. (2013). Use of 25 hydroxycholecalciferol in Diets of Broiler Chickens: Effects on Growth Performance, Immunity and Bone Calcification. *Poultry Science*, 50, 60-64.
11. Grasman, K. A. (2010). In vivo functional test for assessing immunotoxicity in birds (Ed.), Immunotoxicity testing: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology (pp. 387-397) Humana Press, Product.
12. Hewison, M., Burke, F., Evans, K. N. & Lammas, D. A. (2007). Extra-renal 25-hydroxyvitamin D_3-1alpha-hydroxylase in human health and disease Steroid Biochem. *Molecular Biology*, 103, 316-321.
13. Holick, M. F. & Chen, T. C. (2008). Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 1080-1086.
14. Khan, S. H., Shahid, R., Mian, A. A., Sardar, R. & Anjum, M. A. (2010). Effect of the level of cholecalciferol supplementation of broiler diets on the performance and tibial dyschondroplasia. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94, 584-593.
15. Malone, J. I. (1975). Vitamin passage across the placenta. *Clinics in Perinatology*, 2(2), 295-307.
16. Margherita, T., Yan, Zhu., Monica, F. & Anja, Wittke. (2004). Vitamin D status: 1,25-dihydroxyvitamin D_3, and the immune system. *American Society for Clinical Nutrition*, 80, 1717-20.
17. McDowell, L. R. (2000). Vitamins in animal and human nutrition. Iowa State University Press United States of America, 52, 227-258.
18. Quiles, A. F., Marques, G., Murakami, A. E., Rojas, I. C., Picoli, K. P. & Puzotti, M. M. (2013). Use of Vitamin D_3 and Its Metabolites in Broiler Chicken Feed on Performance, Bone Parameters and Meat Quality. *Animal Science Department*, 26, 408-415.
19. Ricks, C., Avakian, A., Bryan, T., Gildersleeve, R., Haddad, E., Ilich, R., King, S., Murray, L., Phelps, P. & Poston, R. (1999). In ovo vaccination technology. Advances in veterinary medicine. *Poultry Science*, 41, 495-515.
20. Svensson, E. I., Sinervo, B. & Comendant, T. (2001). Densitydependent competition and selection on immune function in genetic lizard morphs. *Proceeding National Academy Science*, 55, 2053-2069.
21. Svensson, E. I. & Sinervo, B. (2002). Mechanistic and experimental analysis of condition and reproduction in a polymorphic lizard. *Journal of Evoloution*, 15, 1034-1047.
22. Wang, T. T., Nestel, F. P., Bourdeau, V. & Nagai, Y. (2004). Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D_3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *Journal Immunology*, 173, 2909-2912.
23. Thompson, D. L., Elgert, K. D., Gross, W. B. & Siegel, P. B. (1980). Cell mediated immunity in Marek,s disease virus infected chickens genetically selection for high and low concentrations of plasma corticostrone. *Veterinary Research*, 41, 91-96.
24. White, J. H. (2008). Vitamin D signaling, infectious diseases and regulation of innate immunity. *Infection Immunology*, 76, 3837-3843.
25. Yi, G., Allee, G., Knight, C. & Dibner, J. (2005). Impact of glutamine and oasis hatchling supplement on growth performance, small intestinal morphology and immune response of broilers vaccinated and challenged with Eimeria maxima. *Poultry Science*, 84, 283-293.