



# تأثیر ویتامین‌های A و E بر روی پاسخ‌های سیستم ایمنی هومورال بدن در جوجه‌های تخمگذار تجارتي و جوجه‌های بومی خراسان

رضا بهاری کاشانی

دانشجوی دوره دکتری تخصصی گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

محمود شیوازاد

استاد گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

فریدون افتخاری شاهرودی

استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

## چکیده

این تحقیق به منظور بررسی تأثیر ویتامین‌های A و E، بر روی مولفه‌های هومورال سیستم ایمنی جوجه‌های تخمگذار تجارتي و جوجه‌های بومی منطقه خراسان و مشخص ساختن مقدار نیاز آنها جهت فعالیت‌های ایمنی، انجام گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل با دو فاکتور ویتامین A در چهار سطح ۶۰۰۰، ۱۲۰۰۰، ۱۸۰۰۰ و ۲۴۰۰۰ واحد بین‌المللی در کیلوگرم خوراک و ویتامین E در چهار سطح ۲۰، ۵۰، ۸۰ و ۱۱۰ واحد بین‌المللی در کیلوگرم خوراک، با چهار تکرار و پنج جوجه یکروزه بومی و لگهورن در هر تکرار، انجام گرفت. میزان تیترا آنتی بادی علیه گلبول قرمز گوسفند با روش هم‌آگلوتیناسیون و تیترا آنتی بادی علیه آنتی ژنهای ویروسهای آنفلوانزا و نیوکاسل با روش ممانعت از آگلوتیناسیون مورد آزمایش و اندازه‌گیری قرار گرفتند. میزان آنتی بادی علیه گلبول قرمز گوسفند، آنتی بادی علیه ویروسهای آنفلوانزا و نیوکاسل، به شکل معنی‌داری تحت تأثیر اثرات اصلی و متقابل ویتامین‌های A و E قرار گرفت ( $p < 0.05$ ). با افزایش میزان ویتامین‌های A و E مقدار پاسخ سیستم ایمنی نیز افزایش یافت و در سطح ۱۸۰۰۰ واحد بین‌المللی از ویتامین A بهترین پاسخ‌های سیستم ایمنی اندازه‌گیری شد اما در سطح ۲۴۰۰۰ واحد بین‌المللی از ویتامین A در خوراک توان سیستم ایمنی کاهش نشان داد. ویتامین E در سطح ۸۰ واحد بین‌المللی در کیلوگرم خوراک بهترین تأثیر را بر روی سیستم هومورال ایمنی نشان داد. بین گله‌های بومی و تجارتي در پاسخ سیستم ایمنی هومورال و تولید آنتی بادی بر علیه ویروس‌ها اختلاف معنی دار مشاهده نشد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که سیستم ایمنی هومورال به طور مستقیم تحت تأثیر غلظت ویتامین‌های A و E خوراک قرار دارد و بین ویتامین‌های A و E، اثر متقابل منفی بر روی پاسخ‌های دستگاه ایمنی وجود دارد. سطوح توصیه شده ویتامین‌های A و E در NRC (۱۹۹۴) به منظور ایجاد حداکثر توان سیستم ایمنی هومورال، کافی نیستند.

**واژه‌های کلیدی:** ویتامین A، ویتامین E، ایمنی هومورال، آنتی‌بادی، آنتی‌ژن، لگهورن، جوجه بومی خراسان

## مقدمه

سازوکارهای دفاعی، در شرایط روبرو شدن با عوامل بیماری‌زا اولویت اول بدن در استفاده از مواد مغذی هستند و پرنده به منظور غلبه بر بیماری از حداکثر توان خود و مواد مغذی استفاده می‌کند. اگر برخی از مواد مغذی در حد کمتر از نیاز حیوان باشند، در زمان بروز بیماری مقدار کافی از ماده مغذی جهت مقابله با بیماری و تامین نیازهای کل بدن فراهم نخواهد بود. سیستم ایمنی هومورال نسبت به هر آنتی ژن خاص عکس‌العمل خاص خود را نشان می‌دهد (کاراکا<sup>۱</sup> و همکاران ۱۹۹۹).

با تحریک سیستم ایمنی توسط پروتئین خارجی می‌توان عکس‌العمل آنتی بادی بر ضد این پروتئین را مشاهده نمود. قدرت این آنتی بادی به عنوان شاخصی از توانایی سیستم هومورال در تحقیقات ایمونولوژیک دامی واکولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد (چنگ<sup>۲</sup> و همکاران ۱۹۹۱). میزان پاسخ سیستم ایمنی بر اساس تنوع ژنتیکی و نیز تنوع محیطی، که عامل تغذیه را نیز در بردارد، متغیر خواهد بود، سونسون<sup>۳</sup> و سینرو<sup>۴</sup> (۲۰۰۲). پاسخ قوی‌تر نشان دهنده قدرت بیشتر فرد در مقابل عامل بیماری‌زا خارجی است و بنابراین پاسخ آنتی بادی بدست آمده دارای همبستگی مثبت با مقاومت عمومی فرد در مقابل بیماری‌ها می‌باشد، سونسون و همکاران (۲۰۰۱). بنابراین با استفاده از مواد مغذی به میزان کافی، می‌توان این پاسخ را به حد بهینه رساند.

یو<sup>۵</sup> (۱۹۹۴) اثر تنظیمی ویتامین E بر غلظت پروستاگلندین‌ها را بیان نمود. ویتامین E با جلوگیری از اکسیداسیون اسید آراشیدونیک و کاهش سنتز پروستاگلندین‌ها باعث بهبود عملکرد دستگاه ایمنی در طیور می‌گردد [لشچینسکی<sup>۶</sup> و کلاسینگ<sup>۷</sup> (۲۰۰۱)]. همچنین کرامر<sup>۸</sup> و همکاران (۱۹۹۱) افزایش سرعت تکثیر لمفوسیتها در حیوانات اهلی را در نتیجه افزایش غلظت ویتامین E خوراک گزارش کردند.

ویلاورده<sup>۹</sup> و همکاران (۲۰۰۴) اثر غیر مستقیم ویتامین E را برای سیستم ایمنی بررسی کردند. در این تحقیق اثر ویتامین E در حفظ ساختار اسیدهای چرب غیر اشباع جیره بررسی شد و با توجه به اینکه اسیدهای چرب غیر اشباع جیره (PUFA)<sup>۱۰</sup> موجب بهبود عملکرد سیستم ایمنی هستند، ویتامین E از این طریق باعث بهبود پاسخ سیستم ایمنی گردید. تحقیقاتی که توسط سل<sup>۱۱</sup> (۱۹۹۶) برای مقدار مصرف ویتامین E در جیره‌های تجارتي طیور گوشتی انجام شده، نشان می‌دهد که در صنعت به طور معمول مقادیری حدود ۲۰٪ بیش از مقدار ویتامین E توصیه شده NRC (۱۹۹۴)، مورد استفاده قرار می‌گیرد. اما با وجود تحقیقات انجام شده بر روی ویتامین E، هنوز از نظر مقدار استفاده از این ویتامین در جیره‌های غذایی طیور جهت رسیدن به بهترین وضعیت پاسخ سیستم ایمنی ابهام وجود دارد [سل و همکاران (۱۹۹۷)، فرایدمن<sup>۱۲</sup> و همکاران (۱۹۹۸)].

راس<sup>۱۳</sup> (۱۹۹۲) نشان داد که تولی آنتی‌بادی‌ها در جوجه‌هایی که ویتامین A کافی دریافت نکرده بودند کمتر از جوجه‌هایی است که با مقدار مناسب ویتامین A تغذیه شده بودند و افزودن ویتامین A در جیره جوجه‌های گوشتی بر روی سیستم ایمنی سلولی و هومورال تاثیر می‌گذارد. اسکلان<sup>۱۴</sup> و داناویو<sup>۱۵</sup> (۱۹۸۲) نشان دادند که افزودن ویتامین A خوراک باعث افزایش آنتی‌بادی در مقابل

1. Karaca
2. Cheng
3. Svensson
4. Sinervo
5. Yu
6. Leshchinsky
7. Klasing
8. Kramer
9. Villaverde
10. Poly unsaturated fatty acid
11. Sell
12. Friedman
13. Ross
14. Sklan
15. Donoghue

آبله و نیوکاسل می‌گردد. راس (۱۹۹۲) نشان داد که افزودن ویتامین A می‌تواند باعث افزایش تولید سیتوکین از نوع لمفوکین<sup>۱</sup>، تکثیر لمفوسیت‌ها، افزایش فعالیت سلول‌های NK و فاگوسیتوز گردد. سیتسما<sup>۲</sup> و همکاران (۱۹۸۹) نشان دادند که کمبود ویتامین A باعث افزایش تلفات بیماری نیوکاسل می‌گردد. دیویس<sup>۳</sup> و سل (۱۹۸۳)، رشد کمتر تیموس و غده بورس را در اثر کمبود ویتامین A در جوجه‌های گوشتی نشان دادند. تحقیقات متعددی نشان داده‌اند که مقادیر بالای ویتامین A در خوراک باعث کاهش غلظت آلفاتوکوفرول در پلاسما و بافت‌های ذخیره‌ای طیور می‌گردد [پودلکیویز<sup>۴</sup> و همکاران (۱۹۶۴)، کومبز<sup>۵</sup> و اسکات<sup>۶</sup> (۱۹۷۴)، ابوی<sup>۷</sup> و سولیوان<sup>۸</sup> (۱۹۸۹)]. بر خلاف این حالت، برخی محققین نشان داده‌اند که افزودن ویتامین E بیش از دو برابر نیاز جیره غذایی طیور، باعث کمبود ویتامین A در بدن می‌گردد [مک کویگ<sup>۹</sup> و موتزوک<sup>۱۰</sup> (۱۹۷۰) و اسکلان و دانهیو (۱۹۸۲)]. آبروتو<sup>۱۱</sup> و بریتون<sup>۱۲</sup> (۱۹۹۸) نشان دادند که با افزایش مقدار ویتامین E در جیره جوجه‌های گوشتی مقدار ویتامین A در مخزن ذخیره این ویتامین در بدن که کبد می‌باشد، کاهش می‌یابد، همچنین غلظت‌های بالای ویتامین A (۱۵۰۰۰ و ۴۵۰۰۰ واحد بین‌المللی در کیلوگرم خوراک) باعث کاهش غلظت ویتامین E در کبد و پلاسما گردید (b) (۱۹۹۸).

### مواد و روشها

تعداد ۳۲۰ قطعه جوجه تخمگذار تجارتي لگهورن سویه‌های لاین W36 و تعداد ۳۲۰ عدد جوجه‌های بومی منطقه خراسان از مرکز پرورش و اصلاح نژاد مرغ بومی شرق کشور در سن یک روزگی تعیین جنسیت و جدا سازی گردیدند. جوجه مرغ‌ها در محل کارخانه جوجه‌کشی واکسن مارک دریافت کردند. در سن ۱ روزگی در محل انجام آزمایش واکسن برونشیت سویه HI20 اسپری گردید. جوجه‌ها در ناحیه ساق شماره‌گذاری گردیدند و بصورت تصادفی در ۱۲۸ قفس پنج‌تایی تقسیم شدند و به این ترتیب هر جیره داری ۴ تکرار از هر نژاد و هر تکرار دارای ۵ جوجه گردید و جوجه‌ها بر روی بستر و با استفاده از جیره تامین کننده نیازهای رشد سنین صفر تا شش هفته با ترکیب جدول شماره ۱ تغذیه گردیدند. ترکیب مواد مغذی و انرژی جیره در جدول ۲ ارایه گردیده است.

با توجه به اینکه مواد خوراکی موجود در جیره به شکل طبیعی دارای مقادیری از ویتامین‌های A و E می‌باشند، مقدار این دو ویتامین با HPLC<sup>۱۳</sup> اندازه‌گیری شد و به منظور تامین ویتامین‌های هر جیره آزمایشی، تا رسیدن به میزان مورد نظر ویتامین‌های A, E افزوده گردید. جیره‌های مورد نظریه ترتیب جدول ۳ تهیه گردیدند.

سطوح ویتامین A در سطح ۶۰۰۰ (توصیه NRC<sup>۱۴</sup>)، سطح ۱۲۰۰۰ (سطح مصرف تجاری<sup>۱۵</sup>)، سطح ۱۸۰۰۰ (۳ برابر توصیه NRC (۱۹۹۴) و ۲۴۰۰۰ (۴ برابر توصیه NRC (۱۹۹۴) انتخاب گردیدند و نیز با توجه به منابع مورد بررسی سطوح ویتامین E بیش از توصیه NRC (۱۹۹۴) (۱۰ واحد بین‌المللی به ازای هر کیلوگرم) خوراک انتخاب شد و به منظور مشخص ساختن حد مطلوب

1. Lymphokine
2. Sijtsma
3. Davis
4. Pudelkiewicz
5. Combs
6. Scott
7. Abawi
8. Sullivan
9. McCuaig
10. Motzok
11. Aburto
12. Britton
13. Perkin Elmer silica column, 344nm
14. National Research Council (1994)
15. Hy-line W36 commercial management guide (2003)

استفاده از ویتامین E تا ۴ برابر افزایش داده شد. به این ترتیب هر کدام از فاکتورهای A و E دارای چهار سطح و تعداد جیره‌های غذایی ۱۶ جیره گردید.

### استفاده از آنتی ژن

آنتی ژنهای نیوکاسل (ND) و آنفلوانزا (AI) با استفاده از واکسن دوگانه نیوکاسل - آنفلوانزا روغنی<sup>۱</sup> در سن ۱۲ روزگی به جوجه‌ها تزریق گردید. در سن ۴۰ روزگی (چهار هفته پس از تزریق آنتی ژن) خونگیری از سیاهرگ بال جوجه‌ها به تعداد یک نمونه از هر تکرار، جمعاً بر روی ۱۲۸ نمونه انجام گردید و سرم هر نمونه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جداسازی گردید. با استفاده از کیت ممانعت از هم‌آگلوتیناسیون<sup>۲</sup> غلظت آنتی بادی‌های تولید شده بر ضد آنتی ژنهای نیوکاسل و آنفلوانزا اندازه‌گیری گردید و بر اساس  $\log_2$  (لگاریتم نسبت رقیق کردن سرم در مینای ۲) محاسبه گردید. محاسبات برای هر کدام از آنتی‌ژنهای ND و AI و برای هر کدام از جوجه‌های بومی و تجارتي بصورت جداگانه انجام گردید. در این روش نمونه‌های سرم خون در میکروپلیت‌های ۹۶ تایی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر ریخته شد و به صورت پلکانی تا ۱۰ مرتبه با محلول سالین رقیق گردید و با آنتی ژن مربوط به هر ویروس مخلوط گردید و بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس گلبول قرمز طیور که قبلاً از همین گله‌ها تهیه و شستشو داده شده بود، به آن اضافه گردید و بمدت ۳۰ دقیقه دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید و سپس شماره حفره‌هایی از میکروپلیت که در آنها آگلوتیناسیون قابل مشاهده بود به نسبت  $\log_2$  گزارش گردید [آنون<sup>۳</sup> (۱۹۷۱)].

### آنتی ژن SRBC<sup>۴</sup>

در این آزمایش از آرایتروسیت‌های گوسفند به عنوان آنتی ژن تحریک کننده سلول‌های T استفاده گردید. جهت استخراج گلبول‌های قرمز گوسفند، خونگیری از گوسفند در محلول سیترات سدیم ۳/۸٪ (برای جلوگیری از انعقاد) انجام گردید. سپس گلبول‌های قرمز گوسفند سه بار توسط بافر سالین فسفات (PBS)<sup>۵</sup> شستشو داده شد. سپس سوسپانسیون ۷٪ گلبول‌های قرمز گوسفند در PBS به میزان یک میلی لیتر به سیاهرگ بال تزریق گردید. ۱۴ روز پس از تزریق SRBC خونگیری از سیاهرگ بال انجام شد و سرم نمونه‌های خون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جداسازی گردید. با استفاده از روش هم‌آگلوتیناسیون غلظت آنتی بادی‌های تولید شده بر ضد SRBC اندازه‌گیری گردید. در این روش نیز از نمونه‌های سرم خون در میکروپلیت‌های ۹۶ تایی به میزان ۷۵ میکرولیتر ریخته شد و به صورت پلکانی تا ۱۰ مرتبه رقیق گردید و با گلبول قرمز جمع‌آوری شده از همان گوسفند که گلبول‌های قرمز تزریق شده به جوجه‌ها از آن تهیه شده بود، مخلوط گردید و بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس شماره حفره‌هایی از میکروپلیت که در آنها آگلوتیناسیون قابل مشاهده نبود به نسبت  $\log_2$  گزارش گردید. این آزمایش نیز به صورت جداگانه بر روی جوجه‌های بومی و جوجه‌های تخمگذار انجام گرفت [کورش<sup>۶</sup> و همکاران (۲۰۰۴)].

### تجزیه آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل ۴<sup>۲</sup> در قالب طرح کاملاً تصادفی<sup>۷</sup> انجام گردید. دو فاکتور عبارتند از ویتامین A و ویتامین E و هر کدام از فاکتورها دارای ۴ سطح می باشند.

1. Newpasol 102 from Pasouk Biological Research & Manufacturing company
2. Hemagglutination Inhibition
3. Anon
4. Sheep Red Blood Cells
5. Phosphate Buffered Salin
6. Qureshi
7. complete random design

تجزیه آماری توسط نرم افزار آماری JMP<sup>۱</sup> و مقایسات میانگینها با روش توکی انجام پذیرفت. به منظور ارزیابی اختلاف بین جوجه های بومی و لگهورن نسبت به عکس العمل سیستم ایمنی هومورال به غلظتهای مختلف ویتامین‌های A و E، نتایج بدست آمده به صورت نستد<sup>۲</sup> با اثرات ویتامین A (گله)، ویتامین E (گله)، ویتامین A × ویتامین E (گله) و اثر گله مورد تجزیه قرار گرفت.

## نتایج و بحث

همانگونه که جداول ۴ و ۵ ملاحظه می‌گردد اثر مدل به دست آمده از تاثیر ویتامین‌های A و E بر روی عکس‌العمل جوجه‌های بومی و لگهورن در مقابل تزریق گلبولهای قرمز گوسفند، معنی‌دار است. مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت ویتامین A از ۶۰۰۰ به ۱۲۰۰۰ واحد بین‌المللی در کیلوگرم خوراک افزایش معنی‌داری در عکس‌العمل سیستم ایمنی هومورال وجود ندارد اما با افزایش به سطح سوم این فاکتور (۱۸۰۰۰ واحد بین‌المللی در کیلوگرم خوراک) بیشترین تولید آنتی بادی بر ضد SRBC مشاهده گردید که نشان از غلظت مناسب ویتامین A بر روی این پاسخ سیستم ایمنی می‌باشد. مشابه همین نتایج در آزمایش‌های انجام شده با آنتی ژنهای AI و ND مشاهده می‌گردد. تاثیر ویتامین A بر روی سیستم ایمنی هومورال در موش توسط فریدمن<sup>۳</sup> و اسکلان (۱۹۸۹) بررسی گردید و موثر بودن تاثیر آن ثابت شد.

مکانیسم عمل ویتامین A از طریق تاثیر بر تمایز لمفوسیت‌های B و تولید آنتی بادی از این گروه از گلبولهای سفید می‌باشد. مکانیسم دیگر (تاثیر مثبت) ویتامین A بر روی سیستم ایمنی هومورال توسط لزارد<sup>۴</sup> و همکاران (۱۹۹۷) در آزمایش بر روی موش‌ها اینگونه بیان شده است که افزایش غلظت ویتامین A در خوراک می‌تواند باعث افزایش نسبت سلولهای T دارای گیرنده‌های CD4 نسبت به سلولهای T دارای گیرنده‌های CD8 گردد و این امر موجب ترشح بیشتر سیتوکینها در سیستم ایمنی و فعالیت بیشتر لمفوسیت‌های B در پی ترشح سیتوکینها گردد. فریدمن و همکاران (۱۹۹۱) نشان دادند که افزودن ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین A باعث کاهش توان ایمنی در مقابله با اشرشیا کلای<sup>۵</sup> می‌گردد. همچنین فریدمن و اسکلان (۱۹۸۹) بیان نمودند، که مصرف ویتامین A در غلظت‌های زیاد باعث کاهش تکثیر *invitro* لمفوسیت‌های T و کاهش تیتراژ آنتی بادی نسبت به سرم گاو می‌گردد.

ویتامین E نیز دارای تاثیر معنی‌دار بر روی آنتی بادی تولید شده بر ضد SRBC، AI و ND بود که نتایج بدست آمده در تحقیقات پیشین را تایید می‌کند [لشچینسکی و کلاسینگ (۲۰۰۱)]. همانگونه که در جداول ۴ و ۵ ملاحظه می‌شود، با افزایش غلظت ویتامین E از ۲۰ به ۵۰ واحد بین‌المللی در کیلوگرم خوراک تغییر در غلظت آنتی بادی معنی‌دار نیست اما با رسیدن به غلظت ۸۰ واحد بین‌المللی در کیلوگرم خوراک افزایش معنی‌دار در غلظت آنتی بادی مشاهده می‌شود و این اختلاف در غلظت ۱۱۰ واحد بین‌المللی در کیلوگرم خوراک نیز حفظ شده است که به این ترتیب می‌توان سطح سوم فاکتور ویتامین E (۸۰ واحد بین‌المللی در کیلوگرم خوراک) را به عنوان سطح مناسب در تغذیه طیور بومی و لگهورن جهت رسیدن به بهترین میزان پاسخ سیستم ایمنی هومورال توصیه نمود. سطح چهارم ویتامین E پاسخ کمتری نسبت به سطح سوم (۸ واحد بین‌المللی ویتامین E در کیلوگرم خوراک) نشان می‌دهد که می‌توان آن را به دلیل اثر معکوس غلظت بیش از حد ویتامین E بر روی سیستم ایمنی بیان نمود. تورنتون<sup>۶</sup> و همکاران (۱۹۹۵) نشان دادند که چگونه آلفا توکوفرول با افزایش غلظت در سلول‌های صاف عضلانی در مجاورت

1. JMP Copyright © 1989 - 2001 SAS Institute Inc.

2. nested

3. Friedman

4. Lessard

5. *Escherichia coli*

6. Thoronton

اسید آراشیدونیک به یک عامل اکسید کننده تبدیل می‌شود. این مکانیسم در متابولیسم LDL در انسان و نیز در ماهیها مشاهده شده است و در غلظتهای بالا آنتی اکسیدانها به موادی اکسید کننده بدل می‌شوند و در سیستم ایمنی طیور، این ویژگی باعث کاهش میزان تولید آنتی بادی خواهد گردید [اسکلان و همکاران (۱۹۸۳)]. ملاحظه می‌شود که سطوح دوم و سوم و چهارم از ویتامین E (۵۰ و ۸۰ و ۱۱۰ واحد بین المللی در کیلوگرم خوراک) نسبت به غلظت ۲۰ واحد بین المللی در کیلوگرم خوراک ویتامین E به میزان معنی داری اثر بهتری بر روی پاسخ سیستم ایمنی هومورال در مقابل این آنتی ژن خاص نشان داده اند. هرچند که سطح چهارم از نظر عددی کاهش نشان میدهد اما اختلاف آن با توصیه NRC (۱۰ واحد بین المللی در کیلوگرم خوراک) و کاربرد تجاری این ویتامین در صنعت پرورش طیور (۲۰ واحد بین المللی در کیلوگرم خوراک) معنی دار است. مکانیسم دیگر تاثیر ویتامین E بر سیستم ایمنی هومورال توسط ارف<sup>۱</sup> و همکاران (۱۹۹۸) در جوجه های گوشتی بررسی شد و بیان کردند که افزودن ویتامین E به خوراک باعث افزایش تولید سلولهای TCR2+ که مولد لمفوسیت های CD4 T هستند، می‌گردد و از این طریق باعث فعالیت بیشتر لمفوسیت های B و بهبود پاسخ سیستم ایمنی هومورال می‌گردد.

همانگونه که در جدول های ۴ و ۵ (آزمون اثرات) ملاحظه می‌شود، ویتامین های A و E در این پاسخ نیز بر روی یکدیگر اثر متقابل و کاهش داری دارند. با توجه به اینکه هر دو ویتامین از ویتامین های محلول در چربی هستند و در مراحل جذب و انتقال و ذخیره سازی با یکدیگر رقابت دارند، میتوان انتظار داشت که تیمارهای دارای سطوح بالای هر دو فاکتور نمی‌توانند اثر قابل انتظار را نشان دهند. به این ترتیب تاثیر منفی ویتامین های A و E با یکدیگر بر روی سیستم ایمنی طیور قابل ذکر است. در جدول های ۴ و ۵ ملاحظه می‌گردد که تیمارهای سطوح دوم، سوم و چهارم هر دو فاکتور اثرات بهتری را نمایش می‌دهند اما تیمار تشکیل شده از سطوح چهارم هر دو فاکتور احتمالاً به دلیل سمیت این غلظت از ویتامین A بر روی سیستم ایمنی و نیز اثر آنتاگونیستی ویتامین های A و E، به شکل معنی داری پاسخ کمتری رانست به سطوح سوم و حتی دوم نشان می‌دهد که این اثر سمیت را لزارد و همکاران نیز (۱۹۹۷) گزارش کرده‌اند.

اطلاعات بدست آمده از دو آزمایش اندازه گیری تیترا HA نسبت به آنتی ژن SRBC از نظر آماری یکسان گردید و به منظور ارزیابی اختلاف بین جوجه های بومی و لگهورن به صورت nested مورد تجزیه آماری قرار گرفت. همانگونه که در جدول شماره ۶ مشاهده می‌شود اثر گله در این آزمایش معنی دار نیست و از نظر آماری اختلافی بین دو گله از نظر تاثیر پذیری سیستم ایمنی هومورال از ویتامین های A و E وجود ندارد.

بهترین غلظت های بدست آمده ویتامین های A و E جهت توصیه استفاده در پرورش نیمچه های تخم گذار تجارتي سوبه های لاین و نیز مرغ های بومی منطقه خراسان مقدار ۱۸۰۰۰ واحد بین المللی در کیلوگرم خوراک ویتامین A و ۸۰ واحد بین المللی در کیلوگرم خوراک ویتامین E می‌باشد که این مقادیر برای رسیدن به سطح بهینه توان سیستم ایمنی هومورال کافی خواهد بود و توصیه می‌شود حداقل در زمان انجام واکسیناسیون و موارد بروز همه گیری بیماریهای طیور این مقادیر از ویتامین های A و E در خوراک تامین گردند و با توجه به هزینه اندک استفاده از افزودنیهای ویتامینی در خوراک، از بروز و انتشار بیماریها جلوگیری به عمل آید. حقیقت جالب توجه دیگر بدست آمده در این تحقیق، عدم مشاهده اختلاف بین جوجه های تخمگذار اصلاح شده لگهورن و جوجه های بومی منطقه خراسان بود که ما را قادر می‌سازد، یافته های علمی در زمینه تغذیه و سیستم ایمنی طیور در سطح بین المللی را نسبت به جوجه های بومی منطقه تعمیم دهیم و از دستاوردهای جدید در جهت بهبود سیستم های پرورش جوجه های بومی استفاده نماییم.

جدول شماره ۱- ترکیب جیره غذایی مورد استفاده

ماده غذایی	%
ذرت	۶۵/۶۹
سویا	۲۸/۴۲
پودر ماهی (۶۱/۳ CP)	۲/۲۲
دی کلسیم فسفات	۱/۷۲
کربنات کلسیم	۱/۲۳
نمک	۰/۳۸
DL-متیونین	۰/۱۴
مکمل ویتامینی*	۰/۱
مکمل معدنی**	۰/۱

\* مکمل ویتامینی بکار برده شده به صورت اختصاصی فاقد ویتامین‌های A و E و به صورت پرمیکس ۱ کیلوگرم در تن تهیه گردید و دارای مقادیر زیر به ازای میلی گرم در کیلوگرم می‌باشد: تیامین ۱/۵، ریبوفلاوین ۵، پنتوتنیک اسید ۱۰، نیکوتینیک اسید ۳۰، پیریدوکسین هیدروکلراید ۳، اسید فولیک ۵۵/۰، سیانوکوبال آمین ۴۵/۰، بیوتین ۷/۵، کولین کلراید ۲۵۰، کوله کلسیفرول ۲، منادیون سدیم دی سولفات ۱/۶، BHT ۰/۴

\*\* مکمل معدنی به کار برده شده دارای این مقادیر (میلی گرم در کیلوگرم) می‌باشد: منگنز ۸۰، روی ۵۰، آهن ۱۰۰، مس ۱۰، سلنیوم ۰/۲، ید ۰/۴ به شکل اختصاصی تهیه گردید.

جدول شماره ۲: مواد مغذی موجود در جیره غذایی مورد استفاده

ماده مغذی	ترکیبات اندازه گیری شده:
پروتئین %	۱۹/۲
فیبر خام %	۳/۴
کلسیم	۱/۱
فسفر کل %	۰/۷۵
ترکیبات محاسبه شده:***	
انرژی متابولیسمی (kcal/kg)	۲۹۰۰
سدیم %	۰/۱۸
پتاسیم %	۰/۷۷
لینولئیک اسید %	۱/۵۷
لیزین %	۰/۹۸
متیونین %	۰/۴۲

\*\*\* NRC ۱۹۸۴

جدول شماره ۳: سطوح مورد استفاده ویتامین A و ویتامین E

سطح اول	سطح دوم	سطح سوم	سطح چهارم
۶۰۰۰	۱۲۰۰۰	۱۸۰۰۰	۲۴۰۰۰
۲۰	۵۰	۸۰	۱۱۰

سطوح ویتامین A (واحد بین‌المللی در کیلوگرم خوراک)

سطوح ویتامین E (واحد بین‌المللی در کیلوگرم خوراک)

جدول شماره ۴: اثرات مقادیر مختلف ویتامین‌های A و E بر روی پاسخ ایمنی هومورال در جوجه های بومی

ND	AI	HA(SRBC)	ویتامین E (IU/kg)	ویتامین A (IU/kg)
۳/۷۵۰ d	۳/۵۰۰ e	۳/۵۰۰ d	۲۰	۶۰۰۰
۴/۵۰۰ bcd	۵/۲۵۰ cd	۵/۱۰۰ bcd	۵۰	۶۰۰۰
۶/۱۰۰ abc	۵/۷۵۰ abc	۵/۲۵۰ abc	۸۰	۶۰۰۰
۵/۶۶۶ abcd	۷/۱۰۰ ab	۶/۱۰۰ abc	۱۱۰	۶۰۰۰
۴/۲۵۰ cd	۳/۵۰۰ e	۴/۷۵۰ bcd	۲۰	۱۲۰۰۰
۵/۲۵۰ ab	۴/۶۶۶ cde	۵/۲۵۰ abc	۵۰	۱۲۰۰۰
۶/۳۳۳ ab	۷/۱۰۰ ab	۷/۱۰۰ a	۸۰	۱۲۰۰۰
۶/۲۵۰ ab	۷/۳۳۳ a	۵/۲۵۰ abc	۱۱۰	۱۲۰۰۰
۵/۳۳۳ abcd	۵/۱۰۰ cde	۶/۱۰۰ abc	۲۰	۱۸۰۰۰
۶/۱۰۰ abc	۶/۶۶۶ ab	۶/۱۰۰ abc	۵۰	۱۸۰۰۰
۷/۱۰۰ a	۶/۳۳۳ abc	۶/۲۵۰ ab	۸۰	۱۸۰۰۰
۶/۲۵۰ ab	۶/۶۶۶ ab	۶/۷۵۰ a	۱۱۰	۱۸۰۰۰
۶/۱۰۰ abc	۵/۳۳۳ bcd	۵/۱۰۰ bcd	۲۰	۲۴۰۰۰
۵/۷۵۰ abc	۵/۶۶۶ abcd	۴/۵۰۰ bc	۵۰	۲۴۰۰۰
۶/۳۳۳ ab	۵/۲۵۰ bcd	۴/۳۳۳ bc	۸۰	۲۴۰۰۰
۴/۵۰۰ bcd	۴/۱۰۰ de	۴/۵۰۰ bcd	۱۱۰	۲۴۰۰۰
اثرات اصلی				
ویتامین A				
۴/۹۳۳ b	۵/۱۲۵ b	۴/۶۹۳ b	(IU/kg)	۶۰۰۰
۵/۴۶۶ ab	۵/۵۶۲ ab	۵/۴۶۶ b	(IU/kg)	۱۲۰۰۰
۶/۱۵۳ a	۵/۹۷۹ a	۶/۴۰۰ a	(IU/kg)	۱۸۰۰۰
۵/۶۰۰ ab	۵/۱۲۵ b	۴/۷۳۳ b	(IU/kg)	۲۴۰۰۰
ویتامین E				
۴/۸۰۰ c	۴/۴۰۰ b	۴/۵۸۳ b	(IU/kg)	۲۰
۵/۳۳۳ bc	۵/۴۰۰ a	۵/۱۰۰ ab	(IU/kg)	۵۰
۶/۳۸۴ a	۶/۱۰۰ a	۵/۷۱۴ a	(IU/kg)	۸۰
۵/۶۶۶ ab	۵/۸۶۶ a	۵/۶۹۳ a	(IU/kg)	۱۱۰
تجزیه واریانس				
۰/۰۰۳۵	۰/۰۵۳۹	۰/۰۰۰۱	d.f.	ویتامین A
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۳	ویتامین E
۰/۰۰۶۴	۰/۰۰۱۰	۰/۰۰۱۰	۹	ویتامین A × ویتامین E



جدول شماره ۵: اثرات مقادیر مختلف ویتامین‌های A و E بر روی پاسخ ایمنی هومورال در جوجه‌های لگهورن

ND	AI	HA(SRBC)	ویتامین E (IU/kg)	ویتامین A (IU/kg)
۴/۰۰۰ d	۳/۷۵۰ c	۳/۷۵۰ d	۲۰	۶۰۰۰
۴/۷۵۰ bcd	۴/۲۵۰ bc	۴/۷۵۰ bcd	۵۰	۶۰۰۰
۶/۶۶۶ ab	۶/۰۰۰ abc	۶/۵۰۰ a	۸۰	۶۰۰۰
۵/۵۰۰ abcd	۶/۵۰۰ a	۵/۳۳۳ abcd	۱۱۰	۶۰۰۰
۴/۰۰۰ cd	۳/۵۰۰ c	۴/۲۵۰ cd	۲۰	۱۲۰۰۰
۶/۳۳۳ abcd	۵/۶۶۶ abc	۵/۵۰۰ abc	۵۰	۱۲۰۰۰
۶/۳۳۳ abcd	۶/۰۰۰ abc	۵/۰۰۰ abcd	۸۰	۱۲۰۰۰
۶/۰۰۰ abcd	۶/۰۰۰ abc	۵/۶۶۶ abc	۱۱۰	۱۲۰۰۰
۵/۲۵۰ abcd	۶/۰۰۰ abc	۵/۷۵۰ abc	۲۰	۱۸۰۰۰
۶/۰۰۰ abcd	۷/۰۰۰ a	۶/۰۰۰ ab	۵۰	۱۸۰۰۰
۷/۲۵۰ a	۶/۰۰۰ abc	۶/۵۰۰ a	۸۰	۱۸۰۰۰
۶/۵۰۰ abc	۶/۰۰۰ abc	۶/۰۰۰ ab	۱۱۰	۱۸۰۰۰
۵/۳۳۳ abcd	۵/۶۶۶ abc	۶/۰۰۰ ab	۲۰	۲۴۰۰۰
۴/۶۶۶ bcd	۳/۶۶۶ c	۶/۵۰۰ a	۵۰	۲۴۰۰۰
۵/۰۰۰ bcd	۶/۵۰۰ a	۵/۰۰۰ abcd	۸۰	۲۴۰۰۰
۵/۵۰۰ abcd	۵/۵۰۰ abc	۴/۷۵۰ bcd	۱۱۰	۲۴۰۰۰
اثرات اصلی				
ویتامین A				
۵/۰۷۶ b	۴/۸۴۶ b	۵/۰۸۳ b	(IU/kg)	۶۰۰۰
۵/۸۱۸ ab	۵/۴۵۴ b	۵/۱۰۴ b	(IU/kg)	۱۲۰۰۰
۶/۲۵۰ a	۶/۲۵۰ a	۶/۰۶۲ a	(IU/kg)	۱۸۰۰۰
۵/۱۴۲ b	۵/۴۲۸ b	۵/۵۶۲ ab	(IU/kg)	۲۴۰۰۰
ویتامین E				
۴/۶۹۲ c	۴/۸۴۶ b	۴/۹۳۷ b	(IU/kg)	۲۰
۵/۴۲۸ bc	۵/۲۱۴ b	۵/۶۶۶ a	(IU/kg)	۵۰
۶/۲۸۵ a	۶/۱۴۲ a	۵/۸۰۰ a	(IU/kg)	۸۰
۵/۹۲۳ ab	۵/۹۲۳ a	ab ۵/۳۸۴	(IU/kg)	۱۱۰
تجزیه واریانس				
۰/۰۰۱۸	۰/۰۰۲۱	۰/۰۰۰۱	d.f.	ویتامین A
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱۶	۳	ویتامین E
۰/۰۴۱۲	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۱	۳	ویتامین A × ویتامین E
		(P)	۹	

جدول شماره ۶: تجزیه واریانس اثر گله بر پاسخ سیستم ایمنی هومورال

ND Titers	AI Titers (P)	HA Titers (SRBC) (P)	d.f.	تجزیه واریانس
<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۶	ویتامین A (گله)
<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۶	ویتامین E (گله)
۰/۰۰۱۶	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۱۸	ویتامین A × ویتامین E (گله)
۰/۹۷۲۶ NS	۰/۶۸۸۷ NS	۰/۴۸۶۰ NS	۱	گله

## منابع و مأخذ

- 1- Abawi, F. G., and T. W. Sullivan, 1989. Interactions of vitamins A, D<sub>3</sub>, E, and K in the diet of broiler chicks. *Poultry Science* 68: 1490–1498.
- 2- Aburto, A., and M. Britton, 1998a. Effects and interactions of dietary levels of vitamins A and E and cholecalciferol in broiler chickens. *Poultry Science* 77:666–673.
- 3- Aburto, A., and M. Britton, 1998b. Effects of different levels of vitamins A and E on the utilization of cholecalciferol by broiler chickens. *Poultry Science* 77:570–577.
- 4- Anon, 1971. Methods for examining poultry biologic and for identification and quantifying avian pathogens. Newcastle disease, p: 66. National Academy of science, Washington, D.C.
- 5- Cheng, S., Rotschild, M.F. and Lamont, S.J., 1991. Estimates of quantitative genetic parameters of immunological traits in the chicken. *Poultry Science* 70: 2023-2027.
- 6- Combs, G. F., Jr., and M. L. Scott, 1974. Dietary requirements for vitamin E and selenium measured at the cellular level in the chick. *Journal of Nutrition* 104:1292–1296.
- 7- Davis, C. Y., and J. L. Sell, 1983. Effects of all-trans retinol and retinoic acid nutrition on the immune system of chicks *Journal of Nutrition* 113:1914–1919.
- 8- Erf, G. F., W. G. Bottje, T. K. Bersi, M. D. Headrick, and C. A. Fritts, 1998. Effects of dietary vitamin E on the immune system in broilers: Altered proportions of CD4 T cells in the thymus and spleen. *Poultry Sci.* 77:529–537.
- 9- Friedman, A., and D. Sklan, 1989. Antigen-specific immune response impairment in the chick as influenced by dietary vitamin A. *Journal of Nutrition* 119:790–795.
- 10- Friedman, A., and D. Sklan, 1991. Impaired T-lymphocyte immune response in vitamin A depleted rats and chicks. *British Journal of Nutrition.* 62:439–449.
- 11- Friedman, A., I. Bartov, and D. Sklan, 1998. Humoral immune response impairment following excess vitamin E nutrition in the chick and turkey. *Poultry Science* 77:842–849.
- 12- Karaca, M., E. Johnson, and S. J. Lamont, 1999. genetic line and major histocompatibility complex effects on primary and secondary antibody responses to T-dependent and T-independent antigens. *Poultry Science* 78:1518-1525.
- 13- Kramer, T. R., N. Schoene, L. W. Douglass, J. T. Judd, R. Ballard-Barbash, P. R. Taylor, H. N. Bhagavan, and P. P. Nair, 1991. Increased vitamin E intake restores fish-oil induced suppressed blastogenesis of mitogen-stimulated T-lymphocytes. *American Journal of Clinical Nutrition* 54: 896–902.
- 14- Leshchinsky, T.V. and K.C. Klasing, 2001. Relationship between the level of dietary vitamin E and the immune response of broiler chickens. *Poultry Science* 80:1590-1599.

- 15- Lessard, M., Hutchings, D., and Cave, A.N. 1997. Cell-mediated and humoral immune response in broiler chickens maintained on diets containing different levels of vitamin A. *Poultry Science* 76: 1368-1378.
- 16- McCuaig, L. W., and I. Motzok, 1970. Excessive dietary vitamin E: Its alleviation of hypervitaminosis A and lack of toxicity. *Poultry Science* 49:1050-1052.
- 17- McGraw, K.J., and D. R. Ardia, 2003. Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors: an experimental test. *the American Naturalist* 162: 74-712.
- 18- National Research Council, 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.
- 19- Pudlakiewicz, W. J., L. Webster, and L. D. Matterson, 1964. Effects of high levels of dietary vitamin A acetate on tissue tocopherol and some related analytical observations. *Journal of Nutrition* 84:113-117.
- 20- Qureshi, M.A., R. Ali, M.A. Cheema, Z. Ahmed and H. Roth, 2004. Immunmilk® feeding increases growth and immune responses in broiler chicks. *International Journal of Poultry Science* 3 (5): 305-312.
- 21- Ross, A. C., 1992. Vitamin A status: relationship to immunity and the antibody response. *Proceeding of Social Medicien* 200: 303-320.
- 22- Sell, J. L., 1996. Vitamin E nutriture of growing turkeys: criteria of adequacy? Pages 1-11 in: *Proceedings Roche Turkey Health Seminar*, Raleigh, NC.
- 23- Sell, J. L., M. F. Soto-Salanova, P. Palo, and M. Jeffrey, 1997. Influence of supplementing corn-soybean meal diets with vitamin E on performance and selected physiological traits of male turkeys. *Poultry Science* 76:1405-1417.
- 24- Sijtsma, S. R., C. E. West, J.H.W.M. Rombout, and A. J. Zijpp, 1989. Effect of Newcastle disease virus infection on vitamin A metabolism in chickens. *Journal of Nutrition* 119:940-947.
- 25- Sklan, D., and S. Donoghue, 1982. Vitamin E response to high dietary vitamin A in the chick. *Journal of Nutrition* 112:759-765.
- 26- Sklan, D., Z. Tenne, and P. Budowski, 1983. The effect of dietary fat and tocopherol on lipolysis and oxidation in turkey meat stored at different temperatures. *Poultry Science* 62:2017-2021.
- 27- Svensson, E., Sinervo, B. and Comendant, T., 2001. Density-dependent competition and selection on immune function in genetic lizard morphs. *Proceeding National Academy Science, USA* 55: 2053-2069.
- 28- Svensson, E.I., and B. Sinervo, 2002. Mechanistic and experimental analysis of condition and reproduction in a polymorphic lizard. *Journal of Evolution* 15: 1034-1047.
- 29- Thornton, D. E., K. H. Jones, Z. Jiang, H. Zhang, G. Liu, and D. G. Cornwell, 1995. Antioxidant and cytotoxic tocopheryl quinones in normal and cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* 18:963-976.
- 30- Villaverde, C., L. Cortinas, A. C. Barroeta, S. M. Martín-Orúe and M. D. Baucells, 2004. Relationship between dietary unsaturation and vitamin E in poultry. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 88 (3-4): 143-149.
- 31- Yu, B. P., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physioly Review* 74:139-162.

# Effect of Vitamin A and Vitamin E on Humoral Immune Response of Commercial Layer Chicks and Khorasan Region Native Chicks

**R. Bahari**

*Ph.D. student in animal nutrition, Science & Research Branch, Islamic Azad University*

**M. Shivazad**

*Professor of poultry nutrition, Science & Research Branch, Islamic Azad University*

**F. Eftekhari**

*Professor of animal science, College of agriculture, Ferdowsi University, Mashhad*

**Keywords:** Vitamin A, Vitamin E, Humoral immunity, Antibody, Antigen, Leghorn, Khorasan native chicks

## Abstract

The effect of different concentration of vitamin A and vitamin E on humoral immunoresponse of layer and Khorasan native chicks for optimal immunity was evaluated. Experimental design was full factorial with vitamin A in 4 levels 6000, 12000, 18000 and 24000 IU per kilogram of feed and vitamin E in 4 levels 20, 50, 80 and 110 IU per kilogram of feed with 4 replicates each with 5 day old commercial and native layer chicks for 8 weeks. Antibody titers against Sheep Red Blood Cells, Avian Influenza virus and Newcastle Disease virus, evaluated. SRBC, AI and ND titers, were significantly affected by different levels of vitamin A and vitamin E and their interaction. Increasing vitamins A and E levels in diet, causes better responses from humoral immune system of chicks. With 18000 IU per kilogram feed level of vitamin A the best responses was observed but increasing this vitamin to 24000 IU per kilogram of feed lead to lower responses. The best level of vitamin E was 80 IU per kilogram of feed. The results of this experiment show that humoral immunity response is directly affected by vitamin A and vitamin E in diet. Vitamin A and vitamin E have antagonistic interaction over immunity response. NRC recommended doses of vitamin A and vitamin E is not suitable for humoral immune system needs. No differences observed between native and commercial chicks in response to different doses of vitamin A or Vitamin E.