

اثرات ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی کوله کلسیفرول (کلسیتریول) و عصاره‌ی هیدروالکی ریشه‌ی گیاه دارویی پنیر باد (*Withania coagulans*) بر پاسخ ایمنی و ریخت‌شناسی روده‌ی جوجه‌های گوشتی

سیدجواد حسینی^۱، محمدطاهر میرکزهی^{۲*} و حسن صالح^۳

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۹

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی اثرات ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی کوله کلسیفرول [$1, 25 (OH)_2 D_3$] (کلسیتریول) و عصاره‌ی هیدروالکی میوه گیاه دارویی پنیر باد (*Withania coagulans*) بر پاسخ ایمنی و ریخت‌شناسی روده‌ی کوچک جوجه‌های گوشتی طراحی گردید. تیمارها در قالب فاکتوریل ($2 \times 3 \times 2$) شامل جیره‌ی کنترل مثبت با سطح کافی کلسیم و کنترل منفی (کاهش ۳۰ درصدی سطح کلسیم)، ۳ سطح عصاره‌ی پنیرباد (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و ۲ سطح ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی کوله کلسیفرول (صفر و ۰/۵ میکروگرم در کیلوگرم جیره) بود. تعداد ۶۰۰ قطعه جوجه‌ی گوشتی یک روزه راس ۳۰۸ به صورت تصادفی در ۶۰ تکرار و ۱۰ پرندۀ در هر کدام توزیع گردید. هر تیمار دارای ۵ تکرار (۵۰ پرندۀ در هر تیمار) بود. جیره‌های آزمایشی به طور نامحدود در اختیار جوجه‌ها از ۱ تا ۴۲ روزگی قرار گرفت. برای بررسی ایمنی هومورال، از ارزیابی پاسخ نسبت به SRBC استفاده گردید. برای این منظور دو تزریق در روزهای ۲۵ و ۳۲ دوره‌ی آزمایش برای تعیین پاسخ آنتی‌بادی اولیه و ثانویه انجام شد. برای بررسی ایمنی سلولی ازدیاد حساسیت تأخیری نسبت به فیتوهماگلوآنتینین در سن ۳۷ روزگی ارزیابی گردید. در سنین ۲۱ و ۴۲ روزگی یک پرندۀ از هر تکرار کشتار و وزن اندام‌های لنفاوی اندازه‌گیری و ۱/۵ سانتی‌متر از بافت ژژونوم به منظور تعیین خصوصیات ریخت‌شناسی جدا گردید. نتایج آزمایش پاسخ ایمنی هومورال نشان داد کاهش سطح کلسیم جیره و مکمل سازی پنیرباد و کلسیتریول اثر قابل ملاحظه‌ای بر عیار آنتی-بادی ضد SRBC ندارد. ارزیابی ایمنی سلولی نشان داد که مکمل سازی پنیر باد و کلسیتریول تأثیری بر ضخامت پوست محل تزریق (پرده‌ی بین انگشتان) ندارد. در ۴۲ روزگی تغذیه‌ی جیره‌ی کنترل منفی منجر به کاهش معنی‌دار وزن طحال و مکمل سازی پنیرباد در سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم منجر به افزایش معنی‌دار وزن تیموس گردید. نتایج ریخت‌شناسی روده نشان داد که مکمل‌سازی پنیرباد در سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم منجر به کاهش طول پرز در سن ۴۲ روزگی می‌گردد. به نظر می‌رسد سطح کلسیتریول مورد استفاده در این آزمایش کم‌تر از سطوح مورد نیاز آن برای تغییر پارامترهای ریخت‌شناسی روده و پاسخ ایمنی باشد.

کلمات کلیدی: کلسیتریول، پنیر باد، پاسخ ایمنی، ریخت‌شناسی روده، جوجه‌ی گوشتی

مقدمه

هیدروکسیلاسیون زمانی رخ می‌دهد که ویتامین D_3 به کبد منتقل شده تشکیل ۲۵ هیدروکسی کوله‌ی کلسیفرول [$25-(OH) D_3$] می‌دهد و دومین هیدروکسیلاسیون در کلیه به وسیله‌ی آنزیم ۱-آلفا-هیدروکسیلاز (E.C.1.14.13.13) رخ داده که $1, 25 (OH)_2 D_3$ تشکیل می‌شود (Kenney

و ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی کوله کلسیفرول [$1, 25 (OH)_2 D_3$] (کلسیتریول) از لحاظ زیست‌شناسی فعال‌ترین شکل متابولیکی ویتامین D_3 است که ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر فعالیت بیش‌تری نسبت به دیگر متابولیت‌های آن دارد و به وسیله‌ی دو واکنش هیدروکسیلاسیون متوالی تولید می‌گردد. اولین

^۱ دانش‌آموخته‌ی دکترای تغذیه طیور، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

^{۲*} استادیار گروه علوم دامی، مجتمع آموزش عالی سراوان

^۳ استادیار گروه علوم دامی، مجتمع آموزش عالی سراوان

(نویسنده‌ی مسئول)

E-mail: mt_mirakzehi@yahoo.com

کامل، برگ‌ها، ساقه، سته‌های سبز، میوه‌ها، دانه‌ها و پوست است. بررسی‌ها نشان داده است که این گیاه دارای اثرات ضد التهاب، ضد سرطان، درمان آلزایمر، کاهش دهنده‌ی قند و کلسترول خون، ضد باکتریایی، ضد فارچی، تقویت کننده‌ی سیستم ایمنی، ضد آلرژیک و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Jaiswal et al. 2009). تحقیقات بیوشیمیایی انجام شده روی میوه این گیاه منجر به شناسایی گروه خاصی از لاکتون‌های استروئیدی به نام ویتانولیدها شده است که خواص درمانی آن را مرتبط با این ترکیبات می‌دانند (Nagareddy and Lakshmana 2006, Prasad et al. 2010). از مهم‌ترین ویتانولیدهای میوه‌ی گیاه پنیرباد می‌توان به ویتاکواگین، ویتانیا کوئگولنس، ویتافرین A، ویتانولید D، ویتانولید E و ویتانولید H اشاره کرد (Khodaei et al. 2012). گزارش شده است که ویتافرین A و ویتانولید E موجود در میوه‌ی پنیرباد باعث تکثیر سلول‌های نوع B و T سیستم ایمنی، کمک به ایمنی انتخابی نوع Th1 و افزایش فعالیت ماکروفاژها و ترشح ایمونوگلوبولین‌ها می‌گردد که خود بیانگر نقش عصاره‌ی میوه‌ی این گیاه در تحریک ایمنی سلولی و هومورال می‌باشد (Shohat et al. 1978). گیاهان دارویی علاوه بر تحریک فرآیند رشد موجودات زنده و تقویت سیستم ایمنی، اثرات مثبتی بر ساختار و عملکرد پرزها و سلول‌های اپیتلیال در بخش‌های مختلف روده دارند (Yamauchi et al. 2006). Davis و Kuttan در سال ۱۹۹۸ در آزمایشی به مدت ۳۰ روز و هر ۳ روز یک بار ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از عصاره‌ی هیدروالکلی ریشه‌ی گیاه دارویی بوزیدان (*Withania Somnifera*) را به موش‌هایی که سیستم ایمنی آن‌ها به وسیله‌ی ۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از ماده‌ی سیکلو فسفامید و هر ۳ روز یک بار سرکوب شده بود تزریق نمودند. نتایج ریخت‌شناسی روده نشان داد که درمان به وسیله‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی ریشه‌ی بوزیدان در موش‌های آلوده با سیکلو فسفامید باعث بازگرداندن ساختار پرز به حالت طبیعی می‌گردد. هدف از این

(1976, Soares 1984, Reddy and Tserng 1989). ویتامین D و متابولیت‌های آن علاوه بر روده، استخوان و کلیه در سلول‌های سیستم ایمنی نظیر مونوسیت‌ها و ماکروفاژها نیز دارای گیرنده می‌باشند. لئوسیت‌ها نیز فقط در مراحل معینی از تمایز و به محض فعال شدن دارای گیرنده‌های کلسیتریول می‌باشند (Aslam et al. 1998). کلسیتریول باعث توسعه‌ی سلول‌های Th2 می‌گردد که آن‌ها نیز باعث رشد و تمایز سلول‌های B و متعاقباً القاء تولید ایمونوگلوبولین می‌گردند (Beal et al. 2004). ویتامین D و متابولیت‌های آن نقش مهمی در توسعه‌ی ساختاری و عملکردی غشای مخاطی پرزهای روده دارند (Shinki et al. 1991). پلی‌آمین‌های آلیفاتیک پاترسین، اسپرمیدین و اسپرمین به عنوان اجزایی ضروری از سلول قلمداد می‌گردند که نقش مهمی در تنظیم، تکثیر و تمایز سلول دارند. تزریق کلسیتریول به جوجه‌های با کمبود ویتامین D باعث افزایش قابل ملاحظه‌ای در تولید پاترسین از اورنیتین و اسپرمیدین در دوازدهه شده است (Shinki et al. 1985). یون‌های کلسیم نقشی اساسی و مهم در فعال‌سازی و بلوغ لئوسیت‌ها دارند (Beridge et al. 2003, Feske 2007). همچنین غلظت داخل سلولی کلسیم در انواع مختلف سلول‌ها در طی استرس افزایش می‌یابد. برای مثال، استرس محدودیت شدید فضای فیزیکی، بسیج کلسیم در لئوسیت‌های موش را افزایش می‌دهد (Sei et al. 1991, Satoh et al. 2006). علاوه بر این، یون‌های کلسیم برای تولید ایترلوکین ۲ توسط لئوسیت‌های T ضروری هستند (نگولسکو و همکاران ۱۹۹۴). پنیرباد (*Withania coagulans*) گیاهی بوته‌ای و سفت، به بلندی ۳۰ تا ۹۰ سانتی‌متر با برگ‌های ۲/۵ تا ۷/۵ سانتی‌متری با عرض ۱/۵ دوکی شکل و نوک تیز و بعضی اوقات لب گرد است. دارای ساقه‌های کوتاه و باریک، به رنگ خاکستری تا اندازه‌ای سفید، اغلب پوشیده شده با کرک‌های خاکستری رنگ ریز و متراکم و ستاره‌ای شکل است. گل‌های آن زرد و دو پایه با قطر ۷ تا ۱۲ میلی‌متر است. بخش‌های قابل استفاده شامل گیاه

سطح کافی کلسیم و کنترل منفی (کاهش ۳۰ درصدی سطح کلسیم)، سه سطح عصاره‌ی پنیرباد (صفر، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و دو سطح کلسیتریول (صفر و ۰/۵ میکروگرم در کیلوگرم جیره) بود. کلسیتریول (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) با روغن ذرت به عنوان حامل مخلوط (۱۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) و در یک بطری تیره در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان استفاده در جیره‌ی نگهداری گردید. انرژی قابل متابولیسم و پروتئین خام جیره‌های مورد استفاده یکسان بود. جیره‌ی کنترل مثبت تأمین‌کننده‌ی همه‌ی نیازمندی‌های مواد مغذی ضروری پیشنهاد شده در دستورالعمل راهنمای سویه‌ی تجارتي راس ۳۰۸ بود. جیره‌ی کنترل منفی مشابه با جیره‌ی کنترل مثبت اما سطح کلسیم آن ۳۰ درصد کاهش یافته بود.

برای بررسی ایمنی هومورال از آنتی‌ژن گلبول قرمز گوسفندی (SRBC) استفاده گردید و پاسخ ایمنی علیه آن بررسی شد. بدین منظور ۲۰ میلی‌لیتر خون گوسفند تهیه و در لوله‌ی حاوی EDTA ۵ درصد ریخته شد. گلبول‌های قرمز سه بار با بافر نمکی فسفات (PBS) شسته شد و در نهایت یک محلول ۵ درصد از گلبول قرمز در بافر نمکی فسفات تهیه گردید (Chou et al. 2009). در روز ۲۵ دوره‌ی آزمایش (سن ۲۵ روزگی) به ۲ جوجه از هر تکرار، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول فوق درون سیاهرگ بال تزریق شد. برای اندازه‌گیری پاسخ آنتی‌بادی اولیه علیه SRBC، در روز ۳۲ دوره‌ی آزمایش (۷ روز پس از تزریق) از هر تکرار دو قطعه جوجه‌ای که به آن‌ها SRBC تزریق شده بود انتخاب و از ورید بال آن‌ها ۲ میلی‌لیتر خون اخذ شد و تزریق محلول ۵ درصد از گلبول قرمز در بافر نمکی فسفات مجدداً برای بررسی تیتراژ آنتی‌بادی ثانویه تکرار شد و ۷ روز بعد (روز ۳۹) خون‌گیری به عمل آمد. به منظور بررسی فعالیت ایمنی سلولی از ازدیاد حساسیت جلدی (CBH¹) استفاده گردید. در روز ۳۷

آزمایش، بررسی اثرات اصلی و متقابل کلسیتریول و عصاره‌ی هیدروالکلی ریشه‌ی گیاه دارویی پنیرباد با استفاده از جیره‌های با سطوح کافی و یا کم کلسیم بر پاسخ ایمنی و ریخت‌شناسی روده‌ی جوجه خروس‌ها می‌باشد.

مواد و روش کار

میوه‌های گیاه پنیرباد در ماه مهر از زیستگاه طبیعی آن واقع در سراوان، سیستان و بلوچستان جمع‌آوری شدند. میوه‌ها به هرباریوم پژوهشکده‌ی گیاه‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد منتقل و برای اطمینان مورد شناسایی قرار گرفتند. میوه‌ها در سایه و در معرض هوای آزاد خشک شدند و در نهایت خرد و به شکل پودر درآمدند. جهت حصول عصاره‌ی هیدروالکلی از اتانول ۵۰ درصد به عنوان حلال استفاده شد. بدین منظور میوه‌ی پودر شده با نسبت ۱ به ۴ (پودر میوه به حلال) به مدت ۷۲ ساعت در حلال قرار گرفت و ۸ لیتر از حلال به ۲ کیلوگرم پودر میوه افزوده شد. سپس میوه‌های پودر شده در حلال توسط دستگاه روتاری (Laborota 4000, Heidolph German) در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور به دست آوردن عصاره‌ی نیمه خشک مورد عصاره‌گیری قرار گرفت. عصاره‌ی آبی به دست آمده به مدت ۲۴ ساعت مورد انجماد خشک قرار گرفت. بالاخره عصاره‌ی خشک در بطری قرار گرفت و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

در این آزمایش تعداد ۶۰۰ قطعه جوجه خروس یک روزه سویه‌ی راس ۳۰۸ خریداری و در ۶۰ تکرار با بستری از تراشه‌ی چوب با تراکم ۱۰ قطعه جوجه به ازای هر تکرار قرار گرفتند. پرندگان در طی دوره‌ی آزمایش ۶ هفته‌ای به آب و تیمارهای آزمایشی دسترسی آزاد داشتند. دما و برنامه‌ی نوری مطابق با دستورالعمل پرورش سویه‌ی راس ۳۰۸ کنترل شد. طرح آزمایشی مورد استفاده به صورت فاکتوریل ۲×۳×۲ و شامل جیره‌ی کنترل مثبت با

ایمنو گلوبولین G از عیار تام، ایمنو گلوبولین M محاسبه شد. برای آماده‌سازی نمونه‌های بافتی سه مرحله‌ی آبیگری، شفاف‌سازی و پارافینه شدن انجام گرفت. برای آبیگری از نمونه‌های بافتی، نمونه‌ها داخل محلول الکل اتیلیک با درجات صعودی قرار گرفت. جهت شفاف‌سازی از زایلل استفاده گردید. به منظور اشباع‌سازی نمونه‌ها با پارافین، عمل پارافینه کردن انجام شد. سپس به وسیله‌ی میکروتوم چرخان برش‌هایی با ضخامت ۵ الی ۶ میکرومتر بریده شد. برش‌های حاصله به منظور صاف شدن داخل آب ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد شناور شدند و پس از رفع چروک‌های احتمالی روی لام قرار گرفتند. لام‌های مربوطه روی صفحه‌ی گرم با دمای ۴۰ الی ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند تا ضمن خشک شدن، پارافین‌های اضافی نیز ذوب گردد. رنگ‌آمیزی بافت‌های پایدار شده روی لام، پس از پارافین‌گیری با زایلل و آب‌دهی با درجات نزولی الکل اتیلیک، به کمک هماتوکسیلین و ائوزین انجام گرفت. برای بررسی بافت‌های تهیه شده از میکروسکوپ نوری (Olympus BX41TF, Tokyo, Japan) متصل به دوربین دیجیتال (Olympus DP12 U-TV0.5 XC-2, Japan) و مجهز به سیستم آنالیز تصویر (Olysia Soft Imaging System, Germany) استفاده گردید. بدین ترتیب ارتفاع پرز (از نوک پرز تا محل اتصال کریپت)، عرض پرز، عمق کریپت و ضخامت عضله محاسبه شد.

آنالیز اطلاعات به صورت یک طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل ۲×۳×۲ (دو سطح کلسیم، سه سطح عصاره‌ی میوه‌ی پنبرباد و دو سطح کلسیتریول) انجام شد. تجزیه و تحلیل کلیه‌ی داده‌ها با استفاده از روش GLM نرم‌افزار آماری SAS انجام شد. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده گردید.

دوره‌ی آزمایش ابتدا ضخامت پرده‌ی بین انگشت دوم و سوم هر دو پای چپ و راست ۲ قطعه‌ی جوجه به ازای هر تکرار با استفاده از کولیس دیجیتال با دقت ± 1 میکرومتر (series 500, Mitutoyo, Tokyo, Japan) اندازه‌گیری شد. سپس ۱۰۰ میکروگرم فیتو هم آگلوتینین (PHA-P) در ۰/۱ میلی‌لیتر محلول سالین از طریق تزریق زیر پوستی به پرده‌ی بین انگشت دوم و سوم پای چپ هر جوجه تزریق گردید. به پرده‌ی بین انگشت دوم و سوم پای راست نیز ۰/۱ میلی‌لیتر سالین تزریق گردید که به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. ضخامت پرده بعد از تزریق و به فواصل ۱۲ و ۲۴ ساعت دوباره اندازه‌گیری گردید. به منظور بررسی میزان تکثیر سلول‌های T در سیستم ایمنی سلولی اختلاف ضخامت قبل و بعد از هر تزریق به عنوان معیار سنجش در نظر گرفته شد. میانگین افزایش ضخامت پرده در هر پرنده از اختلاف ضخامت قبل و بعد از هر تزریق به دست آمد (Thompson et al. 1980). در روزهای ۲۱ و ۴۲ دوره‌ی آزمایش یک قطعه جوجه به ازای هر تکرار کشتار و وزن اندام‌های لنفاوی شامل تیموس، طحال و بورس فابرسیوس اندازه‌گیری شدند. تأثیر تیمارهای آزمایشی بر ریخت‌شناسی بخش ژژنوم روده‌ی کوچک در ۲ سن ۲۱ و ۴۲ روزگی بررسی گردید. بدین منظور در روزهای ۲۱ و ۴۲ دوره‌ی آزمایش کلیه‌ی پرندگان مورد آزمایش به مدت ۸ ساعت از دسترسی به خوراک محروم و یک قطعه جوجه به ازای هر تکرار کشتار گردید. حدود ۱/۵ سانتی‌متر از قسمت میانی بافت ژژنوم جدا شد. نمونه‌ها به منظور تهیه‌ی اسلاید و اندازه‌گیری متغیرهای مربوطه شامل ارتفاع پرز، عرض پرز، ضخامت اپیتلیوم، ضخامت عضله و عمق کریپت به آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه فردوسی منتقل شدند.

برای اندازه‌گیری تیترا آنتی‌بادی از روش میکروهماگلوتیناسیون استفاده گردید (Boa-Amponsem et al. 2001). برای عیار ایمنو گلوبولین G از مرکاپتاتانول ۰/۰۱ مولار استفاده شد. از تفریق عیار

نتایج

ایمنی هومورال

اثر تیمارهای آزمایشی بر پاسخ آنتی‌بادی اولیه و ثانویه ضد SRBC در جدول ۲ نشان داده شده است. اطلاعات جدول نشان می‌دهد که نوع جیره کنترل، مکمل سازی بوزیدان و کلستریول هیچ گونه تأثیر معنی‌داری بر پاسخ ایمنو گلوبولین M، G و تام ضد گلبول قرمز گوسفند در سنین ۳۲ و ۳۹ روزگی نداشته است ($P > 0/05$). اثر متقابل معنی‌داری بین جیره و کلستریول بر پاسخ ایمنو گلوبولین G در تست اولیه مشاهده گردید ($P < 0/05$). اما این اثر متقابل در تست ثانویه مشاهده نگردید ($P > 0/05$).

ایمنی سلولی

کلیه تیمارهای آزمایشی هیچ گونه تأثیر معنی‌داری بر افزایش حساسیت و ورم پرده بین انگشتان دوم و سوم در اثر تزریق زیر پوستی ۱۰۰ میکروگرم فیتو هم آگلوتینین در ۰/۱ میلی‌لیتر محلول سالین نشان ندادند ($P > 0/05$) (جدول ۳).

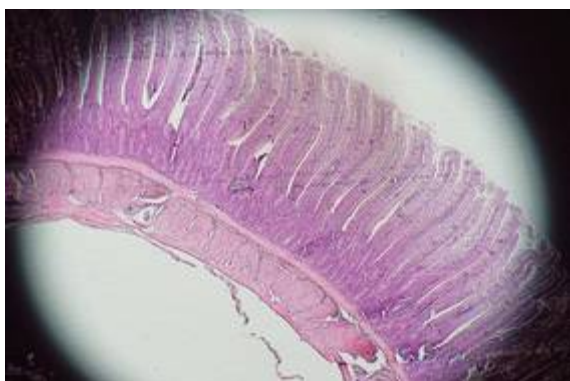
وزن اندام‌های لنفاوی

اثر پنیر باد، کلستریول و نوع جیره کنترل بر وزن نسبی اندام‌های لنفاوی در سنین ۲۱ و ۴۲ روزگی در جداول ۴ و ۵ نشان داده شده است. در سن ۲۱ روزگی اثر متقابل میان نوع جیره کنترل و پنیر باد بر وزن نسبی طحال مشاهده شد (جدول ۴). این اثر متقابل نشان داد در جیره‌های کنترل مثبت، صرف نظر از سطح کلستریول جیره، مکمل سازی ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره پنیر باد موجب افزایش وزن نسبی طحال در مقایسه با جیره‌های فاقد پنیر باد می‌گردد ($0/137$ در مقابل $0/088$ گرم). در ۴۲ روزگی وزن اندام‌های لنفوئیدی تیموس و طحال تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفتند. وزن نسبی تیموس در پرندگان تغذیه شده با ۲۰۰ میلی‌گرم در

کیلوگرم عصاره پنیر باد بیش‌تر از پرندگان تغذیه شده با سطوح دیگر این عصاره بود ($P < 0/01$). همچنین جیره کنترل منفی موجب کاهش وزن نسبی طحال در مقایسه با جیره کنترل مثبت گردید ($P < 0/05$).

ریخت‌شناسی روده‌ی کوچک

در ۲۱ روزگی به جز نسبت طول پرز به عمق کریپت سایر پارامترهای روده تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند (جدول ۶). در ۴۲ روزگی مکمل سازی ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پنیر باد موجب کاهش معنی‌دار طول پرز در مقایسه با مکمل سازی سایر سطوح این عصاره گردید (جدول ۶) (تصاویر ۱ و ۲) ($P < 0/01$). هیچ اثر متقابل معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی بر ریخت‌شناسی روده در ۴۲ روزگی مشاهده نشد (جدول ۷).



تصویر ۱: کاهش طول پرز در اثر تغذیه‌ی سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره‌ی میوه پنیر باد در سن ۴۲ روزگی



تصویر ۲: افزایش طول پرز در اثر تغذیه‌ی سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره‌ی میوه پنیر باد در سن ۴۲ روزگی

جدول ۱: ترکیب جیره‌های پایه‌ی جوجه‌های گوشتی در بازه‌های زمانی مختلف (%).

دوره پایانی (۲۴-۴۲ روزگی)		دوره رشد (۱۱-۲۳ روزگی)		دوره آغازین (۱-۱۰ روزگی)		
+	-	+	-	+	-	
۵۳	۵۳	۵۳/۲۰	۵۳/۲۰	۵۲	۵۲	ذرت
۳۶/۹۰	۳۶/۹۰	۳۷	۳۷	۳۵	۳۵	کنجاله سویا
-	-	-	-	۵	۵	گلوتن ذرت
۶/۵۶	۶/۵۶	۵/۸	۵/۸	۳/۲۷	۳/۲۷	روغن گیاهی
۱/۰۳	۰/۳۷	۱/۰۷	۰/۴۰	۱/۳۱	۰/۵۳	سنگ آهک
۱/۴۰	۱/۴۰	۱/۵۵	۱/۵۵	۱/۷۵	۱/۷۵	دی کلسیم فسفات
۰/۴۱	۰/۴۱	۰/۴۷	۰/۴۷	۰/۳۵	۰/۳۵	نمک
۰/۲۰	۰/۲۰	۰/۲۸	۰/۲۸	۰/۳۲	۰/۳۲	دی ال متیونین
-	-	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۴	۰/۴	ال لیزین
-	-	-	-	۰/۱	۰/۱	ال ترئونین
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	مکمل ویتامینی ۱
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	مکمل معدنی ۲
-	۰/۶۶	-	۰/۶۷	-	۰/۷۸	ماسه
						انرژی و مواد مغذی محاسبه شده
۳۱۷۸/۷۷	۳۱۷۸/۷۷	۳۱۳۰/۹۷	۳۱۳۰/۹۷	۳۰۱۱/۴۷	۳۰۱۱/۴۷	انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری/کیلوگرم)
۲۰/۹۱	۲۰/۹۱	۲۱/۱۵	۲۱/۱۵	۲۳/۵۲	۲۳/۵۲	پروتئین خام (%)
۱/۱۳	۱/۱۳	۱/۲۴	۱/۲۴	۱/۴۴	۱/۴۴	لیزین (%)
۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۶۱	۰/۶۱	۰/۷	۰/۷	متیونین (%)
۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۹۵	۰/۹۵	۱/۰۷	۱/۰۷	کل اسیدهای آمینه گوگرد دار (%)
۰/۸۵	۰/۵۹	۰/۹۰	۰/۶۳	۱/۰۴	۰/۷۳	کلسیم (%)
۰/۴۲	۰/۴۲	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۵	۰/۵	فسفر غیر فیتاته (%)
۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۷	۰/۷	فسفر کل (%)
۰/۱۷	۰/۱۷	۰/۱۹	۰/۱۹	۰/۱۵	۰/۱۵	سدیم (%)
۰/۸۹	۰/۸۹	۰/۹۰	۰/۹۰	۰/۸۷	۰/۸۷	پتاسیم (%)
۰/۲۸	۰/۲۸	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۲۵	۰/۲۵	کلر (%)
۲۲۶/۸۷	۲۲۶/۸۷	۲۲۶/۱۱	۲۲۶/۱۱	۲۱۷/۲۹	۲۱۷/۲۹	DEB (mEq/kg) ۳
						غلظت مواد مغذی آنالیز شده
۰/۸۸	۰/۶۱	۰/۹۳	۰/۶۵	۱/۰۷	۰/۷۵	کلسیم (%)
۰/۶۷	۰/۶۷	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۷۴	۰/۷۴	فسفر کل (%)

^۱ پیش مخلوط ویتامینی در هر کیلوگرم جیره ۱۱۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۸۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D، ۱۱ میلی‌گرم ویتامین A، ۲ میلی‌گرم ویتامین B_۱، ۵/۷ میلی‌گرم ویتامین B_۲، ۲ میلی‌گرم ویتامین B_۶، ۰/۰۲۴ میلی‌گرم ویتامین B_{۱۲}، ۲۸ میلی‌گرم نیکوتینیک اسید، ۰/۵ میلی‌گرم اسید فولیک، ۱۲ میلی‌گرم پانتوتینیک اسید، ۲۵۰ میلی‌گرم کولین کلراید تأمین می‌کرد.

^۲ پیش مخلوط معدنی در هر کیلوگرم جیره ۱۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۶۵ میلی‌گرم روی، ۵ میلی‌گرم مس، ۰/۲۲ میلی‌گرم سلنیوم، ۰/۵ میلی‌گرم ید و ۰/۵ میلی‌گرم کبالت تأمین می‌کرد.

^۳ DEB= Dietary electrolyte balance

جدول ۲: اثر پنیر باد، کلستیریل و نوع جیره ی کنترل بر پاسخ آنتی بادی اولیه و ثانویه (۳۹ روزگی) SRBC

تست ثانویه (۳۹ روزگی)			تست اولیه (۳۲ روزگی)			تیمار		
ایمونوگلوبولین م	ایمونوگلوبولین G	ایمونوگلوبولین م	ایمونوگلوبولین م	ایمونوگلوبولین G	ایمونوگلوبولین م	کلستیریل (میکروگرم/ کیلوگرم)	پنیر باد (میلیگرم/ کیلوگرم)	جیره ^۱
۷/۵۰	۵/۵۰	۲/۰۰	۷/۲۰	۵/۲۰	۲/۰۰ ^{ab}	صفر	صفر	-
۷/۴۰	۵/۶۰	۲/۵۰	۶/۸۰	۵/۴۰	۱/۴۰ ^{ab}	۰/۵	صفر	-
۷/۲۰	۵/۲۰	۲/۰۰	۸/۲۰	۶/۰۰	۲/۲۰ ^a	صفر	۱۰۰	-
۸/۲۰	۶/۲۰	۲/۰۰	۷/۶۰	۶/۰۰	۱/۶۰ ^{ab}	۰/۵	۱۰۰	-
۷/۸۰	۵/۴۰	۲/۴۰	۷/۴۰	۵/۸۰	۱/۶۰ ^{ab}	صفر	۲۰۰	-
۸/۴۰	۶/۲۰	۲/۲۰	۸/۰۰	۶/۴۰	۱/۶۰ ^{ab}	۰/۵	۲۰۰	-
۸/۰۰	۶/۲۰	۱/۸۰	۸/۰۰	۶/۴۰	۱/۶۰ ^{ab}	صفر	صفر	+
۷/۸۰	۵/۷۵	۲/۰۰	۷/۴۰	۵/۶۰	۱/۸۰ ^{ab}	۰/۵	صفر	+
۷/۵۰	۵/۵۰	۲/۰۰	۷/۵۰	۶/۶۰	۱/۵۰ ^{ab}	صفر	۱۰۰	+
۸/۰۰	۵/۶۰	۲/۴۰	۷/۰۰	۵/۲۰	۱/۸۰ ^{ab}	۰/۵	۱۰۰	+
۷/۶۰	۵/۴۰	۲/۲۰	۷/۸۰	۶/۶۰	۱/۲۰ ^b	صفر	۲۰۰	+
۷/۴۰	۵/۶۰	۱/۸۰	۷/۸۰	۶/۴۰	۱/۷۵ ^{ab}	۰/۵	۲۰۰	+
۰/۴۷۵	۰/۵۴۷	۰/۳۶۹	۰/۶۷۳	۰/۶۶۶	۰/۲۷۱			SEM
								اثر اصلی
۷/۷۵	۵/۶۸	۲/۱۷	۷/۵۳	۵/۸۰	۱/۷۳	-		جیره
۷/۷۲	۵/۶۷	۲/۰۳	۷/۵۸	۶/۱۰	۱/۶۰	+		
۷/۶۸	۵/۷۷	۲/۰۵	۷/۳۵	۵/۶۵	۱/۷۰	صفر		پنیر باد
۷/۷۳	۵/۶۳	۲/۱۰	۷/۵۷	۵/۸۸	۱/۷۸	۱۰۰		
۷/۸۰	۵/۶۵	۲/۱۵	۷/۷۵	۶/۳۰	۱/۵۲	۲۰۰		
۷/۶۰	۵/۵۳	۲/۰۷	۷/۶۸	۶/۰۷	۱/۶۸	صفر		کلستیریل
۷/۸۶	۵/۸۲	۲/۱۳	۷/۴۳	۵/۸۳	۱/۶۵	۰/۵		

P Values

۰/۹۰۵	۰/۹۷۷	۰/۴۴۹	۰/۸۹۹	۰/۳۸۸	۰/۴۳۸			جیره
۰/۹۳۴	۰/۹۲۱	۰/۹۵۴	۰/۷۰۳	۰/۳۹۴	۰/۴۷۶			پنیر باد
۰/۳۴۶	۰/۳۲۲	۰/۶۷۴	۰/۵۲۷	۰/۴۸۶	۰/۸۷۶			کلستیریل
۰/۳۰۷	۰/۵۳۵	۰/۴۵۸	۰/۳۸۴	۰/۷۳۷	۰/۸۱۴			جیره × پنیر باد
۰/۴۰۹	۰/۲۴۷	۰/۹۳۲	۰/۷۶۷	۰/۱۷۵	۰/۰۲۳			جیره × کلستیریل
۰/۴۳۰	۰/۵۴۰	۰/۳۶۹	۰/۶۱۲	۰/۶۳۶	۰/۴۲۰			پنیر باد × کلستیریل
۰/۸۷۶	۰/۹۶۵	۰/۷۳۷	۰/۹۳۶	۰/۹۴۲	۰/۹۰۱			جیره × پنیر باد × کلستیریل

^{a,b} میانگین‌های هر ستون و برای هر عامل که دارای حرف مشترک نمی‌باشند دارای تفاوت معنی‌دار هستند ($P < 0.05$).

^۱ جیره کنترل مثبت (+) حاوی سطح توصیه شده کلسیم و کنترل منفی (-) حاوی ۷۰ درصد سطح مورد نیاز کلسیم بود.

جدول ۳: اثر پنیرباد، کلستریول و نوع جیره‌ی کنترل بر افزایش ضخامت پرده بین انگشت دوم و سوم جوجه‌های گوشتی در سن ۳۷ تا ۳۸ روزگی

افزایش ضخامت پرده بین انگشت دوم و سوم		تیمار		
افزایش ۲۴ ساعته (میلی‌متر)	افزایش ۱۲ ساعته (میلی‌متر)	کلستریول (میکروگرم/کیلوگرم)	پنیر باد (میلی‌گرم/کیلوگرم)	جیره ^۱
۰/۳۳۶	۰/۳۶۸	صفر	صفر	-
۰/۱۹۶	۰/۲۰۸	۰/۵	صفر	-
۰/۲۰۴	۰/۱۵۰	صفر	۱۰۰	-
۰/۴۲۴	۰/۲۹۴	۰/۵	۱۰۰	-
۰/۲۳۰	۰/۲۳۰	صفر	۲۰۰	-
۰/۳۷۸	۰/۳۰۴	۰/۵	۲۰۰	-
۰/۵۰۴	۰/۶۶۲	صفر	صفر	+
۰/۱۹۴	۰/۲۷۸	۰/۵	صفر	+
۰/۴۹۶	۰/۴۰۴	صفر	۱۰۰	+
۰/۴۳۴	۰/۴۶۴	۰/۵	۱۰۰	+
۰/۲۵۴	۰/۲۹۰	صفر	۲۰۰	+
۰/۳۳۶	۰/۲۷۴	۰/۵	۲۰۰	+
۰/۱۱۵	۰/۱۲۷			SEM
				اثر اصلی
				جیره
۰/۲۹۴	۰/۲۵۹	-		
۰/۳۶۹	۰/۳۹۵	+		
		صفر		پنیر باد
۰/۳۰۷	۰/۳۷۹	۱۰۰		
۰/۳۸۹	۰/۳۲۸	۲۰۰		
۰/۲۹۹	۰/۲۷۴	صفر		کلستریول
		۰/۵		
P Values				
۰/۲۶۵	۰/۰۷۰			جیره
۰/۴۷۸	۰/۵۱۵			پنیر باد
۰/۸۷۷	۰/۵۲۶			کلستریول
۰/۶۱۸	۰/۵۰۵			جیره × پنیر باد
۰/۲۰۰	۰/۳۷۲			جیره × کلستریول
۰/۰۸۲	۰/۱۰۰			پنیر باد × کلستریول
۰/۸۰۳	۰/۹۰۸			جیره × پنیر باد × کلستریول

^۱ جیره‌ی کنترل مثبت (+) حاوی سطح توصیه شده کلسیم و کنترل منفی (-) حاوی ۷۰ درصد سطح مورد نیاز کلسیم بود.

جدول ۴: اثر پنیر باد، کلسیتریول و نوع جیره ی کنترل بر وزن نسبی اندام های لثاوی
(گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن بدن) در سن ۲۱ روزگی

وزن اندام های لثاوی			تیمار		
بوس فابرسیوس	طحال	تیموس	کلسیتریول (میکروگرم/کیلوگرم)	پنیر باد (میلی گرم/کیلوگرم)	جیره ^۱
۰/۲۵۲	۰/۱۱۱ ^{ab}	۰/۹۷۱	صفر	صفر	-
۰/۲۴۲	۰/۱۲۸ ^{ab}	۰/۷۷۶	۰/۵	صفر	-
۰/۲۹۱	۰/۱۰۸ ^{ab}	۰/۸۰۲	صفر	۱۰۰	-
۰/۲۱۴	۰/۰۹۵ ^{ab}	۰/۷۳۰	۰/۵	۱۰۰	-
۰/۲۴۷	۰/۱۰۸ ^{ab}	۰/۸۵۹	صفر	۲۰۰	-
۰/۲۴۶	۰/۱۱۷ ^{ab}	۰/۹۲۶	۰/۵	۲۰۰	-
۰/۲۵۴	۰/۰۹۵ ^{ab}	۰/۹۳۲	صفر	صفر	+
۰/۱۹۲	۰/۰۸۸ ^b	۰/۹۰۰	۰/۵	صفر	+
۰/۲۴۸	۰/۱۲۵ ^{ab}	۰/۸۸۸	صفر	۱۰۰	+
۰/۲۹۲	۰/۱۱۲ ^{ab}	۰/۷۶۱	۰/۵	۱۰۰	+
۰/۲۱۱	۰/۱۳۷ ^a	۰/۹۱۷	صفر	۲۰۰	+
۰/۳۰۳	۰/۱۰۲ ^{ab}	۰/۶۸۸	۰/۵	۲۰۰	+
۰/۰۳۴	۰/۰۱۳	۰/۰۸۵			SEM
					اثر اصلی
۰/۲۴۹	۰/۱۱۱	۰/۸۴۴	-		جیره
۰/۲۵۰	۰/۱۱۰	۰/۸۴۸	+		
۰/۲۳۵	۰/۱۰۵	۰/۸۹۵	صفر		پنیر باد
۰/۲۶۱	۰/۱۰۹	۰/۷۹۵	۱۰۰		
۰/۲۵۲	۰/۱۱۶	۰/۸۴۸	۲۰۰		
۰/۲۵۰	۰/۱۱۴	۰/۸۹۵	صفر		کلسیتریول
۰/۲۴۸	۰/۱۰۷	۰/۷۹۷	۰/۵		

P Values

۰/۹۴۸	۰/۸۱۱	۰/۷۲۲			جیره
۰/۵۵۷	۰/۴۹۹	۰/۱۳۴			پنیر باد
۰/۹۱۵	۰/۳۴۷	۰/۱۰۱			کلسیتریول
۰/۶۵۹	۰/۰۴۳	۰/۳۶۹			جیره × پنیر باد
۰/۱۷۵	۰/۱۹۷	۰/۸۶۴			جیره × کلسیتریول
۰/۲۳۰	۰/۷۹۶	۰/۷۶۹			پنیر باد × کلسیتریول
۰/۱۷۰	۰/۷۴۰	۰/۱۵۵			جیره × پنیر باد × کلسیتریول

جدول ۵: اثر پنیر باد، کلسیتریول و نوع جیره ی کنترل بر وزن نسبی اندام های لفاوی (گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن بدن) در سن ۴۲ روزگی

وزن اندام های لفاوی			تیمار		
بوس فابرسیوس	طحال	تیموس	کلسیتریول (میکروگرم/کیلوگرم)	پنیر باد (میلی گرم/کیلوگرم)	جیره ^۱
۰/۰۹۵	۰/۱۲۵	۰/۵۲۰	صفر	صفر	-
۰/۰۹۸	۰/۱۰۵	۰/۶۳۲	۰/۵	صفر	-
۰/۱۱۶	۰/۱۱۲	۰/۶۹۳	صفر	۱۰۰	-
۰/۱۱۳	۰/۱۱۴	۰/۶۱۹	۰/۵	۱۰۰	-
۰/۰۹۸	۰/۱۱۶	۰/۹۰۶	صفر	۲۰۰	-
۰/۰۸۴	۰/۱۳۲	۰/۸۵۷	۰/۵	۲۰۰	-
۰/۱۱۷	۰/۱۴۲	۰/۶۳۲	صفر	صفر	+
۰/۱۰۴	۰/۱۲۸	۰/۶۳۵	۰/۵	صفر	+
۰/۱۱۳	۰/۱۴۱	۰/۶۷۹	صفر	۱۰۰	+
۰/۱۱۲	۰/۱۳۵	۰/۷۰۹	۰/۵	۱۰۰	+
۰/۱۰۲	۰/۱۱۸	۰/۷۷۷	صفر	۲۰۰	+
۰/۱۰۳	۰/۱۲۹	۰/۹۱۷	۰/۵	۲۰۰	+
۰/۰۱۸	۰/۰۱۱	۰/۰۹۹			SEM
					اثر اصلی
۰/۱۰۰	۰/۱۱۷ ^b	۰/۷۰۵	-		جیره
۰/۱۰۹	۰/۱۳۲ ^a	۰/۷۲۵	+		
۰/۱۰۳	۰/۱۲۵	۰/۶۰۵ ^b	صفر		پنیر باد
۰/۱۱۴	۰/۱۲۶	۰/۶۷۵ ^b	۱۰۰		
۰/۰۹۶	۰/۱۲۴	۰/۸۶۴ ^a	۲۰۰		
۰/۱۰۷	۰/۱۲۶	۰/۷۰۱	صفر		کلسیتریول
۰/۱۰۲	۰/۱۲۴	۰/۷۲۸	۰/۵		

P Values

۰/۴۹۵	۰/۰۳۲	۰/۷۲۶			جیره
۰/۴۹۴	۰/۹۶۹	۰/۰۰۱			پنیر باد
۰/۶۸۶	۰/۷۸۶	۰/۶۳۹			کلسیتریول
۰/۸۲۴	۰/۲۵۹	۰/۷۹۰			جیره × پنیر باد
۰/۹۸۳	۰/۸۶۹	۰/۵۹۵			جیره × کلسیتریول
۰/۹۸۹	۰/۲۰۰	۰/۸۳۱			پنیر باد × کلسیتریول
۰/۸۵۹	۰/۹۰۲	۰/۵۵۵			جیره × پنیر باد × کلسیتریول

^{a-c} میانگین های هر ستون و برای هر عامل که دارای حرف مشترک نمی باشند دارای تفاوت معنی دار هستند ($P < 0.05$).

^۱ جیره کنترل مثبت (+) حاوی سطح توصیه شده کلسیم و کنترل منفی (-) حاوی ۷۰ درصد سطح مورد نیاز کلسیم بود.

جدول ۶: اثر پنیر باد، کلسیتریول و نوع جیره ی کنترل بر ریخت شناسی بخش ژژونوم روده ی کوچک جوجه های گوشتی در سن ۲۱ روزگی

خصوصیات ریخت شناسی بخش ژژونوم					تیمار		
طول پرز / عمق کریبت	ضخامت لایه عضلانی (میکرومتر)	عمق کریبت (میکرومتر)	عرض پرز (میکرومتر)	طول پرز (میکرومتر)	کلسیتریول (میکروگرم/کیلوگرم)	پنیر باد (میلی گرم/کیلوگرم)	جیره ^۱
۴/۴۰۱ ^{ab}	۲۹۲/۷	۲۳۹/۷	۱۰۵/۳	۱۰۴۹	صفر	صفر	-
۳/۹۶۲ ^{ab}	۲۷۳/۱	۲۵۴/۴	۱۰۰/۷	۹۹۰/۷	۰/۵	صفر	-
۴/۴۶۲ ^{ab}	۲۱۰/۴	۲۳۲/۱	۹۹/۵۰	۱۰۰۸	صفر	۱۰۰	-
۴/۳۴۸ ^{ab}	۲۴۷/۹	۲۳۵/۶	۸۹/۷۴	۱۰۱۳	۰/۵	۱۰۰	-
۴/۴۵۴ ^{ab}	۲۸۲/۷	۲۴۴/۷	۸۵/۸۸	۱۰۶۰	صفر	۲۰۰	-
۵/۰۹۲ ^a	۲۹۷/۶	۲۳۴/۷	۹۹/۲۱	۱۱۷۵	۰/۵	۲۰۰	-
۴/۷۸۴ ^{ab}	۲۶۳/۴	۲۴۰/۲	۱۱۳/۶	۱۱۵۳	صفر	صفر	+
۳/۷۸۱ ^b	۲۷۳/۳	۲۷۵/۴	۱۰۵/۵	۱۰۱۶	۰/۵	صفر	+
۴/۰۸۶ ^{ab}	۲۹۹/۰	۲۵۰/۴	۹۸/۵۹	۱۰۱۹	صفر	۱۰۰	+
۳/۹۳۱ ^{ab}	۲۷۵/۰	۲۵۵/۰	۱۰۵/۱	۹۹۷/۸	۰/۵	۱۰۰	+
۴/۱۸۴ ^{ab}	۲۶۳/۳	۲۵۹/۷	۱۰۷/۹	۱۰۸۰	صفر	۲۰۰	+
۵/۰۵۲ ^a	۲۱۹/۶	۲۲۴/۲	۸۹/۷۶	۱۱۱۵	۰/۵	۲۰۰	+
۰/۳۴۷	۴۳/۸۹	۱۷/۸۱	۸/۳۳۰	۷۷/۷۸			SEM
							اثر اصلی
۴/۴۵۵	۲۸۰/۳	۲۴۰/۲	۹۶/۴۴	۱۰۴۹	-		جیره
۴/۳۱۱	۲۶۴/۴	۲۵۰/۸	۱۰۳/۶	۱۰۶۵	+		
۴/۲۲۳	۲۹۵/۸	۲۳۵/۱	۱۰۶/۳	۱۰۵۲	صفر		پنیر باد
۴/۲۱۳	۲۵۵/۹	۲۴۴/۹	۹۸/۲۳	۱۰۰۹	۱۰۰		
۴/۶۹۶	۲۶۵/۸	۲۴۰/۸	۹۵/۷۱	۱۱۰۸	۲۰۰		
۴/۴۰۶	۲۸۰/۹	۲۴۶/۵	۱۰۱/۸	۱۰۶۴	صفر		کلسیتریول
۴/۳۶۱	۲۶۴/۴	۲۴۴/۴	۹۸/۳۶	۱۰۵۱	۰/۵		

P Values

۰/۴۶۷	۰/۴۷۸	۰/۳۱۷	۰/۱۷۷	۰/۷۵۶			جیره
۰/۰۹۷	۰/۳۷۲	۰/۶۴۱	۰/۱۹۴	۰/۲۲۲			پنیر باد
۰/۸۶۸	۰/۴۲۴	۰/۸۴۳	۰/۴۸۳	۰/۸۱۸			کلسیتریول
۰/۶۲۱	۰/۱۲۴	۰/۸۱۱	۰/۹۹۶	۰/۷۳۱			جیره × پنیر باد
۰/۷۶۲	۰/۹۵۲	۰/۹۵۱	۰/۵۲۶	۰/۵۰۵			جیره × کلسیتریول
۰/۰۱۷	۰/۶۲۲	۰/۱۸۴	۰/۹۱۵	۰/۳۰۹			پنیر باد × کلسیتریول
۰/۷۲۵	۰/۲۳۸	۰/۶۶۵	۰/۱۴۳	۰/۹۶۳			جیره × پنیر باد × کلسیتریول

^{ab} میانگین های هر ستون و برای هر عامل که دارای حرف مشترک نمی باشند دارای تفاوت معنی دار هستند ($P < 0.05$).

^۱ جیره کنترل مثبت (+) حاوی سطح توصیه شده کلسیم و کنترل منفی (-) حاوی ۷۰ درصد سطح مورد نیاز کلسیم بود.

جدول ۷: اثر پنیر باد، کلسیتریول و نوع جیره‌ی کنترل بر ریخت‌شناسی بخش ژژونوم روده‌ی کوچک جوجه‌های گوشتی در سن ۴۲ روزگی

خصوصیات ریخت‌شناسی بخش ژژونوم					تیمار		
طول پرز / عمق کریپت	ضخامت لایه عضلانی (میکرومتر)	عمق کریپت (میکرومتر)	عرض پرز (میکرومتر)	طول پرز (میکرومتر)	کلسیتریول (میکروگرم/کیلوگرم)	پنیر باد (میلی‌گرم/کیلوگرم)	جیره ^۱
۴/۸۴۰	۳۷۰/۴	۳۳۲/۳	۱۰۹/۹	۱۵۸۱	صفر	صفر	-
۴/۰۰۶	۳۸۲/۴	۳۵۹/۶	۱۲۴/۰	۱۴۳۴	۰/۵	صفر	-
۴/۸۰۴	۴۴۲/۷	۳۲۲/۸	۱۱۱/۸	۱۴۹۷	صفر	۱۰۰	-
۴/۳۱۵	۳۸۰/۷	۳۵۱/۱	۱۱۳/۳	۱۴۶۸	۰/۵	۱۰۰	-
۳/۷۳۹	۴۴۹/۴	۳۴۷/۷	۱۱۱/۱	۱۲۵۴	صفر	۲۰۰	-
۴/۵۱۱	۳۷۹/۷	۲۷۷/۰	۱۰۲/۰	۱۲۳۱	۰/۵	۲۰۰	-
۴/۲۴۸	۳۷۷/۷	۳۱۸/۳	۱۱۶/۴	۱۳۰۳	صفر	صفر	+
۴/۲۶۰	۳۹۵/۸	۳۴۷/۱	۱۳۴/۶	۱۴۵۸	۰/۵	صفر	+
۵/۲۱۳	۴۱۰/۹	۲۹۷/۶	۱۱۰/۷	۱۶۲۸	صفر	۱۰۰	+
۵/۰۱۶	۳۲۶/۵	۳۳۷/۹	۱۰۷/۶	۱۵۶۱	۰/۵	۱۰۰	+
۵/۱۷۵	۴۲۸/۸	۳۳۴/۷	۱۱۸/۶	۱۴۱۹	صفر	۲۰۰	+
۴/۴۲۷	۳۷۵/۲	۳۴۴/۱	۱۲۸/۱	۱۱۴۹	۰/۵	۲۰۰	+
۰/۴۶۲	۳۲/۹۲	۳۷/۶۷	۹/۶۹۰	۱۰۸/۹			SEM
							اثر اصلی
۴/۳۶۹	۴۰۰/۰	۳۳۱/۷	۱۱۱/۶	۱۴۱۱	-		جیره
۴/۶۹۷	۳۷۷/۵	۳۲۹/۴	۱۱۹/۰	۱۴۱۷	+		
۴/۳۳۹	۳۷۱/۶	۳۳۹/۳	۱۲۱/۰	۱۴۴۴ ^a	صفر		پنیر باد
۴/۸۰۶	۳۸۷/۸	۳۲۷/۳	۱۱۰/۸	۱۵۳۲ ^a	۱۰۰		
۴/۴۲۵	۴۰۸/۸	۳۲۴/۹	۱۱۴/۳	۱۲۶۹ ^b	۲۰۰		
۴/۶۳۳	۴۰۴/۶	۳۲۵/۶	۱۱۳/۱	۱۴۴۱	صفر		کلسیتریول
۴/۴۰۰	۳۷۳/۰	۳۳۵/۸	۱۱۷/۷	۱۳۸۵	۰/۵		

P Values

۰/۲۱۷	۰/۲۷۹	۰/۹۳۴	۰/۲۰۵	۰/۸۹۱			جیره
۰/۳۲۴	۰/۳۲۳	۰/۸۶۰	۰/۳۳۵	۰/۰۰۳			پنیر باد
۰/۳۸۵	۰/۰۹۹	۰/۶۳۲	۰/۳۶۹	۰/۳۲۳			کلسیتریول
۰/۴۰۹	۰/۷۵۱	۰/۶۵۲	۰/۳۵۳	۰/۲۹۴			جیره × پنیر باد
۰/۸۲۲	۰/۷۳۵	۰/۴۸۱	۰/۶۰۰	۰/۹۶۱			جیره × کلسیتریول
۰/۸۱۳	۰/۰۵۳	۰/۴۲۴	۰/۴۰۵	۰/۶۱۱			پنیر باد × کلسیتریول
۰/۲۲۲	۰/۷۷۵	۰/۷۳۵	۰/۷۰۵	۰/۲۰۷			جیره × پنیر باد × کلسیتریول

^{a,b} میانگین‌های هر ستون و برای هر عامل که دارای حرف مشترک نمی‌باشند دارای تفاوت معنی‌دار هستند ($P < 0.05$).

^۱ جیره‌ی کنترل مثبت (+) حاوی سطح توصیه شده‌ی کلسیم و کنترل منفی (-) حاوی ۷۰ درصد سطح مورد نیاز کلسیم بود.

بحث

دسترسی پرنده به کلسیم کافی برای پاسخ‌های ایمنی مناسب باشد که این عدم دسترسی موجب کاهش جمعیت سلول‌های ایمنی و در نتیجه کاهش وزن این اندام شده است. Cantorna و همکاران در سال ۲۰۰۴ بیان کردند که میزان و قابلیت دسترسی کلسیم جیره از فاکتورهای مهم تأثیرگذار بر پاسخ ایمنی و در نتیجه وزن طحال است. استفاده از سطوح بالای کلسیتریول توسط Chou و همکاران در سال ۲۰۰۹ منجر به افزایش طول پرزهای دئودنوم در ۲۱ و ۲۸ روزگی و پرزهای ژژونوم در ۱۴ و ۲۸ روزگی گردید. آن‌ها از سطوح ۳۴/۵ و ۶۹ میکروگرم در هر کیلوگرم جیره‌ی جوجه‌های گوشتی مازاد بر سطح ویتامین D₃ جیره (3000 IU/kg) استفاده کردند که ۷۰ تا ۱۴۰ برابر بیشتر از سطح مورد استفاده در این آزمایش است. Spielvogel و همکاران در سال ۱۹۷۲ با تزریق میزان‌های فیزیولوژیک کوله‌ی کلسیفرول، افزایش ۳۰ درصدی طول پرزهای روده در جوجه را مشاهده کردند. با توجه به گزارش‌های پیشین مبنی بر استفاده از کلسیتریول در جیره‌ی طیور، به نظر می‌رسد در این آزمایش‌ها سطوح کلسیتریول مکمل شده به عنوان مکمل مازاد بر احتیاجات ویتامین D جیره، کم‌تر از سطوح مورد نیاز برای تغییر در بافت روده‌ی کوچک به خصوص پارامترهای هضمی از قبیل طول پرزها باشد. اثر متقابل میان پنیر باد و کلسیتریول بر نسبت طول پرز به عمق کریپت نشان داد مکمل‌سازی ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پنیر باد، در سطح ثابت ۰/۵ میکروگرم کلسیتریول و صرف نظر از سطح کلسیم جیره موجب افزایش معنی-دار نسبت طول پرز به عمق کریپت در مقایسه با جیره‌ی فاقد پنیر باد می‌گردد (۵/۰۹۲ و ۵/۰۵۲ در مقابل ۳/۷۸۱). عمق کریپت در روده به خصوص در ژژنوم شاخصه‌ای از بلوغ و ظرفیت هضمی روده می‌باشد لذا بهبود ظرفیت روده و دستگاه گوارش موردی مهم در عملکرد جوجه-های گوشتی است (Uni and Ferket 2004). در فرآیند

اثر متقابل معنی‌دار بین جیره و کلسیتریول بر پاسخ ایمونوگلوبولین G در تست اولیه نشان داد که صرف نظر از سطح عصاره‌ی هیدروالکلی میوه‌ی پنیرباد در شرایط عدم مکمل‌سازی کلسیتریول یعنی سطح صفر میلی‌گرم در کیلوگرم کلسیتریول بیش‌ترین پاسخ ایمونوگلوبولین G در پرنده‌گانی رخ می‌دهد که از جیره‌ی کنترل منفی در مقایسه با کنترل مثبت تغذیه کرده باشند (۲/۲ در مقایسه با ۱/۲۰، P<۰/۰۵). کاهش ۳۰ درصدی سطح کلسیم جیره در این آزمایش علی‌رغم گزارش‌های متعدد بر نقش کلسیم در فعال‌سازی و بلوغ لنفوسیت‌ها (بریج و همکاران ۲۰۰۳، فسک ۲۰۰۷)، نوتروفیل‌ها، تولید سیتوکین، بیان رسپتور سیتوکین (Kimura et al. 1999) افزایش بیان mRNA ژن‌های اینترلوکین ۲، سنتز پروتئین اینترلوکین ۲ (McCrady et al. 1978) و در نتیجه تحریک تولید آنتی‌بادی و پاسخ سیستم ایمنی (Cantorna et al. 2004)، هیچ‌گونه تأثیر معنی‌داری بر تیتراژ آنتی‌بادی در مقایسه با جیره‌ی استاندارد نداشت. ویتافرین A و ویتانولید E موجود در عصاره‌ی ریشه و میوه‌ی پنیرباد اثرات ویژه‌ای بر لنفوسیت‌های B و T انسان و همچنین تکثیر سلول‌های تیموس موش دارد (Shohat et al. 1978). کوآگولین H موجود در عصاره‌ی میوه نیز اثرات مهمی در تکثیر لنفوسیت و تولید سیتوکین Th1 دارد. این نوع سیتوکین نیز به نوبه‌ی خود باعث کنترل تکثیر و تمایز سلول‌های مؤثر در پاسخ ایمنی می‌شود (Mesaik et al. 2006). طحال از اندام‌های لنفوئیدی ثانویه‌ی بدن است که در توسعه و تمایز لنفوسیت‌های B و T نقشی مهم دارد (Eerola et al. 1987, Toivanen et al. 1987). طحال از مناطق اصلی تولید آنتی‌بادی در بدن در مقابل هر گونه آنتی‌ژن می‌باشد و افزایش وزن آن نشانه‌ی افزایش جمعیت سلولی و تولید سلول‌های ایمنی می‌باشد (White et al. 1975). کاهش وزن طحال در گروه تغذیه شده با جیره‌های کنترل منفی ممکن است به دلیل کاهش

پنیر باد موجب بروز اثرات تخریبی در پرزها گردید. ارتباط اثرات نامطلوب مکمل سازی ۲۰۰ میلی گرم عصاره-ی هیدروالکلی پنیر باد با آنزیم های کاتالیز کننده ی پوترسین از جمله اورنیتین دکربوکسیلاز و اسپرمیدین ان استیل ترانسفراز، به آزمایش های کامل و دقیق تری نیاز دارد.

کاهش سطح کلسیم جیره و مکمل سازی عصاره ی پنیر باد و کلسیتریول اثر قابل ملاحظه ای بر عیار آنتی بادی ضد SRBC و همچنین پاسخ ایمنی سلولی نداشتند اما جیره ی کنترل منفی موجب کاهش وزن نسبی طحال در مقایسه با جیره ی کنترل مثبت و مکمل سازی عصاره ی پنیر باد در سطح ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم منجر به افزایش معنی دار وزن تیموس گردید. به نظر می رسد در این آزمایش ها سطوح کلسیتریول مکمل شده به عنوان مکمل مازاد بر احتیاجات ویتامین D جیره، کم تر از سطوح مورد نیاز برای تغییر در بافت روده ی کوچک به خصوص پارامترهای هضمی از قبیل طول پرزها باشد.

تکامل روده، توسعه کریپت مرحله ای مهم می باشد (Uni et al. 2000). نسبت طول پرز به عمق کریپت نیز شاخصی مفید برای تخمین ظرفیت هضمی روده ی کوچک است (Montagne et al. 2003). کاهش در نسبت طول پرز به عمق کریپت تأثیر منفی قابل ملاحظه ای در هضم و جذب دارد (Kelly et al. 1991). پوترسین از پلی آمین های مهم در تکثیر و تمایز سلول است که در سلول های پرز عمدتاً از اسپرمیدین تشکیل می شود. سرعت تخریب و بازسازی سلولی در سلول های اپی تلیال روده بسیار بالا است. در سلول های کریپت پلی آمین ها (پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین) به طور متوالی از اورنیتین ساخته می شوند که آنزیم های کاتالیز کننده ی این واکنش ها اورنیتین دکربوکسیلاز و اسپرمیدین ان استیل ترانسفراز در غشای مخاطی پرز است (Shinki et al. 1985). مطالعات اندکی به اثرات سمی سطوح بالای عصاره ی پنیر باد و مکانیزم های آن پرداخته اند. با این وجود مکمل سازی ۲۰۰ میلی گرم عصاره ی هیدروالکلی

منابع

- Aslam, S.M.; Garlich, J.D. and Qureshi, M.A. (1998). Vitamin D deficiency alters the immune responses of broiler chicks. *Poultry Science*, 77(6): 842-849.
- Beal, R.K.; Wigley P.; Powers, C.; Hulme, S.D.; Barrow, P.A. and Smith, A.L. (2004). Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 100: 151-164.
- Berridge, M.J.; Bootman, M.D. and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4: 517-529.
- Boa-Amponsem, K.; Price, S.E.H.; Dunnington, E.A. and Siegel, P.B. (2001). Effect of route of inoculation on humoral immune response of white leghorn chickens selected for high or low antibody response to sheep red blood cells. *Journal of Poultry Science*, 80:1073-1078.
- Cantorna, M.T.; Zhu, Y.; Froicu, M. and Wittke, A. (2004). Vitamin D status, 1, 25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80 (6 Suppl): 1717S-1720S.
- Chou, S.H.; Chung, T.K. and Yu, B. (2009). Effects of supplemental 25-hydroxycholecalciferol on growth performance, small intestinal morphology, and immune response of broiler chickens. *Poultry Science*, 88: 2333-2341.
- Davis, L. and Kuttan, G. (1998). Suppressive effect of cyclophosphamide-induced toxicity by *Withania somnifera* extract in mice. *Journal of Ethno pharmacology*, 62: 209-214.
- Eerola, E.; Veromaa, T. and Toivanen, P. (1987). Special features in the structural organization of the avian lymphoid system. *Avian Immunology: Basis and Practice*. A.Toivanen and P. Toivanen, ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, P: 9-22.
- Feske, S. (2007). Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 7: 690-702.

- Jaiswal, D.; Rai, P.K. and Watal, G. (2009). Antidiabetic effect of *Withania coagulans* in experimental rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 24 (1): 88-93.
- Kelly, D.; Smyth, J.A. and McCracken, K.J. (1991). Digestive development of the early-weaned pig. 1. Effect of continuous nutrient supply on the development of the digestive tract and on changes in digestive enzyme activity during the 1st week postweaning. *British Journal of Nutrition*. 65: 169-180.
- Kenney, A.D. (1976). Vitamin D metabolism: Physiological regulation in egg-laying Japanese quail. *American Journal of Physiology*, 230: 1606-1616.
- Khodaei, M.; Jafari, M. and Noori, M. (2012). Remedial use of withanolides from *withania coagulans* (Stocks) dunal. *Advances in Life Sciences*, 2(1): 6-19.
- Kimura, K.; Goff, J.P. and Kehrl, M.E., Jr. (1999). Effects of the presence of the mammary gland on expression of neutrophil adhesion molecules and myeloperoxidase activity in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82: 2385-2392.
- McCrary, C.W.; Ely, C.M.; Westin, E. and Carchman, R.A. (1988). Coordination and reversibility of signals for proliferative activation and interleukin-2 mRNA production in resting human T lymphocytes by phorbol ester and calcium ionophore. *The Journal of Biological Chemistry*, 263: 37-44.
- Mesaik, M.A.; Haq, Zu.; Murad, S.; Ismail, Z.; Abdullah, N.R.; Gill, H.K. et al. (2006). Biological and molecular docking studies on coagulin-H, Human IL-2 novel natural inhibitor. *Molecular Immunology*, 43: 1855-1863.
- Montagne, L.; Pluske, J.R. and Hampson, D.J. (2003). A review of interactions between dietary fiber and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Science and Technology*, 108: 95-117.
- Nagareddy, P.R. and Lakshmana, M. (2006). *Withania somnifera* improves bone calcification in calcium-deficient ovariectomized rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58: 513-519.
- Negulescu, P.A.; Shastri, N. and Cahalan, M.D. (1994). Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91 (7): 2873-2877.
- Prasad, S.K.; Kumar, R.; Patel, D.K. and Hemalatha, S. (2010). Wound healing activity of *Withania coagulans* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmaceutical Biology*, 48: 1397-1404.
- Reddy, G.S. and Tserng, K.Y. (1989). Calcitric acid, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ through C-24 oxidation pathway. *Biochemistry*, 28: 1763-1769.
- Satoh, E.; Edamatsu, H. and Omata, Y. (2006). Acute restraint stress enhances calcium mobilization and proliferative response in splenic lymphocytes from mice. *Stress*, 9: 223-230.
- Sei, Y.; McIntyre, T.; Skolnick, P. and Arora, P.K. (1991). Stress modulates calcium mobilization in immune cells. *Life Science*, 49: 671-676.
- Shinki, T.; Tanaka, H.; Takito, J.; Yamaguchi, A.; Nakamura, Y.; Yoshiki, S. and Suda, T. (1991). Putrescine is involved in the vitamin D action in chick intestine. *Gastroenterology*, 100: 113-122.
- Shinki, T.; Takahashi, N.; Kadofuku, T.; Sato, T. and Suda T. (1985). Induction of spermidine N1-acetyltransferase by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ as an early common event in the target tissues of vitamin D. *The Journal of Biological Chemistry*, 260: 2185-2190.
- Shohat, B.; Kirson, I. and Lavie, D. (1978). Immunosuppressive activity of two plant steroidal lactones withaferin A and wi-thanolide E. *Biomedicine*, 28: 18-24.
- Soares, J.H.Jr. (1984). Calcium metabolism and its control-a review. *Poultry Science*, 63: 2075-2083.
- Spielvogel, A.M.; Farley, R.D. and Norman, A.W. (1972). Studies on the mechanism of action of calciferol. V. Turnover time of chick intestinal epithelial cells in relation to the intestinal action of vitamin D. *Experimental Cell Research*, 74: 359-366.
- Thompson D.L.; Elgert K.D.; Gros, W.B. and Siegel, P.B. (1980). Cell mediated immunity in marek's disease virus infected chickens genetically selection for high and low concentrations of plasma corticosterone. *American Journal of Veterinary Research*. 41: 91-96.
- Toivanen, P.; Naukkarinen, A. and Vainio, O. (1987). What is the function of bursa of Faricius, in: *Avian Immunology: Basis and Practice*. A. Toivanen and P. Toivanen, ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. Pages, 79-100.

- Uni, Z. and Ferket, P.R. (2004). Methods for early nutrition and their potential. *World Poultry Science Journal*, 60: 101-111.
- Uni, Z.; Geyra, A.; Ben-Hur, H. and Sklan, D. (2000). Small intestinal development in the young chick: crypt formation and enterocyte proliferation and migration. *British Poultry Science*, 41(5): 544-551.
- White, R.G.; Henderson, D.C.; Eslami, M.B. and Neilsen, K. H. (1975). Localization of a protein antigen in the chicken spleen. Effect of various manipulative procedures on the morphogenesis of the germinal centre. *Immunology*, 28: 1-21.
- Yamauchi, K.; Buwjoom, T.; Koge, K. and Ebashi, T. (2006). Histological alterations of the intestinal villi and epithelial cells in chickens fed dietary sugar cane extract. *British Poultry Science*, 47: 544-553.

The effects of dietary 1, 25-dihydroxycholecalciferol (calcitriol) and root hydroalcoholic extract of *Withania Coagulans* on immune response and small intestinal morphology of broiler chickens

Hosseini, S.J.¹; Mirakzehi, M.T.² and Saleh, H.²

Received: 13.05.2015

Accepted: 30.12.2015

Abstract

This study was carried out to investigate the effects of 1, 25-dihydroxycholecalciferol (1, 25 (OH)₂ D₃) (calcitriol) and fruit hydroalcoholic extract of *Withania coagulans* (WC) on immune response and small intestinal morphology of broiler chickens. Treatments were arranged factorially (2×3×2) consisted of a positive control with adequate Ca and a negative control diet (Ca level reduced by 30%), three levels of WC (0, 100 and 200 mg/kg diet), and two levels of 1, 25 (OH)₂ D₃ (0 and 0.5 µg/kg diet). Six hundred male day old Ross 308 broiler chicks were randomly distributed into 60 floor pens, 10 birds each. Each treatment was replicated 5 times (50 birds). Each diet was fed *ad libitum* to chicks from day one to 42 d of age. Sheep red blood cells (SRBC) test was used as measure of humoral immunity. So, at 25 and 32 days of age chicks were injected to evaluate the primary and secondary antibody response. At 37 days of age, the cutaneous basophil hypersensitivity (CBH) test was used to evaluate cell-mediated immune response. On d 21 and 42, one bird per replicate was killed to determine small intestinal morphology and lymphoid organ weights. The results of humoral immune response showed that reduction of dietary Ca level by 30% and supplementation of WC did not significantly influence total antibody levels. The CBH response showed that supplementation of WC and calcitriol had no significant effect on interdigital skin thickness. At 42 d of age, the weight of spleen significantly reduced by feeding of negative control diet. Also, supplementation of WC at 200 mg/kg significantly increased the weight of thymus at this age. It was found that supplementation of WC at 200 mg/kg resulted in shorter villus length at 42 d of age. It seemed that level of calcitriol which used in current experiment is lower than those required for alteration of intestine morphological and immunological parameters.

Key words: Calcitriol, *Withania coagulans*, Immune response, Intestine morphology, Broiler chickens

1- PhD Graduated of Poultry Nutrition, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- Assistant Professor, Department of Animal Science, Higher Educational Complex of Saravan, Iran

Corresponding Author: Mirakzehi, M.T., E-mail: mt_mirakzehi@yahoo.com