بررسی اثر برخی از محرک‌های ایمنی بر سیستم ایمنی سلولی و وزن ارگان‌های جوجه‌های گوشتی

سید ناصر خالقی میران[1]، دکتر محمد امیر کریمی ترشیزی[2]، دکتر محمد رضا باسامی[3]، جمشید رجنی[1]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس ۲- عضو هیأت علمی دانشگاه تربیت مدرس ۳- عضو هیأت علمی دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

به منظور بررسی اثر سه ترکیب شامل سرخارگل، ویتامین E و لوامیزول بر سیستم ایمنی سلولی و ارگان‌های لنفاوی جوجه‌های گوشتی، آزمایشی با ۲۰۰ قطعه جوجه گوشتی نر یک روزه راس در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تیمار، ۵ تکرار و ۱۰ قطعه جوجه در هر تکرار طراحی و انجام شد. گروه-های آزمایشی شامل ویتامین E به میزان ppm ۱۵۰ در جیره غذایی، عصاره گیاهی سرخارگل به میزان ۱ در هزار و لوامیزول به میزان ppm ۱۵ به صورت محلول در آب و گروه کنترل بود. برای ارزیابی ایمنی سلولی از دی نیتروکلروبنزن در روزهای ۳۱ و ٤۲ دوره پرورش و فیتوهماگلوتنین در ٤۲روزگی استفاده شد. در ٤۲ روزگی از هر تکرار یک پرنده کشتار و وزن بورس فابریسیوس، طحال وتیموس ثبت شد. نتایج مربوط به ارزیابی ایمنی سلولی درپاسخ پوست به فیتوهماگلوتنین (PHA) و دی نیتروکلروبنزن (DNCB) در ٤۲ روزگی اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد بیشترین پاسخ در مورد فیتوهماگلوتنین و دی نیتروکلروبنزن به ترتیب مربوط به لوامیزول و ویتامین E و کمترین آن در هر دو مربوط به گروه شاهد بود. اما پاسخ پوست به دی نیتروکلروبنزن در ۳۱ روزگی دارای اختلاف معنی‌دار است و بیشترین پاسخ مربوط به ویتامین E و کمترین آن مربوط به سرخارگل بود. نتایج مربوط به وزن ارگان‌های لنفاوی نشان داد که تیمارهای آزمایشی اثر معنی‌داری بر آنها ندارد.

واژه‌های کلیدی: **جوجه گوشتی، سیستم ایمنی، سرخارگل، لوامیزول، ویتامین E.**

مقدمه

امروزه پرورش طیور به عنوان یکی از بزرگترین منابع تأمین پروتئین حیوانی جای خود را در جهان باز کرده است .صنعت طیور علاوه بر تأمین اسیدهای آمینهٔ ضروری از نظر اقتصادی نیز به دلیل برگشت سریع سرمایه و ضریب تبدیل غذایی خوب نسبت به دیگر حیوانات اهلی از اهمیت خاصی برخوردار است . در تولید تجاری طیور هر گونه اختلال در سلامت پرنده، تأثیر مهمی بر راحتی حیوان و بازده اقتصادی آن خواهد داشت. در پرورش طیور بهبود سیستم ایمنی به خاطر جلوگیری از بیماری‌های عفونی بسیار مهم است. فاکتورهای مختلف می‌توانند باعث نقص ایمنی شوند مانند: شکست واکسیناسیون، عفونی شدن به وسیله بیماری‌های تضعیف کننده سیستم ایمنی، و استعمال نادرست آنتی بیوتیک‌ها. مصرف محرک‌های ایمنی یک راه حل بهبود ایمنی حیوانات و کاهش حساسیت آنها به بیماری‌های عفونی است (Liu, 1999).

لوامیزول

لوامیزول هیدروکلراید دارویی با دو نوع فعالیت کلینیکی می‌باشد. این دارو به عنوان ضد انگل در پزشکی و دامپزشکی استفاده می-شود علاوه بر این به طور فزاینده‌ای به عنوان یک داروی محرک ایمنی استفاده می‌شود. چند صد مقاله در مورد اثر لوامیزول به عنوان یک محرک ایمنی منتشر شده است، که افزایش در سلول‌های T و فعالیت ماکروفاژی را نشان داده است (Symoens and Rosenthal, 1977).

در انسان لوامیزول برای درمان ٤ کلاس اصلی از بیماری با موفقیت متفاوت استفاده شده است: (۱) شرایط آنرژیک (۲) شرایط عفونی شامل آلودگی با هرپس ویروس‌ها (۳) بیماری‌های نئوپلاستیک و (٤) بیماری‌های شبه روماتیسمی.

ساپی وهمکاران (۱۹۷۹) یافتند که لوامیزول پاسخ لنفوسیت‌های جوجه‌ها را نسبت به فیتوهماگلوتنین و کونکاناوالین-A را افـزایش داد و پاسخ‌های آنتی بادی نسبت به آنتی ژن وابسته به تیموس را افزایش داد.

میزان ۰/۲۵ mg/kg لوامیزول به طور معنی‌داری هم پاسخ‌های فیتوهماگلوتنین و هم کونکاناوالینA و لنفوسیت‌هـای جوجـه‌هـا را افزایش داد، میزان ۲/۵ mg/kg فقط موجب افزایش پاسخ‌های فیتوهماگلوتنین شد. یافته‌های اخیر پیشنهاد می‌کند کـه غلظـت‌هـای متفاوت لوامیزول ممکن است جمعیـت‌هـای مختلـف سـلول‌هـای لنفوئیـدی را تحـت تـأثیر قـرار دهـد زیـرا فیتوهمـاگلوتنین و کونکاناوالینA نشان داده که به طور جزئی جمعیت‌های مختلف سلول لنفوئیدی را تحریـک مـی‌کنـد (Stobo and Paul, 1972; Jacobsson and Blomgren, 1974).

سرخارگل

با نام علمی(*Echinacea purpurea*) گیاهی علفی و چند ساله است. در سال ۱۹۰۰ مهمترین گیاه ضدباکتریایی و ضدویروسی بوده که استفاده می‌شده اما با ورود داروهای سولفانامیدها استفاده از آن به سرعت کاهش یافت (Tyler, 1994). عصاره الکلی ریشه سرخارگل باعث بهبود ایمنی غیراختصاصی شامل افزایش فعالیت ماکروفاژها، فعال کردن فاگوسیت‌ها و فعال کردن سلول‌های کشنده طبیعی (NK) شده است. این اثرات در حیوانات آزمایشگاهی اثبات شده است (Coeugniet and Elek, 1987; Bauer, 1996). پلی‌ساکاریدهای خالص شده از سرخارگل فعالیت ماکروفاژها را تحریک کرده و باعث افزایش فعالیت فاگوسیت‌ها در موش‌های آزمایشگاهی شده است (Luetting *et al*., 1989; Stimpel *et al*., 1984). این گیاه ترشح عامل نکروزه کننده تومورها (TNF) و اینترلوکین۱ ، ٦ و ۱۰ را به خوبی افزایش می‌دهد (Burger *et al*., 1997). پلی‌ساکاریدهای سرخارگل مقاومت موش‌ها به عفونت *Candida albicans* و لیستریا مونوسیتوژنز را افزایش داد (Tyler, 1994). همچنین مکمل سرخارگل تعداد سلول‌های کشنده طبیعی (NK) را در موش‌ها افزایش داده و مدت زنده ماندن را در موش‌های درمان شده نیز بهبود داده است (Currier and Miller, 2001). فعالیت ضدالتهابی نیز در سرخارگل دیده شده است (Raso *et al*., 2002; Clifford *et al*., 2002).

در مطالعه‌ای دیگر گزارش شد که پلی‌ساکاریدها به طور معنی‌داری غلظت کلسیم سرم را افزایش دادند. کلسیم نیز یک تنظیم کننده مهم فعالیت لنفوسیت‌ها است که سیگنال‌های لنفوسیت را هدایت کرده و تکثیر لنفوسیت‌ها را بهبـود مـی‌دهـد (Imboden *et al*., 1985). افزایش کلسیم تا حدودی بر تعدیل ایمنی جوجه‌های گوشتی اثر دارد. دریک مطالعه آزمایشگاهی آلکیل آمیدهای استخراج شده از سرخارگل فعالیت آنزیم‌های ۵ – لیپوکسی‌ژناز و سیکلواکسی‌ژناز که آنزیم‌های کلیدی برای سنتز پروستاگلاندین‌هـا هسـتند را مهار می‌کنند. پروستاگلاندین‌ها باعث مهار فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (NK) مـی‌شـوند (Dussault and Miller, 1993; Muller-Jakic *et al*., 1994).

ویتامین E

از طریق تحریک فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز نوتروفیل‌ها و ماکروفاژهای سیستم خون، سیستم ایمنی را تقویت می‌کند و همچنین باعث تحریک فعالیت لنفوسیت‌های T می شود. افزایش فعالیت فاگوسیتوزی و افزایش تولید آنتی بادی بر ضد چندین آنتی‌ژن نیز در جوجه‌هایی که ویتامین E دریافت کرده بودند گزارش شده است. ارف و همکاران (۱۹۹۸) پیشنهاد کردند که تغذیه ۹۰ واحد ویتامین E در کیلوگرم جیره تمایز سلول‌های T در تیموس را تحت تاثیر قرار داده و همچنین باعث افزایش شمار

ماکروفاژها می‌شود. لشچنسکی و کلاسینگ (۲۰۰۱) مشاهده کرد که با افزایش ویتامین E از سطح ۰ تا ۵۰ واحد میزان ازدیاد لنفوسیت‌ها افزایش می‌یابد، ولی برای سطوح بالاتر از ۵۰ واحد مشاهده نشد، این محققان نتیجه گرفتند که اضافه کردن ویتامین E در سطوح بیش از آنچه که برای رشد بهینه لازم است برای بهبود سیستم ایمنی می‌تواند مفید باشد. ولی سطوح خیلی بالایی از آن اثر ممانعتی برای تکثیر سلول‌هایT دارد (Cook, 1991).

پاسخ مربوط به التهاب نیز تحت تأثیر ویتامین E قرار می‌گیرد، این پاسخ بیشتر وابسته به هتروفیل‌ها و ماکروفاژها که جزء اولین خط دفاعی بدن است، می‌باشد (Klasing, 1997). واسطه اصلی التهاب سیتوکنین‌ها، اینترلوکین I و اینتر لوکینII می‌باشند که باعث فعال کردن ماکروفاژها می‌شود. با افزایش ویتامین E مقدار هتروفیل تولیدی کاهش می‌یابد که علت آن احتمالا مربوط به نقش ویتامین E در کاهش اینترلوکین I می‌باشد (Devaraj, 1996).

مواد و روش ها

در این بررسی تعداد ۲۰۰ قطعه جوجه گوشتی نر یک روزه راس در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تیمار، ۵ تکرار و ۱۰ قطعه جوجه در هر تکرار انجام گرفت. گروه‌های آزمایشی شامل ویتامین E به میزان ppm ۱۵۰ در جیره غذایی، عصاره گیاهی سرخارگل به میزان ۱ درهزار و لوامیزول به میزان ppm ۱۵ به صورت محلول در آب و گروه کنترل بود. به منظور ارزیابی ایمنی سلولی در سن ۳۱ و ٤۲ روزگی، ۲ پرنده از هر پن پس از علامت‌گذاری با رنگ‌های مختلف، بوسیله چالش پوست با ۰/۲۵ میلی لیتر دی نیتروکلروبنزن (حاوی ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر DNCB برای ۳۱ روزگی و ۱ میلی گرم در میلی لیتر DNCB برای ٤۲ روزگی) چالش داده شد. از نسبت ٤:۱ استون و روغن زیتون به عنوان حلال استفاده شد. روش کار به این صورت بود که یک ناحیه نسبتا بدون پر با مساحت تقریبی cm^2 ۱۰ در طرف راست بدن برای چالش با DNCB انتخاب شد. به منظور بررسی میزان واکنش، ضخامت پوست پیش از چالش و ٢٤ ساعت پس از چالش اندازه‌گیری شد. میانگین افزایش ضخامت پوست در هر پرنده از اختلاف ضخامت قبل و بعد از هر چالش بدست آمد. هر عدد اندازه‌گیری شده میانگینی از سه تکرار از ناحیه مورد نظر بوده و به عنوان میانگین هر پرنده درون هرپن آزمایشی در نظر گرفته شد.

$$\text{درصد افزایش ضخامت} = \frac{\text{ضخامت پوست قبل از چالش} - \text{ضخامت پوست بعد از چالش}}{\text{ضخامت پوست قبل از چالش}} \times ۱۰۰$$

فیتو هماگلوتنین با اتصال به T-Cell ها به طور غیر مستقیم باعث تحریک آنها می‌شود و همچنین باعث حساسیت شدید بازوفیل-های پوستی می‌شود که باعث پاسخ تورمی به فیتو هماگلوتنین می‌شود. در روز ٤۲ دوره پرورش از هر پن ۲ پرنده به طور تصادفی انتخاب و با رنگ‌های مختلف علامت‌گذاری شد. پرده انگشت سوم پای راست هر پرنده قبل از تزریق اندازه‌گیری و سپس مقدار ۰/۱ میلی لیتر از محلول فیتوهماگلوتینین به صورت جلدی در آن تزریق شد. ٢٤ ساعت پس از تزریق، ضخامت محل تزریق شده

اندازه‌گیری شد و 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.

$$\text{درصد افزایش ضخامت} = \frac{\text{ضخامت پوست قبل از تزریق} - \text{ضخامت پوست بعد از } \textbf{تزریق}}{\text{ضخامت پوست قبل از تزریق}} \times ۱۰۰$$

به منظور تعیین وزن ارگان‌های لنفاوی در ٤٢ روزگی از هر تکرار یک پرنده کشتار و وزن بورس فابریسیوس، طحال وتیموس ثبت شد. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 مورد تجزیه و تحلیل گرفتند. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون LSD در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد انجام گرفت.

نتایج

نتایج مربوط به اثر تیمارهای آزمایشی بر پاسخ ایمنی سلولی در جدول ۱ و اثر آنها بر وزن ارگان‌های لنفاوی در جدول ۲ ارائه شده است. براساس نتایج به دست آمده ارزیابی ایمنی سلولی درپاسخ پوست به فیتوهماگلوتنین و دی نیتروکلروبنزن در ٤٢ روزگی اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد، بیشترین پاسخ در مورد فیتوهماگلوتنین و دی نیتروکلروبنزن در ٤٢ روزگی به ترتیب مربوط به لوامیزول و ویتامین E و کمترین آن در هر دو مربوط به گروه شاهد بود. اما پاسخ پوست به دی نیتروکلروبنزن در ۳۱ روزگی دارای اختلاف معنی‌دار است ($p<۰/۰۱$) **و بیشترین پاسخ مربوط به ویتامین E و کمترین آن مربوط به سرخارگل بود.** نتایج مربوط به وزن ارگان‌های لنفاوی نشان داد که تیمارهای آزمایشی اثر معنی‌داری بر آنها ندارد.

جدول ۱- اثر تیمارهای آزمایشی بر پاسخ ایمنی سلولی

تیمارهای آزمایشی	پاسخ پوست به فیتوهماگلوتنین (درصد افزایش)	پاسخ پوست به DNCB در ۳۱ روزگی (درصد افزایش)	پاسخ پوست به DNCB در ٤٢روزگی(درصد افزایش)
شاهد	۰/٤۹	۱/۹۵[a]	۰/۷۱
سرخارگل	۰/۵۸	۱/٦۰[b]	۰/۷۷
لوامیزول	۰/٦۷	۱/۸٦[a]	۰/۸٤
ویتامین E	۰/۵۸	۲/۰٤[a]	۰/۸۹
SEM	۰/۰۲۲	۰/۰۵۳	۰/۰٤۸
P-value	۰/۲۵۳	۰/۰۱۰	۰/٦۰۱

ab حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد.

جدول ۲ – اثر تیمارهای آزمایشی بر وزن ارگان‌های لنفاوی

تیمارهای آزمایشی	وزن نسبی تیموس (گرم در ۱۰۰ گرم وزن بدن)	وزن نسبی طحال (گرم در ۱۰۰ گرم وزن بدن)	وزن نسبی بورس (گرم در ۱۰۰ گرم وزن بدن)
شاهد	۰/۷٤	۰/۹٤	۰/٤۳
سرخارگل	۰/٥٤	۱/۰۷	۰/٤٦
لوامیزول	۰/٦۱	۰/۸۳	۰/٥٥
ویتامین E	۰/٥۷	۰/۷۸	۰/٥۳
SEM	۰/۰٤۷	۰/۰٥۸	۰/۰۳٦
P-value	۰/٥۰۷	۰/۳۲٤	۰/٦۱۷

ab حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد.

نتیجه‌گیری و بحث

با توجه به افزایش پاسخ پوست به فیتوهماگلوتنین نسبت به شاهد می‌توان گفت که تیمارهای آزمایشی بر ایمنی سلولی از طریق تحریک تولید سلول‌های لنفاوی مختلف تأثیر دارند که با گزارشات ساپی و همکاران (۱۹۷۹)، امبادن و همکاران (۱۹۸٥) و ارف و همکاران (۱۹۹۸) مطابقت دارد. هر چند در این مورد هیچ نظمی در روند داده‌ها وجود ندارد و توجیه این نتایج بسیار مشکل و تقریباً امکان ناپذیر می‌باشد و احتمالاً این روش‌ها برای سنجش سیستم ایمنی مناسب نمی‌باشد و از ماده دی نیتروکلروبنزن در آزمایش ورما و همکاران (۲۰۰٤)، اساساً برای بررسی کارایی سیستم ایمنی سلولی در آزمایش بر روی دان آلوده استفاده شد. تیمارهای آزمایشی از نظر آماری اثر معنی‌داری بر وزن نسبی تیموس طحال و بورس نداشته است و در بین محرک‌های ایمنی به کار رفته در این آزمایش ویتامین E و لوامیزول بیشترین تأثیر را بر پاسخ ایمنی سلولی (تحزیک لنفوسیت‌ها) داشت.

پیشنهادها

به علت متفاوت بودن ترکیبات مورد استفاده در این تحقیق و تغییر در میزان اثرگذاری آنها با سطوح متفاوت، استفاده از دیگر ترکیبات و منابع و سطوح مختلف این افزودینها توصیه می شود. سویه حیوان، جنسیت، زمان وشیوه مصرف به صورت محلول در آب یا افزودن در خوراک فاکتورهایی هستند که اثر این افزودنی‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. همچنین روش ارزیابی سیستم ایمنی بر نتایج حاصله مؤثر بوده و بنابراین پیشنهاد می‌شود این موارد در آزمایشات بعدی در نظر گرفته شود.

منابع

1- Bauer, R. (1996). *Echinacea* drugs-effects and active ingredients. Zeitschrift fur Arztliche Fortbildung (Jena), 90(2): 111-115.

2- Burger, R. A., Torres, A. R., Warren, R. P., Caldwell, V. D. and Hughes, B. G. (1997) *Echinacea*-induced cytokine production by human macrophages. International Journal of Immunopharmacology, 19(7): 371-379.

3- Clifford, L. J., Nair, M. G., Rana, J. and Dewitt, D. L. (2002). Bioactivity of alkamides isolated from *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Phytomedicine. 9(3): 249-253.
4- Coeugniet, E. G. and Elek, E. (1987). Immunomodulation with *Viscum album* and *echinacea purpurea* extracts. Onkologie, 3: 27-33.
5- Cook, M. E., (1991). Nutrition and the immune response to the domestic fowl. Crit. Rev. Poult. Biol, 3: 167–189.
6- Currier, N. L. and Miller, S. C. (2001). *Echinacea purpurea* and melatonin augment natural-killer cells in leukemic mice and prolong life span. Journal Alternative Complementary Medicine, **7**(3): 241-251.
7- Devaraj, S., Li, D. and Jialal, I. (1996). The effects of alpha tocopherol supplementation on monocyte function. Journal of Clinical Investigation. 98: 756–763.
8- Dussault, I. and Miller, S. C. (1993). Stimulation of Natural Killer Cell Numbers but not function in Leukemic infant mice: a systeme primed in infancy allows survival in adulthood. Nature Immunology, 12:66-78.
9- Erf, G.F., Bottje, W.G., Bersi, T.K., Headrik, M.D. and Fritts, C.A. (1998). Effects of dietary vitamin E on the immune system in broilers: altered proportions of CD4T cells in the thymus and spleed. Poultry Science. **77**: 529-537.
10- Imboden, J. B., Weiss, A. and Stobo, J. D. (1985). The antigen receptor on a human T cell line initiates activation by increasing cytoplasmic free calcium. The Journal of Immunology, 134: 663–665.
11- Jacobsson, H. and Blomgen, H. (1974). Response of mouse thimic cells to mitogens. A comparison between phytohemagglutinin and concanavalin A. Cellular Immunology, 11: 427.
12- Klasing, K. C. (1997). Interaction between nutrition and infectious disease. Pages 73–80 in: Diseases of Poultry, B. W. Calnek, ed. Iowa State University Press, Ames, IA.
13- 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.
14- Liu, X. Y. (1999). Stress and Immunity. T. B. Yin, ed. China Agriculture Press, Beijing, China. Pages 230–252 in Poultry Immunology.
15- Luettig, B., Steinmuller, C., Gifford, G.E., Wagner, H. and Lohmann- Matthes, M.L. (1989). Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. Journal of the National Cancer Institute, 81(9): 669-675.
16- Muller-Jakic, B. Brew, W., Prostle, A., Redl, K., Greger, H. and Bauer, R. (1994). *In vitro* inhibition of cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase by alkamides from *Echinacea* and Achillea Species. Plant Medicine. 60(1): 37-40.
17- Raso, G.M., Pacilio, M., Di -Carlo, G., Esposito, E., Pinto, L. and Meli, R. (2002).*In vivo* and *in-vitro* anti-inflammatory effect of *Echinacea purpurea* and *Hypericum perforatum*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 54(10): 1379-1383.
18- Soppi, E., Lassila, O., Viljanen, M. K., Lehtonen, O. P. and Eskola, J. (1979). *In vitro* effect of levamisole on cellular and humoral immunity in normal chickens. Clinical and experimental Immunology, 38: 609-614.
19- Stimpel, M., Proksch, A., Wagner, H. and Lohmann-Matthes, M. L. (1984). Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea*. Infection and Immunity, 46(3): 845-849.
20- Stobo, J. D. and Paul, W. E. (1972). Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. II. Acquisition of mitogen responsiveness and of antigen during the ontogeny of thymocytes and T lymphocytes. Cellular Immunology, 4: 367.
21- Symoens, J. and Rosenthal, M. (1977). Levamisole in the modulation of the immune response: The current experimental and clinical state. J. Reticuloendothel. Soc. 21: 175.
22- Tyler, V. E. (1994). Phytomedicines in Western Europe: their potential impact on herbal medicine in the United States**.** HerbalGram, 30: 24-31.

23- Verma, J., Johri, T. S., Swain, B.K. and Ameena, S. (2004). Effect of graded levels of aflatoxin, ochratoxin and their combinations on the performance and immune response of broilers. British Poultry Science. 45: 512-518.