مجله علوم دامی ایران
دوره ۴۳، شماره ۳، ۱۳۹۱ (۳۰۵-۲۹۷)

تأثیر برنامه نوری بر پاسخ های ایمنی سلولی و همورال جوجه‌های گوشتی آرین

مرضیه رحمانی[۱]، محمد امیر کریمی ترشیزی[۲*] و رسول واعظ ترشیزی[۳]
۱، ۲، ۳، دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار دانشگاه تربیت مدرس
(تاریخ دریافت : ۹۰/۳/۲ – تاریخ تصویب: ۹۰/۱۲/۱۰)

چکیده

این طرح به منظور بررسی تأثیر انواع برنامه‌های نوری بر سیستم ایمنی همورال و سلولی جوجه‌های گوشتی انجام گرفت. در این آزمایش تأثیر چهار برنامه نوری شامل: نور دائم (متداول)، کاهش- افزایش ناگهانی، کاهش- افزایشی تدریجی و متناوب (۱ ساعت روشنایی: ۳ ساعت تاریکی)، بر ۳۲۰ قطعه جوجه خروس گوشتی (آرین ۳۸۶) بررسی شد. به منظور سنجش پاسخ ایمنی همورال از تزریق گلبول قرمز گوسفند (۱۴ و ۳۲ روزگی) و تلقیح واکسن نیوکاسل (۱۱روزگی) و جهت سنجش سیستم ایمنی سلولی از تماس ماده دی نیتروکلروبنزن با پوست پرنده استفاده شد. عیار پادتن کل علیه گلبول قرمز گوسفند در گروه افزایشی ناگهانی به طور معنی‌داری پایین‌تر از سایر گروه‌ها بود (P<۰/۰۵). در نوبت اول میزان عیار پادتن مقاوم به ۲-مرکاپتواتانل در گروه متناوب به طور معنی‌داری از گروه شاهد کمتر بود (P<۰/۰۵). در نوبت دوم عیار پادتن حساس به ۲مرکاپتواتانل گروه های افزایشی تدریجی و ناگهانی به طور معنی داری پایین‌تر از گروه های شاهد و متناوب بود (P<۰/۰۵). عیار پادتن علیه ویروس نیوکاسل در گروه افزایشی تدریجی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد و سایر گروه‌ها بود (P<۰/۰۵). در نوبت اول آغشته سازی پوست به دی نیتروکلروبنزن، تغییر ضخامت پوست در گروه متناوب و افزایشی تدریجی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۵). نسبت هتروفیل به لمفوسیت در گروه‌های متفاوت نسبت به شاهد به طور معنی‌داری پایین‌تر بود (P<۰/۰۵). وزن بورس در گروه افزایشی ناگهانی به طور معنی داری بیشتر از شاهد و سایر گروه‌ها بود (P<۰/۰۵). با توجه به نتایج، می‌توان گفت که برنامه های نوری بر پاسخ سیستم ایمنی جوجه های گوشتی موثرند و استفاده از برنامه نوری افزایشی تدریجی نسبت به سایر برنامه ها می تواند ضمن حفظ بازده تولید و کاهش مصرف انرژی، بر بهبود پاسخ های ایمنی همورال و سلولی موثر باشد.

واژه های کلیدی: **برنامه های نوری، جوجه گوشتی آرین، سیستم ایمنی همورال، سیستم ایمنی سلولی.**

مقدمه

سال‌های زیادی است که جوجه‌های گوشتی با مدیریت نور دائم و یا نزدیک به دائم پرورش می‌یابند این نوع پرورش، حداکثر مصرف غذا و سرعت رشد را به همراه داشته است. اما محققین نشان داده‌اند که استفاده از نور دائم سبب محروم شدن پرنده از خواب و در نتیجه

* نویسنده مسئول: محمد امیر کریمی ترشیزی تلفن: ۰۹۱۲۵۹۹۴۴۶۱ E-mail : karimitm@modares.ac.ir

باعث تنش شدید فیزیولوژیکی می‌شود (Campo and Davila, 2002; Kliger et al., 2000). نسبت هتروفیل به لمفوسیت با برنامه نوری روشنایی- تاریکی، کمتر از پرندگان پرورش یافته در روشنایی دائم بوده است. صرف نظر از نوع برنامه نوری، این نسبت در زمان تنش مشاهده می‌شود. بنابراین پیشنهاد شده است که بیشترین تنش در مقایسه با دوره نوری کوتاه یا بلند، در نور دائم است و این از اثرات نامطلوب روشنایی دائم بر پاسخ ایمنی می‌باشد (Moore and Siopes, 2000).

هورمون غده پینه‌ال یعنی ملاتونین می‌تواند به طور مستقیم و یا غیر مستقیم واسطه اثر دوره نوری بر عملکرد ایمنی باشد (Nelson et al., 1995). در سال های اخیر محققین ارتباط بین طول ساعات روشنایی محیط و برخی پارامترهای ایمنی پستانداران گزارش شده است. تحقیقات در پستانداران نشان داده است که هر دو سیستم ایمنی همورال و سلولی در حیوانات نگهداری شده در دوره نوری کوتاه در مقایسه با حیوانات نگهداری شده در دوره نوری طولانی افزایش یافته است (Demas and Nelson, 1996). تأثیر دوره‌های نوری مختلف بر پاسخ ایمنی از طریق تغییر مقدار ملاتونین ترشحی می‌باشد (Nelson et al., 1995). به نظر می‌رسد دوره نوری کوتاه می‌تواند هر دو ایمنی سلولی و خونی را در مقایسه با دوره نوری طولانی افزایش دهد(Demas and Nelson, 1996). دوره نوری کوتاه سبب افزایش عملکرد ایمنی در گونه‌های مختلف می‌شود(Demas and Nelson, 1996). برنامه نوری ۱D: ۲۳L و یا افزایشی۶L:۱۸D به ۱D : 23L بر نسبت هتروفیل به لمفوسیت اثری ندارد Blair et al., (1993). اما Voe و همکاران (۱۹۶۸) گزارش کردند که در نور دائم درصد هتروفیل ها افزایش و درصد لمفوسیت ها کاهش می‌یابد، که این نشان دهنده ایجاد تنش در گله است. بالاترین غلظت کورتیکوئید پلاسما در جوجه‌های گوشتی در دوره نوری روزبلند نسبت به برنامه نوری متناوب مشاهده شد Buckland *et al.*, (1976). همچنین گزارش شده است که غلظت کورتیکوسترون پلاسما در برنامه نوری دائم با برنامه نوری متناوب تفاوتی ندارد و بنابراین برنامه نوری بر تنش شدید اثری ندارد (Renden et al., 1994).

پرندگان پرورش یافته در برنامه نوری متناوب عیار پادتن علیه نیوکاسل بالاتری نسبت به پرندگان پرورش یافته در نور دائم داشتند (Onbasilar et al., 2007). اثر ملاتونین بر عملکرد ایمنی ممکن است مستقیماً از طریق گیرنده‌های ملاتونین موجود در بافت‌های ایمنی و گلبول‌های سفید باشد(Calvo et al., 1995) و یا می‌تواند به صورت غیر مستقیم از طریق تأثیر بر دیگر هورمون‌های اندوکرین بویژه هورمون تیروئید باشد (Poon et al., 1994). برخی پیشنهادها در رابطه با اثر غیر مستقیم ملاتونین بر ایمنی، از طریق پپتیدهای اپیوییدی می‌باشد (Maestroni and Conti, 1991). هورمون غده پینه‌ال سبب تحریک سلول‌های T کمکی به ترشح اوپیوییدها می‌شود که اثر تنظیمی بر سلول‌های ایمنی مختلف دارند (Maestroni, 2001). پپتیدهای اپیوییدی به طور وسیعی بر سلول‌های فعال ایمنی اثر دارند (Fischer and Falke, 1984). مشخص شده است که در واکنش با یک آنتی‌ژن خاص، سلول‌های موثر پیچیده و متنوع سیتوکین که نقش مهم در ازدیاد حساسیت تأخیری دارند، مسئول تجمع، تراوش و برهمکنش سلول‌های تک هسته‌ای و افزایش نفوذپذیری عروق در نزدیکی محرک می باشند (Aggarwal et al., 2008). تکنیک‌های زیادی جهت سنجش سیستم ایمنی حیوانات وجود دارد. تست پاسخ ایمنی به چالش با آنتی ژن بهترین راه تشخیص کمبود در پاسخ ایمنی دانسته شده است (Selgrade, 2007). یک روش آزمایشگاهی سنجش سیستم ایمنی که برای انواع پرندگان به طور وسیع استفاده می شود، تولید پادتن بر علیه گلبول قرمز گوسفند می‌باشد (Toth and Norcross, 1981). هدف از اجرای این طرح بررسی تأثیر برنامه‌های نوری مختلف بر سیستم ایمنی جوجه های گوشتی آرین به منظور پیشنهاد برنامه نوری است که در آن پرندگان ضمن کسب عملکرد تولیدی مناسب از ایمنی بالاتری برخوردار باشند.

مواد و روش ها

تعداد ۳۲۰ قطعه جوجه خروس گوشتی یکروزه (آرین۳۸۶) به طور تصادفی در چهار اتاق جداگانه، اما با

شرایط کاملاً مشابه توزیع شدند. در سه روز اول، برنامه نوری همه جوجه ها ۲۴ ساعت روشنایی بود. از سن سه روزگی تا آخر دوره (۴۲ روزگی)، نور هر اتاق طبق جدول ۱ برنامه ریزی شد.

جدول ۱- برنامه‌های نوری مورد استفاده

سن (روز)	روشنایی در شبانه روز (ساعت)			
	مداوم	افزایشی ناگهانی	افزایشی تدریجی	متناوب
۱-۳	۲۴	۲۴	۲۴	۲۴
۳-۷	۲۳	۸	۲۳	۱L-۳D†
۷-۱۴	۲۳	۸	۱۳	۱L-۳D
۱۴-۲۱	۲۳	۸	۱۳	۱L-۳D
۲۱-۲۸	۲۳	۲۳	۱۶	۱L-۳D
۲۸-۳۵	۲۳	۲۳	۱۹	۱L-۳D
۳۵-۴۲	۲۳	۲۳	۲۳	۱L-۳D

برنامه نوری متناوب، ۱L= یک ساعت روشنایی، ۳D= سه ساعت تاریکی

در هر سالن ۸ واحد آزمایشی به صورت پن های مفروش شده با کاه جو به ابعاد ۱/۲×۱ متر تعبیه شد. در هر واحد آزمایشی ۱۰ قطعه جوجه خروس یک روزه با میانگین وزنی ۰/۸۹±۴۳ گرم قرار داده شد. شرایط پرورش در چهار اتاق مورد استفاده، به غیر از برنامه نوری یکسان بود. شدت نور با استفاده از دیمر الکترونیک در سه روز نخست به میزان ۱۰۰ لوکس و پس از آن ۲۰ لوکس تنظیم شد. برنامه نوری با استفاده از تایمر (Teban, Germany) اعمال گردید. نیازهای غذایی پرندگان آزمایشی در هر مرحله بر اساس راهنمای پرورش جوجه گوشتی آرین محاسبه گردید.

ارزیابی سیستم ایمنی هومورال

تعیین عیار پادتن علیه گلبول قرمز گوسفند[1]

در سنین ۱۴ و ۳۲ روزگی ۸ پرنده از هر گروه آزمایشی به طور تصادفی انتخاب و پس از علامت گذاری، ۰/۲ میلی لیتر سوسپانسیون گلبول قرمز گوسفند ۵ درصد به صورت عضلانی به درون ماهیچه سینه جوجه‌ها تزریق گردید. یک هفته پس از هر بار تزریق از ورید بال همان پرنده‌ها خونگیری شد. جهت تعیین عیار پادتن تولید شده علیه گلبول قرمز گوسفند از روش هماگلوتیناسیون میکروتیتر استفاده شد (Wegmann and Smithies, 1966). به این ترتیب که ابتدا در دو پلیت سری رقت از سرم تهیه شد و سپس به یکی از پلیت‌ها ۲- مرکاپتواتانل افزوده شد (جهت تعیین میزان عیار پادتن مقاوم به ۲- مرکاپتواتانل). در نهایت پس از ۰/۵ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، گلبول قرمز گوسفند به هر دو پلیت افزوده شد. میزان عیار پادتن حساس به ۲- مرکاپتواتانل نیز از تفریق عیار پادتن کل از عیار پادتن مقاوم به ۲- مرکاپتواتانل به دست آمد.

تعیین عیار پادتن علیه ویروس واکسن نیوکاسل[2]

در روز ۱۸ پرورش (۷ روز بعد از اولین تلقیح واکسن نیوکاسل به صورت قطره چشمی) از هر گروه آزمایشی ۸ پرنده به طور تصادفی انتخاب و از طریق ورید بال حدود یک میلی لیتر خون گرفته شد. عیار پادتن علیه نیوکاسل با روش مهار هماگلوتیناسیون میکروتیتر (HI) در نمونه های سرم تعیین شد (Allan

1. Sheep red blood cells

2. Newcastle Virus Vaccine

(and Gough, 1974. در این آزمایش از رقت ۸ واحد هماگلوتیناسیون و رقیق سازی سرم استفاده گردید.

ارزیابی سیستم ایمنی سلولی

به منظور سنجش سیستم ایمنی سلولی، در ۲۴ روزگی تعداد ۸ پرنده از هر گروه آزمایشی به طور تصادفی انتخاب و علامت گذاری شد. ضخامت پوست در ناحیه‌ای مشخص (ناحیه مثلثی شکل در میان ران، پشت، سینه سمت چپ پرنده) با کمک کولیس دیجیتال (Mitutoyo, Japan) اندازه‌گیری شد. سپس پوست این ناحیه با ۲۵۰ میکرولیتر دی نیترو کلروبنزن (mg/ml ۱۰ ,DNCB) در حلال استون : روغن زیتون به نسبت ۱ به ۴ آغشته شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت دوباره ضخامت پوست اندازه گیری شد.

میانگین افزایش ضخامت پوست در هر پرنده از اختلاف ضخامت قبل و بعد چالش بدست آمد. نظیر اعمال فوق در سمت راست هر پرنده با حلال عاری از DNCBتکرار گردید تا پاسخ مربوط به حلال و عملیات دستورزی پرنده تصحیح شود. هر عدد اندازه گیری شده میانگینی از سه تکرار از ناحیه مورد نظر بوده و به عنوان میانگین هر پرنده در نظر گرفته شد (Thompson et al., 1980).

مشابه همین اعمال در ۳۴ روزگی با استفاده از محلول DNCB با غلظت (mg/ml ۱) انجام گرفت. به منظور شمارش سلول های خونی و تعیین نسبت هتروفیل به لمفوسیت در سن ۳۹ روزگی از هر سالن به طور جداگانه از ۸ پرنده با سرنگ آغشته به EDTA خونگیری انجام گرفت. سپس از یک قطره خون کامل گسترش تهیه شد و به روش رایت رنگ آمیزی گردید تا شمارش تفریقی هتروفیل و لمفوسیت با استفاده از میکروسکوپ نوری و با درشت نمایی ×۱۰۰۰ انجام شود. هتروفیل‌ها معمولاً اندازه بزرگ و دارای هسته دو یا چند قسمتی بوده و گرانول‌های میله‌ای با رنگ قرمز نارنجی دارند.

لمفوسیت‌ها که به تعداد فراوان یافت می‌شوند، دارای یک هسته بزرگ و گرد با لایه نازکی سیتوپلاسم در اطراف آن مشاهده می‌شوند. در سه ناحیه متفاوت هر لام تعداد ۱۰۰ گلبول سفید (به تفکیک شمارش هتروفیل و لمفوسیت) شمارش شد.

وزن اندام های لمفوئید

در سن ۴۰ روزگی از هر سالن به طور تصادفی ۸ پرنده انتخاب و پس از وزن کشی کشتار شد. سپس وزن بورس و طحال هر پرنده از هر گروه به طور جداگانه تعیین شد. کلیه داده‌های بدست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۸ تکرار با کمک نرم افزار SAS (1990)و با استفاده از مدل آماری زیر تجزیه واریانس شدند:

$$Y_{ij}= \mu + T_i+ \varepsilon_{ij}$$

که در آن Y_{ij}= مقدار هر مشاهده، μ = اثر میانگین جامعه، T_i = انواع برنامه های نوری و ε_{ij} = مقدار باقیمانده می باشد. مقایسه میانگین با روش حداقل اختلافات معنی‌داری (LSD) انجام و سطح معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) فرض شد (Steel and Torrie, 1980).

نتایج و بحث

تولید پادتن علیه SRBC

با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۲، میزان کل ایمنوگلوبولین در نوبت اول تزریق SRBC بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P>۰/۰۵$). در نوبت دوم تزریق SRBC میزان کل ایمنوگلوبولین در گروه های برنامه نوری متناوب و افزایشی- تدریجی نسبت به شاهد تفاوت معنی داری نشان نداد ($P>۰/۰۵$)، اما در گروه افزایشی ناگهانی به طور معنی داری کمتر از گروه شاهد بود ($P<۰/۰۵$). میزان عیار پادتن مقاوم به ۲- مرکاپتواتانل در گروه افزایشی تدریجی و ناگهانی تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت ($P>۰/۰۵$). اما در گروه متناوب به طور معنی داری از گروه شاهد کمتر بود ($P<۰/۰۵$). میزان عیار پادتن مقاوم به ۲- مرکاپتواتانل در نوبت دوم تزریق SRBC در گروه‌های مختلف نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P>۰/۰۵$). میزان عیار پادتن حساس به ۲- مرکاپتواتانل در نوبت اول تزریق SRBC نیز در بین گروه‌های مختلف نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>۰/۰۵$). اما میزان این پادتن در نوبت دوم در گروه افزایشی- تدریجی و ناگهانی به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($P<۰/۰۵$). با توجه به این که

کورتیکوستروئیدها از طریق ممانعت از سنتز پادتن مقاوم به ۲- مرکاپتواتانل و یا افزایش کاتابولیسم پادتن مقاوم به ۲- مرکاپتواتانل سبب کاهش تولید پادتن می‌گردند، این کاهش تولید می تواند ناشی از کاهش سنتز اینترلوکین II به وسیله سلول‌های T کمکی می‌باشد (Webb and Winkelstein, 1985). بنابراین کاهش پادتن مقاوم به ۲- مرکاپتواتانل در گروه متناوب نسبت به شاهد ممکن است به دلیل میزان بیشتر کورتیکوسترون پلاسما در این گروه باشد. در تحقیقی، جوجه‌های پرورش یافته در نور ثابت به طور معنی‌داری کمترین عیار پادتن علیه SRBC نسبت به گروه ۱۲L:۱۲D را نشان دادند (Kirby and Froman, 1991). همچنین مشخص شده است که اعمال روشنایی دائمی با لامپ‌های رشته‌ای با شدت ۴۵ لوکس باعث کاهش سطح ایمنی در جوجه خروس‌های نابالغ می‌شود. این مسأله با کاهش میزان تولید پادتن، در پاسخ به ایمن‌سازی ثانویه با SRBC در سن ۱۸-۱۳ هفتگی، در مقایسه با گروه کنترل با برنامه نوری۱۲L:۱۲D مشخص شد.

تولید پادتن علیه واکسن ویروس نیوکاسل

عیار پادتن علیه واکسن ویروس نیوکاسل در گروه افزایشی تدریجی به طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد و سایر گروه‌ها بود (P<۰/۰۱). ملاتونین باعث فعال شدن سلول‌های T کمکی می‌شود (Raghavendra et al., 2001) و با فعال شدن سلول‌های T کمکی افزایش لمفوسیت‌ها و تولید آنتی‌بادی مشاهده می‌شود (Kuby, 2000). بنابراین بیشتر بودن عیار پادتن ممکن است به علت زیاد بودن میزان ملاتونین در این گروه نسبت به شاهد و سایر گروه‌ها باشد. گزارش شده است که پرندگان پرورش یافته در برنامه نوری متناوب نسبت به پرندگان پرورش یافته در نور دائم عیار پادتن بیشتری علیه نیوکاسل داشتند. این نتایج بر تأثیر نور بر سیستم ایمنی تأکید دارد (Onbasilar et al., 2007). در نتیجه‌ی استفاده از نور متناوب در برابر نور دائم، افزایش ایمنی جوجه‌های گوشتی در دیگر مطالعات نیز گزارش شده است (Kilger et al., 2000). همچنین بهبود ایمنی سلولی و همورال در بلدرچین ژاپنی پرورش یافته در برنامه نوردهی کاهشی، نسبت به نور دائم توسط برخی محققین نیز گزارش شده است (Moore and Siopes, 2000).

جدول ۲: عیار پادتن تولید شده علیه گلبول قرمز گوسفند(HA) و علیه ویروس نیوکاسل(HI)

تیمار	IgT[1]		IgG[2]		IgM[3]		ND[4]
	(لگاریتم در مبنای دو)						
	نوبت اول	نوبت دوم	نوبت اول	نوبت دوم	نوبت اول	نوبت دوم	۱۸ روزگی
شاهد	۵/۲۵	۸/۸۸^{a}	۰/۷۵^{ab}	۲/۸۸^{ab}	۴/۵۰	۶/۰۰^{a}	۳/۱۲^{b}
افزایشی-ناگهانی	۵/۵۰	۶/۳۸^{b}	۱/۲۵^{a}	۲/۵۰^{b}	۴/۲۵	۳/۸۸^{b}	۲/۵۰^{b}
افزایشی تدریجی	۴/۶۲	۷/۸۸^{ab}	۰/۳۸^{bc}	۴/۵۰^{a}	۴/۲۵	۳/۸۳^{b}	۵/۸۷^{a}
متناوب	۵/۳۸	۸/۱۲^{ab}	۰/۰۰^{c}	۲/۰۰^{b}	۵/۳۸	۶/۱۲^{a}	۳/۳۷^{b}
P-Value	۰/۸۲	۰/۰۵۷	۰/۰۱۳	۰/۰۴	۰/۵۵۷	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۱
SEM	۰/۳۴۶	۰/۳۴۶	۰/۱۴۸	۰/۳۳۴	۰/۳۱۰	۰/۳۲۰	۰/۲۸۴۸

[abc] میانگین های با حروف متمایز هر ستون، از نظر آماری متفاوتند (P<۰/۰۵)

IgT، میزان عیار پادتن کل; IgG، میزان عیار پادتن مقاوم به ۲-مرکاپتواتانل; IgM، میزان عیار پادتن حساس به ۲- مرکاپتواتانل ND ;، میزان عیار پادتن علیه ویروس واکسن نیوکاسل.

ارزیابی سیستم ایمنی سلولی

بر طبق نتایج جدول ۳، در نوبت اول آغشته سازی پوست به DNCB، میزان تغییر ضخامت پوست در گروه متناوب و افزایشی تدریجی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۱). اما تفاوت معنی داری از این نظر بین گروه افزایشی ناگهانی و شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵). درصد تغییر ضخامت پوست در گروه متناوب نسبت به شاهد به طور معنی داری

بالاتر بود (P<۰/۰۵)، اما بین سایر گروه‌ها و شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). با توجه به این که کاهش ضخامت پوست در اثر کاهش تراوش لوکوسیت ها به ناحیه آغشته شده به DNCB نسبت داده شده است (Anil Kumar et al., 2003)، بنابراین کمتر بودن ضخامت پوست در گروه شاهد می‌تواند به علت تراوش کمتر گلبول‌های سفید به ناحیه آغشته شده با DNCB باشد، که خود می‌تواند در اثر کمتر بودن میزان گلبول‌های سفید بخصوص لمفوسیت‌ها در گروه شاهد نسبت به سایرین باشد. با توجه به این که افزایش ضخامت پوست نیز در نتیجه تشکیل وزیکول، ضخیم شدن پوست، ادم و تراوش سلول‌های تک هسته‌ای به ناحیه آغشته شده به DNCB می‌باشد (Anil Kumar et al., 2003). بنابراین بیشتر بودن ضخامت پوست در ناحیه آغشته شده با DNCB در گروه متناوب و افزایشی تدریجی نسبت به شاهد می تواند در اثر تراوش تعداد بیشتر گلبول‌های سفید بویژه لمفوسیت‌ها در این ناحیه باشد. در نوبت دوم آغشته سازی پوست با DNCB، میزان تغییر ضخامت پوست در گروه متناوب و افزایشی تدریجی نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵). اما در گروه افزایشی ناگهانی به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۵) که می تواند در اثر کاهش تراوش گلبول‌های سفید در ناحیه آغشته شده با DNCB باشد. درصد تغییر ضخامت پوست در بین گروه‌های مختلف نسبت به شاهد نیز تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵).

جدول ۳- تأثیر برنامه‌های نوری بر پاسخ پوست به تیمار DNCB

تیمار	نوبت اول		نوبت دوم	
	مقدار افزایش (mm)	درصد افزایش	مقدار افزایش (mm)	درصد افزایش
شاهد	۱/۰۳[c]	۱/۸۸[b]	۰/۹۲[a]	۰/۵۸[ab]
افزایشی- ناگهانی	۱/۰۶[bc]	۲/۰۳[b]	۰/۵۳[b]	۰/۵۵[b]
افزایشی تدریجی	۱/۱۷[b]	۱/۸۸[b]	۰/۶۷[ab]	۰/۶۳[ab]
متناوب	۱/۹۷[a]	۳/۴۵[a]	۰/۹۵[a]	۰/۷۵[a]
P-Value	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵
SEM	۰/۰۷	۰/۱۲	۰/۰۵	۰/۰۳

[abc] میانگین های با حروف متمایز هر ستون، از نظر آماری متفاوتند (P<۰/۰۵)

تعداد کل گلبول های سفید و نسبت هتروفیل به لمفوسیت

با توجه به نتایج جدول ۴، تعداد گلبول‌های سفید در گروه متناوب و افزایشی-تدریجی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۱). این تعداد در گروه افزایشی ناگهانی با گروه شاهد تفاوت نداشت (P<۰/۰۵). با توجه به این که ملاتونین خارجی سبب افزایش تعداد گلبول‌های سفید و فعالیت لمفوسیت های B و T در جوجه‌های بالغ (Brennan et al., 2002) و پینه‌ال کتومی سبب کاهش پاسخ ایمنی می‌شود، پیشنهاد شده است که ملاتونین نقش تنظیمی در سیستم ایمنی دارد (Rodriguez and Lea, 1994).

در نتیجه بالاتر بودن تعداد گلبول های سفید در گروه متناوب و افزایشی تدریجی نسبت به گروه کنترل می‌تواند به علت مقادیر بیشتر ملاتونین در این گروه‌ها باشد. اگر چه در تحقیق حاضر امکان سنجش هورمون ملاتونین وجود نداشت، ولی ارتباط بین دوره نوری و سطح این هورمون قابل پیش بینی می باشد. گزارش شده است جوجه‌هایی که در معرض برنامه نوری غیر متناوب بودند به طور معنی‌داری کمترین تعداد گلبول سفید را در مقایسه با گروه متناوب و یا نور دائم داشتند. همچنین کل گلبول‌های سفید و عیار تولید پادتن در گروه متناوب در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود. این افزایش می‌تواند در اثر زیاد شدن ملاتونین در دوره تاریکی باشد (Abbas et al., 2007).

درصد لمفوسیت در برنامه‌های نوری مختلف به طور معنی‌داری بالاتر از شاهد بود (P<۰/۰۵). درصد

هتروفیل و نسبت هتروفیل به لمفوسیت در گروه‌های آزمایشی نسبت به شاهد به طور معنی‌داری پایین‌تر بود (P<۰/۰۵).

با توجه به این که افزودن ملاتونین به آب آشامیدنی و یا کاهش دوره نوری سبب افزایش گلبول های سفید، افزایش درصد لمفوسیت، کاهش درصد هتروفیل و همچنین کاهش نسبت هتروفیل به لمفوسیت شده است (Moore and Siopes, 2000)، بنابراین بالاتر بودن درصد لمفوسیت‌ها، پایین بودن درصد هتروفیل‌ها و پایین بودن نسبت هتروفیل به لمفوسیت در گروه متناوب و گروه‌های افزایشی نسبت به شاهد می‌تواند به علت پایین‌تر بودن میزان ساعات روشنایی و در نتیجه بیشتر بودن میزان ملاتونین باشد. این نتایج مطابق با مشاهدات (Voe et al., 1998) بود، اما با نتایج (Campo and Davila, (2002 و Blair et al. (1993)، که نبود تفاوت در نسبت هتروفیل به لمفوسیت در پرندگان پرورش یافته در نور دائم با پرندگان پرورش یافته در دوره نوری افزایشی را گزارش کردند، مغایرت داشت.

وزن اندام های لمفوئیدی

بر طبق نتایج جدول ۴، وزن طحال در بین گروه های مختلف نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). وزن بورس در گروه افزایشی ناگهانی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد و سایر گروه‌ها بود (P<۰/۰۵). وجود نقاط باند کننده مخصوص ملاتونین در سلول‌های لمفوئیدی گواه بر اثر مستقیم ملاتونین بر تنظیم سیستم ایمنی می‌باشد (Garcia-Perganeda et al., 1997) همچنین مشاهده شده است که بورس با کمک مکمل ملاتونین توسعه یافته است. این ارگان یک بافت لمفوئیدی اولیه مسئول توسعه مجموعه پادتن ها در پرندگان اهلی می‌باشد (Glick et al., 1956). بیشتر بودن وزن بورس در گروه افزایشی ناگهانی نسبت به گروه شاهد می‌تواند به علت بالاتر بودن میزان ملاتونین در این گروه باشد.

جدول۴- تأثیر برنامه های نوری مختلف بر درصد هتروفیل، لمفوسیت، تعداد کل گلبول های سفید و وزن اندام های لنفاوی در جوجه گوشتی آرین

تیمار	تعداد گلبول های سفید میلیون در میلی لیتر	هتروفیل (%)	لمفوسیت (%)	لمفوسیت / هتروفیل	وزن طحال (g)	وزن بورس (g)
شاهد	۱۲/۵ b	۵۸/۵۰ a	۴۱/۵۰ b	۱/۴۶ a	۲/۶۶	۳/۴۲ b
افزایشی -ناگهانی	۱۱/۵۲ b	۳۶/۵۴ b	۳۶/ ۴۶ a	۰/۵۸ b	۲/۴۰	۵/۴۹ a
افزایشی -تدریجی	۱۶/۸۳ a	۳۶/۰۰ b	۶۴/۰۰ a	۰/۵۶ b	۲/۵۹	۳/۲۲ b
متناوب	۱۶/۰۰ a	۲۷/۷۸ b	۷۲/۲۲ a	۰/۳۹ b	۲/۲۹	۳/۶۳ b
P-Value	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۷۵	۰/۰۰۹۳
SEM	۰/۵۹	۳/۱۰	۳/۱۰	۰/۱۱۹	۰/۱۲	۰/۳۰۰

abc میانگین های با حروف متمایز هر ستون، از نظر آماری متفاوتند (P<۰/۰۵)

با توجه به مطالب گفته شده، می توان به اهمیت نور و اثرات آن بر برخی از ویژگی‌های طیور پی برد. بر این اساس باید سعی شود که در طول دوره پرورش از دوره نوری مناسب استفاده کرد به نحوی که علاوه بر توجه به بهبود عملکرد، تأمین ایمنی و سلامت پرنده نیز مد نظر قرار گرفته باشد. براساس نتایج بدست آمده در این آزمایش، تنها برنامه نوری کاهشی افزایشی تدریجی واجد ویژگی های فوق می‌باشد.

REFERENSES

1. Abbas, A. O., Gehad, A. E., Hendricks, G. L., Gharib, H. B. A. and Mashaly, M. M. (2007). The effect of lighting program and melatonin on the the alleviation of the negative impact of heat stress on the immune response in broiler chickens. Poultry Science, 6, 651-660.
2. Anil Kumar, P., Satyanarayana, M. L., Vijayasarathi, S. K., Sreenivas Gowda, R. N. and Suguna, R. (2003). Pathology of lymphoid organs in aflatoxicosis and ochratoxicosis and immunomodulatory effect of vitamin E and selenium in broiler chicken. Indian Journal of Veterinary Pathology. 27, 102-106.

3. Aggarwal, M., Naraharisetti, S. B., Dandapat, S., Degen, G. H. and Malik, J. K. (2008). Perturbations in immune responses induced by concurrent subchronic exposure to arsenic and endosulfan. Toxicology. 251, 51-60.
4. Allan, W. H. and Gough, R. E. (1974). A standard haemagglutination inhibition test for Newcastle disease. A comparison of macro and micro methods. Veterinary Record, 95, 120-123.
5. Blair, R., Newberry, R. C. and Gardiner, E. E. (1993). Effects of lighting pattern and dietary tryptophan supplementation on growth and mortality in broilers. Poultry Science, 72, 495–502.
6. Brennan, C. P., Hendricks, G. L., El-Sheikh, T. M. and Mashaly, M. M. (2002). Melatonin and the enhancement of immune responses in immature male chickens. Poultry Science, 81, 371–375.
7. Buckland, R. B., Bernon, D. E. and Goldrosen. A. (1976). Effect of four lighting regimes on broiler performance, leg abnormalities and plasma corticoid levels. Poultry Science. 55, 1072–1076.
8. Calvo, J. R., El-Idrissi, M. R., Pozo, D. and Guerrero, J. M. (1995). Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells. Pineal Research, 18, 119.
9. Campo, J. L. and Davila, S. G. (2002). Effect of photoperiod on heterophil to lymphocyte ratio and tonic immobility duration of chickens. Poultry Science, 81, 1637-1639.
10. Demas, G. E. and Nelson, R. J. (1996). Photoperiod and temperature interact to affect immune parameters in adult male deer mice. Journal Biology Rhythms, 11, 94–102.
11. Fischer, E. G. and Falke, N. E. (1984). Beta-endorphin modulates immune functions. Psychotherapy and Psychosomatics, 42(1–4), 195–204.
12. Garcia-Perganeda, A., Pozo, D., Guerrero, J. M. and Calvo, J. R. (1997). Signal transduction for melatonin in human lymphocytes: involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. Journal Immunology, 159, 3774-3781.
13. Glick, B., Chang, T.S. and Jaap, R.G. (1956). The bursa of Fabricius and antibody production. Poultry Science, 35, 224–225.
14. Kirby, J. D. and Froman, D. P. (1991). Evaluation of humoral and delayed hypersensitivity responses in cockerels reared under constant light or a twelve-hour light: twelve hour dark photoperiod. Poultry Science, 70:2375-2378.
15. Kuby, J. (2000). Immunology. W. H. Freeman and Co., New York, N.Y., pp:20-70, 100-225.
16. Kliger, C. A., Gehad, A. E., Hulet, R. M., Roush, W. B., Lillehoj, H. S. and Mashaly, M. M. (2000). Effect of photoperiod and melatonin on lymphocyte activities in male broiler chickens. Poultry Science, 79, 18-25.
17. Maestroni, G. J. (2001). The immunotherapeutic potential of melatonin. Expert Opinon on Investigational Drugs, 103:467–476.
18. Maestroni, J. M. and Conti, A. (1991). Anti-stress role of the melatonin-immuno-opioid network: Evidence for a physiological mechanism involving T cell-derived, immuno-reactive beta-endorphin and met-enkephalin binding to thymic opiod receptors. Neuroscince, 61, 289–298.
19. Moore, C. B. and Siopes, T. D. (2000). Effects of light conditions and melatonin supplementation on the cellular and humoral immune responses in Japanese quail *Coturnix coturnix* japonica. General and Comparative Endocrinology, 119,95-104.
20. Nelson, R. J., Demas, G. E., Klein, S. L. and Kriegsfeld, L. J. (1995). The influence of season, photoperiod, and pineal melatonin onimmune function. Pineal Research. 19, 149–165.
21. Onbasılar, E. E., Erol, H., Cantekin, Z. and Kaya, U. (2007). Influence of intermittent lighting on broiler performance, incidence of tibial dyschondroplasia, tonic immobility, some blood parameters and antibody production. Asian-Australasian Journal of Animal Science, 20, 550–555.
22. Poon, A. M., Liu, Z. M., Tang, F. and Pang, S. F. (1994). Cortisol decreases 2 [^{125}I] iodomelatonin binding sites in the duck thymus. Endocrinology, 130, 320-324.
23. Raghavendra, V., Singh, V., Kulkarni, S. K. and Agrewala, J. N. (2001). Melatonin enhances Th2 cell mediated immune responses: lack of sensitivity to reversal by naltrexone or benzodiazepine receptor antagonists. Molecular and Cellular Biochemistry, 221, 57-62.
24. Renden, J. A., Lien, R. J., Oates, S. S. and Bilgili, S. F. (1994). Plasma concentrations of corticosterone and thyroid hormones in broilers provided various lighting schedules. Poultry Science, 73, 186–193.
25. Rodriguez, A. B. and Lea, R. W. (1994). Effect of pinealectomy upon the nonspecific immune response of the ring-dove (*Streptopelia risoria*). Pineal Research. 16, 159–166.
26. SAS Institute (1990). SAS/STAT User's Guide, Version 6, 4th ed., Vol. 2. SAS Institute Inc., Cary, NC.
27. Selgrade, M. K. (2007). Immunotoxicity, the risk is real. Toxicology Science, 100, 328–332.
28. Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. (1980). Principles and Procedures of Statistics. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
29. Thompson, D. L., Elgert, K. D., Gross, 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

corticostrone. Veterinary Research, 41, 91-96.
30. Toth, T. E. and Norcross, N. L. (1981). Immune response of the duck to particulate (red blood cell) antigens. Avian Diseases, 25, 353-365.
31. Webb, D. R. and Winkelstein, A. (1985). Immunosuppression, immunopotentiation, and antiinflammatory drugs. Chapter 17. In: Basic and Clinical Immunology, 5th ed. D. P. Stites, J. D. Stobo, H. H. Fudenberg, and J. V. Wells (eds.). Lange Medical Publications, Los Altos, California, pp:-217-287.
32. Wegmann, T. and Smithies, O. (1966). A simple hemagglutination system requiring small amounts of red cells and antibodies. Transfusion, 6, 67-75.
33. Voe, K. V., Burgess, C. Adefope, N. A., Catlin, C. and Wakefield, T. (1998). Effects of lighting regime and feed restriction for various durations on growth performance, leg abnormalities and hemo-stress response of broilers. Poultry Science, 77(Suppl. 1), 3.