

اثرات ۱-۲۵ دی‌هیدروکسی کوله کلسیفرول (کلستریول) و عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه دارویی بوزیدان (*Withania somnifera*) بر پاسخ ایمنی و ریخت‌شناسی روده جوجه‌های گوشتی

محمدطاهر میرکزه‌ی^{۱*} - حسن کرمانشاهی^۲ - ابولقاسم گلپان^۲ - حسن صالح^۱ - محمدجواد آگاه^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۶/۲۱

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی اثرات ۱-۲۵ دی‌هیدروکسی کوله کلسیفرول [$1, 25 (OH)_2 D_3$] (کلستریول) و عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه دارویی بوزیدان (*Withania somnifera*) بر پاسخ ایمنی و ریخت‌شناسی روده کوچک جوجه‌های گوشتی انجام شد. تیمارها در قالب فاکتوریل ($2 \times 3 \times 2$) شامل جیره کنترل مثبت با سطح کافی کلسیم و کنترل منفی (کاهش ۳۰ درصدی سطح کلسیم)، ۳ سطح عصاره بوزیدان (صفر، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و ۲ سطح ۱-۲۵ دی‌هیدروکسی کوله کلسیفرول (صفر و ۰/۵ میکروگرم در کیلوگرم جیره) بود. تعداد ۶۰۰ قطعه جوجه گوشتی یک روزه راس ۳۰۸ به صورت تصادفی در ۶۰ عدد پن و ۱۰ پرنده در هر کدام توزیع گردید. هر تیمار دارای ۵ تکرار (۵۰ پرنده در هر تیمار) بود. جیره‌های آزمایشی به طور نامحدود در اختیار جوجه‌ها از ۱ تا ۴۲ روزگی قرار گرفت. برای بررسی ایمنی هومورال از تست SRBC استفاده گردید. لذا دو تزریق در روزهای ۲۵ و ۳۲ دوره آزمایش برای تعیین پاسخ آنتی‌بادی اولیه و ثانویه انجام شد. در ۲۱ و ۴۲ روزگی یک پرنده از هر تکرار کشتار و وزن اندام‌های لنفاوی اندازه‌گیری و ۱/۵ سانتی‌متر از بافت ژژونوم به منظور تعیین خصوصیات ریخت‌شناسی جدا گردید. آزمایشات پاسخ ایمنی هومورال نشان داد که کاهش ۳۰ درصدی سطح کلسیم جیره باعث کاهش تیترا آنتی‌بادی کل می‌گردد. عصاره هیدروالکلی ریشه بوزیدان در سطح ۱۵۰ میلیگرم فقط باعث افزایش تیترا ایمونوگلوبولین G در تست اولیه گردید. هیچ‌گونه اثرات اصلی از تیمارهای آزمایشی بر وزن اندام‌های لنفاوی مشاهده نگردید. اطلاعات ریخت‌شناسی روده نشان داد که مکمل‌سازی کلستریول در جیره باعث کاهش طول پرز در ۲۱ روزگی و کاهش عرض آن در ۴۲ روزگی می‌گردد. کاهش ۳۰ درصدی سطح کلسیم جیره منجر به کاهش عمق کرپیت در مقایسه با گروه کنترل مثبت گردید. این آزمایشات نشان داد که کاهش سطح کلسیم جیره باعث کاهش پاسخ ایمنی هومورال می‌گردد. مکمل‌سازی عصاره بوزیدان در جیره‌های آزمایشی تأثیری بر خصوصیات پرز نداشت.

واژه‌های کلیدی: بوزیدان، پاسخ ایمنی، جوجه گوشتی، ریخت‌شناسی روده، کلستریول.

مقدمه

می‌دهد و دومین هیدروکسیلاسیون در کلیه به وسیله آنزیم ۱-آلفا-هیدروکسیلاز (E.C.1.14.13.13) رخ داده که ۱، ۲۵ (OH)₂ D₃ تشکیل می‌شود (۱۳، ۱۹، ۲۴ و ۳۲). ویتامین D و متابولیت‌های آن علاوه بر روده، استخوان و کلیه در سلول‌های سیستم ایمنی نظیر مونوسیت‌ها و ماکروفاژها نیز دارای گیرنده می‌باشند. لنفوسیت‌ها نیز فقط در مراحل معینی از تمایز و به محض فعال شدن دارای گیرنده‌های کلستریول می‌باشند (۱). گزارش شده است که کمبود ویتامین D باعث سرکوب ایمنی سلولی و پاسخ به التهاب می‌گردد (۴۰). علاوه بر این در پستانداران مبتلا به کمبود ویتامین D فعال‌سازی ماکروفاژ، شیمیوتاکسی، تولید سیتوکین سرکوب و تعداد سلولهای خونساز مغز استخوان کاهش می‌یابد (۳). کلستریول باعث توسعه سلول‌های Th2 می‌گردد که آنها نیز باعث رشد و تمایز

۱-۲۵ دی‌هیدروکسی کوله کلسیفرول [۱، ۲۵ (OH)₂D₃] (کلستریول) از لحاظ زیست‌شناسی فعال‌ترین متابولیت ویتامین D₃ است که به وسیله دو واکنش هیدروکسیلاسیون متوالی تولید می‌گردد. اولین هیدروکسیلاسیون زمانی رخ می‌دهد که ویتامین D₃ به کبد منتقل شده تشکیل ۲۵ دی‌هیدروکسی کوله کلسیفرول [۲۵ (OH) D₃]

۱- استادیار گروه علوم دامی، مجتمع آموزش عالی سراوان،

۲- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد،

۳- استادیار گروه علوم دامی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس، شیراز.

(* - نویسنده مسئول: Email: mt_mirakzehi@yahoo.com

بود تزریق نمودند. به طور کلی درمان به وسیله عصاره هیدروالکلی ریشه بوزیدان در موش‌های آلوده با سیکلو فسفامید باعث بازگرداندن ساختار پرز به حالت طبیعی گردید. هدف از این آزمایش بررسی اثرات اصلی و متقابل کلسیتریول و عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه دارویی بوزیدان با استفاده از جیره‌های با سطوح کافی و یا کم کلسیم بر پاسخ ایمنی و ریخت‌شناسی روده جوجه خروس‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

استخراج عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه دارویی بوزیدان

ریشه‌های گیاه بوزیدان در آبان ماه از زیستگاه طبیعی آن واقع در سراوان، استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری گردید. ریشه‌ها برای حصول اطمینان در هر بار یوم پژوهشکده گیاهشناسی دانشگاه فردوسی مشهد مورد شناسایی قرار گرفتند. سپس به آرامی با آب استریل شستشو داده شده، در سایه و در معرض هوای آزاد خشک شدند و در نهایت خرد شده تا به شکل پودر درآمدند. ریشه پودر شده با استفاده از اتانول ۵۰ درصد توسط دستگاه روتاری (Laborota 4000, Heidolph German) در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای حصول عصاره نیمه خشک مورد عصاره‌گیری قرار گرفت. آنگاه عصاره آبی به مدت ۲۴ ساعت مورد انجماد خشک قرار گرفت و با قرار گرفتن در بطری، تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

حیوانات و جیره‌های آزمایشی

تعداد ۶۰۰ قطعه جوجه خروس یک روزه سویه راس ۳۰۸ خریداری و در ۶۰ عدد پن با بستری از تراشه چوب با تراکم ۱۰ قطعه جوجه به ازای هر پن قرار گرفتند. پرندگان در طی ۶ هفته دوره آزمایش به آب و تیمارهای آزمایشی دسترسی آزاد داشتند. دما و برنامه نوری مطابق با دستورالعمل نژاد راس ۳۰۸ کنترل شد. طرح آزمایشی به صورت فاکتوریل $2 \times 3 \times 2$ و شامل جیره کنترل مثبت با سطح کافی کلسیم و کنترل منفی (کاهش ۳۰ درصدی سطح کلسیم)، سه سطح عصاره بوزیدان (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 درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده در جیره نگهداری گردید. جیره‌های آزمایشی به گونه‌ای فرموله شده بودند که دارای انرژی قابل متابولیسم و پروتئین خام یکسانی باشند. جیره کنترل مثبت تأمین کننده همه نیازمندی‌های مواد مغذی پیشنهاد شده در دستورالعمل راهنمای سویه تجارتهی راس ۳۰۸ بود (۲۵). جیره کنترل منفی مشابه با جیره کنترل مثبت اما سطح کلسیم آن ۳۰ درصد کاهش یافته بود.

سلولهای B و متاقبا القاء تولید ایمونوگلوبولین می‌گردند (۲). ویتامین D و متابولیت‌های آن نقش مهمی در توسعه ساختاری و عملکردی غشاء مخاطی پرزهای روده دارند (۳۱). پلی آمین‌های آلیفاتیک پاترسین، اسپرمیدین و اسپرمین به‌عنوان اجزائی 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 (۳۰). گزارش شده است که یون‌های کلسیم نقشی اساسی و مهم در فعال‌سازی و بلوغ لنفوسیت‌ها دارند (۴ و ۱۰). همچنین مطالعات پیشین نشان داده است که غلظت داخل سلولی کلسیم در انواع مختلف سلول‌ها در طی استرس افزایش می‌یابد. برای مثال استرس محدودیت حاد بسیج کلسیم در لنفوسیت‌های موش را افزایش می‌دهد (۲۷ و ۲۸). علاوه بر این یون‌های کلسیم برای تولید اینترلوکین ۲ توسط لنفوسیت‌های T ضروری هستند (۲۲). بوزیدان (*Withania somnifera*) گیاهی است دارویی، یکساله و علفی از خانواده سیب زمینی (Solanaceae) که به آن گیلاس زمستانی و در زبان سانسکریت Ashwaganda اطلاق گردیده است. ارتفاع این گیاه به ۱۷۰ سانتیمتر می‌رسد (۱۸). تحقیقات نشان داده است که این گیاه دارای اثرات ضد التهاب، ضد سرطان، ضد استرس، آنتی‌اکسیدان، تقویت کننده سیستم ایمنی و خونسازی می‌باشد. اثرات سودمند بر روی سیستم هورمونی، قلبی ریوی، سیستم عصبی مرکزی، ورم مفاصل و استخوان سازی است. بخش مهم مورد استفاده این گیاه ریشه آن است که دارای خواص درمانی می‌باشد (۱۷). ترکیبات بیولوژیکی فعال این گیاه آلکالوئیدها (اشواگاندین، کاسکوهیگرین، آناهیگرین، توپین و ...)، ترکیبات استروئیدی شامل لاکتون‌های استروئیدی نوع ارگوستان، ویتافرین A، ویتانولیدهای نوع A الی Y، ویتاسامنیفرین A، ویتاسامنیدون، ویتاسامنیروز A الی C، ویتانول و... می‌باشند. تزریق دهانی ۱۰، ۳۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از عصاره هیدروالکلی ریشه این گیاه به مدت ۱۵ روز در موشها باعث تکثیر سلول‌های نوع B و T سیستم ایمنی، کمک به ایمنی انتخابی نوع Th1 و افزایش فعالیت ماکروفاژها و ترشح ایمونوگلوبولین‌ها گردیده که به خوبی بیانگر نقش چشمگیر عصاره این گیاه در تحریک هر دو نوع ایمنی سلولی و ایمنی نوع هومورال می‌باشد (۱۷). یاماوچی و همکاران (۴۱) گزارش کردند که گیاهان دارویی که محرک رشد موجود زنده و تحریک کننده سیستم ایمنی آنها می‌باشند اثرات مثبتی بر ساختار و عملکرد پرزها و سلول‌های اپیتلیال در همه بخش‌های روده دارند. دیویس و کوتان (۷) در آزمایشی به مدت ۳۰ روز و هر ۳ روز یک بار ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه بوزیدان را به موش‌هایی که سیستم ایمنی آنها به وسیله ۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از سیکلو فسفامید و هر ۳ روز یک بار سرکوب شده

جدول ۱- ترکیب جیره‌های پایه جوجه‌های گوشتی در بازه‌های زمانی مختلف (%)
Table 1- Composition of the basal diets in different periods (%)

ماده Ingredient	دوره آغازین (۱-۱۰ روزگی)		دوره رشد (۱۱-۲۳ روزگی)		دوره پایانی (۲۴-۴۲ روزگی)	
	Starter (1-10 days)		Grower (11-23d)		Finisher (24-42d)	
	-	+	-	+	-	+
ذرت Maize	520	520	532.0	532.0	530.0	530.0
کنجاله سویا Soybean meal	350	350	370.0	370.0	369.0	369.0
گلوتن Gluten	50	50	-	-	-	-
روغن گیاهی Vegetable oil	32.7	32.7	58.0	58.0	65.6	65.6
سنگ آهک Limestone	5.3	13.1	4.0	10.7	3.7	10.3
دی کلسیم فسفات Dicalcium phosphate	17.5	17.5	15.5	15.5	14.0	14.0
نمک Salt	3.5	3.5	4.7	4.7	4.1	4.1
متیونین Methionin	3.2	3.2	2.8	2.8	2.0	2.0
لیزین Lysine	4.0	4.0	1.3	1.3	-	-
ترئونین Threonine	1.0	1.0	-	-	-	-
مکمل ویتامینی ^۱ Vitamin premix ¹	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
مکمل معدنی ^۲ Mineral premix ²	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
ماسه Sand	7.8	-	6.7	-	6.6	-
انرژی و مواد مغذی محاسبه شده Calculated nutrients and energy						
انرژی قابل متابولیسم (مگا ژول بر کیلوگرم) AME, (MJ kg ⁻¹)	12.6	12.6	13.1	13.1	13.3	13.3
پروتئین خام (گرم بر کیلوگرم) Crude protein (g kg ⁻¹)	235.2	235.2	211.5	211.5	209.1	209.1
لیزین (گرم بر کیلوگرم) Lysine (g kg ⁻¹)	14.4	14.4	12.4	12.4	11.3	11.3
متیونین (گرم بر کیلوگرم) Methionine (g kg ⁻¹)	7.0	7.0	6.1	6.1	5.2	5.2
کل اسیدهای آمینه گوگردار (گرم بر کیلوگرم) TSAA (g kg ⁻¹)	10.7	10.7	9.5	9.5	8.6	8.6
کلسیم (گرم بر کیلوگرم) Calcium (g kg ⁻¹)	7.3	10.4	6.3	9.0	5.9	8.5
فسفر غیر فیتاته (گرم بر کیلوگرم) Nonphytate P (g kg ⁻¹)	5.0	5.0	4.5	4.5	4.2	4.2
فسفر کل (گرم/کیلوگرم) Total P (g/kg)	7.0	7.0	6.8	6.8	6.5	6.5

Continuation of table 1

غلظت مواد مغذی آنالیز شده

Analyzed Ca and total P concentration

کلسیم (گرم/کیلوگرم)	7.5	10.7	6.5	9.3	6.1	8.8
Calcium (g/kg)						
فسفر کل (گرم/کیلوگرم)	7.4	7.4	7.1	7.1	6.7	6.7
Total P (g/kg)						

^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 K₃، ۵/۷ میلی‌گرم ویتامین B₂، ۲ میلی‌گرم ویتامین B₆، ۰/۰۲۴ میلی‌گرم ویتامین B₁₂، 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.

^۱ Vitamin premix provided per kilogram of diet: retinyl acetate, 11,000 IU; cholecalciferol, 1,800 IU; DL- α -tocopheryl acetate, 11 mg; menadione sodium bisulphate, 2 mg; riboflavin, 5.7 mg; pyridoxine hydrochloride, 2 mg; cyanocobalamin, 0.024 mg; nicotinic acid, 28 mg; folic acid, 0.5 mg; pantothenic acid, 12 mg; choline chloride, 250 mg.

^۲ Mineral premix provided per kilogram of diet: Mn, 100 mg; Zn, 65 mg; Cu, 5 mg; Se, 0.22 mg; I, 0.5 mg; and Co, 0.5 mg.

دست می‌آید تعیین گردید.

روش‌های آزمایش

در روزهای ۲۱ و ۴۲ دوره آزمایش یک قطعه جوجه به ازای هر تکرار کشتار و وزن اندام‌های لنفاوی شامل تیموس، طحال و بورس فابریسیوس اندازه‌گیری شدند.

تاثیر تیمارهای آزمایشی بر ریخت‌شناسی بخش ژژنوم روده کوچک در ۲ سن ۲۱ و ۴۲ روزگی بررسی گردید. در روزهای ۲۱ و ۴۲ دوره آزمایش کلیه پرندگان مورد آزمایش به مدت ۸ ساعت به منظور تخلیه دستگاه گوارش (۶) 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 شده و داخل محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. پس از ۱۲ ساعت محلول فرمالینی که نمونه‌ها درون آن بود با محلول فرمالین ۱۰ درصد جدید تعویض شد. نمونه‌ها به منظور تهیه اسلایدها و اندازه‌گیری متغیرهای مربوطه شامل ارتفاع پرز، عرض پرز، ضخامت اپیتلیوم، ضخامت ماهیچه و عمق کریپت به آزمایشگاه هیستولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی منتقل شدند.

آنالیزهای آزمایشگاهی

برای اندازه‌گیری تیترا آنتی‌بادی از روش ELISA^۱ استفاده گردید. برای اندازه‌گیری ایمنوگلوبولین G از مراپتواتانول ۰/۰۱ مولار استفاده شد. از تفریق ایمنوگلوبولین G از عدد کل، مقدار ایمنوگلوبولین M حاصل می‌شود. برای آماده سازی نمونه‌های بافتی سه مرحله: آبیگری، شفاف‌سازی و پارافینه شدن انجام گرفت. برای آبیگری از نمونه‌های بافتی، نمونه‌ها داخل محلول الکل اتیلیک با درجات صعودی قرار گرفت. جهت شفاف‌سازی و گرفتن الکل از زایلن استفاده گردید. به منظور اشباع سازی نمونه‌ها با پارافین، عمل پارافینه کردن انجام شد. سپس به وسیله میکروتوم چرخان برش‌هایی با

برای بررسی ایمنی هومورال از تست آنتی‌ژن گلبول قرمز گوسفندی (SRBC) استفاده گردید و پاسخ ایمنی علیه آن بررسی شد. بدین منظور ۲۰ میلی‌لیتر خون گوسفند تهیه گردیده و در شیشه حاوی EDTA ریخته شد. گلبول‌های قرمز سه بار با بافر فسفات سالین (PBS) شسته شد و در نهایت یک محلول ۵ درصد از گلبول قرمز در بافر فسفات سالین تهیه گردید (۶). در روز ۲۵ دوره آزمایش (سن ۲۵ روزگی) به ۲ جوجه از هر پن، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول فوق به صورت داخل ورید بال تزریق شد. برای اندازه‌گیری پاسخ آنتی‌بادی اولیه علیه SRBC، در روز ۳۲ دوره آزمایش (۷ روز پس از تزریق) از هر پن دو قطعه جوجه‌ای که به آنها SRBC تزریق شده بود انتخاب و از ورید بال آنها ۲ میلی‌لیتر خون گرفته و تزریق محلول ۵ درصد از گلبول قرمز در بافر فسفات سالین مجدداً برای بررسی تیترا آنتی‌بادی ثانویه تکرار شد و ۷ روز بعد (روز ۳۹) خونگیری به عمل آمد.

برای بررسی فعالیت ایمنی سلولی از تست حساسیت شدید بازوفیل پوستی (CBH) استفاده گردید. بدین منظور در روز ۳۷ دوره آزمایش ابتدا ضخامت پرده بین انگشت دوم و سوم هر دو پای چپ و راست ۲ قطعه جوجه به ازای هر پن یا 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 پرده بین انگشت دوم و سوم پای چپ هر جوجه تزریق گردید. به پرده بین انگشت دوم و سوم پای راست نیز ۰/۱ میلی‌لیتر سالین تزریق گردید که به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. ضخامت پرده که قبل از تزریق با استفاده از میکرومتر دیجیتال اندازه‌گیری شده بود بعد از تزریق و به فواصل ۱۲ و ۲۴ ساعت دوباره اندازه‌گیری گردید. پاسخ به این تست از طریق مقدار تورم ایجاد شده که خود از کسر میزان تورم قبل از تزریق و بعد از تزریق در ساعات خاص به

1- Enzyme-linked immunosorbent assay

در تست اولیه ($P < 0.05$) گردید اما هیچ گونه اثر معنی‌داری بر پاسخ آنتی‌بادی علیه تست SRBC در تست ثانویه نداشت ($P > 0.05$). همچنین هیچ‌گونه اثر متقابل معنی‌داری از تیمارهای آزمایشی بر پاسخ اولیه و ثانویه آنتی‌بادی مشاهده نگردید ($P > 0.05$). همان‌طور که قبلاً ذکر گردید تغذیه جیره کنترل منفی به پرندگان باعث کاهش معنی‌دار ایمونوگلوبولین‌های M و ایمونوگلوبولین‌های کل گردید. گزارش شده است که یون‌های کلسیم نقشی اساسی و مهم در فعال‌سازی و بلوغ لنفوسیت‌ها دارند (۴ و ۱۰). همچنین مطالعات پیشین نشان داده است که غلظت داخل سلولی کلسیم در انواع مختلف سلول‌ها در طی استرس افزایش می‌یابد. برای مثال استرس محدودیت حاد فضای فیزیکی بسیج کلسیم در لنفوسیت‌های موش را افزایش می‌دهد (۲۷ و ۲۸). علاوه بر این یون‌های کلسیم برای تولید اینترلوکین ۲ توسط لنفوسیت‌های T ضروری هستند (۲۲). افزایش یون کلسیم باعث تحریک بیان mRNA ژن‌های اینترلوکین ۲ و سنتز پروتئین اینترلوکین ۲ می‌گردد (۱۸). وانگ و همکاران (۳۶) نیز گزارش کردند که افزایش بیان سیتوکین‌های اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما باعث تحریک تولید آنتی‌بادی در پرندگان می‌گردد. اینترلوکین ۲ به فاکتور رشد لنفوسیت T نیز مشهور است و برای تکثیر لنفوسیت نیز ضروری است زیرا می‌تواند باعث تحریک انتقال سلول‌های T فعال شده از فاز G1 به فاز S در سیکل سلولی گردد. یون‌های کلسیم به‌عنوان پیامبر ثانویه عمل می‌کنند که در بسیاری از فرآیندهای شیمیایی باعث ایجاد سیگنال‌های خارجی در پاسخ‌های سلولی می‌گردند (۳). کلسیم داخل سلولی در سلول‌های سیستم ایمنی بسیاری از اعمال سلولی شامل تولید سیتوکین، بیان رسپتور سیتوکین و تکثیر سلول را تنظیم می‌کند. افزایش یا کاهش کلسیم داخل سلولی اثر معنی‌داری بر ظرفیت عملکردی سلول‌های سیستم ایمنی دارد (۱۵). هاپیوکلسمی بر نقل و انتقال داخل سلولی کلسیم در لنفوسیتها تأثیر می‌گذارد. عدم تعادل کلسیم جیره به طور مشخص بر عملکرد سیستم ایمنی و از عوامل سرکوب عملکرد لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها به شمار می‌رود (۱۴). کانتورنا و همکاران (۵) گزارش کردند که اثر ویتامین D بر عملکرد سیستم ایمنی از طریق کلسیم جیره اعمال می‌گردد. آنها گزارش کردند که کلسیم جیره دارای اثرات مستقلی بر شدت بروز بیماری التهاب روده در موش‌ها دارد. مکمل‌سازی کلسیتریول در جیره‌های با کمبود کلسیم باعث بهبود علائم این بیماری گردیده است. به طور کلی مقدار کلسیم جیره از عوامل مهم تنظیم‌کننده پاسخ سیستم ایمنی در دستگاه گوارش و سیستم عصبی مرکزی می‌باشد (۵). افزایش تیترا آنتی‌بادی کل در اثر مکمل‌سازی بوزیدان قبلاً به وسیله دیویس و کوتان (۸) گزارش شده است. هر چند در این آزمایش فقط افزایش تیترا ایمونوگلوبولین G و فقط در تست اولیه مشاهده گردید.

ضخامت ۵ الی ۶ میکرومتر بریده شد. برش‌های حاصله داخل آب ۴۰ درجه سانتی‌گراد شناور شد تا پس از صاف شدن چروک‌های احتمالی، به راحتی روی لام قرار گیرند. لام‌های مربوطه روی صفحه گرمی قرار گرفت (۴۰-۴۵ درجه سانتی‌گراد) تا ضمن خشک شدن، پارافین‌های اضافی نیز ذوب شود. رنگ آمیزی 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 (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 ماهیچه محاسبه شد.

آنالیز آماری

آنالیز اطلاعات بصورت یک طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل $2 \times 3 \times 2$ (دو سطح کلسیم، سه سطح عصاره ریشه بوزیدان و دو سطح کلسیتریول) انجام شد. تجزیه و تحلیل کلیه اطلاعات با استفاده از روش GLM نرم افزار آماری SAS (۲۶) انجام شد. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده گردید.

نتایج و بحث

ایمنی هومورال

همان‌طور که از جدول ۲ پیداست کاهش ۳۰ درصدی سطح کلسیم جیره به طور معنی‌داری باعث کاهش پاسخ ایمونوگلوبولین M و ایمونوگلوبولین کل در تست‌های اولیه (۳۲ روزگی) و ثانویه (۳۹ روزگی) شده است ($P < 0.05$ و $P < 0.01$) برای ایمونوگلوبولین کل در تست ثانویه). اثر اصلی بوزیدان بر پاسخ ایمونوگلوبولین G در تست اولیه معنی‌دار است. به طوری که بیشترین پاسخ ایمونوگلوبولین G در سطح ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره بوزیدان مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری را با سطح ۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم و همچنین سطح صفر نشان می‌داد ($P < 0.05$). مکمل‌سازی بوزیدان اثر معنی‌داری را بر پاسخ ایمونوگلوبولین‌های M و کل در تست اولیه و همچنین بر پاسخ آنتی‌بادی در تست ثانویه نشان نداد ($P > 0.05$). پرندگانی که از جیره با سطح کاهش یافته ۳۰ درصدی کلسیم تغذیه کرده بودند در تست اولیه SRBC به طور معنی‌داری دارای پاسخ بیشتری از ایمونوگلوبولین G در مقایسه با گروه کنترل مثبت بودند ($P < 0.01$). اما این افزایش معنی‌دار در تست ثانویه مشاهده نگردید ($P > 0.05$). مکمل‌سازی کلسیتریول باعث کاهش تیترا آنتی‌بادی کل

جدول ۲- اثر بوزیدان، کلستریول و نوع جیره کنترل بر پاسخ آنتی‌بادی اولیه و ثانویه علیه تست ایمنی ^۱SRBC
Table 2- Effect of *Withania somnifera* (WS), 1, 25 (OH)₂ D₃ and type of control diet on blood characteristics of broilers at 21 and 42 days of age¹

جیره Control	تیمار Treatment		پاسخ اولیه آنتی‌بادی Primary antibody response			پاسخ ثانویه آنتی‌بادی Secondary antibody response		
	بوزیدان (میلی‌گرم بر کیلوگرم) WS (mg kg ⁻¹)	کلستریول (میکروگرم بر کیلوگرم) 1, 25 (OH) ₂ D ₃ (μg kg ⁻¹)	ایمونوگلوبولین G IgG	ایمونوگلوبولین M IgM	ایمونوگلوبولین کل Total	ایمونوگلوبولین G IgG	ایمونوگلوبولین M IgM	ایمونوگلوبولین کل Total
-	0	0	1.80	5.40	7.20	2	5.75	7.75
-	0	0.5	1.20	5.60	6.80	2.50	6	8.50
-	75	0	1	6.25	7.25	2	6.25	8.25
-	75	0.5	1.60	5	6.60	2.20	5.60	7.80
-	150	0	3.50	4.50	8	2	6.60	8.60
-	150	0.5	2	5.60	7.2	2.20	5.40	7.60
+	0	0	1.50	6.75	8.25	2	6.25	8.25
+	0	0.5	1.80	6	7.80	1.80	6.40	8.20
+	75	0	1.20	7.60	8.80	2.20	6.20	8.40
+	75	0.5	1.80	5.80	7.60	2.20	5.40	7.60
+	150	0	1.80	6.60	8.40	1.60	6	7.60
+	150	0.5	1.40	5.40	6.80	2.20	6.80	9
SEM			0.491	0.713	0.595	0.358	0.582	0.578
اثر اصلی Main effect								
جیره Control	-		1.81 ^a	5.39 ^b	7.14 ^b	2.16	5.8 ^b	8.04 ^b
	+		1.58 ^b	6.34 ^a	7.93 ^a	2	6.1 ^a	8.17 ^a
بوزیدان WS	0		1.57 ^b	5.89	7.47	2.05	6.11	8.17
	75		1.42 ^b	6.15	7.57	2.15	5.84	8
	150		2.11 ^a	5.57	7.57	2	6.16	8.16
کلستریول 1, 25 (OH) ₂ D ₃	0		1.77	6.22	8	1.96	6.16	8.12
	0.5		1.62	5.56	7.13	2.17	5.93	8.10
			P					
جیره Control			0.008	0.009	0.006	0.127	0.008	0.033
بوزیدان WS			0.001	0.593	0.554	0.449	0.494	0.641
کلستریول 1, 25 (OH) ₂ D ₃			0.282	0.140	0.040	0.208	0.659	0.645
بوزیدان × جیره Control × WS			0.177	0.883	0.260	0.512	0.620	0.960
کلستریول × جیره Control × 1, 25 (OH) ₂ D ₃			0.313	0.206	0.504	0.776	0.928	0.656
کلستریول × بوزیدان WS × 1, 25 (OH) ₂ D ₃			0.057	0.326	0.626	0.973	0.519	0.646
کلستریول × بوزیدان × جیره Control × WS × 1, 25 (OH) ₂ D ₃			0.175	0.891	0.727	0.469	0.394	0.268

^۱ در هر ستون بین میانگین‌های با حروف متفاوت، اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵).

^۱ Means within same column with different superscripts differ (P<0.05).

بیشترین وزن طحال در حالی که عدم مکمل‌سازی منجر به کمترین وزن طحال می‌گردد. همچنین این اثر متقابل نشان می‌دهد که صرف نظر از سطح عصاره هیدروالکلی ریشه بوزیدان در جیره‌های آزمایشی جوجه‌های گوشتی مکمل‌سازی سطح ثابت ۰/۵ میکروگرم در کیلوگرم کلستیرول هنگامی منجر به بالاترین وزن طحال می‌گردد که در جیره‌های کنترل مثبت مکمل‌گردد. به طوری که پرندگانی که جیره کنترل مثبت و سطح ۰/۵ میکروگرم کلستیرول در کیلوگرم جیره مصرف می‌کنند اختلاف معنی‌داری را از نظر وزن طحال با گروهی که جیره کنترل منفی و سطح ۰/۵ میکروگرم کلستیرول در کیلوگرم جیره دریافت می‌کنند نشان می‌دهند ($P < 0.05$). طحال از اندام‌های لنفوییدی ثانویه بدن است که در توسعه و تمایز لنفوسیت‌های B و T نقشی مهم دارد (۹ و ۳۵). وایت و همکاران (۳۹) گزارش کردند که طحال از محل‌های اصلی تولید آنتی‌بادی در بدن در مقابل هر گونه آنتی‌ژن می‌باشد و بالا رفتن وزن آن خود نشانه افزایش جمعیت سلولی و افزایش تولید سلول‌های ایمنی می‌باشد. این اثر متقابل جیره و کلستیرول به خوبی نشان می‌دهد که هر دوی کلسیم جیره و کلستیرول از فاکتورهای مهم تنظیم‌کننده پاسخ سیستم ایمنی می‌باشند که از طریق سیستم گوارشی و سیستم عصبی مرکزی این پاسخ‌ها را تنظیم می‌کنند (۵). همان‌طور که قبلاً ذکر شد میزان و قابلیت دسترسی کلسیم جیره نیز عامل مهمی است که بر درجه تاثیر کلستیرول بر پاسخ ایمنی تأثیر می‌گذارد (۵). نتایج این آزمایش راجع به نقش کلستیرول در سیستم ایمنی در تطابق با نتایج گارلیچ و همکاران (۱۱) می‌باشد که گزارش کردند مکمل‌سازی کلستیرول بالغ بر سطح ویتامین D جیره (4000 IU/kg) در جوجه بوقلمون‌ها منجر به وزن بیشتر طحال و پاسخ آنتی‌بادی بیشتر در مقایسه با گروه کنترل که فقط از ویتامین D تغذیه می‌کنند می‌شود. لنفوسیتها در مراحل معینی از تمایز و به محض فعال شدن دارای گیرنده‌های کلستیرول می‌باشند (۱). کلستیرول باعث توسعه سلول‌های Th2 می‌گردد که آنها نیز باعث رشد و تمایز سلول‌های B و متقابلاً القاء تولید ایمونوگلوبولین می‌گردند (۲ و ۱۲).

ریخت شناسی روده کوچک

به طوری که از جداول ۴ و ۵ پیداست اثر اصلی کلستیرول بر طول پرز در سن ۲۱ روزگی و بر عرض پرز در سن ۴۲ روزگی معنی‌دار است ($P < 0.05$). مکمل‌سازی ۰/۵ میکروگرم در کیلوگرم کلستیرول در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی به طور معنی‌داری باعث کاهش طول پرز در ۲۱ روزگی (کاهش ۶/۴۵ درصدی) و کاهش عرض پرز در ۴۲ روزگی (کاهش ۱۱/۸۷ درصدی) گردید.

مالک و همکاران (۱۷) گزارش کردند که خوراندن ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه دارویی بوزیدان به صورت دهانی و به مدت ۱۵ روز منجر به افزایش ۳ برابری تیترا ایمونوگلوبولین G در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد که در تطابق با نتایج این آزمایش می‌باشد. عصاره هیدروالکلی ریشه بوزیدان باعث افزایش تکثیر لنفوسیت‌های B و T می‌گردد، از ایمنی انتخابی نوع Th1 حمایت، باعث افزایش فعال‌سازی ماکروفاژ و ترشح ایمونوگلوبولین‌ها می‌شود که این خود بیانگر تحریک ایمنی سلولی و هومورال می‌باشد (۱۷). سواس و همکاران (۳۴) گزارش کردند که فعال‌سازی سلول‌های نوع T نیز به نوبه خود باعث فعال‌سازی سلول‌های دیگر سیستم ایمنی نظیر سلول‌های نوع B می‌گردد تا به سلول‌های پلاسمایی تولیدکننده آنتی‌بادی تمایز یابند که خود نقشی مهم در مقابل پاتوژن‌های خارج سلولی به‌عهده دارند. همان‌طور که از نتایج تست ایمنی SRBC پیداست افزایش معنی‌دار تیترا آنتی‌بادی در اثر مکمل‌سازی بوزیدان در تست ثانویه بر خلاف تست اولیه مشاهده نمی‌گردد. در این راستا لیتون و کلینمن (۱۶) نشان دادند که سلول‌های نوع B که در پاسخ ثانویه دخیل هستند به طور اساسی با آنهايي که در تست اولیه درگیر هستند متفاوت می‌باشند. لذا مکانیسم‌های درگیر در پاسخ اولیه با آنهايي که در پاسخ ثانویه درگیر هستند متفاوت می‌باشند.

ایمنی سلولی

تیمارهای آزمایشی هیچ‌گونه 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 ($P > 0.05$). لذا نتایج این جدول ارائه نشده است.

وزن اندام‌های لنفاوی

اثر بوزیدان، کلستیرول و نوع جیره کنترل بر وزن اندام‌های لنفاوی در جدول ۳ نشان داده شده است. تیمارهای آزمایشی هیچ‌گونه تأثیری بر وزن تیموس و بورس فابرسیوس در روزهای ۲۱ و ۴۲ نداشتند ($P > 0.05$). وزن طحال نیز در روز ۴۲ آزمایش در اثر تغذیه جیره‌های آزمایشی دستخوش تغییر نگردید. در روز ۲۱ دوره آزمایش اثرات اصلی بر وزن طحال معنی‌دار نبود. اما اثر متقابل بین جیره و کلستیرول بر وزن طحال معنی‌دار گردید ($P < 0.01$). اثر متقابل معنی‌دار بین جیره و کلستیرول نشان می‌دهد که صرف نظر از سطح عصاره هیدروالکلی ریشه بوزیدان در جیره‌های آزمایشی جوجه‌های گوشتی، در سطح کافی و توصیه شده کلسیم جیره یا همان کنترل مثبت مکمل‌سازی ۰/۵ میکروگرم در کیلوگرم کلستیرول منجر به

جدول ۳- اثر بوزیدان، کلستریول و نوع جیره کنترل بر وزن نسبی اندام‌های لنفاوی (گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن بدن) در سن ۲۱ روزگی^۱

Table 3- Effect of *Withania somnifera* (WS), 1, 25 (OH)₂D₃ and type of control diet on relative lymphoid organ weights (g/100 g of body weight) at 21 days of age¹

جیره Control	تیمار Treatment		وزن اندام‌های لنفاوی Lymphoid organs weight		
	بوزیدان (میلی‌گرم بر WS (mg کیلوگرم) kg ⁻¹)	کلستریول 1, 25 (OH) ₂ D ₃ (μg/kg)	تیموس Thymus	طحال Spleen	بورس فابرسیوس Bursa of Fabricius
-	0	0	0.86	0.114 ^{abc}	0.21
-	0	0.5	0.76	0.104 ^{abc}	0.22
-	75	0	0.81	0.125 ^{ab}	0.24
-	75	0.5	0.79	0.094 ^{bc}	0.21
-	150	0	0.75	0.111 ^{abc}	0.22
-	150	0.5	0.86	0.096 ^{bc}	0.22
+	0	0	0.96	0.090 ^c	0.25
+	0	0.5	0.89	0.106 ^{abc}	0.22
+	75	0	0.83	0.104 ^{abc}	0.25
+	75	0.5	0.88	0.130 ^a	0.24
+	150	0	0.89	0.098 ^{abc}	0.25
+	150	0.5	0.93	0.101 ^{abc}	0.20
SEM			0.086	0.009	0.031
اثر اصلی Main effect					
جیره		-	0.81	0.10	0.22
Control		+	0.90	0.10	0.23
بوزیدان		0	0.87	0.10	0.23
WS		75	0.83	0.11	0.23
		150	0.86	0.10	0.23
کلستریول		0	0.85	0.10	0.24
1, 25 (OH) ₂ D ₃		0.5	0.85	0.10	0.22
			P		
جیره			0.078	0.653	0.605
Control					
بوزیدان			0.787	0.207	0.947
WS					
کلستریول			0.984	0.726	0.317
1, 25 (OH) ₂ D ₃					
بوزیدان × جیره			0.876	0.433	0.751
Control × WS					
کلستریول × جیره			0.984	0.005	0.465
Control × 1, 25 (OH) ₂ D ₃					
کلستریول × بوزیدان			0.452	0.800	0.832
WS × 1, 25 (OH) ₂ D ₃					
کلستریول × بوزیدان × جیره			0.823	0.336	0.691
Control × WS × 1, 25 (OH) ₂ D ₃					

^۱ در هر ستون بین میانگین‌های با حروف متفاوت، اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P<0.05).

¹ Means within same column with different superscripts differ (P<0.05).

می‌کنند به طور معنی داری نسبت به آنهایی که از جیره کنترل مثبت تغذیه می‌کنند بیشتر است. این عدد با طول پرز نسبت مستقیم و با عمق کریپت نسبت معکوس دارد. به طوری که قبلاً نیز ذکر شد و در جدول ۴ نیز مشهود است پرندگان تغذیه شده با جیره کنترل منفی دارای عمق کریپت کمتری نسبت به کنترل مثبت هستند. اثر اصلی کلستیرول بر نسبت طول پرز به عمق کریپت در سن ۲۱ روزگی نیز معنی دار شده است ($P < 0.05$). به طوری که مکمل سازی ۰/۵ میکروگرم در کیلوگرم کلستیرول به طور معنی داری باعث کاهش این نسبت شده است. نتایج جدول ۵ نشان می‌دهد که اثر متقابل بین جیره و کلستیرول بر نسبت طول پرز به عمق کریپت در سن ۴۲ روزگی معنی دار است ($P < 0.05$). این اثر متقابل نشان می‌دهد که مکمل سازی ۰/۵ میکروگرم در کیلوگرم کلستیرول در جیره کنترل مثبت در مقایسه با جیره کنترل منفی به طور معنی داری باعث افزایش نسبت طول پرز به عمق کریپت می‌گردد (۵/۴۹) در مقایسه با ۳/۸۵ میکرومتر). در تقابل با نتایج این آزمایش چو و همکاران (۶) گزارش کردند که مکمل سازی ۲۵ هیدروکسی کوله کلسیفرول در سطوح ۳۴/۵ و ۶۹ میکروگرم در هر کیلوگرم جیره جوجه‌های گوشتی مازاد بر سطح ویتامین D3 جیره (IU/kg 3000) باعث افزایش طول پرزهای دئودنوم در ۲۱ و ۲۸ روزگی و پرزهای ژژونوم در ۱۴ و ۲۸ روزگی می‌گردد. همچنین منجر به کاهش عمق کریپت در قسمت دئودنوم در ۱۴ روزگی و در قسمت ژژونوم در ۲۱ و ۲۸ روزگی گردید (۶). نتایج این آزمایش در تقابل با نتایج اسپیلوگ و همکاران (۳۳) است که گزارش کردند تزریق عروقی غلظت‌های فیزیولوژیکی کوله کلسیفرول باعث افزایش ۳۰ درصدی طول پرزهای روده در جوجه می‌گردد. گزارش شده است که مکمل سازی ۲۵ هیدروکسی کوله کلسیفرول به مقدار IU 3000 افزون بر IU 1000 از این ماده در جیره مادری جوجه‌های گوشتی باعث کاهش طول و وزن روده جوجه‌ها در هفته اول بعد از جوجه درآوری می‌گردد (۳۰). چو و همکاران (۶) گزارش کردند که طول و وزن روده جوجه‌های گوشتی در اثر مکمل سازی ۲۵ هیدروکسی کوله کلسیفرول کاهش می‌یابد. همان‌طور که از جدول ۴ پیداست کاهش سطح کلسیم جیره در کنترل منفی باعث کاهش طول پرز ($P = 0.059$)، کاهش عمق کریپت ($P < 0.05$) و افزایش نسبت طول پرز به عمق کریپت ($P < 0.05$) شده است. شینکی و همکاران (۳۱) گزارش کردند که مقدار پوترسین روده به موازات افزایش و وجود کلسیم در روده افزایش می‌یابد که این مسئله خود بیانگر نقش پلی آمین‌ها و به‌ویژه پوترسین است که ارتباطی دو طرفه با کلسیم و جذب آن دارند. همان‌طور که قبلاً ذکر شد پوترسین از پلی آمین‌هایی است که نقشی مهم در تکثیر و تمایز سلول دارند. سلول‌های اپیتلیال روده دارای تجزیه و دوباره سازی سلولی سریع و همچنین شیب مشخصی از تمایز از منطقه کریپت به

اثر اصلی جیره بر عمق کریپت در سن ۲۱ روزگی معنی دار شده است ($P < 0.05$). در حالی که این اثر معنی دار در ۴۲ روزگی مشاهده نمی‌گردد ($P > 0.05$). اطلاعات نشان می‌دهد که کاهش ۳۰ درصدی سطح کلسیم جیره منجر به کاهش عمق کریپت در مقایسه با گروه کنترل مثبت شده است (کاهش ۱۱/۰۸ درصدی). اثرات متقابل معنی داری بین جیره و بوزیدان بر عرض پرز و عمق کریپت در سن ۴۲ روزگی مشاهده گردید ($P < 0.05$). اثر متقابل جیره و بوزیدان بر عرض پرز نشان داد که صرف نظر از سطح کلستیرول در جیره مکمل سازی ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره هیدروالکلی ریشه بوزیدان در جیره کنترل منفی منجر به بیشترین عرض پرز و مکمل سازی آن در جیره کنترل مثبت منجر به کمترین عرض پرز خواهد شد. همچنین این اثر متقابل بر عمق کریپت نشان می‌دهد که صرف نظر از سطح کلستیرول در جیره مکمل سازی سطح ثابت ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره هیدروالکلی ریشه بوزیدان هنگامی منجر به بیشترین عمق کریپت می‌شود که در جیره‌های کنترل منفی در مقایسه با کنترل مثبت مکمل شده باشد. اطلاعات به خوبی نشان می‌دهد که مکمل سازی ۱۵۰ میلی‌گرم از عصاره بوزیدان در جیره کنترل مثبت به طور هم‌زمان منجر به کاهش هر دوی عمق کریپت و عرض پرز می‌گردد. علاوه بر مطالب ذکر شده این اثر متقابل معنی دار نشان می‌دهد که در سطح کافی کلسیم جیره یا به عبارتی کنترل مثبت مکمل سازی ۷ میلی‌گرم از عصاره بوزیدان باعث افزایش عمق کریپت و مکمل سازی ۱۵۰ میلی‌گرم عصاره منجر به کاهش عمق کریپت می‌گردد. دیویس و کوتان (۷) گزارش کردند که گیاه دارویی بوزیدان محرک رشد موجود زنده و تحریک کننده سیستم ایمنی است و از این طریق اثرات مثبتی بر ساختار و عملکرد پرزها و سلول‌های اپیتلیال در همه بخش‌های روده دارد. تیمارهای آزمایشی در سن ۲۱ روزگی هیچ گونه تأثیری بر ضخامت لایه ماهیچه‌ای نداشتند ($P < 0.05$). اما اثر متقابل جیره و کلستیرول بر ضخامت لایه ماهیچه‌ای در سن ۴۲ روزگی معنی دار گردید ($P < 0.05$). این اثر متقابل نشان می‌دهد که مکمل سازی سطح ثابت ۰/۵ میکروگرم در کیلوگرم کلستیرول در جیره کنترل منفی نسبت به کنترل مثبت به طور معنی داری باعث افزایش ضخامت لایه ماهیچه‌ای می‌گردد (۴۶۶/۲۰) در مقایسه با ۳۳۴/۸۰ میکرومتر). همچنین این اثر متقابل نشان می‌دهد که در جیره‌های با کلسیم پایین یا به عبارتی در سطح ثابت کنترل منفی افزودن ۰/۵ میکروگرم کلستیرول در کیلوگرم باعث افزایش معنی داری در ضخامت لایه ماهیچه‌ای می‌گردد. اثر اصلی جیره بر نسبت طول پرز به عمق کریپت در سن ۲۱ روزگی معنی دار شده است اما این اثر اصلی معنی دار در سن ۴۲ روزگی وجود نداشت ($P > 0.05$). این اثر اصلی معنی دار نشان می‌دهد که نسبت طول پرز به عمق کریپت در پرندگانی که از جیره کنترل منفی تغذیه

مناطق دیگر پرز هستند. سلول‌های تکثیر شده در منطقه کریپت به سمت قله پرز مهاجرت می‌کنند.

جدول ۴- اثر بوزیدان، کلسیتریول و نوع جیره کنترل بر ریخت شناسی بخش ژژونوم روده کوچک جوجه‌های گوشتی در سن ۲۱ روزگی^۱

Table 4- Effect of *Withania somnifera* (WS), 1, 25 (OH)₂ D₃ and type of control diet on the jejunum morphology of broilers at 21 days of age¹

تیمار Treatment			خصوصیات ریخت‌شناسی ژژونوم Morphological characteristics of jejunum				
جیره Control	بوزیدان (میلی گرم بر کیلوگرم) WS (mg kg ⁻¹)	کلسیتریول (میکروگرم بر کیلوگرم) 1, 25 (OH) ₂ D ₃ (μg kg ⁻¹)	طول پرز (میکرومتر) Villus height (μm)	عرض پرز (میکرومتر) Villus width (μm)	عمق کریپت (میکرومتر) Crypt depth (μm)	ضخامت لایه ماهیچه ای (میکرومتر) Muscle depth (μm)	طول پرز به عمق کریپت (میکرومتر بر میکرومتر) Villus height: crypt depth ratio (μm μm ⁻¹)
-	0	0	1138.02	110.08	251.70	247.33	4.34
-	0	0.5	1036.18	98.27	248.16	257.55	4.18
-	75	0	1072.42	100.56	226.88	264.15	4.79
-	75	0.5	900.96	100.48	188.53	230.00	4.85
-	150	0	1094.48	93.36	208.56	276.15	5.40
-	150	0.5	1178.02	104.00	266.17	274.56	4.77
+	0	0	1198.68	96.18	240.20	299.50	4.98
+	0	0.5	1048.62	110.03	292.80	260.75	3.63
+	75	0	1152.77	102.19	257.47	276.06	4.53
+	75	0.5	1098.16	101.96	277.66	282.10	4.03
+	150	0	1245.37	103.44	260.38	245.25	4.32
+	150	0.5	1142.57	97.74	312.14	326.93	4.05
SEM			64.348	8.471	30.127	25.249	0.35
اثر اصلی Main effect							
جیره	-		1076.25	101.13	239.89 ^b	260.78	4.74 ^a
Control	+		1144.08	101.92	269.78 ^a	280.36	4.25 ^b
بوزیدان	0		1103.66	103.30	258.56	268.39	4.27
WS	75		1068.64	101.34	242.25	266.21	4.51
	150		1160.96	99.96	261.58	278.50	4.64
کلسیتریول	0		1147.13 ^a	100.87	232.89	269.31	4.76 ^a
1, 25 (OH) ₂ D ₃	0.5		1073.08 ^b	102.19	273.99	273.00	4.21 ^b
			P				
جیره			0.059	0.877	0.005	0.144	0.036
Control							
بوزیدان			0.104	0.809	0.406	0.622	0.376
WS							
کلسیتریول			0.044	0.830	0.275	0.805	0.032
1, 25 (OH) ₂ D ₃							
بوزیدان × جیره			0.554	0.966	0.412	0.843	0.190
Control × WS							
کلسیتریول × جیره			0.626	0.769	0.342	0.436	0.285
Control × 1, 25 (OH) ₂ D ₃							
کلسیتریول × بوزیدان			0.436	0.979	0.336	0.273	0.617
WS × 1, 25 (OH) ₂ D ₃							
کلسیتریول × بوزیدان × جیره			0.326	0.241	0.156	0.224	0.328
Control × WS × 1, 25 (OH) ₂ D ₃							

^۱ در هر ستون بین میانگین‌های با حروف متفاوت، اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵).

¹ Means within same column with different superscripts differ (P<0.05).

جدول ۵- اثر بوزیدان، کلسیتریول و نوع جیره کنترل بر ریخت‌شناسی بخش ژژونوم روده کوچک جوجه‌های گوشتی در سن ۴۲ روزگی^۱
Table 5- Effect of *Withania somnifera* (WS), 1, 25 (OH)₂D₃ and type of control diet on the jejunum morphology of broilers at 42 days of age¹

تیمار Treatment		خصوصیات ریخت‌شناسی ژژونوم Morphological characteristics of jejunum					طول پرز به عمق کریپت (میکرومتر بر میکرومتر) Villus height: crypt depth ratio ($\mu\text{m } \mu\text{m}^{-1}$)
جیره	ب بوزیدان (میلی‌گرم بر کیلوگرم) WS (mg kg^{-1})	کلسیتریول 1, 25 (OH) ₂ D ₃ ($\mu\text{g/kg}$)	طول پرز (میکرومتر) Villus height (μm)	عرض پرز (میکرومتر) Villus width (μm)	عمق کریپت (میکرومتر) Crypt depth (μm)	ضخامت لایه ماهیچه‌ای (میکرومتر) Muscle depth (μm)	
-	0	0	1690.30	111.75 ^b	352.20 ^a	371.56 ^{ab}	4.90 ^{abc}
-	0	0.5	1389.30	120.58 ^b	361.90 ^a	399.52 ^{ab}	3.85 ^c
-	75	0	1380.14	115.65 ^b	300.26 ^{ab}	405.88 ^{ab}	4.64 ^{abc}
-	75	0.5	1426.74	100.76 ^{ba}	278.46 ^{ab}	431.84 ^{ab}	5.12 ^{ab}
-	150	0	1432.20	160.07 ^b	326.88 ^{ab}	338.28 ^b	4.38 ^{abc}
-	150	0.5	1488.62	111.31 ^b	357.30 ^a	466.20 ^a	4.17 ^{bc}
+	0	0	1442.80	115.22 ^b	339.00 ^{ab}	419.00 ^{ab}	4.36 ^{abc}
+	0	0.5	1436.76	111.60 ^b	329.70 ^{ab}	334.80 ^b	4.44 ^{abc}
+	75	0	1321.02	131.35 ^b	355.30 ^a	368.43 ^{ab}	3.85 ^c
+	75	0.5	1426.26	113.52 ^b	294.38 ^{ab}	398.20 ^{ab}	4.89 ^{abc}
+	150	0	1317.25	107.54 ^b	290.47 ^{ab}	409.76 ^{ab}	4.68 ^{abc}
+	150	0.5	1400.85	99.05 ^b	251.62 ^b	352.04 ^{ab}	5.49 ^a
SEM			121.541	8.490	28.229	35.805	0.361
اثر اصلی Main effect							
جیره Control		-	1467.14	120.32	328.54	400.01	4.52
		+	1393.09	113.23	310.76	380.62	4.58
بوزیدان WS		0	1489.79	114.79	345.70	381.70	4.39
		75	1388.54	115.32	307.10	401.09	4.62
		150	1411.05	120.61	304.64	387.64	4.66
کلسیتریول 1, 25 (OH) ₂ D ₃		0	1434.53	124.15 ^a	328.62	384.33	4.46
		0.5	1426.90	109.41 ^b	310.67	396.86	4.65
P							
جیره Control			0.292	0.153	0.142	0.310	0.623
بوزیدان WS			0.472	0.833	0.123	0.749	0.497
کلسیتریول 1, 25 (OH) ₂ D ₃			0.972	0.031	0.366	0.588	0.375
بوزیدان × جیره Control × WS			0.896	0.004	0.035	0.875	0.056
کلسیتریول × جیره Control × 1, 25 (OH) ₂ D ₃			0.384	0.537	0.260	0.026	0.041
کلسیتریول × بوزیدان WS × 1, 25 (OH) ₂ D ₃			0.332	0.159	0.356	0.433	0.058
کلسیتریول × بوزیدان × جیره Control × WS × 1, 25 (OH) ₂ D ₃			0.707	0.302	0.857	0.188	0.845

^۱ در هر ستون بین میانگین‌های با حروف متفاوت، اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P<0.05).

^۱ Means within same column with different superscripts differ (P<0.05).

نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت تأثیر منفی بر هضم و جذب دارد (۲۰).

نتیجه گیری کلی

آزمایشات پاسخ ایمنی هومورال نشان داد که کاهش ۳۰ درصدی سطح کلسیم جیره باعث کاهش تیترا آنتی‌بادی کل می‌گردد. عصاره هیدروالکلی ریشه بوزیدان در سطح ۱۵۰ میلی‌گرم اثرات مطلوبی بر تیترا آنتی‌بادی اولیه دارد. اطلاعات ریخت‌شناسی روده نشان داد که مکمل‌سازی کلسیتریول در جیره اثرات مطلوبی بر ریخت‌شناسی روده ندارد. همچنین این اطلاعات نشان می‌دهد که مکمل‌سازی عصاره بوزیدان در جیره‌های آزمایشی تأثیری بر خصوصیات روده ندارد.

در سلول‌های کریپت پلی آمین‌ها (پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین) به طور متوالی از اورنیتین ساخته می‌شوند. در طی مهاجرت سلول‌های کریپت به سمت قله پرز تغییرات قابل ملاحظه‌ای در متابولیسم پلی آمین‌ها رخ می‌دهد. پوترسین در سلول‌های پرز عمدتاً از اسپرمیدین تشکیل می‌شود. فعالیت آنزیم‌های کاتالیز کننده واکنش‌های تولید پوترسین یعنی اورنیتین دکربوکسیلاز و اسپرمیدین ان استیل ترانسفراز در غشاء مخاطی پرز به ترتیب در منطقه کریپت و خود پرز بالا می‌باشد (۳۱). یونی و فرکت (۳۶) گزارش کردند که ساختار و عملکرد اولیه دستگاه گوارش مسئله‌ای مهم در عملکرد اولیه جوجه‌های گوشتی است. لذا بهبود عملکردی ظرفیت روده در این سن مطلوب است. توسعه کریپت مرحله‌ای مهم در فرآیند بلوغ روده می‌باشد (۳۷). نسبت طول پرز به عمق کریپت نیز شاخصی مفید برای تخمین ظرفیت هضمی روده کوچک است. به طوری که کاهش

منابع

- Aslam, S. M., J. D. Garlich, and M. A. Qureshi. 1998. Vitamin D deficiency alters the immune responses of broiler chicks. *Poultry Science*, 77(6): 842-9.
- Beal, R. K., P. Wigley., C. Powers., S. D. Hulme., P. A. Barrow, and A. L. Smith. 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. 1985. The molecular basis of communication within the cell. *Scientific American*, 253:142-152.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, and H. L. Roderick. 2003. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4: 517-529.
- Cantorna, M. T., Y. Zhu., M. Froicu, and A. Wittke. 2004. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(6): 1717S-1720S.
- Chou, S. H., T. K. Chung, and B. Yu. 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 G. Kuttan. 1998. Suppressive effect of cyclophosphamide-induced toxicity by *Withania somnifera*. *Journal of Ethno pharmacology*, 71: 193-200.
- Davis, L, and G. Kuttan. 2000. Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*". *Journal of Ethno pharmacology*, 62: 209-214.
- Eerola, E., T. Veromaa, and P. Toivanen. 1987. Special features in the structural organization of the avian lymphoid system. Pages 9-22 In *Avian Immunology: Basis and Practice*. Toivanen, A, and P. Toivanen, ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- Feske, S. 2007. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature Reviews Immunology*, 7: 690-702.
- Garlich, J. D., M. A. Qureshi., P. R. Ferket, and S. M. Aslam. 1992. Immune system modulation by dietary calcium. Pages 99-106 in: *Proceedings of the 19th World's Poultry Congress*, Amsterdam, Netherlands.
- Kazemi Fard, M., H. Kermanshahi., M. Rezaei, and A. Golian. Effect of fennel extract and vitamin D3 on hatchability and qualitative characteristics of chicks in post molt broiler breeder performance. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 6(3): 197-207. (In Persian)
- Kenney, A. D. 1976. Vitamin D metabolism: Physiological regulation in egg-laying Japanese quail. *American Journal of Physiology*, 230: 1606-1616.
- Kimura, K., J. P. Goff, and M. E. Kehrli, J. 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: 2385-92.
- Kimura, K., T. A. Reinhardt, and J. P. Goff. 2006. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89: 2588-2595.

- 16- Linton, P. J. and N. R. Klinman. 1992. The generation of memory B cells. *Seminars in Immunology*, 4: 3-9.
- 17- Malik, F., J. Singh., A. Khajuria., K. Suri., N. Satti, and S. Singh. 2007. A standardized root extract of *Withania somnifera* and its major constituent withanolide-A elicit humoral and cell-mediated immune responses by up-regulation of Th1-dominant polarization in BALB/c mice. *Life Science*, 80: 525–1538.
- 18- McCrady, C. W., C. M. Ely., E. Westin, and R. A. Carchman. 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: 18537-18544.
- 19- Mirakzahi, M. T., H. Kermanshahi., A. Golian, and A. R. Raji. 2014. The effects of dietary 1, 25-dihydroxycholecalciferol and hydroalcoholic extract of *Withania somnifera* root on bone mineralisation and strength in broiler chickens. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 6(3): 313-324. (In Persian)
- 20- Montagne, L., J. R. Pluske, and D. J. Hampson. 2003. A review of interactions between DF and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Science and Technology*, 108: 95-117.
- 21- Mu, H. H, and W. A. Sewell. 1994. Regulation of DTH and IgE responses by IL-4 and IFN-gamma in immunized mice given pertussis toxin. *Immunology*, 83: 639-45.
- 22- Negulescu, P. A., N. Shastri, and M. D. Cahalan. 1994. Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(7): 2873-2877.
- 23- Qureshi, M. A, and G. B. Havenstein. 1994. A comparison of the immune performance of a 1991 commercial broiler with a 1957 randombred strain when fed 'typical' 1957 and 1991 broiler diets. *Poultry Science*, 73:1805–1812.
- 24- Reddy, G. S, and K. Y. Tserng. 1989. Calcitroic acid, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ through C-24 oxidation pathway. *Biochemistry*, 28: 1763–1769.
- 25- Ross. 2007. Ross 308 Broiler: Nutrition Specification. Aviagen, Scotland, UK. Accessed May 25, 2009. Available at <http://www.aviagen.com/>.
- 26- SAS Institute. 2000. SAS User's Guide: Statistics, Version 9.1 Edition. Cary, NC, USA.
- 27- Satoh, E., H. Edamatsu, and Y. Omata. 2006. Acute restraint stress enhances calcium mobilization and proliferative response in splenic lymphocytes from mice. *Stress*, 9(4): 223-30.
- 28- Sei, Y., T. McIntyre., P. Skolnick, and P. K. Arora. 1991. Stress modulates calcium mobilization in immune cells. *Life Science*, 49: 671-6.
- 29- Shinki, T., H. Tanaka., J. Takito., A. Yamaguchi., Y. Nakamura., S. Yoshiki, and T. Suda. 1991. Putrescine is involved in the vitamin D action in chick intestine. *Gastroenterology*, 100: 113–122.
- 30- Shinki, T., N. Takahashi., T. Kadofuku., T. Sato, and T. Suda. 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.
- 31- Shinki, T., T. Kadofuku., T. Sato, and T. Suda. 1986. Spermidine N1-acetyltransferase has a larger role than ornithine decarboxylase in 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃-induced putrescine synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 261: 11712-6.
- 32- Soares, J. H. Jr. 1984. Calcium metabolism and its control-a review. *Poultry Science*, 63: 2075–2083.
- 33- Spielvogel, A. M., R. D. Farley, and A. W. Norman. 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: 359-66.
- 34- Suvas, S., V. Singh., S. Sahdev., H. Vohra, and J. N. Agrewala. 2002. Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 7766-75.
- 35- Toivanen, P., A. Naukkarinen, and O. Vainio. 1987. What is the function of bursa of Fabricius? Pages 79–100 In *Avian Immunology: Basis and Practice*. Toivanen, A, and P. Toivanen, ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- 36- Uni, Z. and P. R. Ferket. 2004. Methods for early feeding and their potential. *World Poultry Science Journal*, 60: 101-111.
- 37- Uni, Z., A. Geyra., H. Ben-Hur, and D. Sklan. 2000. Small intestinal development in the young chick: crypt formation and enterocyte proliferation and migration. *British Poultry Science*, 41(5): 544-551.
- 38- Wang, Z. H., C. A. Vidair, and W. C. Dewey. 1991. Maintenance of intracellular free Ca²⁺ homeostasis following lethal heat shock. *Radiation Research*, 128: 104–107.
- 39- White, R. G., D. C. Henderson., M. B. Eslami, and K. H. Neilsen. 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.
- 40- Yamamoto, Y, and B. Glick. 1982. A comparison of the immune response between two lines of chickens selected for differences in the weight of the bursa of Fabricius. *Poultry Science*, 61: 2129–2132.

- 41- Yamauchi, K., T. Buwjoom., K. Koge, and T. Ebashi. 2006. Histological alterations of the intestinal villi and epithelial cells in chickens fed dietary sugar cane extract. *British Poultry Science*, 47: 544-553.
- 42- Yang, S., C. Smith., J. M. Prahl., X. Luo, and H. F. DeLuca. 1993. Vitamin D deficiency suppresses cell-mediated immunity in vivo. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(1): 98-106.



The Effects of Dietary 1, 25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol) and Root Hydroalcoholic Extract of *Withania somnifera* on Immune Response and Small Intestinal Morphology of Broiler Chickens

M. T. Mirakzahi^{1*} - H. Kermanshahi² - A. Golian² - H. Saleh¹ - M. J. Agah³

Received: 18-05-2014

Accepted: 12-09-2015

Introduction 1, 25-dihydroxycholecalciferol [1, 25 (OH)₂ D₃], the major biologically active metabolite of vitamin D₃ is produced by two sequential hydroxylation reactions. The first hydroxylation occurred when vitamin D₃ is transported to the liver, forming 25-hydroxycholecalciferol [25-(OH) D₃] and the second in the kidney, by the enzyme 1-alpha-hydroxylase (VD₃ 1α hydroxylase) forming 1, 25 (OH)₂ D₃. Vitamin D₃ may have a role in regulating the morphological and functional development of intestinal villus mucosa. Calcium ions have an essential role function in activation and maturation of lymphocytes. Previous studies have demonstrated that the intracellular concentration of free Ca²⁺ increases in several types of cells during stress. For example, acute restraint stress enhances Ca²⁺ mobilization in lymphocytes from mice. In addition, Ca²⁺ ions are essential for production of interleukin-2 by T cells (22). *Withania somnifera* (WS) is an annual herb and a rich source of bioactive compounds. Several pharmacological activities of the plant have been attributed to its roots. Oral administration of root extract of WS at 10, 30 and 300 mg/kg body weight for 15 days stimulated B and T cells proliferation, induced type 1 immunity, increased the activity of macrophage and levels of immunoglobulin which indicated the potent role of extract on humoral and cellular immunity. The present study aimed to evaluate the main effects and interaction of calcitriol and WS root extract in either low or adequate Ca diets on immune response and small intestinal morphology of broiler chickens.

Material and Methods Six hundred male day old Ross 308 broilers obtained from a commercial hatchery, and reared in 60 floor pens with wood shavings litter at a stocking rate of 10 birds per pen (1×1 m). Feed and water were provided *ad libitum* throughout the 6-wk experimental period. The experimental design was a 2×3×2 factorial comprising of two dietary concentration of Ca (negative and positive control), three concentrations of WS root extract (0, 75 and 150 mg/kg diet), two concentrations of 1, 25 (OH)₂ D₃ (0 and 0.5 μg/kg diet). SRBC test was used to measure humoral immunity response. So, at 25 and 32 days of age chicks were injected to evaluate the primary and secondary antibody response. On d 21 and 42, one bird per replicate was killed to determine small intestinal morphology and lymphoid organ weights. Sample sections (2.5 cm in length) were taken from the middle region of the jejunum. The tissues were stained for measurement of villus length, villus width, crypt depth and thickness of muscle layer. The General Linear Models of SAS were used to analyse all the data.

Results and Discussion The results of humoral immune response showed that reduction of dietary Ca level by 30% resulted to depression of immunoglobulin M and total antibody levels. Supplementation of WS at 150 mg/kg significantly improved the level of immunoglobulin G only in primary test. Calcium ions have an essential role function in activation and maturation of lymphocytes (10). Previous studies have demonstrated that the intracellular concentration of free Ca²⁺ increases in several types of cells during stress. For example, acute restraint stress enhances Ca²⁺ mobilization in lymphocytes from mice. In addition, Ca²⁺ ions are essential for production of interleukin-2 by T cells. It was found that supplementation of calcitriol resulted in shorter villus length at 21 d and shorter villus width at 42 day of age, respectively. Reduction of dietary Ca level by 30% resulted to shorter crypt depth compared to positive control diet. A researcher reported that supplementation of 25-OH-D₃ decreased the length and weight of small intestine. The duodenal putrescine content was enhanced in parallel with the increase in intestinal calcium absorption, suggesting that polyamines, in particular putrescine, may be involved somehow in the intestinal calcium transport mechanism. The aliphatic polyamines, putrescine, spermidine, and spermine, are considered to be essential cell constituents that play an important role in modulating cell proliferation and differentiation.

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

2- Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran,

3- Assistant Professor of Animal Science Department, Fars Research Center for Agriculture and Natural Resources, Shiraz, Iran.

(*- Corresponding Author Email: mt_mirakzahi@yahoo.com)

Conclusion The results of humoral immune response showed that decreasing of dietary Ca level to 30% resulted to reduction of total antibody response. The findings showed that supplementation of calcitriol did not exert beneficial effects on intestine morphology. Supplementation of WS root extract did not affect intestine characteristics.

Keywords: Broiler chicken, Calcitriol, Immune response, Intestine morphology, *Withania somnifera*.