نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۸، پاییـز ۱۳۹۹
ص‌ص: ۲۰۵~۲۱۶

پاسخ ایمنی و فعالیت‌های آنزیمی جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی به داروی نیتروگلیسیرین

- **محمد حسین نعمتی** (نویسنده مسئول)

استادیار بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی زنجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان، ایران.

- **سید سعید موسوی**

استادیار پژوهشی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، زنجان-ایران.

- **صیفعلی ورمقانی**

استادیار پژوهشی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان ایلام، ایلام-ایران.

تاریخ دریافت : فروردین ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش : مهر ۱۳۹۸

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۶۴۱۹۵۲۲
Email: Nemati.mh1354@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2019.125912.1902

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی تاثیر افزودن داروی آهسته رهش نیتروگلیسرین بر جلوگیری از بروز سندرم آسیت در جوجه‌های گوشتی انجام شد. تعداد ۵۰۰ قطعه جوجه گوشتی نر در سن هفت روزگی در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تیمار، ۵ تکرار و ۲۰ قطعه جوجه در هر تکرار، مورد استفاده قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی شامل ۱- گروه شاهد مثبت (بدون القاء آسیت و بدون افزودن داروی نیتروگلیسیرین) ۲- گروه شاهد منفی (القاء آسیت بدون افزودن داروی نیتروگلیسیرین)، تیمارهای ۳، ٤ و ٥ به ترتیب شامل القاء آسیت به همراه ٥، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره از داروی نیتروگلیسیرین بودند. برای القای تنش سرمایی، از سن ۱۵ تا ٤۲ روزگی، دمای سالن در حد ۱۵ درجه سانتی‌گراد، ثابت نگه داشته شد. پاسخ‌های ایمنی خونی و سلولی و همچنین غلظت آنزیم‌های سرم خون مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که تنش سرمایی منجر به کاهش معنی‌دار وزن نسبی طحال و تیموس شد (P<۰/۰٥) ولی اثری بر وزن نسبی غده بورس فابریسیوس نداشت. استفاده از داروی نیتروگلیسیرین منجر به افزایش معنی‌دار وزن نسبی طحال و تیموس شد (P<۰/۰٥). پاسخ ایمنوگلوبولین M و حساسیت بازوفیلی پوستی در نتیجه تنش سرمایی، کاهش و استفاده از نیتروگلیسیرین بطور معنی‌داری آنها را افزایش داد (P<۰/۰٥). غلظت آنزیم‌های آسپارتات آمینو ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز در نتیجه تنش سرمایی، افزایش یافت و استفاده از غلظت ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نیتروگلیسیرین در جیره، مقادیر آنها را بطور معنی‌داری کاهش داد (P<۰/۰٥). شاخص پراکسیداسیون لیپید در نتیجه استفاده از نیتروگلیسیرین بطور متمایل به معنی‌داری (P=۰/۰٦) بهبود یافت. در مجموع، نتایج این پژوهش نشان دادند که استفاده از سطح ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم داروی فشار خون نیتروگلیسیرین در شرایط تنش سرمایی، منجر به بهبود پاسخ‌های ایمنی و آنزیمی جوجه‌های گوشتی شد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم، پاسخ ایمنی، تنش سرمایی، جوجه‌های گوشتی، نیتروگلیسیرین.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 128 pp: 205-216

Immune response and enzymatic activities of broiler chicks under cold stress to nitroglycerin.

By: M.H. Nemati[1*], S.S. Mosavi[2], S.A. Varmaghani[3]
1: Assistant Professor Animal Science Research Department, Zanjan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zanjan, Iran (*Corresponding Author).
2:Animal Science Research Department, Zanjan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zanjan, Iran.
3:Animal Science Research Department, Ilam Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Ilam, Iran.

Received: April 2019 **Accepted: October 2019**

This experiment was conducted to evaluate the effect of addition of nitroglycerin (NG) slow release drug on prevention of ascites syndrome in broiler chickens. A total of 500 male broiler chicks at 7 day of age were used in a completely randomized design with 5 treatments, 5 replicates and 20 chicks per each replication. The experimental treatments included: 1) positive control group (without induction of ascites and without addition of NG); 2) negative control group (induction of ascites without adding NG), and treatments 3, 4 and 5, including induction of ascites with 5, 10 and 20 mg NG /kg diet, respectively. In order to induce cold stress, the rearing house temperature was fixed at 15^{o}C from 15 until 42 day of age. The humeral and cellular immune responses as well as blood serum enzyme concentrations were evaluated. The results showed that cold stress significantly reduced the relative weights of spleen and thymus ($P<0.05$) but had no significant effect on relative weight of bursa of Fabricius gland. The utilization of NG significantly increased the relative weights of spleen and thymus ($P<0.05$). The immunoglobulin M response and cutaneous basophilic sensitivity decreased as a result of cold stress, and significantly increased by using NG ($P<0.05$). The concentration of aspartae amino transferase and lactate dehydrogenase enzymes increased as a result of cold stress and addition of 20 mg NG/kg diet significantly decreased the mentioned enzymes concentration ($P<0.05$). The lipid peroxidation index improved near meaningfully as a result of dietary NG ($P= 0.06$). In general, the results of this study showed that using 20 mg NG/kg diet in cold stress condition led to improvement in immune and enzymatic responses of broiler chickens.

Key words: enzyme, immune response, cold stress, broilers, nitroglycerin.

مقدمه

سندرم آسیت نه تنها از طریق مرگ و میر بلکه از طریق کاهش سرعت رشد و ضبط لاشه در کشتارگاه، باعث بروز خسارات زیادی می‌شود به طوری که این سندرم بیش از ۲۵ درصد مرگ و میر جوجه‌های گوشتی را به خود اختصاص می‌دهد. با توجه به پرورش سالانه ۴۰ بیلیون قطعه جوجه گوشتی در جهان، میزان ضایعات ناشی از این سندرم چشمگیر است (Guo و همکاران، ۲۰۰۷). با توجه به این که سالانه بیش از یک میلیارد و دویست میلیون قطعه جوجه گوشتی در داخل کشور پرورش داده می‌شود، میزان تلفات و ضایعات ناشی از این سندرم، بسیار بالا می‌باشد (بی‌نام، ۱۳۹۱).

افزایش سرعت رشد و در نتیجه افزایش نیاز به اکسیژن، می‌تواند آغازگر بروز سندرم آسیت در جوجه‌های گوشتی باشد. شرایط فشار نسبی کم اکسیژن منجر به افزایش تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین شده و در نتیجه سبب افزایش مقاومت عروق خونی به جریان خون می‌شود. پیشنهاد شده است که با کاهش مقاومت عروق ششی توسط گشاد کننده‌های عروقی،

می توان فشار خون ریوی و در نهایت برون‌دهی قلب را کاهش داد و از بروز ناهنجاری افزایش فشار خون ریوی جلوگیری کرد (Wideman و همکاران، ۲۰۱۳). اکسید نیتریک، مولکولی با یک الکترون منفرد و یک رادیکال آزاد است. این مولکول در غلظت بالا، اکسید شده و تولید نیتریت می‌نماید اما در غلظت پایین، نقش‌های بیولوژیکی فراوانی در بدن ایفا می‌کند. اکسید نیتریک به عنوان یک گشاد کننده قوی عروق، به طور مستقیم از طریق شل کردن عضلات صاف رگ ها، مقاومت رگ‌های ریوی را کاهش می‌دهد. همچنین باعث کاهش یا توقف تولید و آزاد سازی مواد منقبض کننده رگ مانند سرتونین، ترمبوکسان و اندوتلین-۱ می‌شود (Wideman و همکاران، ۲۰۰۷). اکسید نیتریک بوسیله اکسید نیتریک سنتاز اندوتلیومی (eNOS) از ال-آرژنین ساخته می‌شود. وجود فشار خون سیستمیک در حیوانات فاقد اکسید نیتریک سنتاز اندوتلیومی به اثبات رسیده است که این امر نشان می دهد اکسید نیتریک از طریق گشاد کردن مویرگ‌های محیطی، در کاهش مقاومت در برابر جریان خون نقش دارد (Huang و همکاران، ۱۹۹۵).

گزارش شده است که مکمل کردن جیره با ال-آرژنین منجر به افزایش سطح اکسید نیتریک پلاسما، اتساع رگ‌ها، کاهش مقاومت رگ های ریوی، بهبود جریان خون ریوی و کاهش تفات ناشی از سندرم افزایش فشار خون ریوی در جوجه‌های گوشتی می‌شود (Tan و همکاران، ۲۰۰۷). نشان داده شده است که استفاده از جیره حاوی ۱۰ گرم در کیلوگرم مکمل آرژنین، سندرم فشار خون ریوی را در جوجه‌های گوشتی کاهش می‌دهد. در شرایط تنش محیطی، ال-آرژنین به عنوان یک سوبسترا برای تولید اکسید نیتریک که یک گشاد کننده قوی رگ‌های ریوی در جوجه‌های گوشتی است، عمل می‌کند (Wideman و همکاران، ۱۹۹۵).

افزایش فشار خون می تواند دلایل متعددی داشته باشد و شناخت دقیق عامل موثر بر افزایش فشار خون، بسیار مشکل است. بر اساس نوع فشار خون، داروهای مختلف با مکانیسم عمل‌های متفاوت، توصیه شده است (Prasad و همکاران، ۲۰۰۰). در خصوص استفاده از داروهای شیمیایی جهت کنترل عارضه آسیت در جوجه‌های گوشتی نیز تحقیقات متعددی صورت گرفته است (Wu و همکاران، ۲۰۰۷). برای مثال Wideman و همکاران (۱۹۹۵) از داروهای قلبی فروزماید، کارودیلول و پریندوپریل، Forman و Wideman (۲۰۰۱) از داروی قلبی فروزماید، Ocampo و همکاران (۱۹۹۸) از داروی قلبی کلن بوترول و Ozdemir و همکاران (۲۰۰۰) از داروی قلبی لیزینوپریل استفاده کردند. کاهش میزان اکسید نیتریک حاصل از دیواره داخلی عروق ششی در جوجه‌های مبتلا به آسیت، گزارش شده است (Moreno and Hernandez, 2003). با توجه به اینکه در شرایط تنش و بروز آسیت، پاسخ ایمنی و فعالیت‌های آنزیمی تحت تاثیر قرار می‌گیرند (دانشیار و همکاران، ۲۰۰۹؛ فتحی و همکاران، ۲۰۱۱) و با توجه به مکانیسم عمل داروی نیتروگلیسیرین از جمله انبساط عروق ششی و کاهش فشار خون ریوی از طریق آزاد کردن اکسید نیتریک، پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر افزودن داروی آهسته رهش نیتروگلیسرین بر پاسخ ایمنی و فعالیت آنزیمی جوجه‌های گوشتی تحت شرایط القای آسیت انجام شد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۵۰۰ قطعه جوجه گوشتی نر در سن هفت روزگی در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تیمار، ۵ تکرار و ۲۰ قطعه جوجه در هر تکرار مورد استفاده قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی شامل ۱- گروه شاهد مثبت (بدون القاء آسیت و بدون افزودن داروی نیتروگلیسیرین، Nitroglycerin 6.4- Shafa)، ۲- گروه شاهد منفی (القاء آسیت بدون افزودن داروی نیتروگلیسیرین) ۳- القاء آسیت به همراه ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره از داروی نیتروگلیسیرین ۴- القاء آسیت به همراه ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره از داروی نیتروگلیسیرین و ۵- القاء آسیت به همراه ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره از داروی نیتروگلیسیرین بودند. جیره‌های آزمایشی بر اساس احتیاجات مواد مغذی در راهنمای پرورش سویه راس ۳۰۸ برای سه مرحله آغازین (سن یک تا ۱۰ روزگی)، رشد (سن ۱۱ تا ۲۴ روزگی) و پایانی (سن ۲۵ تا ۴۲

روزگی) تنظیم شدند (جدول ۱). برای القای آسیت، از سن ۱۵ رو زگی دمای سالن روزانه حدود ۲ درجه سانتی‌گراد کاهش داده شد تا در سن ۲۱ روزگی به دمای ۱۵ درجه سانتیگراد رسید و تا پایان دوره پرورش، در همین درجه حرارت باقی ماند. تیمار شاهد مثبت تحت شرایط دمایی توصیه شده (۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد) بعد از سن ۲۱ روزگی در سالن مشابهی، بطور جداگانه پرورش داده شد. رطوبت سالن پرورش ۵۰ تا ۶۰ درصد و برنامه نوری شامل ۲۳ ساعت روشنایی و یک ساعت خاموشی بود. واکسیناسیون جوجه‌ها بر علیه بیماری‌های برونشیت، نیوکاسل، آنفلونزا و گامبورو به ترتیب در روزهای۱، ۹، ۹ و ۱۵ انجام شد.

جدول ۱- اجزای تشکیل دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره‌های مورد استفاده در آزمایش

اقلام خوراکی (درصد)	سن ۱۰-۰ روزگی	سن ۲۴-۱۱ روزگی	سن ۴۲-۲۵ روزگی
ذرت	۴۸ /۳۴	۵۶ /۲۴	۶۴ /۱۴
کنجاله سویا	۴۳ /۲۰	۳۶ /۷۵	۳۰ /۱۶
روغن سویا	۴ /۶۰	۳ /۳۲	۱ /۹۹
دی کلسیم فسفات	۱ /۵۲	۱ /۴۷	۱ /۳۶
کربنات کلسیم	۱ /۳۱	۱ /۱۵	۱/۱
نمک	۰ /۳۷	۰ /۳۷	۰ /۳۷
مکمل ویتامینی[1]	۰ /۲۵	۰ /۲۵	۰ /۲۵
مکمل مواد معدنی[2]	۰ /۲۵	۰ /۲۵	۰ /۲۵
دی-ال متیونین	۰ /۱۳	۰ /۱۵	۰ /۱۶
ال-لیزین هیدروکلراید	۰ /۰۳	۰ /۰۵	۰ /۲۲
ترکیب مواد مغذی محاسبه شده			
انرژی قابل سوخت و ساز (Kcal/Kg)	۳۰۰۰	۳۰۰۰	۳۰۰۰
پروتئین خام (درصد)	۲۳ /۰۰	۲۰ /۸۳	۱۸ /۷۵
کلسیم (درصد)	۰/۹۶	۰ /۸۸	۰ /۸۱
فسفر قابل دسترس (درصد)	۰ /۴۵	۰ /۴۳	۰ /۴
سدیم (درصد)	۰ /۱۷	۰ /۱۷	۰/ ۱۷
کلر (درصد)	۰/۱۹	۰/۱۹	۰/۱۸
لیزین (درصد)	۱ /۴	۱ /۲۷	۱ /۲
متیونین (درصد)	۰ /۵۳	۰ /۵۱	۰ /۴۸
متیونین+ سیستین (درصد)	۰/۹۶	۰/۸۵	۰/۸۲
آرژنین (درصد)	۱/۵۵	۱/۴۰	۱/۲۷
تعادل کاتیون- آنیون جیره (mEq/kg)[3]	۲۲۵	۲۲۰	۲۱۷

[1] مقادیر ویتامین‌ها به ازای هر کیلوگرم جیره: ویتامین A، ۱۲۰۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین D_3، ۵۰۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین E، ۷۵ واحد بین‌المللی؛ ویتامین K_3، ۲/۸ میلی‌گرم؛ تیامین، ۳/۱۳ میلی‌گرم؛ ریبوفلاوین، ۷/۹۲ میلی‌گرم؛ نیاسین، ۵۵/۶۳ میلی‌گرم؛ اسید پانتوتنیک، ۱۸/۲۲ میلی‌گرم؛ پیریدوکسین، ۴/۸۶ میلی‌گرم؛ اسید فولیک، ۲/۲ میلی‌گرم؛ بیوتین، ۰/۳ میلی‌گرم؛ ویتامین B_{12}، ۰/۰۱۸ میلی‌گرم؛ کولین کلراید، ۱۵۰۰ میلی‌گرم و آنتی اکسیدان، ۱/۲ میلی‌گرم.

[2] مقادیر مواد معدنی به ازای هر کیلوگرم جیره: منگنز، ۱۰۰ میلی‌گرم؛ روی، ۱۰۰ میلی‌گرم؛ آهن، ۲۰ میلی‌گرم؛ مس، ۱۲/۳۴ میلی‌گرم؛ ید، ۱/۲ میلی‌گرم و سلنیوم، ۰/۳ میلی‌گرم.

[3] $Na^+ + K^+ - Cl^-$

برای سنجش میزان پاسخ اولیه تیتر آنتی بادی به تزریق گلبول قرمز خون گوسفند (SRBC[1])، در روزهای ۲۵ و ۳۲ دوره پرورش، تعداد ۲ قطعه پرنده از هر تکرار انتخاب و مقدار ۰/۸ میلی‌لیتر SRBC ده درصد از طریق ورید بال، تزریق گردید. یک هفته بعد از هر تزریق، خونگیری انجام و میزان تیتر آنتی‌بادی سرم خون، سنجش شد. برای تعیین تیتر پاسخ کل (IgM + IgG) از روش هما گلوتیناسیون میکروتیتر استفاده شد. ابتدا نمونه های سرم خون جهت خنثی شدن سیستم کمپلمان و عدم تداخل آن با پادتن ضدگلبول قرمز گوسفند به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد در گرم‌خانه، قرار داده شدند. در هنگام قرائت نمونه‌ها، لگاریتم مبنای دو عکس آخرین رقتی که در آن هماگلوتیناسیون انجام شد، به عنوان عیار پادتن ثبت گردید (Hay and Hudson, 2002). برای اندازه‌گیری IgG و IgM که اجزای پاسخ به SRBC هستند، با جداسازی آنتی بادی مقاوم به مرکاپتا-اتانول که در حقیقت IgG هست و کسر این مقدار از پاسخ کل، آنتی‌بادی حساس به مرکاپتااتانول بدست آمد که معرف IgM می‌باشد (Delhanty and Solomon, 1966).

برای سنجش پاسخ حساسیت بازوفیلی پوستی[2] (CBH)، از روش Ahmed و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شد. برای این منظور، در سن ۳۸ روزگی تعداد دو قطعه پرنده از هر تکرار انتخاب و بعد از اندازه‌گیری ضخامت پرده بین انگشتان هر دو پا، مقدار ۱۰۰ میکروگرم فیتوهماگلوتنین فسفاتی (PHA-P) حل شده در ۰/۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل، بین پرده پای انگشتان راست پرنده تزریق گردید. همچنین مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سرم فیز یولوژی استریل به عنوان گروه شاهد به پای چپ پرنده، تزریق گردید. ضخامت پرده بین انگشتان، ۳۶ ساعت پس از تزریق با استفاده از کولیس با دقت ۰/۰۱ میلی متر اندازه‌گیری شد. پاسخ CBH بصورت اختلاف بین ضخامت پرده بین انگشتان در قبل و بعد از تزریق بر حسب میلی‌متر بیان شد. در پایان دوره پرورش، تعداد ۲ قطعه پرنده از هر تکرار متناسب با میانگین وزنی تکرار انتخاب و جهت بررسی وزن اندام‌های ایمنی، کشتار گردیدند.

به منظور مطالعه فعالیت های آنزیمی، در روز ۳۵ از دو قطعه پرنده از هر تکرار، خونگیری و فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینو-ترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز، لاکتات دهیدروژناز و سوپر اکسید دیسموتاز سرم خون با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون و دستگاه اسپکتوفتومتر (ساخت آمریکا، Milton Roy، مدل D۲۱) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپید از روش اندازه‌گیری تیوباربیتوریک اسید (TBARS) استفاده شد (Esterbauer and Cheesman, 1990). در این روش، ابتدا با تهیه رقت های مختلف مالون دی-آلدئید (Malondialdehyde, MDA)، منحنی استاندارد رسم و در نهایت میزان جذب نمونه در طول موج ۵۳۲ nm سنجیده شد و با استفاده از منحنی استاندارد، میزان پراکسیداسیون لیپید تعیین گردید.

داده‌های حاصل از آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح آماری ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج و بحث

تاثیر داروی ضد فشار خون نیتروگلیسیرین بر میانگین وزن نسبی اندام‌های ایمنی و شاخص آسیت جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده تاثیرپذیری وزن نسبی طحال و تیموس از تیمارهای آزمایشی است ($P<۰/۰۵$) به طوری که تنش سرمایی منجر به کاهش وزن نسبی آن‌ها شد. استفاده از داروی نیتروگلیسیرین منجر به افزایش معنی‌دار وزن نسبی طحال و تیموس شد ولی وزن نسبی غده بورس فابریسیوس تحت تاثیر تنش سرمایی و تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. افزایش وزن نسبی قلب تحت شرایط تنش سرمایی تمایل به معنی داری ($P=۰/۰۹$) داشت. نسبت وزن بطن راست به وزن کل بطن‌ها در جوجه های گوشتی تحت شرایط تنش سرمایی بطور معنی‌داری افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). استفاده از داروی نیتروگلیسیرین در سطح ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره منجر به کاهش معنی‌دار این نسبت شد.

[1] Sheep Red Blood Cell
[2] Coetaneous Basophile Hypersensivity Response

جدول ۲- تاثیر داروی نیتروگلیسیرین بر میانگین وزن نسبی اندام‌های ایمنی و شاخص آسیت جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی (درصدی از وزن زنده)

صفات مورد مطالعه	تیمارهای آزمایشی[1]						
	PC	NC	NG5	NG10	NG20	SEM	P-Value
اندام‌های ایمنی							
طحال	۰/۱۵۳ bc	۰/۱۳۲ c	۰/۱۸۶ ab	۰/۲۰۶ a	۰/۱۹۵ ab	۰/۰۱۷	۰/۰۲
بورس	۰/۱۲۰	۰/۱۱۳	۰/۱۱۸	۰/۱۲۸	۰/۱۲۵	۰/۰۰۳	۰/۵۶
تیموس	۰/۱۹۱ ab	۰/۱۵۶ b	۰/۱۸۵ ab	۰/۲۳۶ a	۰/۲۲۷ a	۰/۰۲۲	۰/۰۴
شاخص آسیت							
قلب	۰/۵۶	۰/۶۳	۰/۶۰	۰/۵۹	۰/۵۸	۰/۰۲۵	۰/۰۹
RV/TV	۰/۲۲ b	۰/۲۷ a	۰/۲۵ ab	۰/۲۵ ab	۰/۲۳ b	۰/۰۱۲	۰/۰۴

[1] تیمارهای آزمایشی شامل PC: شاهد مثبت (بدون تنش سرمایی و بدون دریافت نیتروگلیسیرین)، NC: تیمار شاهد منفی (تنش سرمایی بدون دریافت نیتروگلیسیرین)، NG: نیتروگلیسیرین در سطوح ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره بودند.

[a-c] در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارند.

RV/TV: نسبت بین وزن بطن راست به وزن کل بطن‌ها.

کاهش وزن نسبی اندام‌های ایمنی در نتیجه تنش سرمایی توسط تعدادی از محققین گزارش شده است (Campo و همکاران، ۲۰۰۸؛ Hangalapura و همکاران، ۲۰۰۴) که در مطابقت با نتایج تحقیق حاضر است. طحال اندامی برای تخریب و بازیابی سلول‌های قرمز پیر و فرسوده است که لنفوسیت‌ها را تولید می‌کند. در شرایط تنش، لنفوسیت‌ها کاهش می‌یابند و به تبع آن حجم خون و گلبول‌های قرمز، افزایش می‌یابند. کاهش فعالیت طحال منجر به کاهش وزن آن شده که در نتیجه استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدانی و تولید بیشتر لنفوسیت‌ها، وزن نسبی طحال نیز افزایش می‌یابد. تحقیقات اخیر نشان می‌دهند که سلول‌های غده بورس فابریسیوس، اولویت بالایی برای گلوکز، ایزولوسین و لیزین دارند اما سلول‌های تیموس، اولویت بسیار کمی دارند (Humphrey و همکاران، ۲۰۰۶) به علاوه، در هنگام مواجه شدن با کمبود گلوکز و لیزین، سلولهای غده بورس فابریسیوس توانایی خود را برای بدست آوردن گلوکز و لیزین، بالا می برند در حالی که سلول‌های تیموس به میزان کمتری این توانایی را دارند لذا تحت شرایط تنش، تیموس بسیار حساس است که این مسئله موجب کاهش سریع تعداد سلول‌های آن و وزن این غده می‌شود. در خصوص سلول‌های طحال نیز احتمال چنین فرضیه‌ای وجود دارد.

افزایش وزن قلب و شاخص نسبت وزن بطن راست به وزن کل بطن‌ها (RV/TV) در اثر تنش سرمایی توسط محققین قبلی گزارش شده است (Danshyar و همکاران، ۲۰۰۹؛ Wang و همکاران، ۲۰۱۲) که در مطابقت با نتایج تحقیق حاضر است. قبل از بروز علائم آسیت در جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی، به طور معمول تغییرات آناتومیکی و هماتولوژیکی از قبیل افزایش در نسبت وزن بطن راست به وزن کل بطن‌ها (>۰/۲۵) به عنوان نقطه شروع آسیت قابل تشخیص است (Wideman و همکاران، ۲۰۱۳). تحت شرایط تنش سرمایی، نیاز اکسیژنی پرنده افزایش یافته و فعالیت زیاد قلب در راستای تامین این نیاز منجر به هیپرتروفی بطن راست و آسیت می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که در حیوانات فاقد eNOS[3]، فشار خون سرخرگی بالا می‌باشد. این امر نقش اکسید نیتریک را در کاهش فشار خون از طریق گشاد کردن مویرگ‌های محیطی و کاهش مقاومت در برابر جریان خون، به اثبات می‌رساند (Huang و همکاران، ۱۹۹۵). Ruiz-Feria (۲۰۰۹) طی آزمایشاتی اثرات مکمل آرژنین، ویتامین E و ویتامین C را بر فراسنجه‌های آسیت، اکسید نیتریک

[3] Endothelial Nitric Oxide Synthase

سنتتاز و عملکرد قلبی- عروقی جوجه‌های گوشتی تحت شرایط تنش سرمایی را مورد مطالعه قرار داد و گزارش کرد که استفاده از آرژنین باعث حفظ بافت دیواره داخلی عروق، بهبود وظایف اکسید نیتریک بواسطه افزایش قابلیت دسترسی آن و کاهش فشار خون سرخرگ ریوی از طریق افزایش اکسید نیتریک، می‌شود. فتحی و همکاران (۲۰۱۱) بهبود سیستم قلبی- عروقی و سندرم آسیت در نتیجه استفاده از آرژنین به میزان ۰/۳ درصد را ناشی از کاهش دانسیته خون و کاهش مقاومت در برابر جریان خون ششی، دانستند.

تاثیر داروی ضد فشار خون نیتروگلیسیرین بر ایمنی خونی و سلولی جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان دادند که پاسخ ایمنی خونی اولیه تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ولی سطح ایمنوگلوبولین M (IgM) در پاسخ ایمنی ثانویه تحت شرایط تنش سرمایی به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). استفاده از داروی نیتروگلیسیرین به میزان ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره منجر به افزایش معنی‌دار غلظت IgM شد. مقدار ایمنوگلوبولین کل و ایمنوگلوبولین G تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. ایمنی سلولی و پاسخ حساسیت بازوفیلی پوستی (CBH) در پاسخ به تزریق فیتوهماگلوتنین فسفاتی تحت شرایط تنش سرمایی، کاهش یافت و استفاده از داروی نیتروگلیسیرین به میزان ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره، منجر به افزایش معنی‌دار ایمنی سلولی شد (P<۰/۰۵).

جدول ۳- تاثیر داروی نیتروگلیسیرین بر ایمنی خونی و سلولی جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی

صفات مورد مطالعه	تیمارهای آزمایشی[1]						
	PC	NC	NG5	NG10	NG20	SEM	P-Value
ایمنی خونی اولیه							
کل	۴/۳۳	۳/۳۱	۴/۱۶	۳/۶۹	۳/۷۵	۰/۴۸	۰/۵۶
IgM	۱/۶۸	۱/۴۱	۱/۸۲	۱/۵۴	۱/۶۳	۰/۲۷	۰/۶۳
IgG	۲/۶۵	۱/۹۰	۲/۳۴	۲/۱۵	۲/۱۲	۰/۳۷	۰/۲۶
ایمنی خونی ثانویه							
کل	۵/۲۰	۳/۶۲	۴/۲۵	۴/۰۸	۴/۵۶	۰/۵۷	۰/۳۸
IgM	۲/۸۹ [ab]	۱/۶۱ [b]	۲/۵۰ [ab]	۲/۱۵ [ab]	۳/۰۵ [a]	۰/۴۳	۰/۰۵
IgG	۲/۳۱	۲/۰۱	۱/۷۵	۱/۹۳	۱/۵۱	۰/۳۸	۰/۵۸
ایمنی سلولی							
CBH[2] (mm)	۱/۷۵ [a]	۰/۹۳ [b]	۱/۳۶ [ab]	۱/۲۹ [ab]	۱/۵۸ [a]	۰/۱۵	۰/۰۴

[1] تیمارهای آزمایشی شامل PC: شاهد مثبت (بدون تنش سرمایی و بدون دریافت نیتروگلیسیرین)، NC: تیمار شاهد منفی (تنش سرمایی بدون دریافت نیتروگلیسیرین)، NG: نیتروگلیسیرین در سطوح ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره.

[a-b] در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارند.

[2] CBH (Coetaneous Basophile Hypersensivity Response): پاسخ حساسیت بازوفیلی پوستی.

سرکوب سیستم ایمنی خونی (Hester و همکاران، ۱۹۹۶) و سیستم ایمنی سلولی (Atta و همکاران، ۱۹۹۶) در شرایط تنش سرمایی توسط تعدادی از محققین نشان داده شده است. تاثیر آرژنین بر بهبود پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی از طریق تولید اکسید نیتریک توسط تعدادی از محققین نشان داده شده است (Li و همکاران، ۲۰۰۹؛ Guo و همکاران، ۲۰۱۵).

اکسید نیتریک (NO) در بسیاری از سلول‌های سیستم ایمنی (ماکروفاژها، سلول‌های دندریتی، سلول‌های کشنده طبیعی (NK)، ماست‌سل ها و سلول های بیگانه خوار) و سلول‌های مرتبط با سیستم ایمنی (سلول‌های دیواره داخلی عروق، سلول‌های بافت پوششی و سلول‌های بافت کبد) تولید می‌شود. اکسید نیتریک به عنوان یک مولکول پیام‌رسان، نقش حیاتی در تنظیم پاسخ ایمنی و التهاب از طریق مسیرهای مختلف بیوشیمیایی دارد و می‌تواند از طریق کشتن عوامل بیماری‌زای غیراختصاصی مثل باکتری‌ها، قارچ‌ها، انگل‌ها و سلول‌های سرطانی، ایمنی غیراختصاصی را افزایش دهد. به‌علاوه اکسید نیتریک می‌تواند سنتز و ترشح بعضی از سیتوکین‌های ایمنی مثل فاکتور نکروز تومور (TNF[4])، پروستاگلاندین E2 ، اینترلوکین و اینترفرون که تاثیر زیادی بر پاسخ ایمنی دارند را تنظیم کند (Tan و همکاران، ۲۰۰۷). در آزمایش حاضر، افزودن نیتروگلیسیرین منجر به افزایش وزن نسبی طحال (جدول ۲) و در نتیجه افزایش تکثیر لنفوسیت های T در مقایسه با گروه شاهد منفی شد. لنفوسیت‌ها به عنوان سلول‌های کمک کننده، در تولید آنتی‌بادی‌ها نقش دارند. در آزمایش حاضر، افزایش غلظت آنتی‌بادی ها می‌تواند ناشی از این امر باشد.

تاثیر داروی ضد فشار خون نیتروگلیسیرین بر فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، لاکتات دهیدروژناز (LDH) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) سرم خون جوجه‌های تحت آسیت القایی، در جدول ۴ آورده شده است. نتایج نشان دادند که در شرایط تنش سرمایی، مقادیر AST و LDH در سرم خون جوجه‌ها افزایش یافت ولی غلظت ALT و SOD تحت تاثیر معنی دار قرار نگرفت. استفاده از سطح ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم داروی نیتروگلیسیرین در جیره موجب کاهش معنی‌دار غلظت آنزیم‌های AST و LDH شد.

تاثیر داروی ضد فشار خون نیتروگلیسیرین بر شاخص پراکسیداسیون لیپید (مالون دی‌آلدئید[5]) سرم خون جوجه‌های تحت آسیت القایی، در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج نشان دادند که غلظت مالون دی‌آلدئید سرم خون جوجه‌های گوشتی تحت شرایط القا آسیت، به طور معنی‌داری افزایش یافت و استفاده از داروی نیتروگلیسیرین منجر به کاهش نسبی غلظت مالون دی-آلدئید سرم خون جوجه‌های گوشتی تحت آسیت القایی شد (P=۰/۰۶).

[4] Tumor Necrosis Factor

[5] Malondialdehyde

جدول ٤- تاثیر داروی نیتروگلیسیرین بر فعالیت هورمونی، آنزیمی و شاخص پراکسیداسیون لیپیدی جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی

صفات مورد مطالعه	تیمارهای آزمایشی[1]					
	PC	NC	NG5	NG10	NG20	SEM	P-Value
آنزیم‌ها							
ALT[2](U/L)	۵/۲۴	۵/۱۲	۴/۱۸	۴/۸۶	۶/۲۵	۱/۲۳	۰/۶۳
AST[3] (U/L)	۱۸۳/۶ ab	۲۱۶/۳ a	۱۹۶/۵ ab	۱۶۷/۳ b	۱۸۱/۱ b	۹/۸۵	۰/۰۱
LDH[4] (U/L)	۱۶۳۰ ab	۲۲۴۵ a	۲۰۲۰ ab	۱۷۶۰ ab	۱۲۸۵ b	۲۸۵	۰/۰۲
SOD[5] (U/g hemoglobin)	۱۱۲۵	۱۰۵۶	۹۸۷	۱۰۹۵	۱۰۴۳	۵۲	۰/۳۴
شاخص پراکسیداسیون لیپیدی							
MDA[6] (nmol/ml)	۴/۳۶ b	۶/۱۲ a	۵/۵۲ ab	۵/۶۸ ab	۵/۲۱ ab	۰/۵۸	۰/۰۶

[1] تیمارهای آزمایشی شامل PC: شاهد مثبت (بدون تنش سرمایی و بدون دریافت نیتروگلیسیرین)، NC: تیمار شاهد منفی (تنش سرمایی بدون دریافت نیتروگلیسیرین)، NG: نیتروگلیسیرین در سطوح ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره.

[a-b] در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارند.

[۲] Alanin transferase

[۳] Aspartate transferase

[۴] Lactate dehydrogenase

[۵] Super oxide dismutase

[۶] Malondialdehyde

پراکسیداسیون لیپید، یکی از نتایج تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن و بروز تنش اکسیداتیو است. تحت شرایط تنش، تولید مالون دی آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید، افزایش می‌یابد و افزایش میزان MDA تحت شرایط تنش سرمایی، گزارش شده است (Mujahid، ۲۰۱۰؛ Wang و همکاران، ۲۰۱۲). زمانی‌که غلظت آنتی‌اکسیدان‌های پلاسمای خون کاهش می‌یابد، پراکسیداسیون لیپید در پلاسمای خون و بافت‌ها افزایش می‌یابد و منجر به آسیب دیدن غشای سلولی می‌شود. مشخص شده است که چنین اثراتی می‌توانند با مکمل کردن جیره با ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، از بین بروند (Zhang و همکاران، ۲۰۰۹؛ Geng and Guo, 2005). در پژوهش حاضر، کاهش عددی ولی غیر-معنی‌دار سطح MDA سرم خون در نتیجه استفاده از ترکیب نیتروگلیسیرین، ممکن است افزایش پتانسیل ایمنی حیوان را بواسطه ایجاد تعادل در تولید و حذف رادیکال‌های آزاد، توضیح دهد.

آسپارتات آمینوترانسفراز آنزیمی است که در اثر آسیب‌های پارانشیم کبدی و نیز صدمات قلبی، افزایش می‌یابد و به عنوان شاخص سلامت کبد، اندازه گیری می‌شود. همچنین آنزیم لاکتات دهیدروژناز آنزیمی است که هنگام آسیب بافت‌های قلب، کبد و شش، به خون آزاد می‌شود (Daneshyar و همکاران، ۲۰۰۹). با توجه به آسیب های وارده به قلب، کبد و شش پرندگان مبتلا به آسیت، فعالیت آنزیم‌های پلاسمایی نیز تحت تاثیر قرار

گرفته و افزایش می یابد و کاهش غلظت این آنزیم‌ها در سرم خون در نتیجه استفاده از داروی نیتروگلیسیرین نشان دهنده بهبود این شاخص‌ها است. دانشیار و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که در شرایط القاء آسیت و تنش سرمایی، غلظت آنزیم‌های AST و LDH تحت تاثیر قرار نگرفت که در مغایرت با نتایج تحقیق حاضر است.

بطور کلی، نتایج این پژوهش نشان دادند که استفاده از سطح ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم از داروی ضد فشار خون نیتروگلیسیرین در شرایط تنش سرمایی منجر به بهبود پاسخ‌های ایمنی خونی و سلولی شد و سطح آنزیم‌های کبدی در سرم خون را کاهش داد.

منابع

بی‌نام (۱۳۹۱). چکیده نتایج سرشماری از مرغداری‌های پرورش مرغ گوشتی. معاونت برنامه‌ریزی و نظارت راهبردی ریاست جمهوری، مرکز آمار ایران.

Ahmed, O.A., Ahmed, E.G., Gilbert, L.H. and Magdi, M.M. (2007). The effect of lighting program and melatonin on the alleviation of the negative impact of heat stress on the immune response in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*. 6: 651-660.

Atta, A.M., El-Tantawy, S.M.T., Osman, A. and El-Far, A.A. (1996). Suppression of cellular immune response of chickens following *in vivo* and *in vitro* heat stress. *Egyptian Journal of Animal Production*. 33: 71-77.

Aviagen. (2014). Ross 308. Broiler Performance Objective. Retrieved from www.aviagen.com. Accessed on May 21.

Campo, J.L., Prieto, M.T. and Da´vila, S.G. (2008). Effects of housing system and cold stress on heterophil-to-lymphocyte ratio, fluctuating asymmetry, and tonic immobility duration of chickens. *Poultry Science*. 87: 621-626.

Daneshyar, M., Kermanshahi, H. and Golian, A. (2009). Changes of biochemical parameters and enzyme activities in broiler chickens with cold-induced ascites. *Poultry Science*. 88: 106-110.

Delhanty, J.J. and Solomon, J.B. (1966). The nature of antibodies to goat erythrocytes in the developing chicken. *Immunology*. 11: 103-113.

Esterbauer, H. and Cheesman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondealdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*. 186: 407-421.

Fathi, M., Nazer Adl, K., Ebrahim Nezhad, Y., Aghdam Shahryar, H. and Daneshyar, M. (2011). The effects of vitamin E and L-arginine supplementation on antioxidant status and biochemical indices of broiler chickens with pulmonary hypertension syndrome. *Research Journal of Poultry Science*. 4: 33-40.

Forman, M.F. and Wideman, R.F. (2001). Furosemide does not facilitate pulmonary vasodilation in broilers during chronic or acute unilateral pulmonary arterial occlusion. *Poultry Science*. 80: 937-943.

Geng, A.L. and Guo, Y.M. (2005). Effects of dietary coenzyme Q10 supplementation on hepatic mitochondrial function and the activities of respiratory chain-related enzymes in ascitic broiler chickens. *British Poultry Science*. 46: 626-634.

Guo, J.L., Zheng, Q.H., Yin, Q.Q., Cheng, W. and Jiang, Y.B. (2007). Study on mechanism of ascites syndrome of broilers. *American Journal of Animal Veterinary Science*. 2: 62-65.

Guo, Y.W., Shi, B.L., Yan, S.M., Xu, Y.Q., Li, J.L. and Li, T.Y. (2015). Effects of arginine on cytokines and nitric oxide synthesis in broilers. *The Journal of Animal and Plant Sciences*. 25: 366-371.

Hangalapura, B.N., Nieuwland, M.G.B., Buyse, J., Kemp, B. and Parmentier, H.K. (2004). Effect of duration of cold stress on plasma adrenal and thyroid hormone levels and immune responses in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Poultry Science*. 83: 1644-1649.

Hay, L. and Hudson, F.C. (2002). Practical Immunology. Fourth Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.

Hester, P.Y., Muir, W.M. and Craig, J.V. (1996). Group selection for adaptation to multiple-hen cages: Humoral immune response. *Poultry Science*. 75: 1315-1320.

Huang, P.L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K.D., Moskowitz, M.A., Bevan, J.A. and Fishman, M.C. (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 377: 239-242.

Humphrey, B.D., Stephensen, C.B., Calvert, C.C. and Klasing, K.C. (2006). Lysine deficiency and feed restriction independently alter cationic amino acid transporter expression in chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology,* Part A. 143: 218-227.

Li, H.Y., Yan, S.M., Shi, B.L. and Guo, X.Y. (2009). Effect of chitosan on nitric oxide content and inducible nitric oxide synthase activity in serum and expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in small intestine of broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 22: 1048-1053.

Moreno, S.M. and Hernandez, A. (2003). Nitric oxide synthase expression in the endothelium of pulmonary arterioles in normal and pulmonary hypertensive chickens subjected to chronic hypobaric hypoxia. *Avian Diseases*. 47: 1291-1297.

Mujahid, A. (2010). Acute cold-induced thermogenesis in neonatal chicks (*Gallus gallus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A.* Molecular and Integrative Physiology. 156: 34-41.

Ocampo, L., Cortez, U., Sumano, H. and Avila, E. (1998). Use of low dose of Clenbuterol to reduce incidence of ascites syndrome in broilers. *Poultry Science,* 77: 1297-1299.

Ozdemir, H.S., Aksulu, H.E., Karatas, F., Ustundag, B. and Bingo, I. (2000). Long-term lisinopril dehydrate application decrease plasma noradrenaline but not adrenaline levels in chickens. *Physiological Research.* 64: 183-188.

Prasad, K., Chang, J.B., Oksen, E.R. and Sumpio, B.E. (2000). Textbook of Angiology. 1st Edition. Chapter 4: Blood Pressure and Its Control Mechanism. pp: 46-54. Springer, New York.

Ruiz-Feria, C.A. (2009). Concurrent supplementation of arginine, vitamin E, and vitamin C improve cardiopulmonary performance in broilers chickens. *Poultry Science*. 88: 526-535.

SAS (2002-2003). SAS/STAT Software: change and enhancement through release 9.1. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.

Tan, X., Hu, S.H. and Wang, X.L. (2007). Possible role of nitric oxide in the pathogenesis of pulmonary hypertension in broilers: a synopsis. *Avian Pathology*. 36: 261-267.

Wang, Y., Guo, Y., Ning, D., Peng, H., Cai, H., Tan, J., Yang, Y. and Liu, D. (2012). Changes of hepatic biochemical parameters and proteomics in broilers with cold-induced ascites. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. Available at: *http://www.jasbsci.com/content/3/1/41*.

Wideman, R.F., Chapman, M.E., Hamal, K.R., Bowen, O.T., Lorenzoni, A.G., Erf, G.F. and Anthony, N.B. (2007). An inadequate pulmonary vascular capacity and susceptibility to pulmonary arterial hypertension in broilers. *Poultry Science*. 86: 984-998.

Wideman, R.F., Ismail, M., Kirby, Y.K., Bottje, W.G., Moore, R.W. and Vardeman, R.C. (1995). Furosemide reduces the incidence of pulmonary hypertension syndrome (ascites) in broiler exposed to cool environmental temperatures. *Poultry Science*. 74: 314-322.

Wideman, R.F., Rhoads, D.D., Erf, G.F. and Anthony, N.B. (2013). Pulmonary arterial hypertension (ascites syndrome) in broilers: A review. *Poultry Science*. 92: 64-83.

Wu, D.J., Lin, J.A. and Lin, C.S. (2007). Reduction of dilated cardiomyopathy of broiler chickens model by pharmacological treatments- pathological aspects. *Taiwan Veterinary Journal*. 33: 6-13.

Zhang, X.H., Zhong, X., Zhou, Y.M., Du, H.M. and Wang, T. (2009). Effect of RRR-α-tocopherol succinate on the growth and immunity in broilers. *Poultry Science*. 88: 959-966.