



"مقاله پژوهشی"

بررسی تأثیر سطوح مختلف روی و سلنیوم در جیره‌های حاوی روغن اکسیده بر سیستم ایمنی و اندام‌های لنفاوی جوجه‌های گوشتی

مسعود صفرزائی^۱، حسن صالح^۲، محمد طاهر میرکزی^۳ و امید جنگجو^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد مدیریت پرورش و تولید طیور، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، مجتمع آموزش عالی سراوان، سراوان، ایران
۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، مجتمع آموزش عالی سراوان، سراوان، ایران، (نویسنده مسوول: hsaleh.um@gmail.com)
۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، مجتمع آموزش عالی سراوان، سراوان، ایران
۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد مدیریت پرورش و تولید طیور، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، مجتمع آموزش عالی سراوان، سراوان، ایران
تاریخ دریافت: ۹۹/۰۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۱
صفحه: ۱۱ تا ۱۹

چکیده

به منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف روی و سلنیوم در جیره‌های حاوی سطح صفر و ۲ درصد روغن اکسیده بر سیستم ایمنی سلولی، همورال و وزن نسبی اندام لنفوئیدی در جوجه‌های گوشتی، طرحی در قالب آزمایش فاکتوریل ۲*۳*۲ (دو سطح صفر و ۲ درصد روغن اکسیده، سه سطح صفر، ۴۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در جیره سولفات روی، دو سطح صفر و ۳/۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در جیره سلنیت سدیم) با استفاده از ۴۸۰ جوجه یک روزه راس ۳۰۸ با ۱۲ تیمار و در هر تیمار ۴ تکرار ۱۰ جوجه‌ای انجام شد. به منظور بررسی سیستم ایمنی همورال، تغییرات تیترا آنتی‌بادی با تزریق گلبول قرمز خون گوسفند در دو نوبت (۲۱ و ۲۸ روزگی) و خون‌گیری در دو نوبت (۲۸ و ۳۵ روزگی) انجام شد. اندازه‌گیری وزن نسبی بورس، طحال و تیموس در ۴۲ روزگی بعد از کشتار انجام شد. جهت بررسی سیستم ایمنی سلولی از تست حساسیت پوستی بازوفیل (CBH) استفاده شد. نتایج به دست آمده عیار پادتن کل در نوبت اول و دوم اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$). بیشترین عیار پادتن کل اولیه و ثانویه در جوجه‌های تغذیه شده با روغن سالم (صفر درصد روغن اکسید) به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم روی و ۳/۰ میلی‌گرم/کیلوگرم سلنیوم و جوجه‌های تغذیه شده با روغن اکسیده (۲ درصد روغن اکسیده) حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم روی و ۳/۰ میلی‌گرم/کیلوگرم سلنیوم بود و تأثیر استفاده هم‌زمان روی و سلنیوم در پاسخ عیار پادتن کل اولیه نیز معنی‌دار شد و استفاده هم‌زمان ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم روی و ۳/۰ میلی‌گرم/کیلوگرم سلنیوم باعث افزایش معنی‌دار پاسخ عیار پادتن کل اولیه گردید. اثر گروه‌های مختلف آزمایشی بر پاسخ عیار پادتن Igm در نوبت اول و دوم اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$). پاسخ ایمنی سلولی تست CBH تحت تأثیر جیره‌های مختلف آزمایشی قرار نگرفتند. نتایج تأثیر تیمارها بر وزن نسبی اندام مختلف لنفاوی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. نتایج این پژوهش نشان داد مکمل کردن جیره با سولفات روی و سلنیوم موجب بهبود سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ایمنی سلولی، جوجه گوشتی، روی، سلنیوم

مقدمه

یکی از اهداف اصلی تولید کنندگان صنعت طیور، کاهش میزان تلفات در شرایط استرس‌های محیطی می‌باشد. مکمل‌های غذایی با افزایش راندمان سیستم ایمنی، زمینه را برای بهبود عملکرد تولیدی گله و در نتیجه بهره‌وری اقتصادی فراهم می‌کنند (۹، ۱۸ و ۱۱). پاسخ ایمنی همورال و سلولی تأثیرات مثبتی بر روی محدود کردن عوامل عفونی بیماری‌زا دارد. شواهد بسیاری وجود دارد که نشان می‌دهد عناصر معدنی کم‌مصرف برای سلامتی حیوان ضروری بوده و در چالش‌های ایمنولوژیکی حیاتی می‌باشد (۶). مطالعات بسیاری نشان داده است که مکمل کردن جیره طیور به وسیله روی، سیستم ایمنی همورال و سلولی را علیه برخی بیماری‌ها تقویت کرده است (۱۶). روی یکی از اجزای مهم و ضروری در خوراک طیور است که وظایف مهم در عملکرد بیولوژی بدن طیور ایفا می‌کند. روی به‌عنوان کاتالیست، برای عملکرد مورد نیاز برای بسیاری از آنزیم می‌باشد و خصوصاً به‌صورت کاتالیزور مستقیم آنزیم‌ها فعالیت می‌کند. از نظر نقش تنظیمی، عنصر روی هم فعالیت آنزیمی داشته و هم به‌عنوان یک مهارر و یا تحریکی، پایداری پروتئین‌ها را تنظیم می‌نماید. از جنبه نقش ساختمانی، عنصر روی به‌دلیل دارا بودن

خصوصیت‌های فیزیکی-شیمیایی خاص در بسیاری از پروتئین‌های دخیل در همانند سازی DNA و رونویسی معکوس، نقش ساختاری و عملکردی داشته و برای فعالیت تعدادی از متالوپروتئین ضروری می‌باشد (۳ و ۱۹). علاوه بر این تأثیر روی از این نظر حائز اهمیت است که در بیش از ۲۴۰ آنزیم به‌عنوان کوفاکتور عمل کرده و در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها، دخالت دارد (۳). سلنیوم یک عنصر معدنی کم مصرف است که تأثیر فراوانی بر فعالیت‌های بیولوژیکی طیور دارد که از جمله می‌توان تنظیم فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، بهبود عملکرد سیستم ایمنی، رشد طبیعی، حفظ و نگهداری بدن نام برد (۲۰). کمبود سلنیوم می‌تواند موجب تغییرات در بافت‌های مختلف بدن مانند بورس فابرسیوس، تیموس و طحال شود که متعاقباً بر سیستم ایمنی بدن تأثیر منفی خواهد گذاشت (۲). نقش مثبت سلنیوم بر روی سیستم ایمنی از طریق دخالت در کاهش استرس اکسیداتیو با افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی میسر می‌شود (۱۵). بنابراین هدف از انجام این آزمایش بررسی اثرات سطوح مختلف روی و سلنیوم در جیره‌های حاوی روغن اکسیده بر فعالیت سیستم ایمنی همورال، ایمنی سلولی و وضعیت اندام‌های لنفاوی خواهد بود.

مواد و روش‌ها

آزمایش به صورت فاکتوریل $3 \times 2 \times 2$ در قالب طرح کاملاً تصادفی به مدت ۴۲ روز با استفاده از ۴۸۰ قطعه جوجه یک روزه گوشتی سویه راس ۳۰۸ انجام شد. آزمایش بر روی بستر و جوجه‌ها در ۱۲ گروه آزمایشی که هر گروه دارای ۴ تکرار ۱۰ قطعه جوجه بودند، پنبندی شدند. جیره‌ها آزمایشی با سطوح روغن (روغن سالم و روغن اکسیده)، دو سطح سلیت سدیم ($0/3$ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و سه سطح عنصر سولفات روی ($40,0$ و 100 میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و بر اساس احتیاجات جوجه‌های گوشتی راس در سه مرحله آغازین ($1-10$ روز)، رشد ($23-11$) و پایانی ($42-24$) با نرم‌افزار جیره‌نویسی WUFFDA تنظیم شدند (جدول ۱). جیره‌های مراحل مختلف از نظر انرژی و پروتئین یک سان بود. روغن‌های تازه مورد استفاده در جیره دارای عدد پراکسید ۳ میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم چربی و روغن اکسیده حاوی ۷۵ میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم چربی بودند. سولفات روی ($ZnSO_4$) مورد استفاده دارای خلوص ۳۴٪ و تولید شده شرکت گیوان شیمی بود. همچنین سلیت سدیم دارای خلوص ۹۹ درصد و تولید شده توسط شرکت سیگما آلدریج (Sigma-Aldrich) بود. لازم به ذکر است، میزان روی و سلیوم، علاوه بر میزان آنها در مکمل معدنی بوده و به‌عنوان مکمل به جیره افزوده شدند. در تنظیم جیره‌ها در تمامی مراحل، روغن اکسیده فقط دو درصد از میزان مورد نیاز را تأمین و سایر مقادیر مورد نیاز از روغن سالم استفاده می‌گردید. به‌منظور تعیین عیار پادتن کل علیه گلبول قرمز گوسفند (SRBC) به سیاهرگ زیربالی ۲ قطعه پرنده از هر تکرار در ۲۱ و ۲۸ روزگی، $0/5$ میلی‌لیتر از سوسپانسیون گلبول قرمز گوسفند ۵ درصد تزریق گردید. هفت روز بعد در

۲۸ و ۳۵ روزگی از سیاهرگ زیربالی جوجه‌ها خون‌گیری به عمل آمد. سپس عیار ایمونوگلوبولین G، M و تام بر ضد SRBC تعیین گردید (۱۲). به‌منظور بررسی سیستم ایمنی سلولی ابتدا از هر تکرار در سن ۳۴ روزگی یک جوجه مشخص و با کولیس ورنیه مندرج، ضخامت پرده وسط پای انگشتان چپ اندازه‌گیری شد و سپس به‌مقدار $0/1$ میلی‌لیتر فیتوهموگلووتین به آن تزریق شد و بین انگشتان پای راست $0/1$ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی تزریق گردید. به‌منظور بررسی میزان تکثیر سلول‌های T در سیستم ایمنی، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از تزریق فیتوهموگلووتین ضخامت بین انگشتان پای چپ به‌وسیله کولیس ورنیه اندازه‌گیری شد و اعداد ثبت گردیدند. میزان افزایش ضخامت پوست در هر پرنده از اختلاف ضخامت قبل و بعد تزریق به‌دست آمد (۲۲). در ۴۲ روزگی یک جوجه از هر پن انتخاب و برای جداسازی و اندازه‌گیری وزن اندام لنفوی کشتار شد.

طرح آزمایشی و تجزیه تحلیل داده‌ها

در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار SAS (۲۰۰۹)، داده‌های جمع‌آوری شده در قالب طرح کاملاً تصادفی و با آزمایش فاکتوریل، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. جهت مقایسه میانگین، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری $0/05$ استفاده شد. مدل ریاضی این طرح در حالت کلی به‌صورت زیر است:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + AB_{ij} + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + e_{ijk}$$

در این رابطه، Y_{ijk} : مقدار هر مشاهده، μ : میانگین جامعه، A_i : اثر روغن، B_j : اثر روی، C_k : اثر سلیوم، AB_{ij} : اثر متقابل روغن و روی، AC_{ik} : اثر متقابل روغن و سلیوم، BC_{jk} : اثر متقابل روی و سلیوم، ABC_{ijk} : اثر متقابل روغن، روی و سلیوم و e_{ijk} : خطای آزمایش می‌باشد.

جدول ۱- ترکیب جیره‌های آزمایشی (%)

اقلام ^۱	جیره آغازین (۱۰-۱ روزگی)	جیره میانی (۱۱-۲۳ روزگی)	جیره پایانی (۲۴-۴۲ روزگی)
دانه ذرت	۵۲/۲۵	۵۲/۳۷	۵۷/۰۸
کنجاله سویا (۴۴ درصد)	۳۴/۰۰	۳۷/۸۶	۳۲/۴۵
گلوتن ذرت	۴/۸۲	-	-
روغن گیاهی آفتابگردان ^۲	۳/۲۲	۵/۵۰	۶/۳۰
پودر صدف	۱/۲۵	۱/۱۸	۱/۱۵
دی کلسیم فسفات	۱/۷۸	۱/۵۶	۱/۵۶
نمک	۰/۴۰	۰/۴۵	۰/۴۶
دی-ال-متیونین	۰/۳۴	۰/۳۲	۰/۲۹
ال لایزین	۰/۴۶	۰/۱۸	۰/۱۸
دی-ال-ترئونین	۰/۱۴	۰/۰۸	۰/۰۶
مکمل ویتامینی ^۳	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل معدنی ^۴	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
انرژی و مواد مغذی محاسبه شده (کیلوکالری/گرم)			
انرژی قابل متابولیسم	۳/۰۰	۳/۱۰	۳/۲۱
پروتئین خام، %	۲۳/۰۲	۲۱/۵۲	۱۹/۵۱
فیبر خام، %	۳/۵۹	۳/۸۰	۳/۵۳
کلسیم، %	۰/۹۶	۰/۹۰	۰/۸۸
فسفر، %	۰/۷۳	۰/۶۹	۰/۶۶
سدیم، %	۰/۱۸	۰/۲۰	۰/۱۹
پتاسیم، %	۰/۸۹	۰/۹۲	۰/۸۲
کلر، %	۰/۳۷	۰/۳۵	۰/۳۳
لایزین، %	۱/۴۴	۱/۲۹	۱/۱۶
متیونین، %	۰/۷۰	۰/۶۴	۰/۵۹

۱- روی و سلینیوم مورد نیاز از شرکت آزمایشگاهی واکرمن مشهد تهیه گردید و به ترتیب به مقدار ۰، ۴۰ و ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم جیره و ۰ و ۰/۳ میلی گرم/کیلوگرم جیره در گروه‌های آزمایشی مد نظر، مورد استفاده قرار گرفت.

۲- از کل نیاز جوجه‌ها به روغن، فقط ۲ درصد روغن اکسیده در نظر گرفته شد و مابقی روغن سالم (همه جیره‌ها حاوی ۲ درصد روغن اکسیده می‌باشند)

۳- در هر کیلوگرم جیره مکمل ویتامینی مقادیر: ۷۰۴۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۲۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D₃، ۱/۷۶ میلی گرم ویتامین K₃، ۱/۲ میلی گرم ویتامین B₁، ۳/۲ میلی گرم ویتامین B₂، ۶/۴ میلی گرم ویتامین B₃ (کلسیم پنتوتنات)، ۲۸ میلی گرم ویتامین B₅ (نیاسین)، ۱/۹۷ میلی گرم ویتامین B₆، ۰/۲۸ میلی گرم ویتامین B₉ (فولیک اسید)، ۰/۰۰۸ میلی گرم ویتامین B₁₂، ۰/۱۲ میلی گرم ویتامین H₂(بیوتین) و ۳۲۰ میلی گرم کلرید را در هر کیلوگرم جیره تأمین نمود.

۴- مکمل معدنی اضافه شده به جیره مقادیر: ۶۰ میلی گرم منگنز، ۶۰ میلی گرم آهن، ۴/۸ میلی گرم مس و ۰/۶۹ میلی گرم ید را تأمین نمود.

تأثیر گروه‌های آزمایشی بر سیستم ایمنی همورال

اثرات گروه‌های آزمایشی مختلف بر میزان عیار پادتن‌های تولید شده علیه گلبول قرمز گوسفند در پاسخ اولیه و ثانویه در دو مرحله خونگیری (۲۸ و ۳۵ روزگی) به صورت آنتی‌بادی کل، IgM و IgG در جدول ۲ نشان داده شده است. گروه‌های آزمایشی بر عیار پادتن کل و IgM در نوبت اول و دوم اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0.05$). بیشترین پاسخ عیار پادتن کل و IgM در نوبت اول و دوم مربوط به جوجه‌های تغذیه شده با روغن سالم و اکسیده به همراه ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم روی و ۰/۳ میلی گرم/کیلوگرم سلینیوم بود. در بررسی عنصر روی، سطح ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم در تیتراژ آنتی‌بادی کل تفاوت معنی‌داری را نسبت به سطوح صفر و ۴۰ میلی گرم در کیلوگرم نشان داده شد ($p < 0.05$). با بررسی اثرات اصلی سلینیوم بدون در نظر گرفتن روی و روغن، در تیتراژ آنتی‌بادی کل و اولیه اختلاف معنی‌داری بین سطوح سلینیوم مشاهده شد به طوری که سطح ۰/۳ میلی گرم/کیلوگرم سلینیوم نسبت به سطح صفر میلی گرم/کیلوگرم سلینیوم تیتراژ بالاتری را باعث شده بود ($p < 0.05$). تنها اثر متقابل

مشاهده شده در سیستم ایمنی همورال مربوط به اثر متقابل روی و سلینیوم در تیتراژ آنتی‌بادی کل نوبت اول بود ($p < 0.05$). نتایج به دست آمده نشان داد که تیتراژ آنتی‌بادی (کل)، IGM و IgG (جوجه‌هایی که جیره غذایی آن‌ها حاوی روغن اکسیده ۲ درصد و روغن سالم بود بدون در نظر گرفتن سطوح روی و سلینیوم، فاقد اختلاف معنی‌داری می‌باشند).

نتایج و بحث

انبرگ و همکاران (۵) افت سیستم ایمنی پرندگان تغذیه شده با روغن اکسیده از نظر تیتراژ آنتی‌بادی علیه گلبول قرمز گوسفند را گزارش شد. ولی نتیجه‌ی به دست آمده از آزمایش حاضر مغایر با این گزارشات بود. احتمالاً این تفاوت به دلیل استفاده از سطوح مختلف روغن اکسیده در آزمایش حاضر و آزمایشات محققین دیگر باشد. همچنین سیستم ایمنی طیور در طی دوره آزمایش تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی و حتی سنی قرار می‌گیرد و بسته به سطح روغن اکسید شده می‌توان احتمال داد که سطح ۲ درصد روغن اکسیده نتواند باعث تأثیر معنی‌داری بر پاسخ سیستم ایمنی همورال را سبب

مشارکت در تولید گلبول‌های سفید نقش مهمی در سیستم ایمنی ایفا می‌کند. تأثیر استفاده هم‌زمان ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم روی و ۰/۳ میلی‌گرم/کیلوگرم سلیوم در این آزمایش قابل توجه بود و نشان داد که استفاده هم‌زمان از این دو سلیوم باعث افزایش عیار آنتی‌بادی عنصر (روی و علیه گلبول قرمز گوسفند می‌گردد که این نتیجه با مشاهدات هگازی و آتاجی (۸)، مطابقت دارد.

شود. شانکار و پراساد (۱۶)، در بررسی تأثیر سطوح عنصر معدنی روی بر سیستم ایمنی طیور به این نتیجه رسیدند که عنصر روی باعث بهبود عملکرد سیستم ایمنی جوجه‌ها می‌شود. احتمالاً روی با تأثیر بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز، از طریق کاهش رادیکال‌های آزاد در بدن طیور و کاهش آسیب‌های رادیکال‌های آزاد باعث بهبود سیستم ایمنی طیور می‌گردد و این آنتی اکسیدان به‌خاطر

جدول ۲- اثر گروه‌های آزمایشی بر پاسخ سیستم ایمنی همورال

Table 2. Effect of experimental diets on humoral immune response

تست ثانویه		تست اولیه		تیمارها		گروه‌های آزمایشی	تیمارها
IgG	IgM	IgG	IgM	سلیوم	روی		
۷/۱۰ ^D	۴/۵۰	۲/۵۰ ^D	۵/۲۵ ^D	۳/۵۰	۱/۷۵ ^D	صفر	صفر
۷/۵۰ ^{Da}	۴/۵۰	۳/۰۰ ^{Da}	۵/۵۰ ^D	۳/۷۵	۱/۷۵ ^D	۰/۳	صفر
۷/۵۰ ^{Da}	۴/۵۰	۳/۰۰ ^{Da}	۵/۵۰ ^D	۳/۵۰	۲/۰۰ ^{Da}	صفر	۴۰
۷/۵۰ ^{Da}	۴/۵۰	۳/۰۰ ^{Da}	۵/۷۵ ^{Da}	۳/۷۵	۲/۰۰ ^{Da}	۰/۳	۴۰
۷/۵۰ ^{Da}	۴/۵۰	۳/۰۰ ^{Da}	۵/۵۰ ^D	۳/۵۰	۲/۰۰ ^{Da}	صفر	۱۰۰
۸/۲۵ ^a	۴/۷۵	۳/۵۰ ^a	۶/۵۰ ^a	۳/۷۵	۲/۷۵ ^{Da}	۰/۳	۱۰۰
۷/۵۰ ^{Da}	۴/۵۰	۳/۰۰ ^{Da}	۵/۵۰ ^D	۳/۵۰	۲/۰۰ ^{Da}	صفر	روغن اکسید
۷/۱۰ ^D	۴/۵۰	۲/۵۰ ^D	۵/۰۰ ^D	۳/۲۵	۱/۷۵ ^D	۰/۳	روغن اکسید
۷/۷۵ ^{Da}	۴/۷۵	۳/۰۰ ^{Da}	۵/۷۵ ^{Da}	۴/۰۰	۱/۷۵ ^D	صفر	روغن اکسید
۷/۵۰ ^{Da}	۴/۵۰	۳/۰۰ ^{Da}	۵/۷۵ ^{Da}	۳/۵۰	۲/۲۵ ^{Da}	۰/۳	روغن اکسید
۷/۵۰ ^{Da}	۴/۷۵	۲/۷۵ ^{Da}	۵/۵۰ ^D	۳/۲۵	۲/۲۵ ^{Da}	صفر	روغن اکسید
۸/۲۵ ^a	۴/۷۵	۳/۵۰ ^a	۶/۵۰ ^a	۳/۷۵	۲/۷۵ ^a	۰/۳	روغن اکسید
۰/۳۰۳	۰/۲۷۹	۰/۲۴۶	۰/۲۸۸	۰/۲۸۲	۰/۲۸۸		SEM
۷/۵۴	۴/۵۴	۳/۰۰	۵/۶۶	۳/۶۲	۲/۰۴		اثرات اصلی
۷/۵۸	۴/۶۲	۲/۹۵	۵/۶۶	۳/۵۴	۲/۱۲		روغن اکسید
۷/۲۵ ^D	۴/۵۰	۲/۷۵ ^D	۵/۳۱ ^D	۳/۵۰	۱/۸۱ ^D		روغن اکسید ۲٪
۷/۵۶ ^{Da}	۴/۵۶	۳/۰۰ ^{Da}	۵/۶۸ ^{Da}	۳/۶۸	۲/۰۰ ^D		روغن اکسید ۴۰٪
۷/۸۷ ^a	۴/۶۸	۳/۱۸ ^a	۶/۰۰ ^a	۳/۵۶	۲/۴۳ ^a		روغن اکسید ۱۰۰٪
۷/۴۵	۴/۵۸	۲/۸۷	۵/۵۰ ^D	۳/۵۴	۱/۹۵		سلیوم
۷/۶۶	۴/۵۸	۳/۰۸	۵/۸۳ ^a	۳/۶۲	۲/۲۰		سلیوم ۰/۳
P-Values							
۰/۸۱۳	۰/۶۰۴	۰/۷۷۱	۰/۶۵۱	۰/۶۱۲	۰/۶۲۰		روغن
۰/۰۲۲	۰/۶۲۴	۰/۰۵۳	۰/۰۰۷	۰/۶۳۷	۰/۰۱۲		روی
۰/۹۴۵	۰/۹۳۴	۰/۹۱۸	۰/۸۲۶	۰/۶۳۷	۰/۹۳۹		روغن*روی
۰/۲۴۲	۰/۸۴۵	۰/۱۵۱	۰/۰۵۳	۰/۶۱۲	۰/۱۴۲		سلیوم
۰/۲۴۲	۰/۶۰۴	۰/۲۸۵	۰/۳۲۴	۰/۳۱۳	۰/۹۵۲		روغن*سلیوم
۰/۱۰۲	۰/۸۱۶	۰/۱۳۲	۰/۰۲۳	۰/۴۳۶	۰/۱۹۹		روی*سلیوم
۰/۴۸۶	۰/۹۳۴	۰/۱۷۹	۰/۶۴۹	۰/۴۳۶	۰/۵۷۴		روغن*روی*سلیوم

a-b در هر ستون، حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد (p<۰/۰۵). SEM: میانگین انحراف استاندارد (Standard Error Mean)

ضد اکسیدانی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و باعث کاهش اثر اکسیدکنندگی رادیکال‌های آزاد می‌شود همچنین عنصر ضروری برای آنزیم سوپراکسیددسموتاز می‌باشد که باعث بهبود عملکرد سیستم ایمنی سلولی می‌گردد (۱۳). در حالی که در آزمایش حاضر هیچ تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های آزمایشی مشخص نشد و نتیجه به دست آمده مغایر با نتایج (۱،۷) می‌باشد. لازم به ذکر است که اثر روی بر وزن طحال به‌عنوان محل تولید لنفوسیت‌های T، در این آزمایش معنی‌دار بود ولی دلیل عدم تأثیر معنی‌دار عنصر روی در تست CBH، که نمایگر افزایش میزان فعالیت سلول‌های T، B و ماکروفاژها می‌باشد، احتمالاً ناشی از تفاوت در میزان سطح

تأثیر گروه‌های مختلف آزمایشی بر عملکرد سیستم ایمنی سلولی

نتایج ارزیابی حساسیت پوستی بازوفیل (CBH) که جهت بررسی میزان پاسخ ایمنی سلولی جوجه‌ها مورد استفاده قرار گرفت در جدول ۳ نشان داده شده است. تفاوت معنی‌داری در میزان ضخامت پوست بین انگشتان ۲ و ۳ پا بعد ۱۲ و ۲۴ ساعت از تزریق فیتوهموگلوبین بین جوجه‌های تغذیه‌شده با جیره‌های آزمایشی مختلف مشاهده نشد (p>۰/۰۵). افزودن سلیوم به جیره پرندگان باعث تقویت سیستم ایمنی سلولی می‌گردد (۱). تحریک سیستم ایمنی ممکن است به دلیل افزایش فعالیت لنفوسیت‌های T و سلول‌های بیگانه‌خوار و افزایش سطح پروتئین سرم باشد (۷). روی فعالیت آنزیم‌های

سلیوم، عدد بالاتری را نشان دادند ولی از لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار نبود.

والش و همکاران (۲۳) گزارش کردند در اثر کمبود روی امکان کاهش اندازه اندام لنفاوی، خصوصاً طحال وجود دارد. در آزمایش حاضر نیز عدم مکمل‌کردن روی در جیره باعث افت معنی‌دار در وزن نسبی طحال مشاهده شد. طحال از اندام‌های لنفوئیدی ثانویه بدن است که در تمایز و توسعه لنفوسیت‌های T و B نقشی مهم دارد و از اندام‌های اصلی تولید آنتی‌بادی در بدن در مقابل هر گونه آنتی‌ژن می‌باشد و افزایش وزن آن نشانه‌ی افزایش جمعیت و تولید سلول‌های ایمنی می‌باشد (۴). هر چند سطوح مختلف روی، تفاوت معنی‌داری را در وزن نسبی تیموس و بورس نشان ندادند ولی از نظر عددی وزن نسبی بورس در سطوح ۴۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روی، بیشتر از سطح صفر میلی‌گرم بر کیلوگرم روی بود. تراورز و همکاران (۲۱) و همچنین بارتلت و اسمیت (۱۷)، گزارش کردند روغن اکسیده و استرس اکسیداتیو، باعث کاهش وزن در اندام لنفوئیدی می‌شوند ولی مشاهدات ما در این آزمایش کاهش وزن اندام لنفوئیدی را در سطح روغن اکسیده نسبت به روغن سالم از نظر عددی نشان داد ولی این تفاوت معنی‌دار نبود که مطابق با گزارش صالح و همکاران (۱۵) می‌باشد. روی یک کوفاکتور برای تعدادی از آنزیم‌ها، از جمله تیمیدین کیناز، ریبونوکلاز و DNA پلیمرز و RNA می‌باشد. تمام این آنزیم‌ها برای تقسیم سلولی مهم هستند. علاوه بر این، عنصر روی کوفاکتوری مهم برای تولید تیمولین و هورمون‌های پپتیدی هستند که نقش کلیدی در بلوغ سلول‌های T دارند. کید و همکاران (۱۰) در بررسی نقش عنصر روی نشان دادند که روی باعث افزایش پاسخ ایمنی می‌شود. محققان اعتقاد دارند که عنصر روی با آنزیم‌های تکثیر کننده سلول‌های ایمنی همکاری می‌کند و کمبود مختصر آن باعث کوچک شدن تیموس و طحال و بافت‌های لنفوئیدی می‌شود. مطالعات نشان داده است که جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های غذایی که از نظر سلیوم کمبود دارند ضایعاتی در اندام‌های لنفاوی و اختلال عملکرد سیستم ایمنی بدن به نمایش گذاشته‌اند (۱۴، ۲۴)، که در آزمایش حاضر نیز این افت اندام لنفاوی از نظر عددی قابل مشاهده بود ولی از نظر آماری این اختلاف‌ها، معنی‌دار نبودند. تفاوت گزارشات این چنینی ممکن است در نتیجه تفاوت در میزان به کار رفته عناصر معدنی و یا اثر متقابل بین سایر مواد مغذی در جیره‌های پایه مورد استفاده در آزمایشات تغذیه‌ای باشد.

روی مورد استفاده، شکل مورد استفاده شده عنصر روی، سویه جوجه مورد آزمایش و شرایط پرورش باشد.

پارامترهای مربوط به اندام‌های لنفاوی

اثرات گروه‌های آزمایشی مختلف بر وزن نسبی (گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن زنده) تیموس، بورس و طحال در جدول ۴ نشان داده شده است. گروه‌های آزمایشی مختلف تأثیری بر میانگین وزن تیموس، بورس و طحال نشان ندادند. در بررسی اثرات اصلی عنصر روی بر وزن نسبی اندام طحال بدون در نظر گرفتن فاکتورهای سلیوم و روغن، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.05$). به طوری که بدون در نظر گرفتن روغن و سلیوم جوجه‌های دریافت‌کننده سطح صفر میلی‌گرم در کیلوگرم روی کمترین، وزن نسبی طحال و جوجه‌های دریافت‌کننده سطح ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم روی، بیشترین میزان وزن نسبی طحال را دارا بودند. همچنین اثر اصلی روغن در وزن نسبی طحال از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت ولی از لحاظ عددی میزان افزایش وزن نسبی طحال در روغن سالم در مقایسه با روغن اکسیده بیشتر بود (۰/۱۵۱ در مقابل ۰/۱۴۳). همچنین در مورد اثر اصلی سلیوم، نتایج مشابهی در مورد وزن طحال نشان داده شد و تفاوت فقط از لحاظ عددی وجود داشت که سطح ۰/۳ میلی‌گرم/کیلوگرم سلیوم وزن نسبی طحال بیشتری را نسبت به سطح صفر سلیوم نشان داد (۰/۱۵۰ در مقابل ۰/۱۴۴). در اثرات اصلی نوع روغن، وزن نسبی تیموس اختلاف معنی‌داری بین دو سطح روغن مورد استفاده، نشان نداد ولی از نظر عددی میزان وزن نسبی تیموس در جوجه‌های تغذیه‌شده با روغن سالم بیشتر از جوجه‌های تغذیه‌شده با روغن اکسیده بود (۰/۱۴۰ در مقابل ۰/۱۳۷). همچنین تأثیر اثر سطوح مختلف روی بر وزن نسبی تیموس معنی‌دار نبود ولی از نظر عددی جوجه‌های تغذیه‌شده با سطح ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم روی وزن نسبی تیموس بالاتری نسبت به وزن نسبی تیموس جوجه‌های تغذیه‌شده با جیره فاقد روی داشتند (۰/۱۴۲ در مقابل ۰/۱۳۶). اثر اصلی سلیوم نیز بر وزن نسبی تیموس از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ولی از نظر عددی سطح ۰/۳ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن نسبی تیموس بالاتری نسبت به سطح صفر سلیوم را نشان دادند (۰/۱۴۰ در مقابل ۰/۱۳۷). در بررسی اثرات اصلی روغن، روی و سلیوم بر وزن نسبی بورس نیز هیچ اثر معنی‌داری وجود نداشت ولی از نظر عددی روغن سالم نسبت به روغن اکسیده، ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم روی نسبت به صفر میلی‌گرم/کیلوگرم روی و ۰/۳ میلی‌گرم/کیلوگرم سلیوم نسبت به صفر میلی‌گرم/کیلوگرم

جدول ۳- اثر گروه‌های آزمایشی بر پاسخ ایمنی سلولی

Table 3. Effect of experimental diets on cellular immune response

تفاوت اندازه بعد از ۲۴ ساعت	تفاوت اندازه بعد از ۱۲ ساعت	گروه‌های آزمایشی		روغن
		سطح سلنیوم	سطح روی	
۰/۳۰۰	۰/۳۷۵	صفر	صفر	سالم
۰/۳۷۵	۰/۴۵۰	۰/۳	صفر	سالم
۰/۳۰۰	۰/۳۰۰	صفر	۴۰	سالم
۰/۳۷۵	۰/۴۰۰	۰/۳	۴۰	سالم
۰/۳۷۵	۰/۳۷۵	صفر	۱۰۰	سالم
۰/۳۲۵	۰/۱۷۵	۰/۳	۱۰۰	سالم
۰/۲۷۵	۰/۳۲۵	صفر	صفر	۲٪ روغن اکسیده
۰/۲۷۵	۰/۲۰۰	۰/۳	صفر	۲٪ روغن اکسیده
۰/۳۲۵	۰/۴۷۵	صفر	۴۰	۲٪ روغن اکسیده
۰/۳۲۵	۰/۳۲۵	۰/۳	۴۰	۲٪ روغن اکسیده
۰/۲۵۰	۰/۲۲۵	صفر	۱۰۰	۲٪ روغن اکسیده
۰/۲۵۰	۰/۲۵۰	۰/۳	۱۰۰	۲٪ روغن اکسیده
۰/۱۰۵	۰/۱۰۲			SEM
				اثرات اصلی
۰/۳۴۱	۰/۳۲۹	سالم		روغن
۰/۲۴۵	۰/۳۰۰	۲٪ روغن اکسیده		روغن
۰/۳۰۶	۰/۳۳۷	صفر		روی
۰/۳۳۱	۰/۳۷۵	۴۰		روی
۰/۲۴۲	۰/۲۳۱	۱۰۰		روی
۰/۲۶۶	۰/۳۲۹	صفر		سلنیوم
۰/۳۲۰	۰/۳۰۰	۰/۳		سلنیوم
				P-Value
۰/۶۱۷	۰/۶۷۹			روغن
۰/۶۴۱	۰/۲۷۰			روی
۰/۲۸۱	۰/۴۷۴			روغن*روی
۰/۴۵۲	۰/۷۹۱			سلنیوم
۰/۷۳۸	۰/۳۸۶			روغن*سلنیوم
۰/۱۸۵۰	۰/۹۹۵			روی*سلنیوم
۰/۵۹۰	۰/۴۰۸			روغن*روی*سلنیوم

SEM: میانگین انحراف استاندارد (Standard Error Mean)

تفاوت معنی داری ایجاد نکردند، اما تأثیر مثبتی در جهت تقویت سیستم ایمنی داشتند. اندام‌های لنفاوی نیز به دلیل جیره‌های اعمال شده شامل روی و سلنیوم، وزن نسبی بهتری در مقایسه با تیمار شاهد ثبت کردند.

نتایج این پژوهش نشان داد مکمل کردن روی و سلنیوم، سیستم ایمنی همورال را تحت تأثیر قرار می‌دهد و موجب بهبود عملکرد سیستم ایمنی همورال می‌شود. همچنین با وجود این که گروه‌های آزمایشی بر روی سیستم ایمنی سلولی

جدول ۴- اثر گروه‌های آزمایشی بر وزن نسبی اندام‌های لنفاوی

وزن طحال (گرمدر ازای ۱۰۰ گرموزنزننده)	وزن بورس (گرمدر ازای ۱۰۰ گرموزنزننده)	وزن تیموس (گرمدر ازای ۱۰۰ گرموزنزننده)	گروه‌های آزمایشی		
			سلیوم	روی	روغن اکسیده
-/۱۴۲	-/۲۳۲	-/۱۳۷	صفر	صفر	سالم
-/۱۴۷	-/۲۵۵	-/۱۳۷	۰/۳	صفر	سالم
-/۱۴۲	-/۲۵۷	-/۱۳۷	صفر	۴۰	سالم
-/۱۵۰	-/۲۱۷	-/۱۴۰	۰/۳	۴۰	سالم
-/۱۶۵	-/۲۴۲	-/۱۴۲	صفر	۱۰۰	سالم
-/۱۶۰	-/۲۵۷	-/۱۴۵	۰/۳	۱۰۰	سالم
-/۱۳۵	-/۲۲۰	-/۱۳۵	صفر	صفر	۲٪ روغن اکسیده
-/۱۳۷	-/۲۴۵	-/۱۳۵	۰/۳	صفر	۲٪ روغن اکسیده
-/۱۳۵	-/۲۴۰	-/۱۳۷	صفر	۴۰	۲٪ روغن اکسیده
-/۱۴۵	-/۲۴۵	-/۱۳۷	۰/۳	۴۰	۲٪ روغن اکسیده
-/۱۴۷	-/۲۴۵	-/۱۳۷	صفر	۱۰۰	۲٪ روغن اکسیده
-/۱۶۲	-/۲۲۲	-/۱۴۵	۰/۳	۱۰۰	۲٪ روغن اکسیده
-/۰۰۹	-/۰۱۳	-/۰۱۰	SEM		
اثرات اصلی					
-/۱۵۱	-/۲۴۳	-/۱۴۰	روغن سالم		روغن اکسیده
-/۱۴۳	-/۲۳۶	-/۱۳۷	۲٪ روغن اکسیده		
-/۱۴۰ ^D	-/۲۳۸	-/۱۳۶	صفر		روی
-/۱۴۳ ^{Da}	-/۲۴۰	-/۱۳۸	۴۰		
-/۱۵۸ ^a	-/۲۴۱	-/۱۴۲	۱۰۰		
-/۱۴۴	-/۲۳۹	-/۱۳۷	صفر		سلیوم
-/۱۵۰	-/۲۴۰	-/۱۴۰	۰/۳		
P-Value					
-/۸۷۲	-/۹۳۱	-/۵۹۰			روغن
-/۰۰۸	-/۷۸۸	-/۲۹۸			روی
-/۹۳۷	-/۶۸۴	-/۹۶۶			روی* روغن
-/۲۴۴	-/۹۲۹	-/۴۵۰			سلیوم
-/۴۲۷	-/۷۳۷	-/۹۱۱			سلیوم* روغن
-/۸۶۵	-/۲۰۶	-/۹۸۵			سلیوم* روی
-/۷۶۳	-/۰۸۶	-/۸۷۶			سلیوم* روی* روغن

a-b در هر ستون، حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($p < 0.05$).

SEM: میانگین انحراف استاندارد (Standard Error Mean)

منابع

- Arthur, J.R., R.C. McKenzie and G.J. Beckett. 2003. Selenium in the immune system. The Journal of Nutrition, 133: 1457S-1459S.
- Cai, S., C. Wu, L. Gong, T. Song, H. Wu and L. Zhang. 2012. Effects of nano-selenium on performance, meat quality, immune function, oxidation resistance, and tissue selenium content in broilers. Poultry Science, 91: 2532-2539.
- Chand, N., S. Naz, A. Khan, S. Khan and R.U. Khan. 2014. Performance traits and immune response of broiler chicks treated with zinc and ascorbic acid supplementation during cyclic heat stress. International Journal of Biometeorology, 58: 2153-2157.
- Eerola, E., T. Veromaa and P. Toivanen. 1987. Special features in the structural organization of the avian lymphoid system. Cell and Tissue Research, 258: 119-124.
- Engberg, R.M., C. Lauridsen, S.K. Jensen and K. Jakobsen. 1996. Inclusion of oxidized vegetable oil in broiler diets. Its influence on nutrient balance and on the antioxidative status of broilers. Poultry Science, 75: 1003-1011.
- Fekete, S.G. and R. Kellems. 2007. Interrelationship of feeding with immunity and parasitic infection: a review. Veterinárni Medicína, 52: 131.
- Fuller, R. 1989. A review: probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66: 365-378.
- Hegazy, S. and Y. Adachi. 2000. Comparison of the effects of dietary selenium, zinc, and selenium and zinc supplementation on growth and immune response between chick groups that were inoculated with Salmonella and aflatoxin or Salmonella. Poultry Science, 79: 331-335.
- Karimi, A., K. Hosseini, Z. Nematy and M.R. Sheikhlou. 2018. Effects of different zinc sources on productive performance and egg quality, blood parameters and immune response in Japanese layer quail. Research On Animal Production, 9(20): 27-35.

10. Kidd, M., N. Anthony, L. Newberry and S. Lee. 1993. Effect of supplemental zinc in either a corn-soybean or a milo and corn-soybean meal diet on the performance of young broiler breeders and their progeny. *Poultry Science*, 72: 1492-1499.
11. Kidd, M., P. Ferket and M. Qureshi. 1996. Zinc metabolism with special reference to its role in immunity. *World's Poultry Science Journal*, 52: 309-324.
12. Nelson, N., N. Lakshmanan and S. Lamont. 1995. Sheep red blood cell and Brucella abortus antibody responses in chickens selected for multitrait immunocompetence. *Poultry Science*, 74: 1603-1609.
13. Powell, S.R. 2000. The antioxidant properties of zinc. *The Journal of Nutrition*, 130: 1447S-1454S.
14. Rao, S.V.R., B. Prakash, M.V.L.N. Raju, A.K. Panda, S. Poonam and O.K. Murthy. 2013. Effect of supplementing organic selenium on performance, carcass traits, oxidative parameters and immune responses in commercial broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26: 247.
15. Saleh, H., S. Rahimi and T.M. Karimi. 2009. The effect of diet that contained fish oil on performance, serum parameters, the immune system and the fatty acid composition of meat in broilers. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 3(2): 69-75.
16. Shankar, A.H. and A.S. Prasad. 1998. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68: 447S-463S.
17. Smith, M. 2003. Effects of different levels of zinc on the performance and immunocompetence of broilers under heat stress. *Poultry Science*, 82: 1580-1588.
18. Soroush, Z., S. Salari, M. Sari and J. Fayazi. 2015. Tabatabaie. Effects of different levels of zinc on performance, egg quality traits and some blood parameters of laying hens. *Research on Animal Production*, 6: 19-27 (In Persian).
19. Stefanidou, M., C. Maravelias, A. Dona and C. Spiliopoulou. 2006. Zinc: a multipurpose trace element. *Archives of Toxicology*, 80: 1.
20. Surai, P. 2002. Selenium in poultry nutrition 2. Reproduction, egg and meat quality and practical applications. *World's Poultry Science Journal*, 58: 431-450.
21. Tavárez, M., D.D. Boler, K. Bess, J. Zhao, F. Yan, A. Dilger, F. McKeith and J. Killefer. 2011. Effect of antioxidant inclusion and oil quality on broiler performance, meat quality, and lipid oxidation. *Poultry Science*, 90: 922-930.
22. Thompson, D., K. Elgert, W. Gross and P. Siegel. 1980. Cell-mediated immunity in Marek's disease virus-infected chickens genetically selected for high and low concentrations of plasma corticosterone. *American Journal of Veterinary Research*, 41: 91-96.
23. Walsh, C. T., H. H. Sandstead, A. d. S. Prasad, P. M. Newberne and P. J. Fraker. 1994. Zinc: health effects and research priorities for the 1990s. *Environmental Health Perspectives*, 102: 5-46.
24. Zhang, Z.W., Q.H. Wang, J.L. Zhang, S. Li, X.L. Wang and S.W. Xu. 2012. Effects of oxidative stress on immunosuppression induced by selenium deficiency in chickens. *Biological Trace Element Research*, 149: 352-361.

The Effect of Different Levels of Zinc and Selenium Supplementation in Diets Containing Oxidized Oil on Immune System and Lymphatic Organs of Broiler Chickens

Masood Sarfazaei¹, Hassan Saleh², Mohammad Taher Mirakzahi³
and Omid Jangjoo⁴

1- Graduated M.Sc. Student, Higher Education Complex of Saravan, Sistan and baluchestan, Iran

2- Assistant Professor, Higher Education Complex of Saravan, Sistan and baluchestan, Iran
(Corresponding author: hsaleh.um@gmail.com)

3- Assistant Professor, Higher Education Complex of Saravan, Sistan and baluchestan, Iran

4- Graduated M.Sc. Student, Higher Education Complex of Saravan, Sistan and baluchestan, Iran

Received: 1 April 2020

Accepted: 19 February 2021

Abstract

In order to study the effect of different levels of zinc and selenium in diets containing oxidized oil on humoral and cellular immunity and relative weight of lymphoid organs in broilers, an experiment performed in a 2×3×2 factorial arrangement in a completely randomized design (two Zero and 2% oxidized oil levels, three levels of 0, 40 and 100 mg / kg zinc sulfate, two levels of zero and 0.3 mg / kg selenium) using 480 one-day-old Ross 308 chicks with 12 treatments and 4 replicate per treatment and 10 chicks per each treatment. To evaluate the immune system, changes in antibody titers were performed by injection of Sheep red blood cell (SRBC) at two times (21 and 28 days) and blood sampling at two times (28 and 35 days). The relative weights of bursa, spleen and thymus were measured at 42 days after slaughter. Cutaneous basophil hypersensitivity (CBH) test was used to evaluate cellular immune system. The results of total antibody titer in first and second times showed significant difference ($P < 0.05$). Maximum grade of primary and secondary total antibodies in chicks fed with 100 mg / kg zinc and 0.3 mg / kg selenium and chicks oil). Containing 100 mg / kg zinc and 0.3 mg / kg selenium and the effect of zinc, Selenium, and their combined supplementation on the initial total antibody grade response was also significant, with 100 mg / kg zinc and 0.3 mg / kg. Selenium significantly increased the initial total antibody titer response. The effect of different experimental groups on IgM antibody response was significant at the first and second time ($P < 0.05$). The cellular immune response of CBH test was not affected by different experimental diets. The effect of treatments on the relative weight of different lymph nodes was not significantly different. The results demonstrated that supplementation of zinc sulfate and sodium selenite improved the immune system of broilers.

Keyword: Broiler, Cellular immunity, Humoral immunity, Selenium, Zinc