مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

تاثیر پودر آب پنیر و شکل فیزیکی خوراک بر پاسخ ایمنی هومورال و بیان ژن‌های اینترلوکین-۴ و اینترفرون گاما در ژنوم جوجه‌های گوشتی

سونیا زکی زاده*[۱]، مریم ترابی[۲]، علی جوادمنش[۳]، علی زنگنه[۴]، محمد حسین ناظم شیرازی[۵]

[۱] دانشیار بخش ژنتیک و اصلاح دام موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

[۲] آزمایشگاه بیولوژی ملکولی اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی، مشهد، ایران.

[۳] استادیار گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[۴] گروه علوم دامی و دامپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.

[۵] دکترای دامپزشکی و متخصص بین المللی آزمایشگاه در پروژه بانک جهانی، پروژه فائو، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۱/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۰۲

چکیده

این طرح جهت بررسی تاثیر پودر آب‌پنیر و شکل فیزیکی خوراک بر ایمنی هومورال و بیان ژن‌های اینترلوکین-۴ و اینترفرون گاما روی۲۴۰ قطعه جوجه خروس یک‌روزه گوشتی سویه راس ۳۰۸ انجام شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی در ۶ تیمار به روش فاکتوریل (۲×۳)، آب پنیر در سه سطح (صفر، ۴ و ۸٪) و فرم فیزیکی در دو سطح (آردی و پلت) به جیره جوجه‌های گوشتی با ۴ تکرار و ۱۰ قطعه جوجه در هر تکرار انجام شد. جیره‌ها بر مبنای احتیاجات جوجه گوشتی سویه راس ۳۰۸ تنظیم و در سه مرحله پرورش در اختیار پرندگان قرار گرفتند. جهت تعیین تیتر ایمنی علیه نیوکاسل، برونشیت، گامبورو و آنفولانزا در روزهای ۱۰، ۳۱ و ۴۲ خونگیری شد. در پایان هر مرحله یک قطعه جوجه از هر واحد آزمایشی انتخاب و کشتار شد؛ وزن اندام‌های لنفاوی یادداشت و بیان ژن‌های اینترلوکین-۴ و اینترفرون‌گاما نمونه ژژنوم پس از استخراج mRNA و ساخت cDNA، اندازه‌گیری شد. مشخص گردید افزودن پودر آب‌پنیر بر وزن طحال و بورس فابرسیوس اثر معنی‌دار نداشت، اما پلت کردن در میان‌دان بر وزن بورس تاثیر معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۱$). پلت کردن و افزودن آب‌پنیر به جیره در میان‌دان باعث افزایش بیان نسبی ژن اینترلوکین-۴ گردید ($p<۰/۰۵$). بیان ژن اینترفرون‌گاما تحت تاثیر پودر آب‌پنیر قرار نگرفت اما پلت کردن، بیان این ژن را در پیش‌دان ($p<۰/۰۱$) و میان‌دان افزایش داد ($p<۰/۰۱$).

واژه‌های کلیدی: *اندام لنفاوی، ایمنی هومورال، بیان ژن، تیتراسیون واکسن.*

* نویسنده مسئول: سونیا زکی زاده تلفن: ۰۹۱۵۳۱۰۷۵۶۹ Email:Sonia_zaki@yahoo.com

مقدمه

بهره‌گیری از فرآورده‌های فرعی از جمله فرآورده‌های جانبی صنایع شیر به عنوان منابع خوراکی جدید در راستای کاهش هزینه‌های پرورش اهمیت فراوانی دارد. آب پنیر که مایع حاصل از فرایند پنیرسازی است، به رغم آنکه ارزش پروتئینی بالایی در زنجیره غذایی انسان دارد، به عنوان ضایعات کارخانجات لبنی محسوب می‌شود، اگرچه می‌تواند خشک شده آن را برای تغذیه طیور مورد استفاده قرار داد (Aghaei *et al.,* 2010). پودر آب پنیر دارای مقدار قابل توجهی لاکتوز است، اما طیور به دلیل نداشتن آنزیم لاکتاز قادر به هضم آن نیستند؛ در نتیجه لاکتوز موجود در آب پنیر در دستگاه گوارش پرنده تخمیر شده و باعث تکثیر برخی باکتری‌های مفید مانند لاکتوباسیل‌ها می‌شود (Aghaei *et al.,* 2010). پودر آب پنیر به عنوان پری بیوتیک شناخته شده و اخیرا به عنوان محرک رشد، جایگزین شونده‌های آنتی بیوتیک گردیده است. پری بیوتیک‌ها،کربوهیدرات‌های با زنجیره کوتاه هستند که توسط آنزیم‌های گوارشی طیور قابل هضم نیستند (Taherpour *et al*., 2009). این مواد از طریق رشد و یا فعالیت تعداد محدودی از گونه‌های باکتریائی که هدف آنها بهبود سلامتی میزبان است، به طور انتخابی باعث تحریک رشد یا فعالیت شمار محدودی از باکتری‌ها شده و به طور موثری بر ارتقاء سلامتی پرنده تاثیر می‌گذارند (Panda *et al*., 2006). در تحقیقی که توسط Kheiri *et al*. (2015) انجام شد، افزودن آب پنیر باعث بهبود عملکرد تولیدی، کاهش کلسترول و تری گلیسرید، بهبود تیتر واکسیناسیون علیه بیماری نیوکاسل، افزایش طول و ضخامت اپیتلیال روده و بهبود میکروفلور روده جوجه‌های گوشتی شد. بهبود ضریب تبدیل غذایی طیور گوشتی با مصرف پودر آب پنیر نیز گزارش شده است (Aghaei *et al.,* 2010; Omara, 2012). با افزایش نگرانی‌ها در رابطه با مقاومت آنتی بیوتیکی و ممانعت درمان با این محصولات در اروپا و ایالات متحده آمریکا، تحقیقات جهت یافتن جایگزین شونده‌های آنتی‌بیوتیک در تولیدات طیور افزایش یافته است (Paterson and Borkhoder, 2003). مکانیسم دیگری که ممکن است وجود داشته باشد، تغییر قابلیت متابولیسمی فلور روده و تغییر میکروفلور آن به سمت میکروب‌های مفید نظیر لاکتوباسیل‌ها و کاهش اشریشیا کلی و سایر میکروارگانیسم‌های مضر، با مصرف مواد خاصی مانند پری بیوتیک‌ها (آب پنیر، مانان، بتاگلوکان، فرمکتو)، اسیدهای آلی و انواع روغن است (Ebrabimi *et al*., 2016).

امروزه، دو نوع فرم فیزیکی آردی و پلت جهت تغذیه طیور متداول است. مهمترین عامل تاثیرگذار در تهیه پلت، فرآیند سابیدن و شرایط آن است که باعث ریزتر شدن اندازه ذرات و افزایش نسبت سطح به حجم می‌شود؛ در نتیجه باعث نفوذ بیشتر دما و رطوبت به عمق ماده غذایی می‌گردد. شرایط دمایی باعث اتصال مواد

مغذی می‌شود که برای تشکیل باندهای قوی پلت، ضروری هستند. (Kenny & Flemming, 2006). حرارتی که روی کربوهیدرات‌ها اعمال می‌شود، باعث شکسته شدن گرانول‌های آمیلوز و آمیلوپکتین می‌شود. همچنین، تغییراتی در ساختار سه بعدی پروتئین رخ می‌دهد که قابلیت هضم آن را بهبود می‌دهد که می‌توان آن را به تاثیر دما، فشار و رطوبت خوراک نسبت داد، زیرا در درجه خاصی از ژلاتینه شدن، پرنده از مواد مغذی بهتر استفاده می‌کند (Maiorka *et al*., 2005). از طرف دیگر، تعداد ویلی‌های دودنوم جوجه‌ها در جیره‌های پلت بیشتر و کریپت‌ها، عمیق‌تر از جیره آردی است (Dahlke *et al*., 2002). در برخی تحقیقات pH دستگاه گوارش تغییر معنی‌دار نشان نداد (Dahlke *et al*., 2002)، در حالی که گزارش دیگر بیان نمود که در جوجه‌های تغذیه شده با جیره پلت به دلیل افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار سنگدان و سکوم که محصول تخمیر میکروبی هستند، ، اسیدیته سکوم کاهش نشان داد (Huang *et al*., 2006). باید توجه نمود که تغذیه جیره‌های پلت شده به تنهایی و بدون در نظرگرفتن کیفیت آن، برای دستیابی به عملکرد بالاتر پرنده کفایت نمی‌کند، به طوری که تغذیه خوراک‌های پلت شده با کیفیت ضعیف، باعث کاهش اثرات مفید استفاده از خوراک پلت در طیور گوشتی می‌شود (Khodaei *et al*. 2015).

ایمنی هومورال، به آن دسته از پاسخ‌های ایمنی اطلاق می‌شود که آنتی بادی‌ها نقش مهمی در مکانیسم‌های اجرایی آن دارند. پاسخ‌های ایمنی به دو دسته هومورال (وابسته به آنتی بادی) و سلولی (وابسته به سلول T) تقسیم می‌شوند. حذف آنتی ژن‌های محلول و تخریب میکروارگانیسم‌های خارج سلولی، وظیفه‌ی اصلی ایمنی هومورال (به واسطه‌ی آنتی بادی‌های تولید شده توسط سلول‌های B) و حذف میکروارگانیسم‌های داخل سلولی (به واسطه‌ی سلول‌های T) می باشد. آنتی بادی دسته‌ای از پروتئین‌های گلوبولین می‌باشند که در ایمنی بدن نقش دارند و ایمنوگلوبولین نامیده می‌شوند. یکی از سیگنال‌های فعال سازی پاسخ ایمنی هومورال، سیتوکین‌هایی مانند اینترلوکین-۴ هستند که سبب فعال شدن، تکثیر و تمایز سلول‌های B می‌شوند (Fietta and Delsante, 2009). ژن اینترلوکین-۴ در طیور روی کروموزوم ۱۳ قرار گرفته و طول mRNA آن ۴۱۱ جفت باز می‌باشد (NCBI, NM_001007079). اینترلوکین‌ها، سیتوکین‌هایی هستند که روابط بین لنفوسیت‌ها و سایر لکوسیت‌ها را تنظیم می‌کنند و با مولکول‌های بسیاری به صورت واسطه‌ای در مکانیسم‌های ایمنی مرتبط هستند، لذا، به محرک‌های انتخابی بسیاری از بیماری‌های عفونی پاسخ می‌دهند (Downing *et al*., 2010). تیموس که اندام اولیه لنفی می‌باشد در عدم حضور هر تحریک کننده‌ای قادر به تولید انواع سیتوکین‌ها است. در روز ۱۴ و ۱۸جنینی و روز اول پس از هچ، ژن های سیتوکین جوجه مانند IFN نوع ۱، IL-1β، IL-2 و فاکتور رشد β4، به صورت جزئی در

تیموسایت‌ها بیان شده و به نظر می‌رسد با توسعه تیموس همراه باشند (Peters *et al*., 2003).

اینترفرون‌ها گروه دیگری از سیتوکین‌ها هستند که در تکثیر ویروس‌ها تداخل ایجاد می‌کنند و در ایمنی ذاتی نقش دارند. اینترفرون‌ها به سه تیپ ۱ (مقابله با عفونت ویروسی)، تیپ ۲ و تیپ ۳ تقسیم می‌شوند. تیپ ۲ اینترفرون یا اینترفرون گاما، با خاصیت ضد ویروسی آن که توسط سلول‌های ایمنی فعال نظیر سلول‌های T و natural killer ها (NK) ایجاد می‌شود، شناخته می‌شود. تیپ ۳ اینترفرون‌ها که پیشتر به نام اینترلوکین ۲۸ و ۲۹ شناخته می‌شدند، در بافت‌های محدودی توزیع شده‌اند و عمدتا در سطوح اپیتلیال فعالیت می‌کنند (Negishi *et al*., 2017). ژن اینترفرون گاما در طیور روی کروموزوم ۱ قرار گرفته و پروتئین بالغی با تعداد ۱۴۵ اسیدآمینه و وزن مولکولی ۱۶/۸ کیلودالتون تولید می‌کند. این ژن همولوژی بالایی از اسیدهای آمینه و تیپ ۱ اینترفرون پستانداران به خصوص در موتیف‌های آن دارد و شواهد حاکی از انشقاق طیور و پستاندار در ۳۵۰ میلیون سال پیش دارد (Digby and Lowenthal, 1995). شناسایی اولیه پپتیدهای مشتق از آنتی ژن به وسیله گیرنده‌های سلول‌های T انجام شده و سلول‌های T helper (Th) نقش مهمی در القا و تنظیم پاسخ ایمنی ایفا می‌کنند که به دو دسته Th1 و Th2 تقسیم می‌شوند. در گذشته تصور می‌شد که اینترفرون گاما توسط سلول‌های Th1 و لنفوسیت سیتوکین‌های $CD8^+$ تولید می‌شود اما گزارش‌های اخیر حاکی از شواهدی است که سایر سلول‌ها مانند سلول‌های B، سلول‌های دندریت و ماکروفاژها نیز اینترفرون ترشح می‌کنند (Negishi *et al*., 2017).

اگر چه مطالعات زیادی در زمینه ژنتیک ملکولی و ارتباط بین ژنوتیپ و عملکرد طیور در ایران انجام شده است (Zandi *et al*., 2014; Mohammadifar *et al*., 2014; Moazeni *et al*., 2016a; Moazeni *et al*., 2016b; Shahdadnejad *et al*., 2016)، اما تاکنون مطالعه نوتری‌ژنومیکس در زمینه ارتباط بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ ایمنی با تغذیه آب پنیر در این حیوانات گزارش نشده است. به دلیل آنکه پری‌بیوتیک‌ها در تغییر جمعیت میکروبی روده موثر هستند؛ لذا، هدف از این تحقیق نقش و اثر پری‌بیوتیک آب پنیر و نوع فرم فیزیکی جیره روی عملکرد تولیدی و افزایش کارایی و تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی سلولی در روده باریک طیور در مقابله با بیماری بود.

مواد و روش‌ها

در این طرح تعداد ۲۴۰ قطعه جوجه نر یکروزه گوشتی از سویه تجاری راس ۳۰۸ به صورت آزمایش فاکتوریل چند مشاهده‌ای ۲×۳ در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد که در آن دو عامل پودر آب پنیر با سه سطح صفر، ۴ و ۸ درصد و عامل فرم فیزیکی خوراک با دو سطح جیره آردی و پلت (دو شکل خوراکی رایج در صنعت پرورش طیور) در نظر گرفته شد. مبنای انتخاب این سطوح، بر اساس بررسی نتایج

حاصل از تحقیق سایر محققین و پیشنهادات ارائه شده بود (Mehri *et al*., 2004; Kermanshahi *et al*., 2006; Rastad *et al*., 2008; Aghaei *et al*., 2010). مدت زمان پرورش جوجه گوشتی دو ماه بود و در سن ۴۲ روزگی با کشتار پایان یافت. جوجه‌ها پس از ورود به سالن شماره گذاری و توزین شدند و به ۲۴ گروه ۱۰ قطعه‌ای با میانگین وزنی مشابه (۵/۷±۴۰/۲ گرم) در پن-های مشخص اختصاص یافتند. برنامه واکسیناسیون گله بر اساس کارت بهداشتی و بیماری‌های شایع در منطقه توسط دامپزشک متخصص بیماری‌های طیور تجویز گردید (جدول ۱).

جدول ۱- برنامه واکسیناسیون گله.

Table 1- Vaccination program.

روز پرورش Day	واکسن Vaccine	نحوه واکسیناسیون Method of vaccination
4	نیوکاسل + آنفولانزا روغنی (کشته) Newcastle+ Influenza oil	تزریقی Injection
4	نیوکاسل B1 Newcastle B1	قطره چشمی Eye drop
10	برونشیت H120 (زنده) Bronchitis H120 (alive)	آشامیدنی Drinking
12	گامبورو (زنده) Infectious Bursal disease (IBD) (alive)	آشامیدنی Drinking
15	نیوکاسل (زنده) Newcastle (alive)	آشامیدنی Drinking
18	گامبورو (زنده) IBD (alive)	آشامیدنی Drinking
21	نیوکاسل (زنده) Newcastle (alive)	آشامیدنی Drinking

جهت بررسی تیتر ایمنی جوجه‌ها، بر اساس برنامه واکسیناسیون گله و پس از تزریق واکسن-های مذکور در روزهای ۲۴، ۳۱ و ۴۲ روزگی، از هرتکرار دو قطعه جوجه انتخاب و از ورید بال با سرنگ ۵ میلی‌لیتری خون‌گیری شده، سرم جدا شد تا سطح تیتر ایمنی گامبورو و برونشیت با روش الایزا (ELISA[1]) و نیوکاسل و آنفولانزا به روش ممانعت از هماگلوتیناسیون HI[2] مشخص گردد. جیره‌های آزمایشی بر اساس احتیاجات جوجه گوشتی سویه راس ۳۰۸ سال (۲۰۰۹) و با استفاده از نرم افزار UFFDA تنظیم شدند (Pesti *et al*., 1992). در تمام تیمارها، جیره‌ها بر اساس انرژی، پروتئین و مواد مغذی یکسانی برای هر یک از مراحل پرورش آغازین (۰-۱۰ روزگی)، رشد (۱۱-۲۴ روزگی) و پایانی (۲۵-۴۲ روزگی) تنظیم شدند. آب پنیر ماده خوراکی نارنجی رنگ به صورت پودر کریستاله که از پساب کارخانجات لبنی استحصال گردیده و از ضایعات زنجیره غذائی انسانی به دست می‌آید، در سه سطح صفر، ۴ و ۸ درصد در جیره اعمال شد و مورد استفاده جوجه‌ها قرار گرفت. آنالیز پودر آب پنیر مورد استفاده در تیمارهای جیره این آزمایش در جدول ۲ آورده شده است

با توجه به اینکه محل اثرگذاری پری‌بیوتیک‌ها روی فلور میکروبی روده و یکی از سایت‌های مهم جذب غذا در ژژنوم است، نمونه برداری از آن در پایان هر سه مرحله پرورش در روزهای ۱۱ ، ۲۵ و ۴۲ انجام گرفت. تعداد ۲۴ جوجه (۱ قطعه از هر پن) پس از ذبح بلافاصله کالبدگشایی شده، بورس فابرسیوس و طحال جدا و از قسمت میانی ژژنوم، حدود ۲ سانتی متر جدا و در داخل میکروتیوپ و کانتینر ازت مایع به آزمایشگاه ژنتیک ملکولی ارسال شد. به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های اینترلوکین ۴ و اینترفرون گاما به همراه ژن مرجع GAPDH سه جفت آغازگر اختصاصی به شرح جدول ۳ توسط شرکت متابیون آلمان سنتز شد (جدول ۳) (Cox *et al*., 2010؛ Kitessa *et al*., 2014).

استخراج RNA با استفاده از کیت جداسازی High Pure شرکت Roche و برای تهیه cDNA از پرایمر هگزامر تصادفی استفاده گردید. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر و طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت.

واکنش‌ها در دستگاه Corbett Research کیاژن استرالیا مدل Rotor gene 6000 انجام گرفت. کلیه واکنش‌ها به صورت دو تکرار و طبق استاندارد MIQE[3] انجام شدند (Bustin *et al*., 2009). تکثیر ژن بیان شده برای PCR کمّی با استفاده از اجزای زیر و در شرایط حرارتی مشخص در جدول ۴ در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد.

[1] Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

2 Haemagglutination Inhibition

[3] *M*inimum *I*nformation for Publication of *Q*uantitative qPCR *E*xperiments

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

. جدول ۲- آنالیز پودر آب پنیر مورد استفاده در تیمارهای جیره.

Table 2- Analysis of Whey components used in treatments.

Value مقدار	Nutrients مواد مغذی
1900 Kcal/Kg	Metabolic energy انرژی متابولیسمی
%7.35	Crude protein پروتئین خام
% 0.7	Calcium کلسیم
% 0.55	Phosphorus فسفر
% 9.6	Ash خاکستر
% 0.3	Crude fiber فیبر خام
% 0.1	Crude fat چربی خام

جدول۳- توالی آغازگرهای استفاده شده در آزمایش.

Table 3- Primary sequences used in experiment.

نام ژن Gene	توالی پرایمر Primer sequence	شماره دسترسی در بانک ژنی NCBI NCBI Acc. No.
GAPDH	F:5´-CCT AGG ATA CAC AGA GGA CCA GGT T- 3´ R:5´GGT GGA GGA ATG GCT GTC A 3´	NM_204305
اینترلوکین-۴ Inteleukin-4	F:5´-GCT CTC AGT GCC GCT GAT G-3´ R:5´-GAA ACC TCT CCC TGG ATG TCA T-3´	NM_001007079
اینترفرون گاما Interferon-gamma	F:5´-GCT CCC GAT GAA CGA CTT GA-3´ R:5´-TGT AAG ATG CTG AAG AGT TCA TTC G-3´	NM_205149

مستر میکس حاوی سایبرگرین به نام 2qPCR-Mastermix with SYBR green از شرکت Primerdesign (انگلستان) استفاده شد (جدول ۴).

شرایط دمایی برای تمام ژن‌ها یکسان بوده و شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس حرارت ۹۵ درجه و ۱۰ ثانیه و ۶۰ درجه ۶۰ ثانیه بودکه ۵۰ دور تکرار انجام گرفت . برای رسم منحنی ذوب[4] دما از ۷۰ تا ۹۵ درجه سانتی گراد بود که در هر ثانیه، یک درجه دما بالاتر رفته و به مدت ۱۰ ثانیه در همین دما باقی می‌ماند. به

[4] melting

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

منظور تعیین بازده واکنش به روش منحنی استاندارد (Ghanipoor-Samami *et al*., 2018)، سری رقت‌های ۱ به ۱۰۰، ۱ به ۱۰۰۰، ۱ به ۱۰۰۰۰، و ۱ به ۱۰۰۰۰۰ از مخلوطی از کل cDNAها (۰/۵ میکرولیتر از هر cDNA) تهیه و واکنش‌های جداگانه qPCR انجام شد. با استفاده از Cq[5] (محور Y) و لگاریتم رقت‌ها (محور X)، منحنی استاندارد برای هر جفت پرایمر ترسیم شد و شیب نمودار و راندمان واکنش توسط نرم افزار Corbet Rotor- Gene Q series software 2.3.1 محاسبه گردید.

مدل آماری طرح در بخش فراسنجه‌های عملکردی به صورت مدل زیر بود:

$Y_{ijk}=M+A_i+B_j+AB_{ij}+e_{ijk}$

Y_{ijk}=ارزش هر مشاهده؛ M= میانگین کل مشاهدات؛ A_i= اثر پودر آب پنیر؛ B_j= اثر فرم فیزیکی خوراک؛ AB_{ij}= اثر متقابل پودر آب پنیر و فرم فیزیکی خوراک؛ e_{ijk}= اثر خطای آزمایش.

داده ها ابتدا با برنامه اکسل(Exell) مرتب شده و با استفاده از نرم افزار آماری SAS 9.1 به روش تجزیه واریانس مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. لازم به ذکر است که ضریب تصحیح برای داده‌ها استفاده نشد و از منحنی استاندارد برای تبدیل استفاده گردید. مقایسه میانگین تیمارها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن(۰/۰۵) انجام شد.

به منظور محاسبه کمّی تغییر بیان ژن نسبی و آنالیز آماری آن از روش منحنی استاندارد استفاده شد و مقادیر Cq ژن مرجع و نمونه ژن‌های بیان شده یا میانگین آنها، تبدیل به مقادیر مطلق و بدون واحد گردید (Ghanipoor-Samami *et al*., 2018):

$$\text{ارزش مطلق} = \exp(\frac{Cq - B}{M})$$

Cq= سیکل کمی هر نمونه، B= مقدار ثابت و اولیه منحنی استاندارد، M= شیب منحنی استاندارد.

برای نرمال کردن داده‌ها میانگین هندسی تکرارها برای هر ژن محاسبه شد (Xiang *et al*., 2014) و در آنالیز واریانس استفاده گردیدند. برای بررسی معنی‌دار بودن تغییر بیان محاسبه شده، از نرم افزار SAS استفاده شد و تفاوت بین گروه‌ها برای هر یک از ژن‌ها به کمک آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج آنالیز واریانس وزن طحال و بورس در جدول ۵ نشان دهنده این مطلب است که افزودن آب پنیر روی این اوزان معنی‌دار نبود. تاثیر فرم فیزیکی جیره روی وزن نسبی بورس فابرسیوس معنی‌دار بود (P<۰/۰۱) اما روی وزن طحال معنی‌دار نبود.

[5] Quantification cycle

جدول ۴- اجزای واکنش Realtime PCR.

Table 4-Realtime PCR reaction component.

غلظت concentrate	Volume حجم (میکرولیتر) (microliter)	Reaction component اجزای واکنش
---	7	Distilled water آب مقطر
2x	10	Mastermix with مستر میکس سایبرگرین SYBR green
$10 pmol/\mu l$	1	Forward primer پرایمر رفت
$10 pmol/\mu l$	1	Backward primer پرایمر برگشت
400 ng	1	cDNA

اگرچه تاثیر آب پنیر روی وزن اندام‌های لنفاوی معنی‌دار نبود، ولی درصد وزن نسبی بورس و طحال در سطوح ۴ و ۸ درصد پودر آب پنیر کاهش یافت (جدول ۵). همچنین، مشاهده گردید که افزودن آب پنیر در جیره پلت باعث تشدید کاهش وزن بورس شد، اگرچه اثرات متقابل معنی‌دار نبود.

تغییرات وزن در اندام‌های طیور در اثر مصرف خوراک پلت گزارش شده است، به طوری که وزن پیش معده (Dahlke *et al*., 2002)، روده کوچک (Dahlke *et al*., 2002) و سنگدان (Huang *et al*., 2006; Khodaei *et al*. 2015؛ Dahlke *et al*., 2002) کمتر و میانگین افزایش وزن (Khodaei *et al*. 2015) و وزن سکوم بیشتر (Huang *et al*., 2006) جوجه‌های تغذیه شده با جیره پلت بیشتر از آردی است؛ در حالی که طول روده باریک نیز کوتاهتر (Dahlke *et al*., 2002) می‌باشد. دلیل کمتر بودن وزن و اسیدیته سنگدان در جیره‌های پلت را به تحریک مکانیکی کمتر در سنگدان و ترشح اسید کلریدریک نسبت داده‌اند. همچنین، نرخ زنده‌مانی و شیوع سالمونلا تیفیموریوم تحت تاثیر فرم فیزیکی خوراک قرار می‌گیرد (Huang *et al*., 2006). انتظار می‌رود که با افزایش سطح پودر آب پنیر و تقویت سیستم ایمنی بدن و در نتیجه بهبود هضم و جذب مواد مغذی، وزن نسبی این اندام‌ها کاهش یابد و یا به دلیل مرگ سلولی و یا آتروفی، اندام تحلیل یافته باشد. بنابراین، نیازی به تولید لنفوسیت‌ها در برابر آنتی‌ژن‌های احتمالی نباشد و اوزان افزایش نیابند.

جدول ۵- تاثیر پودر آب پنیر و فرم فیزیکی خوراک بر وزن نسبی بورس و طحال (گرم) جوجه‌های گوشتی در پایان دوره پرورش.

Table 5- The effect of whey powder and physical form of diet on burse and spleen relative weight of chicks at the end of trial.

وزن نسبی طحال (گرم) Relative weight of spleen (g)	وزن نسبی بورس (گرم) Relative weight of burse (g)	تیمار Treatment
0.11 [a]	0.20 [ab]	جیره آردی فاقد آب پنیر (شاهد) Diet without whey (control)
0.14 [a]	0.16 [ab]	جیره پلت بدون آب پنیر Pelleted diet without whey
0.13 [a]	0.21 [a]	جیره ۴٪ آب پنیر آردی mash diet with 4% whey
0.12 [a]	0.13[b]	جیره ۴٪ آب پنیر پلت Pelleted diet with 4% whey
0.09 [a]	0.16[ab]	جیره ۸٪ آب پنیر آردی mash diet with 8%whey
0.09 [a]	0.13[b]	جیره ۸٪ آب پنیر پلت Pelleted diet with 8% whey
0.02	0.02	خطای معیار Standard error (SE)
		سطح پودر آب پنیر Levels of whey powder
0.13 [a]	0.18 [a]	صفر درصد پودر آب پنیر 0% whey powder
0.12[a]	0.17[a]	۴ درصد پودر آب پنیر 4% whey powder
0.09 [a]	0.14[a]	۸ درصد پودر آب پنیر 4% whey powder
0.01	0.01	خطای معیار Standard error (SE)
		فرم فیزیکی Physical form
0.12 [a]	0.19[a]	جیره آردی Mash diet
0.11 [a]	0.14[b]	جیره پلت Pelleted diet
0.01	0.01	خطای معیار Standard error (SE)
	p-value	
0.57	0.39	اثر متقابل Interaction
0.18	0.17	پودر آب پنیر Whey powder
0.85	<0.001	فرم فیزیکی Physical form

[a-c] اعداد با حروف غیر مشابه در هر ستون با هم اختلاف معنی‌داری دارند (p<۰/۰۵).

[a-c] values with different alphabet in columns differ significantly (p<0.05).

به دلیل درگیر نشدن گله با ویروس گامبورو انتظار می‌رفت که وزن بورس نیز تغییر معنی‌دار نشان ندهد. Khani *et al.* (۲۰۱۵) نیز تاثیری در وزن اندام‌های لنفوئیدی جوجه‌های تغذیه شده با پودر آب پنیر اسیدی و پودر آب پنیر اسیدی کم لاکتوز مشاهده نکردند. این در حالی است که Kheiri *et al.* (2015) کاهش وزن بورس فابرسیوس، چربی بطنی و افزایش وزن کبد و طحال بر اثر مصرف آب پنیر در جوجه‌ها را گزارش کردند.

پاسخ‌های ایمنی هومورال (تیتر ایمنی واکسیناسیون)

اگرچه افزودن آب پنیر تاثیر معنی‌دار روی تیتر گامبورو، برونشیت و آنفولانزا در روزهای پس از واکسیناسیون نداشت (P<۰/۰۵)، اما مقایسات میانگین نشان داد که افزودن آب پنیر به جیره روی تیتر واکسن نیوکاسل در ۳۱ روزگی معنی‌دار بود و باعث بهبود سطح ایمنی شد (P<۰/۰۵). تیترهای برونشیت، نیوکاسل و آنفولانزا تحت تاثیر نوع فرم فیزیکی جیره قرار نگرفتند اما مقایسات میانگین حاکی از تاثیر معنی-دار پلت کردن جیره روی کاهش تیتر گامبورو در روز ۳۱ بود (P<۰/۰۵) (جدول ۶ و ۷).

صرف نظر از نوع فرم فیزیکی جیره، مقدار تیتر واکسن نیوکاسل در جیره‌های حاوی آب پنیر در ۳۱ روزگی بالاتر بود (P<۰/۰۵). گذشت زمان پس از واکسیناسیون نشان دهنده افزایش مقدار تیتر از روز ۲۴ام پرورش تا زمان کشتار می‌باشد. تیتر واکسن نیوکاسل و آنفولانزا در جیره‌های حاوی آب پنیر نسبت به بدون آب پنیرها بالاتر بود. در حالی که میزان آنتی بادی گامبورو در جیره‌های پلت شده کمتر از جیره‌های آردی بود. در مورد تیتر برونشیت روند خاصی بین فرم فیزیکی جیره و میزان آب پنیر به دست نیامد.

تحقیقات زیادی روی مکانیسم تاثیر پری‌بیوتیک‌ها روی سیستم ایمنی انجام نشده است، اما گزارشات حاکی از این است که با مصرف پودر آب پنیر در جیره، pH دستگاه گوارش پایین می‌آید و در نتیجه فعالیت میکروارگانیسم‌هایی مانند اشریشیاکلی که در محدوده بالاتری از pH فعالیت دارند را محدود می‌کند.

افزودن پری‌بیوتیک‌ها باعث کمک به تغییرات میکروفلور دستگاه گوارش در جهت کلونیزه شدن باکتری‌های مفید می‌شود و در مهار پاتوژن‌هایی مانند اشریشیاکلی و کلستریدیوم‌ها موثر است (Dhama *et al.*, 2011).

جدول ۶- تاثیر سطوح پودر آب پنیر و فرم فیزیکی بر سطح تیتر ایمنی گامبورو و برونشیت درجوجه-های گوشتی.

Table 6- The effect of whey powder and physical form of diet on titration of IBD and bronchitis in chicks.

روز ۴۲ Day 42		روز ۳۱ Day 31		روز ۲۴ Day 24		تیمار Treatment
برونشیت	گامبورو	برونشیت	گامبورو	برونشیت	گامبورو	
584.50[a]	65.00[a]	887.75[a]	185.00[a]	721.00[a]	614.75[a]	جیره آردی فاقد آب پنیر (شاهد) Diet without whey (control)
1106.75[a]	56.50[a]	420.25[a]	103.75[a]	493/00[a]	293.75[a]	جیره پلت بدون آب پنیر Pelleted diet without whey
333.75[a]	104.75[a]	329.50[a]	89.25[a]	1358.25[a]	514.75[a]	جیره ۴٪ آب پنیر آردی mash diet with 4% whey
490.00[a]	35.50[a]	667.50[a]	55.00[a]	649.50[a]	662.25[a]	جیره ۴٪ آب پنیر پلت Pelleted diet with 4% whey
420.50[a]	53.50[a]	566.00[a]	170.00[a]	662.75[a]	463.25[a]	جیره ۸٪ آب پنیر آردی mash diet with 8%whey
265.50[a]	14.50[a]	276.00[a]	51.00[a]	739.25[a]	664.00[a]	جیره ۸٪ آب پنیر پلت Pelleted diet with 8% whey
267.71	38.38	296.85	42.76	296.85	272.20	خطای معیار Standard error (SE)
						سطح پودر آب پنیر
845.60[a]	60.75[a]	654.00[a]	144.38[a]	607.00[a]	454.30[a]	صفر درصد پودر آب پنیر 0% whey powder
411.90[a]	70.13[a]	498.50[a]	72.13[a]	1003.90[a]	588.50[a]	۴ درصد پودر آب پنیر 4% whey powder
343.00[a]	34.00[a]	421.00[a]	110.50[a]	701.00[a]	563.60[a]	۸ درصد پودر آب پنیر 4% whey powder
189.30	27.14	209.90	30.24	275.78	192.48	خطای معیار Standard error (SE)
						فرم فیزیکی Physical form
446.30[a]	74.42[a]	594.40[a]	148.08[a]	914.00[a]	530.90[a]	جیره آردی Mash diet
620.80[a]	35.50[a]	454.60[a]	69.92[b]	627.30[a]	540.00[a]	جیره پلت Pelleted diet
154.56	22.16	171.139	24.69	225.18	157.16	خطای معیار Standard error (SE)
				p-value		
0.464	0.735	0.382	0.619	0.606	0.583	اثر متقابل Interaction
0.155	0.628	0.731	0.265	0.578	0.872	پودر آب پنیر Whey powder
0.435	0.230	0.571	0.038	0.379	0.968	فرم فیزیکی Physical form

[a-c] اعداد با حروف غیر مشابه در هر ستون با هم اختلاف معنی‌داری دارند (p<۰/۰۵).

[a-c] values with different alphabet in columns differ significantly (p<0.05).

جدول ۷- تاثیر سطوح پودر آب پنیر و فرم فیزیکی بر سطح تیتر ایمنی نیوکاسل و آنفولانزا درجوجه-های گوشتی.

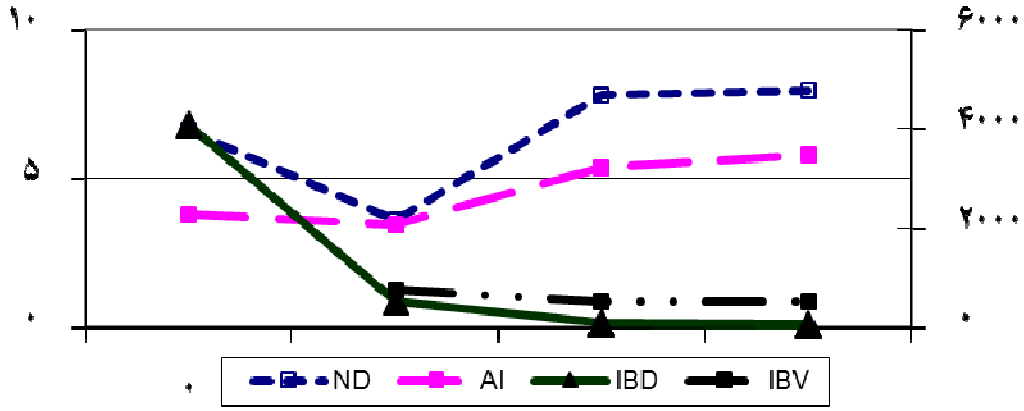
Table 6- The effect of whey powder and physical form of diet on titration of newcastle and influenza in chicks.

روز ۴۲ Day 42		روز ۳۱ Day 31		روز ۲۴ Day 24		تیمار Treatment
آنفولانزا	نیوکاسل	آنفولانزا	نیوکاسل	آنفولانزا	نیوکاسل	
5.50 [a]	7.25 [a]	4.50 [a]	7.50 [ab]	3.25 [a]	2.75[a]	جیره شاهد Control Diet
5.75 [a]	8.50 [a]	4.75 [a]	7.00 [b]	3.50 [a]	3.00 [a]	پلت بدون آب پنیر Pelleted diet without whey
6.25 [a]	8.50 [a]	6.00 [a]	8.00 [ab]	4.50 [a]	4.25 [a]	جیره ۴٪ آب پنیر آردی mash diet with 4% whey
5.25 [a]	8.00 [a]	5.25 [a]	8.00 [ab]	2.75 [a]	4.25 [a]	جیره ۴٪ آب پنیر پلت Pelleted diet with 4% whey
5.75 [a]	7.25 [a]	5.75 [a]	8.00 [ab]	3.00 [a]	4.00 [a]	جیره ۸٪ آب پنیر آردی mash diet with 8%whey
6.25 [a]	8.25 [a]	6.00 [a]	8.50 [a]	3.75 [a]	3.50 [a]	جیره ۸٪ آب پنیر پلت Pelleted diet with 8% whey
0.86	0.48	0.84	0.33	0.93	0.72	خطای معیار Standard error (SE)
						سطح پودر آب پنیر Whey powder level
5.62 [a]	7.87 [a]	4.62 [a]	7.25 [b]	3.37 [a]	2.87 [a]	صفر درصد پودر آب پنیر 0% whey powder
5.75 [a]	8.25 [a]	5.62 [a]	8.00 [ab]	3.62 [a]	4.25 [a]	۴ درصد پودر آب پنیر 4% whey powder
6.00 [a]	7.75 [a]	5.87 [a]	8.25 [a]	3.37 [a]	3.75 [a]	۸ درصد پودر آب پنیر 4% whey powder
0.61	0.34	0.60	0.23	0.66	0.51	خطای معیار Standard error (SE)
						فرم فیزیکی Physical form
5.83 [a]	7.67 [a]	5.42 [a]	7.83 [a]	3.58 [a]	3.67 [a]	جیره آردی Mash diet
5.75 [a]	8.25 [a]	5.33 [a]	7.83 [a]	3.33 [a]	3.58 [a]	جیره پلت Pelleted diet
0.49	0.27	0.49	0.19	0.54	0.42	خطای معیار Standard error (SE)
			p-value			
0.650	0.166	0.794	0.346	0.383	0.869	اثر متقابل Interaction
0.906	0.559	0.316	0.020	0.953	0.183	پودر آب پنیر Whey powder
0.906	0.150	0.905	1.00	0.746	0.889	فرم فیزیکی Physical form

[a-c]اعداد با حروف غیر مشابه در هر ستون با هم اختلاف معنی‌داری دارند (p<۰/۰۵).

[a-c] values with different alphabet in columns differ significantly (p<0.05).

پری‌بیوتیک‌هایی مانند مانان-اولیگوساکارید و فروکتواولیگوساکارید اثرات ایمن سازی روی بافت‌های لنفوئیدی مرتبط با دستگاه گوارش را دارند، بدون آنکه روی عملکرد تولید تاثیر منفی بگذارند. این بهبود عملکرد می‌تواند از طریق افزایش دادن پروفایل میکروبی و فعال کردن مواد اولیه و منبع انرژی برای لاکتوباسیل‌ها و ایجاد باندهای رقابتی در جهت جلوگیری از اتصال باکتری‌های گرم منفی به دیواره روده باشد (Roberts *et al.*, 2015). شکل ۱ بیان می‌کند که از زمان هچ شدن جوجه تا ۲۴ روزگی سطح ایمنی علیه بیماری‌های نیوکاسل، آنفولانزا، گامبورو و برونشیت کاهش پیدا کرده است که نتیجه افت تیتر ایمنی مادری نیوکاسل و گامبورو است. پس از اتمام آخرین واکسن در ۲۱ روزگی (نیوکاسل)، سطح ایمنی علیه نیوکاسل و آنفولانزا افزایش یافت. اگرچه تغییرات برای برونشیت اندکی کاهشی بود، اما روند ایمنی بدن علیه گامبورو سیر نزولی نشان داد. انجام واکسیناسیون از هفته ۳ و ۴ به بعد باعث افزایش تیتر واکسن شد که این روند تا هنگام کشتار ادامه یافت.



شکل ۱- تغییرات تیتر واکسن در طول دوره پرورش (ND نیوکاسل، AI آنفولانزا، IBD گامبورو، IBV برونشیت).

Figure 1- Vaccine titeation changes during breeding (ND newcastle, AI influenza, IBD infectious bursa disease, IBV bronchitis).

توجه به عیار پادتن مادری در هفته اول پرورش جوجه ها بسیار حائز اهمیت است، زیرا میزان بالای ایمنی مادری جوجه‌های جوان موجب عدم تکثیر کافی واکسن‌های زنده و در نتیجه موجب کاهش ایمنی حاصل می‌شود. برای مثال جوجه‌های حاصل از مرغ‌های مادر با تیتر

ایمنی بالا علیه بیماری گامبورو ممکن است برای مدت‌ها دارای ایمنی مادری علیه این بیماری بوده و در صورت انجام واکسیناسیون پاسخ مناسب ایمنی حاصل نگردد. عفونت با ویروس گامبورو تا سن سه هفتگی از طریق تخریب بافت لنفوئیدی بورس فابریسیوس باعث تضعیف سیستم ایمنی و در نتیجه کاهش یا عدم پاسخ به واکسن‌های متداول و نیز افزایش حساسیت در برابر دیگر بیماری‌های عفونی می‌شود. در حالی که در سنین بالاتر (معمولاً سه تا شش هفتگی)، ممکن است با نشانه‌های درمانگاهی و تلفات ۲۰-۱۵ درصد همراه باشد (Mayahi *et al.*, 2017). با توجه به تیتر بالای نیوکاسل و افزایش ناگهانی آن در ۳۱ روزگی می‌توان نتیجه گرفت که تیتر بالا به دلیل برخورد گله با ویروس‌های فیلدی در حدود ۳ هفتگی ایجاد شده که تحریک سیستم ایمنی را به دنبال داشته است، اگرچه باعث بروز علایم مشخص بیماری نشده است. لذا به دلیل درگیر شدن گله با ویروس نیوکاسل، تیترهای واکسن، نتیجه واقعی اعمال تیمارها نمی-توانند تلقی شوند؛ اما به نظر می‌رسد افزودن ۴٪ آب پنیر نسبت به جیره شاهد، سیستم ایمنی را تقویت کرده است؛ اگرچه به دلایل فوق الذکر، قابلیت اندازه گیری این مطلب وجود ندارد. در ۴۲ روزگی نیز بالاتر بودن تیتر جیره‌های با ۴٪ آب پنیر دیده شد. مشخص شده است که عوامل متفاوتی مانند حدت ویروس، مقاومت میزبان، عوامل محیطی و بیماری‌های همزمان می‌توانند بر بیماری‌زایی و تلفات ویروس تاثیر بگذارند. گزارش شده است که افزودن پروبیوتیک به جیره کم پروتئین سبب افزایش تیتر آنتی بادی علیه ویروس نیوکاسل شد در حالی که تاثیری بر مقدار آن در جیره با سطح پروتئین متعادل نداشت، به عبارتی باعث بهبود عملکرد تولیدی و توان ایمنی جوجه های گوشتی می‌شود (Dastar *et al.*, 2008). Khani *et al.* (2015) نیز تاثیری در تیتر آنتی بادی آنفولانزا و نیوکاسل جوجه‌های تغذیه شده با پودر آب پنیر اسیدی و پودر آب پنیر اسیدی کم لاکتوز مشاهده نکردند. Kheiri *et al.* (2015) با افزودن پودر آب پنیر و سماق به جیره جوجه‌های گوشتی شاهد افزایش تیتر واکسن علیه بیماری نیوکاسل و بهبود سیستم ایمنی و مقاومت به باکتری‌های بیماری‌زا از طریق افزایش جمعیت میکروفلور لاکتوباسیل‌ها و کاهش E.Coli بودند. آب پنیر دارای مشتقات پروتئین-های سرم از جمله لاکتوفرین است که منبع ارزشمند زیستی محسوب می‌شود (Molayiparvari, 2011). گزارش شده است که خواص سودمند لاکتوفرین ممکن است به عنوان یک جایگزین ضد میکروبی برای صنعت طیور مفید باشد، به خصوص زمانی که پرندگان با یک چالش مواجه می شوند؛ اما باعث ایجاد بهبود عملکرد پرندگان سالم در شرایط پرورش مطلوب، نشد (Geier *et al.*, 2011).

در مورد تیتر گامبورو انتظار بر این بود که با واکسیناسیون، پس از ۲۸ روزگی افزایش تیتر مشاهده شود، اما در تمامی تیمارها این روند کاهشی بود که می‌تواند به دلیل شکست

واکسیناسیون آشامیدنی و یا مصرف آنتی‌بادی و درگیری با ویروس باشد. البته این امکان نیز وجود دارد که آب پنیر به عنوان بازدارنده عمل نموده و با بیماری مقابله کرده است، اگرچه تایید این فرضیه بایستی از طریق جداسازی عامل بیماری از بورس فابرسیوس انجام شود. اگر فرضیه دوم اثبات گردد، نقش سرکوب کنندگی گامبورو و تاثیر آن روی سایر واکسن‌ها محرز شده در نتیجه گله کلا حساس باقی مانده است (Ezeibe *et al*., 2014). به دلیل موثر نبودن روند تیتر واکسیناسیون گامبورو و روند کاهشی ایمنی مادری، توجیه خاصی برای این پدیده وجود ندارد. افزایش تیتر آنفولانزا نشانه درگیر شدن با ویروس است که به طور موردی نیز تیترهای بالای ۷ و ۸ مشاهده شد، اما روند کاهشی تیتر برونشیت بیانگر این امر است که نه تنها درگیری از این بابت در گله وجود نداشته، بلکه یک نوبت واکسیناسیون نیز برای به دست آوردن عیار آنتی بادی محافظت کننده کافی نیست.

بیان ژن‌های اینترلوکین-۴ و اینترفرون گاما

منحنی استاندارد سریال رقت پرایمرها در نمودارهای جداگانه رسم شد و مقادیر شیب معادله، راندمان و ضریب تعیین‌های محاسبه شده حاکی از دقت و صحت انجام کار داشت (جدول ۸).

جدول ۸- مقادیر شیب معادله، راندمان و ضریب تعیین پرایمرها.

Table 7- Equation slope, efficiency and reliability of primers.

اینترفرون گاما **Interferon Gamma**	اینترلوکین-۴ **Interleukin 4**	**GAPDH**	
$conc = 10^{(-0.293 \times C_q + 10.332)}$	$conc = 10^{(-0.338 \times C_q + 11.715)}$	$conc = 10^{(-0.311 \times C_q + 10.642)}$	Standard Curve (1)
$C_q = -3.409 \times \log(conc) + 35.219$	$C_q = 2.957 \times \log(conc) + 34.640$	$C_q = -3.219 \times \log(conc) + 34.252$	Standard Curve (2)
$0.96505 \left(* = 10^{\left(\frac{-1}{m}\right)} - 1\right)$	$1.17861 \left(* = 10^{\left(\frac{-1}{m}\right)} - 1\right)$	$.04496 \left(* = 10^{\left(\frac{-1}{m}\right)} - 1\right)$	Reaction efficiency (*)
-3.40861	-2.957	-3.21869	M
35.21874	34.64017	34.25183	B
0.99868	0.99595	0.99559	R Value
0.99736	0.99192	0.99120	R^2 Value

بیان ژن‌های اینترلوکین-۴ و اینترفرون گاما در هر مرحله پرورش

آنالیز واریانس بیان ژن‌های اینترلوکین-۴ و اینترفرون به تفکیک هر مرحله پرورش در جدول ۹ آورده شده است. همانطور که نتایج نشان می-دهد، اینترلوکین-۴ در مرحله رشد (۱۰-۲۴ روزگی) تحت تاثیر درصد پودر آب پنیر و فرم فیزیکی جیره قرار گرفت؛ به طوری که افزودن آب پنیر به جیره و همچنین پلت کردن آن باعث بیان بیشتر ژن اینترلوکین-۴ شد. افزودن آب پنیر تاثیری در بیان ژن اینترفرون در هیچ مرحله‌ای نداشت، اما نوع فرم فیزیکی در پیش دان (۰-۱۰ روزگی) ($P<0.05$) و میان دان (۱۰-۲۴ روزگی) ($P<0.01$) روی بیان ژن تاثیر گذاشت. همچنین اثرات متقابل نیز در این مراحل معنی‌دار شد ($P<0.01$). در تحقیق حاضر، افزودن آب پنیر باعث افزایش بیان ژن اینترلوکین-۴ در میان دان (۱۰-۲۴ روز) شد. اگرچه در دو مرحله دیگر پرورش، تاثیر افزودن آب پنیر از نظر آماری معنی‌دار نبود، اما افزایش میزان بیان ژن اینترلوکین-۴ حاکی از پاسخ Th2های وابسته به سلول می‌باشد. اگرچه، بیان اینترفرون گاما در حضور آب پنیر تغییر نیافت اما پلت‌کردن خوراک در پیش‌دان و میان‌دان نتایج متفاوتی را به همراه داشت. همچنین، در جیره‌های آردی، افزودن آب پنیر تا ۴ درصد باعث کاهش بیان ژن اینترفرون در پیش‌دان و میان‌دان شد اما در ۸٪ میزان بیان ژن افزایش یافت؛ در حالیکه در جیره‌های پلت شده افزودن آب پنیر در مجموع باعث افزایش بیان این ژن در این دو مرحله از رشد شد. با توجه به این که آب پنیر قبل از پلت‌کردن به جیره افزوده شده بود، این احتمال وجود دارد که حرارت دادن در زمان تهیه خوراک پلت، سبب بهبود کیفیت آب پنیر و تاثیر روی فلور روده شده باشد. در پژوهشی Janardhana *et al.* (2009) گزارش کردند که افزودن پری بیوتیک به جیره باعث کاهش معنی‌دار نسبت سلول‌هایB در لنفوسیت بافت سکوم، افزایش تعداد کلی سلول-های سفید خون و وزن نسبی اندام‌های سیستم ایمنی، وزن‌های نسبی لاشه و اجزای خوراکی و بهبود مقادیر تیتر آنتی‌ژن ایمنوگلوبولین M و G در سرم خون می‌شود. افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون در جیره‌های حاوی آب پنیر در تحقیق دیگری نیز گزارش شده است (Rastad *et al.*, 2008). تغییرات سطح mRNA بیان شده در روزهای مختلف آزمایش در جوجه‌هایی که با جیره‌های مختلف پروبیوتیک و اسیدآلی تغذیه شده بودند گزارش شده است و احتمال بر این است که افزودن پروبیوتیک و اسیدهای آلی (اسید سوربیک و سیتریک) باعث فعال شدن گیرنده‌های ملکولی سیستم ایمنی ذاتی می‌شود که در نتیجه پپتیدها و پروتئین‌های ضد میکروبی تولید می‌شود (Rodriguez-Lecompte *et al.*, 2011). این احتمال نیز وجود دارد که با توجه به رشد جوجه و توسعه و تکامل بافت روده و تغییرات میکروفلور که در اثر تیمارهای اعمال شده رخ می‌دهد، پاسخ‌های متفاوتی از بیان ژن مشاهده شود.

جدول ۹- آنالیز واریانس و میانگین بیان ژن اینترلوکین-۴ و اینترفرون گاما در سه مرحله پرورش.

Table 8- Variance analysis and expression mean of Interleukin-4 (IL-4) and Interferon-gamma (In-γ) genes in 3 periods of breeding.

Day 42 روز ۴۲		Day 24 روز ۲۴		Day 10 روز ۱۰		Treatment تیمار
اینترفرون گاما In-γ	اینترلوکین ۴ IL-4	اینترفرون گاما In-γ	اینترلوکین ۴ IL-4	اینترفرون گاما In-γ	اینترلوکین ۴ IL-4	
0.162 a	21.498 a	0.066 ab	0.067 c	0.185 a	1.057 a	جیره شاهد Control diet
0.090 a	9.116 a	0.135 a	1.039ab	0.041 b	0.393 a	پلت بدون آب پنیر Pelleted without whey
0.115 a	0.943 a	0.048 b	0.085 c	0.092 ab	0.833 a	جیره ۴٪ آب پنیر آردی mash diet with 4% whey
0.027 a	8.744 a	0.113 ab	1.647 a	0.054 b	1.322 a	جیره ۴٪ آب پنیر پلت Pelleted with 4% whey
0.059 a	26.912 a	0.096 ab	0.703 bc	0.054 b	0.862 a	جیره ۸٪ آب پنیر آردی mash diet with 8%whey
0.022 a	2.416 a	0.128 a	1.540 a	0.079 ab	1.565 a	جیره ۸٪ آب پنیر پلت Pelleted with 8% whey
0.059	8.231	0.016	0.186	0.021	0.461	خطای معیار Standard error (SE)
						سطح پودر آب پنیر
0.126 a	15.307 a	0.100 a	0.553b	0.113 a	0.725a	صفر درصد پودر آب پنیر 0% whey powder
0.071 a	4.843 a	0.081 a	0.866 ab	0.073 a	1.078a	۴ درصد پودر آب پنیر 4% whey powder
0.041 a	14.664 a	0.112 a	1.121 a	0.067 a	1.214 a	۸ درصد پودر آب پنیر 4% whey powder
0.039	6.286	0.011	0.131	0.016	0.328	خطای معیار Standard error (SE)
						فرم فیزیکی Physical form
0.112 a	16.451 a	0.065 b	0.285 b	0.109 a	0.917 a	جیره آردی Mash diet
0.051 a	6.957 a	0.124 a	1.408 a	0.058 b	1.093 a	جیره پلت Pelleted diet
0.033	5.253	0.009	0.107	0.012	0.268	خطای معیار Standard error (SE)
			p-value			
0.900	0.191	0.001**	0.145	0.007**	0.354	اثر متقابل Interaction
0.296	0.403	0.211	0.023	0.130	0.601	پودر آب پنیر Whey powder
0.165	0.190	0.001**	<0.0001	0.012*	0.650	فرم فیزیکی Physical form

a-c اعداد با حروف غیر مشابه در هر ستون با هم اختلاف معنی‌داری دارند (p<۰/۰۵).

a-c values with different alphabet in columns differ significantly (p<0.05).

در همین رابطه، افزودن پروبیوتیک پریمالاک در تنظیم بیان ژن‌های ایمنی در ایلئوم و سکوم تونسیل موثر بوده است (Pender *et al*., 2016).

در بخش دیگری از این طرح که نتایج آن قبلا به چاپ رسیده است، تاثیر جیره‌های اعمال شده روی تغییرات مورفولوژیکی ژژنوم بررسی و مشخص گردید که در جیره‌های آردی حاوی آب پنیر (۴ یا ۸ درصد) طول و عرض پرزهای ژژنوم در میان‌دان بیشترین مقدار بود (Vakili *et al*., 2015). این احتمال وجود دارد که با تغییرات ایجاد شده روی مورفولوژی، میزان هضم و جذب غذا، بیان ژن و تیتراسیون واکسن تحت تاثیر قرار گرفته باشد. با بررسی پاسخ‌های ایمنی، آب پنیر پروفیل سیتوکین‌ها را تعدیل و تغییر داده که منجر به بهبود پاسخ‌های ایمنی ذاتی و وابسته به Thها شده است. لذا، آب پنیر با افزایش تنظیم پاسخ-های التهابی، همانند یک عامل حفاظتی برای ایمنیت عمل می‌کند و منجر به حفاظت بیشتر علیه پاتوژن‌های داخل سلولی می‌شود.

نتیجه گیری

افزودن آب پنیر باعث افزایش بیان ژن اینترلوکین-۴ فقط در روزهای ۱۰ تا ۲۴ روزگی شد که حاکی از پاسخ Th2ها و تولید آنتی بادی می‌باشد، اما بیان ژن اینترفرون گاما تحت تاثیر افزودن آب پنیر به جیره قرار نگرفت. با توجه به امکان برخورد گله‌ها با سویه‌های مزرعه‌ای و استرس‌های مختلف مانند ورود و خروج افراد، پیشنهاد می‌شود که طرح‌های مربوط به پاسخ‌های ایمنی در سطحی از بیوسکیوریتی و در ایزولاتور انجام شود تا تیترهایی که مشاهده می‌شوند، به علت درگیری گله با عوامل بیماریزایی بجز واکسن نباشند و آلودگی‌های دخالت کننده در مطالعه و نتایج آن، به حداقل ممکن برسد. همچنین در ادامه این طرح، به منظور بررسی تاثیر کاهش‌دهندگی آب پنیر روی تیتر گامبورو، PCR نمونه بورس فابرسیوس گذاشته شود تا مشخص گردد آیا وجود پاتوژن و نقش بازدارندگی آب پنیر تایید می‌گردد یا خیر.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح شماره ۹۲۱۰۳-۲-۰۱-۰۱ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی است و کلیه هزینه‌های آن توسط موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی و مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی خراسان رضوی تامین گردیده است. مراحل پرورش و عملیات میدانی این طرح در مزرعه پرورش طیور مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی و کلیه مراحل آزمایشگاهی آن در آزمایشگاه مرجع اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی انجام گرفت. بدین وسیله نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را از زحمات بی‌دریغ مسوولین و همکاران ذیربط در اجرای این طرح بنمایند.

منابع

Aghaei A, Tabatebaei S, Chaji M, Nazari M. (2010). Effects of dried whey (prebiotics) and probiotics in laying Hen's performance and intestinal flora. Journal of Animal and Veterinary Advances 9: 1996-2000.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry 55: 611-22.

Cox CM, Sumners LH, Kim S, McElroy AP, Bedford MR, Dalloul RA (2010). Immune responses to dietary β-glucan in broiler chicks during an Eimeria challenge. Poultry Science 89: 2597–2607.

Dahlke F, AML. Ribeiro, AM. Kessler, AR. Lima, A. Mairoka. (2002). Effects of corn particle size and physical form of the diet on the gastrointestinal structuers of broile chickens. Brazilian Journal of Poultry Science 5: 61-67.

Dastar B, Khaksefidi A, Mostafalou Y (2008). The Effect of tipax probiotics and protein levels of diet on performance of broilers. Journal of Water and Soil Science 43: 449.

Dhama K, Verma V, Sawant PM, Tiwari R, Vaid RK, Chauhan RS (2011). Applications of probiotics in poultry: Enhancing immunity and beneficial effects on production performances and health, A review. Journal of Immunology and Immunopathology 13: 1-19.

Downing T, Lloyd AT, O'Farrelly C, Bradley DG (2010). The Differential Evolutionary Dynamics of Avian Cytokine and TLR Gene Classes. Journal of Immunology 184: 6993-7000.

Ebrahimi H, Hooshmand M, Khajavi M, Naghiha A (2016). Single or Combined Effects of Prebiotic and Probiotic on Performance, Immunity Response and Gut Flora of Broiler Chickens. Research on Animal Production 7: 60-69.

Ezeibe MCO, Okoye JOA, Ogunniran TM, Animoke PC, Mbuko IJ, Nwankwo IA, Ngene AA (2014). Effects of Live Infectious Bursal Disease Vaccines, on Immune response of Vaccinated Chicks. British Journal of Medicine & Medical Research 4: 1506-1513.

Fietta P, Delsante G (2009). The effector T helper cell triade. Rivista Di Biologia 102: 61–74.

Geier MS, Torok VA, Guo P, Allison GE, Boulianne M, Janardhana V, Bean AGD, Hughes RJ (2011). The effects of lactoferrin on the intestinal environment of broiler chickens. British Poultry Science 52: 564-572.

Ghanipoor-Samami M, Javadmanesh A, Burns BM, Thomsen DS, Natrass GS, Estrella CAS, Kind KL, Hiendleder S (2018). Atlas of tissue- and developmental stage specific gene expression for the bovine insulin-like growth factor (IGF) system. PLoS ONE 13: e0200466.

Gulsen N, Coskun B, Umucalilar HD, Inal F, Boydak M (2002). Effect of lactose and dried whey supplementation on growth performance and histology of the immune system in broilers. Archive Animal Nutrition 56: 131-139.

Huang DS, Li DF, Xing JJ, Ma YX, Li ZJ, Lv SQ (2006). Effects of Feed Particle Size and Feed Form on Survival of Salmonella typhimurium in the Alimentary Tract and Cecal S. typhimurium Reduction in Growing Broilers. Poultry Science 85: 831–836

Janardhana V, Broadway MM, Bruce MP, Lowenthal JW, Geier MS, Hughes RJ, Bean AGD (2009). Prebiotics modulate immune responses in the gut-associated lymphoid tissues of chickens. The Journal of Nutrition 139: 1404- 1409.

Kenny M, Flemming E (2006). Optimising broiler performance- the role of physical feed quality. Australian Poultry Science Symposium 25-29.

Kermanshahi H, Rostami H (2006). Influence of supplemental dried whey on broiler performance and cecal flora. International Journal of Poultry Science 5: 538-543.

Khani M, Toghyani M, Foroughi M (2015). Effect of different levels of acid whey powder on growth performance and immune responses of broiler chicks. International journal of poultry Science 14: 61-57.

Khodaei1 H, Maghsoudlou S, Garehbash AM, Taraz Z (2015). Effect of Physical form of Feed and Dietary Supplementation of Probiotic and Prebiotic on Performance and Carcass characteristics of Broiler Chickens. Research on Animal Production 6: 20-29.

Kheiri F, Rahimian Y, Nasr J (2015). Application of sumac and dried whey in female broiler feed. Archives Animal Breeding 58: 205–210.

Kitessa SM, Nattrass GS, Forder REA, McGrice HA, Wu S, Hughes RJ (2014). Mucin Gene mRNA Levels in Broilers Challenged with Eimeria and/or Clostridium perfringens. Avian Diseases 58: 408-414.

Lowenthal JW, Connick TE, McWaters PG, York JJ (1994). Development of T cell immune responsiveness in the chicken. Immunology & Cell Biology 72: 115–122.

Mayahi M, Boroomand Z, Jafari RA, Zahabi H (2017). Study on experimental infection of Newcastle Disease virus in local breeder chicks infected with infectious bursal disease virus. Veterinary Researches & Biological Products 117: 11-23.

Maiorka A, Dahlke F, Penz AM, Kesslerr AM (2005). Diets Formulated on Total or Digestible Amino Acid Basis with Different Energy Levels and Physical form on Broiler Performance. Brazilian Journal Poultry Science 7: 47-50.

Mehri M, Zare Shahne A, Samie A (2004). The Effects of Supplementation of Whey Powder on Broiler Performance. Iranian Journal of Agricultural Science 35: 1007-1013.

Moazeni S, Mohammadabadi MR, Sadeghi M, Shahrbabak H, Koshkoieh A, Bordbar F (2016a). Association between UCP Gene Polymorphisms and Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in Mazandaran Indigenous Chicken. Open Journal of Animal Sciences 6: 1-8.

Moazeni SM, Mohammadabadi MR, Sadeghi M, Moradi Shahrbabak H, Esmailizadeh AK (2016b). Association of the melanocortin-3(MC3R) receptor gene with growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. Journal of Livestock Science and Technologies 4: 51-56.

Mohammadifar A, Faghih Imani SA, Mohammadabadi MR, Soflaei M (2014). The effect of TGFb3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. Journal of Agricultural Biotechnology 5: 125-136.

Molayiparvar M (2012). Characteristics of whey. Proc. of 2nd national food security seminar. Oct. 17-18, 2012. Savadkouh. https://www.civilica.com/Paper-FSS02-FSS02_096.html

Negishi H, Taniguchi T, Yanai H. (2017). The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. Cold Spring Harb Perspect Biol doi: 10.1101/cshperspect.a028423.

Omara II (2012). Nutritive value of skimmed milk and whey, added as natural probiotics in broiler diets. Egyptian Journal of Animal Production 49: 207-217.

Panda AK, Rao SVR, Raju MVLN, Sharma SR (2006). Dietary supplementation of Lactobacillus sporogenes on perfor-mance and serum Biochemico – lipid profile of broiler chicken. The journal of Poultry Science 43: 235–242.

Patterson JA, Burkholder KM (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. Poultry science 82: 627-631.

Pender CM, Kim S, Potter TD, Ritzi MM, Young M, Dalloul RA (2017). In ovo supplementation of probiotics and its effects on performance and immune-related gene expression in broiler chicks. Poultry Science 96: 1052–1062. http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew381

Pesti GM, Miller BR, Hargrave J (1992). User-Friendly Feed Formulation, Done Again (UFFDA). University of Georgia

Peters MA, Browning GF, Washington EA, Crabb BS, Kaiser P (2003). Embryonic age influences the capacity for cytokine induction in chicken thymocytes. Immunology 110: 358–367.

Rastad AH, Samie AH, Daneshvar F (2008). The effect of bactocel and whey powder on performance and carcass characteristics of broilers. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, Journal of Water and Soil Science 43: 473

Rodriguez-Lecompte JC, Brady J, CameloJaimes G, Sharifi S, Crow G, Ramirez-Yanez GO, Guenter W, House JD (2011) Effect of microbial-nutrition interaction on chicken immune system after the early administration of probiotic with organic acids in young chicks. Poultry Science 89: E-Suppl. 1. 546

Shahdadnejad N, Mohammadabadi MR, Shamsadini M. (2016) Typing of Clostridium Perfringens Isolated from Broiler Chickens Using Multiplex PCR. Genetics in the 3rd millennium 14: 4368-4374.

Taherpour K, Moravej H, Shivazad M, Adibmoradi M, Yakhchali B (2009). Effects of dietary probiotic, prebiotic and butyric acid glycerides on performance and serum composition in broiler chickens. African Journal of Biotechnology 8: 2329-2334.

Tizard IR (2009). Veterinary Immunology: An Introduction. 8th Edition. CBS Publishers & Distributors. P. 574.

Varasteh, AR, Vahedi F (2011). ABC of immunology. Varastehgan Pblisher. Iran. 2nd volume, 192 p.p. (in Persian)

Vakili, R, Zakizadeh S, Sepehri Moghaddam H, Zanganeh A (2015). The effect of diet physical form and whey powder on performance and morphological changes in jejunum of broilers. Iranian Veterinary Journal. 11: 105-114.

Xiang R, Lee AM, Eindorf T, Javadmanesh A, Ghanipoor-Samami M, Gugger M, Fitzsimmons CJ, Kruk ZA, Pitchford WS, Leviton AJ, Thomsen DA, Beckman I, Anderson GI, Burns BM, Rutley DL, Xian CJ, Hiendleder S (2014). Widespread differential maternal and paternal genome effects on fetal bone phenotype at mid-gestation. Journal of Bone and Mineral Research 29: 2392-404.

Zandi, E, Mohammadabadi MR, Ezzatkhah M, Esmailizadeh AK (2014). Typing of Toxigenic Isolates of Clostridium Perfringens by Multiplex PCR in Ostrich. Iranian Journal of Applied Animal Science 4: 509-514.

Effect of whey powder and physical form of feed on humoral immune response and expression of interleukin-4 and interferon-gamma transcripts in jejunum of broiler chickens

Zakizadeh S.[1*], Torabi M.[2], Javadmanesh A.[3], Zanganeh A.[4], Nazemshirazi M.H.[5]

[1]Associate Professor of Animal Genetics and Breeding, Animal Science Research Institute of Iran, Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO). Karaj. IRAN.
[2] Ph.D. Biotechnologist, Molecular Biology Laboratory of Veterinary Organization of Khorasan Razavi. Mashhad, Iran.
[3] Assistant Professor, Departent of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[4] Animal Science and Veterinary Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran.
[5] DVM and International Laboratory Specialist of World Bank project, Kabul, Afghanistan; DVM and Former International Laboratory Specialist of FAO project, Kabul, Afghanistan

Abstract

This study was conducted to assess the effect of whey powder and physical form of feed on humoral immunity and transcript abundances of interleukin-4(IL-4) and interferon-gamma (In-γ) genes on 240 Ross-308 day-old-chickens. The experiment was conducted in a completely randomized design in 6 treatments in factorial arrangement (2×3), whey powder at three levels (0, 4,8%) and physical form in two levels (mash, pellet) in broiler chicken diet with 4 repeats and 10 chickens per replicate. The diets formulated based on nutritional requirements of Ross strain-308 (2009) and were fed to the birds in three periods. To determine the immunity titer of ND, IBV, IBD and influenza blood samples were collected at day 10, 31 and 42. At the end of periods, one chicken was selected from experimental units and slaughtered; lymphatic organs were weighted and gene expression of IL-4 and In-γ measured after mRNA extraction and cDNA synthesis. It was found that the addition of whey powder did not have a significant effect on the weights of the spleen and bursa of Fabricius, but the pelleting in the growing stage had a significant effect on the weight of spleen ($p<0.01$). Pelleting and adding whey to diet in the growing period increased the IL-4 gene expression ($p<0.05$). In-γ expression was not influenced by whey powder, but pelleting increased its expression during the starter ($p<0.01$) and grower ($p<0.01$) stages.

Key words: *lymphoid organs, humoral immunity, gene expression, vaccine titration.*

* Corresponding Author: Zakizadeh S. Tel:09153107569 Email: Sonia_zaki@yahoo.com

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500