"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2021.1910890.1282**

The effect of different levels of Valine in low protein diets on cellular and humoral immunity of broiler chickens

Parsaeimehr, Kh.[1], Daneshyar, M.[2*] Farhoomand, P.[3], Janmohammadi, H.[4], Oliyaee, M.[5]

1- Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran.
2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran.
3- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran.
4- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
5- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

[*]Corresponding author's email: daneshyar_mohsen@yahoo.com

(Received: 2020/ 11/1 Accepted: 2021/4/15)

Abstract

Different levels of valine in low protein diets have a significant effect on the immune system of broiler chickens. This experiment was performed to evaluate the effect of different levels of valine in low protein diets on the immune response of broiler chickens. This study was conducted using 200 one-day old male broilers of Ross 308 strain in a completely randomized design with 5 replicates and 10 birds per replicate. Experimental treatments were adjusted based on the Brazilian tables and included: control diet with recommended levels of valine, 10% higher than the recommended level of valine and 20% higher than the recommended level of valine diluted in a diet containing 2% protein. The results showed that different levels of valine had no significant effect on the weight of liver, spleen, fabricius bursa and leukocytes (p>0.05). Diets containing 20% valine significantly increased the HI antibody and humoral immunity responses (p<0.05). The initial total antibody response was not affected by the experimental treatments (p>0.05). But the level of 20% valine significantly increased the total secondary response and IgM secondary response to SRBC (p<0.05). Moreover the addition of valine had a significant effect on the injection reaction of PHA-P (p<0.05), and level of 20% valine, significantly increased the cellular immunity of broilers in comparison to the control treatment and lower valine levels. In the present study, the addition of high levels of valine in low-protein diets improved the cellular and humoral immunity of broiler chickens.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Broiler chickens, Diets, Immune system, Low protein, Valine.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2021.1910890.1282

تأثیر مقادیر مختلف اسیدآمینه والین در جیره‌های کم‌پروتئین، بر ایمنی سلولی و هومورال جوجه‌های گوشتی

خسرو پارسائی‌مهر[۱]، محسن دانشیار[۲*]، پرویز فرهومند[۳]، حسین جانمحمدی[٤]، مجید علیایی[٥]

۱- دانشجوی دکترای تغذیه دام و طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۳- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

٤- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۵- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: daneshyar_mohsen@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۹/۸/۱۱ پذیرش نهایی: ۱٤۰۰/۱/۲٦)

چکیده

سطوح مختلف والین در جیره‌های غذایی کم پروتئین، بر سیستم ایمنی طیور موثر می‌باشد. مطالعه حاضر، به منظور ارزیابی تأثیر مقادیر مختلف اسیدآمینه مذکور در جیره‌های غذایی کم‌پروتئین بر پاسخ سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی انجام شد. بدین منظور از ۲۰۰ قطعه جوجه گوشتی نر سویه راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی، به صورت ۵ تکرار و ۱۰ پرنده در هر تکرار، استفاده گردید. تیمارهای آزمایشی بر اساس جداول برزیلی تنظیم شدند که شامل: جیره شاهد، مقدار توصیه شده والین، ۱۰ درصد بیشتر از میزان توصیه شده والین و ۲۰ درصد بیشتر از مقدار توصیه شده والین که در جیره حاوی ۲ درصد پروتئین، رقیق شده‌بودند. نتایج نشان داد که مقادیر مختلف والین تأثیر معنی‌داری بر وزن کبد، طحال و بورس فابریسیوس نداشت ($p>0/05$). همچنین افزودن اسیدآمینه والین تأثیر معنی‌داری بر لکوسیت‌ها نشان نداد ($p>0/05$). اما مصرف جیره حاوی ۲۰ درصد والین به طور معنی‌داری باعث افزایش عیار پادتن در آزمایش HI (haemagglutination inhibition test) و ایمنی هومورال گردید ($p<0/05$). همچنین پاسخ اولیه پادتن‌کل تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ($p>0/05$)، اما سطح ۲۰ درصد والین، باعث افزایش پاسخ ثانویه‌کل و مقدار IgM علیه گلبول قرمز گوسفندی شد ($p<0/05$). ازطرف دیگر، افزودن اسیدآمینه والین تأثیر معنی‌داری بر واکنش تزریق فیتوهماگلوتینین داشت و سطح ۲۰ درصد آن نسبت به مقدار آن در تیمار شاهد و سطوح پایین‌تر استفاده‌شده، به طور معنی‌داری باعث افزایش ایمنی سلولی جوجه‌های گوشتی شد($p<0/05$). در مطالعه حاضر افزودن سطوح بالای اسیدآمینه والین در جیره‌های کم پروتئین، باعث بهبود سیستم ایمنی سلولی و هومورال جوجه‌های گوشتی گردید.

کلیدواژه‌ها: جوجه‌های گوشتی، جیره، سیستم ایمنی، کم پروتئین، والین.

مقدمه

امروزه یکی از مشکلات در پرورش تجاری طیور هزینه‌های خوراک می‌باشد که در این میان پروتئین جیره، بخش قابل توجهی از این هزینه‌ها را به خود اختصاص می‌دهد. اما علی‌رغم بالا رفتن هزینه‌ها، عملکرد و بازده لاشه به طور مستقیم تحت تأثیر پروتئین جیره می‌باشد (Dairo *et al.*, 2010). با توجه به نکات ذکر شده هدف متخصصین در پرورش طیور، دست‌یابی به عملکرد ایده‌آل پرنده با در نظر گرفتن تغذیه کافی و کاهش دفع مواد مغذی است. از طرفی هم مقدار مواد مغذی جیره می‌تواند تأثیر به‌سزایی بر مصرف خوراک داشته باشد. اما این امر بیشتر تحت تأثیر انرژی جیره و همچنین توازن اسیدهای آمینه موجود در خوراک است، به‌طوری‌که کمبود اسیدهای آمینه به طور مستقیم و بالا بودن مقدار آن از طریق مصرف انرژی بیشتر برای آمین‌زدایی اسیدهای‌آمینه، رشد پرنده را با مشکل مواجه خواهد کرد. بنابراین استفاده از اسیدهای‌آمینه سنتتیک برای ساخت پروتئین مطلوب می‌باشد. به‌علاوه با تأمین احتیاجات اسیدآمینه-ای جوجه‌های گوشتی، از مصرف بیش از حد آنها جلوگیری می‌شود (Kidd *et al.*, 2002). بررسی‌ها نشان می‌دهند که می‌توان کاهش رشد و عملکرد ناشی از کاهش پروتئین جیره را با مکمل کردن اسیدآمینه‌های سنتتیک جبران کرد (Hussein *et al.*, 2001). از طرفی تنظیم جیره بر اساس اسیدآمینه‌های کل و قابل هضم می‌تواند باعث بهبود عملکرد گردد (Rostagno *et al.*, 1995). به طور کلی در جیره‌های بر پایه ذرت و سویا، مقدار اسیدآمینه‌های محدود کننده (ایزولوسین، والین، آرژینین و تریپتوفان)، به میزان کافی هستند، اما با کاهش پروتئین جیره ممکن است میزان این اسیدآمینه‌های جیره نیز کاهش یابد (Thornton *et al.*, 2006).

برخی از خصوصیات والین در ارتباط با اعمال غیرپروتئینی و متابولیسم، آن را از سایر اسیدهای‌آمینه متمایز می‌کند. بیشتر اسیدهای‌آمینه در طیور، در کبد و کلیه تجزیه می‌شوند ولی والین (که جزو اسید آمینه‌های شاخه‌دار است) در ماهیچه تجزیه می‌گردد. اسیدآمینه‌های شاخه‌دار از متابولیت‌های پیش‌ساز در بدن ساخته می‌شوند که تولید آن‌ها بسیار محدود بوده و تنها مقدار ۲ تا ۵ درصد از نیاز پرنده را تأمین می‌کند. راندمان انتقال انرژی برای تبدیل ال-والین به ATP، ۵۳ درصد است و این اسیدآمینه به عنوان چهارمین اسیدآمینه محدودکننده رشد جوجه‌های گوشتی در جیره‌های فاقد پروتئین حیوانی مطرح می‌باشد. اسیدآمینه‌های شاخه‌دار توسط آمینوترانسفراز زنجیره‌ای، گروه آمینی خود را از دست می‌دهند و تبدیل به آلفاکتووالرات می‌شوند. آلفا کتواسیدهای تولید شده توسط آلفاکتواسیددهیدروژناز دکربوکسیله می‌شوند و طی یک سری واکنش‌های آنزیمی به سوکسینیلCoA تبدیل شده و وارد سیکل کربس می‌گردند (Zhang *et al.*, 2017). از طرفی اسیدآمینه‌های شاخه‌دار لوسین و والین، گروه آلفاآمین را برای سنتز و ترشح گلوتامین در ماهیچه‌های اسکلتی فرآهم می‌کنند که نقش مهمی در سیستم ایمنی دارد (Newsholme and Calder, 1997).

چون نیازهای گزارش شده در جداول برزیلی برای والین و تریپتوفان متفاوت بوده و بیشتر این اختلافات مربوط به مقادیر مختلف سایر اسیدهای‌آمینه می‌باشند

و با توجه بـه تـأثیر اسـیدآمینه والـین از طریـق بخـش مرکزی گرلین و نوروپپتیدY، مصرف خوراک و به تبع آن تأثیر این اسیدآمینه بر سیستم ایمنی پرنده (Coto *et al.*, 2009)، لذا انجام تحقیق حاضر، ضـروری بـه نظـر رسید.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در مـرداد مـاه سـال ۱۳۹۸ در سـالن تحقیقـات و متابولیسـم طیـور ایسـتگاه آموزشـی و تحقیقاتی خلعت پوشان دانشـکده کشـاورزی دانشـگاه تبریز در یک دوره ۲۱ روزه انجام گرفـت کـه بـر پایـه طرح کاملاً تصـادفی بـا اسـتفاده از ۲۰۰ قطعـه جوجـه گوشتی یک روزه سویه راس ۳۰۸ که از جوجـه کشـی الماس جوجه، واقع در رشت تهیه شده بودنـد، از سـن ۸ تا ۲۱ روزگی با ٤ تیمار و ۵ تکـرار بـا ۱۰ پرنـده در هر تکرار انجام گردیـد. جوجـه‌هـا در ۷ روز اول دوره پرورش با جیره آغازین بر پایه ذرت، کنجالـه سـویا و گندم تغذیه شدند و سپس وزن کشی شـده و بـه طـور تصادفی به داخل پن‌ها انتقـال یافتنـد. خـوراک مرحلـه آغـازین (۱ تـا ۷ روزگـی) مطـابق کتابچـه راهنمـای مـدیریتی راس۳۰۸ (308 Specifications, Broiler Ross Nutrition, 2014) تنظـیم شـده و در اختیـار جوجه‌ها قرار داده‌شد. در ادامه جیره‌هـای آزمایشـی بـا کاهش ۲ درصد پروتئین بر پایـه ذرت، کنجالـه‌سـویا و گندم بر اساس داده‌های ارائـه شـده در کتـاب جـداول برزیلی برای طیور و خـوک (Rostagno *et al.*, 2011) برای مرحله ۸ تا ۲۱ روزگـی تنظـیم شـد (جـدول ۱). تیمارهای آزمایشی هم شامل جیره شاهد، مقدار توصیه شده والـین، ۱۰ درصـد بیشـتر از مقـدار توصـیه شـده والین، ۲۰ درصد بیشتر از مقدار توصیه شده والـین، در جیـره حـاوی ۲ درصـد پـروتئین رقیـق شـده، بودنـد.

جدول ۱- میزان مواد خوراکی تشکیل دهنده و ترکیبات شیمیایی جیره غذائی جوجه‌های مورد آزمایش

نام ماده خوراکی	مقدار در جیره دوره پرورشی ۲۱-۸ روزگی (گرم بر کیلوگرم)
ذرت	۳۹/۹۶
گندم	۳۱/۱۵
کنجاله سویا	۲۱/۰۱
روغن سویا	۱/۵
نمک	۰/۲٤
پیش‌مخلوط ویتامین و مواد معدنی	۰/۵
منوکلسیم فسفات	۰/۹۲
پودر آهک	۱/۵۵
جوش شیرین	۰/٤۱
آنزیم فیتاز	۰/۰۱
لیزین	۰/۷۵
متیونین	۰/٤۲
تره‌ئونین	۰/۳۳
آرژینین	۰/۳۸
والین	۰/۳
لوسین	۰/۰۷
هیستیدین	۰/۰۷
تریپتوفان	۰/۰۲
شن	۰/۰۵
ترکیب شیمیایی محاسبه‌شده	**مقدار در جیره**
انرژی قابل متابولیسم (kcal/kg)	۳۰۰۰ (کیلوکالری در کیلوگرم)
پروتئین خام (درصد)	۱۹ (درصد)
کلسیم (درصد)	۱/۹
فسفر قابل دسترس(درصد)	۰/۳۹
لیزین (درصد)	۱/۳
متیونین (درصد)	۰/٦۵
تره ئونین (درصد)	۰/۸۸
والین (درصد)	۱/۰۲
هیستیدین (درصد)	۰/٤۸
تریپتوفان (درصد)	۰/۲۲
متیونین + سیستین (درصد)	۰/۹۳

پیش مخلوط (در هر کیلوگرم جیره) شامل: ویتامین A، ٤۰۰ واحد بین المللی؛ ویتامینD ، ۲۵۰ واحد بین المللی؛ ویتامینE ، ۳۰ میلی‌گرم؛ ویتامینK3، ۱۳ میلی‌گرم؛ ویتامین B1، ۱۰ میلی‌گرم؛ ویتامین B2، ۱٦ میلی‌گرم؛ ویتامین B6، ۱۲ میلی‌گرم؛ ویتامین B12، ۰/۱ میلی‌گرم؛ پنتوتنات کلسیم، ٦۰ میلی‌گرم؛ اسید فولیک، ۰/۲ میلی‌گرم؛ اسید نیکوتنیک، ۸۳ میلی‌گرم؛ کولین، ۱۰۵ میلی‌گرم؛ کبالت، ۰/٤ میلی‌گرم؛ مس، ۳/۷ میلی‌گرم؛ ید، ۰/۵ میلی‌گرم؛ منگنز، ۸٦ میلی‌گرم؛ منیزیم، ۱۰۸ میلی‌گرم؛ روی، ٦۲ میلی‌گرم؛ آهن، ٤۲ میلی‌گرم؛ کلسیم، ۱۱ میلی‌گرم؛ سدیم، ۳۹۰ میلی‌گرم؛ کلر، ٦۷۱ میلی‌گرم و پتاسیم، ۷۸ میلی‌گرم.

در ادامه آزمایش، برای تفکیک اجزای لاشه در سن ۲۱ روزگی، تعداد ۲ قطعه جوجه از هر تکرار به صورت تصادفی انتخاب و پس از وزن کشی کشتار شدند. وزن اجزا شامل طحال، تیموس و بورس فابریسیوس نسبت به وزن زنده پرنده تعیین گردید.

همچنین به منظور شمارش گلبول‌های سفید، در ۲۱ روزگی بعد از خون‌گیری از ورید بال جوجه‌های مورد آزمایش، گسترش خونی تهیه شده و تعداد لنفوسیت، هتروفیل، منوسیت، بازوفیل و ائوزینوفیل شمارش گردید.

از طرف دیگر برای تعیین تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل، از روش ممانعت از هماگلوتیناسیون (haemagglutination inhibition; HI) استفاده شد. بدین منظور، پس از سانتریفیوژ و جداسازی سرم خون‌های اخذ شده در روز ۲۱ آزمایش، به منظور تعیین عیار سرمی آنتی‌بادی تولیدشده علیه ویروس نیوکاسل، ابتدا سوسپانسیون ویروسی حاوی ٤ واحد HA (haemagglutination) از ویروس مذکور، با استفاده از واکسن نیوکاسل سویه لاسوتا تهیه شد. بدین منظور محتویات خشک واکسن ابتدا با ۸ میلی‌لیتر سالین (Zmpharmed, Iran) مخلوط شده و سپس ۲۵ میکرولیتر از آن فقط در چاهک اول یک ردیف از پلیت ۹٦ تایی (strip 96-well ELISA single break plate, Iran) که دارای چاهک‌های V شکل می‌باشد، ریخته شد و در ادامه به همه چاهک‌های ردیف مذکور، ۲۵ میکرولیتر سالین اضافه گردید. سپس رقیق سازی سریال از چاهک اول شروع و پس از اتمام آن (با بیرون ریختن ۲۵ میکرولیتر از محتویات چاهک آخر)، به تمامی چاهک‌ها ۲۵ میکرولیتر خون مرغی ۰/۹۵درصد اضافه شد. پس از ۱۵ تا ۳۰ دقیقه، عدد ۲ از عدد حاصل از چاله‌ای که رسوب گلبول‌های قرمز در آن مشاهده شد، کسر گردید و به صورت توان عدد ۲ قرار داده شد. عدد حاصل مبنای رقیق‌سازی واکسن غلیظ قرار داده شد. نهایتاً بر اساس نتیجه مشاهده‌شده در آزمایش HA، هر میلی‌لیتر از واکسن مذکور با ۱۵ میلی‌لیتر سالین مخلوط شد، تا جمعاً ١٦ میلی‌لیتر سوسپانسیون ویروسی حاوی ٤ واحد HA تهیه شود (Henning *et al.*, 2008).

برای اندازه‌گیری پاسخ ایمنی علیه گلبول قرمز گوسفند نیز از روش ارائه‌شده توسط تورنتون و همکاران استفاده شد (Thornton *et al.*, 2005). بدین منظور، ابتدا از یک رأس گوسفند ۲۰ میلی‌لیتر خون گرفته شد و سه بار با بافر سالین فسفاته (Zmpharmed, Iran) شسته شد. در نهایت محلول ۵ درصد از گلبول قرمز در بافر فسفات سالین تهیه گردیده و برای اندازه‌گیری پاسخ ایمنی علیه گلبول قرمز گوسفند، در روز ۷ آزمایش به ۲ قطعه جوجه شماره‌گذاری‌شده از هر پن، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول فوق در قسمت ماهیچه سینه تزریق شد. در ادامه، در روزهای ١٤ و ۲۱ آزمایش، ۲ میلی‌لیتر خون از ورید بالی جوجه‌های مذکور اخذ و بعد از انجام سانتریفیوژ (PIT 320, Iran) ۳۰۰۰ دور و به مدت ۱۰ دقیقه، سرم‌ها جدا شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری گردید، سپس برای تعیین تیتر ایمنوگلوبولین کل و نیز تیتر آنتی‌بادی‌های IgM و IgG به آزمایشگاه دامپزشکی دانشگاه تبریز انتقال داده شد و به روش سنجش مستقیم میکروهموآگلوتیناسیون انجام گردید (Isakov *et al.*, 2005). به منظور اندازه‌گیری IgM

و IgG، با استفاده از روش جداسازی پادتن مقاوم به مرکاپتا اتانول (Merck, Germany)، مقدار IgG محاسبه گردید و در نهایت با کسر این مقدار از مقدار پاسخ کل، میزان IgM محاسبه گردید (Grasman, 2010).

برای بررسی فعالیت ایمنی سلولی از روش واکنش حساسیت پوستی بازوفیلیک (cutaneous basophilic hypersensitivity; CBH) یا تورم شبکه پا (toe web swelling; TWS) استفاده شد. برای این منظور محلول فیتوهماگلوتینین (phytohaemagglutinin; PHA) از شرکت بهار افشان تهیه گردید. جهت بررسی پاسخ ایمنی سلولی علیه میتوژن‌های محرک سیستم ایمنی در روز ۱۸ آزمایش از هر پن دو قطعه جوجه انتخاب و شماره‌گذاری شد، و با میکرومتر دیجیتال با دقت ۰/۱ میلی‌متر ضخامت پرده پا (به عنوان ساعت صفر) اندازه‌گیری گردید (Corrier *et al*., 2005)، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات سالین به پرده پای راست (بین انگشتان سوم و چهارم) و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول فیتوهماگلوتینین به پرده پای چپ در همان ناحیه تزریق شد. در ٦ نوبت، (ساعت-های صفر، ۲، ٤، ۱۲، ۲٤ و ٤٨) میزان تورم پرده‌ٔ پای جوجه‌ها توسط کولیس (تاف مدل E141-122) با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شده و نتیجه به صورت شاخص ضخامت پرده پا در ساعات مذکور ثبت و از رابطه زیر شاخص پاسخ ایمنی سلولی محاسبه گردید (Sijben *et al*., 2001):

$$W= (RLP – RL) – (LLB – LL)$$

W: شاخص ضخامت پرده پا یا شاخص تحریک فیتوهماگلوتینین بر حسب میکرومتر

RLP: ضخامت پرده پای چپ بعد از تزریق PHA

RL: ضخامت پرده پای چپ قبل از تزریق PHA

LLB: ضخامت پرده پای راست بعد از تزریق بافر فسفات

LL: ضخامت پرده پای راست قبل از تزریق بافر فسفات

-**تحلیل آماری داده‌ها**: داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS (۲۰۰۲) نسخه ۹/۱ با رویه (GLM) در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با ٤ تیمار و ٥ تکرار برای هر تیمار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها نیز از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. مدل آماری بکار رفته هم به‌شرح زیر بود:

$$y_{ij} = \mu + A_i + e_{ij}$$

Yij = مقدار هر مشاهده

μ = میانگین جامعه

Ai = اثر سطوح والین

eij = خطای آزمایش

یافته‌ها

نتایج مقایسه تأثیر مقادیر مختلف والین بر اندام‌های سیستم ایمنی در تحقیق حاضر، در جدول ۲ ارائه شده‌است که نشان می‌دهد، استفاده از مقادیر مختلف والین، تأثیر معنی‌داری بر وزن کبد، طحال و بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی مورد آزمایش نداشت ($p>۰/۰۵$).

جدول ۲- تأثیر جیره‌های آزمایشی برافزایش وزن نسبی اندام‌های مرتبط با سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی در سن ۲۱ روزگی (برحسب درصد)

نوع تیمار*	وزن نسبی اندام‌های مورد نظر		
	بورس فابریسیوس	طحال	تیموس
تیمار ۱	۰/۲۵	۰/۱٤۸	۰/۳۹۲
تیمار ۲	۰/۲۳	۰/۱۸	۰/۳۷۸
تیمار ۳	۰/۲۱	۰/۱۹	۰/۲۹٤
تیمار ٤	۰/۲٦	۰/۱۹۸	۰/۳۸٦
خطای استاندارد	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۱
ارزش معنی‌داری	۰/۱۳۱	۰/۳٦۷	۰/٤۰٤

*: تیمار ۱= تیمار شاهد، تیمار ۲= سطح توصیه شده والین در جیره با ۲ درصد پروتئین پایین، تیمار ۳= ۱۰درصد بیشتر از سطح توصیه شده والین در جیره با ۲ درصد پروتئین پایین، تیمار ٤= ۲۰درصد بیشتر از سطح توصیه شده والین در جیره با ۲ درصد پروتئین پایین.

همچنین نتایج مربوط به شمارش سلول‌های خونی (لکوسیت‌ها) جوجه‌های گوشتی مورد آزمایش هم در جدول ۳ ارائه شده است که مشخص می‌کند افزودن اسیدآمینه والین تأثیر معنی‌داری بر فراوانی لنفوسیت، هتروفیل، منوسیت، بازوفیل، ائوزینوفیل و نسبت لنفوسیت به هتروفیل خون نداشت ($p>۰/۰۵$). اما جیره‌های حاوی ۱۰ درصد والین باعث افزایش عددی تعداد لنفوسیت، هتروفیل، بازوفیل و ائوزینوفیل گردید.

جدول ۳- تأثیر جیره‌های آزمایشی بر لکوسیت‌های خون جوجه‌های گوشتی در سن ۲۱ روزگی (برحسب درصد)

نوع تیمار*	فراوانی لکوسیت بررسی‌شده					
	ائوزینوفیل	بازوفیل	منوسیت	هتروفیل	لنفوسیت	نسبت هتروفیل به لنفوسیت
تیمار ۱	۰/۸	۲	٤	۲٤/۸	٦۸/٤	۲/٦
تیمار ۲	۰/۸	۲/۸	٤/۸	۲۲	٦۹/٦	۳/۱
تیمار ۳	۱/۲	۲/۸	٤/٤	۲۱/٦	۷۰	۳/۵
تیمار ٤	۰/۸	۲	٤	۲٤	٦۹/۲	۲/۹
خطای استاندارد	۱/۲	۱/٦	٤/۵	۱٤	۲۱/۲	۰/۸٤٤
ارزش معنی‌داری	۰/۹۱	۰/۵۸	۰/۹۱	۰/۱۱۲	۰/۹۵	۰/٤۲

*: تیمار ۱= تیمار شاهد، تیمار ۲= سطح توصیه شده والین در جیره با ۲ درصد پروتئین پایین، تیمار ۳= ۱۰درصد بیشتر از سطح توصیه شده والین در جیره با ۲ درصد پروتئین پایین، تیمار ٤= ۲۰درصد بیشتر از سطح توصیه شده والین در جیره با ۲ درصد پروتئین پایین.

یافته‌های مربوط به تأثیر مقادیر مختلف والین در آزمایشات HI و SRBC (sheep red blood cell) نیز در جدول ٤ ارائه شده‌است. بر این اساس، تحلیل آماری داده‌های مربوط به تعیین عیار سرمی آنتی‌بادی‌های تولیدشده علیه ویروس نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی نشان می‌دهد که جیره‌های حاوی ۲۰ درصد والین به طور معنی‌داری باعث افزایش آنتی‌بادی تولیدشده علیه ویروس مذکور و ایمنی هومورال جوجه‌های گوشتی در سن ۲۱ روزگی گردید ($p<۰/۰۵$). همچنین میزان پادتن کل در پاسخ اولیه علیه گلبول قرمز گوسفندی، تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ($p>۰/۰۵$)، اما افزودن ۱۰ درصد والین به جیره، باعث افزایش معنی‌دار تیتر IgM در ۲۱ روزگی شد ($p<۰/۰۵$). مقدار پادتن کل در پاسخ ثانویه علیه گلبول قرمز گوسفندی هم تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت، طوری‌که سطح ۲۰ درصد والین به طور معنی‌داری باعث افزایش پاسخ ثانویه کل و تیتر IgM مربوط به پاسخ ثانویه SRBC شد ($p<۰/۰۵$).

جدول ٤ – تأثیر تیمارهای آزمایشی بر تیتر آنتی‌بادی‌های تولیدشده علیه ویروس نیوکاسل و گلبول قرمز گوسفندی در سرم خون جوجه‌های گوشتی ۲۱ روزه

نوع تیمار*	تیتر آنتی‌بادی تولیدی علیه ویروس نیوکاسل (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	تیتر آنتی بادی تولیدی علیه گلبول قرمز گوسفندی (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)				
		اولیه			ثانویه	
		ایمونوگلوبین G	ایمونوگلوبین M	ایمونوگلوبین کل (G+M)	ایمونوگلوبین G	ایمونوگلوبین M	ایمونوگلوبین کل (G+M)
تیمار ۱	٦/٤^{a}	۱/٤	۳/۲	٤/٦	۲/٤	۳/٤^{ab}	٥/۸^{ab}
تیمار ۲	۲^{b}	۲/٦	۳	٥/۲	۲/٤	۲/۸^{ab}	٥/۲^{ab}
تیمار ۳	٤^{b}	۲/٤	٤/٤	٦/۸	۳	۱/٤^{b}	٤/٤^{b}
تیمار ٤	٦/٤^{a}	۲/٦	۲/۸	٥/٤	۳/٦	٤/٦^{a}	۸/۲^{a}
خطای استاندارد	۱/٤	۱/٦۷	۱/۰٥	۱/۸۷	۲/۹۷	۱/۱٥	۳/۱
ارزش معنی‌داری	۰/۰۰۰۱	۰/٤۲	۰/۱۰	۰/۱۱	۰/٦٥۲	۰/۰۰۲	۰/۰۲

*: تیمار ۱= تیمار شاهد، تیمار ۲=سطح توصیه‌شده والین در جیره با ۲ درصد پروتئین پایین، تیمار ۳= ۱۰درصد بیشتر از سطح توصیه‌شده والین در جیره با ۲ درصد پروتئین پایین، تیمار ٤= ۲۰درصد بیشتر از سطح توصیه‌شده والین در جیره با ۲ درصد پروتئین پایین.

ab: حروف غیرمشابه در ستون‌های مختلف، وجود تفاوت‌های آماری معنی‌دار را نشان می‌دهند ($p<۰/۰۵$).

در جدول ٥ هم نتایج پاسخ ایمنی سلولی به صورت واکنش حساسیت تأخیری به تزریق PHA-P ارائه شده است که نشان می‌دهد افزودن اسیدآمینه والین تأثیر معنی‌داری بر واکنش تزریق PHA-P داشته است ($p<۰/۰۵$)، به طوری‌که سطح ۲۰ درصد والین باعث افزایش ایمنی سلولی در جوجه‌های گوشتی شد.

جدول ۵- تأثیر جیره‌های آزمایشی بر میانگین شاخص تورم پوست پرده پای جوجه‌ها در پاسخ به تزریق فیتوهماگلوتینین (میلی‌متر)

نوع تیمار*	میزان تورم ایجادشده در ساعات مختلف			
	ساعت ۲	ساعت ٤	ساعت ۱۲	ساعت ۲٤
تیمار ۱	۱۸/٦^{ab}	۸/۸	۷/۸	٦
تیمار ۲	۲۰^{ab}	۱۲/٦	۹	۸
تیمار ۳	۱۳/٦^{b}	۸/٤	۸	۷/٦
تیمار ٤	۲۵/۸^{a}	۱٦	۱٤/٤	۱۰/٤
خطای استاندارد	۳۰/۲	۳٤/۸	۳۰/۷	۲۹/۲
ارزش معنی‌داری	۰/۰۲	۰/۱۸	۰/۲۳	۰/٦٤

*: تیمار ۱= تیمار شاهد، تیمار ۲= سطح توصیه‌شده والین در جیره با ۲ درصد پروتئین پایین، تیمار ۳= ۱۰درصد بیشتر از سطح توصیه‌شده والین در جیره با ۲ درصد پروتئین پایین، تیمار ٤= ۲۰درصد بیشتر از سطح توصیه‌شده والین در جیره با ۲ درصد پروتئین پایین.

ab: حروف غیرمشابه در ستون‌های مختلف، وجود تفاوت‌های آماری معنی‌دار را نشان می‌دهند (p<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های پژوهش حاضر مشخص کرد که افزودن والین در جیره‌های آزمایشی، تأثیر معنی‌داری بر وزن اندام‌های لنفوئیدی جوجه‌های گوشتی مورد آزمایش نداشت (جدول ۲). عقیده براین است که وزن اندام‌های ایمنی یکی از شاخصه‌های عملکرد سیستم ایمنی می‌تواند باشد چرا که بالا بودن وزن اندام‌های مذکور ممکن است با حضور سلول‌های ایمنی بیشتر در آن اندام‌ها همراه باشد و بنابراین بتوانند با کارآیی بهتری در مقابل عوامل پاتوژن ایفای نقش کنند (Katanbaf *et al.*, 1989). البته مطابق با نتایج ما در تحقیقی گزارش شده که وزن نسبی اندام‌های لنفوئیدی تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی با مقادیر مختلف والین قرار نگرفته‌است (Thornton *et al.*, 2006). در عین حال مشخص شده که بالا بودن سطوح مورد نیاز پرنده به اسیدآمینه‌ها به دلیل وابستگی بالای سیستم ایمنی به این منابع می‌باشد و کمبود یا تأمین سطح حاشیه‌ای آن، عملکرد سیستم ایمنی را به شدت کاهش می‌دهد (Li *et al.*, 2007).

از سوی دیگر در تحقیق حاضر افزودن والین تأثیر معنی‌داری بر لکوسیت‌های خونی نداشت (جدول ۳). در این خصوص گزارش شده‌است که ویژگی‌های لکوسیت‌های خون یک صفت وراثتی بوده و تحت تأثیر سن و عوامل مختلفی مثل تنش، برخی هورمون‌ها و برخی مواد تغییر پیدا می‌کند (Allsep *et al.*, 1990)، لذا بررسی شاخصه‌های لکوسیتی خون جوجه‌های گوشتی روش مناسبی برای ارزیابی تنش می‌باشد (Fatemi and Toghyani, 2018). همچنین بررسی تعداد لنفوسیت و هتروفیل و نسبت لنفوسیت به هتروفیل خون هم شاخص مناسبی برای ارزیابی تنش و کارآیی سطح ایمنی می‌باشد (Cotter, 2015)، به‌طوری‌که تحت تأثیر تنش، میزان ترشح کورتیکوسترون در بدن افزایش می‌یابد که خود مانع سنتز بیشتر لنفوسیت‌ها شده و در نتیجه نسبت هتروفیل به لنفوسیت خون زیاد می‌شود (Sturkie, 1995). از طرف دیگر در مطالعه حاضر مشخص شد که جیره‌های حاوی والین به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) باعث افزایش عیار پادتن سنجیده شده در آزمایش HI و ایمنی هومورال می‌گردند (جدول ٤). همچنین افزودن والین باعث افزایش میزان IgM سرم در پاسخ اولیه شد (جدول ٤). میزان پادتن کل در پاسخ ثانویه هم تحت تأثیر معنی‌دار تیمارهای آزمایشی قرار گرفت ($p<۰/۰۵$). همچنین مطابق داده‌های ثبت شده در جدول٤، تغییر معنی‌داری در میزان IgM مربوط به پاسخ ثانویه علیه SRBC حاصل شد ($p<۰/۰۵$). در این ارتباط، مطالعه‌ای نشان داده که مقدار والین جیره باعث افزایش ایمنی ذاتی یا اکتسابی گردیده، به طوری‌که با افزایش سطح والین در جیره، تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس بیماری نیوکاسل نیز افزایش یافته‌است (Bhargava *et al.*, 1971). از طرفی گزارش شده که کمبود اسیدآمینه‌های شاخه‌دار از جمله والین در جیره جوجه‌های گوشتی، باعث کاهش تیتر آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن گلبول قرمز گوسفندی می‌شود (Isakov *et al.*, 2005) چرا که با کاهش سطح اسیدآمینه‌های مورد نیاز در سیستم ایمنی (اسیدآمینه‌های شاخه‌دار)، عملکرد لکوسیت‌ها و متعاقب آن تولید آنتی‌بادی‌ها و واسطه‌هایی همچون اسید نیتریک و یا اینترلوکین‌ها کاهش می‌یابد (Bogdan *et al.*, 2000). از طرف دیگر

بررسی‌ها نشان می‌دهند که تمایز لنفوسیت‌های B و افزایش آنتی‌بادی‌ها، تحت تأثیر اسیدهای‌آمینه، مخصوصاً اسیدآمینه‌های شاخه‌دار می‌باشد. همچنین به طور کلی اکثر اسیدهای‌آمینه باعث تبدیل لنفوسیت‌های T یاریگر به لنفوسیت‌های T کشنده می‌شوند. در این خصوص لازم به یادآوری است که ایمونوگلوبین G و ایمونوگلوبین A تحت تأثیر لنفوسیت T یاریگر هستند. همچنین گزارش شده‌است که وجود اسیدآمینه والین، سلول‌های T را افزایش داده و باعث افزایش ایمنی هموورال می‌گردد، چرا که سلول‌های T توسط سیتوکین‌هایی که ترشح می‌کنند، باعث فعال شدن سلول‌های B می‌شوند. این یافته‌ها نشان می‌دهند که پاسخ ایمنی هومورال جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با جیره کم‌پروتئین مکمل‌شده با اسیدآمینه‌های سنتتیک، باعث افزایش تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل و گلبول‌قرمز گوسفندی گردیده‌است (Thornton *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007).

همچنین در تحقیق حاضر پاسخ ایمنی سلولی ناشی از واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری به تزریق PHA-P هم نشان داد که افزودن والین تأثیر معنی‌داری بر واکنش تزریق PHA-P داشت ($p<۰/۰۵$)، (جدول ۵). در این خصوص نشان داده شده که کاتابولیسم اسیدآمینه‌های سنتتیک، نقش مهمی در واکنش‌های ایمنی به واسطه تولید موضعی بازدارنده‌های ایمنی محیطی، که توانایی کنترل هومئوستازی سلول‌های T را در التهاب دارند، ایفاء می‌نماید (Platten *et al.*, 2005). همچنین عقیده بر این است که افزایش حضور ماکروفاژها و لکوسیت‌ها، عامل تورم پوست در محل تزریق فیتوهماگلوتینین می‌باشد، به طوری که در یک مطالعه آزمایشگاهی مشخص گردیده، حذف اسید آمینه‌های شاخه‌دار از محیط کشت، باعث از بین رفتن توانایی تکثیر لنفوسیت‌ها در پاسخ به فیتوهماگلوتینین می‌شود (Chuang *et al.*, 1990).

با توجه به این‌که در مطالعه حاضر افزودن ۲۰ درصد والین به جیره‌های کم پروتئین باعث بهبود سیستم ایمنی سلولی و هومورال جوجه‌های گوشتی گردید، به طوری‌که افزودن والین باعث افزایش عیار پادتن حاصله در آزمایش HI و ایمنی هومورال شد و همچنین مقادیر بالای والین در جیره باعث افزایش پاسخ ثانویه علیه گلبول قرمز گوسفندی گردیده و تأثیر مثبتی بر ایمنی سلولی داشت، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که افزودن مقادیر بالای اسیدآمینه والین به جیره‌های کم پروتئین، به احتمال قوی بتواند سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی را در دوره رشد بهبود بخشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از اساتید گروه علوم دامی دانشگاه تبریز به خصوص از آقای مهندس چراغی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Allsep, T., Wiggins, M. and Birrenkott, G. (1990). Normal growth and white blood cell development in large white turkey embryos. Poultry Science, 69(11): 2027-2034.
- Bhargava, K.K., Hanson R.P. and Sunde, M.L. (1971). Effects of methionine and valine on growth and antibody production in chicks infected with live or killed Newcastle disease virus. Poultry Science, 50(2): 614-619.
- Bogdan, C.T., Rollinghoff, M. and Diefenbach, A. (2000). The role of nitric oxide in innate immunity. Immunological Reviews, 173(1): 17-26.
- Chuang, J.C., Yu, C.L. and Wang, S.R. (1990). Modulation of human lymphocyte proliferation by amino acids. Clinical and Experimental Immunology, 81(1): 173-176.
- Corrier, D.E. and Deloach, J.R. (1990). Evaluation of cell mediated, cutaneous basophil hypersensitivity in young chickens with an interdigital skin test. Poultry Science, 69(3): 403-408.
- Coto, C., Wang, Z., Cerrate, S., Perazzo, F., Abdel-Maksoud, A., Yan, F., et al. (2009). Effect of Protein and amino acid levels on bone formation in diets varying in calcium content. Poultry science, 8(4): 307-316.
- Cotter, P.F. (2015). An examination of the utility of heterophil-lymphocyte ratios in assessing stress of caged hens. Poultry Science, 94(3): 512-517.
- Corzo, A., Kidd, M., Dozier, W. and Vieira, S. (2007). Marginality and needs of dietary valine for broilers fed certain all-vegetable diets. Journal of Applied Poultry Research, 16(4): 546-554.
- Dairo, F.A.S., Adesehinwa, A.O.K., Oluwasola, T.A. and Oluyemi, J.A. (2010). High and low dietary energy and Protein levels for broiler chickens. African Journal Agriculture Research, 5(15): 2030-2038.
- Delhanty, J.J. and Salomon, J.B. (1966). The nature of antibodies to goat erythrocytes in the developing chicken. Journal of Immunology, 11(2): 103-113.
- Fatemi, M. and Toghyani, M. (2018). Effect of Tryptophan supplementation in protein deficient diets on performance, gut development and immune responses in Broiler Chickens. Iranian Journal of Applied Science, 8(1): 101-108.
- Grasman, K.A. (2010). In vivo functional test for assessing immunotoxicity in birds. Immunotoxicity testing: Methods and protocols, Methods in Molecular Biology. Humana Press Product, pp: 387-398.
- Henning, J., Morton, J.H.T. and Meers, J. (2008). Mortality rates adjusted for unobserved deaths and associations with Newcastle disease virus serology among unvaccinated village chickens in Myanmar. Preventive Veterinary Medicine, 85(3-4): 241-252.
- Hussein, A.S., Cantor, A.H., Pescatore, A.J., Gates, R.S., Burnham, D., Ford, M.J., et al. (2001). Effect of low protein diets with amino acid supplementation on broiler growth. Journal of Applied Poultry Research, 10(4): 354-362.
- Isakov, N., Feldmann, M. and Segel, S. (2005). The mechanism of modulation of humoral immune responses after injection of mice with SRBC. Journal Immunology, 128(2): 969-975.
- Katanbaf, M.N., Dunninington, E.A. and Siegel, P.B. (1989). Restricted feeding in early and late-feathering chickens. Growth and Physiological responses. Poultry Science, 68(3): 344-351.
- Kidd, M.T., Zumwalt, C.D., Chamalee, D.W., Carden, M.L. and Burnham, D.J. (2002). Broiler growth and carcass responses to diets containing L-threonine versus diets containing threonine from intact protein sources. Journal of Applied Poultry Research, 11(1): 83-89.
- Li, P., Yin, Y.L., Li, D., Kim, S.W. and Wu, G. (2007). Amino acids and immune function: a review. British Journal Nutrition, 98(2): 237-252.
- Newsholme, E.A. and Calder, P.C. (1997). The Proposed role of Glutamine in some cells of the immune system and speculative consequences for the whole animal. Nutrition, 13(7-8): 728-730.

- Platten, M., Ho, P.P., Youssef, S. and Fontoura, P. (2005). Treatment of autoimmune neuro inflammation with a synthetic Tryptophan metabolite. Science, 310(5749): 850-855.
- Rostagno, H.S., Pupa, J.M.R. and Pack, M. (1995). Diet formulation for broilers based on total versus digestible amino acids. The Journal of Applied Poultry Research, 4(3): 293-299.
- Sijben, J.W.C., Nieuwland, M.G.B., Kemp, B., Parmentier, H.K. and Schrama, J.W. (2001). Interactions and antigen dependence of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on antibody responsiveness in growing layer hens. Poultry Science, 80(7): 885-893.
- Sturkie, P.D. (1995). Avian Physiologhy. Paper presented at the fourth International Congress of Springer verlag, New York, America.
- Thornton, S.A., Corzo, A., Pharr, G.T., Dozier Iii, W.A., Miles, D.M. and Kidd, M.T. (2006). Valine requirements for immune and growth responses in broilers from 3 to 6 weeks of age. British Poultry Science, 47(2): 190-199.
- Zhang, S., Iangfang Zeng, X., Ren, M., Mao, X. and Qiao, S. (2017). Novel metabolic and Physiological functions of branched chain amino acids. Journal of Animal Science and Biotechnology, 40(1): 130-142.