پژوهش‌های علوم دامی
Animal Science Research

مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۳۲ شماره ۲/ سال۱۴۰۱/ صفحات ۸۵ تا ۹۴

DOI: 10.22034/AS.2022.42711.1593

تأثیر تزریق درون تخم‌مرغی نانو ذرات نقره بر عملکرد سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی تحت تنش اکسیداتیو القاء شده توسط لیپوپلی‌ساکارید

سمیرا عرب‌عامری[۱]*، فیروز صمدی[۲]، بهروز دستار[۳]، زربخت انصاری پیرسرایی [۴] و رضا مبصری[۵]

تاریخ دریافت: ۹۹/۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ٤۰۰/۱۱/۲۰

[۱] دانشجوی دکتری علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[۲] استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[۳] استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[٤] دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[۵] دامپزشک، مدیر نمایندگی سازمان مدیریت صنعتی گرگان

*مسئول مکاتبه: Email: samira arabameri@chmail.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: امروزه پرورش طیور با عوامل تنش‌زای مختلفی همراه است. از این‌رو تقویت سیستم ایمنی بخصوص به روش تزریق درون تخم مرغی مورد توجه محققین می‌باشد. **هدف:** تأثیر تزریق درون تخم مرغی نانوذرات نقره بر عملکرد سیستم ایمنی در زمان تفریخ و پایان دوره پرورش (٤۲ روزگی) تحت تنش اکسیداتیو القاء شده توسط لیپوپلی-ساکارید بررسی شد. **روش کار:** بدین منظور از ۵۹۲ تخم‌مرغ بارور در ٤ تیمار، ٤ تکرار و ۳۷ عدد تخم‌مرغ در هر تکرار استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل دو تیمار شاهد (۱-بدون تزریق و ۲- تزریق یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به ازای هر تخم‌مرغ)، و تیمارهای ۳ و ٤ به ترتیب تزریق ۲۰ و ٤۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره به ازای هر تخم مرغ بودند. تزریق نانوذرات نقره و سرم فیزیولوژی در روز ۷ جوجه‌کشی صورت گرفت. جهت القاء تنش اکسیداتیو در دوره پرورش، لیپوپلی‌ساکارید به میزان ۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن زنده در زمان‌های ۱۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت قبل از کشتار به صورت درون صفاقی تزریق شد. **نتایج:** درصد جوجه‌درآوری در شاهد بدون تزریق نسبت به بقیه تیمارها بیشتر بود (P<۰/۰۵). نانوذرات نقره تزریق شده درون تخم‌مرغ‌ها در سطح ۲۰ و ٤۰ میلی‌گرم موجب بهبود رشد جوجه‌ها در طی دوران جوجه-کشی و پرورش شد (P<۰/۰۵). غلظت ایمونوگلوبین G (IgG)، M (IgM)، تعداد کل گلبول‌های سفید و نسبت هتروفیل/لنفوسیت تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). گروه دریافت‌کننده ۲۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره بالاترین سطح بیان ژن TNF-α، IL-٦ و TGF-β را در روز تفریخ و گروه دریافت‌کننده ٤۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره بالاترین سطح بیان ژن TNF-α و TGF-β را درروز ٤۲ پرورش نشان دادند (P<۰/۰۵). **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج حاصل از این مطالعه پیشنهاد می‌کند که نانوذرات نقره با بهبود رشد و بالا بردن سطح بیان ژن فاکتورهای دخیل در عملکرد سیستم ایمنی موجب بهبود پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی می‌شود.

واژگان کلیدی: بیان ژن، پاسخ ایمنی، جوجه گوشتی، نانوذرات نقره

مقدمه

تنش‌های متعدد از چالش‌های اجتناب‌ناپذیر در صنعت طیور می‌باشند که با اختلال در هومئوستازبدن[1] ضمن مستعد نمودن پرنده به بیماری‌های مختلف منجر به کاهش عملکرد پرنده می‌شوند (میسوچی و پاپ ۲۰۱۵).

امروزه استفاده از تنش اکسیداتیو القایی بدلیل قابلیت اجراء و هزینه کمتر مورد توجه دانشمندان می‌باشد. در این خصوص از لیپوپلی‌ساکارید[2] یا اندوتوکسین که از اجزاء یواره سلولی باکتریهای گرم منفی می باشد جهت القاء تنش اکسیداتیو در پرندگان استفاده می‌شود. این ترکیب با تولید رادیکالهای آزاد منجر به اختلال در همئوستاز سیستم‌های اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی بدن می‌شود (گرانادو و همکاران۲۰۰۸ و ایسری و همکاران ۲۰۰۸).

نانوذرات نقره به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی کاربردهای وسیعی در صنعت و پزشکی دارد (بهنجا و همکاران ۲۰۱۵). خواص آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی نقره منجر به استفاده آن در زمینه‌های مختلف از جمله علوم دامی شده است. گزارش شده است که تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره می‌تواند بر افزایش وزن جنینی موثر باشد و استفاده از ۹۰۰ppm نانوذرات نقره در جیره باعث افزایش معنی‌دار وزن زنده جوجه‌ها و کاهش معنی‌دار ضریب تبدیل خوراک نسبت به گروه شاهد می‌شود (احمدی ۲۰۰۹ و بهنجا و همکاران ۲۰۱۵). بیان ژن[3] IL-۶ و TNF-α[4] پس از القای تنش اکسیداتیو توسط لیپوپلی‌ساکارید در گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرات نقره افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (بهنجا و همکاران ۲۰۱۵). با توجه به اثرات مفید نانوذرات نقره بر عملکرد و سیستم ایمنی طیور و همچنین محدود بودن مطالعات در مورد تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره، این آزمایش به منظور بررسی تاثیر تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر جوجه‌درآوری، رشد، سیستم ایمنی و بیان ژن فاکتورهای ایمنی جوجه‌های گوشتی تحت تنش لیپوپلی‌ساکارید انجام شد.

مواد و روش

دراین مطالعه، از ۵۹۲ عدد تخم‌مرغ سویه هوبارد F15 (مزرعه نمونه ارتش، گرگان، گلستان) در ٤ تیمار با ٤ تکرار و ۳۷ عدد تخم‌مرغ در هر تکرار استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل دو تیمار شاهد (۱-بدون تزریق و ۲- تزریق یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی۰/۹٪ به ازای هر تخم‌مرغ، و تیمارهای ۳ و ٤ به ترتیب تزریق ۲۰ و ٤۰ میلی‌گرم نانو ذرات نقره (شرکت پارت خزر، pH= ٦/٥، ۳۲۰ میلی اسمول) به ازای هر تخم مرغ بودند. تزریق درون تخم‌مرغی در روز هفت جوجه‌کشی با استفاده از سر سوزن شماره ۲۱ و به کمک نوربینی به درون سفیده انجام شد (گل و همکاران، ۲۰۱۷). سپس تخم‌مرغ‌ها (میانگین وزنی ٥۰ گرم) در دستگاه جوجه‌کشی (پیترسام، بلژیک) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸٥ درصد قرار داده شدند. پس از تزریق، محل تزریق با پارافین بسته شد. در روز تفریخ، نیمی از جوجه‌ها پس از شمارش و وزن‌کشی جهت بررسی ایمنی هومورال (ایمونوگلوبین‌های G و M)، شمارش تفریقی گلبولهای سفید و نیز مطالعه ژن‌های مورد نظر (TNF-α، IL-۶ وTGF-β) کشتار شدند و از میان سایر جوجه‌ها، آن‌هایی که از نظر وزنی دارای یکنواختی بیشتری با تیمار مورد نظر داشتن به فارم پرورشی (میهن طیور، آق‌قلا، گلستان) منتقل شدند و مجددا در ٤ تیمار و ٤ تکرار با ۲۰ قطعه جوجه گوشتی در هر تکرار قرار گرفتند. جیره غذایی بر اساس راهنمای نگهداری سویه هوبارد F15 تهیه شد. در طی آزمایش از برنامه راهنمای نوری بنا بر کتابچه راهنمای پرورش سویه هوبارد در سالن استفاده شد و آب و غذا به صورت آزاد در اختیار جوجه‌ها قرار گرفت. جهت القاء تنش اکسیداتیو در دوره پرورش از تزریق درون صفاقی

[1] Homeostasis
[2] Lipopolysaccharide
[3] Interleukin-6
[4] Tumor necrosis factor-alpha

لیپوپلی‌ساکارید باکتری سالمونلا در ۴۸، ۲۴ و ۱۲ ساعت قبل از کشتار (روزهای ۴۰ و ۴۱ پرورش) به میزان ۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن زنده استفاده شد (ایکس و همکاران ۲۰۰۰). سپس در روز ۴۲ پرورش پس از وزن-کشی، جوجه‌ها جهت بررسی ژن‌های مورد نظر (TNF-α، IL-۶ و TGF-β) کشتارشدند.

نانوذرات

محلول هیدروکلوئیدی نقره از شرکت نانو پارت خزر که با روش ولتاژ بالا غیر انفجاری با استفاده از فلز با خلوص بالا (۹۹,۹٪) و آب با خلوص بالا تولید شده بود، تهیه شد. غلظت نانوذرات در هیدروکلوئید نانونقره ۵۰ ppm بود.

بررسی درصد جوجه‌درآوری

درصد جوجه‌درآوری به شرح ذیل محاسبه گردید.

درصد جوجه‌درآوری= تعداد جوجه*۱۰۰/تعداد تخم های نطفه دار

اندازه‌گیری وزن لاشه، اندام‌های داخلی، کبد و طحال

در روز تفریخ و انتهای دوره پرورش (۴۲ روزگی)، دو پرنده به طور تصادفی از هر واحد آزمایشی انتخاب، پس از وزن‌کشی کشتار شده، سپس وزن لاشه (وزن کل بدن به جزء امعاء و احشاء داخلی)، اندام‌های داخلی، کبد و طحال با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت یک هزارم محاسبه گردید و به صورت نسبتی از وزن بدن بیان شدند.

بررسی میزان تولید ایمونوگلوبین

در روز تفریخ، دو پرنده به طور تصادفی از هر واحد آزمایشی انتخاب شد. نمونه خون از قلب آنها گرفته شد و برای تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی به لوله‌های آزمایش بدون هپارین منتقل شد. نمونه ها با چرخش ۳۰۰۰ هزار در دقیقه و به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شدند (HERMLE-Z323K ، آلمان) تا سرم جدا شود. بعد از جداسازی، ایمونوگلوبولین‌های G و M با استفاده از کیت تجاری پارس آزمون موجود اندازه گیری شد.

شمارش تعداد گلبول های سفید و نسبت هتروفیل به لنفوسیت

در روز تفریخ، دو پرنده به طور تصادفی از هر واحد آزمایشی انتخاب شد. خون از قلب آنها گرفته شد وجهت جلوگیری از انعقاد نمونه‌های خون، به لوله‌های حاوی EDTA منتقل شد. گسترش از نمونه‌های خون پرندگان روی لام تهیه گردید. نمونه‌های گسترده شده پس از خشک شدن با متانول ۹۹,۵٪ ثابت، سپس با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شد، پس از ۵۰ دقیقه، اسلایدها شسته شدند و با بزرگنمایی ۱۰۰، شمارش گلبول‌های سفید انجام شد (گراس و سیگل ۱۹۸۳).

بررسی بیان ژن

جهت بررسی بیان ژن TNF-α، IL-۶ و TGF-β[1] در روز تفریخ و ۴۲ پرورش از هر تیمار سه پرنده به طور تصادفی انتخاب و کشتار شدند. برای استخراج RNA قطعه‌های کوچکی از بافت کبد هر جوجه توسط تیغ استریل جدا شد و به‌سرعت درون تانک نیتروژن در دمای ۱۹۶- قرار داده شد. استخراج RNA کل از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت کبد و بنا بر دستورکار کیت استخراج شرکت یکتا تجهیز صورت گرفت. کیفیت و کمیت RNAاستخراج شده با روش الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه طیف‌سنج نوری[2] ارزیابی شد. برای ساخت (سنتز cDNA) از مستر میکس لیوفیلیزه بایونیر شرکت یکتا تجهیز استفاده شد. بدین منظور میزان ۱۰ پیکومول از آغازگر تصادفی هگزامر به همراه ۲ میکرولیتر RNA استخراج به میکروتیوپ حاوی مسترمیکس اضافه شد و در نهایت حجم نهایی مواد افزوده‌شده توسط آب Free RNase به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از تهیه مخلوط کامل، ساخت cDNAدر شرایط دمای ۱۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه و دمای ۹۰ درجه سلسیوس برای پنج دقیقه قرار گرفت. پس از ساخت، cDNA در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. همچنین کیفیت cDNAساخت شده با استفاده از ژل

[1] Transforming growth factor beta

[2] Spectrophotometer

آگارز ۱ درصد تعیین شد. برای بررسی بیان ژن هدف و مرجع از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد که مشخصات آنها در جدول ۱ آمده است (هاتفی و همکاران ۲۰۲۱ و الکازلن و همکاران ۲۰۲۰). در روش تعیین کمی بیان ژن تصحیح تغییر آزمایشی ضروری است. برای این منظور، از یک ژن کنترل داخلی، β Actin استفاده شد. برای Q-RT-PCR مسترمیکس از واکنش Real Time PCR شرکت یکتا تجهیز استفاده شد. برای هر نمونه در هر تیوپ ٤ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین، ۱میکرولیتر از هر آغازگر رفت با غلظت ۵ پیکومول، ۱ میکرولیتر cDNA ساخت شده و ۳ میکرولیتر آب Free DNaseاضافه شد که در کل حجم نهایی هر میکروتیوپ به ۱۰میکرولیتر رسید. برای هر نمونه نیز سه میکروتیوپ به عنوان سه تکرار در نظر گرفته شد. برنامه گرمایی استفاده شده در واکنش Time Real PCR برای ژنهای β-Actinو تریپسین شامل دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و ۳۱ ثانیه در دمای٦٠ درجه سلسیوس با ٤٠ چرخه و در مرحله جداسازی نهایی در شرایط دمایی ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه و دمای ٦٠ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، دمای۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه و ٦٠ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه بود. در پایان مقایسه بیان ژن با استفاده از برنامه REST و بر پایه میزان Ct (شمار چرخه مورد نیاز برای رسیدن به یک سطح آستانه) به دست آمده توسط Real PCR Time نسبت به گروه شاهد (کنترل) انجام شد. داده‌های به دست آمده با روش لیواک واکاوی اولیه شد(لیواک واکاوی ۲۰۰۱). پژوهش در قالب کاملا تصادفی اجرا شد. پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد. تجزیه آماری داده‌ها توسط نرم افزار SAS و با استفاده از رویه GLM انجام شد. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح ۵ درصد انجام پذیرفت.

$Yij = \mu + Ti + eij$

Y_{ikj} = مقدار هر مشاهده از فراسنجه مورد اندازه‌گیری

μ= میانگین کل

ai = اثرات عامل اول(تیمارهای تزریقی)

eijk=اثرخطای‌آزمایشی

Table1- Oligonucleotide sequence of immune-related gene primers (Hateifi et al. 2021; Alqazlan et al. 2020).

Gene	Sequence (5'→3')	Accession No.	Product Size (bp)
IL-6	CAACCTCAACCTgCCCAA ggAgAgCTTCCTCAggCATT	AB559572	85
TNF-α	TgTgTATgTgCAgCAACCCgTAgT ggCATTgCAATTTggACAgAAgT	AY765397	171
TGF-β	CggCCgACgATgAgTggCTC CggggCCCATCTCACAgggA	M31160.1	120
β-actin	CATCACCATTggCAATgAgAgg gCAAgCAggAgTACgATgAATC	L08165	353

نتایج و بحث

نتایج مربوط به قابلیت جوجه‌درآوری، وزن نسبی لاشه، اندام های داخلی، کبد و طحال در روز تفریخ از تخم و روز ٤٢ پس از تفریخ در جداول ۲ و ۳ آمده است. جوجه‌درآوری در تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی داری را نشان داد، به طوری که بیشترین جوجه‌درآوری مربوط به گروه شاهد بدون تزریق بود ($p<۰/۰۵$). نتایج مشاهده شده در این تحقیق با نتایج (گل و همکاران ۲۰۱۷) مطابقت دارد که بیان نمودند بیشترین جوجه‌درآوری مربوط به گروه شاهد می باشد. در آزمایش حاضر، تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره موجب کاهش جوجه‌درآوری شد که می‌تواند به دلیل کوچک بودن جوجه‌ها در روز ۷ جوجه‌کشی باشد. اختلاف درجه پاسخ به تزریق درون تخم‌مرغی می‌تواند ناشی از ژنتیک، سن مرغ مادر، اندازه تخم‌مرغ، شرایط جوجه‌کشی، ترکیبات تزریقی، شیوه تزریق، مکان تزریق،

عمق تزریق و زمان تزریق با شد (پیلار سکی و همکاران ۲۰۰۵ و سان و همکاران ۲۰۱۸).

وزن نسبی لاشه، سینه و ران در گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرات نقره در روز تفریخ از تخم و وزن نسبی لاشه و سینه در گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرات نقره در روز ٤٢ پس از تفریخ به طور معنی‌داری افزایش داشت ($p<۰/۰۵$). نتایج مشاهده شده در این تحقیق با نتایج (بهنجا وهمکاران ۲۰۱۵ و ساکی و سالاری ۲۰۱٤ و پیندا و همکاران ۲۰۱۲) مطابقت دارد که بیان نمودند استفاده از نانوذرات نقره، تاثیر معنی‌داری بر خصوصیات عملکردی جوجه‌های گوشتی از جمله خوراک مصرفی، وزن بدن و ضریب تبدیل خوراک دارد. در آزمایش حاضر، تزریق درون تخم-مرغی نانوذرات نقره موجب افزایش وزن در روز تفریخ از تخم و روز ٤٢ پس از تفریخ شد که می‌تواند به دلیل وجود قابل توجهی آنتی‌اکسیدان در نانوذرات نقره باشد که با اثر آنتی‌اکسیدانی آن بر راندمان انرژی در دوران زندگی جنینی، موجب افزایش وزن گروه‌های دریافت‌کننده نانونقره شده است. احمدی (۲۰۰۹) با استفاده از سطوح مختلف نانوذرات نقره در جیره جوجه‌های گوشتی نتیجه گرفت که نانوذرات نقره به میزان ppm ۹۰۰ در جیره باعث افزایش معنی‌دار وزن زنده جوجه‌ها و همچنین کاهش معنی‌دار ضریب تبدیل خوراک نسبت به گروه شاهد می-شود. در گزارش اندی و همکاران (۲۰۱۱) مشخص گردید وجود نانوذرات نقره باعث بهبود وزن‌گیری، خوراک مصرفی و ضریب تبدیل خوراک می‌شود.

Table 2. Effects of *in ovo* injection of silver nanoparticles on hatchability percentage, carcass, liver and spleen of broilers in the study groups at hatching time

Treatments	Hatchability (%)	Carcass weight (%)	Breast weight (%)	Thigh weight (%)	Liver (%)	Spleen (%)
Non-injected	90^{a} ±0.408	66.61^{d}±0.20	21.45^{c}±0. 1	15.71^{c}±0.01	0.9±0.05	0.55^{b}±0.05
Saline solution	85^{b}±0.707	68.20^{c}±0.01	21.52^{bc}±0.01	15.74^{c}±0.01	1.15±0.1	0.65^{ab}±0.05
20 mg NS	81^{c}±0.408	73.21^{a}±0.01	22.01^{a}±0.01	16.13^{a}±0.01	1.40±0.1	0.95^{a}±0.05
40 mg NS	75^{d}±0.408	70.15^{b}±0.05	21.83^{ab}±0.05	16.02^{b}±0.02	1.20±0.1	0.70^{ab}±0.1
P-Value	0.0001	0.01	0.01	0.02	0.05	0.05

^{a,b,c,d} Means within a column without a common superscript differ significantly (P<0/05).

Non-injected: without silver nanoparticles, Saline solution: phosphate buffer saline, 20 mg NS: 20 mg silver nanoparticles, 40 mg NS: 40 mg silver nanoparticles

Table 3. Effects of *in ovo* injection of silver nanoparticles on carcass percentage, liver and spleen of broilers in the study groups at 42 day

Treatments	Carcass weight (%)	Breast weight (%)	Thigh weight (%)	Liver (%)	Spleen (%)
Non-injected	70.50b±0.5	22.61^{c}±0.01	16.62±0.01	1.75±0.05	0.7±0.05
Saline solution	71.50 ^{b}±0.5	22.47^{b}±0.02	16.66 ±0.07	1.80±0.1	0.75±0.01
20 mg NS	75.50^{a}±0.5	22.82^{b}±0.02	16.71 ±0.01	1.85±0.1	0.95 ±0.05
40 mg NS	77.50^{a}±0.5	23.05^{a}±0.05	16.83±0.03	2.01±0.01	1.01±0.01
P-Value	0.001	0.0007	0.082	0.342	0.05

^{a,b,C} Means within a column without a common superscript differ significantly (P<0/05).

Non-injected: without silver nanoparticles, Saline solution: phosphate buffer saline, 20 mg NS: 20 mg silver nanoparticles, 40 mg NS: 40 mg silver nanoparticles

وزن نسبی طحال در گروه‌های دریافت کننده نانوذرات نقره نسبت به گروه شاهد در روز تفریخ از تخم به طور معنی‌دار افزایش داشت ($p<۰/۰۵$). اگرچه وزن نسبی کبد در روز تفریخ و وزن نسبی کبد و طحال در روز ٤٢ پس از تفزیخ افزایش معنی‌داری را نشان نداد اما بیشترین وزن نسبی کبد و طحال مربوط به گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرات نقره بود. نتایج مشاهده شده در این تحقیق با نتایج (گل و همکاران ۲۰۱۷) مطابقت دارد که بیان کردند

بیشترین وزن کبد وطحال مربوط به گروه دریافت‌کننده نانوذرات نقره در زمان جنینی بود. در آزمایش حاضر، تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره موجب افزایش وزن نسبی کبد و طحال در روز تفریخ و ٤٢ پرورش شد که می‌تواند بیانگر اثر نانوذرات نقره بر کاهش ترشح هورمون کورتیکوسترون و تاثیر آن بر افزایش وزن بدن و به دنبال آن افزایش وزن کبد و طحال باشد.

نتایج حاصل از تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره برغلظت ایمونوگلوبین G، M، تعداد گلبول های سفید و نسبت هتروفیل به لنفوسیت در روز تفریخ در جدول ٤ آمده است. غلظت ایمونوگلوبین G، M ، تعداد گلبول‌های سفید و نسبت هتروفیل به لنفوسیت تفاوت معنی‌داری را در تیمارهای آزمایشی نشان نداد ($p>0/05$). نتایج ما با نتایج قبلی پیندا و همکارن (۲۰۱۲) مطابقت دارد که نشان دادند غلظت IgG و IgM تحت تأثیر تزریق درون تخم‌مرغی ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم نانونقره قرار نگرفته است. (سالاری و همکاران ۲۰۱۵ و ساکی و سالاری ۱۳۹۲ و جانگ و همکاران ۲۰۱۳) گزارش کردند نانوذرات نقره میزان IgG، IgM و گرانولوسیت های نوتروفیل خون را افزایش داد. تفاوت در نتایج ممکن است به دلیل تفاوت در روش تزریق، محل تزریق، عمق تزریق، زمان تزریق، ژنتیک، سن مرغ، اندازه تخم و شرایط جوجه‌کشی باشد.

Table 4. Effects of in ovo injection of silver nanoparticles on immune response of broilers in the study groups

Treatments	IgG	IgM	WBC	H/L
Non-injected	344.375±0.263	110.875±0.295	22920.250±0.0.365	0.406±0.001
Saline solution	345.125±0.811	111.750±0.250	22922.200±4.255	0.413±0.003
20 mg NS	345.750±0.422	111.925±0.350	22930.500±0.70	0.417±0.004
40 mg NS	345.500±0.365	111.875±0.226	22930.250±1.849	0.416±0.003
P-Value	0.268	0.053	0.084	0.123

Non-injected: without silver nanoparticles, Saline solution: phosphate buffer saline, 20 mg NS: 20 mg silver nanoparticles, 40 mg NS: 40 mg silver nanoparticles
IgG: Immunoglobulin G, IgM: Immunoglobulin M, WBC: White blood cell, H/L:Heterophil/lymphocyte

نتایج حاصل از تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر بیان ژن TNF-α، IL-6 و TGF-β در روز تفریخ و روز ٤٢ پس از تفریخ در جدول ٥ آمده است. بیان ژن TNF-α، IL-۶ و TGF-β تفاوت معنی‌داری را در گروه های آزمایشی نشان داد، به طوری‌که گروه دریافت کننده ٤٠ میلی‌گرم نانوذرات نقره بالاترین سطح بیان ژن TNF-α و TGF-β را در روز ٤٢ پس از تفریخ نشان داد ($p<0/05$). نانوذرات نقره می‌تواند با سیستم ایمنی بدن از طریق اتصال و واکنش با سلول یا پروتئین ارتباط برقرار کنند، درنتیجه در تعدیل پاسخ ایمنی موثر باشند (کلیپستن و همکاران ۲۰۱۰). نتایج این تحقیق در ارتباط با تاثیر تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر بیان ژن TNF- α و IL- ٦ با مطالعات قبلی توسط خان و همکاران(۲۰۱۳) مطابقت دارد، آنها نشان دادند که بیان ژن IL- ٦ و TNF- α تحت تاثیر نانوذرات با سایز ۱۰ نانومتر قرار نمی‌گیرد بلکه بیان ژن TNF- α و IL- ٦ تحت تاثیر نانوذرات با اندازه ٥٠ نانومتر به طور معنی‌داری در موش‌ها افزایش می‌یابد. همچنین وادالاستی و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند که بیان ژن TNF-α و NF-kB به طور قابل توجهی در گروه ٥٠ppm نانوذرات نقره در پاسخ به تنش تنظیم شده است.

Table 5. Effects of *in ovo* injection of silver nanoparticles on expression gene TNF-α, IL-6 and TGF-β of broilers in the study groups at hatching time and 42 day

	At hatching			42 day		
Treatments	**TNF-α**	**IL-6**	**TGF-β**	**TNF-α**	**IL-6**	**TGF-β**
Non-injected	1.0000^{b}±0.03	1.0000^{b}±0.02	1.0133^{b}±0.11	^{b}±0.01 1.0000	1.0033±0.06	1.0167^{c}±0.13
Saline solution	1.0133^{b}±0.05	1.0933^{b}±0.13	1.1100^{b}±0.07	1.1767^{b}±0.17	1.1000±0.13	0.9000^{c}±0.08
20 mg NS	2.3567^{a}±0.17	5.5400^{a}±0.67	3.0867^{a}±0.30	1.6631^{a}±0.17	1.2767±0.14	2.2933^{b}±0.22
40 mg NS	0.9567^{b}±0.12	3.4400^{a}±0.27	2.8233^{a}±0.33	1.7067^{a}±0.04	1.3133±0.01	4.013^{a}±0.31
P-Value	0.0001	0.0003	0.0003	0.0082	0.187	0.0001

^{a,b,c} Means within a column without a common superscript differ significantly (P<0/05).

Non-injected: without silver nanoparticles, Saline solution: phosphate buffer saline, 20 mg NS: 20 mg silver nanoparticles, 40 mg NS: 40 mg silver nanoparticles

TNF-α:Tumor necrosis factor-α, IL-6: Interleukin 6, TGF-β:Transforming growth factor beta

نتیجه‌گیری

نتایج کلی پژوهش بیانگر این است که تزریق درون تخم-مرغی ۲۰ و ٤٠ میلی‌گرم نانوذرات نقره با بهبود رشد و بالا بردن سطح بیان ژن فاکتورهای دخیل در عملکرد سیستم ایمنی موجب بهبود پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی شدند.

سپاسگزاری

از حمایت های دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که در اجرای این پروژه همکاری لازم را داشتند و همچنین شرکت نانو پارت خزر برای تهیه نانوذرات نقره در انجام طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

Ahmadi J, 2009. Aplication of different levels of silver nanopracticles in food on the performance and some blood parameters of broiler chickens. World Applied Science Journal 7: 24-27.

Alqazlan N, Alizadeh MA, Boodhoo N, Taha-Abdelaziz KH, Nagy E, Bridle B and Sharif SH, 2020. Probiotic Lactobacilli Limit Avian Influenza Virus Subtype H9N2 Replication in Chicken Cecal Tonsil Mononuclear Cells. Vaccines 8:2-14.

Andi MA, Mohsen H and Farhad A, 2011. Effects of feed type with /without nanosil on cumulative performance, relative organ weight and some blood parameters of broilers. Global Veterinaria 7: 605-609.

Bhanja SK, Anna H, Mehra M, Sawosz E, Pineda L, Vadalasetty KP, Kurantowicz N and Chwalibog A, 2015. In Ovo Administration of Silver Nanoparticles and/or Amino Acids Influence Metabolism and Immune Gene Expression in Chicken Embryos. International Journal of Molecular Sciences 16: 9484-9503.

De Jong WH, Van Der Ven LM, Sleijffers Park MVDZ, Jansen EHJM, Loveren HV and Vandebriel RJ, 2013. Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in ratsq. Biomaterials۱۲:1-11.

Erf GF, 1997. Immune system function and development in broilers. Poultry Science 8:108-115.

Goel A, Bhanja SK, Mehra M, Majumdar S and Mandal A, 2017. In ovo silver nanoparticle supplementation for improving the post-hatch immunity status of broiler chickens. Journal of Animal Nutrition 71: 384–394.

Granado M, Martin AI, Lopez Menduina M, Lopez Calderon A and Villanua MA, 2008. GH-releasing peptide-2 administration prevents liver inflammatory response in endotoxemia. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 294(1): 131-41.

Hateifi A, Zare shahne A, Ansari pirsaraie Z, Alizadeh AM, Atashnak MP, Masoudi R and Pio F, 2021. The Combined Anti-inammatory Strategy of Beta-2 Adrenergic Agonist and Glucocorticoid on the Laying Hen Model of Ovarian Cancer: the Immune Traits and Ovarian In ammatory Functions. Research Square ۲۳:1-19.

Iseri SO, Sener G, Saglam B, Ercan F, Gedik N and Yege BC, 2008. Ghrelin alleviates biliary obstruction-induced chronic hepatic injury in rats. Regulatory Peptides 146(1-3):73-9.

Jones SA, 2005. Directing transition from innate to acquired immunity, defining a role for IL-6. Immunology175: 3463–3468.

Khan AH, Abdelhalim MAK, Alhomida AS and Al-Ayed MS, 2013. Effects of Naked Gold Nanoparticles on Proinflammatory Cytokines mRNA Expression in Rat Liver and Kidney. BioMedical Research16: 1-6.

Kim S and Ryu DY, 2013. Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. Journal of Applied Toxicology 33(2):78–89. 10.1002/jat.2792.

Klippstein R, Fernandez-Montesinos R, Castillo PM, Zaderenko AP and Pozo D, 2010. Silver nanoparticles interactions with the immune system, implications for health and disease. In Silver Nanoparticles; Perez, D.P., Ed.; InTech: Croatia, Europe 16: 309–324.

Livak KJ and Schmittgen TD, 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 22DDCT Method. Methods 25: 402–408.

Pilarski R, Bednarczyk M, Lisowski A, Rutkowski Z, Bernacki M and Gulewicz k, 2005. Assessment of the effect of alpha-galactosides injected during embryogenesis on selected chicken traits. Folia Biologica 53: 13-20.

Pineda L, Chwalibog A, Sawosz E, Lauridsen C, Engberg R, Elnif J, Hotowy A, Sawosz F, Gao Y, Ali A and Sepehri Moghadam H, 2012. Effect of silver nanoparticles on growyh, performance, metabolism and microbial profile of broiler chickens. Archives of Animal Nurition 66: 416-429.

Pisoschi AM and Pop A, 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. European Journal of Medicinal Chemistry 97: 55-74.

Saki AA and Salari J, 2013. In ovo injection of nano silver, thyme and savory extracts on the 17th day of embryo and its effect on performance and blood parameters of broilers on days 14 and 21 of breeding. Journal of Animal Science Research and Construction 7:101.

Salari J, Saki AA, Abasinejad M and Manafi M, 2015. In ovo injection of nano silver, thyme and savory extracts to broiler breeders eggs and their effect on post- hatch immunological parameters. Iranian Animal Science 108:95-100.

SAS Institute Inc, 2003. SAS Procedure Guide. Version 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Selye H, 1976. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. Canadian Medical Association Journal 115: 53–56.

Shaowei Chen RS, Ingram Michael J, Hostetler JJ, Pietron RW, Murray T and Gregory Schaaff JT, 1998. Gold Nanoelectrodes of Varied Size: Transition to Molecule-Like Charging. Science, 2098-21010

Sun X, Lu X, Liao L, Zhang X, Lin X and Ma Q, 2018. Effect of in ovo zinc injection on the embryonic development and epigenetics-related indices of zinc-deprived broiler breeder eggs. Biological Trace Element Research 185(2): 456-46.

Triplett MD, Zhai W and Peebles ED, 2018. Investigating commercial in ovo tech-nology as a strategy for introducing probiotic bacteria to broiler embryos. Poultry Science 97: 658-666.

Vadalasetty KP, Lauridsen CH, Margarete Engberg R, Vadalasetty R, Kutwin M, Chwalibog M and Sawosz E, 2018. Influence of silver nanoparticles on growth and health of broiler chickens after infection with Campylobacter jejuni. BMC Veterinary Research 1-11.

Van Oosten M, Van de Bilt E, Van Berkel TJ and Kuiper J, 1998. New scavenger receptor-like receptors for the binding of lipopolysaccharide to liver endothelial and kupffer cells. Infect Immun 66(11):5107-5112.

Xiang D, Chen Q, Pang L and Zheng C, 2011. Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza a virus in vitro. Journal of Virological Methods 178: 137–142.

Xie H, Rath NC, Huff GR, Huff WE and Balog JM, 2000. Effects of Salmonella typhimurium Lipopolysaccharide on Broiler Chickens. Poultry Science 79:33–40.

Effects of *in-ovo* injection of silver nanoparticles on immune system function of broiler chickens under lipopolysaccharide induced oxidative stress

S Arabameri[1*], F Samadi[2], B Dastar[3], Z Ansari pirsaraii[4] and R Mobaseri[5]

Received: November 17, 2020 Accepted: February 9, 2022

[1] PhD Student of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran
[2] Professor, Department of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran
[3] Professor, Department of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran
[4] Associate Professor, Department of Animal Science, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran
[5] Vet, Maneger of Golestan Branch of IMI Gorgan, Iran
Corresponding author: Email: samiraarabameri@chmail.ir

پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Research
Journal of Animal Science/vol.32 No.4/ 2022/pp 85-94
https://animalscience.tabrizu.ac.ir
OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)
DOI: 10.22034/AS.2022.42711.1593

Introduction: As Selye (1976) pointed out, “stress is the nonspecific response of the body to meet any demand”, whereas stressor is defined as “an agent that produces stress at any time”. Hence, stress represents the reaction of the animal organism (i.e., a biological response) to stimuli that disturb its normal physiological equilibrium or homeostasis. Among many solutions, silver nanoparticles with antioxidant, nutrients and anti-inflammatory properties are used in many developed countries (Bhanja et al. 2015). Nanotechnology has very wide and diverse applications, yet is commonly utilized in the development of therapeutic and pharmaceutical material.

Materials and methods: A total number of 592 eggs with an average weight of 50 g were purchased from a commercial Hubbard F15 broiler breeder flock aged 50 wk. The eggs, allotted to 4 treatments of 4 replicates with 37 eggs each, were set on the same floor to provide similar incubation conditions. Treatments including 2 doses of NS (20 and 40 mg) were injected via the egg holes using 1 mL insulin syringes equipped with disposable needles (21 gauge). The control group did not receive any treatment, and the sham control was injected with 1 mL phosphate-buffered saline (Triplett et al. 2018). The injection holes were immediately covered using paraffin. At the end of 18 d incubation, the eggs were transferred to the hatching cabinet. On the 21 d incubation, the hatched chicks were taken out of the incubator and after counting (checking for hatching) and weighting, half of the chicks were sacrificed on the same day to check Hemoral immunity (G and M), white blood cell count and study of the desired genes (TNF-α, IL-6 and TGF-β). Among other chicks, those that were more uniform in weight with the desired treatment were transferred to the breeding period for 42 day in 4 treatments (treatments applied during incubation) and 4 replications with 20 broilers per replication. During 42 day, broilers were provided with ad libitum water and food. To induce oxidative stress birds were injected Salmonella lipopolysaccharide (500 µg/kg live weight) at 12, 24 and 48 hours before sacrificing (Xi et al. 2000).

Results and discussion: ovo injection of NS significantly decreased the hatchability of broiler in comparison to the control group (P<0/05). Goel et al. (Goel et al. 2017), similar to our results, reported that the hatchability of the eggs injected with nanoparticles was significantly lower than the control

group. The reason can be attributed to the smaller size of younger embryos at the 7th ED, injection method, location of injection, injection depth, injection time, genetics, hen age, egg size and hatching conditions (Sun et al. 2018; Pilarski et al. 2005). Ovo injection of 20 and 40 mg NS significantly increased carcass percentage compared to the control group at hatching and post-hatch period, respectively ($P<0.05$). Bhanja et al. and Pineda et al. (Bhanja et al 2015; Pineda et al 2012) proved that NS had positive effects on embryo weight. Due to the significant amount of antioxidant in the NS inside the egg and its antioxidant effect on energy efficiency during embryonic life, NS receiving groups had a higher body weight at hatching time. Higher birth weight makes it possible to increase feed intake and weight gain in these treatments. Upon ovo administration of 20 mg NS, spleen was increased significantly compared to the control group at hatching period ($P<0.05$). This is in line with a previous study of Goal et al. (2017), who observed higher liver and spleen weights in birds treated with 40 mg NS /kg of body weight. The development of B and T lymphocytes initiates during embryogenesis in the bursa of Fabricius and thymus, respectively, and matures in the spleen until post-hatch (Erf 1997). These organs play important roles in imparting immunity. The cells produced in these organs differentiate into cellular immunity and humoral immunity, thus imparting immunity against different pathogens. Therefore, increased liver and spleen weight indicates a better immunological health status of in ovo NS supplemented birds. Ovo treatments did not affect the concentrations of immunoglobulin (IgG), (IgM), WBC counts and H/L ratio ($P>0.05$). Our results are consistent with previous studies of Pineda et al. (2012) who showed the concentration of IgG and IgM were not affected by ovo injection of 10 and 20 mg NS/kg of …. Salari et al. and Saki and Salari (Salari et al. 2016; Saki and Salari 2015) showed that NS treated groups had higher serum IgM and IgE, and higher blood neutrophilic granulocytes. Rezaei Zarchi et al. (2012) reported that NS-supplemented diet fed rats (25, 50, 100 and 200 mg NS/kg of body weight) for 28 days had no significant effect on WBC and H/L. In comparison with the control and 40 mg NS group at hatching, there was significant up-regulation of TNF-α, IL-6 and TGF-β gene expression in 20 mg NS injected embryos. Silver nanoparticles can interact with the immune system by binding and reacting with cells or proteins, thereby modulating the immune response. In the present study, higher expression of TNF-α gene in the livers was observed in ovo injected NS embryos. These findings also support earlier studies by Khan et al. (2013), who showed the gene expression of IL-6 and TNF-α were affected by 50 nm Gold nanoparticles in the kidneys of rats. Furthermore, Vadalasetty et al. (2018) reported that expression of TNF-α and NF-kB at mRNA were significantly up-regulated in the 50 ppm NS group. The results of this study suggest that silver nanoparticles improve the immune response of broilers by improving the growth and increasing the gene expression level of the factors involved in the function of the immune system.

Keywords: Gene expression; Immune response; Broiler chickens; Silver nanoparticles