زیست‌شناسی جانوری، سال چهاردهم، شماره اول، پاییز ۱۴۰۰، صفحات ۱۱۸- ۱۰۷

مقاله پژوهشی

اثر تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر پاسخ سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی

سمیرا عرب‌عامری[1*]، فیروز صمدی[1]، بهروز دستار[1]، زربخت انصاری[2]، رضا مبصری[3]

۱-گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، گرگان، ایران

۲- گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ساری، ایران

۳-دامپزشک، مدیر نمایندگی سازمان مدیریت صنعتی گلستان، گلستان، گرگان، ایران

*مسئول مکاتبات: samiraarabameri@chmail.ir

DOI: 10.22034/ascij.2021.684781

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۴

چکیده

در این بررسی اثر تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر پاسخ سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی مورد مطالعه قرار گرفت. در این راستا ۵۶۰ عدد تخم‌مرغ در چهار گروه با چهار تکرار به صورت تصادفی تقسیم شدند. گروه‌های آزمایشی شامل:۱) کنترل مثبت (تزریق ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی)، ۲) کنترل منفی (بدون تزریق سرم فیزیولوژی)، ۳) تزریق ۲۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره و ٤) تزریق ٤۰ میلی‌گرم نانو ذرات نقره به ازای هر تخم‌مرغ بود. تزریق نانوذرات نقره و گروه کنترل در روز ۷ دوره جوجه‌کشی انجام گرفت. در انتهای دوره جوجه‌کشی، جوجه‌ها جهت بررسی درصد جوجه‌درآوری شمارش شده و پس از وزن‌کشی جهت بررسی پارامترهای سیستم ایمنی کشتار شدند. درصد جوجه‌درآوری در گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری را داشت (p < ۰/۰۵). به طوری که گروه کنترل منفی بیشترین درصد جوجه‌درآوری را نشان داد. نانوذرات نقره موجب بهبود رشد جوجه‌ها در طی دوران جوجه‌کشی شد (p < ۰/۰۵). به طوری که گروه دریافت کننده ۲۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره بیشترین وزن بدن را نشان داد. نانوذرات نقره وزن نسبی کبد و طحال را به طور معنی‌داری افزایش داد (p < ۰/۰۵). غلظت ایمونوگلوبین G (IgG)، M (IgM)، تعداد کل گلبول‌های سفید و نسبت هتروفیل به لنفوسیت تفاوت معنی‌داری را نشان نداند (p > ۰/۰۵). بیان ژن فاکتور نکروز تومور کبدی آلفا (TNF-α)، اینترلوکین٦ (IL-٦)، فاکتور رشد بتا در حال تغییر (TGF-β) و فاکتور رشد شبه انسولینی۱ (IGF-1) در گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (p < ۰/۰۵). به طوری که گروه دریافت کننده ۲۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره بالاترین سطح بیان ژن را نشان داد. به طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره سبب تقویت سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی می‌شود.

کلمات کلیدی: بیان ژن، پاسخ ایمنی، تزریق درون تخم‌مرغی، جوجه گوشتی، نانوذرات نقره

مقدمه

تزریق درون تخم‌مرغی فن‌آوری توسعه یافته‌ای است که مواد مغذی و ریزفاکتورهای لازم برای رشد و نمو جنین را قبل از جوجه‌درآوری فراهم می‌کند (۲۷). محدودیت مواد مغذی و اکسیژن در انتهای دوره جوجه‌کشی و همچنین عدم دسترسی جوجه‌ها به آب و غذا تا ٤۸ ساعت پس از تفریخ، موجب تضعیف سیستم ایمنی، کاهش جوجه‌درآوری و کاهش رشد در زمان جوجه‌کشی و دوران پرورش می‌شود. لذا تغذیه

داخل تخم‌مرغی مواد مغذی و آنتی‌اکسیدانی می‌تواند منجر به تقویت سیستم ایمنی، بهبود ظرفیت گوارش، افزایش نرخ رشد، بهبود راندمان غذایی، کاهش مرگ و میر و کاهش اختلالات اسکلتی شود (۹). نانوذرات نقره به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی و اکسیژن‌رسانی در بسیاری از کشورهای توسعه یافته مصرف می‌شوند (۵). فهرست پتانسیل کاربردهای نانوتکنولوژی بسیار گسترده و متنوع می‌باشد اما بی‌شک یکی از ارزشمندترین کاربردهای آن در زمینه توسعه موارد درمانی و دارویی است. کاربردهای جدید نانو ذرات و نانو مواد وابسته به سایز و ریخت‌شناسی و نحوه توزیع آنها است که به سرعت در حال توسعه است. به عنوان نمونه نانوتکنولوژی در زمینه‌هایی چون حفظ سلامت، اکسیژن‌رسانی و تغذیه، انتقال ژن و دارو، پزشکی و غیره در حال پیشرفت است. نانوذارت فلزی می‌توانند به تک رشته‌های DNA بدون آسیب زدن به آن متصل شوند. این خواص پنجره جدیدی را به روی تحقیقات درمانی باز می‌کند. نانوذارت می‌توانند از عروق خونی عبور کنند (۱۳). در بین مواد غیرآلی، اکسیدهای فلزی همانند TiO، ZnO_2، MgO ، CaO و Ag به خاطر اینکه نه تنها در شرایط سخت پایدار هستند بلکه عموماً به عنوان مواد بی خطر برای انسان و حیوانات خوانده می‌شوند، بیشتر مورد توجه هستند. همچنین نانوذرات نقره می‌توانند با سیستم - ایمنی بدن از طریق اتصال و واکنش با سلول یا پروتئین ارتباط برقرار کرده، درنتیجه در تعدیل پاسخ ایمنی که یکی از روش‌های تقویت سیستم ایمنیست موثر باشند (۱۲). مشخص شده است که تزریق مکمل‌های غذایی به داخل تخم‌مرغ پرندگان باعث بهبود نرخ جوجه‌درآوری، کاهش نرخ مرگ و میر، کوتاه شدن طول مدت پرورش، سرعت رشد بالا و افزایش وزن در پایان دوره پرورش می‌شود (۲۵). بانجا و همکاران گزارش کردند تزریق درون تخم-مرغی نانوذرات نقره می‌تواند بر افزایش وزن جنینی موثر باشد(۵). Goel و همکاران بیان کردند بیشترین وزن طحال و بورس مربوط به گروه دریافت‌کننده نانوذرات نقره در زمان جنینی بود(۹). Saki و Salari گزارش کردند بیشترین سطح IgA، IgM و IgG در گروه ۷۵ میلی‌گرم نانوذرات نقره نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی بود (۲٤). همچنین Bhanja و همکاران اذعان داشتند بیان ژن IL- ٦ و TNF- α در گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرات نقره، سیستئین یا ترکیب آنها افزایش معنی‌داری را نشان داد (۵). با توجه به اثرات مفید نانوذرات نقره بر 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 و رشد جوجه‌های گوشتی انجام شد.

مواد و روش

دراین مطالعه، از ٥٦٠ عدد تخم‌مرغ سویه هووبارد در ٤ گروه با ٤ تکرار و ۳۵ نمونه در هر تکرار استفاده شد. گروه‌های آزمایشی شامل:۱) کنترل مثبت (تزریق ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد به ازای هر تخم‌مرغ)، ۲) کنترل منفی (بدون تزریق سرم فیزیولوژی)، ۳) تزریق۲۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره و ٤) تزریق ٤٠ 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 (۹). سپس تخم‌مرغ‌ها (میانگین وزنی ۵۰ گرم) در دستگاه جوجه‌کشی (پیترسام، بلژیک) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۵ درصد قرار داده شدند. پس

از تزریق، محل تزریق با پارافین بسته شد. در روز ۲۱ جنینی، جوجه‌های تفریخ شده از دستگاه خارج و پس از شمارش (بررسی درصد جوجه‌درآوری) و وزن-کشی، جهت بررسی فاکتورهای سیستم ایمنی و متابولیکی قربانی شدند.

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 درصد) و آب با خلوص بالا تولید شده بود، تهیه شد. غلظت نانو ذرات در هیدروکلوئید نانونقره ppm ۵۰ بود.

بررسی درصد جوجه‌درآوری: درصد جوجه-درآوری= تعداد جوجه × ۱۰۰ تقسیم بر تعداد تخم-های نطفه‌دار

اندازه‌گیری وزن لاشه، اندام‌های داخلی، کبد و طحال: دو جوجه به طور تصادفی از هر واحد آزمایشی انتخاب، پس از وزن‌کشی کشتار شده، سپس وزن لاشه، 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 ایمونوگلوبین‌ها: دو جوجه 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 کیت تجاری پارس آزمون و روش الایزا اندازه‌گیری شد.

شمارش تعداد گلبول های سفید و نسبت هتروفیل به لنفوسیت: دو جوجه به طور تصادفی از هر واحد آزمایشی انتخاب شد. خون از قلب آنها گرفته شده وجهت جلوگیری از انعقاد نمونه های خون، آنها را در لوله های حاوی EDTA ریخته، سپس به کمک متانول ۹۹/۵ درصد در لام ثابت شد. سپس لکه های خون با رنگ آمیزی گیمسا رقیق شده و در آب پوشانده شد. پس از ۵۰ دقیقه، اسلایدها شسته شدند و با بزرگنمایی ۱۰۰، شمارش گلبول سفید انجام شد.

بررسی بیان ژن: جهت بررسی بیان ژن TNF-α، ٦ IL-، TGF-β و IGF-1 از هر تیمار سه جوجه به طور تصادفی انتخاب و کشتار شدند. برای استخراج RNA قطعه‌های کوچکی از بافت کبد هر جوجه توسط تیغ سترون (استریل) شده جدا شد و به‌سرعت درون تانک نیتروژن قرار داده شد. استخراج RNA کل از ۱۰۰میلی‌گرم بافت کبد و بنا بر دستورکار کیت استخراج شرکت یکتا تجهیز صورت گرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه طیف سنج نوری (اسپکتروفتومتر) 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 ریزلوله‌های (میکروتیوپ) حاوی مسترمیکس اضافه شد و درنهایت حجم نهایی مواد افزوده‌شده به ریزلوله‌ها توسط آب Free RNase به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از تهیه مخلوط کامل، ساخت cDNA در شرایط دمای ۱۵ درجه سلسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ٦۰ دقیقه و دمای ۹۰ درجه سلسیوس برای پنج دقیقه قرار گرفت. پس از ساخت، cDNA در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. همچنین کیفیت cDNA ساخت شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. برای بررسی بیان ژن هدف و مرجع از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد که ویژگی‌های آنها در جدول ۱ آمده است (۱۱، ۲). در روش تعیین کمی بیان ژن تصحیح تغییر آزمایشی ضروری است. برای این

منظور، از یک ژن کنترل داخلی، Actin β استفاده شد. برای سنجش بیان ژن از روش RT_ PCR استفاده گردید و شرکت کیت یکتا تجهیز مورد استفاده قرار گرفت. برای هر نمونه در هر تیوپ ٤ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر رفت با غلظت ۵ پیکومول، ۱ میکرولیتر cDNA ساخت شده و ۳ میکرولیتر آب Free DNase اضافه شد که در کل حجم نهایی هرریزلوله به ۱۰میکرولیتر رسید. برای هر نمونه نیز سه ریزلوله به منظور سه تکرار در نظر گرفته شد. برنامه گرمایی استفاده شده در واکنش Time Real PCR برای ژن‌های Actin-β و تریپسین شامل دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و ۳۱ ثانیه در دمای ٦۰ درجه سلسیوس با ٤۰ چرخه و در مرحله جداسازی نهایی در شرایط دمایی ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه و دمای ٦۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، دمای۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه و ٦۰ 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. داده های به دست آمده با روش لیواک واکاوی اولیه شد (۱۸).

روش آماری، روش تجزیه و تحلیل: پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد. تجزیه آماری داده-ها توسط نرم افزار SAS و با استفاده از رویه GLM انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح ۵ درصد انجام پذیرفت. Yij =μ+Ti+ eij که Yikj = مقدار هر مشاهده از فراسنجه مورد اندازه‌گیری، μ= میانگین کل، ai = اثرات عامل اول(تیمارهای تزریقی)، eijk = اثرخطای‌آزمایشی

جدول ۱: توالی اولیگونوکلئوتیدی آغازگرهای ژنی مربوط به سیستم ایمنی و رشد بدن

نام ژن	توالی آغازگر	شماره دسترسی	اندازه محصول
IL-6	CAACCTCAACCTgCCCAA ggAgAgCTTCCTCAggCATT	AB559572	۸۵
TNF-α	TgTgTATgTgCAgCAACCCgTAgT ggCATTgCAATTTggACAgAAgT	AY765397	۱۷۱
TGF-β	CggCCgACgATgAgTggCTC CggggCCCATCTCACAgggA	JQ423909	۱۲۰
IGF-I	GGTGCTGAGCTGGTTGATGC CGTACAGAGCGTGCAGATTTAGGT	JN942578	۹٦
β-actin	CATCACCATTggCAATgAgAgg gCAAgCAggAgTACgATgAATC	L08165	۳۵۳

نتایج

درصد جوجه‌درآوری، وزن نسبی لاشه، اندام‌های داخلی، کبد و طحال: نتایج حاصل از تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر درصد جوجه‌درآوری، وزن نسبی لاشه، اندام‌های داخلی، کبد و طحال در جدول ۲ گزارش شده است. درصد جوجه‌درآوری در گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p < ۰/۰۵$). به طوری که گروه دریافت کننده کنترل منفی و گروه‌های دریافت کننده ٤۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره به ترتیب بیشترین و کمترین درصد جوجه‌درآوری را نشان دادند. وزن نسبی لاشه، اندام‌های داخلی، کبد و طحال

در گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p < ۰/۰۵$). به طوری که گروه دریافت کننده ۲۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره بیشترین وزن نسبی لاشه، سینه، ران، کبد و طحال را نشان داد ($p < ۰/۰۵$).

پاسخ ایمنی هومورال و سلولی: نتایج حاصل از تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر غلظت ایمونوگلوبین G، M، تعداد گلبول‌های سفید و نسبت هتروفیل به لنفوسیت در جدول ۳ گزارش شده است. غلظت ایمونوگلوبین G، M، تعداد گلبول‌های سفید و نسبت هتروفیل به لنفوسیت تفاوت معنی‌داری را در گروه‌های آزمایشی نشان نداد ($p > ۰/۰۵$). **بیان ژن:** نتایج حاصل از تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر بیان ژن TNF-α، IL-6 ، TGF-β و IGF-1 در شکل ۱، ۲، ۳ و ٤ گزارش شده است. بیان ژن TNF-α، IL-۶ ، TGF-β و IGF-1 تفاوت معنی‌داری را در گروه‌های آزمایشی نشان داد ($p < ۰/۰۵$). به طوری‌که گروه دریافت کننده ۲۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره بالاترین سطح بیان ژن TNF-α، IL-۶ ، TGF-β و IGF-1 را نشان داد.

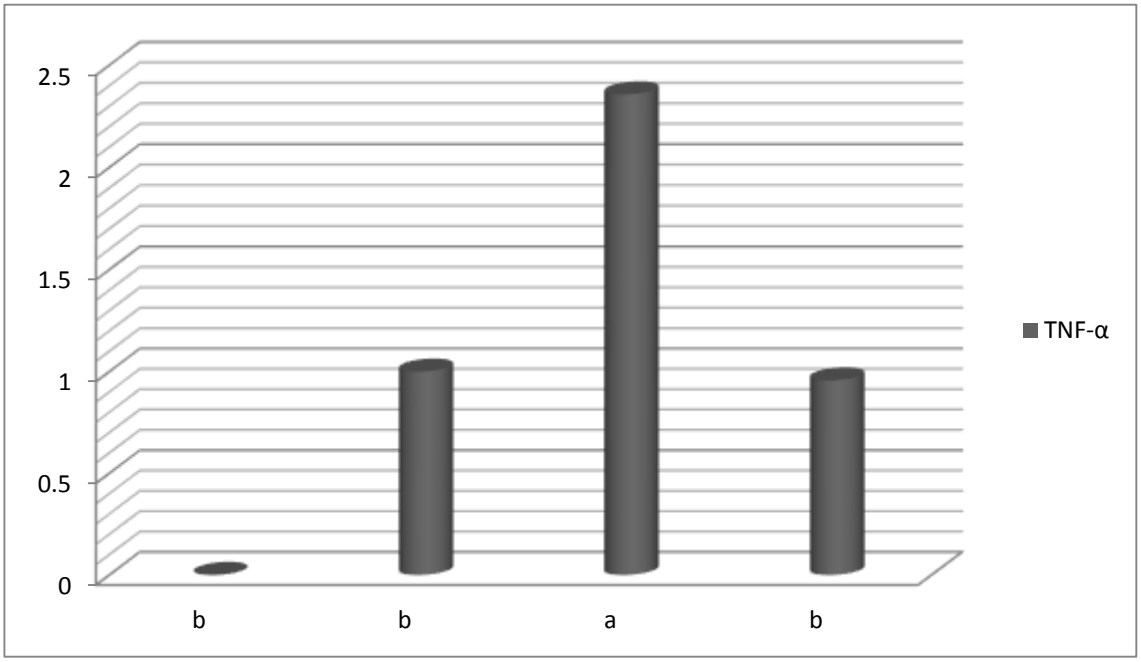
جدول ۲: اثر تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر درصد جوجه‌درآوری، لاشه،اندام‌های داخلی، کبد و طحال جوجه‌های گوشتی

تیمارها	هچ (درصد)	لاشه (درصد)	سینه (درصد)	ران (درصد)	کبد (درصد)	طحال (درصد)
کنترل مثبت	۷۵ ^{d}	۳۷/۱۲۵ ^{ab}	۸/۱۲۳ ^{ac}	۵/۹۷۵ ^{ab}	۲/۱۸۷ ^{b}	۰/۰٦٦۲ ^{ab}
کنترل منفی	۹۰ ^{a}	۳٦/۷۵ ^{b}	۸/۰۹٦ ^{c}	۵/۹۳۷ ^{c}	۲/۱۸۳ ^{b}	۰/۰٦٦۱ ^{b}
۲۰ میلی‌گرم نانوذرات	۸۵ ^{b}	۳۸/۱۲۵^{a}	۸/۲۱۲^{a}	٦/۰۱۰ ^{a}	۲/۲۰۵ ^{a}	۰/۰٦٦۷^{a}
٤۰ میلی‌گرم نانوذرات	۸۱ ^{c}	۳۸/۰۰ ^{ab}	۸/۱۹۰ ^{ab}	۵/۹۷۷ ^{ab}	۲/۲۰۰ ^{ab}	۰/۰٦٦۳ ^{ab}
خطای استاندارد میانگین	۰.۰۰۸	۰.۱۹۵	۰.۰۱۱	۰.۰۰۸	۰.۰۰۲	۰.۰۰۰۲
P-Value	۰.۰۰۲۵	۰.۰۲۳۷	۰.۰۰۰۲	۰.۰۰۲۵	۰.۰۰٥٤	۰.۰۱۲۱

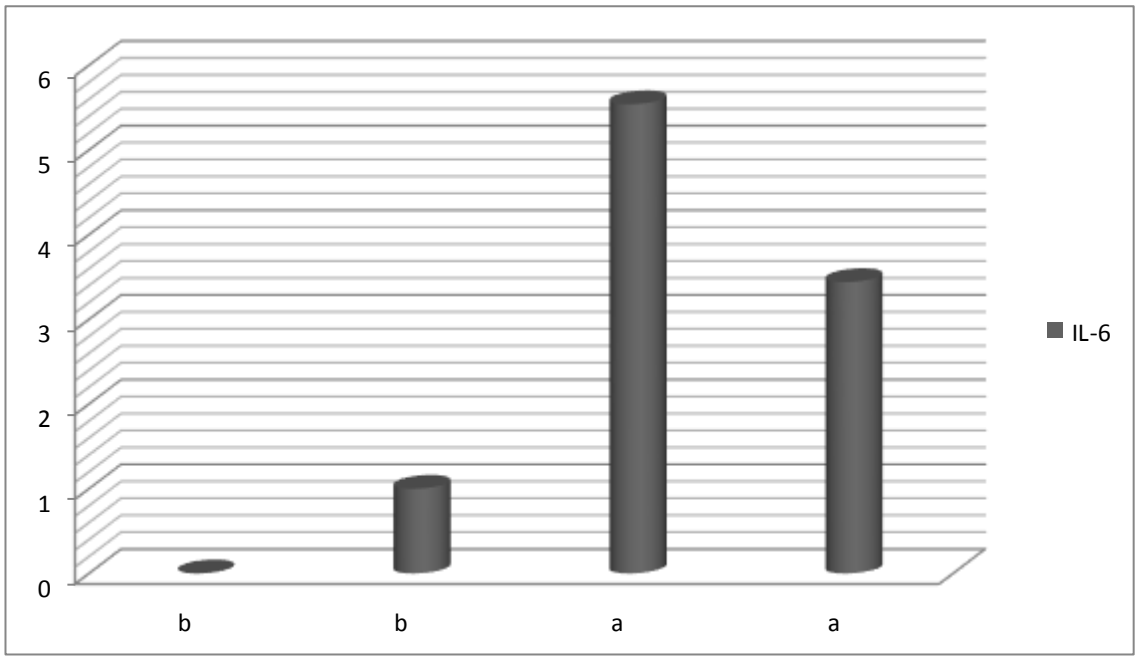
^{a,b,c,d} در هر ستون، میانگین‌های فاقد حروف مشابه به لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار دارند ($p < ۰/۰۵$).

جدول۳: اثر تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر پاسخ ایمنی هومورال و سلولی جوجه‌های گوشتی

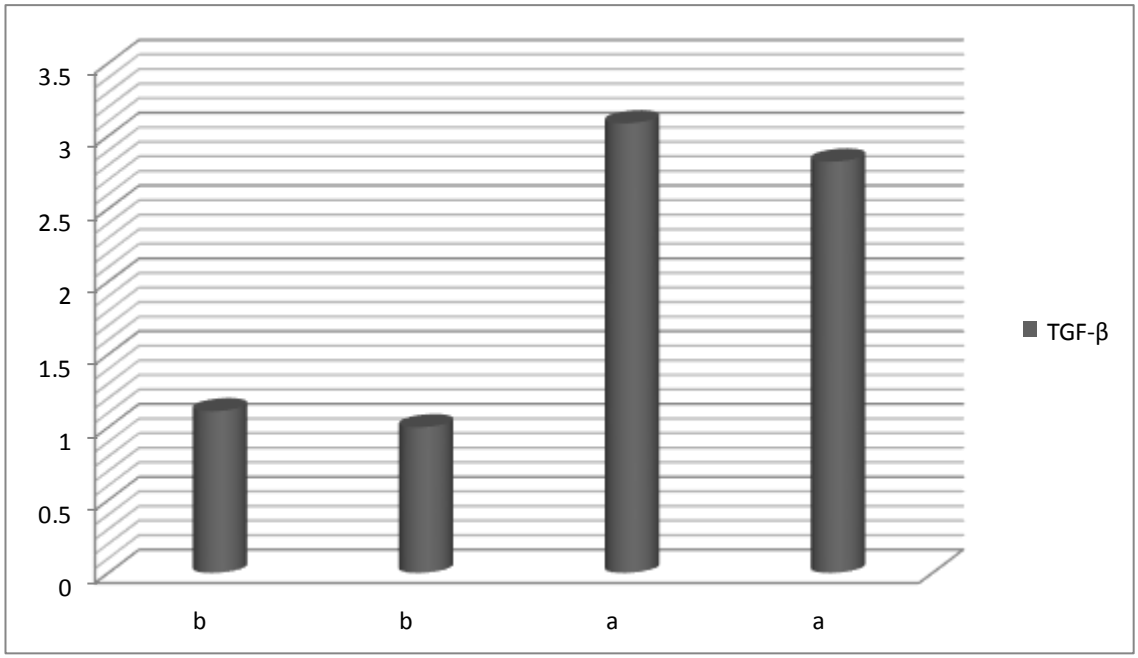
تیمارها	IGG	IGM	WBC	H/L
کنترل مثبت	۳٤۵/۱۲۵	۱۱۱/۷۵۰	۲۲۹۲۲/۲۰۰	۰/٤۱۳
کنترل منفی	۳٤٤/۳۷۵	۱۱۰/۸۷۵	۲۲۹۲۰/۲۵۰	۰/٤۰٦
۲۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره	۳٤۵/۷۵۰	۱۱۱/۹۲۵	۲۲۹۳۰/۵۰۰	۰/٤۱۷
٤۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره	۳٤۵/۵۰۰	۱۱۱/۸۷۵	۲۲۹۳۰/۲۵۰	۰/٤۱٦
خطای استاندارد میانگین	۰/۲٦۳	۰/۲۹۵	۰/۳٦۵	۰/۰۰۱
P-Value	۰/۲٦۸	۰/۰۵۳	۰/۰۸٤	۰/۱۲۳



شکل ۱- اثر تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر بیان ژن TNF-α در جوجه‌های گوشتی. ۱/۰۱۳۳(کنترل مثبت)، ۱/۰۰۰۰ (کنترل منفی)، ۲/۳۵٦۷ (۲۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره)، ۰/۹۵٦۷ (۴۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره). [a,b] حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.



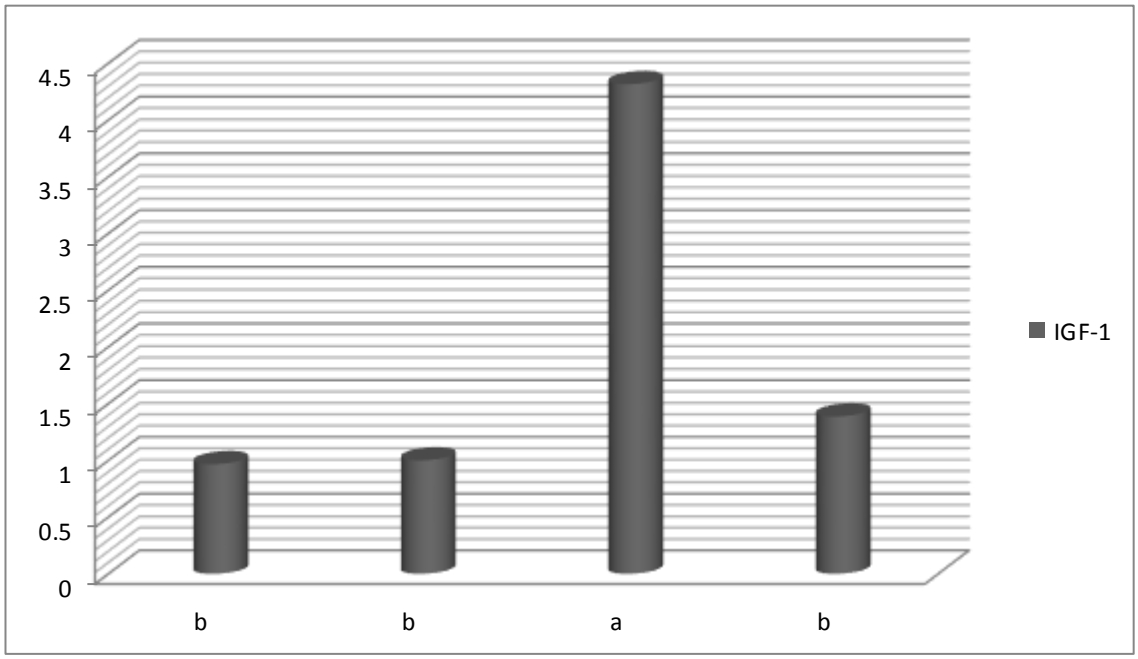
شکل ۲- اثر تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر بیان ژن IL-6 در جوجه‌های گوشتی
۱/۰۹۳۳(کنترل مثبت)، ۱/۰۰۰۰ (کنترل منفی)، ۵/۵٤۰۰ (۲۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره)، ۳/٤٤۰۰ (۴۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره)
[a,b] حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۳- اثر تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر بیان ژن TGF-β در جوجه‌های گوشتی

۱/۱۱۰۰(کنترل مثبت)، ۱/۰۰۰۰ (کنترل منفی)، ۳/۰۸۶۷ (۲۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره)، ۲/۸۲۳۳ (۴۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره)

[a,b] حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.



شکل ٤- اثر تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر بیان ژن IGF-1 در جوجه‌های گوشتی

۰/۹٦٦۷(کنترل مثبت)، ۱/۰۰۰۰ (کنترل منفی)، ٤/۳۱٦۷ (۲۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره)، ۱/۳۸٦۷ (٤۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره)

[a,b] حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره موجب کاهش درصد جوجه‌درآوری می‌شود و گروه کنترل منفی بیشترین درصد جوجه-درآوری را در میان گروه‌های آزمایشی نشان داد. در راستای نتایج حاضرBakhshaiesh و همکاران بیان کردند تزریق درون تخم‌مرغی۱۵، ۳۰، ٦۰ و۱۲۰ قسمت در میلیون نانوذرات اکسید روی، موجب کاهش معنی‌دار درصد جوجه‌درآوری می‌شود (٤). همچنین Goel و همکاران اذعان داشتند در میان گروه‌های دریافت‌کننده ۱۲،۲۵ و۵۰ میکروگرم نانوذرات نقره، گروه دریافت کننده کنترل بیشترین درصد جوجه-درآوری را نشان داد (۹). Shafey و همکاران گزارش کردند در بین گروه‌های آزمایشی بیشترین درصد جوجه‌درآوری مربوط به گروه دریافت کننده کنترل بود (۲۸). در مقابل Hu و همکاران اذعان داشتند تزریق درون تخم‌مرغی بتایین تاثیری بر درصد جوجه‌درآوری ندارد (۱۲). عدم تطابق نتایج مطالعه حاضر با سایر گزارشات می‌تواند ناشی از ژنتیک، سن مرغ مادر، اندازه تخم‌مرغ، شرایط جوجه‌کشی، ترکیبات تزریقی، شیوه تزریق، مکان تزریق، عمق تزریق و زمان تزریق باشد (۱٤، ۱۹، ۲٤، ۳۰).

نتایج مشاهده شده در این تحقیق نشان داد که استفاده از نانوذرات نقره، تاثیر معنی‌داری بر خصوصیات عملکردی جوجه‌های گوشتی از جمله خوراک مصرفی و وزن بدن دارد. در راستای نتایج حاضر Ghodrat و همکاران اثر استفاده از نانوذرات نقره و پروبیوتیک در جوجه‌های گوشتی را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که وزن زنده و ضریب تبدیل غذایی در گروه مصرف کننده توام نانوذرات نقره و پروبیوتیک داراری بهترین عملکرد است و پس از آن گروه دریافت‌کننده نانوذرات نقره بیشترین عملکرد را نشان داد (۸). در گزارش Andi و همکاران مشخص گردید وجود نانوذرات نقره باعث بهبود وزن‌گیری، خوراک مصرفی و ضریب تبدیل خوراک می‌شود (۳). همچنین Sawosz و همکاران نشان دادند استفاده از ۲۵ میلی-گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره به آب آشامیدنی بلدرچین، باعث افزایش جمعیت باکتری‌های گرم مثبت از قبیل لاکتوباسیلوس، لوکونوستوک لاکتیک و اکتینومایسس نائسلوندی در سکوم می‌شود (۲۳). وظیفه اصلی فلور میکروبی فعالیت متابولیک است که منجر به حفظ انرژی و مواد غذایی قابل جذب می‌شود و از این طریق بهبود فلور میکروبی به طور مستقیم روی خصوصیات عملکردی حیوان تاثیرگذار است (۲۷). افزایش وزن لاشه و اندام‌های داخلی در گروه-های دریافت کننده نانوذرات نقره 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 دریافت-کننده نانوذرات نقره شده است. همچنین وزن بالاتر هنگام تولد سبب افزایش مصرف خوراک و افزایش وزن در دوران پرورش می‌گردد (۱۳).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد بیشترین وزن کبد و طحال مربوط به گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرات نقره در زمان جنینی بود. در راستای نتایج حاضر Ahmadi و همکاران گزارش کردند که استفاده از ٤، ۸ و ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره در جیره جوجه‌های گوشتی در دوره آغازین باعث افزایش معنی‌دار وزن کبد می‌شود در حالی که تاثیر معنی‌داری بر وزن قلب، سنگدان، پانکراس و چربی حفره بطنی ندارد (۱). Zargaran Isfahani و همکاران گزارش کردند استفاده از ۸۰۰ میلی‌لیتر محلول ppm ۲۰۰۰ نانوذرات نقره در جیره و آب آشامیدنی وزن نسبی کل دستگاه گوارش و کبد را افزایش و چربی احشایی را به طور معنی‌داری کاهش داد (۳۳). همچنین Felehgari و همکاران نیز

مشاهده کردند که با استفاده از ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره، وزن کبد در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت (۷). با توجه به اینکه محور هیپوتالاموس هیپوفیز آدرنال یک سیستم کنترل مرکزی است که در همراهی سیستم عصبی و هورمونی در تنظیم شرایط فیزیکی و شیمیایی ارگانیسم بدن نقش داشته و باعث افزایش سازش پذیری جانور با شرایط تنش و طبیعی ماندن عملکردهای فیزیولوژیک بدن می‌گردد (٦).

در شرایط استرس از هیپوتالاموس، هورمون آزادکننده-ی کورتیکوتروفیک (CRH) ترشح می‌گردد که از طریق افزایش ترشح هورمون آدرنوکورتیکوتروفیک، باعث تحریک ترشح گلوکوکورتیکوئیدها از بخش قشری غدد آدرنال می‌شود. در انسان کورتیزول و در طیور و موش کورتیکوسترون، مهمترین هورمونها از این دسته می‌باشند (۲۹). در بدن میزان گلوکوکورتیکوئیدها در خون توسط چندین مکانیسم فیدبک منفی تنظیم می-گردد. تنش‌ها و استرس‌های مختلف روانی، فیزیکی، فارماکولوژیکی و غیره، ترشح هورمون کورتیزول را افزایش می‌دهند (۲۲). کورتیزول با متابولیزه کردن سریع آمینواسیدها و چربی‌ها برای آزادسازی انرژی جهت مصارف سلولی نقش مهمی را در سازمان دهی و مدیریت بدن در پاسخ به استرس‌های مختلف بازی می‌کند (١٦،١٥). تنش آثار مخرب زیادی همچون کاهش مصرف خوراک، کاهش وزن‌گیری، کاهش رشد اندام‌های لنفاوی و کاهش عملکرد سیستم ایمنی و کیفیت گوشت می‌شود. افزایش وزن اندام‌های لنفاوی در تحقیق حاضر می‌تواند به دلیل اثر نانوذرات نقره بر کاهش ترشح هورمون کورتیکوسترون و تاثیر آن بر افزایش وزن بدن و به دنبال آن افزایش وزن اندام‌های لنفاوی باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد اگرچه غلظت ایمونوگلوبین‌ها در گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد اما بیشترین غلظت ایمونوگلوبین‌ها مربوط به گروه دریافت‌کننده ۲۰ میلی-گرم نانوذرات نقره بود. در راستای نتایج حاضر Pineda و همکاران نشان دادند غلظت IgG و IgM تحت تأثیر تزریق درون تخم‌مرغی ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم نانونقره قرار نگرفته است (۲۱). ساکیو سالاری گزارش کردند نانوذرات نقره میزان IgG، IgM و گرانولوسیت‌های نوتروفیل خون را افزایش داد (٢٤). همچنین Li و همکاران به این نتیجه رسیدند که تغذیه نانوذرات اکسید روی می‌تواند سطح سنتز ایمونوگلوبین‌ها را در خوکچه هندی افزایش دهد (۱۷). همچنین Ognik و همکاران گزارش کردند تغذیه جوجه‌ها با نانو ذرات مس موجب افزایش IgM، IgG و IgA می‌شود (۲۰).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد اگرچه تعداد گلبول‌های سفید و نسبت هتروفیل به لنفوسیت در گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد اما بیشترین تعداد گلبول‌های سفید و نسبت هتروفیل به لنفوسیت مربوط به گروه دریافت کننده ۲۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره بود. در راستای نتایج حاضر رضایی زرچی و همکاران گزارش کردند تغذیه موش‌ها به مدت ۲۸ روز در دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات نقره تاثیر معنی‌داری بر تعداد گلبول‌های سفید و نسبت هتروفیل به لنفوسیت نداشت (۲۳). حافظ و همکاران بیان کردند تغذیه جوجه‌های گوشتی با ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانواکسید روی شمار لنفوسیت‌های خون را افزایش داده و دفاع آنتی-اکسیدانی و ایمنی سلولی را بهبود می‌بخشد (۱۰). تفاوت در نتایج تحقیقات مختلف ممکن است به دلیل تفاوت در روش تزریق، محل تزریق، عمق تزریق، زمان تزریق، ژنتیک، سن مرغ مادر، اندازه تخم و شرایط جوجه‌کشی باشد.

نتایج این تحقیق در ارتباط با تاثیر تزریق درون تخم-مرغی نانوذرات نقره بر بیان ژن TGF-، IL-٦، TNF-α

β و IGF-1 نشان داد نانوذرات نقره سبب افزایش بیان ژن TNF-α، IL-٦، TGF-β و IGF-1 می‌شود. در راستای نتایج حاضر Khan و همکاران گزارش کردند 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 ۵۰ نانومتر به طور معنی-داری در موش‌ها افزایش می‌یابد (١٤). همچنین Vadalasty و همکاران بیان کردند که بیان ژن TNF-α و NF-kB به طور قابل توجهی در گروه ppm ۵۰ نانوذرات نقره در پاسخ به تنش تنظیم شده است (۳۲). بانجا و همکاران گزارش کردند بیان ژن IL- ٦ ، TNF-α و IGF-1 در گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرات نقره، سیستئین یا ترکیب آنها افزایش معنی‌داری را نشان داد (۵). افزایش بیان ژن TNF-α ، IL-٦ ، TGF-β و IGF-1 می‌تواند به دلیل آن باشد که نانوذرات نقره با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و توانایی نفوذ به ژن، سلول و بافت‌های بدن، در تقویت سیستم ایمنی و رشد موثر باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش نشان داد که تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره سبب کاهش درصد جوجه‌درآوری می-شود اما با بهبود رشد و بالا بردن سطح بیان ژن فاکتورهای ایمنی و رشد موجب بهبود پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی می‌شود.

منابع

1. Ahmadi F., Mohammdami Khah M., Javid S., Zarneshan A., Akradi L., Salehifar P. 2013. The effect of silver nanoparticles on performance, immune organs, and lipid serum of broiler chickens during starter period. *International Journal of Biosciences*, 3: 95-100.

2. Alqazlan N., Alizadeh M.A., Boodhoo N., Taha-Abdelaziz K.H., Nagy E., Bridle B., Sharif S.H. 2020. Probiotic Lactobacilli Limit Avian Influenza Virus Subtype H9N2 Replication in Chicken Cecal Tonsil Mononuclear Cells. *Vaccines*, 8:2-14.

3. Andi M.A., Mohsen H., 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.

4. Bakhshaiesh S., Seif Davati C., Seifzadeh D., Mirzaei Aqjeh Gheshlagh F., Abdi Benmar H., Vahedi V. 2019. The effect of intra-egg injection of zinc oxide nanoparticles on chick hatching percentage, growth performance and carcass characteristics of broilers Ross strain 308. *Livestock production research*, 21. (In Persian).

5. Bhanja S.K., Anna H., Mehra M., Sawosz E., Pineda L., Vadalasetty K.P., Kurantowicz N., Chwalibog A., 2015. In Ovo Administration of Silver Nanoparticles and/or Amino Acids Influence Metabolism and Immune Gene Expression in Chicken Embryos. *Journal of Interdisciplinary Nanomedicin*e, 16: 9484-9503.

6. Brigitte M.K., Clemens K. 2005. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review Biological. *Psychology*. 69: 113–132.

7. Felehgari K., Ahmadi F., Rokhzadi A., Hafsy Kurdestany A., Mohammadi Khah M. 2013. The effect of dietary silver nanoparticles and inorganic selenium supplementation on performance and digestive organs of broilers during starter period. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 2: 104-108.

8. Ghodrat A., Salehi M. 2009. Investigation of the effect of feeding silver nanoparticles and probiotics and their interaction on the performance of broilers. *Journal Animal Science Research*, 4: 11-17.

9. Goel A., Bhanja S.K., Mehra M., Majumdar S., Mandal A. 2017. In ovo silver nanoparticle supplementation for improving

18. Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 22DDCT Method. *Methods*, 25: 402–408.

19. Mosmann T.R., Coffman R.L. 1989. TH1 and TH2 cells, different patterns of cytokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, 7: 145–173.

20. Ognik K., Sembratowicz I., Cholewinska E., Jankowski J., Kozlowski K., Juskiewicz J., Zdunczyk Z. 2017. The effect of administration of copper nanoparticles to chickens in their drinking water on the immune and antioxidant status of the blood. *Animal Science*, 23:112-119.

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

22. Putman P., Hermans E.J., Van Honk J. 2010. Cortisol administration acutely reduces threat-selective spatial attention in healthy young men. *Physiology and Behavior*, 99(3): 294-300.

23. Rezaei Zarchi S., Taghavi Foumani M.H., Razavi Shashdeh S.A., Negahdari M. 2012. Effect of silver nanoparticles on blood cells in male rats. *Blood Research*, 10: 147-153. (In Persian).

24. Saki A., Salari J. 2013. Intra-egg injection of silver nanoparticles and thyme and savory extracts on the seventeenth day of embryo and its effect on performance and blood parameters of broilers on days 14 and 21 of rearing. *Journal of Animal Science Research*, 101. (In Persian).

25. Salmanzadeh M., Ebrahimnezhad Y., Shahryar H.A., Ghaleh-Kandi J.G. 2016. The effects of in ovo feeding of glutamine in broiler breeder eggs on hatchability, development of the gastrointestinal tract, growth performance and carcass the post-hatch immunity status of broiler chickens. *Animal Nutaure*, 71: 384–394.

10. Hafez A., Nassef E., Fahmy M., Elsabagh M., Bakr A., Hegazi E. 2019. Impact of dietary nano-zinc oxide on immune response and antioxidant defense of broiler chickens. *Environmental Science Research*, 4: 15-22.

11. Hateifi A., Zare shahne A., Ansari pirsaraie Z., Alizadeh A.M., Atashnak M.P., Masoudi R., 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*, 1-19.

12. Hu Y.Q., Sun X., Li M., Wang D., Cai X., Zhao R. 2015. In Ovo injection of betaine affects hepatic cholesterol metabolism through epigenetic gene regulation in newly hatched chicks. *PLOS*, 10: 1-13.

13. Jochemsen P., Jeurissen S.H.M. 2002. The localization and uptake of in ovo injected soluble and particulate substances in the chicken. *Poultry Science*, 81:1811-1817.

14. Khan A.H., Abdelhalim M.A.K., Alhomida A.S., Al-Ayed M.S. 2013. Effects of Naked Gold Nanoparticles on Proinflammatory Cytokines mRNA Expression in Rat Liver and Kidney. *BioMed Research*, 1-6.

15. Klasen H.J. 2000. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns Journal Science*, 26: (2), 131-138

16. Levine A., Zagoory-Sharon O., Feldman R., Lewis J.G., Weller A. 2007. Measuring cortisol in human psychobiological studies. *Physiology and Behavior*. 90(1): 43-53.

17. Li X., Xie J., Liao L., Jiang X., Fu H. 2017. UV-curable polyurethane acrylate–Ag/TiO2 nanocomposites with superior UV light antibacterial activity.*International Journal of Polymeric Materials and Polymeric*, 66: 835-843.

30. Sun X., Lu X., Liao L., Zhang X., Lin X., 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.

31. Uni Z., Ferket P.R., Tako E., Kedar O., 2005. In Ovo Feeding Improves Energy Status of Late-Term Chicken Embryos. *Poultry Science*, 84:764-770.

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

33. Zargaran Isfahani H., Sharifi S., Brin A., Afzalzadeh A. 2010. The effect of silver nanoparticles on the performance and carcass characteristics of broilers. *Iran Journal Animal Science*, 41: 143-137. (In Persian).

characteristics of broiler chickens. *Archives Animal Breeding*, 59: 235–242.

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

27. Sawosz E., Binek M., Grodzik M., Zielińska M., Sysa P., Szmidt M., Niemiec T., Chwalibog A. 2007. Influence of hydrocolloidal silver nanoparticles on gastrointestinal microflora and morphology of enterocytes of quails. *Archives of Animal Nutrition*, 61: 444-451.

28. Shafey T.M., Alodan M.A., Al-Ruqaie I.M., Abouheif M.A., 2012. In ovo feeding of carbohydrates and incubated at a high incubation temperature on hatchability and glycogen status of chicks. *African Journal Animal Science*, 42: 210–220.

29. Tsigos C., Chrousos G.P., 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research.* 53: 865–871.