14(2) 139-146, Summer 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Effect of silver nanoparticles in ovo injection on immune system function and some blood parameters in broiler chickens under oxidative stress induced by lipopolysaccharide

Samira Arabameri [1*], Firoz Samadi [1], Behrooz Dastar [1], Zarbakht Ansari pirsaraii [2], Reza Mobaseri [3]

[1]Department of Animal and Poultry Nutrition, Faculty of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[2] Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
[3] Industrial Management Training Institute, Golestan branch, Industrial Management Organization, Gorgan, Iran

Key Words

Gene expression
Immune response
Ovo injection
Chicken
Blood parameters
Silver nanoparticles

Abstract

Introduction: To study the effect of in ovo injection of silver nanoparticles on immune system function and some blood parameters in broiler chickens under oxidative stress condition.

Materials & Methods: 560 Fertile eggs allocated to 4 treatments with 4 replicates of 35 eggs in each. Experimental treatments included: 1) positive control (injection of 1 mL of physiological serum), 2) negative control (no injection of physiological serum), 3) injection of 20 mg nanoparticles of silver per egg and 4) injection of 40 mg nanoparticles of silver per egg. The injection was performed on day 7 of incubation. For oxidative stress, birds received 500 micrograms of lipopolysaccharide per kilogram of body weight at three times (12, 24, and 48 h before slaughter), through intraperitoneal injection.

Results: The results showed that silver nanoparticles improved the weight of chickens during breeding ($p<0.05$). Silver nanoparticles have significantly increased the weight of lymphatic organs ($p<0.05$). The group receiving 40 mg of silver nanoparticles showed the highest weight of lymphatic organs. Blood cholesterol in experimental treatments showed a significant difference ($p<0.05$). Negative control treatment showed the highest level of blood cholesterol compere to positive control and silver nanoparticles ($p<0.05$). TNF-α and TGF-β showed a significant difference experimental treatments so that the group receiving 40 mg of silver nanoparticles showed the highest level of gene expression ($p<0.05$).

Conclusion: From this study, it is clear that silver nanoparticles improve the immune response of broilers by improving weight, lowering cholesterol and increasing the level of expression of immune and growth factor genes.

* Corresponding Author's email: samiraarabameri@chmail.ir
Received: 22 April 2021; Reviewed: 5 June 2021; Revised: 11 August 2021; Accepted: 14 September 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.224796.2487

مقاله پژوهشی

تاثیر تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر سیستم ایمنی و برخی فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی تحت تنش اکسیداتیو القاء شده توسط لیپوپلی‌ساکارید

سمیرا عرب‌عامری[۱]، فیروز صمدی[۱]، بهروز دستار[۱]، زربخت انصاری‌پیرسرایی[۲]، رضا مبصری[۳]*

[۱] گروه تغذیه دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[۲] گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
[۳] موسسه آموزشی مدیریت صنعتی نمایندگی گلستان، سازمان مدیریت صنعتی، گرگان، ایران

کلمات کلیدی

بیان ژن
پاسخ ایمنی
تزریق درون تخم‌مرغی
جوجه گوشتی
فراسنجه خونی
نانوذرات نقره

چکیده

مقدمه: این پژوهش به‌منظور بررسی تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره و تاثیر آن بر سیستم ایمنی و برخی فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی در شرایط تنش اکسیداتیو انجام شد.

مواد و روش‌ها: آزمایش با ٥٦۰ عدد تخم‌مرغ بارور در ٤ تیمار، ٤ تکرار و ۳٥ عدد تخم‌مرغ در هر تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل:۱) شاهد مثبت (تزریق ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی)، ۲) شاهد منفی (بدون تزریق سرم فیزیولوژی)، ۳) تزریق۲۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره به ازای هر تخم‌مرغ و ٤) تزریق٤۰ میلی‌گرم نانو ذرات نقره به ازای هر تخم‌مرغ بود. تزریق در روز ۷ جوجه‌کشی انجام شد. جهت القای تنش اکسیداتیو در دوره پرورش، لیپوپلی‌ساکارید به‌میزان ۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن زنده در زمان‌های ۱۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت قبل از کشتار به‌صورت درون صفاقی تزریق شد.

نتایج: نتایج نشان داد نانوذرات نقره موجب بهبود رشد جوجه‌ها در دوران پرورش شد و وزن اندام‌های لنفاوی را به‌طور معنی‌داری افزایش داد ($p<۰/۰٥$). به‌طوری‌که گروه دریافت‌کننده ٤۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره بیش‌ترین وزن اندام لنفاوی را نشان داد. کلسترول خون با استفاده از تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰٥$). به‌طوری‌که تیمار شاهد منفی، بالاترین سطح کلسترول خون را نشان داد ($p<۰/۰٥$). TNF-α و TGF-β در تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری را نشان دادند، به‌طوری‌که گروه دریافت‌کننده ٤۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره بالاترین سطح بیان ژن را نشان داد ($p<۰/۰٥$).

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان گفت نانوذرات نقره با بهبود رشد، کاهش کلسترول و بالا بردن سطح بیان ژن فاکتورهای ایمنی و رشد، موجب بهبود پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی می‌شود.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: samiraarabameri@chmail.ir

تاریخ دریافت: ۲ اردیبهشت ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۱٥ خرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۲۰ مرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۲۳ شهریور ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.224796.2487

مقدمه

امروزه پرورش طیور با تنش‌های متعددی روبرو است. عوامل تنش‌زا با تولید رادیکال‌های آزاد منجر به اختلال در همئوستاز (Homeostasis) بدن، کاهش عملکرد ایمنی و در نتیجه کاهش عملکرد پرنده می‌شوند. اکسیداسیون بخشی از زندگی هوازی و متابولیسم موجودات زنده است. اکسیژن در موقعیت‌های خاص ممکن است به صورت تک‌الکترونی درآید و رادیکال آزاد تولید کند. تولید رادیکال‌های آزاد رویدادی طبیعی است که در جریان واکنش‌های طبیعی سلول‌ها از جمله تنفس و اکسید شدن مواد به‌وجود می‌آید، اما میزان تولید آن تحت تنش افزایش می‌یابد (۱). لیپوپلی‌ساکارید (Lipopolysaccharide) بخشی از غشا خارجی باکتری‌های گرم منفی بوده که در بروز شرایط پاتولوژیک در بیماری‌هایی نظیر شوک عفونی، کولستاز (cholestasis)، زخم معده روده ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* (Helicobacter pylori) دارد (۲). این ماده، آندوتوکسینی بسیار قوی بوده که پاسخ‌های التهابی را در بافت‌ها راه‌اندازی می‌کند. بخش عمده لیپوپلی‌ساکارید توسط سلول‌های کوپفر، آندوتلیال و پارانشیمال کبد از خون برداشته می‌شود. در میان این سلول‌ها، سلول‌های کوپفر بیش‌ترین نقش را در پاکسازی خون از لیپوپلی‌ساکارید دارند. سلول‌های پارانشیمال کبد پروتئینی موسوم به پروتئین اتصالی به لیپوپلی‌ساکارید به‌داخل خون ترشح می‌کنند. این پروتئین پس از اتصال به لیپوپلی‌ساکارید توسط گیرنده‌های موجود در سطح سلول‌های کوپفر شناسایی می‌شود (۳). هپاتوسیت‌های کبدی بعد از تحریک توسط لیپوپلی‌ساکارید مبادرت به تولید اسیدنیتریک می‌کنند که سبب القای تنش اکسیداتیو می‌گردد (۴). مطالعات مختلف نشان می‌دهند که استفاده از موادی با اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی می‌تواند آسیب ناشی از لیپوپلی‌ساکارید را کاهش دهد (۳). نانوذرات نقره به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی در زمینه پرورش 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، به سایز ۲ تا ۳۵ نانومتر، ریخت‌شناسی و نحوه توزیع آن‌ها وابسته است و به‌سرعت در حال گسترش است. به‌عنوان نمونه، نانوتکنولوژی در زمینه‌هایی هم‌چون پزشکی، حفظ سلامت، اکسیژن‌رسانی، تغذیه، انتقال ژن و دارو در حال پیشرفت است. نانو ذارت فلزی می‌توانند به تک‌رشته‌های DNA بدون آسیب زدن به آن‌ها متصل شوند. این خواص دریچه جدیدی را به روی تحقیقات درمانی باز می‌کند. نانوذارت می‌توانند از عروق خونی عبور کنند (۶). در بین مواد غیرآلی، اکسیدهای فلزی همانند TiO، ZnO_2، MgO، CaO و Ag نه تنها به‌دلیل پایداری در شرایط سخت، بلکه عموماً بدین دلیل که به‌عنوان مواد بی‌خطر برای سلامت انسان و حیوانات خوانده می‌شوند، بیش‌تر مورد توجه هستند (۷). همان‌طورکه پیش‌تر گفته شد خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی نقره منجر به استفاده از آن در حیطه پژوهش‌های علوم دامی شده است. گزارش شده است نانوذرات نقره می‌تواند با سیستم ایمنی بدن از طریق اتصال و واکنش با سلول‌های سیستم ایمنی ارتباط برقرار کرده، درنتیجه در تعدیل پاسخ ایمنی که یکی از روش‌های تقویت سیستم ایمنی است موثر باشند (۸). Bhanja و همکاران، گزارش کردند تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره می‌تواند بر بهبود افزایش وزن بدن پرنده در طی دوران پرورش موثر باشد (۵). Goel و همکاران، بیان کردند بیش‌ترین وزن طحال و بورس مربوط به گروه دریافت‌کننده نانوذرات نقره در زمان جنینی بود (۹). Bhanja و همکاران، اذعان داشتند که تحت شرایط تنش لیپوپلی‌ساکاریدی، بیان ژن‌های کبدی (Interleukin-6) IL-۶ و TNF-α (Tumor necrosis factor-alpha) در روز ۱۹ جنینی در گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرات نقره، سیستئین یا ترکیب آن‌ها در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (۵).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، از ۵۶۰ عدد تخم‌مرغ سویه هوبارد F15 در ۴ تیمار با ۴ تکرار و ۳۵ عدد تخم‌مرغ در هر تکرار استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱) شاهد مثبت (تزریق ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ به‌ازای هر تخم‌مرغ)، ۲) شاهد منفی (بدون تزریق سرم فیزیولوژی)، و تیمارهای ۳ و ۴ به‌ترتیب تزریق ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره (شرکت پارت خزر، pH=۶/۵، ۳۲۰ میلی‌اسمول) به‌ازای هر تخم‌مرغ 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 (با 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 تفریخ جوجه‌هایی که از نظر وزنی دارای یکنواختی بیش‌تری با تیمار مورد نظر داشتند، به مزرعه پرورشی (میهن طیور، آق‌قلا، گلستان) منتقل شدند و دوباره در ۴ تیمار و ۴ تکرار با ۲۰ قطعه جوجه گوشتی در هر تکرار قرار گرفتند. جیره خوراکی براساس راهنمای نگه‌داری سویه هووبارد F15 تهیه شد (جدول ۱). در طی آزمایش از برنامه راهنمای نوری کتابچه راهنمای پرورش سویه هووبارد در سالن استفاده شد و آب و خوراک به‌صورت آزاد در اختیار جوجه‌ها قرار گرفت. جهت القای تنش اکسیداتیو در دوره پرورش از تزریق درون‌صفاقی لیپوپلی‌ساکارید

باکتری سالمونلا که از شرکت سیگما-آلدریچ تهیه شده بود در ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت قبل از کشتار (روزهای ۴۰ و ۴۱ پرورش) به‌میزان ۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن‌زنده استفاده شد(۱۰). سپس در روز ۴۲ پرورش پس از وزن‌کشی، جوجه‌ها جهت بررسی وزن اندام‌های لنفاوی، برخی فراسنجه‌های خونی (کلسترول، تری‌گلیسرید، HDL: high-density lipoprotein، LDL: low-density lipoprotein و VLDL: Very-low-density lipoprotein) و ژن‌های مورد نظر (TNF-α، IL۶، TGF-β: Transforming growth factor beta و IGF-1: Insulin-like growth factor 1) که از بافت کبد استخراج شدند، کشتار شدند.

جدول ۱: جیره مورد استفاده در طول پرورش

اجزاء جیره	جیره غازین (۰-۲۱ روزگی)	جیره رشد (۲۲-۴۲ روزگی)
ذرت	۵۶/۵	۶۰/۵۶
کنجاله سویا	۳۷/۲۷	۳۲/۳۳
روغن	۲/۳۸	۳/۶۹
دی کلسیم فسفات	۱/۴۴	۱/۰۹
کربنات کلسیم	۱/۲۸	۱/۳۸
مکمل معدنی ویتامینی	۰/۵۰	۰/۵۰
نمک طعام	۰/۴۳	۰/۳۳
دی-ال متیونین	۰/۱۵	۰/۰۷
کوکسیدیواستات	۰/۰۵	۰/۰۵
ترکیبات شیمیایی محاسبه		
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری/کیلوژول)	۲۹۵۰	۳۱۰۰
پروتئین (درصد)	۲۱/۲	۱۹/۳۸
کلسیم (درصد)	۰/۹۲	۰/۸۷
فسفر قابل استفاده (درصد)	۰/۴۱	۰/۳۴
سدیم (درصد)	۰/۱۸	۰/۱۵
لیزین (درصد)	۱/۱۵	۱/۰۳
متیونین (درصد)	۰/۴۸	۰/۳۷
ترئونین (درصد)	۰/۸۱	۰/۷۳

۱- مقادیر از NRC محاسبه شده‌اند (۱۱). ۲- هر کیلوگرم مکمل معدنی شامل: ۳۲ گرم منگنز، ۲۵ گرم آهن، ۱۱ گرم روی، ۴ گرم مس، ۰/۱۶ گرم ید و ۰/۲ گرم سلنیوم است. ۳- هر کیلوگرم از مکمل ویتامینی شامل: ۹۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۲۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D_3 ، ۱۸۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۰/۴ گرم ویتامین K_3، ۰/۱۸ گرم ویتامین B_1، ۰/۸۲۵ گرم ویتامین B_2، ۱ گرم ویتامین B_3، ۳ گرم ویتامین B_5، ۰/۳ گرم ویتامین B_6، ۰/۱۲۵ گرم ویتامین B_9، ۰/۱۵ گرم ویتامین B_{12}، ۵۰ گرم کولین کلراید است.

نانوذرات نقره: محلول هیدروکلوئیدی نقره از شرکت نانو پارت خزر که با روش ولتاژ بالای غیرانفجاری با استفاده از فلز با خلوص بالا (۹۹/۹٪) و آب با خلوص بالا تولید شده بود، تهیه شد (۱۲). غلظت نانو ذرات در هیدروکلوئید نانونقره ۵۰ ppm بود.

اندازه‌گیری وزن لاشه و اندام‌های داخلی: در روز ۴۲ پرورش، دو پرنده به‌طور تصادفی از هر واحد آزمایشی انتخاب، پس از وزن‌کشی کشتار شده و وزن نسبی لاشه، سینه و ران با استفاده از ترازوی دیجیتال محاسبه گردید.

اندازه‌گیری وزن اندام لنفاوی و کبد: در روز ۴۲ پرورش، دو پرنده به‌طور تصادفی از هر واحد آزمایشی انتخاب، پس از کشتار وزن نسبی اندام لنفاوی و کبد با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت یک هزارم محاسبه گردید.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های خونی: در روز ۴۲، دو پرنده به‌طور تصادفی از هر واحد آزمایشی انتخاب شد. نمونه خون از رگ‌های بال گرفته شده و برای تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی بیش‌تر به لوله‌های آزمایش بدون هپارین منتقل شد. نمونه‌ها با ۳۰۰۰ چرخش در دقیقه و به‌مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شدند (HERMLE-Z323K، آلمان) تا سرم جدا شود. پس از جداسازی سرم، برخی از فراسنجه‌های خونی (تری‌گلیسرید، کلسترول، HDL، LDL و VLDL) با استفاده از کیت‌های پارس آزمون اندازه‌گیری شد.

بررسی بیان ژن: به‌منظور بررسی بیان ژن TNF-α، IL-۶، TGF-β و IGF-1 در روز ۴۲ پرورش، از هر تیمار سه پرنده به‌طور تصادفی انتخاب و کشتار شدند. برای استخراج RNA قطعه‌های کوچکی از بافت کبد هر جوجه توسط تیغ جراحی سترون جدا شد و به‌سرعت درون تانک نیتروژن در دمای ۱۹۶- درجه سلسیوس قرار داده شد. استخراج RNA کل از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت کبد و بنا بر دستورکار کیت استخراج شرکت یکتا تجهیز آزما صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه طیف‌سنج نوری (Spectrophotometer) ارزیابی شد. به‌منظور ساخت cDNA از کیت شرکت یکتاتجهیز استفاده شد. درون میکروتیوب‌های این کیت آنزیم RT، بافرهای مخصوص، dNTP می‌باشند. بدین‌ترتیب فقط پرایمر oligo dT و نمونه RNA را به‌درون این میکروتیوب‌ها ریخته شد. مراحل ساخت به‌شرح ذیل است: ۱۰میکرولیتر از نمونه DNase را به‌درون میکروتیوپ‌ها اضافه شد. ۱۰ میکرولیتر نیز RNase free اضافه شد سپس به‌مدت ۴۵ دقیقه نمونه‌ها را داخل دستگاه PCR Thermocycler قرار گرفته شد. در نهایت نمونه‌ها را به فریزر ۲۰- درجه سلسیوس منتقل شد.

واکنش Real-time PCR: در ابتدا با استفاده از پی‌سی‌آر، ست‌آپ ژن‌ها انجام شد. واکنش‌های Real-time PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و SYBR Green ساخت شرکت یکتا تجهیز انجام شد. از ژن بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. ویژگی آغازگرها در جدول ۲ آمده است. داده‌های به‌دست آمده با روش لیواک واکاوی اولیه شد (۱۳).

جدول ۲: توالی اولیگونوکلئوتیدی آغازگرهای ژنی مربوط به سیستم ایمنی و رشد بدن(۱۴، ۱۵)

نام ژن	توالی آغازگر	جهت	شماره دسترسی	اندازه محصول
IL-6	CAACCTCAACCTgCCCAA ggAgAgCTTCCTCAggCATT	رفت برگشت	AB559572	۸۵
TNF-α	TgTgTATgTgCAgCAACCCgTAgT ggCATTgCAATTTggACAgAAgT	رفت برگشت	AY765397	۱۷۱
TGF-β	CggCCgACgATgAgTggCTC CggggCCCATCTCACAgggA	رفت برگشت	JQ423909	۱۲۰
IGF-I	GGTGCTGAGCTGGTTGATGC CGTACAGAGCGTGCAGATTTAGGT	رفت برگشت	JN942578	۹۶
β-actin	CATCACCATTggCAATgAgAgg gCAAgCAggAgTACgATgAATC	رفت برگشت	L08165	۳۵۳

جدول۳: اجزای واکنش Real-time PCR

اجزای واکنش	حجم ۱۵ میکرولیتر
cDNA	۱
Master Mix	۷,۵
آغازگر رفت	۱
آغازگر برگشت	۱
آب دو بار تقطیر	۴,۵

جدول۴: شرایط دمایی واکنش Real-time PCR

چرخه	شمار تکرار	مرحله واکنش	زمان (ثانیه)	دما (سلسیوس)
	۱	واسرشت اولیه	۳۰۰	۹۵
	۵۰	واسرشت	۱۰	۹۵
		اتصال و تکثیر	۳۰	۶۰
		رسم منحنی ذوب	افزایش تدریجی دما به‌میزان یک درجه سانتی‌گراد در هر ۵ ثانیه از ۶۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد	

روش تجزیه و تحلیل آماری: این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. تجزیه آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS و با استفاده از رویه GLMانجام شد. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح ۵ درصد انجام پذیرفت.

$Yij = \mu + Ti + eij$

Y_{ik} = مقدار هر مشاهده از فراسنجه مورد اندازه‌گیری، μ= میانگین کل، Ti= اثرات عامل اول (تیمارهای تزریقی)، eij= اثرخطای‌آزمایشی

نتایج

وزن لاشه، سینه و ران: نتایج حاصل از تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر وزن لاشه، سینه و ران در جدول۵ گزارش شده است. وزن لاشه، سینه و ران در تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری را نشان دادند ($p<۰/۰۵$). به‌طوری‌که گروه‌های دریافت کننده ۴۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره و شاهد منفی به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین وزن لاشه، سینه و ران را نشان دادند.

وزن اندام لنفاوی: نتایج حاصل از تزریق درون تخم‌مرغی نانو ذرات نقره بر وزن اندام‌های لنفاوی در جدول ۶ گزارش شده است. وزن اندام‌های لنفاوی در تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری را نشان دادند ($p<۰/۰۵$). به‌طوری‌که گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرات نقره بیش‌ترین وزن کبد، طحال و بورس را نشان دادند.

فراسنجه‌های خونی: نتایج حاصل از تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر مقادیر تری‌گلیسرید، کلسترول، HDL، LDLو VLDL در جدول ۷ گزارش شده است. میانگین کلسترول در تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$). به‌طوری‌که گروه دریافت‌کننده شاهد منفی بیش‌ترین میزان کلسترول خون را نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرات نقره و شاهد مثبت نشان داد.

بیان ژن: نتایج حاصل از تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر بیان ژن TNF-α، IL-6، TGF-βو IGF-1 در جدول ۸ گزارش شده است. بیان ژن TNF-α و TGF-β تفاوت معنی‌داری را در گروه‌های آزمایشی نشان داد ($p<۰/۰۵$). به‌طوری‌که گروه دریافت کننده ۴۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره بالاترین سطح بیان ژن TNF-α و TGF-β را نشان داد.

جدول۵: تاثیر تیمارهای آزمایشی بر وزن لاشه، سینه و ران جوجه‌های گوشتی تحت تنش لیپوپلی‌ساکارید

تیمارها	لاشه (گرم)	سینه (گرم)	ران (گرم)
شاهد مثبت	۱۳۰۸ ^{c}	۴۱۷/۵۰ ^{c}	۳۰۸/۱۲۵ ^{c}
شاهد منفی	۱۲۴۹ ^{d}	۴۰۲/۷۵ ^{d}	۲۹۲/۱۲۵ ^{d}
۲۰ میلی‌گرم نانوذرات	۱۴۸۸ ^{b}	۴۴۵/۲۵ ^{b}	۳۳۲/۸۷۵ ^{b}
۴۰ میلی‌گرم نانوذرات	۱۷۴۸ ^{a}	۵۱۸/۲۵ ^{a}	۳۸۴/۰۰۰ ^{a}
SEM	۰/۱۱	۰/۸۰	۲/۲۹
P-Value	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱

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

جدول۶: تاثیر تیمارهای آزمایشی بر وزن اندام‌های لنفاوی جوجه‌های گوشتی تحت تنش لیپوپلی‌ساکارید

تیمارها	کبد (گرم)	طحال (گرم)	بورس (گرم)
شاهد مثبت	۳۳/۴۸۷ ^{c}	۱/۳۴۷ ^{c}	۰/۵۲۶ ^{c}
شاهد منفی	۳۱/۴۲۵ ^{d}	۱/۲۵۷ ^{c}	۰/۴۲۳
۲۰ میلی‌گرم نانوذرات	۳۶/۹۵۰ ^{b}	۱/۸۹۶ ^{b}	۰/۰۶۱۸ ^{b}
۴۰ میلی‌گرم نانوذرات	۴۶/۲۱۲ ^{a}	۲/۲۵۳ ^{a}	۰/۸۱۲ ^{a}
SEM	۰/۱۰۶	۰/۰۱	۰/۰۰۷
P-Value	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱

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

جدول ۷: تاثیر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی تحت تنش لیپوپلی‌ساکارید

تیمارها	کلسترول (میلی‌گرم/دسی لیتر)	تری‌گلیسرید (میلی‌گرم/دسی لیتر)	HDL (میلی‌گرم/دسی لیتر)	VLDL (میلی‌گرم/دسی لیتر)	LDL (میلی‌گرم/دسی لیتر)
شاهد مثبت	۱۱۳/۰۰ ^{ab}	۲۳/۶۷	۴۰/۹۷	۴/۷۳	۶۶/۵۰
شاهد منفی	۱۲۴/۵۰ ^{a}	۲۷/۶۲	۳۹/۹۶	۵/۵۲	۷۹/۸۱
۲۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره	۱۰۳/۲۵ ^{b}	۲۸/۱۱	۴۱/۳۶	۵/۶۲	۶۵/۲۷
۴۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره	۱۰۹/۰۰ ^{ab}	۲۶/۳۹	۴۱/۱۰	۵/۲۸	۶۲/۶۳
SEM	۲/۷۰	۰/۷۵	۲/۹۷	۰/۱۵	۴/۵۳
P-Value	۰/۰۱۸۷	۰/۱۴۲۷	۰/۹۹۸۸	۰/۱۴۲۷	۰/۳۲۹۵

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

جدول ۸: تاثیر تیمارهای آزمایشی بر TNF-α، IL-6، TGF-β و IGF-1 جوجه‌های گوشتی تحت تنش لیپوپلی‌ساکارید

تیمارها	TNF-α	IL-6	TGF-β	IGF-1
شاهد مثبت	۱/۱۷۶۷ ^{b}	۱/۱۰۰۰	۰/۹۰۰۰ ^{c}	۱/۰۵۰۰
شاهد منفی	۱/۰۰۰۰ ^{b}	۱/۰۰۰۰	۱/۰۱۶۷ ^{c}	۱/۰۱۰۰
۲۰ میلی‌گرم نانوذرات	۱/۶۶۳۱ ^{a}	۱/۲۷۶۷	۲/۲۹۳۳ ^{b}	۱/۲۱۶۷
۴۰ میلی‌گرم نانوذرات	۱/۷۰۶۷ ^{a}	۱/۳۱۳۱	۴/۰۱۳ ^{a}	۰/۶۶۳۳
SEM	۰/۰۹	۰/۰۸۵	۰/۱۸۵	۰/۰۹
P-Value	۰/۰۰۸۲	۰/۱۸۷	۰/۰۰۰۱	۰/۵۴۴

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

بحث

نتایج مشاهده شده در این تحقیق نشان داد که استفاده از نانو ذرات نقره، تاثیر معنی‌داری بر وزن لاشه، سینه و ران 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 گروه مصرف‌کننده توام نانوذرات نقره و پروبیوتیک، دارای بهترین وزن زنده و ضریب تبدیل غذایی است و پس از آن گروه دریافت‌کننده نانوذرات نقره بهترین وزن زنده و ضریب تبدیل غذایی را نشان داد (۱۶). در گزارش Andi و همکاران، مشخص گردید وجود نانوذرات نقره در خوراک باعث بهبود وزن‌گیری، خوراک مصرفی و ضریب تبدیل خوراک می‌شود (۱۷). هم‌چنین Sawosz و همکاران، نشان دادند استفاده از ۲۵ میلی‌گرم نانوذرات نقره به‌ازای هر کیلوگرم آب آشامیدنی بلدرچین، باعث افزایش جمعیت باکتری‌های گرم مثبت از قبیل لاکتوباسیلوس (*Lactobacillus*)، لوکونوستوک لاکتیک (*Leuconostoc Lactis*) و اکتینومایسس نائسلوندی (*Actinomyces naeslundii*) در سکوم می‌شود (۱۸). وظیفه اصلی فلور میکروبی فعالیت متابولیک است که منجر به حفظ انرژی و بهبود قابلیت جذب مواد خوراکی می‌شود و از این طریق بهبود فلور میکروبی به‌طور مستقیم روی خصوصیات عملکردی حیوان تاثیرگذار است. در آزمایش حاضر نانوذرات نقره سبب افزایش وزن لاشه در روز هچ شد که می‌تواند به‌دلیل وجود قابل توجهی آنتی‌اکسیدان در نانوذرات نقره باشد. وزن بالاتر هنگام تفریخ سبب افزایش مصرف خوراک و افزایش وزن در دوران پرورش می‌گردد.

نتایج مشاهده شده در این تحقیق نشان داد بیش‌ترین وزن اندام‌های لنفاوی مربوط به گروه دریافت‌کننده نانوذرات نقره بود. در راستای نتایج حاضر Ahmadi و همکاران، گزارش کردند که استفاده از ۴، ۸ و ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره در جیره جوجه‌های گوشتی در دوره آغازین باعث افزایش معنی‌دار وزن اندام‌های لنفاوی می‌شود درحالی‌که تاثیر معنی‌داری بر وزن قلب، سنگدان، پانکراس و چربی حفره بطنی نداشت (۱۹). Zargaran Esfahani و همکاران، گزارش کردنداستفاده 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 به‌طور معنی‌داری کاهش داد (۲۰). هم‌چنین Felehgari و همکاران، نیز مشاهده کردند که با استفاده از ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره در جیره خوراکی، وزن کبد در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت (۲۱). دلیل افزایش وزن اندام‌های لنفاوی و کبد در تحقیق حاضر می‌تواند اثر نانوذرات نقره بر کاهش ترشح هورمون کورتیکوسترون و تاثیر آن بر افزایش وزن بدن و به‌دنبال آن افزایش وزن اندام‌های لنفاوی باشد (۲۲). اگرچه گزارش شده که نانوذرات نقره اثر سمی بر بافت کبد ماهی کپور داشته است. اختلاف نتایج می‌تواند به‌دلیل میزان و زمان مصرف نانو ذرات نقره باشد (۲۳). نتایج مشاهده شده در این تحقیق نشان داد که استفاده از نانوذرات نقره، تاثیر معنی‌داری بر غلظت کلسترول خون دارد به‌طوری‌که بیش‌ترین غلظت کلسترول مربوط به گروه دریافت‌کننده شاهد بود. اگرچه تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری را بر غلظت HDL نشان نداند، اما بیش‌ترین غلظت HDL مربوط به گروه دریافت‌کننده ۲۰ میلی‌گرم نانوذرات نقره بود. در راستای نتایج حاضر، Gholamhosseini Zahraei و همکاران،گزارش نمودند که نانو زئولیت نقره موجب کاهش معنی‌دار کلسترول کل خون جوجه‌های گوشتی شد (۲۴). Esmaili و همکاران، مشاهده کردند نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت، غلظت کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL و VLDLرا کاهش و غلظت HDL خون جوجه‌های گوشتی را افزایش داد (۲۵). Saki و Salari، گزارش کردند گروه دریافت‌کننده نانوذرات نقره بالاترین سطح HDL را در ۲۱ روزگی نشان داد (۲۶). کاهش کلسترول در گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرات نقره احتمالاً به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات نقره است که از پراکسیداسیون لیپیدها و ایجاد آترواسکلورز ممانعت می‌کند. نتایج این تحقیق در ارتباط با تاثیر تزریق درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر بیان ژن TNF-α، IL-۶، TGF-β و IGF-1 نشان داد که نانوذرات نقره سبب افزایش‌بیان‌ژن TNF-α، IL-۶، TGF-β و IGF-1 می‌شود. در راستای نتایج حاضر، Khan و همکاران، گزارش کردند بیان ژن ۶ -IL و TNF- α تحت تاثیر نانوذرات با اندازه ۱۰ نانومتر قرار نمی‌گیرد، بلکه بیان این دو ژن در روز ۱ تحت تاثیر تزریق درون صفاقی ۵۰ میکرولیتر نانوذرات با اندازه ۵۰ نانومتر، به‌طور معنی‌داری در موش‌ها افزایش می‌یابد اما در روز ۵ به‌حالت عادی برمی‌گردد(۲۷). هم‌چنین Malaczewska، گروه دریافت‌کننده نانوذرات نقره به‌صورت آشامیدنی افزایش بیان ژن IL-1β، IL-۶، TNF-α را در پاسخ به تنش لیپوپلی ساکارید نشان دادند (۲۸). Bhanja و همکاران، گزارش کردند بیان ژن IL-۶، TNF-α و IGF-1 در گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرات نقره، سیستئین یا ترکیب آن‌ها افزایش معنی‌داری را نشان داد (۵). احتمالاً نانوذرات نقره با اتصال و واکنش با سلول‌های سیستم ایمنی در تعدیل پاسخ ایمنی که یکی از روش‌های تقویت سیستم ایمنی است موثر باشد.

از مطالعه ارائه شده، می‌توان نتیجه‌گرفت تزریق‌درون تخم‌مرغی نانوذرات نقره بر وزن لاشه، سینه، ران، اندام لنفاوی و کبد تاثیرگذار بود و سبب کاهش غلظت کلسترول خون جوجه‌های گوشتی شد. هم‌چنین سبب افزایش بیان‌ژن فاکتورهای‌ایمنی TNF-α و TGF-β جوجه‌های گوشتی شد.

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی 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

1. **Allen, R.D., 2008.** Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. Plant Physiology. 107: 1049-1054.
2. **Van Oosten, M., Van de Bilt, E., Van Berkel, T.J. and Kuiper, J., 1998.** New scavenger receptor-like receptors for the binding of lipopolysaccharide to liver endothelial and kupffer cells. Infect Immunology. 66(11): 5107-5112.
3. **Granado, M., Martin, A.I., Lopez Menduina, M., Lopez Calderon, A. and Villanua, M.A., 2008.** GH-releasing peptide-2 administration prevents liver inflammatory response in endotoxemia. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 294(1): 131-141.
4. **Iseri, S.O., Sener, G., Saglam, B., Ercan, F., Gedik, N. and Yege, B.C., 2008.** Ghrelin alleviates biliary obstruction-induced chronic hepatic injury in rats. Regulatory Peptides. 146(3): 73-79.

Subtype H9N2 Replication in Chicken Cecal Tonsil Mononuclear. Cells Vaccines. 8: 2-14.

16. **Ghodrat, A., Ila, N. and Salehi, M., 2018.** Investigating the effect of feeding silver nanoparticles and probiotics and their mutual effect on the performance of broiler chickens. Animal Science Knowledge and Research Journal. 4: 11-17. (In Persian)
17. **Andi, M.A., 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.
18. **Sawosz, E., Binek, M., Grodzik, M., Zielińska, M., Sysa, P., Szmidt, M., Niemiec, T. and Chwalibog, A., 2007.** Influence of hydrocolloidal silver nanoparticles on gastrointestinal microflora and morphology of enterocytes of quails. Archives of Animal Nutrition. 61: 444-451.
19. **Ahmadi, F., Mohammdami Khah, M., Javid, S., Zarneshan, A., Akradi, L. and Salehifar, P., 2013.** The effect of silver nanoparticles on performance, immune organs, and lipid serum of broiler chickens during starter period. International Journal of Biological Sciences. 95-100.
20. **Zargaran Esfahani, H., Sharifi, S.D., Barin, A. and Afzal Zadeh, A., 2010.** Influence of Silver Nanoparticles on Performance and Carcass Properties of Broiler Chicks. Iranian Journal of Animal Science. 41(2): 137-143. (In Persian)
21. **Felehgari, K., Ahmadi, F., Rokhzadi, A., Hafsy Kurdestany, A. and 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 Environmental, Pharmacology and Life Sciences. 2: 104-108.
22. **Niu, N., Liu, L., Yan, N. and Li, N., 2009.** Effect of different levels of vitamin E on growth performance and immune response of broilers under heat stress. Poultry Science. 88: 2101-2107.
23. **Tavassoli, M., Mousavi, S.N. and Abedini, M.R., 2011.** Effects of in ovo feeding of glutamine on performance, small intestine morphology, and immune response of broiler chicks. Journal of Animal Environmental. 3(2): 49-58. (In Persian)
24. **Gholamhosseini Zahraei, M., Shakouri, M.D., Mirzaei Aghje Qeshlaq, F. and Dastmalchi, F., 2012.** The effect of silver nano zeolite, zeolite and flavomycin antibiotic on performance and ileal digestibility of nutrients in broilers during the initial period. Animal research. 32(4): 57-68. (In Persian)
25. **Esmaili, M., Hashemi, S.R., Davoudi, D., Jafari Ahangari, Y., Hasni, S., Bolandi, N. and Shabani, A.,**

5. **Bhanja, S.K., Anna, H., Mehra, M., Sawosz, E., Pineda, L., Vadalasetty, K.P., 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.
6. **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.
7. **Pisoschi, A.M. and Pop, A., 2015.** The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. Eur J Med Chem. 97: 55-74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
8. **Klippstein, R., Fernandez-Montesinos, R., Castillo, P.M., Zaderenko, A.P. 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.
9. **Goel, A., Bhanja, S.K., Mehra, M., Majumdar, S. and Mandal, A., 2017.** In ovo silver nanoparticle supplementation for improving the post-hatch immunity status of broiler chickens. Animal Nutrition. 71: 384-394.
10. **Xie, H., Rath, N.C., Huff, G.R., Huff, W.E. and Balog, J.M., 2000.** Effects of Salmonella typhimurium Lipopolysaccharide on Broiler Chickens. Poultry Science. 79: 33-40.
11. **NRC (National Research Council). 2003.** Nutrient requirement of poultry. 9th ed. Washington: University Press.
12. **Chwalibog, A., Sawosz, E., Hotowy, A., Szeliga, J., Mitura, S., Mitura, K., Grodzik, M., Orlowski, P. and Sokolowska, A., 2010.** Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. International Journal Nanomed. 5: 1085-1094.
13. **Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001.** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Tim Quantitative PCR and the 22DDCT Method. Methods. 25: 402-408.
14. **Hateifi, A., Zare shahne, A., Ansari pirsaraie, Z., Alizadeh, A.M., Atashnak, M.P., 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. 1-19.
15. **Alqazlan, N., Alizadeh, M.A., Boodhoo, N., Taha-Abdelaziz, K.H., Nagy, E., Bridle, B. and Sharif, S.H., 2020.** Probiotic Lactobacilli Limit Avian Influenza Virus

2016. Effect of silver nanoparticles coated on clinoptilolite on functional traits, liver enzymes and blood lipids concentration of broiler chickens. Research On Animal Production. 18(1): 161-171. (In Persian)

26. **Saki, A.A. and Salari, J., 2012.** Intra-egg injection of silver nanoparticles and Thyme and Savory extracts on the 17th embryonic day and its effect on the performance and blood parameters of broiler chickens on the 14th and 21st days of rearing. Journal of animal science, research and development. 101: 73-85. (In Persian)

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

28. **Malaczewska, J., 2011.** The effect of silver nanoparticles on splenocyte activity and selected cytokine levels in the mouse serum at early stage of experimental endotoxemia. Polish Journal of Veterinary Sciences. 14: 597-604.