

## تولیات دامی

دوره ۱۹ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۶

صفحه‌های ۵۱۹-۵۰۷

# اثر تزریق زرده تخم‌مرغ بومی خزک به زرده تخم‌مرغ سویه راس بر عملکرد، ایمنی و بیان ژن TLR4

فرزانه بازماندگان شمیلی<sup>۱</sup>، مهدی وفای‌واله<sup>۲\*</sup>، غلامرضا داشاب<sup>۳</sup>، فرزاد باقرزاده کاسمانی<sup>۳</sup>

۱. کارشناس ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۳. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۰/۲۶

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۵/۰۹/۱۳

### چکیده

به منظور ارزیابی آثار مادری بر تکوین سیستم ایمنی نتاج، اثر تزریق زرده تخم‌مرغ‌های بومی خزک به زرده تخم‌مرغ‌های سویه تجاری راس بر عملکرد، ایمنی و بیان ژن TLR4 در مرغ‌های سویه تجاری راس تعیین شد. بدین منظور، تعداد ۱۵۰ عدد تخم‌مرغ سویه راس به طور تصادفی به دو گروه آزمایشی ۷۵ تایی شامل گروه I (گروه شاهد- تزریق زرده سویه راس) و گروه II (تزریق زرده نژاد خزک) تقسیم و برای مدت سه هفته در دستگاه جوجه‌کشی خوابانده و پس از هج با جیره متوازن به مدت شش هفته پرورش داده شدند. سه پرنده به طور تصادفی در روزهای ۲۷ و ۴۲ انتخاب و کشتار شد. وزن اندام‌های مؤثر در ایمنی (کبد، بورس و تیموس) اندازه‌گیری و تیتراژ آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل و بیان نسبی ژن TLR4 در کبد نمونه‌های آزمایشی بررسی شد. تزریق زرده خزک به تخم‌مرغ‌های سویه راس سبب بهبود عملکرد رشد، پاسخ ایمنی و نیز سبب کاهش بیان ژن TLR4 در کبد جوجه‌ها در مقایسه با گروه شاهد شد ( $p < 0.05$ ). بر اساس نتایج این پژوهش ممکن است تزریق زرده تخم‌مرغ‌های بومی خزک به تخم‌مرغ‌های سویه تجاری راس در روز اول جنینی، سبب بهبود کارایی سیستم ایمنی مرغان سویه راس در سنین بالاتر بشود.

**کلیدواژه‌ها:** آثار مادری، زرده تخم‌مرغ، مرغ بومی خزک، TLR4.

## مقدمه

پیشرفت‌های ژنتیکی در صفات رشد عمدتاً به افزایش حساسیت مرغ‌های اصلاح‌شده در برابر تنش‌های محیطی و پاتوژن‌ها می‌انجامد. با این حال، علی‌رغم پیشرفت‌های گسترده در زمینه اصلاح نژاد، سازوکارهای مؤثر در توجیه تفاوت‌های فیزیولوژیکی نظیر تفاوت کارایی فعالیت سیستم ایمنی در نژادهای مختلف تا حدود زیادی ناشناخته مانده است [۳]. در گذشته تفاوت خصوصیات فیزیولوژیکی پرندگان و عملکرد آن‌ها عمدتاً به تفاوت‌های ژنتیکی نسبت داده می‌شد، ولی نتایج مطالعات انجام‌شده طی سال‌های اخیر دلالت بر تأثیر شگرف محیط مادری بر فرایند تکوین دوران جنینی و حتی رشدونمو در دوران پس از تولد دارد [۱۳].

هر چند اطلاعات اندکی در خصوص اهمیت آثار مادری طیور بر فرایند تکوین در دوران جنینی یا دوران پس از تولد وجود دارد، نتایج حاصل از مطالعات اخیر در پرندگان نشان‌دهنده تأثیر مادر بر خصوصیات تخم‌مانند وزن تخم‌مرغ، ترکیبات زرده، ترکیب و غلظت هورمون‌ها و نیز آنتی‌بادی‌هاست. این عوامل متعاقباً بر وزن تولد، قابلیت بقا و نرخ رشد به‌خصوص در مراحل آغازین زندگی جوجه تأثیر زیادی دارند [۱۳، ۱۶]. به‌علاوه، شواهد حاصل از مشاهدات تجربی حاکی از اهمیت ترکیبات تخم‌مرغ در توارث اطلاعات اپی‌ژنتیکی در پرندگان است [۵، ۱۶].

کارایی پاسخ‌های سیستم ایمنی در مقابل پاتوژن‌ها، نقشی کلیدی در قابلیت زنده‌مانی و عملکرد حیوان دارند. گزارش شده است که اعضای خانواده گیرنده‌های شبه‌تول (TLRs) نقش مهمی در تنظیم فعالیت سیستم ایمنی دارد. این گیرنده‌ها در طیف گسترده‌ای از بافت‌ها و انواع سلول‌ها و به‌طور خاص در سلول‌های ایمنی بدن مانند ماکروفاژها، سلول‌های دندریت، نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها بیان می‌شوند [۹، ۲۴]. این گیرنده‌ها غالباً الگوهای مولکولی وابسته به پاتوژن (PAMPs) و نیز الگوهای مولکولی حاصل از آسیب‌های سلولی (DAMPs) را شناسایی و متعاقباً سبب فعال‌شدن

مسیرهای سیگنال‌آبشاری در جهت بروز پاسخ متناسب می‌شوند. روی‌هم‌رفته تاکنون ده عضو عملکردی از این گیرنده‌ها در طیور شناسایی شده است که قابلیت شناسایی و اتصال با تعداد وسیعی از لیگاندها نظیر ساختارهای پروتئینی، لیپیدی، پلی‌ساکارییدی و نوکلئوتیدی را دارند [۲۴]. یکی از شناخته‌شده‌ترین اعضای خانواده TLRs، گیرنده TLR4 است که به‌طور عمده در بافت‌های غنی از ماکروفاژ مانند طحال، لوزه و کبد بیان می‌شود و در شناسایی لیپوپولی‌ساکاریدهای موجود در دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی و نیز اندوتوکسین‌ها نقش کلیدی دارد [۲۱، ۲۴].

فعال‌شدن گیرنده TLR4 در زمان اتصال به لیگاندهای اختصاصی سبب بروز پاسخ‌های ایمنی ذاتی و متعاقباً ایمنی اکتسابی به‌واسطه فعال‌شدن دو مسیر سیگنال درون سلولی می‌شود که یکی وابسته به پروتئین آدابتور MYD88 و دیگری وابسته به پروتئین TRIF است. گزارش شده است که فعال‌شدن این دو مسیر در نهایت سبب القای بیان ژن‌های التهابی نظیر TNF $\alpha$ ، سیتوکین‌های التهابی، اینترفرون‌های نوع I و نیز آنزیم iNOS در سلول می‌شود [۹، ۲۴]. این فاکتورها می‌توانند سبب فعال‌شدن مسیرهای دخیل در آپوپتوزیس هپاتوسیت‌های کبدی شوند [۱۴]. بنابراین، پیشنهاد شده است که بخشی از تفاوت کارایی پاسخ سیستم ایمنی بین لاین‌های مختلف طیور به‌واسطه تفاوت در عملکرد مسیر سیگنال TLR4 باشد [۱].

بر این اساس، بخشی از تفاوت‌های نژادی در عملکرد سیستم ایمنی ممکن است به‌واسطه تأثیر نژاد مادر روی ترکیبات زرده تخم‌مرغ باشد. لذا، با توجه به نقش کلیدی ژن TLR4 در تنظیم پاسخ متناسب سیستم ایمنی و نیز اهمیت بافت کبد در مقابله با پاتوژن‌ها، در این مطالعه به‌منظور شناخت اهمیت آثار مادری بر تکوین و تکامل نجاج، زرده نژاد مرغ بومی خزرک (مرغ بومی منطقه سیستان)، به‌دلیل مقاومت بسیار بالای آن نسبت به تنش‌های مختلف محیطی نظیر محدودیت‌های غذایی،

## تولیدات دامی

(۴۰۰ میکرولیتر زرده سویه راس + ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر) به کیسه زرده تخم مرغ های گروه شاهد تزریق شد. منفذ ایجاد شده با پارافین مذاب مسدود و تخم مرغ ها به دستگاه جوجه کشی منتقل شد.

پس از پایان دوره جوجه کشی، جوجه های تفریخ شده یکروزه متعلق به هر گروه آزمایشی نخست به صورت انفرادی توزین و سپس به سالن پرورش منتقل و تا شش هفتگی پرورش یافتند. درجه حرارت سالن نگهداری در روز ورود جوجه ها به سالن در ۳۴ درجه سانتی گراد بود. پس از آن، به تدریج بر اساس اصول پیشنهادی پرورشی به صورت هفتگی (۲ درجه سانتی گراد در هفته) کاهش یافت. برنامه نوری برای سه روز نخست پس از هچ به صورت روشنایی دائمی و برای باقی دوره پرورش به صورت ۲۳ ساعت روشنایی و یک ساعت خاموشی تنظیم و اجرا شد. جیره پایه برای دوره آغازین (یک تا ۲۱ روزگی) و رشد (۲۲-۴۲) برای تأمین مواد مغذی توصیه شده [۲۳] تنظیم شد (جدول ۱). غذا و آب به صورت آزادانه طی دوره در اختیار پرندگان بود.

در پایان هر هفته، وزن پرندگان اندازه گیری و ثبت شد. واکسن نیوکاسل B1 در هفت روزگی از طریق قطره چشمی تجویز شد. دو هفته بعد از واکسیناسیون از سه قطعه پرنده از هر گروه آزمایشی از طریق ورید بال خون گیری انجام شد. پس از جداسدن سرم از لخته خون، به منظور تعیین عیار پادتن تولید شده علیه ویروس واکسن نیوکاسل از روش ممانعت از هماگلو تیناسیون (HI) استفاده شد [۱۵]. در روزهای ۲۷ و ۴۲ دوره پرورش، از هر تیمار سه جوجه با وزن نزدیک به میانگین گروه انتخاب و پس از اعمال سه ساعت گرسنگی، کشتار و وزن نسبی اندام های مرتبط با سیستم ایمنی شامل طحال، بورس و کبد بر اساس وزن زنده اندازه گیری شد. پس از وزن کشی، نمونه های کبد جمع آوری و برای جلوگیری از تجزیه RNA به سرعت در ازت مایع فریز و تا زمان آنالیز بیان ژن به فریزر دمای ۸۰- منتقل و نگهداری شد.

استرس حاد گرمایی و بیماری ها، به کیسه زرده تخم مرغ های سویه راس، سویه بسیار حساس به تنش های محیطی و بیماری ها، تزریق و تأثیر پیامدهای تزریق بر عملکرد، ایمنی و بیان ژن TLR4 در سلول های کبدی جوجه های حاصل از انکوباسیون بررسی شد.

## مواد و روش ها

تعداد ۱۵۰ عدد تخم مرغ بارور سویه راس ۳۰۸، تهیه شده از گله مادر با سن ۳۵ هفته، در قالب طرحی کاملاً تصادفی به دو گروه آزمایشی شاهد و گروه تیمار شده با زرده تخم مرغ نژاد خزک اختصاص داده شد. تخم مرغ نژاد خزک از پژوهشکده دام های خاص دانشگاه زابل تهیه شد. به منظور تعدیل آثار سن، جیره و سایر عوامل محیطی از تخم مرغ های با متوسط سن ۳۴-۳۸ هفته تغذیه شده با جیره استاندارد مرغان تخم گذار [۲۳] پرورش یافته در شرایط توصیه شده استفاده شد.

برای بررسی تأثیر زرده نژاد خزک روی فرایند تکوین جنین و پاسخ ایمنی سویه راس به ترتیب تعداد پنج زرده تخم مرغ خزک و نیز پنج زرده تخم مرغ راس با یکدیگر مخلوط شد. در نهایت، مخلوط زرده های حاصل برای تسهیل پروسه تزریق به نسبت چهار به یک با آب مقطر رقیق سازی شد. برای تزریق ماده آزمایشی (زرده تخم خزک)، قبل از انکوبه کردن تخم مرغ ها، نخست دیواره تخم مرغ ها با الکل اتانول ۷۰ درصد ضد عفونی و سپس با استفاده از سوزن ضد عفونی شده، در پوسته تخم مرغ ها سوراخ ایجاد شد. سپس، با استفاده از سرنگ ۱۰ میلی لیتری با سر سوزن درجه ۱۸ مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از زرده رقیق شده خزک (۴۰۰ میکرولیتر زرده + ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر) به کیسه زرده هر یک از تخم مرغ های گروه تیمار تزریق شد. برای تعدیل آثار تنش ناشی از تزریق و نیز نسبت زرده به سفیده بر فرایند تکوین جنین ها، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از ترکیب زرده راس رقیق شده در آب مقطر

## تولیدات دامی

جدول ۱. مواد خوراکی و ترکیب جیره پایه

جیره رشد (۲۲ تا ۴۲ روزگی)	جیره آغازین (یک تا ۲۱ روزگی)	ماده خوراکی (درصد)
۴۳/۸۰	۵۳/۴۷	ذرت
۲۸/۰۳	۳۵/۰۰	کنجاله سویا (۴۴٪ پروتئین خام)
۱۵/۰۰	--	گندم
۳/۰۱	۲/۸۹	گلوتن ذرت
۵/۰۰	۳/۲۸	روغن آفتابگردان
۱/۳۷	۱/۴۷	دی کلسیم فسفات
۱/۳۴	۱/۵۱	پودر صدف
۱/۰۰	۱/۰۰	ماسه
۰/۳۴	۰/۲۹	بی کرینات سدیم
۰/۲۵	۰/۲۵	مکمل ویتامینی <sup>۱</sup>
۰/۲۵	۰/۲۵	مکمل مواد معدنی <sup>۲</sup>
۰/۲۲	۰/۲۹	DL- متیونین
۰/۱۹	۰/۱۲	L- لیزین هیدروکلراید
۰/۱۳	۰/۱۲	L- ترئونین
۰/۰۴	۰/۰۶	نمک
۰/۰۳	--	ویتامین E
۱۰۰	۱۰۰	جمع

مواد مغذی محاسبه شده

۳۱۰۰	۳۰۰۰	انرژی قابل سوخت و ساز (کیلوکالری بر کیلوگرم)
۲۰/۲۱	۲۲/۰۰	پروتئین خام (%)
۰/۹۰	۱/۰۰	کلسیم (%)
۰/۴۲	۰/۴۵	فسفر غیر فیتاته (%)
۱/۰۰	۱/۱۰	لیزین (%)
۰/۷۸	۰/۹۰	متیونین + سیستئین (%)
۰/۷۵	۰/۸۲	ترئونین (%)
۰/۲۰	۰/۲۲	تریئوفان (%)
۲۵۰	۲۵۰	تعادل آنیون-کاتیون (میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم)

۱. ویتامین‌های تأمین شده به ازای هر کیلوگرم جیره: ویتامین A (از Vitamin A acetate) IU ۱۱۵۰۰، کوله‌کلسیفرول ۲۰۰۰ IU، ویتامین E (از DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate) IU ۲۲، ویتامین B12 ۰/۶۰ mg، ریوفلاوین ۴/۴ mg، نیکوتین آمید ۴۰ mg، کلسیم پنتونات ۳۵ mg، منادیون (منادیون دی‌متیل پیریمیدینول) ۱/۵۰ mg، فولیک اسید ۰/۸۰ mg، تیامین ۳ mg، پیریدوکسین ۱۰ mg، بیوتین ۱ mg، کولین کلراید ۵۶۰ mg، اتوکسی کوئین ۱۲۵ mg
۲. مکمل معدنی تأمین شده به ازای هر کیلوگرم جیره: منگنز (از  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ) ۶۵ mg، روی (از ZnO) ۵۵ mg، آهن (از  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ۵۰ mg، مس (از  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) ۸ mg، ید (از  $Ca(IO_3)_2 \cdot 2H_2O$ ) ۱/۸ mg، سلنیم ۰/۳۰ mg، کبالت (از  $Co_2O_3$ ) ۰/۲۰ mg، مولیبدن ۰/۱۶ mg

## تولیدات دامی

دوره ۱۹ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۶

اثر تزریق زرده تخم مرغ بومی خزک به زرده تخم مرغ سویهٔ راس بر عملکرد، ایمنی و بیان ژن TLR4

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژنهای TLR4 و  $\beta$ -actin

ژن	پرایمر (3'→5')	شمارهٔ ثبت در بانک ژن	اندازهٔ قطعه (جفت باز)
TLR4	CTGACCTACCCATCGGACAC GCCTGAGAGAGGTCAGGTTG	KP410249.1	۱۱۱
$\beta$ -actin	AGACATCAGGGTGTGATGGTTGGT TCCAGTTGGTGACAATACCGTGT	NM_205518.1	۱۲۵

جدول ۳. جدول دمایی و زمانی واکنش Real time PCR برای تکثیر ژنهای TLR4 و  $\beta$ -actin

مراحل چرخه	دما (سانتی گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد چرخه
فعال سازی اولیه آنزیم	۹۵	۶۰۰	۱
واسرشت ثانویه	۹۵	۱۵	
اتصال آغازگرها به الگو	۵۶	۲۰	۴۵
طولیل سازی	۷۲	۲۰	
ترسیم منحنی ذوب	افزایش دما از ۵۵ درجه تا ۹۹ درجه، هر پنج ثانیه یک درجه		

مقطر دوبار تقطیر ( Master mix: 4 $\mu$ l, cDNA: 1 $\mu$ l, Primer mix: 1 $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O: 14 $\mu$ l)، مخلوط و در نهایت واکنش Real Time PCR براساس برنامهٔ دمایی بهینه شده مطابق جدول ۳ انجام شد.

پس از انجام واکنش Real-time PCR، الگوی منحنی های ذوب نیز بررسی و به منظور تأیید نتایج از الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز استفاده شد. پس از پایان واکنش ها، C<sub>T</sub> های خام مربوط به بیان ژن های رفرنس و هدف در نمونه های شاهد و کنترل جمع آوری و مقایسهٔ بیان نسبی داده های حاصل از گروه های آزمایشی به روش  $\Delta\Delta C_t$  و با استفاده از الگوریتم نرم افزار  $\Delta\Delta C_t$  (http://www.gene-quantification.de/rest-2009.html) انجام شد [۲۵]. در نهایت، داده ها با رویهٔ GLM نرم افزار JMP بر مبنای مدل آماری ۱ آنالیز شد. میانگین گروه های آزمایشی به کمک آزمون تی استیودنت در سطح احتمال  $p < 0.05$  مقایسه شد.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad (1)$$

برای بررسی تأثیر تزریق زرده بر الگوی بیان نسبی TLR4، نخست RNA تام بافت کبدی نمونه های آزمایشی با استفاده از محلول ترایزول طبق دستورالعمل استخراج و به دنبال آن سنتز cDNA از نمونه های RNA حاصل از نمونه های کبدی، با استفاده از کیت HyperScript<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase (GeneAll, Seoul, Korea) انجام شد. برای مقایسهٔ میزان بیان نسبی ژن TLR4 در گروه های آزمایشی از پرایمرهای اختصاصی برای ژن های TLR4 و  $\beta$ -actin، پس از مقایسه با توالی ثبت شده در NCBI استفاده شد (جدول ۲).

بررسی بیان نسبی ژن TLR4 به روش RT-PCR و با استفاده از رنگ سایبرگرین (SYBR Green) انجام شد. در انجام واکنش های Real Time PCR از دستگاه Corbett Rotor-Gene 3000 SYBR Green Master Mix استفاده شد. طبق دستورالعمل کیت مربوط، اجزای واکنش که عبارت بود از نسبت معینی از کیت SYBR Green Master Mix، پرایمرهای رفت و برگشت، cDNA و آب

## تولیدات دومی

در این رابطه  $Y_{ij}$  مقدار رکورد اندازه گیری شده در تکرار  $j$ ام از تیمار  $i$ ام (نرخ جوجه درآوری، میزان افزایش وزن جوجه ها در فواصل زمانی معین تولد تا ۱۴ روزگی، ۱۴-۲۸ روزگی، ۲۸-۴۲ روزگی و ۴۲-۷۲ روزگی)،  $\mu$  میانگین کل،  $T_i$  اثر تیمار تزریق زرده، و  $e_{ij}$  خطای تصادفی باقی مانده است.

## نتایج و بحث

تزریق زرده مرغ بومی خزک به تخم مرغ های سویه راس بر میزان جوجه درآوری و میزان افزایش وزن در سنین ۱۴-۲۸ روزگی تأثیر نداشت ( $p > 0/05$ ; جدول ۴). در مقابل، تزریق زرده مرغ بومی خزک نه تنها سبب افزایش وزن جوجه ها در دوره های سنی تولد تا ۱۴ روزگی و ۱۴-۲۸ روزگی شد، بلکه سبب افزایش میزان وزن نهایی (۴۲ روزگی) این گروه از پرندگان در مقایسه با پرندگان گروه شاهد شد ( $p < 0/05$ ; جدول ۴).

زرده تخم مرغ منبع اصلی مواد مغذی برای جنین های در حال رشد است، به طوری که لپیدها، ویتامین های محلول در چربی و کارتنوئیدها منحصراً در زرده یافت می شوند [۲]. در این راستا، نتایج مطالعات مختلف در رابطه با تأثیر تزریق اسیدهای آمینه و کربوهیدرات ها به داخل تخم مرغ، حاکی از تأثیر مثبت تزریق این دسته از

مواد بر عملکرد، ایمنی و کیفیت لاشه جوجه های حاصل است [۶، ۷]. در عین حال، گزارش شده است که مادر در پاسخ به تغییرات محیطی نظیر تغییرات درجه حرارت محیط، تغییر ترکیبات جیره و یا تنش های محیطی قادر به تعدیل میزان انباشت سطوح هورمون هایی از قبیل تستوسترون، استروژن، پروژسترون، کورتیکوسترون و یا هورمون های تیروئیدی در تخم مرغ است [۱۶]. لذا، سازوکارهای مؤثر در فرایند تکوین، رشد و حتی الگوهای رفتاری نتاج را برنامه ریزی و تعیین می کند. اعتقاد بر این است که این آثار بلندمدت احتمالاً به واسطه تأثیر ترکیبات تخم مرغ بر شکل گیری الگوهای اپی ژنتیکی DNA نتاج در مراحل اولیه دوران جنینی است. گزارش شده است که الگوهای اپی ژنتیکی که در اوایل دوره جنینی شکل می گیرد، الگوهای بیان ژن را در مراحل بعدی تکامل به صورت معناداری تحت تأثیر قرار می دهد [۱۰، ۱۱]. بر این اساس، از آنجا که در این مطالعه مرغان مادر برای مدت دو ماه در شرایط یکسان پرورش داده شدند، لذا تأثیر تزریق زرده خزک به راس برروی عملکرد رشد، نه به واسطه تأثیر عوامل محیطی، بلکه احتمالاً به دلیل اثر نژاد برروی ترکیبات زرده تخم مرغ است.

جدول ۴. اثر تزریق زرده مرغ بومی خزک به زرده تخم مرغ سویه راس بر جوجه درآوری و افزایش وزن (گرم) نتاج حاصل در هفته های مختلف پرورش (میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد)

تیمار / هفته	تفریح (درصد)	تولد-۱۴ روزگی	۱۴-۲۸ روزگی	۲۸-۴۲ روزگی	۴۲-۷۲ روزگی
تزریق	۵۰/۶۶ $\pm$ ۰/۷۹	۳۷۶/۰۷ $\pm$ ۹/۹۶ <sup>a</sup>	۸۱۸/۹۶ $\pm$ ۳۰/۹۸	۱۰۹۶/۵۶ $\pm$ ۳۶/۸۰ <sup>a</sup>	۲۳۳۵/۸۸ $\pm$ ۶۳/۳۸ <sup>a</sup>
شاهد	۴۹/۵۰ $\pm$ ۱/۱۷	۳۱۶/۷۹ $\pm$ ۱۵/۵۷ <sup>b</sup>	۶۹۷/۲۰ $\pm$ ۵۵/۱۱	۸۷۱/۶۵ $\pm$ ۶۱/۹۶ <sup>b</sup>	۱۹۲۷/۵۰ $\pm$ ۱۰۶/۶۸ <sup>b</sup>
P-value	۰/۴۱۹	۰/۰۰۳	۰/۰۵۷	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳

a-b تفاوت میانگین ها در هرستون معنادار است ( $p < 0/05$ ).

## تولیدات دامی

دوره ۱۹ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۶

#### اثر تزریق زرده تخم مرغ بومی خزک به زرده تخم مرغ سویه راس بر عملکرد، ایمنی و بیان ژن TLR4

وزن نسبی اندام‌های لنفوییدی معمولاً به‌عنوان شاخصه‌ای برای ارزیابی تأثیر افزودنی‌های غذایی، سموم یا تنش‌های محیطی بر عملکرد سیستم ایمنی طیور بررسی می‌شود [۱۷، ۲۲]. با وجود این، گزارش‌های متناقضی در خصوص تأثیر ترکیبات خوراک، مواد افزودنی، سموم یا تنش‌های محیطی بر هم‌بستگی وزن نسبی اندام‌های مذکور و کارایی سیستم ایمنی منتشر شده است [۱۷، ۲۲]. تناقض در گزارش‌ها ممکن است به دلیل عواملی چون نوع تیمار یا تنش، ترکیب ماده غذایی، پایین بودن نمونه‌های آزمایشی یا به‌واسطه خطای اندازه‌گیری باشد. هر چند علت تأثیر تزریق زرده بر کارایی ایمنی نتایج نامشخص است، گزارش شده است که ایمنی مادری حاصل از انتقال آنتی‌بادی‌های مادری، لکتین، لیزوزوم‌ها و سایر پپتیدهای ضد میکروبی عامل اصلی مصونیت جوجه‌ها در مقابله با پاتوژن‌ها به‌خصوص در دوران اولیه زندگی است [۸، ۱۸].

بر اساس نتایج این پژوهش، تزریق زرده مرغ خزک به کیسه زرده تخم مرغ‌های سویه راس اثر معناداری بر وزن نسبی کبد، طحال و بورس فابرسیوس در بازه‌های زمانی مورد بررسی نداشت (جدول ۵). هر چند عیار آنتی‌بادی تولیدشده بر علیه ویروس نیوکاسل حاکی از تأثیر مثبت تزریق زرده خزک بر میانگین تیتراژ آنتی‌بادی تولیدشده علیه ویروس نیوکاسل (ایمنی همورال) بود، به‌طوری که عیار پادتن تولیدشده علیه ویروس نیوکاسل در جوجه‌های حاصل از تزریق زرده مرغ بومی خزک در مقایسه با گروه شاهد بالاتر بود ( $p < 0.05$ ; جدول ۶).

گزارش‌های محققان نشان داد که تیموس، طحال، کبد و بورس فابرسیوس اندام‌های اصلی دخیل در تنظیم فعالیت سیستم ایمنی طیور به‌واسطه ایفای نقش کلیدی در فاگوسیتوز مؤثر اریتروسیت‌ها، شناسایی پاتوژن‌ها یا تولید آنتی‌بادی‌ها هستند [۱۲، ۱۷]. از آنجا که در برخی مواقع افزایش وزن این اندام‌ها، بیانگر بهبود وضعیت ایمنی است،

جدول ۵. اثر تزریق زرده تخم مرغ خزک به زرده تخم مرغ سویه راس بر وزن نسبی اندام‌های مرتبط با سیستم ایمنی (درصد) در سنین ۲۷ و ۴۲ روزگی

تیمار	۲۷ روزگی			۴۲ روزگی		
	بورس	طحال	کبد	بورس	طحال	کبد
تزریق	۰/۲۷ ± ۰/۰۴	۰/۰۸ ± ۰/۰۲	۲/۹۸ ± ۰/۳۰	۰/۱۵ ± ۰/۰۱	۰/۱۴ ± ۰/۰۴	۲/۵۱ ± ۰/۳۷
شاهد	۰/۳۵ ± ۰/۰۷	۰/۱۰ ± ۰/۰۲	۲/۶۰ ± ۰/۱۷	۰/۱۷ ± ۰/۰۵	۰/۱۵ ± ۰/۰۳	۲/۴۲ ± ۰/۱۳

جدول ۶. اثر تزریق زرده تخم مرغ خزک به زرده تخم مرغ سویه راس بر تیتراژ آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل

گروه آزمایشی	عیار پادتن تولیدشده علیه ویروس نیوکاسل <sup>۱</sup>
شاهد	۴ ± ۰/۲۱ <sup>a</sup>
تزریق زرده	۴/۸۰ ± ۰/۶۳ <sup>b</sup>
P-value	۰/۰۲۴

۱عکس لگاریتم در مبنای دو رقتی که از هموگلوآگلوآگلوآسیون جلوگیری کرده است  
a-b تفاوت میانگین‌ها در هر ستون معنادار است ( $p < 0.05$ ).

## تولیدات دامی

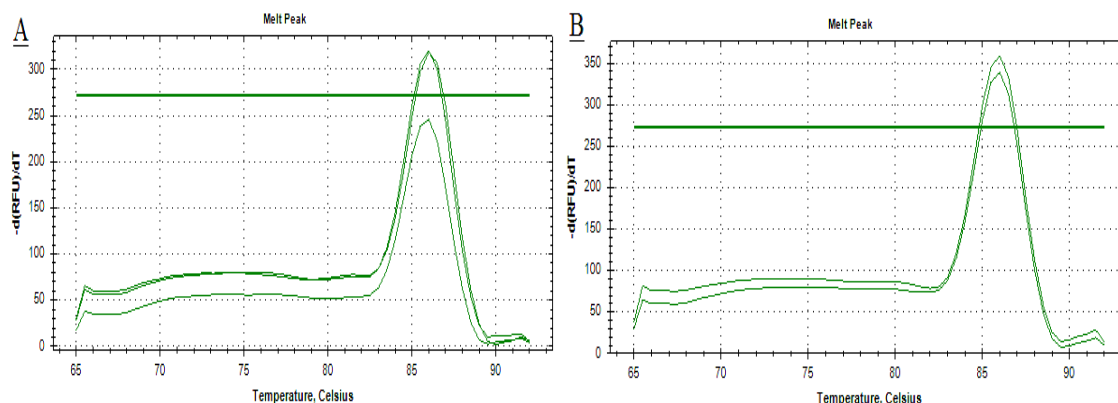
دوره ۱۹ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۶

افزایش مقاومت و نیز بهبود قابلیت زنده‌مانی نتاج در هنگام مواجهه با چالش‌های بعدی با پاتوژن‌ها را دنبال دارد. به علاوه، آثار فرانسلی اپی‌ژنتیکی ناشی از شرایط محیطی مادر از قبیل وضعیت تغذیه مادر، چالش مادر با پاتوژن‌ها و یا توکسین‌ها بر فرایند تکوین و نیز عملکرد سیستم ایمنی نتاج، به واسطه تأثیر بر الگوی بیان ژن‌های مؤثر در فعالیت سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی اثبات شده است [۱۰]. از دیدگاه تکاملی، توارث فرانسلی الگوهای اپی‌ژنتیکی (Transgenerational epigenetic inheritance) مربوط به کارایی سیستم ایمنی ممکن است راهبردی برای افزایش شانس زنده‌مانی افراد در زمان مواجهه با تنش‌های آتی و نهایتاً حفظ پایداری و ثبات جمعیت باشد [۸].

منحنی ذوب ژن‌های مورد بررسی (هدف و رفرنس) به صورت تک‌قله به دست آمد (شکل ۱)، که دلالت بر اختصاصی بودن واکنش‌های PCR دارد. علاوه بر این، الکتروفورز محصولات PCR بر ژل آگارز (درصد) نیز صحت اختصاصی بودن واکنش‌های PCR را تأیید کرد (شکل ۲).

نتایج مطالعات گسترده در خصوص ارتباط بین تغییرات اقلیمی و پیامدهای اکولوژیکی و نیز پاسخ‌های تکاملی موجودات زنده نظیر پراکنش، فیزیولوژی و مورفولوژی دلالت بر اهمیت انعطاف‌پذیری فرایند تکوین در دوران جنینی در پاسخ به سیگنال‌های محیطی دارد. این مسئله تضمین‌کننده احتمال افزایش قابلیت بقا در مواجهه با شرایط پیش‌بینی‌نشده آتی است. بر اساس مدل پاسخ پیش‌بینی آدپتاسیون به شرایط آتی (Predictive adaptive response) مادر قادر به کنترل فرایند تکوین جنین در مواجهه با شرایط پیش‌بینی‌نشده آتی به واسطه کنترل سطوح ترکیبات داخل تخم‌مرغ است، از قبیل هورمون‌ها، آنتی‌بادی‌ها و مواد مغذی و ترکیبات ضد میکروبی تخم‌مرغ [۸، ۱۳].

از طرفی، گزارش شده است که انتقال تجارب مادر در مقابله با پاتوژن‌ها به نتاج (Trans-generational immune priming) آثار مثبتی بر ایمنی نتاج و مقاومت به بیماری‌ها دارد. در این خصوص گزارش شده است که چالش مادران با پاتوژن‌ها، سبب افزایش میزان انتقال آنتی‌بادی‌ها و یا سایر ترکیبات ضد میکروبی به نتاج می‌شود که متعاقباً



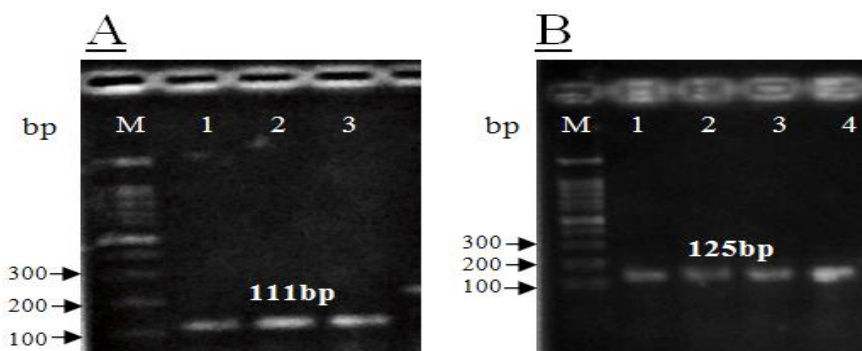
شکل ۱. منحنی ذوب ژن‌های  $\beta$ -actin (A) و TLR4 (B)

## تولیدات دامی

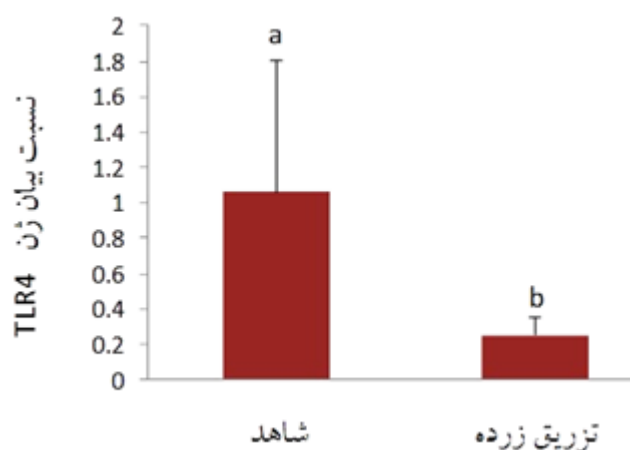
دوره ۱۹ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۶



اثر تزریق زرده تخم مرغ بومی خزک به زرده تخم مرغ سویه راس بر عملکرد، ایمنی و بیان ژن TLR4



شکل ۲. الکتروفورز محصولات تکثیری ژن‌های TLR4(A) و  $\beta$ -actin (B) بر ژل آگارز ۱ درصد. طول قطعه تکثیری در ژن‌های TLR4 و  $\beta$ -actin به ترتیب ۱۱۱ و ۱۲۵ جفت باز بود. چاهک M نشانگر (Ladder) با اندازه ۱۰۰ جفت باز را نشان می‌دهد.



شکل ۳

<sup>a-b</sup> تفاوت میانگین‌ها در هر ستون معنادار است ( $p < 0.05$ ).

پاتوژن‌ها (PAMPs)، همچنین الگوهای مولکولی حاصل از آسیب‌های سلولی (DAMPs) نظیر پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) هستند [۹]. افزایش میزان تولید رادیکال‌های آزاد در پاسخ به شرایط استرس، جراحات و عفونت‌ها، سبب افزایش میزان اکسایش فسفولیپیدهای سلول می‌شود، که فرم اکسیدشده آن (OxPL) نقش آگونیست گیرنده‌های TLR4 را دارد [۲۱]. علاوه بر این، گزارش شده است که بروز سندرم‌های

نتایج حاصل از آنالیز الگوی بیان ژن TLR4 در کبد نشان داد که تزریق زرده خزک به تخم راس سبب کاهش معنادار بیان ژن TLR4 در بافت کبد گروه آزمایشی در مقابل گروه کنترل شد، به طوری که نسبت میزان بیان ژن TLR4 در کبد گروه تزریق زرده به گروه کنترل برابر با ۰/۲۳۵ بود ( $p < 0.05$ ). محققان گزارش کرده‌اند که گیرنده‌های TLR4 موجود در سلول‌های کبدی قادر به شناسایی الگوهای مولکولی

## تولیدات دامی

دوره ۱۹ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۶

اپی ژنتیکی و یا غلظت هورمون‌های استروئیدی تخم‌مرغ باشد [۱۰، ۱۳].

روی هم‌رفته نتایج پژوهش حاضر مبین آن است که احتمالاً تزریق زرده تخم‌مرغ‌های بومی خزرک به تخم‌مرغ‌های سویه تجاری راس در روز اول جنینی، سبب بهبود کارایی سیستم ایمنی و نیز عملکرد مرغان سویه راس در سنین بالاتر می‌شود. بر این اساس، پیشنهاد می‌شود که بخشی از تفاوت‌های فنوتیپی نتاج نژادهای مختلف طیور ممکن است به دلیل تأثیر نژاد بر روی نسبت و ترکیب فاکتورهای مختلف زرده تخم‌مرغ باشد که این عوامل احتمالاً بر روند شکل‌گیری الگوهای اپی ژنتیکی در دوران جنینی مؤثر است.

#### منابع

- [1]. Abasht B, Kaiser MG, van der Poel J and Lamont SJ (2009) Genetic lines differ in Toll-like receptor gene expression in spleens of chicks inoculated with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Poultry Science* 88: 744-9.
- [2]. Anton M, Nau F and Nys Y (2006) Bioactive egg components and their potential uses. *World's Poultry Science Journal* 62: 429-38.
- [3]. Bacon LD, Hunt HD and Cheng HH (2000) A review of the development of chicken lines to resolve genes determining resistance to diseases. *Poultry Science* 79: 1082-93.
- [4]. Bailey MT, Engler H, Powell ND, Padgett DA and Sheridan JF (2007) Repeated social defeat increases the bactericidal activity of splenic macrophages through a Toll-like receptor-dependent pathway. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293: R1180-90.
- [5]. Berghof TV, Parmentier HK and Lammers A (2013) Transgenerational epigenetic effects

متابولیک نه تنها با بروز التهابات همراه است، بلکه سبب افزایش بیان TLR4 در مونوسیت‌ها می‌شود. افزایش نفوذپذیری روده نسبت به باکتری‌های گرم منفی باعث فعال‌سازی گیرنده‌های TLR4 در خون و یا غدد لنفاوی می‌شود. تنش‌های سایکولوژیکی از دیگر عواملی است که سبب القای بیان TLR4 می‌شود؛ به عبارتی، گزارش شده است که TLRها در پاسخ‌های ایمنی - عصبی دخالت دارند [۴]. افزایش میزان بیان iNOS به واسطه فعال‌شدن گیرنده TLR4 به ترتیب با افزایش میزان آسیب DNA میتوکندری سلول‌های کبدی، افزایش فیروز و نیز کاهش میزان ATP در سلول‌های کبدی همراه است [۱۴]. در مقابل گزارش شده است که مواجهه با ترکیبات لیپولی ساکاریدی دیواره باکتری‌ها سبب کاهش حساسیت ماکروفاژها به اندوتوکسین‌ها و سایر محرک‌های سیستم ایمنی می‌شود، که از آن با عنوان پدیده تحمل به اندوتوکسین‌ها (Endotoxin tolerance) یاد می‌شود [۱۹، ۲۰].

گزارش شده است که القای فعالیت ممانعت‌کننده‌های گیرنده TLR4 و نیز ممانعت‌کننده‌های فعالیت فاکتورهای رونویسی NF- $\kappa$ B و AP-1 نظیر MAPK phosphatase-1 و SOCS-1 سبب کاهش بروز پاسخ‌های التهابی ناشی از لیپولی ساکاریدهای گرم منفی می‌شود [۱۹]. سازوکار عمل تزریق زرده بر کاهش میزان بیان ژن TLR4 کبدی مشخص نیست، ولی از آنجا که از جمله عوامل القای بیان TLR4، افزایش میزان انتشار الگوهای مولکولی مرتبط با تخریب (DAMPs) ناشی از فعالیت بیشینه رادیکال‌های آزاد (ROS/RNS-induced DAMPs)، کاهش یا افزایش سطوح غلظت هورمون‌های استروئیدی نظیر استروژن و تستوسترون است، بخشی از تفاوت الگوی بیان، ممکن است به دلیل تأثیر مادر بر الگوی بیان ژن‌های دخیل در فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدان‌ها، مسیرهای متابولیک و یا الگوهای رفتاری به واسطه تأثیر بر فعالیت مدیفایرهای

#### تولیدات دامی

- Science 92: 2904-13.
- [6]. Bhanja S, Sudhagar M, Goel A, Pandey N, Mehra M and Agarwal S (2014a) Differential expression of growth and immunity related genes influenced by in ovo supplementation of amino acids in broiler chickens. *Czech Journal of Animal Science* 59: 399-408.
- [7]. Bhanja SK, Goel A, Pandey N, Mehra M, Majumdar S and Mandal AB (2015) In ovo carbohydrate supplementation modulates growth and immunity-related genes in broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 99(1): 163-173.
- [8]. Broggi J, Soriguer RC and Figuerola J (2016) Transgenerational effects enhance specific immune response in a wild passerine. *Peer J* 4: e1766.
- [9]. Chang WJ and Toledo-Pereyra LH (2012) Toll-like receptor signaling in liver ischemia and reperfusion. *Journal of Investigative Surgery* 25: 271-7.
- [10]. Dixon LM, Sparks NH and Rutherford KM (2016) Early experiences matter: a review of the effects of prenatal environment on offspring characteristics in poultry. *Poultry Science* 95: 489-99.
- [11]. Fresard L, Morisson M, Brun JM, Collin A, Pain B and Minvielle F (2013) Epigenetics and phenotypic variability: some interesting insights from birds. *Genetics Selection Evolution* 45: 16.
- [12]. Gao B, Jeong WI and Tian Z (2008) Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 47: 729-36.
- [13]. Groothuis TG and Schwabl H (2008) Hormone-mediated maternal effects in birds: mechanisms matter but what do we know of them? *Philosophical transactions of the Royal Society on innate immunity in broilers: an underestimated field to be explored? Poultry Society of London Series B, Biological Sciences* 363: 1647-61.
- [14]. Guo J and Friedman SL (2010) Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 3: 21.
- [15]. Hossain KM, Ali MY and Yamato I (2010) Antibody levels against newcastle disease virus in chickens in Rajshahi and surrounding districts of Bangladesh. *International Journal of Biology* 2(2): 102-106.
- [16]. Hsu BY, Dijkstra C, Darras VM, de Vries B and Groothuis TG (2016) Maternal adjustment or constraint: differential effects of food availability on maternal deposition of macro-nutrients, steroids and thyroid hormones in rock pigeon eggs. *Ecology and Evolution* 6: 397-411.
- [17]. Kidd MT (2004) Nutritional modulation of immune function in broilers. *Poultry Science* 83: 650-7.
- [18]. Lardinois A, van den Berg T, Lambrecht B and Steensels M (2014) A model for the transfer of passive immunity against Newcastle disease and avian influenza in specific pathogen free chickens. *Avian Pathology: Journal of the WVPA* 43: 118-24.
- [19]. Liu ZJ, Liu XL, Zhao J, Shi YJ, Yan LN and Chen XF (2008) The effects of SOCS-1 on liver endotoxin tolerance development induced by a low dose of lipopolysaccharide are related to dampen NF-kappaB-mediated pathway. *Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 40: 568-77.

- [20].Lopez-Collazo E and del Fresno C (2013) Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences. *Critical Care* 17: 242.
- [21].Lucas K and Maes M (2013) Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Molecular Neurobiology* 48: 190-204.
- [22].Manafi M, Pirany N, Noor Ali M, Hedayati M, Khalaji S and Yari M (2015) Experimental pathology of T-2 toxicosis and mycoplasma infection on performance and hepatic functions of broiler chickens. *Poultry Science* 94: 1483-92.
- [23].NRC (1994) *Nutrient Requirements of Poultry*. National Academy Press. Washington, DC.
- [24].O'Neill LA, Golenbock D and Bowie AG (2013) The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 13: 453-60.
- [25].Pfaffl MW, Horgan GW and Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30: e36.



Journal of  
**Animal Production**  
(College of Abouraihan – University of Tehran)

Vol. 19 ■ No. 2 ■ Summer 2017

## The effects of in-ovo injection of Native Khazak egg yolk into the Ross eggs yolk on performance, immunity and expression of TLR4 gene

*Farzaneh Bazmandegan Shomeyli<sup>1</sup>, Mehdi Vafaye Valleh<sup>2\*</sup>, Gholamreza Dashab<sup>2</sup>, Farzad Bagherzadeh Kasmani<sup>3</sup>*

1. M.Sc., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
2. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
3. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

Received: December 3, 2016

Accepted: January 15, 2017

### Abstract

To examine the possible role of maternal effect on progeny immune system development, the injection effects of the Khazak yolk into the yolk of the commercial Ross egg on the performance, immunity and expression of TLR4 was determined in a commercial Ross chicken. For this purpose, 150 Ross fertile eggs were randomly assigned to two experimental groups including group I (control in-ovo Ross yolk injection) and group II (in-ovo Khazak yolk injection) and were kept in incubator for three weeks. After incubation period, newly hatched chickens were fed with balanced ration for six weeks. Three chickens from each experimental group were killed at 27- and 42-d post hatch for analysis of immune organs weight (liver, burs and thymus), the HI anti-body titer levels and liver TLR4 mRNA expression levels. The results of statistical analysis demonstrated that the in-ovo injection of Khazak yolk into the Ross eggs not only significantly enhances growth rate and immune function but also decreases expression of TLR4 mRNA in the liver of treated group compared with the control group ( $p < 0.05$ ). Based on these results, it's possible that injection of Khazak yolk into the Ross eggs at the first day of embryonic development enhances the chicken immune response at older ages.

**Keywords:** egg yolk, Khazak native chickens, maternal effects, TLR4.