

تأثیر اکسید روی فعال شده بر تغییرات سرمی اینترلوکین ۶، عامل نکروزه کننده تومور آلفا و اوکلودنس ۱ در مرغ مادر گوشتی

الهام داری^۱، مجتبی زاغری^{۲*} و مسعود برزگر^۳

۱، ۲ و ۳. پژوهشگر پسا دکتری، استاد و دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۶)

چکیده

این پژوهش با هدف مطالعه تأثیر ویژگی‌های فیزیکی اکسید روی بر تغییرات سرمی اینترلوکین ۶، عامل نکروزه کننده تومور آلفا و اوکلودنس ۱ در مرغ مادر گوشتی انجام شد. برای انجام این پژوهش از ۲۰۰ قطعه مرغ مادر سویه راس ۳۰۸، در سن ۵۴ هفته‌گی، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار، ۵ تکرار و ۱۰ پرنده در هر تکرار استفاده شد. در این پژوهش، دو سطح روی (۷۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و دو نوع منبع اکسید روی (اکسید روی معمولی و اکسید روی فعال شده) استفاده شد. عملکرد تولیدی پرنده‌ها و در پایان آزمایش غلظت اینترلوکین ۶ (IL-6)، عامل نکروزه کننده تومور آلفا (TNF α) و اوکلودنس ۱ (ZO-1) در سرم خون، مورد سنجش قرار گرفت. تأمین ۷۰ میلی‌گرم روی در کیلوگرم جیره در هر دو شکل ساده و فعال شده خود، غلظت TNF α و ZO-1 را افزایش داد ($P < 0.01$). در مقابل افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم اکسید روی از هر دو منبع موجب کاهش فاکتورهای پیش التهابی و کاهش غلظت ZO-1 در خون شد ($P < 0.01$). نتایج این پژوهش نشان داد غلظت فاکتورهای التهابی و غلظت پروتئین‌های اتصالات محکم سرم خون در مرغ‌های مادر که احتمالاً به دلیل مصرف یک وعده خوراک در روز در معرض التهاب روده هستند با مصرف سطوح بالاتر روی کاهش می‌یابد و تغییر فاکتورهای التهابی و مقدار پروتئین‌های اتصالات محکم نیز در یک راستا بودند. مصرف ۱۰۰ میلی‌گرم اکسید روی فعال نسبت به ۷۰ میلی‌گرم موجب کاهش IL-6 شد ($P < 0.01$). بنابراین این چنین نتیجه‌گیری می‌شود که تغییر ویژگی‌های فیزیکی، عملکرد اکسید روی را بهبود بخشیده است.

واژه‌های کلیدی: اکسید روی، تغییرات سرمی، مرغ مادر، ویژگی‌های فیزیکی.

Effects of activated zinc oxide on serum changes of interleukin 6, tumor necrosis factor alpha and occludance 1 in broiler breeder hens

Elham Darsi¹, Mojtaba Zhaghari^{2*} and Masoud Barzegar³

1, 2, 3. Postdoctoral Researcher, Professor and Ph. D. Candidate, Department of Animal Science, University of Tehran, College of Agriculture and Natural Resources, Karaj, Iran

(Received: Apr. 13, 2020 - Accepted: Aug. 27, 2020)

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of physical properties of zinc oxide on serum changes of interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF α) and occludance 1 (ZO-1) in broiler breeders. A total of 200 hens (Ross 308), at the age of 54 weeks, was used in a completely randomized design with 4 treatments, 5 replications, and 10 birds per replication. In this study, two levels of zinc (70 and 100 mg/kg diet), and two ZnO sources (regular zinc oxide and activated zinc oxide) were used. The production performance of the birds and the concentration of interleukin 6, tumor necrosis factor and occludin in serum were measured at the end of the experiment. The supply of 70 mg/kg diet in both its regular and activated ZnO forms increased blood concentration of TNF α and ZO-1 ($P < 0.01$). In contrast, addition of 100 mg of ZnO from both sources reduced pro-inflammatory factors and concentration of ZO-1 in the blood ($P < 0.01$). Results of present study showed that the concentration of blood inflammatory factors and tight junction proteins in hens that are prone to intestinal inflammation which probably occur due to a meal in a day decreases with the consumption of higher levels of zinc. Changes in inflammatory factors and the concentration of tight junction proteins were in the same direction. Consumption of 100 mg of activated ZnO decreased IL-6 compared to 70 mg ($P < 0.01$). Therefore, it is concluded that the change in physical properties, has improved the functionality of ZnO.

Keywords: Zinc oxide, physical properties, serum changes, broiler breeder

* Corresponding author E-mail: mzaghari@ut.ac.ir

مقدمه

روی یک عنصر کمیاب ضروری در مایعات و بافت‌های بدن بوده و برای زنده‌مانی و عملکرد صحیح سلول‌ها در شرایط مختلف فیزیولوژیکی مانند ایمنی، توانایی آنتی‌اکسیدانی و فرایندهای اپی‌ژنتیک ضروری است (Huang *et al.*, 2019; Ao & Pierce, 2013). روی کوفاکتور ضروری برای بیش از ۳۰۰ آنزیم از جمله آلکالین فسفاتاز و کربونیک انهدراز (MacDonald, 2000) است و احتمالاً از طریق کنترل ساختار و عملکرد سد غشایی، در حفظ ایمنی بدن نقش دارد (Zhang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013) و این عملکرد روی در مورد دستگاه گوارش که پیوسته در معرض التهاب، عوامل بیماری‌زا و عوامل مضر می‌باشد اهمیت بیشتری دارد. این عنصر سامانه ایمنی ذاتی (غیراختصاصی) و اکتسابی (اختصاصی) را تحت تأثیر قرار می‌دهد و تأثیر گسترده‌ای در واسطه‌های اصلی سامانه ایمنی مانند سایتوکاین‌ها و آنزیم‌ها برای تقویت پاسخ‌های ایمنی از طریق فعال‌سازی ایمنی سلولی و خونی دارد (Dardenne, 2002). به‌طور کلی، روی سیستم دفاعی را از طریق کنترل پاسخ‌های التهابی (Finamore *et al.*, 2008) و حفظ ساختار و عملکرد سد غشایی (Lambert *et al.*, 2004) تحت تأثیر قرار می‌دهد.

آلکالین فسفاتاز جز دسته‌ای از ایزوآنزیم‌ها است که در لایه بیرونی غشای سلول قرار دارد و هیدرولیز استر فسفات آلی را در فضای خارج سلولی کاتالیز می‌کند. روی و منیزیم از کوفاکتورهای این آنزیم هستند. آلکالین فسفاتاز روده‌ای یکی از انواع ایزوآنزیم‌ها است که کارکردهای زیادی در دستگاه گوارش دارد و اثر ضدالتهابی آن از جمله مهمترین این کارکردهاست که از طریق غیر فعال کردن لیپوپلی ساکاریدها این وظیفه را انجام می‌دهد. آلکالین فسفاتاز روده‌ای مقدار نفوذپذیری روده را نیز تنظیم می‌کند.

روی به‌واسطه تأثیر بر تولید آنزیم کربونیک انهدراز که در تولید کربنات کلسیم پوسته تخم‌مرغ نقش دارد و همچنین تأثیر بر بافت پوششی مجرای تولید تخم، با نقشی که در ساختن پروتئین‌ها دارد تشکیل تخم‌مرغ را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (Mayer *et al.*, 2018).

سد روده‌ای از پروتئین‌هایی به نام اتصالات محکم تشکیل شده است. اتصالات محکم از پروتئین‌های غشایی چهاروجهی شامل اکلودین (occludin)، تری‌سلولین (tricellulin) و اعضای خانواده کلادین (claudin) و همچنین از پروتئین غشایی تک‌وجهی، زونا اوکلودنس (ZO) ۱، ۲، ۳ و ZAK و چندین پروتئین غشایی محیطی تشکیل شده است (Walter *et al.*, 2009). نقش اولیه اتصالات محکم، تنظیم نفوذپذیری خارج سلولی سد روده‌ای در سلول‌های پوششی است. نتایج مطالعات پایه و آزمایشگاهی نشان داده است که روی در تنظیم سد اتصالات محکم روده‌ای نقش دارد (Zhang & Guo, 2009; Wang *et al.*, 2013). هرچند نقش دقیق روی در نگهداری ساختار و انسجام اتصالات محکم سلول‌های اپیتلیال در انواع مختلف سلول‌های روده‌ای مشخص نیست (Miyoshi *et al.*, 2016). به‌طور کلی، آلکالین فسفاتاز روده‌ای میزان نفوذپذیری روده را از طریق دو مسیر، کاهش بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular Endothelial Growth Factor) که با کاهش پروتئین‌های دفسفریله مسیر فرستنده سیگنال (ERK)، نفوذپذیری را افزایش می‌دهند و محکم‌تر کردن سد غشایی از طریق تنظیم بیان کلودین ۲، کاهش می‌دهد (Wang *et al.*, 2015).

روی معمولاً به‌صورت یک منبع غیرآلی مانند سولفات روی، کلراید روی و اکسید روی و یا به‌صورت یک منبع آلی مانند کمپلکس‌های پروتئینی، آمینواسیدی و کربوهیدراتی به جیره اضافه می‌شود. ارزش تغذیه‌ای منابع مواد معدنی به میزان زیست‌فراهمی آن ماده برای طیور بستگی دارد (Salim *et al.*, 2008). میزان زیست‌فراهمی عناصر میکرو به‌عنوان بخشی از عنصر خورده شده، که جذب شده و به محل فعالیت خود منتقل شده و به شکل فعال خود تبدیل می‌شود، تعریف شده است (O'Dell, 1983). حلالیت نیز یک فاکتور اساسی برای جذب مواد معدنی کم نیاز است. با افزایش میزان زیست‌فراهمی مواد معدنی مقداری از این مواد که برای رفع نیازهای حیوان باید به جیره اضافه شود کاهش و در نتیجه کاهش مصرف، مقدار دفع آن‌ها توسط پرنده کاهش

در هر تکرار انجام شد. بنابراین در مجموع $200 = 10 \times 5 \times 4$ قطعه مرغ مادر گوشتی سویه "راس ۳۰۸" در سن ۵۴ هفتگی و به مدت ۱۲ هفته استفاده گردید. تیمارهای مورد مطالعه شامل دو سطح توصیه شده و پایین تر از نیاز عنصر روی (۱۰۰ و ۷۰ میلی گرم در کیلوگرم) و ۲ نوع منبع اکسید روی (اکسید روی معمولی و اکسید روی فعال شده) بود. اکسید روی فعال شده از لحاظ اندازه ذرات و شکل ظاهری با اکسید روی معمولی متفاوت است به نحوی که ذرات اکسید روی فعال شده چسبندگی ندارند و به خوبی در خوراک توزیع می شوند (Zaghari & Honarbaksh, 2020).

ویژگی های فیزیکی منبع اکسید روی فعال شده شامل شکل، اندازه ذرات، سیالیت و میزان تخلخل در آزمایشگاه تخصصی مینا پیور مورد اندازه گیری قرار گرفت. اندازه ذرات و شکل آن ها با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus, CX22LED)، دوربین دیجیتال (KECAM-SPCMOS05000KPA) و نرم افزار کنترل دوربین (KEView) اندازه گیری شد. میزان روی موجود در هر دو منبع روی ۷۶ درصد بود که با روش طیف سنجی جذب اتمی اندازه گیری شد. در جیره های آزمایشی از مکمل معدنی فاقد عنصر روی، که از شرکت مکمل سازی مینا پیور تهیه شده بود، استفاده شد. مرغ ها تحت الگوی نوری ۱۳:۳۰ ساعت روشنایی و ۱۰:۳۰ ساعت تاریکی قرار گرفتند. ساعات روشنایی از ۷ صبح تا ۸:۳۰ شب بود. دمای آشیانه از طریق کنترل سیستم تهویه و گرمایش، در محدوده ۲۲-۲۳ درجه سانتی گراد نگهداری شد. چهار تیمار برای انجام این آزمایش در نظر گرفته شد که در تیمار اول و دوم سطح ۷۰ و ۱۰۰ میلی گرم روی در کیلوگرم جیره از منبع اکسید روی معمولی و در تیمار سوم و چهارم همین سطوح روی از منبع اکسید روی فعال شده استفاده شد. جیره های آزمایشی بر اساس جدول احتیاجات غذایی مرغ مادر گوشتی (ROSS 308, 2016) تنظیم شدند (جدول ۱) و به ترتیب ۱۵۵ و ۱۳۰ گرم خوراک به ازای هر مرغ و خروس در چهار هفته اول پژوهش در نظر گرفته شد و از هفته پنجم ۵ گرم به مقدار جیره های مصرفی افزوده شد. پیش از

می یابد (Cheng *et al.*, 1998). منابع مختلف اکسید روی از نظر ویژگی های فیزیکوشیمیایی مانند اندازه ذرات، شکل و اندازه سطح، اختلافاتی دارند که می تواند زیست فراهمی روی را تحت تأثیر قرار دهد (Alves *et al.*, 2018). با تغییر ویژگی های فیزیکی اکسید روی معمولی یعنی اندازه و شکل ذرات، سطح آن افزایش یافته و در نتیجه راحت تر از ذرات بزرگ جذب می شوند.

اعمال محدودیت خوراکی در پرنده ها موجب تخریب بافت پوششی روده و افزایش نفوذ پذیری و یا نشت از روده (Leaky gut) می شود (Kuttappan *et al.*, 2015). محدودیت خوراکی موجب افزایش سطح کورتیکوسترون پلازما می گردد که نتیجه آن اختلال در یکپارچگی سد روده ای و بروز التهاب سیستمی و موضعی است (Abu-Dieyeh, 2006). روی دارای نقش حیاتی در حفظ یکپارچگی سلول های پوششی و عملکرد سد روده ای در موش (Sturniolo *et al.*, 2002) و انسان (Roy *et al.*, 1992) است و کمبود روی موجب ایجاد زخم در پرزهای روده و آسیب به عملکرد سد ایمنی آن می شود (Wapnir, 2000). نقش روی در پاسخ های ضد التهابی و مقاومت در برابر عفونت ها نیز اثبات شده است (Shankar & Prasad, 1998). در مرغ های مادر گوشتی نیز که در روز یک وعده خوراک محدود دریافت می کنند و قسمتی از روز دستگاه گوارش آنها خالی است احتمال بروز التهاب در روده وجود دارد. بر این اساس هدف از انجام این آزمایش بررسی تأثیر تغییر و بهبود ویژگی های فیزیکی اکسید روی معمولی بر تغییرات سرمی اینترلوکین ۶، عامل نکروزه کننده تومور آلفا و اوکلودنس ۱ برای مطالعه عملکرد فیزیولوژیکی روی و تأثیر آن بر سلامت روده در مرغ های مادر گوشتی بود.

مواد و روش ها

این پژوهش در آشیانه پرورش مرغ تخم گذار، واقع در مزرعه آموزشی پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت متعادل با ۴ تیمار در ۵ تکرار و ۱۰ مشاهده

استفاده از میکرومتر دیجیتالی در سه بخش انتهایی پهن، انتهای باریک و بخش میانی اندازه‌گیری شد و میانگین این سه عدد به‌عنوان ضخامت پوسته در نظر گرفته شد. در سن ۶۵ هفتگی، از دو پرنده در هر تکرار، نمونه خون به میزان تقریبی ۳ میلی‌لیتر از ورید بازویی گرفته شد. سپس، سرم خون جدا شده و توسط پیپت‌های پاستور یک‌بار مصرف به میکروتیوب‌های درب‌دار انتقال و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد گردید. غلظت اینترلوکین ۶، عامل نکره‌کننده تومور آلفا و پروتئین‌های اتصالات محکم (اوکلودنس) موجود در سرم با استفاده از تکنیک الایزا و کیت‌های تجاری ویژه طیور (BT., changhai, China) اندازه‌گیری شد. میزان حساسیت کیت‌های IL6، TNF α و ZO-1 به ترتیب ۰/۵۳، ۲/۳۵ و ۰/۰۲۸ نانوگرم بر میلی‌لیتر بود. داده‌های به‌دست‌آمده در این پژوهش با استفاده از رویه GLM از نرم‌افزار SAS 9.3 (2011) در قالب طرح کاملاً تصادفی آنالیز شدند و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد مقایسه گردید. مدل آماری طرح به‌صورت زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

که در آن Y_{ij} : مشاهدات، μ : میانگین، T_i : اثر تیمار

و e_{ij} : اشتباه آزمایشی بود.

نتایج و بحث

اندازه ذرات در اکسید روی فعال‌شده، کوچک‌تر از اکسید روی معمولی بود و زاویه ریزش بهتری داشت در نتیجه قابلیت مخلوط‌شدن آن‌ها با جیره پایه بهتر از اکسید روی معمولی بود (جدول ۲ و شکل ۱).

جدول ۲. ویژگی‌های فیزیکی اکسید روی معمولی و فعال‌شده

Zinc Oxide source	RZ ¹	IZ ²
Particle size (μ m)	100-1000	<150
Shape	Rod-like	Platelet
Angle repose (degree)	35	28
Mixability	Poor	Good

۱. اکسیدروی معمولی

۲. اکسید روی فعال

1. RZ= Regular zinc oxid

2. IZ= Improved physical characteristic of regular zinc oxide

شروع آزمایش به‌مدت دو هفته از جیره‌های فاقد روی برای تخلیه ذخیره مازاد روی استفاده شد (Lambert *et al.*, 2007). جیره‌ها فاقد فیتاز، آنتی‌بیوتیک و اسیدهای آلی بودند.

جدول ۱. ترکیب مواد خوراکی و مواد مغذی جیره‌های آزمایشی

Table 1. Ingredients and calculated nutrient content of basal diet

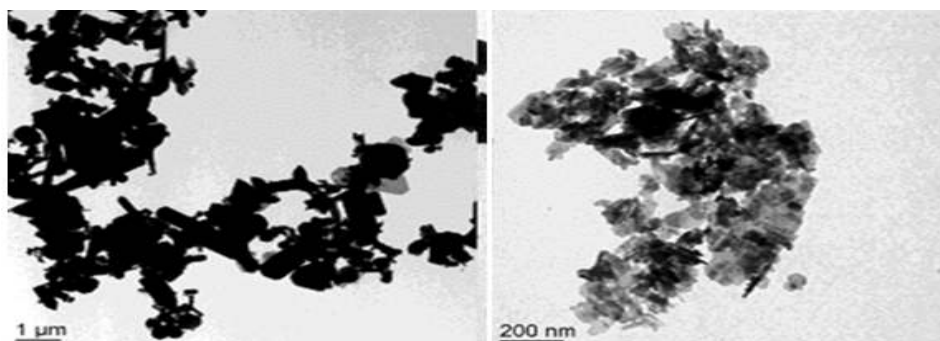
Ingredients (%)	Female	Male
Corn	70.28	67.23
Soybean meal	19.51	6.25
Wheat bran	0.47	23.28
Carbonate Calcium	7.45	0.81
Di-Calcium Phosphate	1.23	1.36
Salt	0.34	0.32
Sodium bicarbonate	0.1	0.1
Vitamin premix ¹	0.25	0.25
Mineral premix ¹	0.25	0.25
D-L Methionine	0.13	0.1
L-Lysin HCL		0.04
Nutrients composition		
AME (Kcal/Kg)	2800	2700
CP %	14	11.5
Ca %	3.2	0.7
Available P %	0.32	0.35
Na %	0.18	0.18
Lys (Dig) %	0.63	0.44
Meth (Dig) %	0.34	0.28
Meth + Cys (Dig) %	0.55	0.47
Thr (Dig) %	0.47	0.35
DCAB (MEq/Kg)	173	163

۱. مکمل ویتامینی و معدنی مقادیر زیر را در هر کیلوگرم خوراک تأمین نمود: ۱۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۳۵۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D₃، ۱۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۳ میلی‌گرم ویتامین K، ۳ میلی‌گرم ویتامین B₁، ۶ میلی‌گرم ویتامین B₂، ۳۵ میلی‌گرم ویتامین B₃، ۱۵ میلی‌گرم ویتامین B₅، ۳ میلی‌گرم ویتامین B₆، ۰/۱۵ میلی‌گرم بیوتین، ۱/۵۰ میلی‌گرم فولیک‌اسید، ۰/۰۲ میلی‌گرم ویتامین B₁₂، ۱۶ میلی‌گرم مس، ۱/۲۵ میلی‌گرم ید، ۴۰ میلی‌گرم آهن، ۱۲۰ میلی‌گرم منیزیم، ۰/۳۰ میلی‌گرم سلنیوم، و صفر میلی‌گرم روی.

1. Vitamin and mineral premix supplied the following per kg of diet: Vitamin A 10000 IU, Vitamin D₃ 3500 IU, Vitamin E 100 IU, Vitamin K 3 mg, Vitamin B₁ 3 mg, Vitamin B₂ 6 mg, Vitamin B₃ 35 mg, Vitamin B₅ 15 mg, Vitamin B₆ 3 mg, Biotin 0.15 mg, Folic Acid 1.50 mg, Vitamin B₁₂ 0.02 mg, Copper 16 mg, Iodine 1.25 mg, Iron 40 mg, Manganese 120 mg, Selenium 0.30 mg, and Zinc 0 mg.

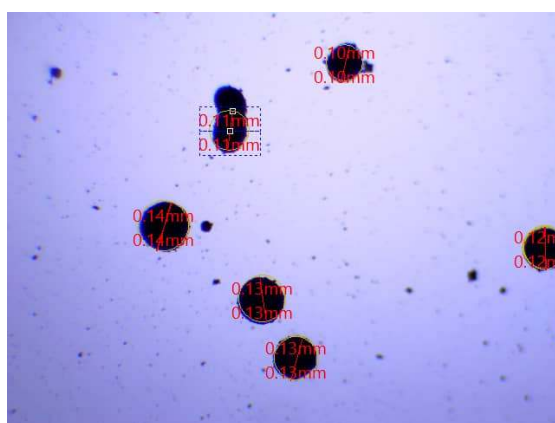
تعداد تخم‌مرغ‌های تولیدی روزانه اندازه‌گیری شد

و با تقسیم آن بر تعداد مرغ‌ها، میزان و درصد تولید تخم‌مرغ در روز محاسبه گردید. در پایان هر هفته تعداد سه تخم‌مرغ از هر تکرار هر تیمار، وزن‌کشی‌شده و ضخامت پوسته آن‌ها اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری ضخامت پوسته، بعد از شکستن تخم‌مرغ، پوسته آن شسته و خشک شد. ضخامت پوسته با



RZ= Regular zinc oxid

IZ= Improved physical characteristic of regular zinc oxide



Representation of particle size of IZ (measured by light microscope equipped with appropriate camera and software)

شکل ۱. شکل بالا: اکسید روی معمولی (چپ) و فعال شده (راست)؛ شکل پایین: اندازه ذرات اکسید روی فعال (KECAM-SPCMOS05000KPA & KEView)

Figure 1 Shape of regular ZnO (Left) and improved physical characteristics of regular ZnO (right), b ottom particle size of improved zinc oxide (Top view 3.7).

زنجره سبک کاپا از لنفوسیت‌های بی فعال شده"، (Warner & Nunez, 2013) و جلوگیری از فعالیت گیرنده‌های Toll like (Fawley & Gourlay, 2016) می‌تواند مانع تولید سیتوکین‌های التهابی شود (Bilski *et al.*, 2016). بر اساس نتایج مطالعات انجام شده در مرغ‌های مادر گوشتی افزایش مقدار روی در جیره تولید سیتوکین‌های التهابی را کاهش می‌دهد (Mayer *et al.*, 2018) و این نتایج در انسان (Finamore *et al.*, 2008) و خوک (Liu *et al.*, 2014) نیز مشاهده شده است که دلیل آن بر اساس مطالعات آزمایشگاهی کاهش بیان سیتوکین‌های التهابی عنوان شده است (Sargeant *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015). در این پژوهش نیز با افزایش سطح روی از ۷۰ به ۱۰۰

مصرف ۷۰ میلی‌گرم روی در کیلوگرم جیره بدون توجه به نوع منبع اکسید روی مقدار TNF- α را نسبت به مصرف ۱۰۰ میلی‌گرم روی در کیلوگرم جیره افزایش داد (-P<0/1) اما در مورد IL-6 این تفاوت فقط در زمان مصرف اکسید روی فعال شده معنی‌دار بود (جدول ۳). روی به‌عنوان کوفاکتور آنزیم آلکالین فسفاتاز، التهاب و نفوذپذیری دستگاه گوارش را تحت تأثیر قرار می‌دهد. آلکالین فسفاتاز روده‌ای از طریق سه مسیر متفاوت، دفسفریله کردن لیپید A که از اجزای ساختمانی لیپوپلی ساکاریدهای موجود در غشای خارجی باکتری‌ها هستند (Riggle *et al.*, 2013)، ممانعت از فعالیت مجموعه پروتئینی کنترل‌کننده تولید سیتوکین‌ها با عنوان "فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده

1. NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

استفاده قرار بگیرد. نتایج تحقیقات در مورد خوکها نشان داد مصرف سطوح بالای روی (۳۰۰۰ میلی گرم در کیلوگرم) میزان بیان پروتئین اتصالات محکم (زونولاکلودین) را در موکوس ژژنوم (Zhu *et al.*, 2017) و موکوس ایلوم (Zhang & Guo, 2009) افزایش می دهد. همچنین، مصرف شکل آلی روی در پرندگان دچار چالش کوکسیدیوز و کلسترییدیوم پرفرینجنس میزان بیان زونولاکلودین را افزایش می دهد که می تواند برای کاهش نفوذپذیری روده موثر باشد (Bortoluzzi *et al.*, 2019). سیتوکین های التهابی مانند اینترلوکین و عامل نکروز دهنده تومور الفا میزان التهاب را افزایش و از طریق کاهش پروتئین های دفسفریله شده فرستنده سیگنال و کاهش بیان کلودین ۲، (Wang *et al.*, 2015) میزان نفوذپذیری دستگاه گوارش را افزایش می دهند. براساس نتایج سایر تحقیقات، بیان آکالین فسفاتاز روده ای میزان التهاب را کاهش و به واسطه کاهش بیان سیتوکین ها اتصالات محکم را افزایش می دهد (Wang *et al.*, 2015).

مصرف اکسید روی فعال شده ضخامت پوسته تخم مرغ را نسبت به مصرف ۷۰ میلی گرم اکسید روی معمولی افزایش داد ($P < 0.05$)، اما تولید و وزن تخم مرغ تحت تأثیر مقدار روی جیره و نوع منبع آن قرار نگرفت (جدول ۴).

احتمالاً دلیل این بهبود تغییر ویژگی های فیزیکی و در نتیجه مخلوط شدن یکنواخت روی با خوراک و عدم آگلومریزه شدن آن باشد (Nouri *et al.*, 2019).

میلی گرم در کیلوگرم در جیره، مقدار سیتوکین های التهابی کاهش یافت. بروز التهاب و فعالیت سامانه ایمنی با ساخت پروتئین های ویژه ای که نقش اساسی در دفاع اندامها در برابر عوامل بیماری زا و تغییر در پاسخ ایمنی دارند مشخص می شود. پروتئین های فاز حاد مانند فیبرینوژن، پروتئین C واکنش پذیر و هپتوگلوبین با القای IL-1 و IL-6 تولید و ترشح می شوند (Gruys *et al.*, 1994). این پروتئین ها زودتر از پادتن ها ظاهر می شوند و کاهش آن ها با پاسخ های التهابی در پستانداران و جوجه ها در ارتباط است (Eckersall, 2000).

مصرف ۱۰۰ میلی گرم روی در کیلوگرم جیره بدون توجه به نوع منبع اکسید روی، غلظت ZO-1 سرم خون را نیز نسبت به مصرف ۷۰ میلی گرم روی در کیلوگرم جیره کاهش داد ($P < 0.01$ ، جدول ۳). به نظر می رسد حفظ انسجام پروتئین های اتصالات محکم بافت روده (همچون سایر بافت ها مانند ریه) مانع نشت اجزای آن به داخل خون می شود (Bao & Knoell, 2006). Xiaoyang *et al.* (2015) گزارش نمودند مشاهده پروتئین های اتصالات محکم در خون می تواند ناشی از شکسته شدن سدهای خونی مغزی (Blood brain barrier) در نتیجه خونریزی داخلی مغز باشد. این محققین نتیجه گیری نمودند که پروتئین های اتصالات محکم موجود در خون می تواند به عنوان یک معیار زیستی (Biomarker) برای بررسی انسجام اتصالات محکم و احتمال خونریزی مغزی مورد

جدول ۳. تأثیر سطوح مختلف روی و اکسید روی معمولی و فعال شده بر سطح سیتوکین های التهابی و پروتئین اتصالات محکم در مرغ مادر گوشتی

Table 3. The effects of different dietary levels of zinc and sources (regular and improved) zinc oxide on inflammatory cytokin and tight junction protein level of broiler breeder serum

Treatment	RZ ¹ -70	RZ-100	IZ ² -70	IZ-100	SEM	P value
Tight junction protein ZO-1 (pg/ml) ³	0.50 ^a	0.250 ^b	0.566 ^a	0.216 ^b	0.057	<0.01
Inflammatory cytokin TNF (pg/ml) ³	45.25 ^a	23.617 ^b	48.383 ^a	21.550 ^b	4.40	<0.01
IL6 (pg/ml) ³	10.625 ^b	3.467 ^b	29.3 ^a	1.267 ^b	4.77	<0.01

ab میانگین های با حروف غیر همسان در هر ردیف اختلاف معنی دار دارند ($P < 0.001$).

۱. اکسید روی معمولی

۲. اکسید فعال شده

۳. پیکوگرم بر میلی لیتر

a, b: Means with different letters in a row differ significantly ($P < 0.001$).

1. RZ= regular zinc oxide

2. IZ=improved physical characteristics of regular zinc oxide

3. Picograms per millilitre

جدول ۴. تأثیر سطوح و منابع مختلف اکسید روی (اکسید روی معمولی و فعال شده) بر تولید، وزن و ضخامت پوسته تخم مرغ در مرغ مادر گوشتی

Table 4. The effects of different dietary levels of zinc and sources (regular and improved zinc oxide) on egg production, egg weight and eggshell thickness of broiler breeder

Treatment [†]	RZ ¹ -70	RZ-100	IZ ² -70	IZ-100	SEM	P value
Egg production (%)	43.2	38	39.2	42.6	2.147	NS
Egg weight (g)	70.24	71.09	71.63	70	0.795	NS
Eggshell thickness (mm)	0.342 ^b	0.343 ^{ab}	0.358 ^a	0.348 ^{ab}	0.0041	<0.05
Initial body weight(g)	3813.8	3876.8	3887.2	3810.4	32.48	NS
Final body weight(g)	4390.2	4358.8	4476	4437	73.21	NS
Change in BW during 12 weeks (g)	576.4	482	589.6	626.6	72.63	NS

ab میانگین‌های با حروف غیر همسان در هر ردیف اختلاف معنی‌دار دارند ($P < 0.001$).

۱. اکسید روی معمولی

۲. اکسید فعال شده

۳. پیکوگرم بر میلی‌لیتر

a, b: Means with different letters in a row differ significantly ($P < 0.001$).

1. RZ= regular zinc oxide

2. IZ=improved physical characteristics of regular zinc oxide

3. Picograms per millilitre

میزان ورود مواد غذایی، آب و مواد معدنی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. بنابراین، عملکرد مناسب سد روده‌ای تأثیر قابل توجهی بر حفظ تعادل بدن و سلامت پرند دارد. زونولا اکلودین به‌عنوان یکی از ترکیبات اصلی اتصالات محکم با تنظیم میزان نفوذپذیری سلول‌های اپیتلیوم و حفظ عملکرد سد روده‌ای در انسان و حیوانات می‌تواند میزان هضم و جذب مواد مغذی را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین، به‌نظر می‌رسد روی در سطح ۷۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره و به شکل اکسید روی فعال شده، با تأثیر بر اتصالات محکم سد روده‌ای و تأثیر بر سلامت روده، توانست میزان ورود مواد معدنی مانند کلسیم را تحت تأثیر قرار داده و در نتیجه کیفیت پوسته را بهبود دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم روی نسبت به ۷۰ میلی‌گرم روی از هر دو منبع اکسید روی معمولی و فعال شده موجب تغییرات سرمی اینترلوکین ۶، عامل نکروزه‌کننده تومورآلفا و اوکلودنس ۱ می‌شود. چنین برداشت می‌شود که کاهش فاکتورهای پیش‌التهابی احتمالاً به دلیل کاهش نشأت پروتئین‌های تشکیل‌دهنده اتصالات محکم در خون باشد. بر اساس نتایج این پژوهش، احتمال دارد که مقدار فاکتورهای التهابی و پروتئین‌های اتصالات محکم بافت روده در مرغ‌های مادر که به دلیل مصرف

در سایر تحقیقات، استفاده از منبع آلی روی در مقایسه با منبع غیر آلی آن، ضخامت و استحکام پوسته را افزایش داد (Zhang *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2019). بدیهی است دلیل بهبود کیفیت پوسته در نتیجه استفاده از منبع آلی روی نیز جذب بهتر و یکنواخت‌تر آن می‌باشد، با وجود این، محققین ذکر نموده‌اند که افزایش فعالیت کربونیک‌انهدراز در زمان تشکیل پوسته دلیل آن است (Zhang *et al.*, 2017). در تعدادی از تحقیقات استفاده از شکل آلی و غیر آلی روی نتوانست میزان تولید و کیفیت تخم‌مرغ را تحت تأثیر قرار دهد (Tabatabaie *et al.*, 2007; Olgun *et al.*, 2017). پوسته تخم‌مرغ حاوی ۹۶٪ کربنات کلسیم می‌باشد و برای تولید هر تخم‌مرغ ۲-۲/۵ گرم کلسیم مورد نیاز است (Al-Batshan *et al.*, 1994). در طول چرخه تولید مثل، کلسیم از دستگاه گوارش جذب و توسط خون از اپیتلیوم عبور کرده و وارد مجرای غدد پوسته‌ساز می‌شود. در مورد کیفیت پوسته تخم‌مرغ نتایج تحقیقات نشان داده افزایش مقدار کلسیم در سرم (Panda *et al.*, 2008) و افزایش میزان ابقای کلسیم (Mutus *et al.*, 2006) و فسفر (Mutus *et al.*, 2006) کیفیت پوسته را افزایش می‌دهد. بخش بالایی سلول‌های اپیتلیوم بخش جذب‌کننده روده، مسئول جذب مواد غذایی هستند. اتصالات محکم، فضای بین سلولی میان سلول‌های اپیتلیوم مجاور را پر کرده و میزان نفوذپذیری سد روده‌ای و در نتیجه

یک وعده خوراک در معرض التهاب روده هستند با مصرف سطوح بالاتر روی کاهش یابد. همچنین روند تغییر غلظت فاکتورهای التهابی و مقدار پروتئین‌های اتصالات محکم نیز در یک راستا بودند. مصرف ۱۰۰ میلی‌گرم اکسید روی فعال نسبت به ۷۰ میلی‌گرم موجب کاهش IL-6 شد. بنابراین، چنین نتیجه‌گیری می‌شود که تغییر ویژگی‌های فیزیکی اکسید روی، عملکرد فیزیولوژیکی آن را بهبود می‌بخشد.

REFERENCES

1. Abu-Dieyeh, Z. H. M. (2006). Effect of chronic heat stress and long-term feed restriction on broiler performance. *International Journal of Poultry Science*, 5(2), 185-190.
2. Al-Batshan, H. A., Scheideler, S. E., Black, B. L., Garlich, J. D. & Anderson, K. E. (1994). Duodenal calcium-uptake, femur ash, and eggshell quality decline with age and increase following molt. *Poultry Science*, 73(10), 1590-1596.
3. Alves, T. E. P., Kolodziej, C., Burda, C. & Franco, A. (2018). Effect of particle shape and size on the morphology and optical properties of zinc oxide synthesized by the polyol method. *Materials & Design*, 146(15), 125-133.
4. Ao, T. & Pierce, J. (2013). The replacement of inorganic mineral salts with mineral proteinates in poultry diets. *World's Poultry Science Journal*, 69(1), 5-16.
5. Aviagen Group Ltd. 2016. Ross 308. Parent stock nutrition specification. *Aviagen, newbridge, Midlothian EH28 8SZ, Scotland, UK*.
6. Bao, S. & Knoell, D. L. (2006). Zinc modulates cytokine-induced lung epithelial cell barrier permeability. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 291(6), L1132-L1141.
7. Bilski, J., Mazur-Bialy, A., Wojcik, D., Zahradnik-Bilska, J., Brzozowski, B., Magierowski, M., Mach, T., Magierowska, K. & Brzozowski, T. (2017). The role of intestinal alkaline phosphatase in inflammatory disorders of gastrointestinal tract. *Mediators of Inflammation*, 2017(9074601):9p.
8. Bortoluzzi, C., Lumpkins, B., Mathis, G. F., Fran, M., King, W. D., Graugnard, D. E., Dawson, K. A. & Applegate, T. J. (2019). Zinc source modulates intestinal inflammation and intestinal integrity of broiler chickens challenged with coccidia and Clostridium perfringens. *Poultry Science*, 98(5), 2211-2219.
9. Cheng, J., Kornegay, E. T. & Schell, T. (1998). Influence of dietary lysine on the utilization of zinc from ZnSO₄ and a zinc-lysine complex by young pigs. *Journal of Animal Science*, 76(4), 1064-1074.
10. Dardenne, M. (2002). Zinc and immune function. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, 20-23.
11. Eckersall, P. D. (2000). Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue de medecine veterinaire*, 151(7), 577-584.
12. Fawley, J. & Gourlay, D. M. (2016). Intestinal alkaline phosphatase: a summary of its role in clinical disease. *Journal of Surgical Research*, 202(1), 225-234.
13. Finamore, A., Massimi, M., Conti Devirgiliis, L. & Mengheri, E. (2008). Zinc deficiency induces membrane barrier damage and increases neutrophil transmigration in Caco-2 cells. *The Journal of Nutrition-Nutrition and Disease*, 138(9), 1664-1670.
14. Gruys, E., Obwolo, M.J., Toussaint, & M.J.M. (1994). Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet. Bull.* 64, 1009 – 1018.
15. Huang, L., Li, X., Wang, W., Yang, L. & Zhu, Y. (2019). The role of zinc in poultry breeder and hen nutrition: an Update. *Biological Trace Element Research*, 192(2), 308-318.
16. Kuttappan, V. A., Berghman, L. R., Vicuña, E. A., Latorre, J. D., Menconi, A., Wolchok, J. D., ... & Bielke, L. R. (2015). Poultry enteric inflammation model with dextran sodium sulfate mediated chemical induction and feed restriction in broilers. *Poultry Science*, 94(6), 1220-1226.
17. Lambert, J.C., Zhou, Z., Wang, L., Song, Z., McClain, C. J. & Kang, Y. J. (2004). Preservation of intestinal structural integrity by zinc is independent of metallothionein in alcohol-intoxicated mice. *American Journal of Pathology*, 164(6), 1959-1966.
18. Lambert, J. C., Zhou, Z., Wang, L., Song, Z., McClain, C. J., & Kang, Y. J. (2003). Prevention of alterations in intestinal permeability is involved in zinc inhibition of acute ethanol-induced liver damage in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305(3), 880-886.
19. Li, C., Guo, S., Gao, J., Guo, Y., Du, E., Lv, Z. & Zhang, B. (2015). Maternal high-zinc diet attenuates intestinal inflammation by reducing DNA methylation and elevating H3K9 acetylation in the A20 promoter of offspring chicks. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(2), 173-183.
20. Liu, P., Pieper, R., Rieger, J., Vahjen, W., Davin, R., Plendl, J., Meyer, W. & Zentek, J. (2014). Effect of dietary zinc oxide on morphological characteristics, mucin composition and gene expression in the colon of weaned piglets. *Plos One*, 9(3), e91091.
21. MacDonald, R. S. (2000). The role of zinc in growth and cell proliferation. *Journal of Nutrition*, 130, 1500S-1508S.

22. Mayer, A. N., Vieira, S. L., Berwanger, E., Angel, C. R., Kindlein, L., Franca, I. & Noetzold, T. L. (2018). Zinc requirements of broiler breeder hens. *Poultry Science*, 0, 1-14.
23. Millan, J. L. (2006). *Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology*. Wiley-Blackwell.
24. Miyoshi, Y., Tanabe, S. & Suzuki, X. T. (2016). Cellular zinc is required for intestinal epithelial barrier maintenance via the regulation of claudin-3 and occludin expression. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 311(1), 105-116.
25. Mutus, R., Kocabagli, N., Alp, M., Acar, N., Eren, M. & Gezen, S. (2006). The effect of dietary probiotic supplementation on tibial bone characteristics and strength in broilers. *Poultry Science*, 85(9), 1621-1625.
26. Nouri, O., Zaghari, M. & Mehrvarz, H. (2019). Scrutinizing mixer efficiency and poultry feedhomogeneity. In: *XVIII European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products and XXIV European Symposium on the Quality of Poultry Meat*: 191 (Abstract). Izmir, Turkey.
27. O'Dell, B. L. (1983). Bioavailability of essential and toxic trace elements. *Federation proceedings*, 42(6), 1714-1715.
28. Olgun, O. & Yildiz, A.O. (2017). Effects of dietary supplementation of inorganic, organic or nano zinc forms on performance, eggshell quality, and bone characteristics in laying hens. *Annals of Animal Science*, 17(2), 463-476.
29. Panda, A.K., Rama Rao, S.S., Raju, M.V. & Sharna, S.S. (2008). Effect of probiotic (*Lactobacillus Sporogenes*) feeding on egg production and quality, yolk cholesterol and humoral immune response of White Leghorn layer breeders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(1), 43-47.
30. Riggle, K. M., Rentea, R. M., Welak, S. R., Pritchard, K. A., Jr, K., Oldham, T. & Gourlay, D. M. (2013). Intestinal alkaline phosphatase prevents the systemic inflammatory response associated with necrotizing enterocolitis. *Journal of Surgical Research*, 180(1), 21-26.
31. Roy, S.K., Behrens, R.H., Haider, R., Akramuzzaman, S.M., Mahalanabis, D., Wahed, M.A. & Tomkins, A.M. (1992). Impact of zinc supplementation on intestinal permeability in Bangladeshi children with acute diarrhoea and persistent diarrhoea syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 15, 289-296.
32. Salim, H.M., Jo, C. & Lee, B.D. (2008). Zinc in broiler feeding and nutrition. *Avian Biology Research*, 1(1), 5-18.
33. Sargeant, H. R., Miller, H. M. & Shaw, M. A., (2011). Inflammatory response of porcine epithelial IPEC J2 cells to enterotoxigenic E. Coli infection is modulated by zinc supplementation. *Molecular Immunology*, 48(15-16), 2113-2121.
34. SAS Institute. (2011). SAS/STAT User's Guide: *Statistics*. Release 9.3 ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.
35. Shankar, A. H. & Prasad, A. S. (1998). Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *The American journal of clinical nutrition*, 68(2), 447S-463S.
36. Sturniolo, G.C., Di Leo, V., Ferronato, A., D'Odorico, A. & D'Inca, R. (2001). Zinc supplementation tightens "leaky gut" in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Disease*, 7(2), 94-98.
37. Sturniolo, G. C., Fries, W., Mazzon, E., Di Leo, V., Barollo, M. & D'inca, R. (2002). Effect of zinc supplementation on intestinal permeability in experimental colitis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 139(5), 311-315.
38. Tabatabaie, M. M., Aliarabi, H., Saki, A. A., Ahmadi, A. & Siyar, S. A. (2007). Effect of different sources and levels of zinc on egg quality and laying hen performance. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(19), 3476-3478.
39. Walter, J. K., Rueckert, C., Voss, M., Mueller, S. L., Piontek, J., Gast, K. & Blasig, I. E. (2009). The Oligomerization of the Coiled Coil-domain of Occludin Is Redox Sensitive. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165(1), 19.
40. Wang, X., Valenzano, M. C., Mercado, J. M., Zurbach, E. P. & Mullin, J. M. (2013). Zinc supplementation modifies tight junctions and alters barrier function of CACO-2 human intestinal epithelial layers. *Digestive Diseases and Sciences*, 58(1), 77-87.
41. Wang, W., Chen, S. W. & Zhu, J. (2015). Intestinal alkaline phosphatase inhibits the translocation of bacteria of gut-origin in mice with peritonitis: mechanism of action. *Plos One*, 10(5), e0124835.
42. Wapnir, R. A. (2000). Zinc deficiency, malnutrition and the gastrointestinal tract. *The Journal of nutrition*, 130(5), 1388S-1392S.
43. Warner, N. & Nunez, G. (2013). MyD88: a critical adaptor protein in innate immunity signal transduction. *The Journal of Immunology*, 190(1), 3-4.
44. Jiao, X., He, P., Li, Y., Fan, Z., Si, M., Xie, Q., ... & Huang, D. (2015). The role of circulating tight junction proteins in evaluating blood brain barrier disruption following intracranial hemorrhage. *Disease markers*, 2015.
45. Zaghari, M. & Honarbakhsh, SH. (2020). Supplement and Therapeutic premixes Manufacturing for Poultry (A Comprehensive Guide). *A book. MinaToyoor Publishing*. (1th ed.). Pages 200,122, 298 & 332. (In Farsi)

46. Zhang, B. & Guo, Y. (2009). Supplemental zinc reduced intestinal permeability by enhancing occludin and zonula occludens protein-1 (ZO-1) expression in weaning piglets. *British Journal of Nutrition*, 102(5), 687-93.
47. Zhang, Y. N., Wang, J., Zhang, H. J., Wu, S. G. & GH, Qi. (2017). Effect of dietary supplementation of organic or inorganic manganese on eggshell quality, ultrastructure, and components in laying hens. *Poultry Science*, 96(7), 2184-2193.
48. Zhu, C., Lv, H., Chen, Z., Wang, L., Wu, X., Chen, Z., Zhang, W., Liang, R. & Jiang, Z. (2017). Dietary zinc oxide modulates antioxidant capacity, small intestine development, and jejunal gene expression in weaned piglets. *Biological trace element research*. *Biological Trace Element Research*, 75(2), 331-338.