The University of Tehran Press

Iranian Journal of Animal Science

Online ISNN: 2008-4773

Homepage: http://ijas.ut.ac.ir/

Effect of injection of zinc oxide nano particles on the immune response, oxidative enzyme activity of plasma and gene expression in broilers spleen tissue

Mohammad Kazemifard[1]✉, Mansour Rezaei[2], Javanshir Palooj[3], Zarbakht Ansari Pirsaraei[4], Essa Dirandeh[5]

1.Corresponding author, Department of Animal science, Faculty of animal and fisheries sciences, Sari agricultural and natural resources university, Sari, Iran. Email:mohamadsolimanekhtiari@gmail.com

2. Department of Animal science, Faculty of animal and fisheries sciences, Sari agricultural and natural resources university, Sari, Iran. Email:mrezaei2000@yahoo.com

3. Department of Animal science, Faculty of animal and fisheries sciences, Sari agricultural and natural resources university, Sari, Iran. Email:jpalooj@yahoo.com

4. Department of Animal science, Faculty of animal and fisheries sciences, Sari agricultural and natural resources university, Sari, Iran. Email:ansari2000@yahoo.com

5. Department of Animal science, Faculty of animal and fisheries sciences, Sari agricultural and natural resources university, Sari, Iran. Email:dirandeh@gmail.com

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received:20September 2022

Received:8November 2022

Accepted:9November 2022

Published online:23September 2023

Keywords:

Interleukin,

Avian influenza,

Glutathioneproxidase,

Superoxide dismutas.

ABSTRACT

This experiment was conducted to investigate the effect of zinc oxide nanoparticls injection on immune response and performance in broilers. One hundred eight Ross308 strain chicks were injected in a completely randomized design with three treatments in four replicates and nine chicks in each replicate on the day of hatching. The treatments include: 1. Control, 2. Injection of 20 microliters of zinc oxide nanoparticls (0.5 mg of zinc oxide nanoparticls in 50 ml of saline), 3. Injection of 20 microliters of zinc oxide nanoparticles (0.6 mg of zinc oxide nanoparticles in 50 ml of saline). The zinc oxide nanoparticls solution was injected into the chickens from the neck area. The ration used for all treatments was the standard ration of Ross 308 strain. Influenza antibody titer 14 days and CBH test, 12 and 24 hours after vaccination and glutathione peroxidase activity level increased significantly in treatment 3 compared to other treatments ($P<0.05$). Interleukin 12 gene expression in treatment 2 and 3 was significantly higher than the control treatment ($P<0.05$). The relative weight of gravel in treatment 3 compared to the control treatment and the feed consumed in treatments 2 and 3 were significantly lower than the control treatment ($P<0.05$). The results showed that the injection of zinc oxide nanoparticls increased the general and cellular immune response, the activity of antioxidant enzymes and interleukin 12 gene expression..

Cite this article: Kazemifard, M., Rezaei, M., Palooj, J., Ansari Pirsaraei, Z., Dirandeh, E.(2023). Effect of injection of zinc oxide nano particles on the immune response, oxidative enzyme activity of plasma and gene expression in broilers spleen tissue.*Iaranian Journal of Animal Science*, 54 (3), 391-402.DOI:http//doi.org10.22059/IJAS.2022.348850.653908

© The Author(s).

DOI:http//doi.org10.22059/IJAS.2022.348850.653908

Publisher: The University of Tehran Press.

Extended Abstract

Introduction

After using antibiotics as growth promoters in poultry feed, try to replace them with suitable options with positive properties and no negative side effects and options of natural origin such as medicinal plants, natural

probiotics and organic acids. Addition of zinc in the diet of broiler chickens increases daily body weight, daily food intake and immune response and performance of broiler chickens and increases growth rate. The volume and size of nanoparticles is smaller than larger particles and due to more contact surface and higher absorption, it provides better performance and reduces the consumption of nutrients. These substances have higher cellular absorption and after entering, they spread quickly in most organs and tissues.

Objectives

Oxide-nanoparticles can improve the safety and efficiency of production in broiler chickens through absorption and transport through the bloodstream instead of the small intestine.

Materials and methods

108 chicks of Ross308 strain were treated with zinc nano oxide solution in a completely randomized design with three treatments in four replicates and nine chicks in each replicate on the hatching day and were reared for 42 days. The treatments include: 1) control (without injection), 2) injection of 10 mg/mliter of zinc nano oxide solution, 3) injection of 12 mg/mliter of zinc nano oxide solution.The zinc nano oxide solution was injected into the chickens from the neck area. The ration used for all treatments was the standard ration of Ross308 strain.

Results

CBHtest, 12hours after Phyto Hem Aglutinin injection and glutathione peroxidase activity level increased in treatment 3 compared to other treatments($P<0.05$). interleukin 12 gene expression in treatments 2 and 3 was higher than the control treatment ($P<0.05$). The relative weight of gizzard in treatment 3 compared to the control treatment and the feed consumption in treatments 2 and 3 was less than the control treatment($P<0.05$). The results showed that zinc nano oxide injection increased blood and cellular immune response, antioxidant enzyme activity and interleukin 12 gene expression.

Conclusion

The better bioavailability of zinc in the form of nanoparticles in the body increases the activity of enzymes related to digestion and absorption and improves the morphological characteristics of the intestine and increases the absorbed surface and the bioavailability of other nutrients, which can lead to a reduction in food consumption, which can be used as an alternative to antibiotics. By increasing and improving IL12 gene expression and affecting the proliferation of basophils, increasing the level of glutathione peroxidase, increases the immune response in broilers and improves bird health. By injecting broilers with zinc nano oxide at the right concentration and time, it is possible to deal with the production of free radicals and lipid peroxidation by increasing the level of blood antioxidant enzymes in the presence of tension and oxidative stress.

نشریه علوم دامی ایران، دوره ۵۴، شماره ۴

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۷۹۴۹-۲۴۲۳

Homepage: http://ijas.ut.ac.ir//

تأثیر تزریق نانواکسیدروی بر پاسخ ایمنی، فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو پلاسما و بیان ژن اینترلوکین بافت طحال در جوجه‌گوشتی

محمد کاظمی‌فرد[1]✉|منصور رضایی[2]|جوانشیر پالوج[3]|زربخت انصاری پیرسرائی[4]|عیسی دیرنده[5]

۱.نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران، ایران. رایانامه:mo.kazemifard@gmail.com

۲. گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران، ایران. رایانامه:mrezaei2000@yahoo.com

۳. گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران، ایران. رایانامه:jpalooj@yahoo.com

۴. گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران، ایران. رایانامه:ansari2000@yahoo.com

۵. گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران، ایران. رایانامه:dirandeh@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۶/۲۹

تاریخ‌بازنگری: ۱۴۰۱/۰۸/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۸

تاریخ‌انتشار: ۱۴۰۲/۰۷/۰۱

کلیدواژه‌ها:

اینترلوکین، آنفلوانزای‌مرغی،

گلوتاتیون‌پراکسیداز،

سوپراکسیددیسموتاز.

چکیده

این آزمایش به‌منظور بررسی تأثیر تزریق نانواکسیدروی بر پاسخ‌ایمنی و عملکرد در جوجه‌گوشتی انجام شد. تعداد ۱۰۸ قطعه جوجه سویه راس۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار در چهار تکرار و نه جوجه در هر تکرار در روز تفریخ با محلول نانواکسیدروی تزریق شدند. تیمارها شامل: ۱. شاهد، ۲. تزریق ۲۰ میکرولیتر نانواکسیدروی(۰/۵ میلی‌گرم نانواکسیدروی در ۵۰ میلی‌لیتر محلول‌نمکی)، ۳. تزریق ۲۰ میکرولیتر نانواکسیدروی(۰/۶ میلی‌گرم نانواکسیدروی در ۵۰ میلی‌لیتر محلول‌نمکی). محلول نانواکسیدروی از ناحیه گردن به جوجه‌ها تزریق شد. جیره مورد استفاده برای همه تیمارها جیره استاندارد سویه راس ۳۰۸ بود. تیتر آنتی بادی آنفلوانزا ۱۴ روز و آزمون حساسیت پوستی، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از واکسیناسیون و سطح فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در تیمار ۳ نسبت به سایر تیمارها به طور معنی‌داری افزایش یافت (P< ۰/۰۵) بیان‌ژن اینترلوکین۱۲ در تیمار ۲ و ۳ به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود (P< ۰/۰۵) وزن نسبی سنگدان در تیمار ۳ نسبت به تیمار شاهد و خوراک مصرفی در تیمار ۲ و ۳ به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود(P<۰/۰۵). نتایج نشان داد که تزریق نانواکسیدروی باعث افزایش پاسخ ایمنی عمومی و سلولی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و بیان‌ژن اینترلوکین۱۲ شد.

استناد: کاظمی‌فرد، محمد؛ رضایی، منصور؛ پالوج، جوانشیر؛ انصاری پیرسرائی، زربخت؛ و دیرنده، عیسی(۱۴۰۲). تأثیر تزریق نانواکسیدروی بر پاسخ ایمنی، فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو پلاسما و بیان ژن اینترلوکین بافت طحال در جوجه‌گوشتی. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۴ (۴)، ۴۰۲-۳۹۱.
DOI:http//doi.org10.22059/IJAS.2022.348850.653908

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI:http//doi.org10.22059/IJAS.2022.348850.653908

مقدمه

افزایش ایمنی، مقاومت در برابر بیماری‌ها، رشد بهینه و کاهش تلفات از اهداف صنعت طیور است (Alitaneh *et al.*, 2017). معمولا جوجه‌ها تا ۴۸ ساعت پس از تولد به آب و غذا دسترسی ندارندکه می‌تواند تاثیری منفی بر رشد و ایمنی پرنده داشته باشد (Noy & uni, 2010). پس از منع استفاده ازآنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان محرک رشد درتغذیه طیور، سعی شد گزینه‌های مناسبی با ویژگی‌های مثبت و بدون عوارض جانبی منفی وگزینه‌هایی با منشأ طبیعی مانند گیاهان دارویی، پروبیوتیک‌های طبیعی و اسیدهای‌آلی جایگزین شود(Hosseini *et al.*, 2017). افزودن روی در جیره غذایی جوجه‌های‌گوشتی سبب افزایش وزن روزانه بدن، دریافت روزانه غذا و پاسخ ایمنی وعملکرد جوجه‌های‌گوشتی می‌شود و سرعت رشد و بازدهی خوراک را افزایش می‌دهد (Hatab *et al.*, 2022). روی از طریق شرکت در ساختار کروماتین، غشاهای بیولوژیک، همانندسازیDNA، ترجمهRNA، فعالیت عوامل ترجمه و پلی‌مرازهای DNAو RNA، شرکت در ترمیم DNA و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول و بیان‌ژن نقش دارد (Suttle, 2010). عنصر روی جزئی از ساختار پروتئین‌های زیادی از جمله عوامل رونویسی و پروتئین‌هایی موسوم به زینک فینگر(Zinc finger) است که به DNAمتصل و در همانندسازیآنشرکت دارد. این پروتئین‌ها بیشتر در نقش یک مولکول واکنش‌دهنده با DNA ، RNAیا پروتئین ظاهرمی‌شوند (Isani 2014) &Carpenè, کمبود این عنصرسبب کاهش سطح هورمون رشد وکاهش عملکردگیرنده هورمون رشد شده و باتاثیر بربیان‌ژن-های هورمون رشد انسولین مانند ۱ و ۲(IGF-1 و IGF-2) سبب کاهش رشد وکاهش وزن پرنده می‌شود (Tsai *et al.*, 2016). حجم و اندازه نانو ذرات نسبت به ذرات بزرگ‌تر کمتر است و به دلیل سطح تماس بیشتر و ظرفیت جذب بالاتر، عملکرد بهتری داشته و مصرف مواد مغذی را کاهش می‌دهد. این مواد جذب سلولی بالایی داشته و پس از ورود به بدن به سرعت در اکثراندام‌ها و بافت‌ها پخش می‌شوند (Razani *et al.*, 2017). نانوتکنولوژی سبب افزایش توانایی طیور درجذب مواد مغذی و در نتیجه بهبود عملکرد رشد، قابلیت هضم مواد مغذی وعملکرد تولیدی پرندگان می‌شود. استفاده از روی به شکل نانوذرات می‌تواند در نسبت‌های پایین‌تر مورد استفاده قرار گرفته و نتایجبهتری نسبتبه منابع معمولی عنصر روی ارائه دهد(Gopi *et al.*, 2017). نانوذراتاکسیدروی می‌تواند ایمنی و بازده تولید درجوجه‌های‌گوشتی را از طریق جذب و انتقال از راه خون به جای روده کوچک بهبود بخشد که هنوز نیاز به تحقیقات دارد (Hussein *et al.*, 2021).

موادوروش‌ها

طراحی آزمایش

این آزمایش برای ارزیابی اثرات تزریق نانواکسیدروی بر پاسخ ایمنی و عملکرد درجوجه‌های‌گوشتی انجام شد. محلول نانواکسیدروی در روز تفریخ به‌صورت زیرجلدی ازناحیه گردن تزریق شد. تعداد ۱۰۸ قطعه جوجه سویه راس ۳۰۸ در طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار در چهارتکرار و نه جوجه در هر تکرار مورد آزمایش قرارگرفتند. تیمارها شامل: ۱) شاهد (بدونتزریق)، ۲) تزریق۱۰میلی‌گرم بر لیتر محلول نانواکسیدروی، ۳) تزریق ۱۲ میلی‌گرم بر لیتر محلول نانواکسیدروی بودند (حجم تزریق در تیمارهای حاوی نانواکسیدروی ۲۰ میکرولیتر بود).

پرورش

جوجه‌ها به سالن پرورش منتقل شدند و به‌صورت آزاد خوراک و آب دریافت کردند. جیره‌غذایی مورد استفاده درطول دوره برای همه تیمارها یکسان و بر اساس ذرت و سویا بود(جدول۱) بود. جوجه‌ها بعد از تزریق بر اساس تیمار و تکرار به سالن پرورش منتقل شدند و جداگانه درقفس‌های مخصوص خود به مدت ۴۲ روز پرورش یافتند. اندازه‌گیری خوراک مصرفی و افزایش وزن جوجه‌ها و برآورد راندمان، به صورت هفتگی انجام شد.

ایمنی خونی

برای سنجش پاسخ ایمنی اکتسابی، واکسیناسیون علیه بیماری نیوکاسلوآنفلوانزا درروز ۲۸ پرورش انجام شد. درروزهای ۳۵ و ۴۲ پرورش، دو جوجه از هر تیمار به‌طور تصادفی انتخاب شدند و نمونه خون (۲ تا ۳ میلی‌لیتر) از سیاهرگ بال جمع آوری و سطح آنتی‌بادی‌های آنفلوانزای مرغی و نیوکاسل در نمونه‌های سرم با استفاده از روش مهار هماگلوتیناسیون(HI) ارزیابی شد.

ایمنی‌سلولی

برای سنجش ایمنی سلولی ازآزمون حساسیت پوستی(CBH) و اندازه‌گیری بیان‌ژن اینترلوکین ۲ و ۱۲ استفاده شد. در روز ۴۲ پرورش، دوجوجه از هر تیمار انتخاب و ضخامت بین پرده راست وچپ انگشت پای چپ آنها با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد، سپس برای سنجش آزمون CBH محلول فیتو هم آگلوتینین تهیه و ۰/۱میلی‌لیتر از آن با سرنگانسولین به پرده بین انگشت دو موسوم پای چپ جوجه‌ها تزریق و بعد از ۱۲ و ۲۴ ساعت ضخامت بین پرده انگشتان محل تزریق دوباره اندازه‌گیری شد و از محاسبه تفاوت به دست آمده در قبل و بعد از تزریق، سطح فعالیت ایمنی سلولیارزیابیشد. هم‌چنین، با تزریق۰/۱ میلی‌لیترآب مقطر به پرده بین انگشت دوم و سوم پای راست به عنوان شاهد استفاده شد(Corrier & Deloach, 1990).

جدول ۱. ترکیباتجیرهوآنالیزموادخوراکی

ترکیب موادخوراکی(درصد)	آغازین	رشد	پایانی
ذرت	۶۲/۱	۵۶/۸	۹۱/۵۵
کنجاله‌سویا	۳۲/۰۷	۲۷/۲	۲۳/۴
سبوس‌گندم	۰/۰۰	۱۰/۰	۱۵/۰
روغن‌سویا	۱/۹۵	۲/۳	۲/۳۷
دی‌کلسیم‌فسفات	۱/۶۰	۱/۴۳	۱/۱۸
سنگ‌آهک	۱/۱۵	۱/۱۵	۱/۰۶
مکمل‌موادمعدنی[۱]	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل‌ویتامینی[۲]	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
نمک	۰/۲۳	۰/۲۳	۰/۲۳
دی-ال‌متیونین	۰/۱۹	۰/۱۷	۰/۱۵
ال-لیزین	۰/۰۹	۰/۱۰	۰/۰۸
کربنات‌سدیم	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/.۱۲
آنالیزموادخوراکی			
انرژی‌قابل‌متابولیسم(کیلوکالری)	۲۹۵۰	۳۰۰۰	۳۰۵۰
درصدپروتئین‌خام	۱۹/۵	۱۸/۵	۱۷/۵
درصدکلسیم	۱/۰۰	۰/۸۴	۰/۷۶
درصدفسفر قابل‌دسترس	۰/۵۰	۰/۴۲	۰/۳۸
درصدلیزین	۱/۰۵	۰/۹۸	۰/۸۹
درصدمتیونین	۰/۴۷	۰/۴۴	۰/۴۰

۱ترکیبات در هر کیلوگرم:۷۵۰۰۰میلی‌گرم منیزیم؛ ۵۰۰۰۰میلی‌گرم آهن؛ ۸۰۰۰میلی‌گرم مس؛ ۷۵۰ میلی‌گرم ید و ۶۰۰۰۰ میکروگرم سلنیوم

۲ترکیبات در هر کیلوگرم: ۸۰۰۰ واحد ویتامین**A**؛۲۰۰۰واحد ویتامین**D3**؛ ۱۸۰۰ میلی‌گرم ویتامین**K**؛ ۱۸۰۰ میلی‌گرم ویتامین**B1**؛ ۶۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین**B2**؛ ۲۸۰۰ میلی‌گرم ویتامین**B6**؛ ۱۲۰۰۰میکروگرم ویتامین**B12**؛ ۱۰۰۰۰میلی‌گرم پنتوتنیک‌اسید؛ ۴۰۰۰۰میلی‌گرم نیاسین؛ ۱۰۰۰ میلی گرم اسیدفولیک و ۰/۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیوتین

استخراجRNA

استخراج و خالص‌سازیRNA با روش آکازول و با استفاده از دستورالعمل کیت شرکت سیناژن انجام شد. درروز دهم پرورش، دوجوجه از هر تکرار انتخاب و نمونه‌های طحال جمع‌آوری و در سالین‌بافرفسفات است ریلشسته شد و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد. نمونه‌ها تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شدند. RNA کل از نمونه‌های طحال با استفاده از محلول RNXTM-Plus (Cinna Gen,Tehran,Iran)، براساس دستورالعمل سازنده استخراج شد و سپس درحضورالیگوپرایمر۱میکرومولار(Qiagen Inc., Tehran, Iran)رونویسی معکوس شد. برای اطمینان از استخراج RNA از ژل آگارز یک‌درصد استفاده شد.

طراحی آغازگرها

سنتز cDNA از RNA با استفاده از کیت شرکت سولجنت‌کره(Solgent)انجام شد AccuPower CycleScript RT). (PreMix(dN$_6$) آغازگرهای خاص این آزمایش توسط شرکت‌کیاژن و بر اساس مقالات حاصل از پژوهش‌های انجام شده طراحی شد (جدول۲). سپس واکنشRT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و کیت شرکت‌کیاژن SYBR®Green PCR) (QuantiNova™انجام شد.

جدول۲.مشخصات آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شده برای ژن‌های اینترلوکین۲و۱۲

نام‌ژن	توالی‌آغازگر(۳-۵)	دما(درجه‌سانتی‌گراد)	اندازه‌باند(Bp)	شماره‌ثبت
اینترلوکین۲	F:CCCGTGGCTAACTAATCTGCTG R:TGAGACACCAGTGGGAAACAGT	۶۰/۶۶-۲/۱	۲۸۷	HE608819
اینترلوکین۱۲	F:GCCGACTGAGATGTTCCTGG R:CCTTGCTTTTGTATTTCTTTGTGC	۵۷/۶۱-۷/۴	۲۲۷	JN942590
بتااکتین	F:AGCCAACAGAGAGAAGATGACAC R:CATCACCAGAGTCCATCACAATA	۶۰-۵۸	۱۳۴	L08165.1

واکنشReal – Time PCR

برای تعیین کمیت واکنش، از رنگ‌هایی مانند سایبرگرین استفاده شد. وقتی که این رنگ به DNA دو رشته‌ای می‌پیوندد، سبب انتشار نور فلورسنس می‌شود. زمانی که شدت فلورسنس تولیدی در اثر تکثیر قطعه‌هایPCR بیش از میزانپایه باشد، چرخه آستانه به وسیله دستگاه شناسایی می‌شود. تعیین کمیت با اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورنس و شناساییC_T انجام شد. سپس با محدود شدن اجزای واکنش، منحنی تکثیریک کفه تشکیل داد که نشان‌دهنده‌ی توقف تکثیربود. پس از این گامه، منحنی ذوب و بازشدن دو رشته DNA با افزایش تدریجی دما از ۵۵ به ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد، سپس بازدهی و ضریب‌تبیین(R^2) در منحنی استاندارد بررسی‌شد. مقادیر این دو نشان‌دهنده‌ی این است که هم ژن هدف و هم ژن مرجع که در این پژوهش mRNAی بتا اکتین است، نزدیک به ۱۰۰ درصد(با پنج درصد اختلاف ۹۵ درصد تا ۱۰۵ درصد) تکثیر شدند.واکنش‌هایReal-Time PCR در حجم کل ۱۵ میکرولیتر، شامل ۷/۵ میلی‌لیتر مخلوط اصلی سایبرگرین،۱ میکرولیترپرایمرهای پیش‌رو و ۱ میکرولیتر پرایمرمعکوس، ۱ میکرولیتر cDNAو۴/۵ میلیلیترآب بدون نوکلئاز بود که به صورت تکراری اجرا شدند و نسبت به بتااکتین به‌عنوان ژن مرجع، بیان شدند. داده‌های حاصل با استفاده از روش ΔCt با تصحیح راندمان تقویت به یک نمونه کالیبراتورنرمال سازی شدند(Livak & Schmittgen, 2001).

عملکرد لاشه

در انتهای دوره(روز۴۲ پرورش)، ۲ جوجه از هرتکرارانتخاب و پس از توزین، ذبح شدند. وزن هر یک از اجزای‌لاشه جداگانه اندازه‌گیری و درصد هریک از اجزای لاشه برآورد شد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

به منظور سنجش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی، در روز دهم پرورش دو جوجه ازهر تکرار به‌طور تصادفی انتخاب و نمونه خون بعد از خون‌گیری از قلب، در لوله‌های پلاستیکی حاوی اتیلن‌دی‌آمین‌تتراستیک‌اسید جمع‌آوری شد. نمونه‌ها تا زمانی که پلاسماباسانتریفیوژ (۱۵۰۰ × گرم به مدت ۲۰ دقیقه) جمع آوری و جدا شوند، روی یخ نگهداری شدند. پلاسما برداشت و تا آنالیز بیشتر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت گلوتاتیون‌پراکسیداز(GPX) و سوپراکسیددیسموتاز(SOD) با استفاده ازکیت‌های تجاری RANSELو(RANSOD(RANDOX Laboratories Ltd., London, UK مطابق دستورالعمل سازنده تعیین شد.

آنالیز آماری

این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار، چهار تکرار و نه مشاهده در هر تکرار با استفاده از مدل خطی تعمیم یافته (GLM) درنرم‌افزارآماریSAS (نسخه ۹/۱) انجام شد. تفاوت بین میانگین‌های تیمار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن اندازه‌گیری شد. تغییرات سطوح بیان‌ژن، خطای استاندارد و اهمیت آماری توسط نرم‌افزار بر اساس فرمول توسعه یافته (Pfaffl & Hagelei, 2001) محاسبه شد. P-Value کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

در روز ۲۸ پرورش تزریق واکسن علیه آنفلوانزا و نیوکاسل انجام‌شد، اما هفت و چهارده روز پس از واکسیناسیون (جدول۳) تفاوتی در تیترآنتی‌بادی‌های آنفلوانزاونی و کاسلبین تیمارها مشاهده نشد(P>۰/۰۵)، اگرچه تیترآنتی‌بادی آنفلوانزا در تیمار سه، ۱۴روز پس از واکسیناسیون بهبود یافت ولی معنی‌دار نشد. افزایش سطح عنصر روی تا ۱۰۰پی‌پی‌ام به روش تزریق‌درون‌تخم‌مرغی نیز تأثیر مثبتی برعملکرد ایمنی اکتسابی و تولید آنتی‌بادی در خون نداشت (Biria *et al*., 2020). اما با افزایش غلظت تزریق‌درون‌تخم‌مرغی نانواکسیدروی با غلظت‌های ۱۰ و ۱۲میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سطح آنتی‌بادی‌های نیوکاسل و آنفلوآنزا نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت(Paluoj *et al*., 2021). برای ارزیابی ایمنی‌سلولی از آزمونCBH استفاده شد (جدول۴). ۱۲ساعت پس از تزریق فیتوهم‌اگلوتینین، سطح حساسیت پوستی در تیمار سه نسبت به تیماریک افزایش یافت(P<۰/۰۵)، افزودن مکمل نانواکسیدروی به جیره جوجه‌گوشتی به‌مقدار ۴۵ و۶۰ پی‌پی‌ام سبب افزایش رشد و تکثیر لنفوسیت‌ها و فعالیت فاگوسیتوزی سلول‌ها و ایمنی‌زایی می‌شود(El-Katcha *et al*., 2017)، اما تزریق‌داخل‌تخم‌مرغی ۱۰ و۱۲ میلی‌گرم نانواکسیدروی تغییرات معنی‌داری را در آزمونCBH در انتهای دوره پرورش در جوجه‌گوشتی ایجاد نکرد (paluoj *et al*., 2021). نانواکسیدروی با فعال‌کردن تیموسیت‌ها سبب بلوغ نفوسیت‌هایT، بهبود عملکرد لنفوسیتB و افزایش تولید ماکروفاژها و افزایش پاسخ ایمنی می‌شود (Tizard, 2009). بازوفیل‌ها نقش التهابی در سلول دارند و افزودن نانوذرات‌روی به مقدار ۱۵تا۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره سبب افزایش‌درصد بازوفیل‌های سلول می‌شود (El-Katcha *et al*., 2017) همین موضوع سبب شد تا تزریق نانواکسیدروی، سبب افزایش حساسیت بازوفیل‌های سطح پوست و ایمنی سلولی شود.

بیان‌ژن اینترلوکین۱۲(IL-12) زمانی‌که ۱۰و۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانواکسیدروی تزریق شد، بیشتر از تیمار شاهد بود(P<۰,۰۵). هم‌چنین بیان‌ژن اینترلوکین۲(IL-2) با افزایش غلظت نانواکسیدروی بهبود پیدا کرد هرچند معنی‌دار نشد(جدول۴).

جدول۳. تاثیر تزریق نانواکسیدروی بر تیتر آنتی‌بادی آنفلوانزای‌مرغی و نیوکاسل(لگاریتم۲)

تیمارها	آنفلوانزا[۱] (روز۳۵)	آنفلوانزا[۲] (روز۴۲)	نیوکاسل[۳] (روز۳۵)	نیوکاسل[۴] (روز۴۲)
شاهد	۱/۷۵	۲/۰۰	۱/۷۵	۲/۷۵
تیمار۱[۵]	۱/۷۵	۳/۰۰	۲/۰۰	۳/۵۰
تیمار۲[۶]	۱/۵۰	۳/۷۵	۲/۰۰	۳/۵۰
P-value	۰/۷۴۸	۰/۰۵۴	۰/۸۵۶	۰/۴۰۵
SEM	۰/۱۵۲	۰/۱۹۱	۰/۲۱۰	۰/۲۵۰

*میانگین‌هایی که در هر ستون حرف‌های متفاوت دارند، دارای اختلاف آماری معنی‌داری با هم هستند(P<۰/۰۵).

۱:تیتر آنتی‌بادی آنفلوانزای مرغی(لگاریتم۲) هفت روز بعد از واکسیناسیون. ۲:تیتر آنتی‌بادی آنفلوانزا(لگاریتم۲) ۱۴ روز بعد از واکسیناسیون. ۳: تیتر آنتی بادی نیوکاسل(لگاریتم ۲) هفت روز بعد از واکسیناسیون. ۴: تیتر آنتی‌بادی نیوکاسل ۱۴ روز بعد از واکسیناسیون. ۵: تزریق ۲۰ میکرولیتر نانواکسیدروی(۰/۵ میلی‌گرم نانواکسیدروی در ۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی). ۶: تزریق ۲۰ میکرولیتر نانواکسیدروی(۰/۶ میلی‌گرم نانواکسیدروی در ۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی).

تزریق‌داخل تخم‌مرغی ۱۰و۱۲میلی‌گرم بر میلی‌لیترنانواکسیدروی در جوجه‌گوشتی باعث افزایش بیان‌ژن اینترلوکین ۱۲ و در نتیجه افزایش پاسخ ایمنی بدن شد(Paluoj *et al*., 2021)،هم‌چنین تزریق۰/۵میلی‌گرم نانواکسیدروی به جنین جوجه ۱۴روزه باعث افزایش قابل توجهی درغلظت اینترلوکین۱۲ شد(Goel *et al*., 2012). اینترلوکین۱۲ یکی ازمهم‌ترین سیتوکین‌-ها است که سبب بهبود ایمنی جوجه‌های‌گوشتی درپاسخ به بیماری‌ها وعفونت‌های ویروسی می‌شود (Takei *et al*., 2008). روی نقش مهمی در سیستم ایمنی و مقاومت بدن در برابر بیماری‌های پرندگان دارد و به تکثیر و تمایز بسیاری از سلول-های‌ایمنی بدن با تأثیر بر رونویسی DNA کمک می‌کند، همچنین نشان داده شده است که ایمنی ذاتی ممکن است با ترشح اینترلولین-۲ در ارتباط باشد که عنصر روی این افزایش ترشح اینترلوکین-۲ را حمایت می کند (Goel *et al*., 2012). شاید روی با نقش مهمی که درساختارآنزیم‌های رونویسی(DNA پلیمراز و RNA پلیمراز) دارد (Klug, 2010)، سبب افزایش بیان‌ژن گیرنده‌های اینترلوکین۱۲در سلول شده(Goel *et al*., 2012) و با افزایش این گیرنده‌ها تولید IL12 برای اتصال به آن جهت ایجاد پیام‌های‌ایمنی افزایش‌یافته ودرنتیجه بیان‌ژن و سطح ایمنی‌زایی اینترلوکین۱۲بهبود یافت (Paluoj *et al*., 2021).

جدول۴. تاثیر تزریق نانواکسید روی برتست حساسیت پوستی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و بیان‌ژن‌های

تیمارها	تست‌حساسیت‌پوستی[۱] (۱۲)	تست‌حساسیت‌پوستی[۲] (۲۴)	گلوتاتیون‌پراکسیداز	سوپراکسیددیسموتاز	اینترلوکین۲	اینترلوکین ۱۲
شاهد	۰/۰۹^{b}	۰/۰۸۰^{b}	۵۰/۱۶^{b}	۱۵۰/۸۲	۰/۳۷	۰/۰۶^{b}
تیمار۱[۳]	۰/۱۷^{ab}	۰/۱۱۰^{b}	۴۲/۲۷^{b}	۱۴۶/۶۱	۱/۰۲	۱/۰۵^{a}
تیمار۲[۴]	۰/۳۵^{a}	۰/۳۷۲^{a}	۱۳۰/۷۰^{a}	۱۵۰/۹۰	۱/۰۳	۱/۱۲^{a}
P-value	۰/۰۳۶	۰/۰۵۲	۰/۰۰۰	۰/۱۳۲	۰/۰۸۷	۰/۰۱۴
SEM	۰/۰۳۶	۰/۰۴۵	۵/۳۸۵	۱/۰۷۷	۰/۱۲۱	۰/۱۲۹

*میانگین‌هایی که در هر ستون حرف‌های متفاوت دارند، دارای اختلاف آماری معنی‌داری با هم هستند(**P<۰/۰۵**).۱:تست حساسیت پوستی بعد از ۱۲ساعت . ۲:تست حساسیت پوستی بعد از۲۴ ساعت. ۳: تزریق ۲۰ میکرولیتر نانواکسیدروی(۰/۵ میلی‌گرم نانواکسیدروی در ۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی). ۴: تزریق ۲۰ میکرولیتر نانواکسیدروی(۰/۶ میلی‌گرم نانواکسیدروی در ۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی).

با تزریق نانواکسیدروی تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموت از درتیمارهای مختلف مشاهده نشد(جدول۴)، اما فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در تیمارهایی که۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانواکسیدروی تزریق شد نسبت به تیمار دو که۱۰میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر نانواکسیدروی تزریق‌شد و تیمار شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۵). اما تزریق‌درون تخم‌مرغی ۱۰و۱۲میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر نانواکسیدروی (Paluoj *et al*., 2021) یا مصرف ۴۵ و۶۰ میلی‌گرم نانواکسیدروی به عنوان مکمل

در جیره، تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم گلوتاتیون‌پراکسیداز ایجاد نکرد(El-Katcha *et al*., 2017). اثر محافظتی روی در برابر پراکسیداسیون لیپیدها می‌تواند با اثر مفید آن به عنوان کوآنزیم بر فعالیت گلوتاتیون پراکسید از در سرم و بافت همراه باشد(Joanna *et al*., 2011). آنزیم گلوتاتیون‌پراکسید از نقش مهمی در تنظیم و بهبود پاسخ حیوانات در شرایط استرسو تنشو از بین بردن رادیکال‌های‌آزاد و بهبود سلامت پرنده دارد (El-Katcha *et al*., 2017) ،که افزودن روی به شکلنانواکسیدروی به جیره‌غذایی به علت زیست فراهمی بهتر این عنصرسبب افزایش غلظت و کارایی آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و تأثیر مثبت آنها درسرم خون میشود (Ahmadi *et al*., 2014).

با تزریق نانواکسیدروی(جدول۵)، تفاوتی در نسبت‌تبدیل‌خوراک و وزن بدن در تیمارهای مختلف تا انتهای دوره پرورش مشاهده نشد(P>۰/۰۵)، اما میزان خوراک مصرفی در هفته‌پنجم و ششم پرورش نسبت به شاهد کاهش پیداکرد(P<۰/۰۵). با افزودن سطوح مختلف روی به جیره‌غذایی جوجه‌های گوشتی، وزن بدن، سرعت رشد ونسبت تبدیل خوراک بهبود پیدا می‌کند(Saleh *et al*., 2018)، هم‌چنین مصرف نانوذرات‌روی در جیره غذایی به‌عنوان مکمل سبب بهبود عملکرد و افزایش‌خوراک مصرفی درجوجه‌گوشتی می‌شود (Hatab *et al*., 2022). استفاده از نانواکسیدروی در جیره با افزایش طول پرز و عمق‌کریپت در روده و بهبود خصوصیات ریخت‌شناسی آن(El-Katcha *et al*., 2017) سبب افزایش قابلیت هضم مواد مغذی و کاهش مصرف خوراک بدون تاثیر منفی بر وزن بدن و ضریب تبدیل غذایی شد.

جدول۵. تاثیر تزریق نانواکسیدروی بر عملکرد در انتهای دوره پرورش

تیمارها	مصرف‌خوراک[۱] (هفته۵)	وزن‌بدن[۲] (هفته۵)	راندمان‌خوراک[۳] (هفته۵)	مصرف‌خوراک[۴] (هفته۶)	وزن‌بدن[۵] (هفته۶)	راندمان‌خوراک[۶] (هفته۶)
شاهد	۱۹۴۶/۰۰[a]	۱۲۵۷/۶۰	۱/۵۵	۲۹۶۳/۹۰[a]	۱۶۸۷/۹۰	۱/۷۶
تیمار۱[۷]	۱۸۵۰/۷۰[b]	۱۲۳۱/۰۰	۱/۵۰	۲۸۷۴/۹۰[b]	۱۶۹۴/۲۸	۱/۷۰
تیمار۲[۸]	۱۸۶۴/۱۸[b]	۱۲۴۱/۸۸	۱/۵۰	۲۸۷۲/۱۵[b]	۱۷۰۲/۷۳	۱/۶۹
value–P	۰/۰۳۶۰	۰/۳۹۷	۰/۴۹۸	۰/۰۴۳۴	۰/۷۹۸	۰/۱۲۹
SEM	۱۳/۴۲۵	۷/۶۲۴	۰/۰۱۸	۱۴/۱۴۵	۸/۹۳۱	۰/۱۳۶

*میانگین‌هایی که در هر ستون حرف‌های متفاوت دارند، دارای اختلاف آماری معنی‌داری با هم هستند(**P**<۰/۰۵).

۱:غذای مصرفی در روز ۳۵ پرورش. ۲: وزن بدن در روز ۳۵ پرورش. ۳: ضریب تبدیل‌غذایی در روز ۳۵ پرورش. ۴: غذای مصرفی در روز ۴۲ پرورش. ۵: وزن بدن در روز ۴۲ پرورش. ۶: ضریب تبدیل‌غذایی در روز ۴۲ پرورش. ۷: تزریق ۲۰ میکرولیتر نانواکسیدروی(۰/۵ میلی‌گرم نانواکسیدروی در ۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی). ۸: تزریق ۲۰ میکرولیتر نانواکسیدروی(۰/۶ میلی‌گرم نانواکسیدروی در ۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی).

با تزریق۱۰و۱۲میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر نانواکسیدروی، تفاوت معنی‌داری در وزن نسبی ران و سینه بین تیمارهای‌مختلف دیده-نشد(جدول۶). در پژوهشی با افزودن ۴۰ و۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانواکسیدروی به جیره جوجه‌گوشتی، وزن‌اندام‌های‌بدن افزایش یافت(Hatab *et al*., 2022). با تزریق ۱۰ و۱۲میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانواکسیدرویتفاوتی در وزن‌نسبی‌قلب، طحال،بورس‌فابرسیوس،کبد،کیسه‌صفرا وچربی‌حفره‌شکمی بین تیمارهای‌مختلف مشاهده نشد(P>۰/۰۵). برخی محققان گزارش‌دادند که افزودن ۱۵تا۶۰ میلی‌گرم نانوذرات‌روی به جیره جوجه‌گوشتی سبب کاهش چربی‌حفره‌شکمی، بهبود وزن بورس‌فابرسیوس و طحال و کاهش وزن کبد می‌شود(El-Katcha *et al*., 2017). برخی گزارش‌ها هم نشان داد که افزودن نانواکسیدروی به جیره جوجه‌گوشتی تاثیری در وزن‌نسبی چربی حفره شکمی ندارد(Saleh *et al*., 2018). در تزریق داخل‌تخم‌مرغی نانواکسیدروی و افزایش غلظت آن تا ۱۲۰پی‌پی‌ام هم تغییر معنی‌داری در وزن نسبی کبد، بورس‌فابرسیوس، طحال، قلب و وزن‌لاشه مشاهده نشد(Bakhshayesh *et al*., 2018).

جدول۶. تاثیر تزریق نانواکسیدروی بر وزن اجزای‌لاشه[1](درصد)

تیمارها	قلب	طحال	بورس	کبد	چربی شکمی	سنگدان	کیسه صفرا	ران	سینه
شاهد	۰/۳۹	۰/۹۶	۰/۱۹	۲/۰۲	۱/۰۷	۱/۴۸[a]	۰/۰۱۰	۱۹/۹۳	۲۴/۹۹[b]
تیمار۱[2]	۰/۴۹	۰/۱۱	۰/۲۰	۱/۸۰	۱/۳۸	۱/۲۳[ab]	۰/۱۱	۱۹/۶۰	۲۴/۷۵[ab]
تیمار۲[3]	۰/۰۴	۰/۰۹	۰/۱۹	۱/۸۱	۱/۱۵	۱/۰۵[b]	۰/۱۱	۱۹/۱۰	۲۶/۸۰[a]
P-value	۰/۲۶۹	۰/۴۰۸	۰/۹۶۲	۰/۶۱۴	۰/۷۰۹	۰/۰۴۳	۰/۹۱۲	۰/۷۳۲	۰/۱۱۲
SEM	۰/۰۲۳	۰/۰۰۶	۰/۰۱۳	۰/۱۰۱	۰/۱۵۳	۰/۰۵۸	۰/۰۰۷	/۴۲۰	۰/۸۲۹

*میانگین‌هایی که در هر ستون حرف‌های متفاوت دارند، دارای اختلاف آماری معنی‌داری با هم هستند(**P<۰/۰۵**).

۱: وزن هر قسمت از لاشه نسبت به وزن مرغ زنده. ۲: تزریق ۲۰ میکرولیتر نانواکسیدروی(۰/۵ میلی‌گرم نانواکسیدروی در ۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی). ۳: تزریق ۲۰ میکرولیتر نانواکسیدروی(۰/۶ میلی‌گرم نانواکسیدروی در ۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی).

باتوجه به‌اینکه عنصرروی سبب تحریک هورمون‌رشدانسولین‌مانند می‌شود و با تاثیر بر رونویسی و بیان‌ژن در ساخت پروتئین‌ها نقش داشته و با بهبود خصوصیات‌ریخت‌شناسی‌روده قابلیت‌هضم موادمغذی را افزایش‌می‌دهد، عدم تاثیر آن بر افزایش‌وزن قسمت‌های مختلف اندام‌های‌لاشه می‌تواند به‌دلیل استفاده از غلظت‌های نامناسب نانواکسیدروی و یا شکل و نحوه استفاده از آن باشد که نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

وزن نسبی سنگدان با تزریق ۱۰ و۱۲میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانواکسیدروی نسبت به تیمار شاهد کم‌تر بود(P<۰/۰۵). گزارشات نشان می‌دهد استفاده ازنانواکسیدروی به عنوان مکمل در جیره، وزن‌نسبی اندام‌های‌گوارشی جوجه‌های‌گوشتی را بهبود می‌بخشد(Ahmadi *et al*., 2014) و در تحقیق دیگر گزارش شد که با افزودن نانواکسیدروی به جیره تغییر معنی‌داری در وزن نسبی سنگدان دیده نشد(Bakhshayesh *et al*., 2018). در برخی گزارشات نیز افزودن نانواکسیدروی به جیره جوجه‌گوشتی سبب کاهش وزن نسبی سنگدان شد(Usama *et al*., 2020). اثرات‌سمی و مضر نانوذرات‌اکسیدروی هم می‌تواند سبب تخریب و تحلیل اندام‌ها و کاهش‌وزن آن‌ها شود(Sabina *et al*., 2020). شاید افزایش قابلیت دسترسی موادمغذی به واسطه بهبود فعالیت آنزیم‌های مرتبط با روی و بهبود خصوصیات ریخت‌شناسی‌روده سبب کاهش مصرف خوراک و در نتیجه فعالیت کم‌تر سنگدان و کاهش وزن‌نسبی آن شده‌است.

نتیجه گیری

می‌توان چنین استدلال کرد که زیست فراهمی بهتر عنصرروی به شکل نانوذرات در بدن سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های مرتبط با هضم و جذب و بهبود خصوصیات ریخت‌شناسی روده و افزایش سطح جذب شده و زیست‌فراهمی سایر موادمغذیبیشتر می‌شود که کاهش مصرف‌خوراک را به‌همراه دارد و می‌توان از آن به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده‌کرد. نانواکسیدروی با افزایش و بهبود بیان‌ژنIL12 و تاثیر بر تکثیر بازوفیل‌ها، افزایش سطح گلوتاتیون‌پراکسیداز سبب افزایش پاسخ‌ایمنی در جوجه‌گوشتی و بهبود سلامت پرنده می‌شود. با تزریق نانواکسیدروی در غلظت و زمان مناسب به جوجه-های‌گوشتی می‌توان در شرایط وجود تنش و استرس‌اکسیداتیو، با افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی‌خون به مقابله با تولید رادیکال‌های‌آزاد و پراکسیداسیون‌لیپید پرداخت.

REFERENCES

Ahmadi,F., Ebrahimnezjad,Y., Ghiasi ghalehkandi,J. & Maheri, Sis. N.(2014). The effect of dietary zinc oxide nanoparticles on the antioxidant state and serum enzymes activity in broiler chickens during starter stage. *International Conference on Biological, Civil and Environmental Engineering*, (UAE), 17-18.

Alitaneh, S., Afzali, N., Sarir, H. & NaeimiPour, H. (2017). Screening for effects of different levels of Ajowan (Carum Copticum L.) and Coriander (Coriandrum Sativum L.) seeds on performance and carcass characteristics of Ross broiler chickens. *Research on Animal Production*, 7, 21-32. (In Persian)

Bakhshayesh, S., Seifdavati, J., Seifzadeh, S., Aghjeh Gheshlagh, M. F., Abdi Benmar, H. & Vahedi, V. (2018). The effect of in ovo injection of nanoparticles of zinc oxide on hatching, growth performance and carcass yield of broiler chicks.*Research on Animal Production*, 9 (21) ,86-92.(In Persian)

Biria1, A., Navidshad, B., Aghjehgheshlag, M. F.& Nikbin, s. (2020). The Effect of in ovo Supplementation of Nano Zinc Oxide Particles on Hatchability and Post-Hatch Immune System of Broiler Chicken. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 10(3), 547-553.

Corrier, D. E. & Deloach, J. R.(1990). Evaluation of cell-mediated, cutaneous basophil hypersensitivity in young chickens by an interdigital skin test. *Poultry Science*, 69,403–408.

El-Katcha, M., Mosad, A. S. & El-badry, M. (2017). Effect of dietary replacement of inorganic zinc by organic or nanoparticles sources on growth performance, immune response and intestinal histopathology of broiler chicken. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences. AJVS*, 55(2), 129-145.

Goel, A., Bhanja, S. K., Mehra, M. & Pande, V.(2012). Does in ovo administration of zinc or iodine modulate differential expression of growth and immune related genes in broiler chickens? World´s Poultry Science Journal, -Salvador - Bahia - *Brazil Nutrition and Feed Technologies*, 1, 1030- 1034.

Gopi, M., Pearlin, B., Kumar, R. D., Shanmathy, M. & Prabakar, G. (2017). Role of nanoparticles in animal and poultry nutrition. Modes of action and applications in formulating feed additives and food processing. *International Journal of Pharmaceutics*, 13(7), 724-731.

Hatab, M. H., Rashad, E., Hisham, M. S., El-Sayed, R. E.& Abu taleb, A.M. (2022).Effects of Dietary Supplementation of Zinc Oxide Nanoparticles on Productive Performance, Physiological, Histological Changes and Tissues Zn Concentration in Broiler Chicks. Research squar, 1-26.

Hussien, K. R. A., Ismail, Z. S. H. & Abdel-Wareth, A. A. A. (2021). Application of zinc oxide nanoparticles as feed additive in broiler chicken nutrition under hot environmental conditions. *S VU-International Journal of Agricultural Sciences*, 3(3), 159-169.

Hosseini Nashli, S.M., Moslemipur, F., Maghsoudlou, S. & Kazemi Fard, M. (2017). The Effects of Saturea and Thyme Medicinal Plants with or without Enzyme on Performance, Blood Parameters in Broiler Chickens. *Research on Animal Production*, 8, 70-78. (In Persian)

Isani, G. & Carpenè, E. (2014). Metallothioneins, Unconventional Proteins from Unconventional Animals, a Long Journey from Nematodes to Mammals. *Biomolecules*, 4, 435-457.

Joanna, R. I.,Barbara, P. M. & Malgorzata, M. B. (2011). Protective effect of zinc against cadmium hepatotoxicity depends on this bioelement intake and level of cadmium. *Chemico-Biological Interactions*, 193,191-203.

Klug, A. (2010). The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annual Review of Biochemistry* 79, 213–231.

Livak, J. K. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C}{}_T$ Method. *Methods*, 25, 402-408.

Palouj, J., Kazemi-Fard, M., Rezaei, M., & Ansari-Piresaraei, Z. (2021).Effects of in ovo injection of nano zinc oxide on the hatchability, immunity and antioxidant responses, and relative gene expressions of interleukin 2 and 12 in broiler chickens.*Iranian Journal of Applied Animal Science*, 11(3), 595-603.

Pfaffl, M. W. & Hageleit, M. (2001). Validities of mRNA quanti-fication using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology*, 23,275-282.

Noy, Y. & Uni, Z. (2010). Early nutritional strategies. *World Poultry Science Journal*, 66, 639-645.

Razani, K., Mottaghitalab, M. & S.H. Hosseini Moghaddam, S. H. (2017). The effect of in ovo

injection of zinc-methionine and nano-zinc methionine on the Zn-T1 gene expression, alkaline phosphatase and maltase activity in broilers small intestine. *Journal of Animal Production Research*, 6, 73-87. (In Persian)

Sabina, K. (2020). Toxicological effect of zinc on liver of broiler chicks. *Egyptian Liver Journal*, 10-21.

Saleh, A. A., Ragab, M. M., Ahmed, E. A., Abudabos, A. M. & Ebeid, T. A. (2018). Effect of dietary zinc-methionine supplementation on growth performance, nutrient utilization, antioxidative properties and immune response in broiler chickens under high ambient temperature. *Journal of Applied Animal Research*, 46 (1), 820-827.

Suttle, N. (2010). *Mineral nutrition of livestock*. (4th Edition). (Pp. 426-458). Midlothian EH26 OPZ, UK.

Takei, M., Umeyama. A., Shoji. N.&Hashimoto, T. (2008). Diterpenes drive Th1 polarization depending on IL-12. *International Immunopharmacology*, 8, 1602-1608.

Tizard, I. R. (2009). *Veterinary Immunology*, an Introduction. (8th ed). Saunders Elsevier, St. Louis, MO.

Tsai, Y. H., Mao, S. Y., Li, M. Z., Huang, J. T., Lien, T. F. (2016). Effects of nanosize zinc oxide on zinc retention, eggshell quality, immune response and serum parameters of aged laying hens. *Animal Feed Science and Technology*, 2(13), 99–107.

Usama, T. M., Hosnia, S. A. M., Manal, A. M M., Omar, A. A., Rasha, I. M H., Ashraf, M. A., Sohair, M. M. R., Hanan, S. A. W., Aly, A. O. & Mohamed, A. O. (2020). Effect of zinc oxide nanoparticles on broilers' performance and health status. *Tropical Animal Health and Production*, 52, 2043–2054.