تحقیقات تولیدات دامی

سال ششم/ شماره اول/ بهار ۱۳۹۶ (۸۷-۷۳)

اثر تزریق درون آمنیوتیکی روی - متیونین و نانو روی - متیونین بر بیان ژن Zn-T1 و فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و مالتاز روده کوچک جوجه‌های گوشتی

کلثوم رازانی[۱]، مجید متقی طلب[۲*]، سیدحسین حسینی مقدم[۳]

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۱)

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر تزریق درون‌آمنیوتیکی روی - متیونین و نانو روی - متیونین بر بیان ژن انتقال‌دهنده روی (Zn-T1) و فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و مالتاز در ژژنوم جوجه‌های گوشتی بود. چهارصد عدد تخم مرغ بارور به چهار گروه (تیمار)، هریک با چهار زیر گروه (تکرار) تقسیم شدند. تیمار اول تا سوم به ترتیب شامل تزریق درون‌آمنیوتیکی یک میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی، سرم فیزیولوژی حاوی ٪۲۵ روی - متیونین و ٪۲۵ نانو روی - متیونین در روز هفدهم جوجه‌کشی بودند. چهارمین تیمار (کنترل منفی) هیچ تزریقی دریافت نکرد. درصد تفریخ هر تیمار محاسبه و در روزهای اول، سوم و هفتم پرورش، دو پرنده از هر تکرار ذبح شد و بیان ژن Zn-T1، فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و مالتاز در بافت روده اندازه‌گیری شد. وزن جوجه‌ها در زمان تفریخ در تیمار روی - متیونین (۰/۰۶±۴۳/۰۲) و نانو روی - متیونین (۰/۰۶±۴۲/۷۷) از سایر تیمارها بیشتر بود ($P<۰/۰۱$). همچنین وزن روده کوچک در روزهای یک و هفت پس از تفریخ در تیمار روی - متیونین (به ترتیب ۰/۰۴۸±۹/۷ ، ۰/۰۷±۱/۵۵) و نانو روی - متیونین (به ترتیب ۰/۰۴۸±۹/۵ ، ۰/۰۷±۱/۵۱) از سایر تیمارها بیشتر بود ($P<۰/۰۱$). تیمار نانو روی - متیونین در روزهای یک، سه و هفت بعد از تفریخ، بیشترین فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (به ترتیب ۰/۱±۱۷/۸، ۰/۰۸±۱۱/۵، ۰/۰۴±۷/۲) مالتاز (به ترتیب ۰/۰۶±۸/۸، ۰/۰۲±۵/۵، ۰/۰۳±۴/۲) و بیان ژن Zn-T1 (به ترتیب ۰/۰۰۹±۳/۱۷، ۰/۰۰۷±۴/۲۴، ۰/۰۰۵±۳/۶۷) را نشان داد ($P<۰/۰۱$). استنتاج نهایی این است که تزریق درون تخم‌مرغی نانو روی - متیونین منجر به افزایش بیان Zn-T1 شده و فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و مالتاز روده را در هفته اول پرورش افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: آلکالین فسفاتاز، جوجه گوشتی، مالتاز، ناقل روی، RT- PCR

*مسئول نویسنده: m_mottaghi@gstp.ir

مقدمه

نقش حیاتی عنصر روی (Zinc) در رشد و نمو جنین در مطالعات زیادی گزارش شده است (Richards, 1997; Miles, 2000). نشانه‌های عمومی جنین و جوجه‌های حاصل از گله‌های در معرض کمبود روی (محروم از روی) پایین بودن قابلیت تفریخ و جوجه درآوری، بدشکلی و ناقص الخلقگی جنینی، جوجه‌های ضعیف و پردرآوری ضعیف و وقوع بالای مرگ و میر می‌باشد (Hudson *et al.*, 2005; Miles, 2000; Richards, 1989). در اواخر دوره جوجه‌کشی ذخیره عنصر روی جنینی کاهش می‌یابد (Richards, 2010) اما تقاضا برای آن به شکل فزاینده‌ای در مراحل پایانی جنینی افزایش می‌یابد (Hudson *et al.*, 2005). از طرفی سطوح بالای کلسیم در جیره مرغان مادر گوشتی با جذب روی تداخل پیدا کرده و ممکن است منجر به کمبود روی در دوره جنینی شود (Hudson *et al.*, 2004).

از آنجایی که روی یک یون هیدروفیل قطبی دارای بار الکتریکی است، نمی‌تواند به سادگی از غشای سلولی عبور نموده و ورود آن به سلول، وابسته به حضور پروتئین‌های انتقال‌دهنده یا ناقلان غشایی است (Kambe *et al.*, 2006; Eide, 2006). پروتئین‌های ناقل روی به دو خانواده ناقل فلزات ZIP (ZRT/IRT-like Protein) و CDF (Cation Diffusion Facilitator) طبقه‌بندی می‌شوند. اعضای خانواده ZIP در ورود روی به درون سیتوزول نقش دارند و برعکس اعضای خانواده CDF خروج روی از سیتوزول و انتقال روی به درون اندامک‌های درون‌سلولی را به عهده دارند (Huang *et al.*, 2006).

امروزه هشت عضو Zn-T1 در خانواده CDF در پستانداران شناسایی شده‌اند (ناقلان روی ۸-۱). در میان آنها Zn-T1 به‌طور وسیع در اکثر بافت‌ها بیان می‌شود. انتقال‌دهنده ZnT-1 یک پروتئین غشایی انتگرال است که دارای الگوی بیان گسترده‌ای می‌باشد (Dufner *et al.*, 2003; Kambe *et al.*, 2006). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که عنصر روی موجود در جیره می‌تواند بیان ژن Zn-T1 را تنظیم کند، بنابراین سطوح mRNAی Zn-T1 در روده از طریق عنصر روی جیره می‌تواند تغییر کند (McMahon and Cousins, 1998). همچنین مستنداتی دال بر تأثیر افزایشی تزریق درون تخم‌مرغی روی - متیونین در دوره جنینی بر سطوح mRNAی Zn-T1 ژژنوم جوجه موجود است (Tako, *et al*., 2005).

با وجود اینکه رطوبت و چربی موجود در تخم‌مرغ پاسخگوی نیاز جنین و شاید بیش از نیاز جنین است، سطوح اسیدهای آمینه و پروتئین ذخیره شده در تخم‌مرغ کمتر از میزان مورد نیاز برای رشد و نمو بهینه جنین است (Ohta *et al*., 1999; 2001). متیونین اولین اسیدآمینه ضروری و محدودکننده در تغذیه طیور (در جیره‌های مرسوم و بر مبنای ذرت و کنجاله سویا) بوده، (Dilger and Baker, 2007) و اثرات قدرتمند آنابولیکی و محرک رشد بر همه سلول‌ها از جمله سلول‌های پوششی روده دارد. در فرایندهای هسته‌ای از جمله ساخت پروتئین‌ها، متیونین یک اسیدآمینه اولویت‌دار است. این نقش متیونین به علت شروع فرایند ترجمه است (Finkelstein, 1990). متیونین به‌طور متوسط بیش از سایر اسیدهای آمینه ضروری در دستگاه گوارش مصرف می‌شود. از آنجایی‌که عملکردهای متنوعی از متابولیسم متیونین در رشد و نمو دستگاه گوارش مورد نیاز است، مانند ساخت پروتئین، پیام‌دهی سلولی، عملکرد آنتی‌اکسیدانی و عملکرد ایمنی (Shoverller, *et al.,* 2003; Wang, *et al.,* 2009)، به‌نظر می‌رسد که احتیاجات عملکردی خاصی به متیونین برای رشد و نمو و نگهداری دستگاه گوارش حیوانات جوان وجود داشته باشد (Stoll, *et al.*, 1998).

با توجه به تنش اکسیداتیو توأم با رشد و نمو سریع دستگاه گوارش حیوانات جوان، اهمیت و نقش عملکردی متیونین به ویژه اثر آنتی‌اکسیدانتی، این اسیدآمینه کلید احتیاجات رشد و نمو دستگاه گوارش حیوانات جوان سریع‌الرشد است (Stoll, *et al.*, 1998). متیونین همچنین در بدن به سیستئین تبدیل می‌شود که بخش مهمی از ساختار متالوتیونین (ناقل درون‌سلولی روی) را تشکیل می‌دهد (Isani and Carpenè, 2014).

در سال‌های اخیر توجه خاصی به تزریق درون تخم‌مرغی ترکیبات مختلف نانو از جمله نانوسیل، نانوسلنیوم و نانوآهن شده است، بنابراین در مطالعه حاضر اثرات تزریق درون تخم‌مرغی روی - متیونین (Zinc-Metioneine) یک ترکیب آلی با قابلیت دسترسی بالاست،

به عنوان محرک رشد و مکمل تغذیه جنینی و مقایسه آن با ترکیب نانو روی - متیونین (Nano Zinc-Metioneine) که از ترکیب نانو ذرات روی و اسیدآمینه متیونین حاصل شده است، بررسی شد. ترکیب جدید نانو روی - متیونین برای اولین بار به عنوان محرک رشد جنینی بررسی و تأثیر اندازه عنصر روی در فرم نانو روی - متیونین بر رشد و سلامت جوجه‌ها مطالعه گردید.

با توجه به اثرات آنابولیکی روی - متیونین به نظر می‌رسد که این ترکیب به عنوان یک محرک قدرتمند برای تکثیر بافت پوششی روده و در نتیجه به عنوان محرک رشد و نمو روده عمل کرده و تجویز آن به بافت روده نابالغ ممکن است اثرات افزایشی بر مکانیسم‌های سلولی مرتبط با جذب روی (بیان و تنظیم Zn-T1) و همچنین فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (که یک پروتئین وابسته به روی است) و آنزیم مالتاز (به‌عنوان بهترین معیار بلوغ روده) داشته باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش با استفاده از چهارصد عدد تخم‌مرغ بارور (دامنه وزنی ۱/۱± ۵۵ گرم) از یک گله مادر گوشتی تجاری (سویه راس ۳۰۸ در سن ۴۵ هفتگی) انجام شد. محلول ٪۲۵ روی - متیونین (Merck, Germany) و نانو روی - متیونین (نانو شیمی سبز، ایران) در سرم فیزیولوژی تهیه شد. در روز هفدهم جوجه‌کشی تخم‌مرغ‌ها از دستگاه جوجه‌کشی خارج و پس از اطمینان از وجود جنین زنده (با روش نوربینی)، به طور تصادفی به چهار تیمار (هر تیمار دارای ۴ تکرار و هر تکرار ۲۵ عدد تخم‌مرغ) تقسیم شدند. قبل از تزریق انتهای پهن تخم‌مرغ به وسیله اتانول ٪۷۰ ضدعفونی و پس از سوراخ کردن پوسته، یک میلی‌لیتر از هر یک از محلول‌های آزمایشی به تیمارهای مربوطه با استفاده از سرنگ یک میلی‌لیتری استریل و سر سوزن درجه ۲۱ در عمق ۱۸ میلی‌متری تزریق شد. تزریق درون تخم‌مرغی براساس روش تاکو و همکاران از انتهای پهن تخم‌مرغ و در کیسه آمنیون انجام شد (Tako *et al.*, 2005). پس از تزریق منفذ پوسته به وسیله پارافین (Merck, Germany) مذاب استریل مسدود و تخم‌مرغ‌ها به دستگاه جوجه‌کشی برگردانده شدند. برای اطمینان از دقت تزریق در کیسه آمنیوتیک، در مرحله تزریق آزمایشی پوسته آهکی بالای کیسه هوایی چند عدد تخم‌مرغ برداشته شده و محل ورود مواد مشاهده گردید. جوجه‌کشی در شرایط استاندارد (حرارت ۳۷/۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ٪۶۸) انجام شد. پس از تفریخ جوجه‌ها و محاسبه درصد تفریخ هر یک از تیمارها، جوجه‌ها به سالن پرورش منتقل شدند. پس از توزین، جوجه‌ها در قفس‌های با ابعاد ۱×۱ متر مربع و بر روی بستر به‌مدت ۶ هفته تحت شرایط استاندارد و کاملاً یکسان پرورش یافتند. برنامه واکسیناسیون مطابق دستورالعمل پرورش جوجه‌های گوشتی انجام شد. در دوره پرورش آب و خوراک بدون محدودیت و به طور آزاد برای جوجه‌ها فراهم شد. جیره‌های غذایی براساس توصیه‌های انجمن ملی تحقیقات آمریکا (NRC, 1994) تهیه و در اختیار جوجه‌ها قرار گرفتند. اجزاء و ترکیبات شیمیایی جیره در جدول ۱ آمده است.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز روده در سنین یک، سه و هفت‌روزگی از هر تکرار دو عدد جوجه با توجه به میانگین وزنی تکرار مربوطه انتخاب شده و پس از کشتار با روش جابجایی گردن، روده آنها جدا شده پس از توزین و تعیین طول روده کوچک، نمونه‌هایی از بافت کامل ژژنوم تهیه و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد (Moosavinasab and Ghiasi Ghalehkandi, 2011). بعد از یخ‌گشایی، نمونه‌های ژژنوم به‌میزان ۵۰ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر بافر سرد PBS (pH=7) با استفاده از هموژنایزر (Heidolph DIAX 900; Sigma –Aldrich, Germany) با دور متوسط به‌مدت ۲۰ ثانیه همگن شد. مخلوط حاصله به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رونشین به عنوان منبع آنزیم استفاده شده و به مدت ۲۰- ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، به روش طیف‌سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (UV/VIS +T80, UK PG Instruments) و محاسبه میزان جذب نوری در ۴۱۰ نانومتر در زمان دو دقیقه اندازه‌گیری شد. هر واحد از فعالیت آنزیم به صورت تولید یک مول پارانیتروفنول در دقیقه در هر گرم از بافت ژژنوم تعریف می‌شود (Saki *et al.*, 2012).

جدول ۱- اجزای جیره غذایی (%) و ترکیب شیمیایی جوجه‌های گوشتی در دوره آغازین، رشد و پایانی

Table 1. Ingredients (%) and chemical composition of diets for broiler chickens during starter, grower and finisher periods

Feed ingredients	Periods		
	Starter	Grower	Finisher
Corn	55.55	56.25	61.00
Soybean Meal	37.30	35.22	30.65
Oil	2.0	4.2	4.1
DCP	1.84	1.5	1.5
Calcium Carbonate	1.34	1.1	1.1
Salt	0.3	0.3	0.3
Mineral Premix	0.5	0.5	0.5
Vitamin Premix	0.5	0.5	0.5
Methionine	0.36	0.28	0.25
Lysine	0.31	0.15	0.1
Calculated analysis			
Energy (kcal)	2900	3050	3100
Protein%	21.2	20.3	18.5
Calcium%	1.01	0.87	0.82
Available Phosphorus%	0.48	0.45	0.41
Methionine%	0.7	0.59	0.54
Met + Cys%	1.03	0.92	0.83
Lys%	1.37	1.20	1.06

به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم مالتاز روده، ابتدا بافر مالیت سدیم (۰/۵۸ گرم اسید مالیک به‌علاوه ۷ میلی‌لیتر NaOH ۱ مولار به حجم ۱۰۰ رسانده شد، pH=6) و محلول سوبسترا (محلول ۰/۵۶ مول مالتوز در بافر مالیت ۰/۱ مولار، pH= 6) تهیه شد. سپس نمونه‌های بافت ژژنوم یخ‌گشایی شده و به‌میزان یک میلی‌گرم از ژژنوم در ۵۰ میکرولیتر محلول نمک ۰/۹٪ به وسیله هموژنایزر (Heidolph DIAX 900; Sigma –Aldrich, Germany) با دور پایین به مدت ۲۰ ثانیه همگن شد. مخلوط حاصله با آب دو بار تقطیر (۱:۲۰) رقیق شده، محلول سوبسترا به آن افزوده و به مدت بیست دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شد. واکنش با افزودن معرف گلوکز اکسیداز، متوقف و محلول حاصله به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. جذب نوری محلول توسط دستگاه طیف‌سنج (T80, UV/VIS PG Instruments+UK) در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم مالتاز بر حسب واحد (واحد: هر یک میکرومول گلوکز آزاد شده در هر دقیقه از واکنش) در هر میلی‌گرم از پروتئین بیان شد (Dahlqvist,1984).

برای اندازه‌گیری بیان ژن Zn-T1 ابتدا نمونه‌های کامل ژژنوم هموژنیزه شده و RNA با استفاده از محلول اکیوزول (AccuZol, Korea Bioneer, Inc) استخراج شد. کیفیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز و کمیت آن به روش طیف‌سنجی و به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (NanoDrop 2000, USA) بررسی شد. بلافاصله RNA استخراجی جهت ساخت cDNA استفاده شد. آغازگرهای اختصاصی ژن هدف Zn-T1 و ژن کنترل داخلی β actin با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی شد (جدول ۲).

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای طراحی‌شده برای ژن‌های Zn-T1 و β-actin

Table 2. Characteristics of primers designed for Zn-T1 and β-actin genes

Gene	No	Sequence	Primer Length (pb)	Product Size (pb)	Melting temperature (°C)
Zn-T1	XM_421021.3	Forward5′:CGGGTGATCCTTGTTGCCTA 3′	20	91	55.35
		Reverse: 5 ′GGCTCTTTGCCAAGTAAGGC 3′	20		55.15
β-actin	NM_205518.1	Forward: 5′ TGATATTGCTGCGCTCGTTG 3′	20	132	55.11
		Reverse: 5′ATACCAACCATCACACCCTGA-3′	21		54.49

به منظور تعیین دمای بهینه اتصال (Annealing) آغازگرها، واکنش گرادیان دمایی در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (۲/۵ µl بافر PCR10X، ۰/۸µl از هر آغازگر، ۰/۱۲۶ µl آنزیم Taq، ۰/۷۵ µl MgCl2، ۱/۲۵ µl dNTPs، ۲ µl DNA، ۱۶/۷۷ µl ddH_2O) انجام شد. این واکنش براساس برنامه حرارتی مشتمل بر پنج دقیقه واسرشت‌سازی اولیه زنجیره‌های الگو در دمای ۹۵°C ، ۴۰ چرخه اصلی شامل ۳۰ ثانیه واسرشت‌سازی در دمای۹۵°C، ۳۰ ثانیه اتصال آغازگر در دامنه دمای ذوب آغازگرها، ۳۰ ثانیه گسترش در دمای ۷۲°C و در پایان گسترش نهایی زنجیره الگو به مدت پنج دقیقه در دمای۷۲°C با کمک ترموسایکلر (PCR, LabCycler, Germany) انجام شد.

برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های کنترل (β actin) و هدف (Zn-T1) واکنش Real time PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (مخلوط آماده سایبرگرین ۱۲/۵ میکرولیتر، آغازگر رفت ۰/۴ میکرولیتر، آغازگر برگشت ۰/۴ میکرولیتر، cDNA ۱/۵ میکرولیتر و آب دو بار تقطیر عاری از نوکلئاز ۱۰/۲ میکرولیتر) انجام شد. این واکنش براساس برنامه حرارتی در قالب سه دقیقه واسرشت‌سازی اولیه زنجیره‌های الگو در دمای ۹۵°C ، ۴۰ چرخه اصلی شامل ۳۰ ثانیه واسرشت‌سازی در دمای ۹۵°C، ۳۰ ثانیه اتصال آغازگر در دمای ۶۰°C و ۳۰ ثانیه گسترش زنجیره الگو در دمای ۷۲°C در دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad, Applied Biosystems, Germany) با استفاده از رنگ فلورسنت سایبرگرین (Perfect Real Time, Termo Scientific) انجام شد.

داده‌های حاصل از Real time PCR به‌صورت Ct (Threshold cycle) از دستگاه استخراج و نسبت به ژن کنترل (β actin) نرمال‌سازی شد. میزان بیان ژن Zn-T1 براساس روش کمیت‌سنجی نسبی (Relative Quantification) و از طریق فرمول لایوک ($2^{-\Delta\Delta CT}$) اندازه‌گیری شد (Livak, 2001). سپس مقادیر بیان ژن در تیمارهای آزمایشی و تیمارهای کنترل (مثبت و منفی) به‌صورت دو به دو با هم مقایسه شد.

داده‌های عملکردی و اندازه‌گیری‌های آنزیمی و بیان ژن با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۱) و رویه آنوا (proc ANOVA) تجزیه و تحلیل شده و میانگین تیمارها در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن مقایسه شد (SAS, Institute,2004).

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و چهار تکرار اجرا شد و مدل آماری طرح به‌صورت زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + t_j + \varepsilon_{ij}$$

که در آن Y_{ij} مقدار هر مشاهده (داده)، μ میانگین کل، t_j اثر تیمار و ε_{ij} خطای آزمایشی می‌باشد.

نتایج

براساس نتایج این تحقیق، تزریق درون‌آمنیوتیکی روی - متیونین و نانو روی - متیونین منجر به افزایش معنی‌دار ($P< ۰/۰۱$) وزن جوجه‌ها در زمان تفریخ شده، اما بر درصد وزن بدن در زمان تفریخ تأثیری نداشت (وزن نسبی جوجه‌های تفریخ شده از طریق تقسیم وزن بدن جوجه‌ها به وزن تخم‌مرغ‌های جوجه‌کشی محاسبه و به‌عنوان درصد بیان شد). اگرچه وزن تفریخ جوجه‌ها در گروه تزریق سرم فیزیولوژی بالاتر از گروه بدون تزریق بود اما اختلاف مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار نبود. طبق نتایج

به‌دست آمده در این مطالعه گروه‌های آزمایشی و کنترل از نظر درصد جوجه‌درآوری اختلاف معنی‌داری نداشتند. قابلیت تفریخ (درصد جوجه‌درآوری) براساس تعداد جوجه تفریخ شده و بر حسب درصدی از تخم‌مرغ‌های تزریق شده در هر تکرار محاسبه شد. نتایج تأثیر تغذیه درون‌آمنیوتیکی روی - متیونین و نانو روی - متیونین بر صفات جوجه‌کشی در جدول ۳ آورده شده است.

همچنین در این آزمایش، تغذیه درون‌آمنیوتیکی روی - متیونین و نانو روی - متیونین موجب افزایش معنی‌دار ($P< ۰/۰۵$) وزن مطلق (گرم) و وزن نسبی (٪) روده کوچک جوجه‌های تازه تفریخ شده در مقایسه با گروه‌های کنترل شده و این اختلاف تا روز هفت پرورش معنی‌دار ($P< ۰/۰۵$) باقی ماند، اما تیمارهای آزمایشی بر طول روده بی‌تأثیر بودند (جدول ۴).

جدول ۳ – اثر تیمارها بر درصد جوجه‌درآوری، وزن بدن (گرم) و وزن نسبی بدن (٪) جوجه‌ها در زمان تفریخ

Table 3. Effect of treatments on hatchability (%), body weights (g), and relative body weights (%) of chicks at hatch time.

Treatment	Egg weights (g)	Body weight (g)	Body weight (٪)	Hatchability (%)
Non injected	54.69	41.13[b]	75.89	89.53
Serum injected	54.84	41.86[b]	76.35	90.87
Zn-Met injected	55.77	43.02[a]	77.13	90.97
Nano Zn-Met injected	55.24	42.77[a]	77.43	90.47
SEM	0.137	0.064	0.336	0.395
P-value	0.218	0.001	0.265	0.133

Means with different superscripts in the same column differ significantly (P < 0.05).

جدول ۴ - اثر تیمارها بر طول، وزن و وزن نسبی روده کوچک در سن یک و هفت‌روزگی

Table 4. Effect of treatments on length, weight and relative weight of small intestine at age of 1 and 7 days

Treatment	DAY 1				DAY 7			
	Body weight (g)	Intestine length (cm)	Intestine weight (g)	Intestine weight (%)	Body weight (g)	Intestine length (cm)	Intestine weight (g)	Intestine weight (%)
Non injected	41.13 [b]	35.9	1.32 [b]	3.20 [c]	120.73 [a]	87.2	8.3 [b]	6.94 [c]
Serum injected	41.86 [b]	34.9	1.37 [b]	3.27 [bc]	119.28 [a]	87.6	7.9 [b]	6.69 [bc]
Zn-Met injected	43.02 [a]	36.1	1.55 [a]	3.60 [a]	128.87 [b]	86.5	9.7 [a]	7.57 [a]
Nano Zn-Met injected	42.77 [a]	37.4	1.51 [a]	3.53 [ab]	131.22 [b]	86.1	9.5 [a]	7.27 [ab]
SEM	0.064	0.717	0.007	0.009	0.05	0.253	0.048	0.03
P-value	0.001	0.28	0.004	0.033	0.002	0.229	0.002	0.018

Means with different superscripts in the same column differ significantly (P < 0.05)

براساس نتایج این آزمایش تغذیه درون‌آمنیوتیکی روی - متیونین و نانو روی - متیونین، منجر به افزایش معنی‌دار ($P< ۰/۰۱$) میزان فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و مالتاز روده در روزهای ۱، ۳ و ۷ پس از تفریخ گردید (جدول ۵).

تزریق روی - متیونین و نانو روی - متیونین بیان mRNAی Zn-T1 ژژنوم را در حد بالایی در روده القا کرد.

همان‌گونه که جدول نشان می‌دهد، تزریق تیمارهای آزمایشی موجب افزایش بیان mRNAی Zn-T1 در تمام روزهای اندازه‌گیری در مقایسه با تیمارهای کنترل شد. همچنین تزریق روی - متیونین و نانو روی - متیونین در تخم‌مرغ بیان mRNAی Zn-T1 ژژنوم جوجه را در روز اول پس از تفریخ به علاوه تا روز هفتم به مقدار زیادی افزایش داد که نتایج آن در جدول ۶ ارائه شده است.

جدول ۵ - اثر تیمارها بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و مالتاز روده (µmol/min) در سن یک، سه و هفت‌روزگی

Table 5. Effect treatments on intestinal alkaline phosphatase and maltase activity (µmol/min) at age of 1, 3 and 7 day

Treatment	Alkaline phosphatase			Maltase		
	Day 1	Day 3	Day 7	Day 1	Day 3	Day 7
Non injected	3.7 ^{c}	5.7 ^{c}	12.3 ^{c}	2.3 ^{c}	3.7 ^{c}	5.6 ^{c}
Serum injected	4.1 ^{c}	6.2 ^{c}	13.2 ^{c}	2.6 ^{c}	3.6 ^{c}	5.9 ^{c}
Zn-Met injected	5.5 ^{b}	8.1 ^{b}	15.2 ^{b}	3.5 ^{b}	4.7 ^{b}	7.1 ^{b}
Nano Zn-Met injected	7.2 ^{a}	11.5 ^{a}	17.8 ^{a}	4.2 ^{a}	5.5 ^{a}	8.8 ^{a}
SEM	0.046	0.082	0.139	0.035	0.025	0.065
P-value	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

Means with different superscripts in the same column differ significantly (P < 0.01)

جدول ۶ - اثر تیمارها بر بیان نسبی ژن Zn-T1 در روده در سن یک، سه و هفت‌روزگی

Table 6. Effect of treatments on relative expression of Zn-T1 gene in the intestine at age of 1, 3 and 7

Treatment	Day 1	Day 3	Day 7
No injected	0.77^{c}	0.92^{c}	0.88^{c}
Serum injected	0.94^{c}	1.10^{c}	1.00^{c}
Zn-Met injected	2.56^{b}	3.14^{b}	2.24^{b}
Nano Zn-Met injected	3.67^{a}	4.24^{a}	3.17^{a}
SEM	0.005	0.007	0.009
P-value	0.001	0.001	0.001

Each value represents the mean of eight chicks.
Means with different superscripts in the same column differ significantly (P < 0.05)

بحث

تأثیر تغذیه درون‌آمنیوتیکی روی - متیونین و نانوروی - متیونین بر درصد جوجه درآوری، وزن جوجه یک روزه، وزن و طول روده و همچنین عملکرد روده کوچک (بیان mRNAی Zn-T1 و فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و مالتاز در ژژنوم) جوجه‌های گوشتی در هفته اول پرورش مطالعه شد. براساس نتایج این آزمایش تزریق درون‌آمنیوتیکی روی - متیونین و نانوروی - متیونین موجب افزایش وزن بدن جوجه‌ها در زمان تفریخ و در سن هفت روزگی شد، اما بر درصد جوجه درآوری تأثیری نداشت. در این مطالعه اگرچه وزن بدن جوجه‌ها در تمامی تیمارها اعم از تیمارهای آزمایشی و تیمارهای کنترل در پایان هفته اول (شاید به علت استفاده از جیره‌های رقیق‌تر، شرایط نامطلوب سالن پرورش و یا تاخیر در اولین خوراک‌دهی جوجه‌ها به علت عملیات تعیین جنسیت) نسبت به استاندارد جهانی پایین‌تر بود، اما اثرات معنی‌دار

و مفید تزریق درون‌آمنیوتیکی پس از مقایسه وزن بدن تیمارهای آزمایشی و تیمارهای کنترل در پایان هفته اول، و مشاهده اختلاف آماری معنی‌دار در وزن بدن در پایان هفته نخست، به روشنی مشهود است.

در مورد تأثیر تزریق درون تخم‌مرغی بر درصد جوجه درآوری گزارش‌های متناقضی ارائه شده است. در برخی مطالعات تأثیر منفی تزریق درون تخم‌مرغی بر درصد جوجه درآوری گزارش شده است (McGruder *et al.*, 2011; Coskun *et al.*, 2014). مطالعات دیگر افزایش درصد جوجه‌درآوری را پس از تزریق درون تخم‌مرغی گزارش کرده‌اند (Hu *et al.*, 2015, 2011; Bottje *et al.*, 2010). برخی از مطالعات نیز حاکی از عدم تأثیر تزریق درون تخم‌مرغی بر درصد جوجه‌درآوری است (Keralapurath *et al.*, 2010; Shafey *et al.*, 2012). دلایل متعددی برای این عدم تطابق‌ها و اختلافات مشاهده شده در مطالعات مختلف می‌توان برشمرد از جمله نوع و حجم ترکیبات مختلف تزریقی ممکن است بر نتایج تأثیرگذار باشد. حجم محلول‌های تزریقی به درون کیسه آمنیوتیک با توجه به حجم کیسه آمنیوتیک در زمان تزریق تعیین می‌شود. از روز ۱۴ جنینی به علت افزایش میزان مایع آمنیوتیک می‌توان محلول‌های تغذیه‌ای را به‌صورت تزریق درون‌آمنیوتیکی تجویز نمود، اما در روزهای ۱۸-۱۶ جنینی با توجه به حجم کلی کیسه آمنیون، بهترین حجم محلول تزریقی برای تخم‌مرغ یک میلی‌لیتر در روز ۱۷/۵ جنینی و برای تخم بوقلمون سه و نیم میلی‌لیتر در روز ۲۳ جنینی پیشنهاد شده است (Uni and Ferket, 2004).

یکی دیگر از دلایل به دست آمدن نتایج متناقض در مورد تأثیر IOF بر میزان جوجه درآوری ممکن است به شیوه‌های مختلف تزریق درون‌آمنیوتیکی مرتبط باشد. علاوه بر تفاوت‌هایی که در اثر تزریق دستی و تزریق به وسیله سرنگ اتوماتیک به وجود می‌آید، مکان تزریق درون‌آمنیوتیکی نیز می‌تواند در بروز نتایج متناقض موثر باشد. تزریق به درون کیسه آمنیون از دو مکان (انتهای پهن تخم‌مرغ و در زیر کیسه هوا و یا تزریق از کناره تخم‌مرغ و مستقیم در اطراف جنین) قابل انجام است. در مطالعه حاضر تزریق درون‌آمنیوتیکی از انتهای پهن تخم‌مرغ و در زیر کیسه هوا انجام شد و نتایج به‌دست آمده با یافته‌های Tako *et al.*, 2004 مطابقت دارد. یکی دیگر از علل حصول نتایج ناهمگن در این زمینه، احتمالاً تفاوت در عمق تزریق است. در روش تزریق درون‌آمنیوتیکی که از انتهای پهن تخم‌مرغ انجام می‌شود، عمق تزریق با توجه به ارتفاع کیسه هوا انتخاب می‌شود و اندازه کیسه هوایی علاوه بر اندازه تخم‌مرغ تحت تأثیر شرایط دستگاه جوجه‌کشی توسعه می‌یابد. در این آزمایش با توجه به اندازه کیسه هوا در روز تزریق، پس از چند تزریق آزمایشی، عمق تزریق ۱۸ میلی‌متر انتخاب شد. با توجه به اندازه تخم‌مرغ‌ها و حجم کیسه‌هوایی عمق تزریق به گونه‌ای انتخاب شد که پس از گذشتن از کیسه هوا سرسوزن وارد کیسه آمنیون و محلول‌های مورد نظر در کیسه آمنیون تزریق شوند.

در مطالعه حاضر در روز ۱۷ جوجه‌کشی یک میلی‌لیتر از هر یک از محلول‌های آزمایشی (سرم فیزیولوژی به - عنوان حلال در این آزمایش استفاده شد) در عمق ۱۸ میلی‌متری از پوسته و به درون مایع آمنیوتیک تزریق شده که تأثیری بر درصد جوجه‌درآوری نداشت. این نتایج با مطالعات Uni *et al.*, (2005) که حاکی از عدم تأثیر تزریق درون‌آمنیوتیکی یک میلی‌لیتر محلول نمک حاوی کربوهیدرات و هیدروکسی‌متیل‌بوتیرات در روز ۱۷/۵ جوجه‌کشی (جنین جوجه‌های سویه *راس ۳۰۸*) بر درصد جوجه‌درآوری بود، مطابقت دارد. (Uni *et al.*, 2005).

در مطالعه حاضر تغذیه درون‌آمنیوتیکی روی - متیونین و نانو روی - متیونین موجب افزایش وزن جوجه‌ها در زمان تفریخ و در سن هفت‌روزگی شد. اکثر مطالعات در زمینه تزریق درون تخم‌مرغی حاکی از تأثیر مثبت و افزایشی محلول‌های تزریقی (به ویژه اسیدهای آمینه) بر وزن بدن جوجه‌ها در زمان تفریخ و پس از تفریخ می‌باشد. به عنوان نمونه تغذیه درون‌آمنیوتیکی اسیدآمینه متیونین در روز ۱۶ جوجه‌کشی منجر به افزایش وزن بدن جوجه‌ها در زمان تفریخ شد (Coskun *et al.*, 2014). در مطالعه دیگری افزایش وزن جوجه‌ها در سن یک و هفت روزگی پس از تزریق درون‌آمنیوتیکی اسیدآمینه متیونین و اسید فولیک گزارش شد (Trzeciak, 2010). همچنین افزایش وزن جوجه‌ها در زمان تفریخ در اثر تزریق متیونین و نانو ذرات آهن به کیسه زرده گزارش شده است (Saki *et al.*, 2014).

علاوه بر متیونین تأثیر تزریق درون‌آمنیوتیکی سایر اسیدهای آمینه از جمله آرژنین، ترئونین و گلوتامین نیز

بر صفات جوجه‌کشی و عملکرد رشد جوجه‌ها مطالعه شده که حاکی از تأثیر مثبت و افزایشی اسیدهای آمینه بر وزن بدن در دوره جنینی و پس از تفریخ می‌باشند (Foye *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009, 2010; Tangara *et al.*, 2010; Shafey *et al.*, 2012; Saki *et al.*, 2013;Tahmasebi and Toghyani, 2015).

در روزهای آخر جوجه‌کشی رشد و نمو طبیعی جنین به خصوص رشد سریع اندام‌های گوارشی نیازمند سطوح بالایی از انرژی است (Chen *et al.*, 2009). در این شرایط تامین انرژی متناسب با تقاضای بالای متابولیکی جنین، منتج به استفاده از پروتئین‌های عضلات (عمدتاً عضله سینه) می‌شود تا اسیدهای آمینه مورد نیاز برای تولید انرژی در مسیر گلوکونئوژنز فراهم شود. از جمله نتایج کاتابولیزه شدن پروتئین کاهش وزن عضله سینه و وزن کلی بدن می‌باشد (Foye *et al.*, 2006; Uni *et al.*, 2003). بنابراین تزریق مواد مغذی مکمل رشد به تخم‌مرغ در اواخر دوره جوجه‌کشی که هم‌زمان با رشد سریع اندام‌های جنینی است را می‌توان به عنوان یک راه حل برای بهبود رشد جنین و افزایش وزن جوجه تازه تفریخ شده در روزهای بحرانی یعنی انتهای دوره جوجه‌کشی و پس از تفریخ در نظر گرفت (Uni *et al.*, 2005;Tako *et al.*, 2005;Uni *et al.*, 2012).

در مطالعه حاضر تأثیر روی - متیونین و نانو روی - متیونین بر عملکرد روده از طریق اندازه‌گیری بیان mRNAی Zn-T1 و فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و مالتاز در ژژنوم بررسی شد. بیان mRNAی Zn-T1 روده به عنوان شاخص جذب روی در سلول‌های جذبی روده (انتروسیت‌ها) در نظر گرفته می‌شود، چون Zn-T1 مهم‌ترین ناقل روی در غشای بازولترال سلول بوده و به‌عنوان معیار توانایی بافت روده در حال تمایز برای پاسخ به روی دریافتی و همچنین مهم‌ترین عامل تخلیه روی از سلول در شرایط وجود غلظت بالای روی خارج سلولی می‌باشد (Huang *et al.*, 2006). مطالعات اخیر نشان داده است که سطوح روی جیره غذایی بر میزان بیان mRNAی Zn-T1 تأثیر می‌گذارد (Huang *et al.*, 2007). افزودن مکمل روی به جیره موش‌های صحرایی منجر به افزایش بیان Zn-T1 روده در دو سطح mRNA و پروتئین به میزان ۵۰ و ۱۰ درصد شد (McMahon and Cousins, 1998). بنابراین Zn-T1 بخشی از فرآیندی است که طی آن روی موجود در جیره جذب می‌شود. اثرات تزریق درون‌آمنیوتیکی روی - متیونین نیز بر بیان mRNAی Zn-T1 در سلول‌های جذبی روده کوچک مطالعه شده و نتایج مشابهی در افزایش سطح mRNAی Zn-T1 ژژنوم جنین جوجه گوشتی دو روز پس از تزریق درون‌آمنیوتیکی روی - متیونین گزارش شد (Tako *et al.*, 2005).

در این مطالعه ترکیب نانو روی - متیونین برای نخستین بار به صورت مکمل تغذیه‌ای و محرک رشد از طریق تزریق درون‌آمنیوتیکی به روده نابالغ جنین عرضه شد. به علت قدرت نفوذ ذرات نانو در عمق هسته و به - علت واکنش‌پذیری بیشتر ذرات نانو در مقایسه با اندازه معمول، تصور می‌شد که نانو روی - متیونین در مقایسه با روی - متیونین قادر به اعمال تغییرات بیشتری در میزان بیان ژن Zn-T1 باشد. همان‌طور که انتظار می‌رفت هر دو نوع ترکیبات روی منجر به تغییر بیان ژن Zn-T1 شدند. بنابراین می‌توان این گونه استنتاج نمود که روی بیشتری به سلول وارد شده که نتیجه آن بیان بالاتر Zn-T1بوده است.

نتایج مطالعه حاضر تأثیر مستقیم روی - متیونین و نانو روی - متیونین را بر بیان mRNAی Zn-T1 نشان داد و مشاهده شد که عنصر روی در ابعاد نانو در دوره جنینی به طور قابل توجهی می‌تواند تنظیم ژنی را تغییر دهد. نقش روی در تنظیم بیان ژن براساس شرکت این عنصر در ساختار عوامل گوناگون رونویسی، از جمله عوامل رونویسی انگشت روی، که به DNA متصل شده و در همانندسازی DNA شرکت می‌کنند، و نیز شرکت در ساختار پروتئین‌های گیرنده هورمون است (Eide, 2006;Carpene *et al.*, 2007; Richards *et al.*, 2010; Isani & Carpenè, 2014). همچنین فعالیت کاتالیکی تعداد قابل توجهی از آنزیم‌ها در بدن وابسته به حضور روی است. آلکالین فسفاتازها گروهی از آنزیم‌های وابسته به روی هستند که فعالیت کاتالیکی آن‌ها تجزیه استرهای فسفات است. در پستانداران و پرندگان، آنزیم آلکالین فسفاتاز روده یک آنزیم براش بوردری (مستقر در لبه مسواکی پرزهای روده) است که نقش اساسی در بلوغ و تکامل سلول‌های جذبی روده، هموستازی و سلامت ایفا می‌کند (Estaki *et al.*, 2014).

آلکالین فسفاتاز در سلول‌های جذبی بالغ مخاط روده بیان شده و فعالیت بیوشیمیایی آن به همراه فعالیت دی ساکاریدازها به عنوان شاخص بلوغ این سلول‌ها محسوب می‌شود (Weiser, 1973; Traber *et al.*, 1991). مالتاز دی ساکاریدازی است که در غشای میکروپرزها قرار داشته و دی ساکارید مالتوز را به دو مولکول گلوکز هیدرولیز کرده، بنابراین برای جذب گلوکز از روده ضروری است. مالتاز مسئول هضم نهایی نشاسته بوده و نقش حیاتی در تنظیم مقدار انرژی قابل دسترس برای جذب ایفا می‌نماید (Iji *et al.*, 2001). در جوجه‌های گوشتی در روز دوازده جنینی دی ساکاریدازها در غلظت پایین وجود داشته و در چند روز قبل از تفریخ افزایش قابل‌توجهی در فعالیت آنها مشاهده می‌شود که همزمان با افزایش تعداد و طول پرزهای روده است، به طوری که از روز ۱۹ تا ۲۱ جنینی فعالیت مالتاز و ساکاراز به سرعت افزایش یافته و تا ۲۱ روز پس از تفریخ پیوسته افزایش می‌یابد (Uni *et al.*, 2003). فعالیت بالای دی ساکاریدازها که در روده جوجه‌های جوان دیده می‌شود، هضم سریع کربوهیدرات‌های جیره را در جوجه‌های تازه تفریخ شده ممکن نموده و به گونه‌ای توسعه می‌یابد که مصرف کربوهیدرات‌های جیره به شکل غلات و نشاسته میسر شود (Foye *et al.*, 2009).

افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و مالتاز در ژژنوم جنین جوجه در روزهای انتهایی جوجه‌کشی و در روز تفریخ در اثر تزریق درون آمنیوتیکی روی - متیونین قبلاً بیان شده است (Tako *et al.*, 2005). همچنین تأثیر افزودن مکمل اکسید روی به جیره جوجه‌های گوشتی بر افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز در بخش پروکسیمال مخاط روده کوچک در سن سه هفتگی گزارش شده است (Ghiasi *et al.*, 2011). در سایر مطالعات نیز تأثیر تزریق درون‌آمنیوتیکی محلول کربوهیدرات و اسیدهای آمینه مختلف بر بیان mRNA و فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده بررسی شده است. به عنوان مثال تغذیه درون تخم‌مرغی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های براش بوردر در بوقلمون می‌شود. تغذیه درون تخم‌مرغی آرژنین و بتاهیدروکسی متیل بوتیرات در عرض ۴۸ ساعت موجب افزایش فعالیت مالتاز و ساکاراز و آلکالین فسفاتاز تا سن ۱۴ روزگی شد (Tako *et al.*, 2004).

تزریق درون‌آمنیوتیکی آرژنین و بتاهیدروکسی متیل بوتیرات موجب افزایش سطح mRNA ایزومالتاز و ساکاراز در روده جنین و جوجه بوقلمون در روز تفریخ و در سنین سه و هفت‌روزگی شد (Foye *et al.*, 2009). همچنین تزریق درون‌آمنیوتیکی محلول کربوهیدرات و گلوتامین موجب افزایش فعالیت آنزیم ساکاراز روده جنین و جوجه اردک شد (Chen *et al.*, 2009). در مطالعه‌ای با استفاده از کبوتر خانگی نیز پس از تزریق درون‌آمنیوتیکی محلول کربوهیدرات فعالیت ساکاراز و مالتاز ژژنومی به‌ازای هر گرم از بافت به‌میزان ۳۹ و ۴۳ ٪ در روز ۱۶ جنینی، به میزان ۲۶ و ۵۲٪ در زمان تفریخ افزایش یافت (Dong *et al.*, 2012).

در جوجه‌های گوشتی تزریق درون‌آمنیوتیکی محلول کربوهیدرات و بتاهیدروکسی متیل بوتیرات در روز ۱۷/۵ جنینی موجب افزایش ۵۰ درصدی فعالیت مالتاز روده تا سن ۱۰ روزگی شده که منجر به افزایش وزن بدن به میزان ۶٪ شد (Uni *et al.*, 2005).

این نتایج به علت تأثیر مستقیم سوبستراهای کربوهیدراتی بر فعالیت آنزیم‌های مخاط روده است. ناقلان مواد مغذی و آنزیم‌های هاضم در پاسخ به سوبسترای جیره‌ای خود در حد بالایی تنظیم و بیان می‌شوند. این اثر ممکن است به عنوان یک مکانیسم سازشی غیراختصاصی توضیح داده شود که طی آن وجود خوراک در حفره روده ممکن است سطح هضم و جذبی روده و نسبت سلول‌های ناقل به غیرناقل را افزایش دهد. از چنین داده‌هایی می‌توان به عنوان شواهد تأیید کننده برای این فرضیه استفاده نمود که تزریق درون تخم‌مرغی به طور اختصاصی سطح هضم و جذبی ژژنوم را افزایش می‌دهد (Foye *et al.*, 2009).

متیونین یک اسید آمینه گلوکوژنیک است که در هموستازی گلوکز نقش دارد. عنصر روی نیز علاوه بر اثرات شبه انسولینی و تنظیم متابولیسم کربوهیدرات‌ها (Ilouz *et al.*, 2002) در فعالیت بسیاری از آنزیم‌های هاضم یا گوارشی در پانکراس و روده نقش اساسی دارد (Tang and Shay., 2001). بنابراین تصور می‌شود که افزایش جذب روی در سلول‌های روده موجب فعال شدن مکانیسم‌هایی شود که با جذب گلوکز در ارتباط هستند. گلوکز در فرآیند بیوسنتز ماکرومولکول‌هایی چون گلیکوپروتئین‌ها، پروتئوگلیکان‌ها و گلیکولیپیدها به عنوان

سوبسترا استفاده می‌شود. بنابراین حضور گلوکز قابل دسترس ممکن است شروعی برای افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز که از نظر ساختاری یک گلیکوپروتئین است، (Dong *et al.*, 2013) باشد. به علاوه عنصر روی بخشی از ساختار کاتالیکی آنزیم آلکالین فسفاتاز بوده و منطقی است که تصور کنیم افزایش جذب روی موجب افزایش فعالیت این آنزیم شود. در مطالعه حاضر همبستگی بین افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و افزایش سن مشاهده شد. پیش از این افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز طی هفته نخست پس از تفریخ مشاهده شده است (Belabbas *et al.*, 2015)

هماهنگ با نتایج مطالعات بیان شده در این آزمایش نیز تزریق درون‌آمنیوتیکی و تجویز روی به شکل روی - متیونین و نانو روی - متیونین به بافت در حال تکامل روده موجب افزایش فعالیت بیوشیمیایی آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و مالتاز شد. از آنجایی‌که فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز وآنزیم مالتاز به عنوان یک معیار قابل اعتماد برای بررسی میزان بلوغ سلول‌های جذبی مخاط روده در نظر گرفته می‌شود (Weiser, 1973; Traber *et al.*, 1991) می‌توان چنین استنتاج کرد که تزریق درون آمنیوتیکی روی - متیونین و نانو روی - متیونین باعث شد که جوجه‌ها در زمان تفریخ روده‌های بالغ‌تری از نظر عملکرد هضم و جذب داشته باشند.

در مطالعه حاضر تیمارهای آزمایشی علاوه بر افزایش بیان و فعالیت آنزیم‌های گوارشی موجب افزایش وزن روده کوچک در زمان تفریخ و در سن یک هفتگی شده و همچنین جوجه‌های تیمارهای آزمایشی در سن یک‌هفتگی وزن بدن بیشتری نسبت به جوجه‌های تیمار کنترل داشتند، که می‌تواند موید این نکته باشد که افزایش بیان mRNA ناقل و فعالیت آنزیم‌های هضمی ممکن است با بهبود استفاده مواد مغذی مرتبط شده و نیز می‌تواند ناشی از افزایش سطح هضم و جذبی روده کوچک باشد. افزایش ۴۵ درصدی در سطح هضم و جذبی ژژنوم جوجه‌ها دراثر تزریق درون‌آمنیوتیکی محلول کربوهیدرات و بتاهیدروکسی متیل بوتیرات سه روز پس از تفریخ گزارش شده است (Tako *et al.*, 2004) که با افزایش ظرفیت هضم و جذبی مواد مغذی مرتبط است.

نتایج مطالعاتی که در آنها بهبود و تسریع رشد و نمو روده کوچک بررسی گردید، نشان داد که تزریق یک میلی‌لیتر محلول IOF (*In ovo* Feeding) حاوی دکسترین و بتاهیدروکسی متیل بوتیرات مشخصاً رشد و نمو روده را سرعت می‌بخشند. براساس چنین یافته‌هایی روده کوچک در اثر تغذیه درون‌آمنیوتیکی از نظر مرحله رشد ساختاری و عملکردی مشابه جوجه‌های دو روزه معمول هستند (Kornasio *et al.*, 2011). عملکرد رشد جوجه‌ها به طور مستقیم به ظرفیت هضمی روده وابسته بوده و دستگاه گوارش نقش اساسی در تعیین ظرفیت رشد و نمو طیور تفریخ شده دارد (Uni *et al.,* 1998 ; 2003). بنابراین هر چه زودتر دستگاه گوارش ظرفیت عملکردی خود را به دست آورد، جوجه سریع‌تر قادر خواهد شد تا از مواد مغذی جیره استفاده کند (Uni and Ferket, 2004, 2005).

نتیجه‌گیری

تغذیه درون‌آمنیوتیکی روی - متیونین و نانو روی - متیونین به عنوان مکمل تغذیه‌ای رشد جنین نه تنها کمبودهای احتمالی روی در اواخر دوره جنینی را برطرف می‌نماید بلکه موجب افزایش القای بیان ژن‌های مرتبط با فرآیند هضم و جذب (آنزیم‌های گوارشی و ناقلان مواد مغذی) می‌شود. بنابراین جوجه‌های حاصل از تیمار IOF (*In ovo* Feeding) در مقایسه با جوجه‌های معمولی با روده‌های با ظرفیت بالاتر هضم و جذبی تفریخ می‌شوند که ممکن است زمینه‌ساز افزایش عملکرد رشد پس از تفریخ باشد.

سپاسگزاری

از همکاری و مساعدت‌های موسسه جوجه‌کشی نوید جوجه برای تامین تخم‌مرغ مورد نیاز و در اختیار گذاشتن دستگاه جوجه‌کشی، مساعدت‌های خانم مهندس هرمزدی، پارک علم و فناوری گیلان و آقای دکتر گل‌شکن، به دلیل تهیه و تامین نانو روی - متیونین و نیز حمایت‌های فنی و تحصصی صمیمانه قدردانی و تشکر می‌شود.

فهرست منابع

Belabbas H., Melizi M., Benkhaled A. and Adili N. 2015. Post hatch development of alkaline phosphatase activity in the broiler small intestine. Poultry Science, 14 (4): 203-206.

Bottje W., Wolfenden A., Ding L., Wolfenden R., Morgan M., Pumford N., Lassiter K., Duncan G., Smith T., Slagle T. and Hargis B. 2010. Improved hatchability and posthatch performance in turkey poults receiving a dextrin-iodinated casein solution *in ovo*. Poultry Science, 89: 2646-2650.

Carpene E., Andreani G.and Isani G. 2007. Metallothionein functions and structural characteristics. Trace Elements in Medicine and Biology, 21(S1): 35–39.

Chen W., Wang R., Wan H. F., Xiong X. L., Peng P. and Peng J. 2009. Influence of *in ovo* injection of glutamine and carbohydrates on digestive organs and pectoralis muscle mass in the duck. British Poultry Science, 50(4):436-442.

Chen W., Wang R., Xiong X.L., Wan H.F., Xu J. and Peng J. 2010. Influence of *in ovo* injection of disaccharides, glutamine and β-hydroxy-β-methylbutyrate on the development of small intestine in duck embryos and neonates. British Poultry Science, 51:592–601.

Coskun I., Erener G., Şahin A., Karadavut U., Altop A. and Ağma Okur A. 2014. Impacts of *in ovo* feeding of DL-methionine on hatchability and chick weight. Turkish Agriculture-Food Science and Technology, 2(1): 47-50.

Dahlqvist A. 1984. Assay of intestinal disaccharidases. Scandinavian Clinical and Laboratory Investigation; 44**,** 169-172.

Dilger R. N. and Baker D. H. 2007. DL-Methionine is as efficacious as L-methionine, but modest L-cystine excesses are anorexigenic in sulfur amino acid-deficient purified and practical-type diets fed to chicks. Poultry Science, 86: 2367-2374.

Dong X. Y., Wang Y. M., Dai L., Azzam M. M., Wang C. and Zou X. T. 2012. Posthach development of intestinal morphology and digestive enzyme activities in domestic pigeons (*Columba livia*). Poultry Science, 91: 1886–1892.

Dong X. Y., Wang Y. M., Song H. H. and Zou X. T. 2013. Effects of *in ovo* injection of carbohydrate solution on small intestine development in domestic pigeons (*Columba livia*). Animal Science, 91(8): 3742-3749.

Dufner J. B., Langmad S. J., Wang F., Eide D. and Andrews G. K. 2003. Structure, function, and regulation of a subfamily of mouse zinc transporter. Genesis, 278 (50): 50142–50150.

Eide D. J. 2006. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. Biochemical and Biophysical. Acta, 1763: 711–722.

Estaki M., DeCoffe D. and Gibson D. L. 2014. Interplay between intestinal alkaline phosphatase, diet, gut microbes and immunity. World Gastroenterology, 20(42): 15650-15656.

Finkelstein J. D. 1990. Methionine metabolism in mammals. Nutritional Biochemistry, 1:228-237.

Foye O.T., Ashwell C., Uni Z. and Ferket P. R., 2009. The effects of intra-amnionic feeding of arginine and/or ß-hyroxy-ß-methylbutyrate on jejunal gene expression in the turkey embryo and hatchling. International Poultry Science, 8 (5): 437-445.

Foye O. T., Uni Z., Ferket P. R. 2007. The effects of *in ovo* feeding arginine, â-hydroxy-â-methyl-butyrate, and protein on jejunal digestive and absorptive activity in embryonic and neonatal turkey poults. Poultry Science, 86: 2343-2349.

Foye O. T., Uni Z., and Ferket P. R. 2006. Effect of *in ovo* feeding egg white protein, β-hydroxy-β-methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys, Poultry Science, 85: 1185-1192.

Ghiasi Ghalehkandi, J., Karamouz H., AgdamShahriar H. Zadeh Adam Nazhad H. Beheshti R. and Karimi N. 2011. Effect of inorganic zinc supplement on activity of alkaline phosphatase enzyme as an index of mucosal functional in small intestine of male broilers. American-Eurasian Agricultural and Environmental Science, 11 (5): 622-625.

Hu Y., Sun Q., Li X., Wang M., Cai, D., Li X. and Zhao R. 2015. *In Ovo* injection of betaine affects hepatic cholesterol metabolism through epigenetic gene regulation in newly hatched chicks. Public Library of Science, 10(4): 1-13.

Huang Y. L., Lu L., Li S. F., Luo X. G. and Liu B. 2007. An optimal dietary zinc level of broiler chicks fed a corn-soybean meal diet. Poultry Science, 86: 2582–2589.

Huang Z. L., Dufner- Beattie J. and Andrews G. K. 2006. Expression and regulation of SLC39A family zinc transporters in the developing mouse intestine. Developmental Biology, 295(2): 571-579.

Hudson B.P., Dozier W. A. and Wilson J. L. 2005. Broiler live performance response to dietary zinc source and the influence of zinc supplementation in broiler breeder diets. Animal Feed Science and Technology, 118: 329–335.

Hudson B. P., Fairchild B. D., Wilson J. L., Dozier W. A. and Buhr R. J. 2004. Breeder age and zinc source in broiler breeder hen diets on progeny characteristics at hatching. Applied Poultry Research, 13: 55-64.

Isani G. and Carpenè E. 2014. Metallothioneins, unconventional proteins from unconventional animals: a long journey from nematodes to mammals. Biomolecules, 4: 435-457.

IjiP. A., Saki A. and Tivey D. R. 2001. Body and intestinal growth of broiler chicks on commercial starter diet Development and characteristics of intestinal enzyme. British Poultry Science, 42(4): 514-522.

Ilonz R., Kaidanovich O., Gurwitz D. and Eldarfinkelma H. 2002. Inhibition of glycogen synthase kinase- 3beta by bivalent zinc ions: Insight into the insulin-mimetic action of zinc. Biochemical and Biophysical Research Communications, 295: 102-106.

Kambe T., Suzuki T., Nagao M. and Yamaguchi-Iwai Y. 2006. Sequence similarity and functional relationship among eukaryotic ZIP and CDF transporters. Genomics, Proteomics and Bioinformatics, 4(1):1-9.

Keralapurath M. M., Corzo A., Pulikanti R., Zhai W. and Peebles E. D. 2010. Effects of *in ovo* injection of L-carnitine on hatchability and subsequent broiler performance and slaughter yield. Poultry Science, 89(7): 1497-1501.

Kornasio R., Halevy O., Kedar O. and Uni Z. 2011. Effect of *in ovo* feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. Poultry Science, 90: 1467–1477.

Livak K. J. and 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: 402-208.

McGruder B. M., ZhaiW., Keralapurath M. M., Bennett L. W., Gerard P. D. and Peebles E. D. 2011. Effects of *in ovo* injection of electrolyte solutions on the pre- and posthatch physiological characteristics of broilers. Poultry Science, 90: 1058–1066.

Mcmahon R. J. and Cousins R. J. 1998. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc **.** Proceedings of the National Academy. USA, 95: 4841–4846.

Moosavinasab F. and Ghiasi Ghalehkandi J. 2011. Comparison of the effects of three different types of probiotics on the alkaline phosphatase activities of the small intestine mucosa of broiler chicks. Global Veterinaria, 7(3): 226-229.

National Research Council. Nutrient requirements of poultry. Washington (DC): National Academy of Science; 1994.

Miles R. D. 2000. Trace minerals and avian embryo development. Ciência Animal Brasileira, 2(1): 1-10.

Ohta Y., Tsushima N., Koid, K., Kidd M. T. and Ishibashi T. 1999. Effect of amino acid injection in broiler breeder eggs on embryonic growth and hatchability of chicks. Poultry Science, 78: 1493-1498.

Ohta Y. and Kidd M. T. 2001. Optimum site for *in ovo* amino acid injection in broiler breeder eggs. Poultry Science, 80: 1425-1429.

Richards J. D., Zhao J., Harrell R. J., Atwell C. A. and Dibner J. J. 2010. Trace mineral nutrition in poultry and swine. Asian-Australasian Animal Science, 23 (11): 1527 – 1534.

Richards M. P. 1997. Trace mineral metabolism in the avian embryo. Poultry Science, 76: 152-164.

Richards M. P. 1989. Recent developments in trace element metabolism and function: role of metallothionein in copper and zinc metabolism. Nutrition, 119: 1062 -1070.

Saki A. A., Abbasinezhad M. and Rafati A. A. 2014. Iron nanoparticles and methionine hydroxy analogue chelate *in ovo* feeding of broiler chickens. International Nano science and Nanotechnology, 10(3): 187-196.

Saki A. A., Abbasinezhad M., Ghazi Sh., Tabatabai M. M., Ahmadi A. and Zaboli K. 2012. Intestinal characteristics, alkaline phosphatase and broilers performance in response to extracted and mechanical soybean meal replaced by fish meal. Agriculture Science and Technology, 14: 105-114.

Saki A. A., Haghighat M. and Khajali F. 2013. Supplemental arginine administered *in ovo* or in the feed reduces the susceptibility of broilers to pulmonary hypertension syndrome. Poultry Science, 54(5):575–580.

SAS Institute. 2003. SAS User's Guide. Version 9.1 ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC.

Shafey T. M., Alodan M.A., Al-Ruqaie I.M. and Abouheif M. A. 2012. *In ovo* feeding of carbohydrates and incubated at a high incubation temperature on hatchability and glycogen status of chicks. South African Animal Science, 42(3): 210-220.

Shoveller A. K., BruntonJ. A., House J. D., Pencharz P. B. and Ball R. O. 2003. Dietary cysteine reduces the methionine requirement by an equal proportion in parentally fed piglets. Nutrition, 133: 4215-4224.

Sklan D., Geyra A.,Tako E., Gal-Gerber O. and Uni Z. 2003. Ontogeny of brush border carbohydrate digestion and uptake in the chick. British Nutrition, 89: 747-753.

Stoll B., Henry J., Reeds P. J., Yu H., Jahoor F. and Burrin D. G. 1998. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. Nutrition, 128: 606-614.

Tahmasebi S. and Toghyani M. 2015. Effect of arginine and threonine administered *in ovo* on digestive organ developments and subsequent growth performance of broiler chickens. Animal Physiology and Nutrition, 100(5): 947-956.

Tang X. and Shay N.V. 2001. Zinc has an insulin-like effect on glucose transport mediated by phosphoinosita3-kinase and Akt in 323-L1 fibroblast and adipocytes. Nutrition, 131: 1414-1420.

Tangara M., Chen W., Xu J., Huang F. R. and Peng J. 2010. Effects of *in ovo* feeding of carbohydrates and arginine on hatchability, body weight, energy metabolism and perinatal growth in duck embryos and neonates. British Poultry Science, 51: 602-608.

Tako E., Ferket P. R. and Uni Z. 2004. Effects of *in ovo* feeding of carbohydrates and beta hydroxyl - beta-methyl butyrate on the development of chicken intestine. Poultry Science, 83: 2023–2028.

Tako E., Ferket P. R. and Uni Z. 2005. Changes in chicken intestinal zinc exporter mRNA expression and small intestinal functionality following intra-amniotic zinc-methionine administration. Nutritional Biochemistry, 16: 339–346.

Traber P.G., Gumucio D. L. and Wang W.1991. Isolation of intestinal epithelial cells for the study of differential gene expression along the crypt-villus axis. American Physiology, 260(6): 895-903.

Trzeciac K. B. 2010. The effect of folic acid and methionine *in ovo* administration on development and selected blood parameters of domestic chicken. Poultry Science, 55:105–112.

Uni Z., Ganot S. and Sklan D. 1998. Post hatch development of mucosal function in the broiler small intestine. Poultry Science, 77: 75–82.

Uni Z., Tako E., Gal-Garber O. and Sklan D. 2003. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. Poultry Science, 82: 1747–1754.

Uni Z. and Ferket P. R. 2004. Methods for early nutrition and their potential. World Poultry Science, 60: 101-111.

Uni Z., Ferket P. R., Tako E. and Kedar O. 2005. *In ovo* feeding improves energy status of late-term chicken embryos. Poultry Science, 84: 764–770.

Uni Z., Yadgary L. and Yair R. 2012. Nutritional limitations during poultry embryonic development. Applied Poultry Research, 21: 175–184.

Wang W. W., Qiao S. Y. and Li D. F. 2009. Amino acids and gut function. Amino Acids, 37: 105-110.

Weiser M. M. 1973. Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. I. An indicator of cellular differentiation. Biological Chemistry, 248(7): 2536-2541.

Animal Production Research

Vol. 6, No. 1, 2017 (73-87)

University of Guilan

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

K. Razani[1], M. Mottaghitalab[2*], S. H. Hosseini Moghaddam[3]

1. Ph.D student, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Associate professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Assistant professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: 12-30-2016 – Accepted: 5-22-2017)

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of intra amniotic injection of zinc-methionine and nano-zinc-methionine on intestinal zinc transporter (zn-t1) expression and alkaline phosphatase and maltase activity in the broiler jejunum. Four hundred fertile eggs were divided into four groups (treatment), each with four samples (replicate). The first three treatments were subject to intra amniotic injection of one milliliter of physiologic serum solution, physiologic serum solution containing 25% zinc- methionine and/or containing 25% nano-zinc- methionine, respectively, at the 17th day of incubation. The fourth treatment (negative control) received no injection. The hatchability percentage was calculated and two birds from each replicate were killed then intestinal alkaline phosphatase and maltase activity and Zn-T1gene expression were assayed at 1, 3 and 7 days after hatch. The highest body weight was for Zinc-methionine (43.02± 0.06) and Nano-zinc-methionine (42.77±0.06) treatments (P<0.01). Also at 1 and 7 days of post hatch the weight of small intestine in the Zinc-methionine (1.55±0.07, 9.7±0.048) and Nano-zinc-methionine (1.51±0.07, 9.5±0.048) treatments were higher than other treatments (p<0.01). Ten nano-zinc-methionine treatment, at 1, 3 and 7 days after hatching, had the most activity of alkaline phosphatase (7.2 ± 0.04, 11.5± 0.08, 17.8 ± 0.1) and maltase (4.2±0.03, 5.5±0.02, 8.8±0.06) and most Zn-T1 gene expression (3.67±0.005, 4.24±0.007, 3.17±0.009) (P<0.01). In conclusion, *in Ovo* injection of Nano-zinc-methionine showed up-regulate Zn-T1 gene expression and lead to increase alkaline phosphatase and maltase activity of chick intestine during first week after hatch.

Keywords: Alkaline phosphatase, Broiler, Maltase, RT-PCR, Zinc transporter

*Corresponding author: m_mottaghi@gstp.ir