



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 Rezaei² , Javanshir Palooj³ , ZARBAKHT Ansari Pirsaraei⁴ , Essa Dirandeh⁵ 

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	ABSTRACT
<p>Article type: Research Article</p> <p>Article history: Received: 20 September 2022 Received: 8 November 2022 Accepted: 9 November 2022 Published online: 23 September 2023</p> <p>Keywords: <i>Interleukin,</i> <i>Avian influenza,</i> <i>Glutathione peroxidase,</i> <i>Superoxide dismutase.</i></p>	<p>This experiment was conducted to investigate the effect of zinc oxide nanoparticles injection on immune response and performance in broilers. One hundred eight Ross 308 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 nanoparticles (0.5 mg of zinc oxide nanoparticles 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 nanoparticles 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 nanoparticles increased the general and cellular immune response, the activity of antioxidant enzymes and interleukin 12 gene expression..</p>

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. *Iranian Journal of Animal Science*, 54 (3), 391-402. DOI: <http://doi.org/10.22059/IJAS.2022.348850.653908>



© The Author(s).

DOI: <http://doi.org/10.22059/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 Agglutinin 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.



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

محمد کاظمی فرد^۱ | منصور رضایی^۲ | جوانشیر پالوج^۳ | زربخت انصاری پیرسرائی^۴ | عیسی دیرنده^۵

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: jpaloos@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	چکیده
<p>نوع مقاله:</p> <p>مقاله پژوهشی</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۹</p> <p>تاریخ‌بازنگری: ۱۴۰۱/۰۸/۱۷</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۸</p> <p>تاریخ‌انتشار: ۱۴۰۲/۰۷/۰۱</p> <p>کلیدواژه‌ها:</p> <p>اینترلوکین، آنفلوآنزای مرغی، گلوکوتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز.</p>	<p>این آزمایش به منظور بررسی تأثیر تزریق نانواکسیدروی بر پاسخ ایمنی و عملکرد در جوجه‌گوشی انجام شد. تعداد ۱۰۸ قطعه جوجه سویه راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار در چهار تکرار و نه جوجه در هر تکرار در روز تفریح با محلول نانواکسیدروی تزریق شدند. تیمارها شامل: ۱. شاهد، 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). محلول نانواکسیدروی از ناحیه گردن به جوجه‌ها تزریق شد. جیره مورد استفاده برای همه تیمارها جیره استاندارد سویه راس ۳۰۸ بود. تیترا آنتی بادی آنفلوآنزا ۱۴ روز و آزمون حساسیت پوستی، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از واکنش‌سناسیون و سطح فعالیت گلوکوتیون پراکسیداز در تیمار ۳ نسبت به سایر تیمارها به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$) بیان ژن اینترلوکین ۱۲ در تیمار ۲ و ۳ به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود ($P < 0/05$) وزن نسبی سنگدان در تیمار ۳ نسبت به تیمار شاهد و خوراک مصرفی در تیمار ۲ و ۳ به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود ($P < 0/05$). نتایج نشان داد که تزریق نانواکسیدروی باعث افزایش پاسخ ایمنی عمومی و سلولی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و بیان ژن اینترلوکین ۱۲ شد.</p>

استناد: کاظمی فرد، 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 جوجه‌گوشی. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۴ (۴)، ۳۹۱-۴۰۲. DOI: <http://doi.org/10.22059/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). معمولاً جوجه‌ها تا ۴۸ ساعت پس از تولد به آب و غذا دسترسی ندارند که می‌تواند تأثیری منفی بر رشد و ایمنی پرنده داشته باشد (Noy & uni, 2010). پس از منع استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان محرک رشد در تغذیه طیور، سعی شد گزینه‌های مناسبی با ویژگی‌های مثبت و بدون عوارض جانبی منفی و گزینه‌هایی با منشأ طبیعی مانند گیاهان دارویی، پروبیوتیک‌های طبیعی و اسیدهای آلی جایگزین شود (Hosseini *et al.*, 2017). افزودن روی در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی سبب افزایش وزن روزانه بدن، دریافت روزانه غذا و پاسخ ایمنی و عملکرد جوجه‌های گوشتی می‌شود و سرعت رشد و بازدهی خوراک را افزایش می‌دهد (Hatab *et al.*, 2022). روی از طریق شرکت در ساختار کروماتین، غشاهای بیولوژیک، همانندسازی DNA، ترجمه RNA، فعالیت عوامل ترجمه و پلی‌مرازهای DNA و RNA، شرکت در ترمیم DNA و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و بیان ژن 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 DNA متصل و در همانندسازی شرکت دارد. این پروتئین‌ها بیشتر در نقش یک مولکول واکنش‌دهنده با DNA، RNA یا پروتئین ظاهر می‌شوند (Isani, 2014). Carpenè & همکاران کمبود این عنصر سبب کاهش سطح هورمون رشد و کاهش عملکرد گیرنده هورمون رشد شده و با تأثیر بر بیان ژن -های هورمون رشد انسولین مانند ۱ و ۲ (IGF-1 و IGF-2) سبب کاهش رشد و کاهش وزن پرنده می‌شود (Tsai *et al.*, 2016). حجم و اندازه ذرات 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 اکثر اندام‌ها و بافت‌ها پخش می‌شوند (Razani *et al.*, 2017). نانوتکنولوژی سبب افزایش توانایی طیور در جذب مواد مغذی و در نتیجه بهبود عملکرد رشد، قابلیت هضم مواد مغذی و عملکرد تولیدی پرندگان می‌شود. استفاده از روی به شکل نانوذرات می‌تواند در نسبت‌های پایین‌تر مورد استفاده قرار گرفته و نتایج بهتری نسبت به منابع معمولی عنصر روی ارائه دهد (Gopi *et al.*, 2017). نانوذرات اکسیدروی می‌تواند ایمنی و بازده تولید در جوجه‌های گوشتی 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).

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش

این آزمایش برای ارزیابی اثرات تزریق نانو اکسیدروی بر پاسخ ایمنی و عملکرد در جوجه‌های گوشتی انجام شد. محلول نانو اکسیدروی در روز تفریخ به صورت زیرجلدی از ناحیه گردن تزریق شد. تعداد ۱۰۸ قطعه جوجه سویه راس ۳۰۸ در طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار در چهار تکرار و نه جوجه در هر تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. تیمارها شامل: (۱) شاهد (بدون تزریق)، (۲) تزریق ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر محلول نانو اکسیدروی، (۳) تزریق ۱۲ میلی‌گرم بر لیتر محلول نانو اکسیدروی بودند (حجم تزریق در تیمارهای حاوی نانو اکسیدروی ۲۰ میکرو لیتر بود).

پرورش

جوجه‌ها به سالن پرورش منتقل شدند و به صورت آزاد خوراک و آب دریافت کردند. جیره غذایی مورد استفاده در طول دوره برای همه تیمارها یکسان و بر اساس ذرت و سویا بود (جدول ۱) بود. جوجه‌ها بعد از تزریق بر اساس تیمار و تکرار به سالن پرورش منتقل شدند و جداگانه در قفس‌های 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 نیوکاسلو آنفلوانزا در روز ۲۸ پرورش انجام شد. در روزهای ۳۵ و ۴۲ پرورش، دو جوجه از هر تیمار به طور تصادفی انتخاب شدند و نمونه خون (۲ تا ۳ میلی لیتر) از سیاهرگ بال جمع آوری و سطح آنتی‌بادی‌های آنفلوانزای مرغی و نیوکاسل در نمونه‌های سرم با استفاده از روش مهار هم‌آگلوتیناسیون (HI) ارزیابی شد.

ایمنی سلولی

برای سنجش ایمنی سلولی از آزمون حساسیت پوستی (CBH) و اندازه‌گیری بیان ژن اینترلوکین ۲ و ۱۲ استفاده شد. در روز ۴۲ پرورش، دو جوجه از هر تیمار انتخاب و ضخامت بین پرده راست و چپ انگشت پای چپ آنها با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد، سپس برای سنجش آزمون CBH محلول فیتو هم آگلوتینین تهیه و ۰/۱ میلی لیتر از آن با سرنگ انسولین 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 سلول‌ها ارزیابی شد. هم‌چنین، با تزریق ۰/۱ میلی لیتر آب مقطر به پرده بین انگشت دوم و سوم پای راست به عنوان شاهد استفاده شد (Corrier & Deloach, 1990).

جدول ۱. ترکیبات تجیره‌های آنالیز مواد خوراکی

ترکیب مواد خوراکی (درصد)	آغازین	رشد	پایانی
ذرت	۶۲/۱	۵۶/۸	۹۱/۵۵
کنجاله سویا	۳۲/۰۷	۲۷/۲	۲۳/۴
سبوس گندم	۰/۰۰	۱۰/۰	۱۵/۰
روغن سویا	۱/۹۵	۲/۳	۲/۳۷
دی کلسیم فسفات	۱/۶۰	۱/۴۳	۱/۱۸
سنگ آهک	۱/۱۵	۱/۱۵	۱/۰۶
مکمل موادمعدنی ^۱	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل ویتامینی ^۲	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
نمک	۰/۲۳	۰/۲۳	۰/۲۳
دی-آل متیونین	۰/۱۹	۰/۱۷	۰/۱۵
آل-لیزین	۰/۰۹	۰/۱۰	۰/۰۸
کرینات سدیم	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۱۲

آنالیز مواد خوراکی

انری قابل متابولیسم (کیلو کالری)	۲۹۵۰	۳۰۰۰	۳۰۵۰
درصد پروتئین خام	۱۹/۵	۱۸/۵	۱۷/۵
درصد کلسیم	۱/۰۰	۰/۸۴	۰/۷۶
درصد فسفر قابل دسترس	۰/۵۰	۰/۴۲	۰/۳۸
درصد لیزین	۱/۰۵	۰/۹۸	۰/۸۹
درصد متیونین	۰/۴۷	۰/۴۴	۰/۴۰

۱ ترکیبات در هر کیلوگرم: ۷۵۰۰۰ میلی گرم منیزیم؛ ۵۰۰۰۰ میلی گرم آهن؛ ۸۰۰۰ میلی گرم مس؛ ۷۵۰ میلی گرم ید و ۶۰۰۰۰ میکروگرم سلنیوم
 ۲ ترکیبات در هر کیلوگرم: ۸۰۰۰ واحد ویتامین A؛ ۲۰۰۰ واحد ویتامین D3؛ ۱۸۰۰ میلی گرم ویتامین K؛ ۱۸۰۰ میلی گرم ویتامین B1؛ ۶۰۰۰ میلی گرم ویتامین B2؛ ۲۸۰۰ میلی گرم ویتامین B6؛ ۱۲۰۰۰ میکروگرم ویتامین B12؛ ۱۰۰۰۰ میلی گرم پنتوتینیک اسید؛ ۴۰۰۰۰ میلی گرم نیاسین؛ ۱۰۰۰ میلی گرم اسید فولیک و ۰/۳ میلی گرم بر کیلوگرم بیوتین

استخراج RNA

استخراج و خالص سازی RNA با روش آکازول و با استفاده از دستورالعمل کیت شرکت سیناژن انجام شد. در روز دهم پرورش، دوجوجه از هر تکرار انتخاب و نمونه های طحال جمع آوری و در سالیان بافر فسفات است ریلشسته شد و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد. نمونه ها تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. RNA کل از نمونه های طحال با استفاده از محلول RNXTM-Plus (Cinna Gen, Tehran, Iran)، براساس دستورالعمل سازنده استخراج شد و سپس در حضور الیگوپرایمر ۱ میکرومولار (Qiagen Inc., Tehran, Iran) رونویسی معکوس شد. برای اطمینان از استخراج RNA از ژل آگارز یک درصد استفاده شد.

طراحی آغازگرها

سنتر cDNA از RNA با استفاده از کیت شرکت سولجنت کره (Solgent) انجام شد (AccuPower CycleScript RT). PreMix (dN₆) آغازگرهای خاص این آزمایش توسط شرکت کیاژن و بر اساس مقالات حاصل از پژوهش های انجام شده طراحی شد (جدول ۲). سپس واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و کیت شرکت کیاژن SYBR[®]Green (QuantiNovaTM) انجام شد.

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن های اینترلوکین ۲ و ۱۲

نام ژن	توالی آغازگر (۳-۵)	دما (درجه سانتی گراد)	اندازه باند (Bp)	شماره ثبت
اینترلوکین ۲	F: CCCGTGGCTAACTAATCTGCTG R: TGAGACACCAGTGGGAAACAGT	۶۰/۶۶-۲/۱	۲۸۷	HE608819
اینترلوکین ۱۲	F: GCCGACTGAGATGTTCTCTGG R: CCTTGCTTTTGTATTTCTTTGTGC	۵۷/۶۱-۷/۴	۲۳۷	JN942590
بتا اکتین	F: AGCCAACAGAGAGAAGATGACAC R: CATCACCAGAGTCCATCACAATA	۶۰-۵۸	۱۳۴	L08165.1

واکنش Real – Time PCR

برای تعیین کمیت واکنش، از رنگ هایی مانند سایبرگرین استفاده شد. وقتی که این رنگ به DNA دو رشته ای می پیوندد، سبب انتشار نور فلورسنس می شود. زمانی که شدت فلورسنس تولیدی در اثر تکثیر قطعه های PCR بیش از میزان پایه باشد، چرخه آستانه به وسیله دستگاه شناسایی می شود. تعیین کمیت با اندازه گیری افزایش تشعشع فلورنس و شناسایی C_T انجام شد. سپس با محدود شدن اجزای واکنش، منحنی تکثیر یک کفه تشکیل داد که نشان دهنده ی توقف تکثیر بود. پس از این گامه، منحنی ذوب و باز شدن دو رشته DNA با افزایش تدریجی دما از ۵۵ به ۹۵ درجه سانتی گراد انجام شد، سپس بازدهی و ضریب تبیین (R²) در منحنی استاندارد بررسی شد. مقادیر این دو نشان دهنده ی این است که هم ژن هدف و هم ژن مرجع که در این پژوهش mRNA بتا اکتین است، نزدیک به ۱۰۰ درصد (با پنج درصد اختلاف ۹۵ درصد تا ۱۰۵ درصد) تکثیر شدند. واکنش های Real-Time PCR در حجم کل ۱۵ میکرولیتر، شامل ۷/۵ میلی لیتر مخلوط اصلی سایبرگرین، ۱ میکرولیتر پرایمرهای پیش رو و ۱ میکرولیتر پرایمر معکوس، ۱ میکرولیتر cDNA و ۴/۵ میلی لیتر آب بدون نوکلئاز بود که به صورت تکراری اجرا شدند و نسبت به بتا اکتین به عنوان ژن مرجع، بیان شدند. داده های حاصل با استفاده از روش ΔCt با تصحیح راندمان تقویت به یک نمونه کالیبراتور نرمال سازی شدند (Livak & Schmittgen, 2001).

عملکرد لاشه

در انتهای دوره (روز ۴۲ پرورش)، ۲ جوجه از هر تکرار انتخاب و پس از توزین، ذبح شدند. وزن هر یک از اجزای لاشه جداگانه اندازه گیری و درصد هریک از اجزای لاشه برآورد شد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

به منظور سنجش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی، در روز دهم پرورش دو جوجه از هر تکرار به‌طور تصادفی انتخاب و نمونه خون بعد از خون‌گیری از قلب، در لوله‌های پلاستیکی حاوی اتیلن‌دی‌آمین‌تراستیک‌اسید جمع‌آوری شد. نمونه‌ها تا زمانی که پلاسما با سانتریفیوژ (۱۵۰۰ × گرم به مدت ۲۰ دقیقه) جمع‌آوری و جدا شوند، روی یخ نگهداری شدند. پلاسما برداشت و تا آنالیز بیشتر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) با استفاده از کیت‌های تجاری RANSEL و 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) در نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۱/۹) انجام شد. تفاوت بین میانگین‌های تیمار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن اندازه‌گیری شد. تغییرات سطوح بیان ژن، 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 انجام شد، اما هفت و چهارده روز پس از واکسیناسیون (جدول ۳) تفاوتی در تیتراژ آنتی‌بادی‌های آنفلوانزونی و کاسلین تیمارها مشاهده نشد ($P > 0.05$)، اگرچه تیتراژ آنتی‌بادی آنفلوانزا در تیمار سه، ۱۴ روز پس از واکسیناسیون بهبود یافت ولی معنی‌دار نشد. افزایش سطح عنصر روی تا ۱۰۰ پی‌پی‌ام به روش تزریق درون‌تخم مرغی نیز تأثیر مثبتی بر عملکرد ایمنی اکتسابی و تولید آنتی‌بادی در خون نداشت (Birja *et al.*, 2020). اما با افزایش غلظت تزریق درون‌تخم مرغی نانو اکسیدروی با غلظت‌های ۱۰ و ۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سطح آنتی‌بادی‌های نیوکاسل و آنفلوانزا نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (Paluoj *et al.*, 2021). برای ارزیابی ایمنی سلولی از آزمون CBH استفاده شد (جدول ۴). ۱۲ ساعت پس از تزریق فیتوهم‌اگلوتینین، سطح حساسیت پوستی در تیمار سه نسبت به تیمار یک افزایش یافت ($P < 0.05$)، افزودن مکمل نانو اکسیدروی به جیره جوجه‌گوشتی به مقدار ۴۵ و ۶۰ پی‌پی‌ام سبب افزایش رشد و تکثیر لنفوسیت‌ها و فعالیت فاگوسیتوزی سلول‌ها و ایمنی‌زایی می‌شود (El-Katcha *et al.*, 2017)، اما تزریق داخل تخم مرغی ۱۰ و ۱۲ میلی‌گرم نانو اکسیدروی تغییرات معنی‌داری را در آزمون CBH در انتهای دوره پرورش در جوجه‌گوشتی ایجاد نکرد (paluoj *et al.*, 2021). نانو اکسیدروی با فعال کردن تیموسیت‌ها سبب بلوغ نفوسیت‌های T، بهبود عملکرد نفوسیت B و افزایش تولید ماکروفاژها و افزایش پاسخ ایمنی می‌شود (Tizard, 2009). بازوفیل‌ها نقش التهابی در سلول دارند و افزودن نانوذرات روی به مقدار ۱۵ تا ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره سبب افزایش درصد بازوفیل‌های سلول می‌شود (El-Katcha *et al.*, 2017) همین موضوع سبب شد تا تزریق نانو اکسیدروی، سبب افزایش حساسیت بازوفیل‌های سطح پوست و ایمنی سلولی شود.

بیان ژن اینترلوکین ۱۲ (IL-12) زمانی که ۱۰ و ۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانو اکسیدروی تزریق شد، بیشتر از تیمار شاهد بود ($P < 0.05$). همچنین بیان ژن اینترلوکین ۲ (IL-2) با افزایش غلظت نانو اکسیدروی بهبود پیدا کرد هرچند معنی‌دار نشد (جدول ۴).

جدول ۳. تاثیر تزریق نانواکسیدروی بر تیتراکتی بادی آنفلوانزای مرغی و نیوکاسل (لگاریتم^۲)

نیوکاسل ^۴ (روز ۴۲)	نیوکاسل ^۳ (روز ۳۵)	آنفلوانزا ^۲ (روز ۴۲)	آنفلوانزا ^۱ (روز ۳۵)	تیمارها
۲/۷۵	۱/۷۵	۲/۰۰	۱/۷۵	شاهد
۳/۵۰	۲/۰۰	۳/۰۰	۱/۷۵	تیمار ^۵
۳/۵۰	۲/۰۰	۳/۷۵	۱/۵۰	تیمار ^۶
۰/۴۰۵	۰/۸۵۶	۰/۰۵۴	۰/۷۴۸	value-P
۰/۲۵۰	۰/۲۱۰	۰/۱۹۱	۰/۱۵۲	SEM

* میانگین‌هایی که در هر ستون حرف‌های متفاوت دارند، دارای اختلاف آماری معنی‌داری با هم هستند ($P < 0.05$).

۱: تیتراکتی بادی آنفلوانزای مرغی (لگاریتم^۲) هفت روز بعد از واکسیناسیون. ۲: تیتراکتی بادی آنفلوانزا (لگاریتم^۲) ۱۴ روز بعد از واکسیناسیون. ۳: تیتراکتی بادی نیوکاسل (لگاریتم^۲) هفت روز بعد از واکسیناسیون. ۴: تیتراکتی بادی نیوکاسل ۱۴ روز بعد از واکسیناسیون. ۵: تزریق ۲۰ میکرولیتر نانواکسیدروی (۰/۵ میلی گرم نانواکسیدروی در ۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی). ۶: تزریق ۲۰ میکرولیتر نانواکسیدروی (۰/۶ میلی گرم نانواکسیدروی در ۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی).

تزریق داخل تخم مرغی ۱۰ و ۱۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر نانواکسیدروی در جوجه‌گوشتی باعث افزایش بیان ژن اینترلوکین ۱۲ و در نتیجه افزایش پاسخ ایمنی بدن شد (Paluoj *et al.*, 2021)، همچنین تزریق ۰/۵ میلی گرم نانواکسیدروی به جنین جوجه ۱۴ روزه باعث افزایش قابل توجهی در غلظت اینترلوکین ۱۲ شد (Goel *et al.*, 2012). اینترلوکین ۱۲ یکی از مهم‌ترین سیتوکین‌ها است که سبب بهبود ایمنی جوجه‌های گوشتی در پاسخ به بیماری‌ها و عفونت‌های 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 سلول‌های ایمنی بدن با تأثیر بر رونویسی DNA کمک می‌کند، همچنین نشان داده شده است که ایمنی ذاتی ممکن است با ترشح اینترلوکین-۲ در ارتباط باشد که عنصر روی این افزایش ترشح اینترلوکین-۲ را حمایت می‌کند (Goel *et al.*, 2012). شاید روی با نقش مهمی که در ساختار آنزیم‌های رونویسی (DNA پلیمراز و RNA پلیمراز) دارد (Klug, 2010)، سبب افزایش بیان ژن گیرنده‌های اینترلوکین ۱۲ در سلول شده (Goel *et al.*, 2012) و با افزایش این گیرنده‌ها تولید IL12 برای اتصال به آن جهت ایجاد پیام‌های ایمنی افزایش یافته و در نتیجه بیان ژن و سطح ایمنی‌زایی اینترلوکین ۱۲ بهبود یافت (Paluoj *et al.*, 2021).

جدول ۴. تاثیر تزریق نانواکسید روی بر تست حساسیت پوستی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و بیان ژن‌های

تیمارها	تست حساسیت پوستی ^۱ (۱۲)	تست حساسیت پوستی ^۲ (۲۴)	گلوکوتایون پراک سیداز	سوپراکسیددیسیم وتاز	اینترلوکین ن ۲	اینترلوکین ۱۲
شاهد	۰/۰۹ ^b	۰/۰۸۰ ^b	۵۰/۱۶ ^b	۱۵۰/۸۲	۰/۳۷	۰/۰۶ ^b
تیمار ^۲	۰/۱۷ ^{ab}	۰/۱۱۰ ^b	۴۲/۲۷ ^b	۱۴۶/۶۱	۱/۰۲	۱/۰۵ ^a
تیمار ^۳	۰/۳۵ ^a	۰/۳۷۳ ^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 ($P < 0.05$). ۱: تست حساسیت پوستی بعد از ۱۲ ساعت. ۲: تست حساسیت پوستی بعد از ۲۴ ساعت. ۳: تزریق ۲۰ میکرولیتر نانواکسیدروی (۰/۵ میلی گرم نانواکسیدروی در ۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی). ۴: تزریق ۲۰ میکرولیتر نانواکسیدروی (۰/۶ میلی گرم نانواکسیدروی در ۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی).

با تزریق نانواکسیدروی تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسیموت از در تیمارهای مختلف مشاهده نشد (جدول ۴)، اما فعالیت گلوکوتایون پراکسیداز در تیمارهایی که ۱۲ میلی گرم در میلی‌لیتر نانواکسیدروی تزریق شد نسبت به تیمار دو ۱۰ میلی گرم در میلی‌لیتر نانواکسیدروی تزریق شد و تیمار شاهد افزایش یافت ($P < 0.05$). اما تزریق درون تخم مرغی ۱۰ و ۱۲ میلی گرم در میلی‌لیتر نانواکسیدروی (Paluoj *et al.*, 2021) یا مصرف ۴۵ و ۶۰ میلی گرم نانواکسیدروی به عنوان مکمل

در جیره، تغییر معنی داری در فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز ایجاد نکرد (El-Katcha et al., 2017). اثر محافظتی روی در برابر پراکسیداسیون لیپیدها می‌تواند با اثر مفید آن به عنوان کوآنزیم بر فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز در سرم و بافت همراه باشد (Joanna et al., 2011). آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز نقش مهمی در تنظیم و بهبود پاسخ حیوانات در شرایط استرسو تنشو از بین بردن رادیکال‌های آزاد و بهبود سلامت پرند دارد (El-Katcha et al., 2017)، که افزودن روی به شکل نانواکسیدروی به جیره غذایی به علت زیست فراهمی بهتر این عنصر سبب افزایش غلظت و کارایی آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و تأثیر مثبت آنها در سرم خون میشود (Ahmadi et al., 2014).

با تزریق نانواکسیدروی (جدول ۵)، تفاوتی در نسبت تبدیل خوراک و وزن بدن در تیمارهای مختلف تا انتهای دوره پرورش مشاهده نشد ($P > 0.05$)، اما میزان خوراک مصرفی در هفته پنجم و ششم پرورش نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد ($P < 0.05$). با افزودن سطوح مختلف روی به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی، وزن بدن، سرعت رشد و نسبت تبدیل خوراک بهبود پیدا می‌کند (Saleh et al., 2018)، هم‌چنین مصرف نانوذرات روی در جیره غذایی به‌عنوان مکمل سبب بهبود عملکرد و افزایش خوراک مصرفی در جوجه‌گوشتی می‌شود (Hatab et al., 2022). استفاده از نانواکسیدروی در جیره با افزایش طول پرز و عمق کریپت در روده و بهبود خصوصیات ریخت‌شناسی آن (El-Katcha et al., 2017) سبب افزایش قابلیت هضم مواد مغذی و کاهش مصرف خوراک بدون تأثیر منفی بر وزن بدن و ضریب تبدیل غذایی شد.

جدول ۵. تأثیر تزریق نانواکسیدروی بر عملکرد در انتهای دوره پرورش

تیمارها	مصرف خوراک ^۱ (هفته ۵)	وزن بدن ^۲ (هفته ۵)	راندمان خوراک ^۳ (هفته ۵)	مصرف خوراک ^۴ (هفته ۶)	وزن بدن ^۵ (هفته ۶)	راندمان خوراک ^۶ (هفته ۶)
شاهد	۱۹۴۶/۰۰ ^a	۱۲۵۷/۶۰	۱/۵۵	۲۹۶۳/۹۰ ^a	۱۶۸۷/۹۰	۱/۷۶
تیمار ^۱	۱۸۵۰/۷۰ ^b	۱۳۳۱/۰۰	۱/۵۰	۲۸۷۴/۹۰ ^b	۱۶۹۴/۲۸	۱/۷۰
تیمار ^۲	۱۸۶۴/۱۸ ^b	۱۳۴۱/۸۸	۱/۵۰	۲۸۷۳/۱۵ ^b	۱۷۰۲/۷۳	۱/۶۹
value-P	۰/۰۳۶	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 ($P < 0.05$).

۱: غذای مصرفی در روز ۳۵ پرورش. ۲: وزن بدن در روز ۳۵ پرورش. ۳: ضریب تبدیل غذایی در روز ۳۵ پرورش. ۴: غذای مصرفی در روز ۴۲ پرورش. ۵: وزن بدن در روز ۴۲ پرورش. ۶: ضریب تبدیل غذایی 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 تزریق ۱۰ و ۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانواکسیدروی، تفاوت معنی‌داری در وزن نسبی ران و سینه بین تیمارهای مختلف دیده نشد (جدول ۶). در پژوهشی با افزودن ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانواکسیدروی به جیره جوجه‌گوشتی، وزن اندام‌های بدن افزایش یافت (Hatab et al., 2022). با تزریق ۱۰ و ۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانواکسیدروی تفاوتی در وزن نسبی قلب، طحال، بورس فابریوس، کبد، کیسه صفرا و چربی حفره شکمی بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($P > 0.05$). برخی محققان گزارش دادند که افزودن ۱۵ تا ۶۰ میلی‌گرم نانوذرات روی به جیره جوجه‌گوشتی سبب کاهش چربی حفره شکمی، بهبود وزن بورس فابریوس و طحال و کاهش وزن کبد می‌شود (El-Katcha et al., 2017). برخی گزارش‌ها هم نشان داد که افزودن نانواکسیدروی به جیره جوجه‌گوشتی تأثیری در وزن نسبی چربی حفره شکمی ندارد (Saleh et al., 2018). در تزریق داخل تخم مرغی نانواکسیدروی و افزایش غلظت آن تا ۱۲۰ پی‌پی‌ام هم تغییر معنی‌داری در وزن نسبی کبد، بورس فابریوس، طحال، قلب و وزن لاشه مشاهده نشد (Bakhshayesh et al., 2018).

جدول ۶. تاثیر تزریق نانو اکسیدروی بر وزن اجزای لاشه (درصد)

تیمارها	قلب	طحال	بورس	کبد	چربی شکمی	سنگدان	کیسه صفرا	ران	سینه
شاهد	۰/۳۹	۰/۹۶	۰/۱۹	۲/۰۲	۱/۰۷	^a ۱/۴۸	۰/۰۱۰	۱۹/۹۳	b۲۴/۹۹
تیمار ۱	۰/۴۹	۰/۱۱	۰/۲۰	۱/۸۰	۱/۳۸	ab۱/۲۳	۰/۱۱	۱۹/۶۰	ab۲۴/۷۵
تیمار ۲	۰/۰۴	۰/۰۹	۰/۱۹	۱/۸۱	۱/۱۵	^b ۱/۰۵	۰/۱۱	۱۹/۱۰	a۲۶/۸۰
-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	۰/۴۲۰	۰/۸۲۹

* میانگین‌هایی که در هر ستون حرف‌های متفاوت دارند، دارای اختلاف آماری معنی‌داری با هم هستند ($P < 0.05$).
 ۱: وزن هر قسمت از لاشه نسبت به وزن مرغ زنده. ۲: تزریق ۲۰ میکرولیتر نانو اکسیدروی (۰/۵ میلی گرم نانو اکسیدروی در ۵۰ میلی لیتر محلول نمکی). ۳: تزریق ۲۰ میکرولیتر نانو اکسیدروی (۰/۶ میلی گرم نانو اکسیدروی در ۵۰ میلی لیتر محلول نمکی).

باتوجه به اینکه عنصرروی سبب تحریک هورمون‌رشدانسولین مانند می‌شود و با تاثیر بر رونویسی و بیان ژن در ساخت پروتئین‌ها نقش داشته و با بهبود خصوصیات ریخت‌شناسی روده قابلیت هضم مواد مغذی را افزایش می‌دهد، عدم تاثیر آن بر افزایش وزن قسمت‌های مختلف اندام‌های لاشه می‌تواند به دلیل استفاده از غلظت‌های نامناسب نانو اکسیدروی و یا شکل و نحوه استفاده از آن باشد که نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

وزن نسبی سنگدان با تزریق ۱۰ و ۱۲ میلی گرم در میلی لیتر نانو اکسیدروی نسبت به تیمار شاهد کمتر بود ($P < 0.05$). گزارشات نشان می‌دهد استفاده از نانو اکسیدروی به عنوان مکمل در جیره، وزن نسبی اندام‌های گوارشی جوجه‌های گوشتی را بهبود می‌بخشد (Ahmadi et al., 2014) و در تحقیق دیگر گزارش شد که با افزودن نانو اکسیدروی به جیره تغییر معنی‌داری در وزن نسبی سنگدان دیده نشد (Bakhshayesh et al., 2018). در برخی گزارشات نیز افزودن نانو اکسیدروی به جیره جوجه گوشتی سبب کاهش وزن نسبی سنگدان شد (Usama et al., 2020). اثرات سمی و مضر نانوذرات اکسیدروی هم می‌تواند سبب تخریب و تحلیل اندام‌ها و کاهش وزن آن‌ها شود (Sabina et al., 2020). شاید افزایش قابلیت دسترسی مواد مغذی به واسطه بهبود فعالیت آنزیم‌های مرتبط با روی و بهبود خصوصیات ریخت‌شناسی روده سبب کاهش مصرف خوراک و در نتیجه فعالیت کمتر سنگدان و کاهش وزن نسبی 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 زیست فراهمی سایر مواد مغذی بیشتر می‌شود که کاهش مصرف خوراک را به همراه دارد و می‌توان از آن به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده کرد. نانو اکسیدروی با افزایش و بهبود بیان ژن IL-12 و تاثیر بر تکثیر بازوفیل‌ها، افزایش سطح گلوکوتایون پراکسیداز سبب افزایش پاسخ ایمنی در جوجه گوشتی و بهبود سلامت پرند می‌شود. با تزریق نانو اکسیدروی در غلظت و زمان مناسب به جوجه‌های گوشتی می‌توان در شرایط وجود تنش و استرس اکسیداتیو، با افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی خون به مقابله با تولید رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپید پرداخت.

REFERENCES

- Ahmadi, F., Ebrahimnejad, Y., Ghiasi ghalehkandi, J. & Maheri, S. 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)
- Birial, 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 quantification 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., Mottaghtalab, 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.