

اثرات مکمل نانوذرات اکسید روی در جیره بر برخی فراسنجه‌های

تولیدمثلی بلدرچین نر



سجاد عمورضائی^۱، *امجد فرزین پور^۲، عباس فرشاد^۳، محمد رزم کبیر^۲

^۱فارغ التحصیل کارشناسی ارشد علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان، ایران

^۲استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان، ایران

^۳دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان، ایران

*پست الکترونیکی نویسنده مسئول: amjadfarzinpour@gmail.com

چکیده

در مطالعه حاضر، اثر نانوذرات اکسید روی بر عملکرد تولیدمثلی بلدرچین نر ژاپنی بررسی گردید. در این تحقیق، از ۱۰۰ قطعه بلدرچین ژاپنی در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در پنج تیمار استفاده و برای هر تیمار پنج تکرار در نظر گرفته شد. هر تکرار شامل سه قطعه بلدرچین ماده و یک قطعه بلدرچین نر بود. این آزمایش در ۲۰ هفته اجرا گردید. تیمارهای آزمایشی شامل کنترل منفی (۰ و ۰)، کنترل مثبت (۳۰ و ۶۰ میلی گرم اکسید روی تجاری در کیلوگرم) و سطوح مختلف نانوذرات اکسید روی (۱۰ و ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم)، (۳۰ و ۶۰ میلی گرم در کیلوگرم) و (۹۰ و ۱۸۰ میلی گرم در کیلوگرم) به ترتیب برای دوره رشد (۰ تا ۴۲ روزگی) و تولید (۴۲ روزگی تا ۲۰ هفتهگی) بودند. نتایج آزمایش نشان داد که عدم وجود مکمل روی، سبب کاهش معنی دار وزن بدن، وزن بیضه، تولید اسپرم روزانه و غلظت تستوسترون سرم بلدرچین نر گردید ($P < 0/05$). مصرف ۱۸۰ میلی گرم نانوذرات اکسید روی در کیلوگرم موجب افزایش اسپرم تولیدی روزانه، غلظت سرمی تستوسترون و وزن بدن پرنده گردید ($P < 0/05$). تفاوت معنی داری برای عملکرد تولیدمثلی و غلظت تستوسترون بلدرچین‌های گروه کنترل مثبت و بلدرچین‌های دریافت کننده ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم نانوذرات اکسید روی مشاهده نشد. افزایش مقدار نانوذرات اکسید روی تا ۱۸۰ میلی گرم در کیلوگرم منجر به افزایش عملکرد تولید مثلی در بلدرچین ژاپنی نر گردید. به طور کلی، مصرف ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم نانوذرات اکسید روی باعث بهبود عملکرد تولیدمثلی بلدرچین‌های نر می گردد و لذا می تواند جایگزین مناسبی برای سطح ۶۰ میلی گرم در کیلوگرم اکسید روی تجاری در جیره باشد.

کلمات کلیدی: اسپرم تولیدی روزانه، بلدرچین ژاپنی، تستوسترون، نانو ذرات اکسید روی.

The effects of dietary zinc oxide nanoparticles on some reproductive parameters of male quail

Sajad Amorezae¹, Amjad Farzinpour^{*2}, Abbas Farshad², Mohammad Razmkabir²

¹Graduated Masters of Animal science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Iran

²Assistant professor, ³Associated professor, Department of Animal sciences, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Iran

*Corresponding author e-mail: amjadfarzinpour@gmail.com

Abstract

In present study, the effect of zinc oxide nanoparticles (ZnO NP) on reproductive performance of male Japanese quail was studied. In this study, one hundred Japanese quails were used based a completely randomized design in 5 treatments and each treatment was repeated 5 times. Each repeated included three females and one male quails. The experiment was performed during 20 weeks. Experimental treatments included negative control (0 and 0 mg/kg), positive control (30 and 60 mg/kg commercial zinc oxide) and different dietary levels (10 and 20 mg/kg), (30 and 60 mg/kg) and (90 and 180 mg/kg) of ZnO NP respectively during growth ((from day one to day 42 of age) and production (from day 42 of age to week 20 of age) periods. The results showed that lack of dietary Zn causes the decreased body weight, testis weight, daily sperm production and serum testosterone concentration ($P<0.05$). The consumption of 180 mg/kg of nanoparticles increases the daily sperm production, serum testosterone concentration and body weight of the birds ($P<0.05$). There were no significant differences between the positive control and the quails fed 20 ml/kg of ZnO NP for reproductive performance and testosterone concentration. Increasing the ZnO NP level to 180 mg/kg leads to significant increase of reproductive performance in male Japanese quail. In conclusion, the consumption of the 20 mg/kg of ZnO NP causes the improved reproductive performance of male quails and hence can be a good replacement for 60 mg/kg of commercial zinc oxide in the diet.

Key words: daily sperm production, Japanese quail, testosterone, zinc oxide nanoparticles.

مقدمه

نانوفناوری^۱ علمی است که با مواد و ساختارهای دارای خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی منحصربه‌فرد و در اندازه‌های بسیار کوچک (۱ تا ۱۰۰ نانومتر) سر و کار دارد (Ramsden., 2005). ذرات در ابعاد یا اندازه نانو به دلیل برخورداری از پتانسیل کاربردی بالا توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند و با به‌کارگیری آن، دانشمندان، مهندسان، پزشکان، داروسازان و میکروبی‌شناسان توانسته‌اند اهداف خود را در سطح مولکولی پیگیری نموده، درهای جدیدی در علوم و بهداشت باز کنند (Arora et al., 2008). مطالعات اخیر نشان داده است که نانوذرات به آسانی از غشای سلولی عبور کرده، وارد اندام‌های هدف شده، با سیستم‌های زیستی واکنش دهند و به همین دلیل ممکن است برای سلول‌های زنده سمی باشند (Makhluf et al., 2008). با این حال شماری از مطالعات، توانایی نانوذرات برای عبور مؤثر از سدهای زیستی از جمله سدهای محافظت‌کننده از بافت‌های تولیدمثلی را نشان داده‌اند (Braydich-Stolle et al., 2005). عنصر روی، عنصری کم مصرف و ضروری برای تمام موجودات زنده است. این عنصر در عملکرد بیش از ۳۰۰ نوع آنزیم و سایر اعمال حیاتی بدن از قبیل رونویسی RNA، دفاع در برابر رادیکال‌های آزاد و تکثیر و بازسازی DNA نقش دارد (Yang et al., 2009) و به دلیل داشتن وظایف متابولیک فراوان، باید به صورت روزانه به جیره حیوانات افزوده شود (Croteau et al., 2011). نقش کلیدی روی ناشی از حضور آن به-عنوان بخش حیاتی آنزیم‌های درگیر در تولید هورمون‌های جنسی است (Lewis-Jones et al., 1996). مطالعات حاکی از آن است که عنصر روی نقش کلیدی در پایداری غشاء و خصوصیات مکانیکی فیبرهای ضمیمه، مورفولوژی دم اسپرم و تحرک اسپرم ایفا می‌کند. همچنین عنصر روی در ارتباط با ATP بوده، در انقباض و تنظیم انرژی فسفولیپیدهای آن نقش دارد و بنابراین تأثیر مستقیمی بر تحرک اسپرم دارد (Lewis-Jones et al., 1996). همچنین وجود عنصر روی در منی، یکی از عواملی است که باعث خاصیت ضدباکتریایی پلاسمای منی و زنده‌مانی اسپرم‌ها می‌شود (Lewis-Jones et al., 1996). در مورد نقش ضروری عنصر روی بر میزان تولید اسپرم،

¹ Nanotechnology

گزارش شده است که روی عنصری ضروری برای تقسیم سلولی و تولید اسپرم سالم است (Amem and Al-Daraji, 2011b). به نظر می-رسد که عنصر روی مهمترین عنصر معدنی مورد نیاز برای عملکرد جنسی پرندگان نر باشد. عنصر روی برای متابولیسم تستوسترون، رشد بیضه‌ها، تولیداسپرم، تحرک آن، تعداد آن و نیز کاستن استروژن مازاد در بافت‌های تولیدمثلی جنس نر مورد نیاز است (Amem and Al-Daraji, 2011b). مشخص شده است که عنصر روی برای سنتز پروژسترون مورد نیاز بوده، کمبود آن منجر به تولید پرولاکتین مازاد می-شود (Brown and Pentlan, 2007). عنصر روی به حفاظت مواد ژنتیکی یا کروماتین موجود در DNA در هسته سلول اسپرم کمک می-کند. وجود این ساختارها برای ایجاد باروری مناسب توسط اسپرم ضروری است. مشخص شده است که عنصر روی برای افزایش میل جنسی و توان آن در جنس نر نقش مهمی دارد (Balasubramanian et al, 2010). استفاده از غلظت‌های بالای روی در مایع رقیق‌کننده اسپرم در خروس می‌تواند منجر به مرگ اسپرم شود و باروری را به شدت کاهش می‌دهد (Barber et al., 2005). استفاده از مکمل روی در جیره خروس‌های مادرگوشتی سبب افزایش حجم انزال، بهبود کیفیت منی، افزایش معنی‌دار غلظت هورمون‌های استروژن و پروژسترون، تحرک اسپرم‌ها و همچنین کاهش درصد اسپرم‌های غیرطبیعی یا مرده و نیز کاهش ناهنجاری‌های آکروزوم اسپرم می‌شود. بنابراین افزودن روی به جیره خروس‌های مادرگوشتی می‌تواند سبب بهبود عملکرد تولیدمثلی خروس‌ها و در نهایت کل گله گردد (Amem M and Al-Daraji, 2011a, b, c). عنصر روی دارای نقش مهمی در تقسیم سلولی است و این نقش در رابطه با تولید اسپرم بسیار حیاتی است. روی در متابولیسم تستوسترون نیز دارای نقش مهمی است و به دلیل نقش در فعالیت آنتی اکسیدانی و ممانعت از فعالیت آنزیم DNAases می‌تواند سبب افزایش زنده‌مانی اسپرم‌ها در مایع منی پس از انزال گردد (Amem and Al-Daraji, 2011d). با توجه به تولید روز افزون نانوذرات اکسید روی و کاربردهای مفید آن در سیستم‌های زیستی، تاکنون مطالعات کمی در زمینه اثرات جانبی این مواد بر بدن جانداران صورت گرفته است. استفاده از نانو اکسیدروی در جیره جوجه‌های گوشتی توانسته است سبب افزایش عملکرد تولید و همچنین افزایش فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز در خون این جوجه‌ها شود (Tian et al., 2009). از عوامل ضدمیکروبی غیرآلی می‌توان به اکسید برخی فلزات مانند دی اکسید تیتانیوم، اکسیدروی، اکسیدمنیزیم و اکسید مس اشاره کرد که استفاده از آن‌ها به عنوان عوامل ضدمیکروبی در تحقیقات مختلف توصیه شده است. همچنین، از این گونه مواد به عنوان عوامل ضدمیکروبی ایمن برای انسان و حیوانات ذکر شده است (Dastjerdi and Montazer, 2010). با توجه به ایمن بودن نانوذرات اکسید روی برای انسان، حیوانات و محیط زیست، همواره توجه زیاد در راستای شناسایی قابلیت‌های جدید این ماده در تغذیه دام و طیور و همچنین اثرات فیزیولوژیک آن به خصوص بر روی باروری جنس نر و ماده وجود داشته است (Dastjerdi and Montazer, 2010). هدف از انجام این تحقیق، ارزیابی اثرات استفاده از مقادیر مختلف نانوذرات اکسیدروی در جیره غذایی بر فعالیت تولیدمثلی در مدل حیوانی بلدرچین در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش، ۶۰۰ قطعه جوجه بلدرچین ژاپنی یک روزه از مزرعه جوجه‌کشی بلدرچین خریداری شد و از روز اول به‌طور تصادفی در ۵ گروه تیماری (بر روی بستر) توزیع گردیدند. هر تیمار دارای پنج تکرار بود. مقدار روی موجود در جیره دوره رشد (۰-۴۲ روزگی) تیمارهای مختلف به ترتیب صفر (کنترل منفی)، ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم اکسید روی تجاری (کنترل مثبت)، ۱۰، ۳۰ و ۹۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره نانوذرات اکسید روی بودند. پس از ۴۲ روز پرورش، ۱۰۰ قطعه بلدرچین در ۵ تیمار و ۵ تکرار برای هر یک (شامل ۳ قطعه بلدرچین ماده و ۱ قطعه بلدرچین نر) در ۲۵ قفس انفرادی توزیع شدند. دسترسی پرندگان به آب آزاد بود، ولی خوراک کنترل شده روزانه ۲ بار توزیع شد. جیره دوره رشد (۴۲ روز) و تولید (۵ ماه) بر پایه سویا و ذرت و مطابق احتیاجات مواد مغذی توصیه شده توسط (NRC (1994) تنظیم گردید (جدول ۱).

گروه‌های مختلف آزمایشی در دوره تولید، شامل گروه کنترل منفی (فاقد هر گونه مکمل روی)، گروه کنترل مثبت (حاوی ۶۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره اکسید روی تجاری) و گروه‌های دریافت‌کننده سطوح مختلف نانو ذرات اکسید روی (۲۰، ۶۰ و ۱۸۰ میلی گرم نانوذرات اکسیدروی) در جیره بودند. مقدار روی جیره‌های غذایی تیمارهای مختلف آزمایشی با استفاده از دستگاه جذب اتمی^۲ اندازه‌گیری

²Shimadzu, AA-670, Japan

گردید (جدول ۲). نانوذرات اکسید روی مصرف شده در این آزمایش ساخت کشور اسپانیا^۳ که به صورت پودر سفید رنگ، بدون بو، با درجه خلوص ۹۹/۹۸ درصد از شرکت نوترینو- تهران خریداری شد. با ارسال نمونه نانوذرات اکسید روی به مؤسسه متالورژی تهران، اندازه ذرات در محدوده ۳۰ - ۳۵ نانومتر اندازه گیری شد (شکل ۱).

جدول ۱: اجزای خوراکی و ترکیبات مواد مغذی جیره غذایی

اجزاء خوراکی (%)	دوره رشد (۱ تا ۴۲ روزگی)	دوره تولید (۴۳ تا ۱۹۷ روزگی)
ذرت	۴۸/۹۹	۴۷/۳۲
کنجاله سویا	۴۶/۷۶	۳۸/۶۱
روغن سویا	۲/۸۶	۶/۱۶
دی کلسیم فسفات	۱/۴۱	۱/۲۲
کلسیت	۰/۸۸۳	۵/۵۲
نمک	۰/۳۳۵	۰/۳۵۰
مکمل ویتامینی ^۱	۰/۲۵۰	۰/۲۵۰
مکمل معدنی ^{۲*}	۰/۲۵۰	۰/۲۵۰
دی- ال میتونین	۰/۱۱۲	۰/۲۰۰
ال- لیزین	۰/۱۲۲	۰/۱۳۰
مواد مغذی محاسبه شده جیره		
انرژی قابل متابولیسم (Kcal/kg)	۳۰۰۰	۳۰۰۰
پروتئین خام %	۲۴/۵۶	۲۱/۱۵
لیزین (%)	۱/۳۰	۱/۰۰
میتونین (%)	۰/۵۰	۰/۴۵
میتونین + سیستین (%)	۰/۷۵	۰/۷۰
کلسیم (%)	۰/۸۰	۲/۵۰
فسفر قابل دسترس (%)	۰/۳۰	۰/۳۵

^۱ هر کیلوگرم مکمل ویتامین سارال حاوی: ویتامین A ۳۶۰۰۰۰ واحد بین المللی، ویتامین D₃ ۸۰۰۰۰ واحد بین المللی، ویتامین E ۷۲۰۰ واحد بین المللی، B₁ ۷۲۰ میلی- گرم، ۲۶۴۰ میلی گرم ویتامین B₂، ۴۰۰۰ میلی گرم اسید پانتوتنیک، ۱۲۰۰۰ میلی گرم اسید نیکوتینیک، ۱۲۰۰ میلی گرم ویتامین B₆، ۴۰۰ میلی گرم اسید فولیک، ۶ میلی گرم ویتامین B₁₂، ۴۰ میلی گرم بیوتین، کولین کلراید ۱۰۰۰۰۰ میلی گرم و آنتی اکسیدان ۴۰۰۰۰ میلی گرم.

^۲ هر کیلوگرم مکمل معدنی فاقد روی: ۴۵۰۰۰ میلی گرم سولفات منگنز، ۳۲۰۰۰ میلی گرم سولفات آهن، ۲۶۰۰ میلی گرم سولفات مس، ۵۰۰ میلی گرم ید، ۲۰ میلی گرم سلنیوم.

* جهت تهیه جیره حاوی ۶۰ میلی گرم در کیلوگرم اکسید روی تجاری، با توجه به نسبت وزن مولکولی عنصر روی (M=65) به وزن مولکولی اکسید روی (M=81) که حدود ۸۱/۳ درصد و درجه خلوص اکسید روی تجاری خریداری شده از شرکت سارال کردستان که ۱۷/۵ درصد بود، با محاسبات انجام شده مقدار ۴۲۰ میلی گرم از آن به یک کیلوگرم جیره اضافه شد. برای تهیه جیره های حاوی ۲۰، ۶۰ و ۱۸۰ میلی گرم در کیلوگرم از نانوذرات اکسید روی با درجه خلوص ۹۹/۹۸ و نسبت وزنی عنصر روی به اکسید روی، به ترتیب ۲۴/۶، ۷۳/۸ و ۲۲۱/۴ میلی گرم نانوذرات به یک کیلوگرم به جیره اضافه شد.

جدول ۲: مقادیر روی فرموله شده و واقعی اندازه گیری شده در جیره دوره تولید بلدرچین با روش جذب اتمی (کیلوگرم/ میلی گرم)

مقدار روی محاسبه شده در جیره پایه	کنترل منفی	۶۰*	۲۰**	۶۰**	۱۸۰**
دوره رشد (۱-۴۲ روزگی)	۰	۳۰	۱۰	۳۰	۹۰
دوره تولید (از ۴۲ روزگی تا ۲۰ هفتگی)	۰	۶۰	۲۰	۶۰	۱۸۰
مقدار روی اندازه گیری شده در جیره تولید	۴۳/۳	۸۹/۵	۶۴/۹	۱۰۹/۶۵	۲۲۴/۲۵

* حاوی اکسید روی تجاری، ** حاوی نانو ذرات اکسید روی

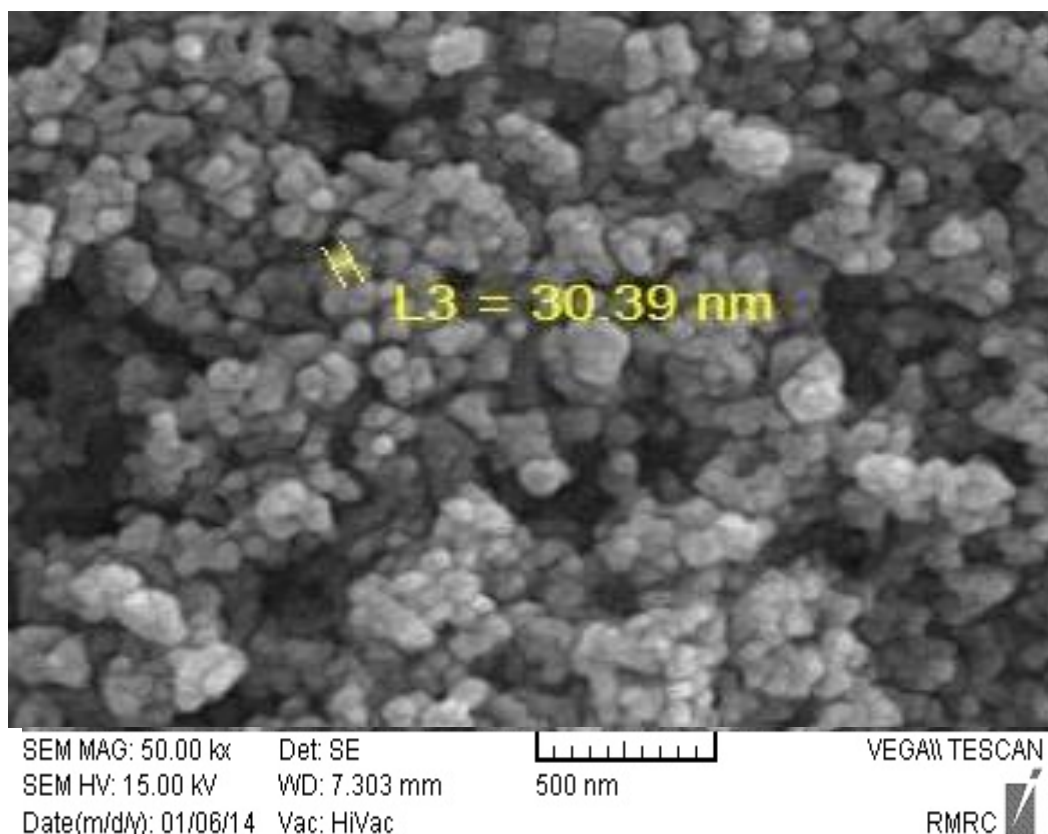
برای تعیین میزان اسپرم روزانه (Zdenka et al., 2013)، پس از جدا کردن و توزین بیضه‌ها، بیضه چپ در ۵۰ میلی لیتر محلول رینگر ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد و به وسیله یک هموژنایزر ساده کاملاً همگن شد. سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از نمونه برداشته شده و روی لام هموسیتمومتر (توما) قرار داده شد و به کمک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ شمارش شد. عمل شمارش هر نمونه ۶ بار تکرار شده و سپس با استفاده از فاکتورهای تبدیلی مناسب و با استفاده از فرمول $[۱۰۰ \times \text{رقت} \times (\text{تعداد اسپرم‌ها در } ۴۰۰ \text{ مربع کوچک})]$ تعداد اسپرم‌ها در هر بیضه محاسبه شد. این مقادیر به عنوان تعداد کل اسپرم‌ها در بیضه به دست آمد. حال باید این مقدار را به وزن بیضه تقسیم کرده تا تعداد اسپرم‌ها در هر گرم بیضه به دست آید. از آنجایی که در بلدرچین، رشد اسپرماتوزوئیدها تقریباً ۲/۶۹ روز در حین اسپرماتوزن طول می کشد (Whittow, 2000)، لذا مقادیر به دست آمده برای تعداد اسپرم در هر گرم بیضه به ۲/۶۹ تقسیم شد تا تولید کل اسپرماتوزوئید برای یک روز به دست آید.

جهت اندازه گیری غلظت هورمون تستوسترون خون، در پایان دوره آزمایش (سن ۲۰ هفتگی) و قبل از کشتار نمونه‌های خونی از ورید زیر بال تمامی بلدرچین‌ها اخذ گردید. سپس سرم آن‌ها با استفاده از سانتریفوژ (Hermle-Z323K) آلمان با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه کاملاً جدا گردید. در ادامه با استفاده از سمپلر سرم برداشته شده و در میکروتیوب‌های ۲ میلی لیتری ریخته شد. میکروتیوب‌ها بلافاصله به فریزر ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) منتقل گردید و تا انجام آزمایش‌ها در فریزر نگهداری شدند. آنالیز نمونه‌های سرم خون توسط آزمایش الیزا^۴ و با استفاده از کیت‌های اختصاصی DRG آلمان، میزان تستوسترون سرم خون اندازه گیری شد.

به منظور بررسی بافت‌شناسی، نمونه‌های بیضه راست جدا شده از بلدرچین‌های نر، به ظروف پلاستیکی مخصوص حاوی محلول بافر فرمالین ۱۰ درصد منتقل شد. مقاطع تهیه شده از نمونه‌های بافتی بیضه با روش ائوزین-نیگروزین رنگ آمیزی شدند. برای هر تیمار تعداد ۴ یا ۵ مقطع تهیه و بررسی شد. تراکم سلول‌های اسپرم‌ساز در لوله‌های سمینیفروس درجه بندی (درجه ۱ تراکم سلولی کم و دارای فضاهای خالی بین زنجیره‌های اسپرماتوزن، درجه ۲ تراکم سلولی متوسط و فضاهای خالی کمتر بین زنجیره‌های اسپرماتوزن، درجه ۳ دارای کمترین فضاهای بین زنجیره‌ای و تراکم سلولی زیاد) گردید، به طوری که این درجه بندی بین ۱ تا ۳ برآورد گردید. همچنین تعداد لوله‌های سمینیفروس در پنج میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰ شمارش گردید.

داده‌های حاصل از این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۵ تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده، از نرم افزار (SAS ۲۰۰۳) طبق رویه GLM و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن (۱۹۵۵) در سطح معنی دار ۵ درصد صورت گرفت.

^۴ELx808 Absorbance Reader, BioTek

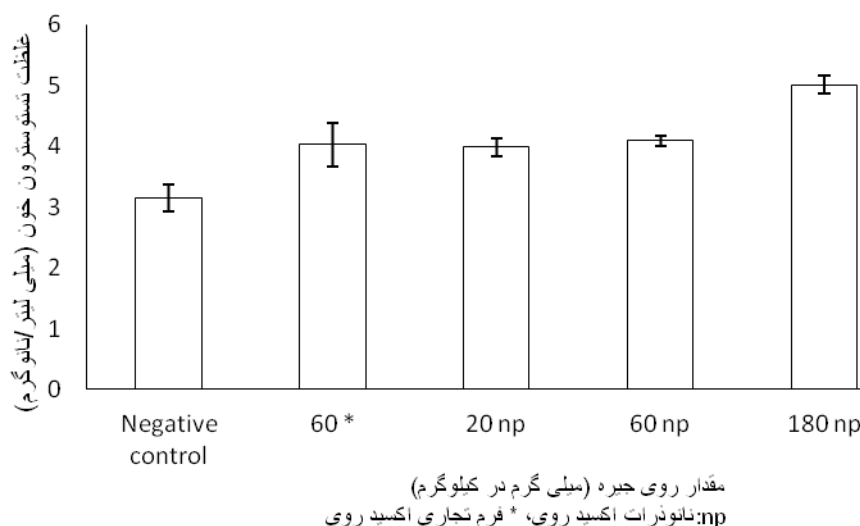


شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات اکسید روی (Scanning electron microscope).

نتایج

تولید اسپرم روزانه: نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارهای آزمایشی بر میزان تولید روزانه اسپرم و سایر فاکتورهای تولیدمثلی در جدول ۳ نشان داده شده است. افزایش معنی‌داری در میزان تولید اسپرم روزانه در گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرات اکسید روی مشاهده شد ($P < 0.05$). به‌طوری که بلدرچین‌های دریافت‌کننده ۱۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات روی، بیشترین تولید اسپرم را داشتند، اما بلدرچین‌های گروه کنترل منفی (فاقد هرگونه مکمل روی در جیره) کمترین اسپرم تولیدی را داشتند. مقایسه میانگین شاخص گنادی معیار (نسبت وزن بیضه به وزن بدن، شاخصی برای ارزیابی عملکرد دستگاه تولیدمثل است) تحت تأثیر تیمارهای مختلف آزمایشی قرار نگرفت (جدول ۳).

نتایج مربوط به اثرات تیمارهای آزمایشی بر میزان غلظت هورمون تستوسترون در نمودار ۱ نشان داده شده است. همانگونه که ملاحظه می‌شود، غلظت هورمون تستوسترون نیز روندی مشابه با میزان تولید اسپرم روزانه را نشان داد و تفاوت معنی‌داری برای غلظت هورمون تستوسترون سرم خون بین گروه‌های مختلف آزمایشی مشاهده گردید ($P < 0.05$).



نمودار ۱: اثرات تیمارهای آزمایشی بر میزان غلظت هورمون تستوسترون در گروه‌های مختلف آزمایشی بلدرچین
نر ($P < 0.05$).

بلدرچین‌های گروه کنترل منفی پایین‌ترین سطح غلظت سرمی هورمون تستوسترون را نشان دادند و بلدرچین‌های گروه دریافت‌کننده ۱۸۰ میلی گرم در کیلوگرم نانو اکسید روی در جیره، بالاترین سطح سرمی تستوسترون را داشتند. غلظت سرمی تستوسترون گروه‌های کنترل مثبت و دریافت‌کننده ۲۰ و ۶۰ میلی گرم نانوذرات بالاتر از مقدار مربوط به گروه کنترل منفی بودند ($P < 0.05$)، اما تفاوت معنی-داری بین غلظت سرمی این هورمون در بین گروه‌های مذکور وجود نداشت. مقایسه مقاطع بافت‌شناسی نمونه‌های بیضه گروه‌های مختلف نشان داد که تراکم سلولی و زنجیره اسپرماتوژنزی بیضه بلدرچین‌های گروه کنترل منفی دارای اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌های آزمایشی است (شکل ۲). کاهش تراکم سلولی در لوله‌های سمینیفروس و وجود فضاهای خالی در بین سلول‌های زنجیره اسپرماتوژنز، سبب کاهش تراکم اسپرماتوزوئیدهای هسته کشیده در ناحیه مرکزی بسیاری از مقاطع این لوله‌ها در بیضه‌های گروه کنترل منفی نسبت به مقاطع بافتی بیضه بلدرچین‌های سایر گروه‌های آزمایش مشاهده شد (شکل ۳). همچنین افزایش بافت پیوندی بینابینی لوله‌های سمینیفروس در بیضه بلدرچین‌های گروه کنترل منفی نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی، یکی دیگر از یافته‌های بافت‌شناسی بود (شکل ۳).

بحث

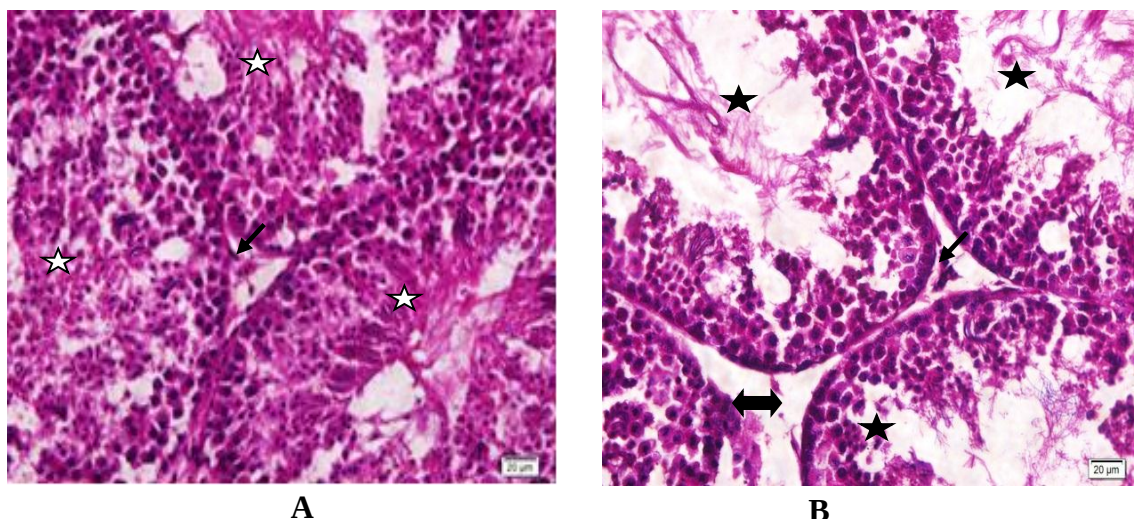
در حال حاضر محصولات جدید نانو بدون ارزیابی سم‌زایی یا اثرات مثبت آنها روی بافت یا سلول‌ها استفاده می‌شوند (Braydich-Stolle, 2005). بنابراین درک دقیق مکانیسم‌های سمیت یا اثرات مثبت فیزیولوژیکی و مولکولی نانوذرات در سیستم تولیدمثلی ضروری است. در این مطالعه اثر مثبت نانو ذرات اکسید روی بر عملکرد تولیدمثلی بلدرچین نر، شامل تولید اسپرم روزانه و تولید تستوسترون مشاهده شد. گامت‌های پستانداران و جنین‌های در حال رشد بسیار آسیب‌پذیر هستند و بنابراین در محیط‌های حفاظت‌شده‌تری واقع هستند. با این حال چندین مطالعه توانایی نانوذرات برای عبور مؤثر از سد‌های بیولوژیکی از جمله سد‌هایی نشان داده‌اند که از بافت‌های تولیدمثلی محافظت می‌کنند.

جدول ۳: اثرات تیمارهای مختلف حاوی مکمل روی جیره (کیلوگرم/ میلی گرم) بر وزن بدن و برخی شاخص‌های تولید مثلی

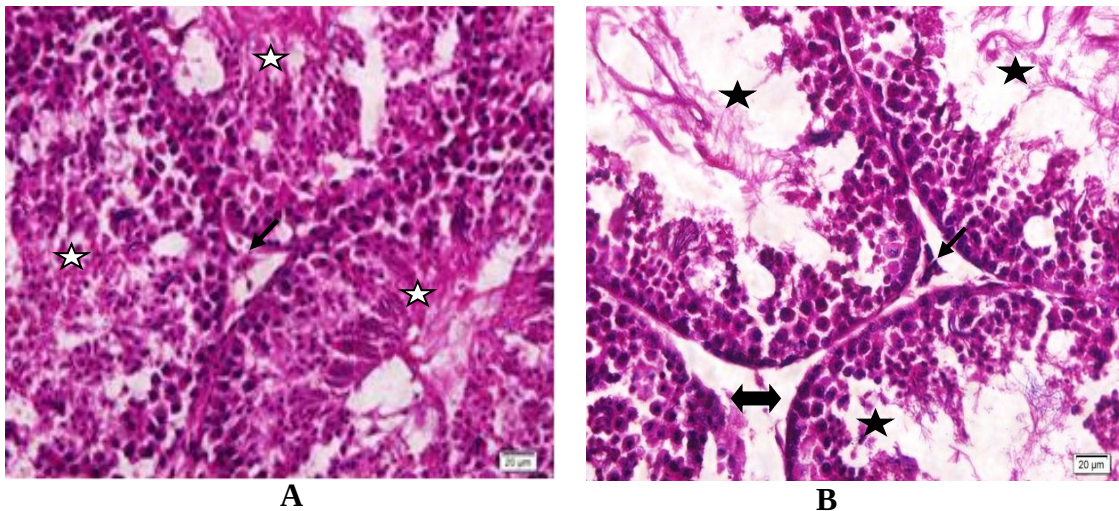
مقدار روی و نانوذرات روی جیره	کنترل منفی	۶۰*	۲۰**	۶۰**	۱۸۰**
وزن بدن (گرم)	۲۱۲/۳±۳۱ ^b	۲۵۷/۳±۴۱ ^{ab}	۲۳۶/۵±۳۵ ^{ab}	۲۴۷/۳±۲۵ ^{ab}	۳۰۰/۴±۲۸ ^a
وزن هر دو بیضه (گرم)	۶/۲۰±۰/۳۷ ^b	۸/۱۳±۰/۶۰ ^a	۷/۶۴±۰/۷۶ ^{ab}	۷/۲۷±۰/۷۴ ^{ab}	۷/۳۶±۰/۳۷ ^{ab}
شاخص گنادی (درصد)	۲/۹۲±۰/۴۷	۳/۱۶±۰/۴۱	۳/۲۳±۰/۵۱	۲/۹۴±۰/۵۴	۳/۱۲±۰/۳۹
۱۰ ^۶ (اسپرم روزانه ×)	۹۰/۴۸±۳/۵۲ ^c	۹۲/۱۶±۲/۷۳ ^b	۹۱/۰۸±۳/۳۶ ^{bc}	۹۲/۱۲±۴/۶۷ ^b	۹۴/۷۰±۲/۲۵ ^a

* حاوی اکسید روی تجاری، ** حاوی نانو ذرات اکسید روی، کنترل منفی فاقد مکمل روی در جیره
a, b, c میانگین‌های هر ردیف با حرف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P < ۰/۰۵).

نشان داده شده است که نانوذرات مغناطیسی پس از تزریق داخل صفاقی در موش، به‌طور مؤثری از سد خونی بیضه‌ای عبور می‌کنند (Kim et al., 2006). حضور نانوذرات پلی متیل‌متاکریلات پس از خوردن به رت‌ها در بیضه تأیید شده است (Araujo et al., 1999). ورود نانوذرات به داخل اسپرم نیز ثابت شده است (Makhluf et al., 2006; 2008). این پژوهشگران نشان دادند که جنمایی و توانایی واکنش آکروزومی سلول‌های اسپرم گاو به وسیله حضور نانوذرات آهن تحت تأثیر قرار نگرفته است. اسپرم پرندگان حاوی مقدار زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در غشا پلاسمایی است که همین امر دلیل اصلی حساسیت آنها به آسیب‌های ایجاد شده توسط پراکسیداسیون لیپید است (Surai et al., 1998). مشخص شده است که عنصر روی به‌طور غیرمستقیم از طریق غده هیپوفیز بر هورمون‌های گنادوتروپیک تأثیر می‌گذارد (Brown et al., 1975). اگرچه منی حاوی مقدار زیادی روی است، اما ارتباط بین کیفیت اسپرم و عنصر روی هنوز به‌درستی شناخته نشده است. دم اسپرم، محل تجمع عنصر روی است. مطالعات حاکی از آن است که عنصر روی نقش کلیدی در پایداری غشاء و خصوصیات مکانیکی فیبرهای ضمیمه، مورفولوژی دم اسپرم و تحرک اسپرم ایفا می‌کند.



شکل ۲. مقاطع بافت بیضه بلدرچین نر. A: تیمار دریافت کننده ۱۸۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره نانوذرات اکسید روی، B: گروه کنترل منفی (فاقد مکمل روی در جیره). رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین. مقیاس = ۲۰۰ میکرومتر.



شکل ۳. مقاطع لوله های سمینفروس در بیضه بلدرچین نر. A: تیمار دریافت کننده ۱۸۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره نانوذرات اکسید روی، B: گروه کنترل منفی (فاقد مکمل روی در جیره). رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین. مقیاس = ۲۰ میکرومتر. علامت ستاره سفید تراکم سلول های اسپرماتوزو را در مرکز لوله های سمینفروس را نشان می دهد. علامت ستاره سیاه فضاهای خالی در داخل لوله ها و در بین زنجیره اسپرماتوزنر نشان می دهد. علامت فلش دو طرفه نشان دهنده فضاهای بین لوله های سمینفروس را نشان می دهد که توسط بافت پیوندی اشغال می گردد و عملاً سطح تولید سلول های جنسی را کاهش می دهد. فلش ساده در هر دو اسلاید سلول لیدینگ را نشان می دهد.

همچنین نشان داده شده است که عنصر روی در ارتباط با ATP بوده، در انقباض و تنظیم انرژی فسفولیپیدهای آن نقش دارد و بنابراین تأثیر مستقیمی بر تحرک اسپرم دارد. در این راستا گزارش شده است که با افزودن ۱۱۰ میلی گرم بر لیتر سولفات روی به مایع منی بوقلمون در شرایط آزمایشگاهی، می توان مانع مصرف اکسیژن توسط اسپرم ها شد، ولی بر میزان باروری اسپرم تأثیری نداشت (Bakst, 1998). بنابراین می توان نتیجه گرفت که عنصر روی در اسپرم بوقلمون به عنوان مهارکننده تحرک اسپرم عمل کرده، از این طریق باعث افزایش زندهمانی اسپرم در زمان ذخیره در توبول ها می شود. تولید اسپرم روزانه، همبستگی مثبتی با اندازه بیضه دارد. به طور معمول، خروس های با جثه بزرگتر، بیضه های بزرگتری دارند و اسپرم بیشتری تولید می کنند (معمار و ضمیری، ۱۳۸۴). افزودن مکمل روی-متیونین، افزون بر نیازهای غذایی توصیه شده توسط NRC (۱۹۹۴) به جیره بلدرچین ژاپنی، تغییری در میزان تولید تخم بلدرچین، وزن تخم و ضریب تبدیل خوراک مشاهده نکردند، اما باعث افزایش ۷/۹۶ درصدی میزان باروری شد (Namra et al., 2009). این محققان نتیجه گرفتند که افزایش باروری ناشی از افزایش عنصر روی در جیره، ناشی از بهبود کیفیت تخم مرغ و کیفیت بالاتر منی بوده که منجر به افزایش بازدهی تولیدمثلی در بلدرچین های نر شده است. در آزمایش های دیگر نشان داده شده است که افزودن عنصر روی (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم جیره) باعث بهبود نرخ باروری می شود (Abdel-Galil and Abdel Samad, 2004). گزارش شده است که استفاده از غلظت های صفر، ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم جیره از نانوذرات اکسید روی در جوجه های گوشتی باعث افزایش عملکرد معنی داری در دز ۴۰ میلی گرم گردید (Tian et al., 2009). همچنین آنها با تغذیه دز ۴۰ میلی گرم نانو ذرات اکسید روی به جوجه های گوشتی، شاهد افزایش معنی دار فعالیت آنتی اکسیدانی به خصوص گلوکوتاتیون پراکسیداز در روزهای ۲۱ و ۴۲ دوره آزمایش بودند (Tian et al., 2009). همچنین در آزمایشی دیگر بر روی موش و با استفاده از سطح ۵ گرم در کیلوگرم خوراک اکسیدروی به همراه نانوذرات آهن و منیزیم گزارش شد که میزان فعالیت لاکتات دهیدروژناز سرم خون کاهش یافت (Chang et al., 2006). نتایج این پژوهش نشان می دهد که عدم وجود مکمل روی در جیره به طور مشخص و معنی داری سبب کاهش عملکرد تولیدمثلی گردید و صرف وجود روی در اجزاء جیره نتوانسته است نیازهای بدن برای یک فعالیت تولید مثلی معمول را در بلدرچین نر را فراهم آورد. وجود مکمل روی به شکل معمول و تجاری اکسید روی (۶۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره) توانسته است که نیازهای پرند نر را تأمین و به طور مشخصی موجب افزایش معنی دار فراسنجه های تولید مثلی گردید. تمامی این یافته ها با یافته های سایر محققین مذکور کاملاً تطابق داشته و ضرورت وجود مکمل روی در جیره را به طور مشخصی تأیید می نماید. در تحقیق اخیر از شکل نانوذرات روی به عنوان مکمل روی استفاده گردید. استفاده از نانوذرات اکسیدروی در مقادیر پیشنهاد شده در آزمایش اخیر توانست تولید اسپرم روزانه و غلظت هورمون تستوسترون خون را افزایش دهد. لذا استفاده از مکمل

روی به شکل نانوذرات، نیازهای اولیه عنصر روی را برای فعالیت‌های متابولیسمی و تولیدمثلی را تأمین می‌نماید. مقایسه میانگین‌ها گروه-های دریافت‌کننده نانوذرات و گروه کنترل مثبت نشان می‌دهد که کاهش مقدار مورد نیاز عنصر روی تا یک سوم مقدار پیشنهاد شده در جدول NRC هیچگونه کمبودی را نشان نداده است و تأثیری بر سایر فراسنجه‌ها نداشته است. در تفسیر این یافته می‌توان این گونه بیان نمود که نانو ذرات دارای سطح بیشتری جهت واکنش‌های متابولیسمی داخل بدن نسبت به ترکیبات فرم معمول هستند. همچنین دلیل کوچک بودن سایز نانوذرات، به راحتی از سدهای مختلف بافتی از جمله مخاطات گوارش عبور کرده، میزان جذب آنها نیز به مقدار زیادی افزایش می‌یابد. لذا کاربرد نانوذرات به صورت مکمل، مقدار مورد نیاز به افزودن به جیره را کاهش می‌دهد و به نظر پژوهشگران مطالعه حاضر، کاهش این مقدار تا یک صدم و یک هزارم مقدار پیشنهادی جدول NRC نیز می‌تواند احتیاجات پرند را تأمین کند که البته نیاز به تحقیقات بیشتری خواهد داشت. این نتایج برخلاف نتایج دیگر پژوهشگران در رابطه با استفاده از نانوذرات در موش (Kim et al., 2006) و برخی پستانداران (Braydich-Stolle, 2005) است. دلیل این امر شاید گونه پرند استفاده شده در آزمایش اخیر است. لذا سطوح استفاده از نانوذرات در این آزمایش بر روی بلدرچین نه تنها عوارض جانبی به دنبال نداشته است بلکه دارای اثرات مثبت بوده است و باعث بهبود عملکرد تولیدمثلی در مقادیر بالای استفاده از نانوذرات روی شده است.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی، بر اساس نتایج آزمایش اخیر، مصرف ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات اکسیدروی در جیره فاقد عوارض جانبی بوده، باعث بهبود شاخص‌های تولید مثلی بلدرچین‌های نر می‌شود و لذا می‌تواند جایگزین ۶۰ میلی‌گرم اکسیدروی تجاری باشد.

منابع

- معمار، م. و ضمیری، م. ج. (۱۳۸۴). پراکنش فصلی ویژگی‌های منی و باروری خروس‌های بومی فارس. مجله علوم کشاورزی ایران. شماره ۳۶، ص ۵۹۰-۵۸۱.
- Abdel-Galil M A and Abdel Samad M. H (2004). Effect of vitamin E, C, selenium and zinc supplementation on reproductive performance of two local breeds of chickens under hot climate conditions. *Egyptian Poultry Science*, 24: 217-229.
- Amem M and Al-Daraji HJ (2011a). Effect of dietary Zinc on semen quality of Cobb 500 broiler breeder Males. *Poultry Science*, 10: 447-482.
- Amem M and Al-Daraji HJ (2011b). Effect of dietary zinc supplementation on some seminal plasma characteristics of broiler breeders Males. *Poultry Science*, 10: 814-818.
- Amem M and Al-Daraji HJ (2011c). Influence of dietary supplementation with zinc on sex Hormones concentration of broiler chickens. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10: 1089-1093.
- Amem M and Al-Daraji HJ (2011d). 2011. Effect of dietary supplementation with different level of zinc on sperm egg penetration and fertility traits of broiler breeder chicken. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10: 1083-1088.
- Araujo L, Sheppard M, Lobenberg R and Kreuter J (1999). Uptake of PMMA nanoparticles from the gastrointestinal tract after oral administration to rats: modification of the body distribution after suspension in surfactant solutions and in oil vehicles. *International Journal of Pharmaceutics*, 176: 209-224.
- Arora S, Jain J, Rajwade JM and Paknikar KM (2008). Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicology Letters*, 179: 93-100.
- Barber SJ, Parker HM and McDaniel CD (2005). Broiler breeder semen quality as affected by trace minerals in Vitro. *Poultry Science*, 84: 100-105.
- Bakst M (1998). Structure of the avian oviduct with emphasis on sperm storage in poultry. *The journal of experimental zoology*, 282: 618-626.
- Balasubramanian SK, Jittiwat J, Manikandan J, Ong CN, Yu LE and Ong WY (2010). Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials*, 31: 2034-2042.
- Braydich-Stolle L, Hussain SM, Schlager JJ and Hofmann MC (2005). In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Journal of Toxicology Science*, 88: 412-419.
- Brown L and Pentland S (2007). Health infertility organization: Male infertility-improving sperm quality acubalance wellness. Center Ltd. Onwest 8th Ave. in Vancouver Bc. Canada.

- Brown NL, Bayle JD, Scanes CG and Follett BK (1975). The actions of avian LH and FSH on the testes of hypophysectomized quail. *Cell Tissue Research*, 156, 499.
- Chang GB, Liu XP, Chang H, Chen GH, Zhao WM, Ji DJ, Chen R, Qin YR, Shi XK and Hu GS (2006). Behavior differentiation between wild Japanese quail, domestic quail, and their first filial generation. *Poultry Science*, 88: 1137-1142.
- Croteau MN, Dybowska AD, Luoma SN and Valsami-Jones E (2011). A novel approach reveals that zinc oxide nanoparticles are bioavailable and toxic after dietary exposures. *Nanotoxicology*, 5:79-90.
- Dastjerdi R, and Montazer MA (2010). Review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. *Colloids and Surfaces. Biointerfaces*, 79: 5-18.
- Duncan DB (1955). Multiple ranges and multiple F test. *Biometrics*. 11: 1-42.
- Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, Kim BG, Park SJ, Kim HW, Lee KH, Park SB, Lee JK and Cho MH (2006). Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicological Science*, 89: 338-347.
- Lewis-Jones, DI, Aird IA, Biljan MM and Kingsland CR (1996). Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. *Human Reproduction*, 11: 2465-2467.
- Makhluf SBD, Abu-Mukh R, Rubinstein S, Gedanken A and Breitbart H (2006). Modified PVA-Fe₃O₄ Nanoparticles as a Protein Carrier into Sperm Cells. *Small*, 4: 1453-8
- Makhluf SBD, Arnon R, Patra CR, Mukhopadhyay D, Gedanken A, Mukherjee P and Breitbart H (2008). Labeling of Sperm Cells via the Spontaneous Penetration of Eu³⁺ Ions as Nanoparticles Complexed with PVA or PVP. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112: 12801–12807.
- Namra MM, AbdelWahed HM and Fayek HM (2009). Evaluation of different sources of dietary zinc supplementation for laying Japanese quail performance. *Egyptian Poultry Science*, 29: 127-143.
- NRC (1994). *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th ed. Natural Academic Press, Washington, DC.
- Ottinger M and Brinkely J H (1979). Testosterone and sex related physical characteristics during the maturation of the male Japanese quail. *Biology of Reproduction*, 20: 905-909.
- Ramsden JJ (2005). What is nanotechnology? *Nanotechnology Perceptions*, 1: 3-17.
- Surai PE, Blesbois E, Grasseau I, Chalah T, Brillard JP, Wishart GJ, Cerolini S and Sparks NHC (1998). Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120: 527-533.
- SAS (2003). *Statistics. User's Guide*, Version 9 ed., SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- Tian L, Jianyang J, Fenghua Z, Huiying R and Wenli L (2009). Effect of Nano zinc oxide on the production and dressing performance of broiler. *Chinese Agricultural science Bulletin*, 12: 6842-6850.
- Taylor U, Petersen S, Barchanski A, Mittag A, Barcikowski S and Rath D (2010). Influence of gold nanoparticles on vitality parameters of bovine spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 45: 60–60.
- Whittow GC (2000). *Sturkie's avian physiology*. 5th Edn. Academic Press, 335-367.
- Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H and Xia Z (2009). Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *Journal of Applied Toxicology*, 29: 69-78.
- Yoshida S, Hiyoshi K, Ichinose T, Takano H, Oshio S, Sugawara I, Takeda K and Shibamoto T (2008). Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice. *International Journal of Andrology*, 32: 337-342.
- Zdenka OK, Boisen AMZ, Jackson P, Wallin H, Vogel U and Hougaard KS (2013). Daily sperm production: Application in studies of prenatal exposure to nanoparticles in mice. *Reproductive toxicology*, 36: 88–97.