Archive of SID

Iranian Journal of Animal Science
Vol 49, No 4, Winter 2019 (495-504)
DOI: 10.22059/ijas.2019.266833.653662

علوم دامی ایران
دورهٔ ۴۹، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۷ (ص ۵۰۴-۴۹۵)

تأثیر تزریق داخل تخم مرغی نانوذرات عصاره هسته انگور بر تمایز جنسیت و ساختار گونادی در جوجه‌های گوشتی

زینب شهودی[۱]، مجید متقی طلب[۲*] و مصطفی گلشکن[۳]
۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۳. استادیار شیمی آلی، مجتمع فناوری‌های پیشرفته پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۱٤ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۳)

چکیده

پلی‌فنول‌های موجود در هسته انگور جز مهارکننده‌های قوی آروماتاز محسوب می‌شوند. در این مطالعه، عصاره هسته انگور به عنوان آنتی‌آروماتاز به تخم‌مرغ تزریق و اثرات آن بر تمایز جنسیت و ساختار گوناد جوجه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. هفتصد عدد تخم‌مرغ از سویه راس ۳۰۸ به ۷ تیمار شامل: تزریق سطوح ۳ (GSE_3+Zn) و ٤ میلی‌گرم (GSE_4+Zn) عصاره هسته انگور و روی، ۳($NGSE_3$+Zn) و ٤($NGSE_4$+Zn) میلی‌گرم نانوذرات عصاره هسته انگور و روی، ۰/۰۵ میلی‌گرم تاموکسیفن و روی (TOM+Zn)، ۰/۵ میلی‌لیتر نرمال سالین (PC) و تیمار بدون تزریق (NC)، اختصاص یافتند. تزریق در روز ۵ انکوباسیون و از قسمت باریک تخم‌مرغ انجام شد. جوجه‌های تولیدی به مدت ۵ هفته پرورش یافتند. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که در مقایسه با تیمارهای شاهد تزریق عصاره هسته انگور باعث افزایش معنی‌دار در درصد جنس نر شد (P<۰/۰۵). مقایسه تیمارهای مختلف حاکی از عدم تفاوت معنی‌داری در وزن یک روزگی و نیز صفات عملکردی (خوراک مصرفی، وزن بدن، افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل خوراک) بود. مطالعه ساختار گوناد در جوجه‌ها، حاکی از درجه قوی برگشتگی جنسی در جوجه‌های تیمار شده با سطوح ۳($NGSE_3$) و ٤(NGSE4) میلی‌گرم نانوذرات عصاره هسته انگور و روی بود. نتیجه‌گیری کلی حاکی از این است که عصاره هسته انگور به عنوان ترکیبی با خاصیت آنتی آروماتازی، قابلیت تولید درصد بیشتر جنس نر جوجه‌های گوشتی را دارد.

واژه‌های کلیدی: آنتی آروماتاز، برگشتگی جنسیت، تزریق درون تخم مرغی، جوجه گوشتی.

Effect of in-ovo injection of nanoparticles of grape seed extract on sex differentiation and gonadal structure in broiler chicks

Zeinab Shohoudi[1], Majid Mottaghitalab[2*] and Mostafa Golshekan[3]
1, 2. Former M.Sc. Student and Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture Science, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Assistant Professor of Organic Chemistry,Institute of Medical Advanced Technologies , Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
(Received: Oct. 6, 2018 - Accepted: Jan. 13, 2019)

ABSTRACT

Polyphenols content in the grape seed are considered as potent aromatase inhibitors. In this study, the grape seed extract was injected into the egg as an anti-aromatase and its effects on sex differentiation and gonadal structure in broiler chicks were investigated. A total of seven hundred eggs from Ross 308 were divided into 7 experiment groups. Treatments including: injection of 3(GSE_3) and 4(GSE_4) milligrams of grape seed extract and zinc, 3 ($NGSE_3$) and 4($NGSE_4$) milligrams of nanoparticle of grape seed extract and zinc, 0.05 mg tamoxifen and zinc (TOM+Zn), 0.5 ml normal saline (PC) and control with no injection (NC). Injection was performed on day 5 of incubation from the narrow side of egg. After hatch, chickens were reared for 5 weeks. Results showed that compared to controls, injection of grape seed extract caused significant increase in percentage of male chick(P<0.05). No significant differences were found in day old chick weights (P>0.05). Feed intake, body weight, body weight gain and feed conversion ratio appeared with no significant differences (P>0.05). The study of gonadal structure in chicks indicated a high degree of sexual reversal in chicken treated with 3($NGSE_3$) and 4($NGSE_4$) mg of nanoparticles of grape seed extract and zinc. Conclusion is that the grape seed extract has the potential to act as an anti-aromatase compound to produce higher percentage of male broiler chicks.

Keywords: Anti aromatase, broiler chicks, *In-Ovo* injection, sex reversal.

* Corresponding author E-mail: m_mottaghi@gstp.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تعیین جنسیت در پرندگان کروموزمی بوده و جنسیت ژنتیکی در زمان لقاح تعیین می‌شود. در جوجه‌ها، گونادهای هر دو جنس، در هفته اول رویانی تمایز نیافته‌اند. متعاقب آن، گوناد نر به بیضه، و گناد ماده به تخمدان تبدیل می‌شود (Ellegren, 2002). با وجود این، ژن‌های مشارکت‌کننده در تمایز گونادها، در مرحله رشد نیز فعال هستند. شواهد به‌دست‌آمده حاکی از آن است که پیش از تمایز جنسی گوناد، ژن‌های کنترل‌کننده تمایز جنسی، در بافت‌های دیگر نظیر مغز، فعال هستند (Zhang *et al.*, 2010)، که به عنوان نمونه می‌توان به بیان ژن هم شکلی جنسی در بلاستودرم جوجه‌ها، جنین‌های اولیه و مغز اولیه، پیش از تشکیل آلت تناسلی اشاره نمود (Ayers *et al.*, 2013). چنین شواهدی نشان می‌دهد که تمایز جنسی تا حدودی به "ژن‌های تمایز جنسیت" فعال در بخش‌های مختلف جنین و نه فقط غدد جنسی وابسته است (Arnold & Itoh, 2011). آروماتاز آنزیمی کلیدی برای سنتز هورمون‌های جنس ماده است که تبدیل آندروژن‌ها به استروژن‌ها را کاتالیز می‌کند (Simpson *et al.*, 2001). در پرندگان، تکامل گوناد نامتمایز به بیضه و یا تخمدان، به میزان فعالیت آنزیم آروماتاز بستگی دارد (Villapando *et al.*, 2000).

انگور (*Vitis vinifera*)، با تولید تقریبی سالانه ۶۱ میلیون تن از جمله بزرگترین محصولات میوه‌ای جهان است (Schieber *et al.*, 2002) پوسته و دانه انگور منبع غنی از فلاونوئیدهایی است که به عنوان مهارکننده‌های آنزیم آروماتاز عمل می‌کنند (Brenes *et al.*, 2008). عصاره هسته انگور شامل سطوح بالای دیمرهای پروسیانیدین است که جزء مهارکننده‌های قوی آروماتاز محسوب می‌شوند (Kijima *et al.*, 2006). رزواترول نیز از جمله پلی‌فنول‌های طبیعی است که در غلظت بالا در انگور و آب انگور قرمز تخمیر شده یافت می‌شود (Wong *et al.*, 2010). نانو ذرات دارای ویژگی‌های خاص شیمیایی و فیزیکی از نظر اندازه، شکل و نسبت بالای سطح به حجم می‌باشند. این مواد پس از تزریق به جانوران، به سرعت در اکثر اندام‌ها و بافت‌ها توزیع شده و پدیده جذب سلولی آن‌ها بسیار زیاد است (Salata, 2004). عنصر روی از جمله عناصر ضروری است که نقش‌های مهمی در فعالیت‌های متابولیکی ایفا می‌کند، که از جمله می‌توان به سنتز پروتئین، متابولیسم کربوهیدرات، تولید مثل، فعال‌سازی آنزیم و رشد بافت‌ها اشاره نمود. کمبود روی باعث تأخیر در رشد، از دست دادن اشتها، کاهش تولید تخم مرغ و عملکرد تولید مثلی، بروز مشکل در توسعه و رشد استخوان و پوست و نیز مرگ‌ومیر می‌شود (Durmus *et al.*, 2004).

با توجه به تأثیر مهارکننده‌های آروماتاز در افزایش درصد جنس نر در جوجه‌های گوشتی، و نیز اثرات اقتصادی ناشی از درصد جوجه‌های نر در پرورش جوجه های گوشتی، در پژوهش حاضر اثر تزریق درون تخم مرغی نانو ذرات عصاره هسته انگور به عنوان یک ترکیب با خاصیت آنتی‌آروماتازی، بر تمایز جنسیت و ساختار گونادی در جوجه‌های گوشتی، و مقایسه آن با تاموکسیفن به عنوان یک آنتی آروماتاز سنتتیک، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش

تهیه عصاره هیدروالکلی هسته انگور

هسته انگور (شاهانی قرمز) بعد از شستن و خشک کردن میوه، جدا و آسیاب شد. مقدار۳۰۰ گرم پودر هسته انگور به ۸۰۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس به مدت ۵ ساعت روی دستگاه استیرر با۷۰۰ دور در دقیقه قرار گرفته و متعاقبا با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر تا حلال فیلتر شده و با دستگاه تبخیر کننده چرخان، تبخیر، و عصاره خشک به‌دست آید. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در یخچال نگهداری شدند (Mohseni Kouchesfahani *et al.*, 2015).

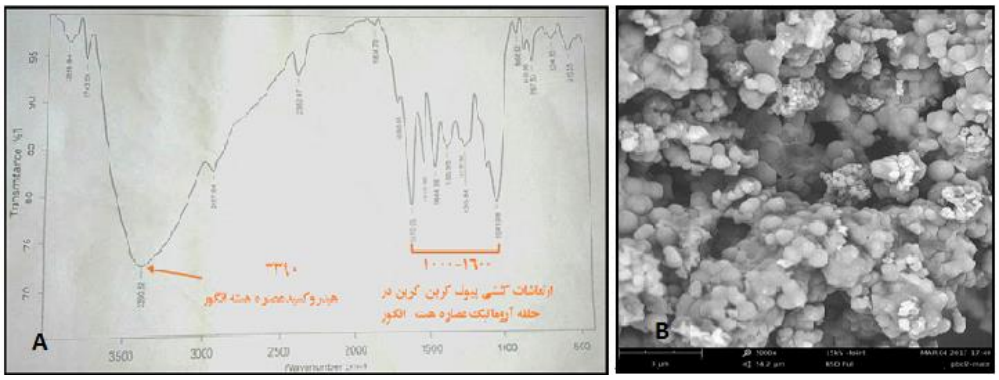
تهیه نانو کامپوزیت روی- عصاره هسته انگور

مقدار ۰/۱۲ گرم نانو ذرات روی با عدد اکسایش صفر تحت اتمسفر نیتروژن به آب با pH، ۸ در یک بالن سه دهانه اضافه و تحت همزدن شدید قرار گرفت. سپس ۴/۵ گرم عصاره هسته انگور که در آب با pH، ۸ حل

www.SID.ir

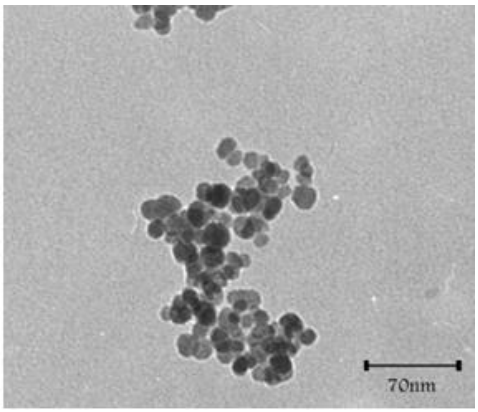
Archive of SID

شده بود، به صورت قطره قطره توسط قیف دکانتور به محیط واکنش اضافه شد. ساختار نانو کامپوزیت مذکور به صورت هسته/ پوسته بوده، که نانو ذرات روی به عنوان هسته و عصاره هسته انگور به عنوان گروه عاملی در سطح نانو ذرات قرار داده شد. جهت اتصال عصاره به نانو ذرات روی، سطح نانو ذرات با قلیایی کردن محیط دارای بار سطحی منفی شده و این امر سبب ایجاد جاذبه الکترواستاتیک و اتصال عصاره به نانوذرات روی شد. در مرحله بعد ساختار نانو کاتالیست‌های سنتز شده با استفاده از تکنیک‌های FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) [Japan, 470] و SEM (Scanning Electron Microscope)[Philips, Japan] بررسی شدند. بخش A شکل ۱، طیف FT-IR نانو کامپوزیت سنتز شده را نشان می‌دهد. پیک در ناحیه ۳۳۹۰nm مربوط به هیدروکسید عصاره هسته انگور و پیک در ناحیه ۱۶۰۰-۱۰۰۰nm مربوط به ارتعاشات کششی پیوند کربن-کربن در حلقه آروماتیک عصاره هسته انگور می‌باشند. همچنین بخش B شکل ۱ تصاویر حاصل از بررسی نانو کامپوزیت سنتز شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) را نشان می‌دهد که تجزیه و تحلیل تصاویر و مورفولوژی نانوذرات، نشان از انباشتگی ذرات بسیار ریز با ابعاد نانومتر داشت. اضافه می شود که جهت سنتز کامپوزیت روی-عصاره هسته انگور ابتدا نانو ذرات روی با ابعادی در حدود ۱۰-۸ نانو متر سنتز که برمبنای نتایج حاصل از TEM (transmission electron microscope) [CM10 HT 100KV] اندازه آن مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۲). نانو ذره آماده شده در گام بعد توسط عصاره هسته انگور عامل دار گردید. اگر در نظر بگیریم که اندازه نانو ذرات روی در حدود ۱۰-۸ نانومتر است، بنابراین نانو ذرات آماده شده در مطالعه حاضر بر استانداردهای مربوطه منطبق بوده و مورد تأیید می باشد.



شکل ۱. تصاویر FT-IR و SEM نانو کامپوزیت روی-عصاره هسته انگور

Figure 1. Images of FT-IR and SEM of nanocomposite of zinc-grape seed extract



شکل ۲. تصویر TEM نانو ذرات روی

Figure 2. TEM image of Zn nano particles

www.SID.ir

Archive of SID

تزریق داخل تخم مرغ و پرورش جوجه‌های تفریخ‌شده

۷۰۰ عدد تخم مرغ از سویه راس ۳۰۸ (با میانگین وزنی ۵/۰۸±۴۶/۰ گرم و سن گله مادر ۶۰ هفته)، به ۷ تیمار (هر تیمار شامل ۴ تکرار و ۲۵ عدد تخم مرغ در هر تکرار) در قالب طرح کاملاً تصادفی تقسیم شدند (جدول ۱). تخم مرغ‌ها در دستگاه جوجه‌کشی اتوماتیک با دمای متوسط ۳۷/۲°c و میانگین رطوبت ۷۰٪ قرار داده شدند. در روز پنجم جوجه‌کشی، ابتدا کلیه تخم مرغ‌ها کندلینگ شده و تخم مرغ‌های دارای جنین برای تزریق انتخاب شدند. تزریق در قسمت باریک تخم مرغ انجام شد. قبل از انجام تزریق، پوسته تخم مرغ به وسیله الکل اتیلیک ۷۰٪ ضدعفونی شد. پس از تزریق ۰/۵ میلی لیتر از محلول حاوی تیمار مورد نظر به تخم مرغ، منفذ ایجاد شده با پارافین مذاب مسدود و تخم مرغ‌ها به درون ماشین جوجه‌کشی برگشت داده شدند.

جدول ۱. نوع و سطح تزریق در تیمارهای مختلف

Table 1. Types and dose of injection in different treatments

Treatments	Type of injection	Dose of injection
PC	Normal saline	**0.5 mg**
GSE_3+Zn	grape seed extract and zinc	**3 mg**
GSE_4+Zn	grape seed extract and zinc	**4 mg**
$NGSE_3$+Zn	Nanoparticles of grape seed extract and zinc	**3 mg**
$NGSE_4$+Zn	Nanoparticles of grape seed extract and zinc	**4 mg**
TOM+Zn	Tamoxifen and zinc	**0.05 mg**
NC	No injections	-

پس از اتمام دوره جوجه‌کشی، جوجه‌ها به روش اختلاف رشد پر در بال تعیین جنسیت شدند. سپس به سالن پرورش انتقال یافته و با جیره‌های یکسان از نظر مواد مغذی و بر مبنای راهنمای سویه راس ۳۰۸ تغذیه شدند. وزن جوجه‌ها، خوراک مصرفی و ضریب تبدیل خوراک در پایان هر هفته به صورت جداگانه ثبت شد. در پایان نیز، چهار قطعه پرنده از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و ذبح شد. گنادهای خارج‌شده از بدن به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شدند و سپس به الکل اتیلیک ۹۰ درصد انتقال داده شدند، بعد از ۲ ساعت گوناد ها خارج و به الکل ۷۰ درصد انتقال داده شدند. آبگیری از بافت گوناد نیز با قرار دادن آن به مدت ۱ ساعت به ترتیب در الکل اتیلیک ۸۰، ۹۰ و ۹۶ درصد انجام شد. سپس برای شفاف کردن بافت‌ها، نمونه‌های بافتی دو بار و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه در محلول گزیلول قرار داده شدند. برای پارافینه کردن بافت‌ها هم نمونه‌های بافتی دوبار و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه در پارافین مذاب قرار داده شدند تا پارافین به داخل بافت‌ها نفوذ کند و بافت‌ها نرم و قابل انعطاف شوند. برای قالب‌گیری بافت‌ها هم، پارافین ذوب شده طوری در قالب ریخته شد که یک ورقه نازک در کف ظرف تشکیل شود. سپس باقیمانده پارافین مذاب در قالب وارد و بافت به آهستگی بوسیله پنس گرم به آن منتقل شد. تهیه برش‌های بافتی از گنادها، با استفاده از دستگاه میکروتوم (با ضخامت ۷ میکرون) انجام شد. برای رنگ‌آمیزی نیز از رنگ‌های ائوزین و هماتوکسیلین استفاده شد و سپس برای مشاهده تغییرات، نمونه‌های برش یافته با میکروسکوپ نوری (Leica DM500) با بزرگنمایی ۴۰ مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز آماری با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS انجام شد. مقایسه میانگین صفات نیز بر اساس آزمون دانکن (سطح احتمال ۵٪) انجام گرفت.

نتایج و بحث

تأثیر عصاره هسته انگور بر درصد جوجه درآوری، وزن یک روزگی و درصد جنس نر

بر اساس نتایج این تحقیق، تیمار NC بیشترین درصد جوجه درآوری و تیمار $NGSE_4$+Zn کمترین درصد جوجه درآوری را داشته و تفاوت بین آنها معنی‌دار بود (جدول ۲). یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر با نتایج حاصل از پژوهش Mottaghitalab & Valizade (2002)، که با تزریق عصاره سیر، کاهش در درصد جوجه درآوری را گزارش کردند، همسو است. اگرچه پژوهش دیگری توسط Fazli *et al.* (2015) انجام شده است و تزریق تأثیری در میزان جوجه درآوری نداشته است. همچنین در وزن یک روزگی در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری به‌دست نیامده که با نتایج گزارش شده توسط Aslani (2011)، Mafi (2010)، Fazli *et al.* (2015) و Burke & Henry (1999)

www.SID.ir

Archive of SID

مطابقت دارد. در پژوهش حاضر، تیمار TOM+ Zn و تیمار NC بترتیب منجر به تولید بیشترین و کمترین درصد جنس نر شدند. بعلاوه مقایسه سطح ۳ میلی‌گرم (GSE_3+Zn) نسبت به ۴ میلی‌گرم (GSE_4+Zn) عصاره هسته انگور و روی، سبب تولید درصد بالاتر جنس نر شد (۶۱/۷۳٪ در مقابل ۵۴/۳۹۸٪). برعکس، مقایسه بین سطوح ۳ ($NGSE_3$+Zn) و ۴ ($NGSE_4$+Zn) میلی‌گرم از نانوذرات عصاره هسته انگور و روی نشان داد که تیمار با سطح بالاتر، منتج به درصد بیشتر جنس نر شده است (جدول ۲).

جدول ۲. مقایسه درصد جوجه‌درآوری، وزن یک روزگی و درصد جنس نر در تیمارهای مختلف

Table 2. Comparison of hatchability, 1-day weight and male (%) in different treatments

Treatments	Hatchability (%)	1-day weight (g)	Male (%)
PC	88^{ab}	46.25	**53.05^{d}**
GSE_3+Zn	73^{bc}	46.97	**61.73^{ab}**
GSE_4+Zn	81^{ab}	46.84	**54.40^{cd}**
$NGSE_3$+Zn	74^{bc}	46.63	**58.37^{bc}**
$NGSE_4$+Zn	62^{c}	47.22	**60.18^{ab}**
TOM+Zn	81^{ab}	46.62	**64.58^{a}**
NC	95^{a}	45.30	**50.66^{d}**
SEM	2.59	0.25	**1.05**
P-value	0.01	0.49	**0.0001**

* حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

* The different letters in each column indicate a significant difference of 5%.

عوامل مختلفی مانند نوع و سطح ماده تزریقی، زمان و شرایط تزریق بر درصد جوجه‌های نر تولیدی مؤثرند. هرچه زمان تزریق به شروع فعالیت آنزیم آروماتاز نزدیکتر باشد، تأثیر ممانعت کننده آروماتاز بیشتر است. در اغلب تحقیقات زمان تزریق، روز ۵ انکوباسیون بود (Abinawanto *et al.*, 1996; Fazli *et al.*, 2015; Mottaghitalab & Valizade, 2002). شرایط تزریق نیز در میزان برگشتگی جنسی مؤثر است. در مطالعه‌ای در اثر تزریق ۱ گرم عصاره سیر، منجر به تولید ۷۲٪جوجه نر شد (Mottaghitalab & Valizade, 2002). اما تزریق ۰/۱ میلی‌گرم عصاره سیر منتج به افزایش جنس نر به ۸۰/۴۳٪ گردید (Mottaghitalab *et al.*, 2009). تاموکسیفن موجب مهار تولید و یا آزادسازی فاکتورهای رشد سلولی و القای آپوپتوزیس شده و استفاده از آن به عنوان مهار کننده آروماتاز جهت درمان بیماری سرطان سینه کاربرد فراوانی دارد (Burstein *et al.*, 2014; Dowsett *et al.*, 2015). در پژوهش حاضر، بیشترین درصد جنس نر مربوط به تیمار TOM+Zn بوده (۶۴/۵۸٪) که تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد داشت. در مطالعه‌ای، تزریق ۱ میلی‌گرم تاموکسیفن، منتج به ۸۴٪ برگشتگی جنسی شد (Mottaghitalab & Valizade, 2002). اما در آزمایشی دیگر، تزریق ۰/۱ میلی‌گرم آن سبب ایجاد ۶۱/۳۴٪ برگشتگی جنسی شد (Mottaghitalab *et al.*, 2009).

خوراک مصرفی، وزن بدن، افزایش وزن روزانه بدن و ضریب تبدیل خوراک

در شرایط انجام تحقیق حاضر، تفاوت معنی‌داری از نظر میزان خوراک مصرفی، وزن بدن، افزایش وزن روزانه بدن و ضریب تبدیل خوراک در تیمارهای مختلف در هفته‌های مختلف پرورش به‌دست نیامد (جدول‌های ۴، ۵، ۶ و ۷). نتایج تحقیق دیگری که در آن از تزریق درون تخم مرغی عصاره سیر، گوجه فرنگی و تاموکسیفن استفاده شد، منطبق با یافته های حاضر، میزان خوراک مصرفی، افزایش وزن روزانه، وزن نهایی و ضریب تبدیل خوراک در پایان دوره (روز ۴۲) تفاوت معنی‌داری نداشتند (Fazli *et al.*, 2015). اما در پژوهش‌های انجام شده توسط Mafi (2010) و Aslani (2011) که ضریب تبدیل خوراک را بین تیمارهای مختلف در دوره‌های آغازین، رشد، پایانی و کل دوره مورد ارزیابی قرار دادند، ضریب تبدیل خوراک در تیمارهای مختلف، متفاوت گزارش شد. در پژوهش انجام شده توسط Mafi (2010) ضریب تبدیل خوراک در گروه جوجه‌های تیمارشده با ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره ریشه گزنه سیاه در کل دوره به طور معنی‌داری کمتر از تیمارهای شاهد بود. اما این مقدار از لحاظ آماری با گروه جوجه‌های تیمارشده با ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره ریشه گزنه سیاه معنی‌دار نبود. Aslani (2011) نیز در پژوهش خود گزارش کرد که تنها در دوره آغازین میزان ضریب تبدیل خوراک در جوجه‌های تیمارشده با عصاره چای سیاه کمتر از گروه شاهد بود.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. مقایسه میزان خوراک مصرفی تیمارهای آزمایشی در هفته‌های مختلف پرورش (گرم)
Table 3. Comparison of feed intake of experimental treatments in different breeding weeks (g)

Treatments	1-week	2-week	3-week	4-week	5-week
PC	152.23	350.36	635.20	1042.69	**1166.00**
GSE_3+Zn	152.01	354.20	635.63	1042.85	**1171.75**
GSE_4+Zn	155.15	329.23	677.80	1089.43	**1138.25**
$NGSE_3$+Zn	158.28	344.65	717.03	1065.50	**1250.50**
$NGSE_4$+Zn	147.62	345.48	662.90	1098.66	**1261.25**
TOM+Zn	154.16	355.73	702.60	1073.50	**1285.84**
NC	155.86	354.44	672.44	989.04	**1210.00**
SEM	2.04	5.03	12.25	12.58	**19.61**
P-value	0.8934	0.8373	0.4994	0.5195	**0.3379**

جدول ۴. مقایسه وزن بدن تیمارهای آزمایشی در هفته‌های مختلف پرورش (گرم)
Table 4. Comparison of body weight of experimental treatments in different breeding weeks (g)

Treatments	1-week	2-week	3-week	4-week	5-week
PC	155.08	366.12	749.56	1234.20	**1691.40**
GSE_3+Zn	153.10	362.19	741.28	1191.81	**1695.07**
GSE_4+Zn	151.79	345.96	718.42	1175.21	**1623.66**
$NGSE_3$+Zn	152.84	355.39	721.95	1174.69	**1649.18**
$NGSE_4$+Zn	147.03	338.84	717.81	1184.38	**1624.26**
TOM+Zn	152.91	368.74	763.08	1211.00	**1725.04**
NC	154.85	368.42	744.30	1202.19	**1729.55**
SEM	1.20	4.09	6.81	10.45	**13.61**
P-value	0.6545	0.3216	0.4251	0.6145	**0.1531**

جدول ۵. مقایسه میزان افزایش وزن روزانه بدن تیمارهای آزمایشی در هفته‌های مختلف پرورش
Table 5. Comparison of daily body weight gain in experimental Treatments in different weeks of breeding

Treatments	1-week	2-week	3-week	4-week	5-week
PC	15.25	30.15	54.78	69.24	**65.31**
GSE_3+Zn	15.16	29.87	54.16	64.36	**71.90**
GSE_4+Zn	14.99	27.74	52.58	63.26	**68.45**
$NGSE_3$+Zn	15.17	28.93	52.37	64.68	**67.79**
$NGSE_4$+Zn	14.26	27.40	52.92	63.09	**71.36**
TOM+Zn	15.27	30.41	56.34	63.99	**73.43**
NC	15.70	30.51	53.70	65.41	**69.68**
SEM	0.17	0.46	0.54	0.92	**1.08**
P-value	0.4647	0.3458	0.5502	0.6343	**0.5542**

جدول ۶. مقایسه ضریب تبدیل خوراک تیمارهای آزمایشی در هفته‌های مختلف پرورش
Table 6. Comparison of feed conversion ratio of experimental treatments in different weeks of breeding

Treatments	1-week	2-week	3-week	4-week	5-week
PC	1.43	1.66	1.69	2.22	**2.88**
GSE_3+Zn	1.44	1.72	1.71	2.35	**2.38**
GSE_4+Zn	1.48	1.69	1.92	2.51	**2.42**
$NGSE_3$+Zn	1.50	1.70	1.97	2.55	**2.65**
$NGSE_4$+Zn	1.49	1.82	1.96	2.55	**2.61**
TOM+Zn	1.44	1.66	1.79	2.42	**2.53**
NC	1.42	1.67	1.82	2.19	**2.33**
SEM	0.02	0.02	0.04	0.05	**0.09**
P-value	0.9040	0.4165	0.3802	0.1785	**0.7028**

تأثیر عصاره هسته انگور بر ساختار گنادی جوجه‌ها

همزمان با فعالیت آنزیم‌های استروئیدوژنیک و هورمونهای جنسی، گنادهای نامتمایز جنینی در جوجه‌های نر ژنتیکی به بیضه و در جوجه‌های ماده ژنتیکی به تخمدان متمایز می‌شوند. در شرایط طبیعی، تمایز گونادهای نامتمایز در جوجه‌های ماده منجر به تبدیل گوناد چپ به تخمدان چپ شده، گوناد راست تحلیل رفته و مجرای مولر سمت چپ به اویداکت تبدیل می‌شود، اما تنها بخش عقبی مجرای مولر سمت راست حفظ می‌شود. در جوجه‌های نر هم هر دو گوناد به بیضه تبدیل می‌شوند. حال آنکه در اثر استفاده از مهارکننده‌های آروماتاز، قبل از تمایز گونادی جنین، بر حسب قدرت مهارکنندگی، در جوجه‌های ماده ژنتیکی سه درجه از برگشتگی جنسی دیده می‌شود که شامل: ۱- درجه برگشتگی جنسی ضعیف که گناد راست حفظ و به بیضه تبدیل می‌شود، اما اندازه آن کوچک‌تر از حالت معمول بوده و گوناد چپ به تخمدانی کوچک با سطحی صاف تمایز می‌یابد. ۲- درجه برگشتگی جنسی متوسط که گوناد راست حفظ و به بیضه‌ای کوچک تبدیل شده و گناد چپ به یک تخمدان- بیضه‌ای متمایز می‌شود و ۳- درجه برگشتگی جنسی قوی که گوناد راست حفظ و به

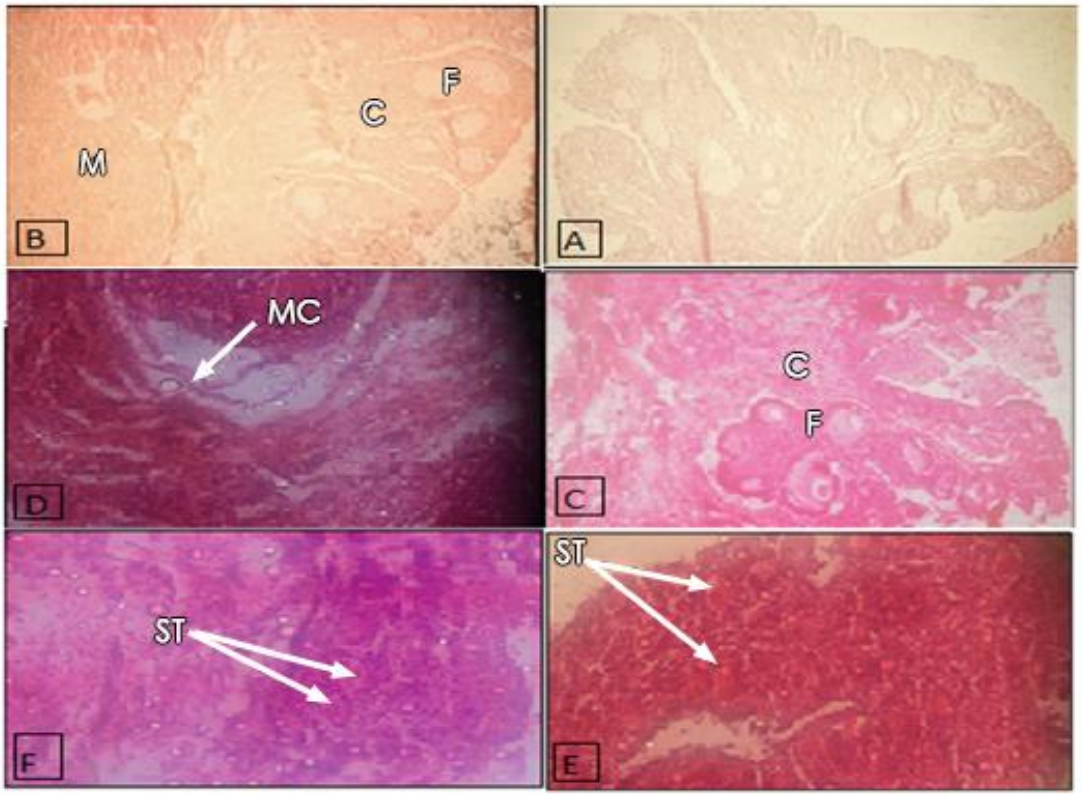
www.SID.ir

Archive of SID

بیضه‌ای کوچک تبدیل شده در حالیکه گوناد چپ به یک بیضه متمایز می‌شود که نسبت به بیضه‌های طبیعی کوچک‌تر اما نسبت به بیضه سمت راست خودش بزرگتر بوده و سطحش نسبتاً صاف است (Vaillant *et al*., 2001).

در پژوهش حاضر درجه قوی از برگشتگی جنسی در تیمارهای $NGSE_4$+Zn و $NGSE_3$+Zn مشاهده شد. Mottaghitalab & Valizade (2002) درجات ضعیف و میانی از برگشتگی جنسی گزارش کردند، در حالی که Burke & Henry (1999) درجات مختلفی از برگشتی جنسی را گزارش کردند. نتایج پژوهش دیگری که توسط Mottaghitalab *et al*. (2009) انجام شد، تولید نرهایی با ژنوتیپ ماده را آشکار نمود که دارای بیضه‌های دوطرفه (درجه قوی برگشتگی جنسی) بودند.

نتایج مربوط به مطالعات بافت شناسی تخمدان در شکل ۳ آمده است. در بخش‌های A و B ساختار خوشه‌ای و بخش‌های مختلف بافت تخمدان (شامل کورتکس، مدولا و فولیکول) مشخص شده است. در بخش C در اثر تزریق ۳mg عصاره هسته انگور و روی (GSE_3+Zn)، تحلیل نسبی در بافت پیوندی کورتکس و کاهش در شمار فولیکول‌ها ایجاد شده است. همچنین در تیمار GSE_3+Zn (بخش D)، تحلیل طناب‌های مدولاری مانع از تکامل طبیعی تخمدان شد. در تیمار GSE_3+Zn و TOM+Zn نیز، در نمونه‌های تخمدانی، لوله‌های سمینی‌فر مشاهده شد (بخش E و F). در شکل ۴ نیز تصاویر مربوط بافت‌شناسی بیضه آورده شده است. در بخش‌های A و B بافت بیضه‌ای تیمارهای شاهد نشان داده شده است. در بافت بیضه متعلق به مرغ‌های جنس برگشته در تیمار $NGSE_4$+Zn و $NGSE_3$+Zn (بخش C و D)، لوله‌های اسپرم ساز نرمال و تحلیل یافته مشاهده شد.



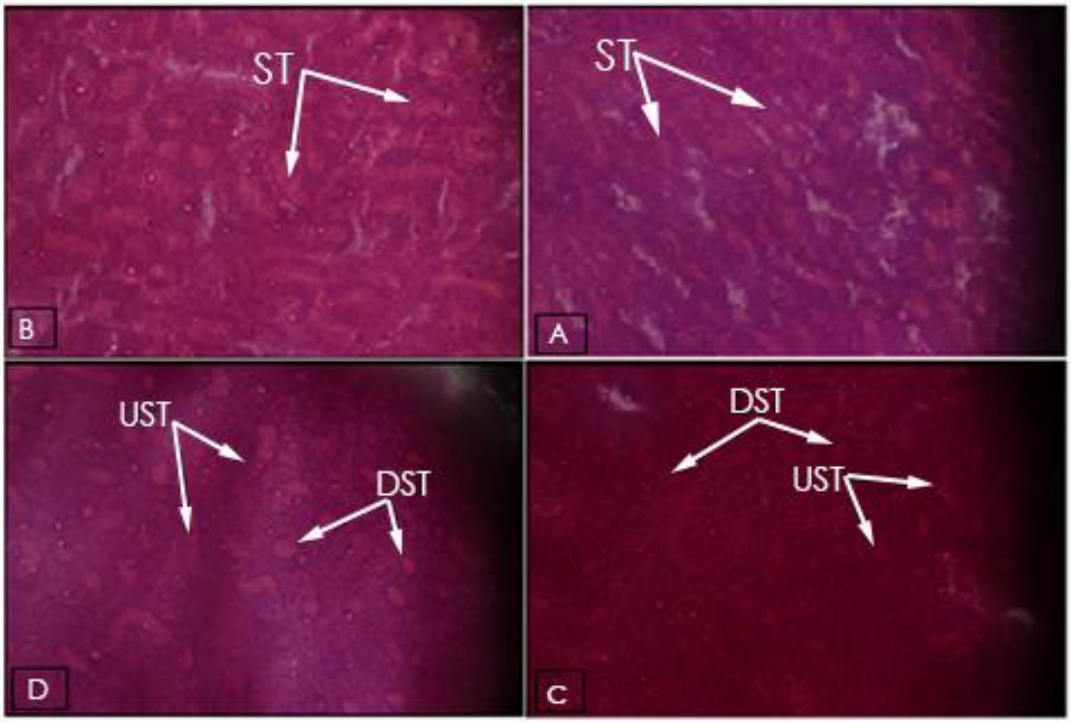
شکل ۳. ساختار بافت تخمدان در تیمارهای آزمایشی

Figure 3. Ovarian tissue structure in experimental treatments

A: تیمار PC و ساختار خوشه‌ای بافت تخمدان. B: تیمار NC و بخش‌های مختلف در بافت تخمدان Follicle(F), Medula(M), Cortex(C)، C: بافت تخمدانی تیمار GSE_3+Zn :Cortex(C), Follicle(F)، D: بافت تخمدانی تیمار GSE_3+Zn :Medulary Cords(MC)، E: بافت تخمدانی تیمار GSE_3+Zn :Seminiferous Tubules (ST)، F: بافت تخمدانی تیمار TOM+Zn :Seminiferous Tubules (ST).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴. ساختار بافت بیضه در تیمارهای آزمایشی

Figure 4. Testicle tissue structure in experimental treatments

A: بافت بیضه‌ای تیمار Seminiferous Tubules (ST)PC، B: بافت بیضه‌ای تیمار Seminiferous Tubules (ST)NC، C: بافت بیضه‌ای تیمار Degenerating Seminiferous Tubules (DST), Unaltered Seminiferous Tubules (UST)، D: بافت بیضه‌ای تیمار Degenerating Seminiferous Tubules (DST), Unaltered Seminiferous Tubules (UST): $NGSE_3$+Zn

بررسی‌های بافت شناسی نشان می‌دهد که در حالت طبیعی تمایز بیضه‌ها به‌واسطه تشکیل طناب‌های بیضوی، اپیتلیوم سرتولینی و آلبوژین است. درحالی‌که تمایز تخمدان‌ها به‌واسطه رشد و توسعه کورتکس و مدولا، مملو شدن مدولا از طناب‌های نازک، ایجاد شکاف در زیر کورتکس و نیز در درون کورتکس است (Vaillant *et al.*, 2001). درجه تغییر در تخمدان و بیضه و تحلیل اویداکت، بهترین شاخص مستقیم برای تخمین درجه برگشتگی جنسی است. نرشدگی جوجه‌های ماده جنس برگشته شامل تغییر در طناب‌های بیضوی و آلبوژین در دو گوناد و عدم توسعه کورتکس تخمدان در گوناد چپ است (Hudson *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). نتایج یک پژوهش نشان داد که در اثر استفاده از فدرازول تمایز گوناد های ماده ژنتیکی به صورت تحلیل ناقص بافت کورتکس، ضخیم شدن اپیتلیوم فضای تخمدانی، تمایز اپیتلیوم تخمدانی به اپیتلیوم سرتولی و تمایز طناب‌های بیضوی از لاکونای تخمدانی ظاهر شد (Vaillant *et al.*, 2001). همچنین، با تزریق آنتی‌آروماتاز ۱-متیل آندرواستندیون، تخمدان جنس برگشته‌ای گزارش شد که کورتکس آن کاهش یافته و به جای آن لایه اپیتلیوم سطحی به داخل طناب‌های مدولاری امتداد یافته بود. همچنین بعضی از طناب‌های مدولاری توخالی شده، سلول‌های جنسی در میان ساختارهای مدولاری احاطه شده بودند (Wartenberg *et al.*, 1992)، که با نتایج به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر تطابق دارد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر تزریق ۳ میلی‌گرم (GSE_3) یا ۴ میلی‌گرم ($NGSE_4$) نانو ذرات عصاره هسته انگور منجر به بروز آثار آنتی آروماتازی شده، و مطالعه ساختار گونادی طیور جنس برگشته، حاکی از درجه قوی برگشتگی جنسی در تیمارهای فوق و معنی‌دار با تیمارهای شاهد مثبت و منفی بوده، درحالی‌که هیچگونه آثار منفی و تفاوت معنی‌دار در صفات عملکردی جوجه‌های تولیدی مشاهده نگردید.

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES

1. Abinawanto, K., Shimada, K., Yoshida, V. & Saito, N. (1996). Effects of Aromatase Inhibitor on Sex Differentiation and Levels of p45017a and p450arom Messenger Ribonucleic Acid of Gonads in Chicken Emryos. *General and Comparative Endocrinology*, 102, 241-246.
2. Arnold, A. P. & Itoh, Y. (2011). Factors Causing Sex Differences in Birds. *Avian Biology Research*, 4(2).
3. Aslani, M. (2011). The effect of black tea extracts on sexual differentiation of broiler chicks. Master's Thesis. Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan. (in Farsi)
4. Ayers, K. L., Davidson, N. M., Demiyah, D., Roeszler, K. N. & Grutzner, F. (2013). RNA Sequencing Reveals Sexually Dimorphic Gene Expression before Gonadal Differentiation in Chicken and Allows Comprehensive Annotation of the W Chromosome. *Genome Biology*, 14, 26.
5. Brenes, A., Viveros, A., Gon, I., Centeno, C., Sayago-Ayerdy, S. G., Arija, I. & Saura-Calixto, F. (2008). Effect of Grape Pomace Concentrate and Vitamin E on Digestibility of Polyphenols and Antioxidant Activity in Chickens. *Poultry Science*, 87, 307-316.
6. Burke, W. & Henry, M. (1999). Gonadal Development and Growth of Chickens and Turkeys Hatched from Eggs Injected with an Aromatase Inhibitor. *Poultry Science*, 78, 1019-1033.
7. Burstein, H. J., Temin, S., Anderson, H., Buchholz, T. A., Davidson, N. E. & Gelmon, K. E. (2014). Adjuvant Endocrine Therapy for Women with Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. *American Society of Clinical Oncology*, 32(21), 2255-2269.
8. Dowsett, M., Forbes, J. F., Bradley, R., Ingle, J., Aihara, T. & Bliss, J. (2015). Aromatase Inhibitors versus Tamoxifen in Early Breast Cancer: Patient-Level Meta-Analysis of the Randomised Trials. *American Society of Clinical Oncology*, 386(10001), 1341-1352.
9. Durmus, I., Atasoglu, C., Mizrak, C., Ertas, S. & Kaya, M. (2004). Effect of increasing zinc concentration in the diets of brown parent stock layers on various production and hatchability traits. *Arch. Tierz. Dummerstorf*, 47(5), 483-489.
10. Ellegren, H. (2002). Evolution of the Avian Sex Chromosomes and Their Role in Sex Determination. *Trends in Ecology and Evolution*, 15, 188-192.
11. Fazli, N., Hassanabadi, A., Mottaghitalab, M. & Hajati, H. (2015). Manipulation of Broiler Chickens Sex Differetiation by In Ovo Injection of Aromatase Inhibitors, and Garlic and Tomato Extracts. *Poultry Science*, 94, 2778-2783.
12. Hudson Q. J., Smith, C. A. & Sinclair, A. H. (2005). Aromatase Inhibition Reduces Expression of FOXL2 in the Embryonic Chicken Ovary. *Dev Dyn*, 233, 1052-1055.
13. Kijima, L., Phung, S., Hur, G. & Kwok, S. (2006). Grape Seed Extract Is an Aromatase Inhibitor and a Suppressor of Aromatase Expression. *Cancer Res*, 66(11), 5960-5967.
14. Mafi, M. (2010). *Manipulation of the sexual difference of broiler chickens using in-ovo injection of black noodle extracts*. M.Sc. thesis. Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan. (in Farsi)
15. Mohseni Kouchesfahani, H., Parivar, K. & Salmabadi, Z. (2015). Effect of Hydroalcoholic Grape Seed Extract (*Vitis vinifera* L.) on Polycystic Ovarian Syndrome in Female Wistar Rat. *Journal of Cell & Tissue*, 6(2), 143-151. (in Farsi)
16. Mottaghitalab, M. & Valizade, E. (2002). Garlic Extraction and Aromatase Interaction on Sex Differension in Chicks. In: Proceedings of *WPSA Spring Meeting*. York, UK. 9-10 April.
17. Mottaghitalab, M., Fazli, N. & Hassan Abadi, A. (2009). In-Ovo Injection Technology: Effects of Different Aromatase Inhibitors on Sex Differentiation. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 6(1), 20-72.
18. Salata, O. V. (2004). Applications of Nanoparticles in Biology and Medicine. *Journal of Nano Biotechnology*, 2, 3.
19. Schieber, A., Stintzing, F. C. & Carle, R. (2002). By-Products of Plant Food Processing as a Source of Functional Compounds-Recent Developments. *Trends Food Science. Technol*, 12, 401-413.
20. Simpson, E., Micheal, D. M., Agarwal, V. R., Hinshelwood, M. M., Bulun, S. E. & Zhao, Y. (2001). *Cytochromes p450 11: Expression of the CYP19 (Aromatase) Gene: An Unusuall Case of Alternative Promoter Usage*. Tissue cell.
21. Vaillant, S., Dorizzi, M., Pieau, C. & Richard, N. (2001). Sex Reversal and Aromatase in Chicken. *Journal of Experimental Zoology*, 290, 727-740.
22. Villapando, I., Sanchez, G., Sanchez, I., Pedernera, E. & Villafan, H. (2000). The P450 Aromatase Gene is Asymmetrically Expressed in a Critical Period for Gonadal Sexual Differentiation in the Chick. *Gen Comp Endocrinol*, 117, 325-334.
23. Wang, M. L., Suo, X., Gu, J. H., Zhang, W. W., Fang, Q. & Wang, X. (2008). Influence of Grape Seed Proanthocyanidin Extract in Broiler Chickens: Effect on Chicken Coccidiosis and Antioxidant Status. *Poultry Science Association Inc*, 2273-2280.

www.SID.ir

Archive of SID

24. Wartenberg, H., Lenz, H. & Schweikert, H. U. (1992). Sexual Differentiation and the Germ Cell in Sex Reversed Gonads after Aromatase Inhibition in the Chicken Embryo. *Journal of Poultry Science*, 24(1), 1-6.
25. Wong, D., Villanueva, J., Cress, A. & Duleba, A. (2010). Effects of Resveratrol on Proliferationand Apoptosis in Rat Ovarian Theca-Interstitial Cells. *Molecular Human Reproduction*, 16(4), 251-259.
26. Zhang, S. O., Mathur, S., Hattem, G., Tassy, O. & Pourquie, O. (2010). Sex-Dimorphic Gene Expression and Ineffective Dosage Compensation of Z-Linked Genes in Gastrulating Chicken Embryos. *BMC Genomics*, 11, 13.

www.SID.ir