نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۰۸، پاییز ۱۳۹٤
ص‌ص: ۱٦۹~۱۸۰

تعیین اثرات تزریق ماده لاکتوفرین در تخم مرغ مادران نژاد تخم‌گذار قبل از جوجه‌کشی، بر استحکام و ویژگی‌های بافتی استخوان ساق پا و عملکرد پس از هچ

- **علی اصغر ساکی** (نویسنده مسئول)

استاد گروه علوم دامی ، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان.

- **همایون محمودی**

دانشجوی دکتری تغذیه طیور دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان.

- **امیر اسکندرلو**

دانشیار گروه آموزشی رادیولوژی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی.

- **میلاد منافی**

استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر.

تاریخ دریافت : آذر ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش : دی ۱۳۹۳

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۸۳۱۳۹۷۷۵

Email: dralisaki@yahoo.com

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثر ماده لاکتوفرین بر استحکام، ویژگی‌های بافتی استخوان ساق پا و عملکرد در مرغ‌های تخم‌گذار طراحی شده است. مجموعا تعداد ۱۰۸۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار مرغ مادر نژاد تخم‌گذار به ٤ تیمار با ۳ تکرار، در هر تکرار۹۰ تخم مرغ، اختصاص داده شدند. تخم مرغ‌های تیمار شاهد، تنها با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سدیم کلراید ۰/۹ درصد تزریق شدند. تیمارهای ۲، ۳ و ٤ به ترتیب با ۲۲/۵ (کم)، ٤۵ (متوسط) و ٦۷/۵ (زیاد) میکروگرم از لاکتوفرین حل شده در ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سدیم کلراید ۰/۹ درصد، تزریق گردیدند. تخم مرغ‌ها در دستگاه جوجه‌کشی قرار گرفتند و سپس جوجه‌های سالم تا پایان ۲۸ هفتگی نگهداری شدند. در این مطالعه، وزن استخوان ساق پای جوجه‌های یک روزه در همه تیمارهای لاکتوفرین بصورت عددی از شاهد بیشتر بود ($p>۰/۰۵$). در مطالعه حاضر، استحکام بیشتر استخوان‌ها در مرغ‌های ۲۸ هفته در تیمارهای لاکتوفرین، صرفا بازتاب ضخامت بیشتر استخوان قشری بوده و تحت تاثیر تحلیل استخوان از سطح داخلی کانال‌های هاورس قرار ندارد. وزن تخم مرغ پرندگان تیمار غلظت زیاد لاکتوفرین نیز به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) از تیمار شاهد بهتر بود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که ضخامت استخوان قشری ساق پا می‌تواند یک متغیر مناسب بیان کننده وضعیت استحکام استخوان‌ها باشد. این مطالعه همچنین نشان می‌دهد که بین ضخامت استخوان قشری ساق پا و استحکام استخوان، یک همبستگی متوسط ($p<۰/۰۱$، $r = ۰/٤۹$) وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: تزریق داخل تخم مرغ، لاکتوفرین، مرغ تخم گذار، ویژگی‌های استخوان ساق پا.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 108 pp: 169-180

Effect determination of in ovo injection of bovine lactoferrin before incubation in layer breeder eggs on strength and tissue characteristics of tibia and performance after hatch

A. A. Saki[1,*], Professor of Animal Science; H. Mahmoudi[2], Ph. D student of poultry nutrition; A. Eskandarloo[3], Associate Professor of Oral and Maxillofacial Radiology; M. Manafi[4], Assistant Professor of Animal Science. [1,2]Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, [3]School of Dentistry, Hamadan University of Medical Sciences; [4]Faculty of Agriculture, Malayer University.
[*]Corresponding Author, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, IRAN, +98 09183139775; Dept. Tel. +98 811 4424195; Dept. Fax: 98 811 4424090; Email: dralisaki@yahoo.com, asaki@basu.ac.ir

Received: Novembar 2014 **Accepted: January 2015**

This study was designed to survey lactoferin effect (LF) on strength, tissue characteristics of tibia and performance in laying hens. A total of 1080 layer -breeder fertile eggs were divided into four treatments with 3 replicates, each treatment comprising 90 eggs; control treatment was injected with 100 µL of normal saline per egg; 2, 3 and 4 treatments including 22.5 (low), 45 (medium), and 67.5 (high) µg of LF in 100 µL of normal saline per egg respectively. Eggs were incubated, then healthy chicks were reared to 28 wk of age. In this study, tibia weight, at hatch, was numerically better in eggs injected with LF than the control ($p>0.05$). Further strength in the bones of LF treatments, is merely reflection of difference in the tibia cortical thickness and is not related to bone atrophy in the intra diameter of haversian canals. Egg weights from hens treated with high concentration of LF were also significantly greater than the control ($p<0.05$). The results of the present study show that tibia cortical thickness could be a suitable variable for evaluating bone status. The present study also shows that there is a middle correlation ($r =0.49$, $p<0.01$) between the tibia cortical thickness and the bone strength.

Key words: *In ovo* injection, Lactoferrin, Laying hens, Tibia characteristics

مقدمه

لاکتوفرین گلیکوپروتئینی از خانواده ترانسفرین بوده که تمایل به اتصال با آهن، نه در شکل هم، را داشته و در خون، شیر، ترشحات برون‌ریز بدن مثل ترشحات بینی، شیره پانکراس، اشک، ترشحات واژنی، ترشحات غدد ضمیمه و گرانول‌های نوتروفیل‌ها دیده می‌شود (Baker و همکاران، ۱۹۹۱). اثر این گلیکوپروتئین به‌عنوان یک عامل چند وظیفه‌ای در رشد و تمایز سلول‌ها، نمو جنینی، فعالیت ضد باکتریایی و تنظیم‌کننده فعالیت سیستم ایمنی نیز مورد تائید قرار گرفته است. اثر لاکتوفرین به عنوان عاملی که رشد استخوان‌ها را بهبود می‌دهد، همچنین گزارش شده است (Brock، ۲۰۰۲؛ Malet و همکاران، ۲۰۱۱). این گلیکوپروتئین تقسیم استئوبلاست‌ها را تحریک نموده، مرگ برنامه‌ریزی شده آن‌ها را به اندازه ۵۰ تا ۷۰ درصد حالت طبیعی خود کاهش داده و از طرفی ورود تیمیدین به این دسته از سلول‌ها را نیز افزایش می‌دهد. این روند در سلول‌های کندروسیت نیز گزارش شده است (Cornish و همکاران، ۲۰۰۴). در مقابل، لاکتوفرین فعالیت استئوکلاست‌ها را کاهش داده یا حتی می‌تواند آن را باز دارد که به میزان لاکتوفرین به‌کار رفته بستگی دارد (Lorget و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین لاکتوفرین به پایدار شدن بافت استخوانی کمک می‌کند. اغلب تحقیقات در مورد لاکتوفرین در شاخه انسانی بوده، هر چند با گونه‌های حیوانی هم مطالعاتی گزارش گردیده است. برای مثال Blais و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادندکه لاکتوفرین در سطوح ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۷ گرم در کیلوگرم جیره موش‌های تخمدان برداری شده، می‌تواند چگالی و نیروی مورد نیاز جهت شکستن این استخوان‌ها را افزایش دهد. این محققین همچنین گزارش نموده‌اند که افزودن لاکتوفرین به محیط کشت سلول‌های استئوبلاست در غلظت ۵ و ۵ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، می‌تواند به ترتیب رشد و فعالیت آلکالین فسفاتاز این سلول‌ها را هم بهبود دهد.

هر تخم مرغ حاوی ۲/۳ گرم کلسیم به شکل کربنات کلسیم بوده که تقریبا معادل ۱۰ درصد از ذخایر کلسیم بدن مرغ تخم‌گذار است (Etches، ۱۹۸۷). به علت این‌که تقریباً ۳۵ درصد از کلسیم مورد نیاز هر تخم مرغ از استخوان‌ها تأمین می‌شود (Mueller و همکاران، ۱۹۶۴)، لذا مرغ‌های هیبرید مدرن امروزی حساسیت بالایی به استئوپروزیس دارند (Rennie و همکاران، ۱۹۹۷). این بیماری متابولیک، که به‌دلیل تحلیل بافت ساختمانی استخوان بعد از بلوغ ایجاد می‌شود (Hester و همکاران، ۲۰۰۴)، منجر به ترد شدن و شکننده شدن استخوان‌ها شده که طبیعتاً دردهای شدید را نیز به دنبال خواهد داشت (Zernicke و همکاران، ۱۹۹۵). بنابراین مشکلات اسکلتی ناشی از تحلیل بخش ساختمانی استخوان، شبیه استئوپروزیس، به راحتی بر کاهش تولید تخم مرغ و کیفیت پوسته تخم مرغ اثر می‌گذارد (Parkinson وCransberg، ۲۰۰۲). تحلیل استخوان، نتیجه عدم تعادل بین فعالیت استئوکلاست‌ها و استئوبلاست‌ها بوده که به ترتیب بازجذب و تشکیل استخوان را سبب می‌شوند.

مطالعات نشان می‌دهند که شماری از بیماری‌ها در طول زندگی، ریشه در رشد و نمو دوران رحمی دارند (Desai و همکاران، ۱۹۹۵؛ Godfrey و Barker ، ۲۰۰۰؛ Malet و همکاران، ۲۰۱۱). بنابراین در این مطالعه فرض شد که بهبود اثرات مادری به‌وسیله تزریق لاکتوفرین به درون تخم مرغ، ممکن است اثراتی طولانی مدت بر مرغ تخم‌گذار داشته باشد. به عبارت دیگر، این بهبود در جنین ممکن است با یک همبستگی مثبت به پرندگان بالغ و تولیدات آن‌ها هم منتقل شود. تا این تاریخ در مطالعات طیور، اطلاعات منتشر شده در رابطه با استفاده از لاکتوفرین بسیار محدود است. بنابراین، هنوز هم مطالعات زیادی نیاز است تا درک بهتری از کاربرد لاکتوفرین در طیور به دست آوریم.

از این رو، هدف از این مطالعه بررسی اثر تزریق ماده لاکتوفرین به تخم مرغ مادران نژاد تخم گذار پیش از جوجه‌کشی بوده که بر مبنای عملکرد، خصوصیات کمی و ویژگی‌های بافتی استخوان ساق پای مرغ های تخم گذار ارزیابی خواهد شد.

مواد و روش‌ها

مجموعاً تعداد ۱۰۸۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار مرغ مادر نژاد تخم-گذار لگهورن سفید (بوانزوایت، ۸۸ هفته)، از مزرعه پرورش مرغ مادر سیمرغ تهیه گردید. این تخم مرغ‌ها به صورت تصادفی به ۴ تیمار با ۳ تکرار، در هر تکرار ۹۰ تخم مرغ، اختصاص داده شدند. تیمار اول، گروه کنترل بود که با ۱۰۰ میکرولیتر از سدیم کلراید ۰/۹ درصد (محلول قابل تزریق، استریل، اسمولاریته ۳۸۰ میلی اسمول در لیتر، غلظت سدیم و کلر به ترتیب معادل ۱۵۴ و ۱۵۴ میلی اکی والان در لیتر) تزریق شد. سه تیمار دیگر به ترتیب با مقادیر ۲۲/۵، ۴۵ و ۶۷/۵ میکروگرم از لاکتوفرین در ۱۰۰ میکرولیتر از سدیم – کلراید ۰/۹ درصد تزریق شدند (لاکتوفرین گاوی، شرکت سیگما، آمریکا). دُز لاکتوفرین تزریقی براساس مطالعه برون تنی Blais و همکاران (۲۰۰۹) طراحی گردید. قبل از تزریق، لاکتوفرین در سدیم کلراید حل شد. سپس محل تزریق با اتانول ۷۵٪ استریل شد. در نهایت یک سوراخ، کمی بالاتر از خط استوای تخم مرغ به طرف ناحیه پهن آن ایجاد گردید. در ایجاد سوراخ از یک الکتروموتور و مته دندانپزشکی استفاده شد. تزریق به درون سفیده تخم مرغ با یک سوزن درجه ۱۸ انجام گرفت. بلافاصله بعد از تزریق محل تزریق با پارافین استریل بسته شد. سپس تخم مرغ‌ها در دستگاه ستر شرکت سیمرغ با دما و رطوبت نسبی ۳۷/۸°C و ۵۶٪ چیده شدند و نهایتاً در ۱۸ روزگی تخم مرغ‌ها به دستگاه هچر با دما و رطوبت ۳۶/۵°C و ۶۵٪ منتقل گردیدند.در روز ۲۱ جوجه‌کشی، جوجه‌ها از نظر سالم بودن آزمایش شده و از روی رشد پرهای اولیه و ثانویه تعیین جنسیت گردیدند. کلاً ۲۵۱ جوجه مرغ بر علیه بیماری مارک واکسینه شدند. درصد تفریخ برحسب تخم مرغ‌های چیده شده در دستگاه ستر معین گردید. جهت تعیین معیارهای ارزیابی استخوان، ۱۲ پرنده یک روزه از هر تیمار، از هر تکرار ۴ پرنده، کشتار شد. بقیه جوجه‌ها وزن کشی شده و در روی بستر تراشه چوب پرورش داده شدند. در مرحله پرورش هم هر تیمار ۳ تکرار داشت. هر تکرار دارای ۱۵ تا ۱۸ پرنده با توجه به درصد تفریخ بود. تلفات روزانه ثبت می‌گردید. آب و جیره‌هایی مشترک طبق جدول (۱)، به

صورت آزاد در اختیار پرندگان بود. خوراک مصرفی و سایر شرایط مدیریتی طبق راهنمای بوانز وایت اعمال گردید (Bovans White commercial layer guide, 2011). وزن کشی و خوراک مصرفی پرندگان هر تکرار، جهت تعیین ضریب تبدیل به صورت هفتگی معین می‌شد.

در ۱۵ هفتگی، ۲۰۱ پولت، به صورت ۳ تایی در قفس قرار داده شدند. برای محاسبه متغیرهای عملکردی، هر دو قفس مجاور به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شدند. وزن پرندگان به صورت انفرادی در ۲۰ و ۲۸ هفتگی ثبت گردید. زمان آزمایش مدت ۹ هفته در نظر گرفته شد. همه تکرارها طبق توصیه راهنمای بوانزوایت تجاری لگهورن سفید تغذیه و نگهداری شدند. جیره (جدول ۱) و آب در دوره تخم‌گذاری بصورت آزاد در اختیار پرندگان بود. دمای سالن تولید در طول شبانه روز در دامنه ۱۸ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد و محدوده رطوبت نسبی سالن بین ۶۵ تا ۷۰ درصد بود. تولید تخم مرغ و وزن آن‌ها در طول مدت آزمایش در هر تکرار بصورت روزانه ثبت می‌گردید. توده تخم مرغ طبق فرمول میانگین وزن تخم مرغ هر تکرار × تعداد تخم مرغ هفتگی هر تکرار، محاسبه می‌شد (Hayat و همکاران، ۲۰۰۹).

معیارهای ارزیابی استخوان ساق پا

جمع‌آوری نمونه‌ها

در ۲۸ هفتگی، از هر تکرار یک پرنده، مجموعاً ۸ پرنده از هر تیمار به‌صورت تصادفی انتخاب و بعد از وزن کشی کشتار گردیدند. درشت نی از هر دو ساق پا، بدون جوشانیدن از گوشت و بافت‌های چسبیده به آن جدا گردید. طول درشت نی ساق پای راست اندازه گیری شد و ضخامت درشت نی در وسط استخوان به‌صورت قطر کوچک و بزرگ بیضی برحسب میلیمتر با یک کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد. چگالی استخوان نیز طبق روش Zhang و Coon (۱۹۹۷) به دست آمد. برای این منظور، وزن استخوان‌ها با ترازویی با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. حجم استخوان‌ها نیز با یک استوانه مدرج معین گردید. چگالی استخوان از تقسیم وزن استخوان به حجم آن به دست آمد. در نهایت این استخوان‌ها تا روز تعیین استحکام و خاکستر استخوان، درون یک کیسه پلاستیکی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخوان‌های ساق پای چپ نیز، به ارزیابی بافت استخوان اختصاص داده شدند.

استحکام استخوان

نیروی شکستن استخوان ساق پای راست، با استفاده از دستگاه اینسترون (BT1-FR0.5TH.D14, 191483/2010, Germany)، بر روی پایه‌ای به فاصله ۶۲/۳۳ میلیمتر و سرعت انتقال نیرویی معادل ۰/۵ میلی‌متر بر ثانیه، با وزنه‌ای (Zwick/Rocll, Co 91502084, Germany) که توانایی انتقال نیرویی معادل حداکثر ۵۰۰ نیوتن را داشت، به دست آمد. سپس استحکام هر استخوان از تقسیم نیروی شکستن هر استخوان بر وزن آن استخوان محاسبه شد (Martin ، ۱۹۹۱؛ Martin ، ۱۹۹۳؛ Turner، ۲۰۰۶).

بعد از شکستن استخوان‌ها با دستگاه اینسترون و تعیین ضخامت استخوان قشری، استخوان‌ها در آون (OSK 95000, Ogawa Seiki Co., LTD) با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت (Park و همکاران، ۲۰۰۳) خشک شده و وزن کشی گردیدند. با این نمونه‌ها هیدراکسی پرولین به عنوان شاخص کلاژن طبق روش Monnier (۱۹۸۶) اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، ۴۰ میلی‌گرم از نمونه‌های استخوان که کاملاً آسیاب شده بودند با محلول کلروفرم: متانول (۲:۱)، به مدت ۱۴ ساعت چربی زدایی شدند. سپس این نمونه‌ها با متانول ۵۰ درصد آب‌دهی شده و با اسید کلریدریک ۶ نرمال در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت هیدرولیز شدند. بعد از خشک کردن نمونه‌ها، به هر نمونه ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. این نمونه‌ها سپس فیلتر شده و جذب نوری آن‌ها با اسپکتروفتومتر (VARIAN, CARY 100, UV visible)، در طول موج ۵۶۴ نانومتر خوانده شد. خاکستر این نمونه‌ها با کوره الکتریکی (OSK 1488, Ogawa Seiki Co., LTD) به صورت درصدی از وزن خشک استخوان، نه وزن استخوان چربی گرفته خشک، به دست آمد (Kim و همکاران، ۲۰۰۵). محتوی مواد معدنی استخوان[1]، معادل گرم خاکستر در استخوان هر ساق پا؛ و تراکم مواد معدنی استخوان[2]، معادل گرم خاکستر در هر سانتیمتر مکعب از استخوان ساق پا، طبق روش Mazzuco و Hester (۲۰۰۵) تعیین شد.

جدول ۱- مواد خوراکی و مواد مغذی تشکیل دهنده جیره ها (٪)

مواد خوراکی	جیره ها				
	آغازین	رشد	پولت	پیش تخم‌گذاری	تخم‌گذاری
	۰ تا ۳ هفتگی	۴ تا ۹ هفتگی	۱۰ تا ۱۵ هفتگی	۱۶ تا ۱۹ هفتگی	۲۰ تا ۲۸ هفتگی
ذرت	۶۱/۲۶	۵۵/۲۴	۵۰/۶۸	۴۱/۶۵	۵۱/۵۵
کنجاله سویا	۲۷/۹۴	۳۰/۳۵	۱۷/۴۸	۲۰/۸۵	۳۱/۸۹
گلوتن ذرت	۵/۰۰	-	-	-	-
گندم	-	۱۰/۰۰	-	-	-
زبره گندم	-	-	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰	-
سبوس گندم	-	-	۸/۰۰	۸/۰۰	-
روغن گیاهی	۱/۰۰	۰/۱۲	-	۲/۸۰	۴/۸۰
صدف	۱/۶۶	۱/۷۸	۲/۰۹	۴/۶۰	۹/۲۰
دی‌کلسیم فسفات	۱/۹۳	۱/۵۴	۰/۸۹	۱/۱۲	۱/۵۰
نمک	۰/۳۷	۰/۳۴	۰/۲۸	۰/۲۷	۰/۳۹
دی- ال متیونین	۰/۱۴	۰/۱۲	۰/۰۷	۰/۱۳	۰/۱۷
مکمل ویتامینی- معدنی[1]	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
آنالیز محاسبه شده					
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری/کیلوگرم)	۲۹۵۰	۲۸۵۰	۲۷۵۰	۲۷۵۰	۲۸۷۱
پروتئین خام	۲۰/۵۰	۱۹/۰۰	۱۶/۰۰	۱۶/۸	۱۸/۲۰
الیاف خام	۳/۶۱	۳/۷۹	۴/۹۵	۴/۶۹	۳/۵۲
لیزین	۱/۱۶	۱/۰۷	۰/۸۱	۰/۸۹	۱/۰۰
متیونین + سیستین	۰/۸۶	۰/۷۶	۰/۶۰	۰/۶۷	۰/۷۷
کلسیم	۱/۱۵	۱/۱۰	۱/۰۷	۲/۱۰	۳/۹۱
فسفرقابل دسترس	۰/۴۸	۰/۴۲	۰/۳۶	۰/۴۲	۰/۴۰
سدیم	۰/۱۶	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۸

[1] تامین شده در هر کیلوگرم جیره (صفر تا ۱۹ هفتگی): ۱۳۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۳۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D_3، ۲۵ واحد بین المللی ویتامین E، ویتامین K_3 ۳ میلی‌گرم، تیامین ۲ میلی‌گرم، ریبوفلاوین ۵ میلی‌گرم، اسید پانتوتنیک ۱۵ میلی‌گرم، نیاسین ۶۰ میلی‌گرم، کولین کلراید ۲۰۰ میلی‌گرم، کوبالامین ۰/۰۲ میلی‌گرم، پیریدوکسین ۵ میلی گرم، اسید فولیک ۰/۷۵ میلی‌گرم، بیوتین ۰/۲ میلی‌گرم؛ منگنز (اکسید) ۶۰ میلی‌گرم، روی (اکسید) ۶۰ میلی‌گرم، آهن (سولفات) ۶۰ میلی‌گرم، مس (سولفات) ۸ میلی‌گرم، ید (یدات کلسیم) ۱/۱ میلی‌گرم، کبالت ۰/۲۵ میلی‌گرم و سلنیوم ۰/۲۵ میلی‌گرم.

[1] تامین شده در هر کیلوگرم جیره (۲۰ تا ۲۸ هفتگی): ۱۰۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۲۵۰۰ واحد بین المللی ویتامین D_3، ۲۰ واحد بین المللی ویتامین E، ویتامین K_3 ۳ میلی‌گرم، تیامین ۲ میلی‌گرم، ریبوفلاوین ۵ میلی‌گرم، اسید پانتوتنیک ۱۲ میلی‌گرم، نیاسین ۴۰ میلی‌گرم، کولین کلراید ۲۰۰ میلی‌گرم، کوبالامین ۰/۰۱۵ میلی‌گرم، پیریدوکسین ۵ میلی گرم، اسید فولیک ۰/۷۵ میلی‌گرم، بیوتین ۰/۰۵ میلی‌گرم؛ منگنز (اکسید) ۷۰ میلی‌گرم، روی (اکسید) ۶۰ میلی‌گرم، آهن (سولفات) ۶۰ میلی‌گرم، مس (سولفات) ۸ میلی‌گرم، ید (یدات کلسیم) ۱/۱ میلی‌گرم، کبالت ۰/۱۵ میلی‌گرم و سلنیوم ۰/۲۵ میلی‌گرم.

ارزیابی بافت استخوان

استخوان ساق پای چپ مرغ‌های ۲۸ هفته، چندین بار با سرم نمکی سرد (۰/۹ درصد، ۵ درجه سانتی‌گراد) شستشو داده شدند. نمونه-های هر تیمار به مدت دو هفته به صورت جداگانه در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شدند تا ثبات کامل صورت گیرد. سپس نمونه‌ها توسط محلول اسید نیتریک ۱۰ درصد، حدود ۱۸ ساعت کلسیم‌زدایی گردیدند بهطوری‌که یک تیغه اسکالپل به راحتی وارد آن‌ها می-گردید. سپس یک قطعه استوانه‌ای به اندازه ۲ سانتیمتر، برای ارزیابی کانال‌های هاورس و بررسی استئوپروزیس از وسط دیافیز استخوان‌ها جدا شد. پس از آب‌گیری با درجات صعودی اتانول، ۷۰ تا ۹۹ ٪، قالب‌گیری توسط پارافین صورت پذیرفت تا مقاطع ۵ میکرومتری عرضی با میکروتوم تهیه شود. جهت تهیه لام‌های دائمی، رنگ‌آمیزی برش‌ها به روش هماتوکسیلین- ائوزین صورت گرفت (Harris، ۱۹۹۰). در نهایت با کمک یک میکروسکوپ نوری تحقیقاتی (LEITZ WETZLAR-513043، آلمان) و یک دوربین دیجیتال (MOTICAM-2000) عکس‌هایی با بزرگنمایی ۴۰۰ و شفافیت ۸۰۰ ×۶۰۰ پیکسل تهیه گردید. در اندازه‌گیری کانال‌های هاورس از نرم افزار ماتیک ۹ استفاده شد.

نتایج

اختلاف معنی‌داری بین متغیرهای تعیین کننده وضعیت استخوان ساق پای جوجه‌ها در یک روزگی مشاهده نشد، با این‌حال وزن استخوان ساق پای جوجه‌های یک روزه تیمارهای لاکتوفرین به صورت عددی از شاهد بیشتر بود ($p>0/05$) (داده‌ها نشان داده نشده است). اثرات تزریق لاکتوفرین به تخم مرغ پیش از جوجه-کشی، بر وزن مرغ‌های تخم‌گذار در ۲۰ و ۲۸ هفتگی معنی‌دار نبود ($p>0/05$). علیرغم مشابه بودن وزن بدن مرغ‌ها در ۲۸ هفتگی، وزن استخوان ساق پای پرندگان تیمار ۲۲/۵ میکروگرم از لاکتوفرین متأثر شد و به‌طور معنی‌داری از شاهد بیشتر بود ($p<0/05$). ضخامت استخوان قشری هم تحت تاثیر لاکتوفرین قرار گرفت و در تیمار ۲۲/۵ و ۶۷/۵ میکروگرم از لاکتوفرین در مقایسه با شاهد، به ترتیب ۳/۹۸ و ۶/۲۵ درصد بیشتر بود ($p<0/05$). همچنین استحکام استخوان‌ها به شکستن به‌وسیله سطح ۶۷/۵ میکروگرم از لاکتوفرین به طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش یافت ($p<0/05$) (جدول ۲).

در بین صفات عملکردی مرغ‌های تخم‌گذار (وزن تخم مرغ، درصد تولید، توده تخم مرغ، خوراک مصرفی و ضریب تبدیل غذایی)، تنها وزن تخم مرغ به وسیله سطوح ۴۵ و ۶۷/۵ میکروگرم از لاکتوفرین تزریق شده در تخم مرغ، به طور معنی‌داری ($p<0/05$) در مقایسه با شاهد افزایش یافت (نمودار ۱).

ارزیابی کمی اثر تزریق لاکتوفرین به تخم مرغ مادران تخم‌گذار پیش از جوجه کشی، بر وضعیت بافت استخوان ساق مرغ‌های تخم‌گذار در سن ۲۸ هفتگی در شکل ۱، نشان داده شده است. این شکل نشان می‌دهد که قطر داخلی کانال‌های هاورس حداکثر ۵۰ میکرومتر است.

همبستگی بین استحکام استخوان و متغیرهای دیگر استخوان ساق پا در جدول ۳، نشان داده شده است. همان‌گونه که در این جدول نشان داده شده است، حجم استخوان با وزن استخوان ($p<0/001$، $r=0/61$)، با طول استخوان ($p<0/05$، $r=0/44$) و با وزن خاکستر ($p<0/01$، $r=0/58$) همبستگی مثبت دارد. در این مطالعه بین وزن خاکستر با حجم، طول، وزن تر و ضخامت لایه قشری استخوان، به ترتیب ضرایب همبستگی مثبت ($p<0/01$، $r=0/58$)، ($p<0/05$، $r=0/39$)، ($p<0/001$، $r=0/91$) و ($p<0/05$، $r=0/49$) دیده می‌شود که ضریب ۰/۹۱، یک همبستگی قوی بین وزن خاکستر با وزن تر استخوان می‌باشد. در مقابل، بین درصد خاکستر با حجم، طول، وزن و ضخامت لایه قشری استخوان هیچ نوع همبستگی یا ارتباطی دیده نمی‌شود. در این مطالعه بین وزن استخوان با سایر متغیرها، نسبت به طول استخوان با سایر متغیرها، ارتباط بیشتری دیده می‌شود.

جدول ۲- اثرات تزریق لاکتوفرین به تخم مرغ مادران نژاد تخم‌گذار قبل از جوجه کشی بر وزن بدن و خصوصیات ساق پای مرغ‌های تخم‌گذار در سن ۲۸ هفتگی

متغیرها	تیمارها						
	شاهد[1]	لاکتوفرین ۱	لاکتوفرین ۲	لاکتوفرین۳	مقدار p	SEM	CV (%)
وزن ۲۰ هفتگی مرغ‌ها (گرم)	۱۲۴۰/۲۹	۱۲۴۳/۵۷	۱۲۵۹/۱۴	۱۲۳۸/۷۱	۰/۳۸۰۵	۹/۰۲۶	۱/۹۱
وزن ۲۸ هفتگی مرغ‌ها (گرم)	۱۵۰۱/۰۶	۱۴۹۹/۰۸	۱۴۸۳/۲۴	۱۵۲۹/۷۴	۰/۲۹۴۰	۱۷/۲۱۱	۲/۹۷
طول ساق پا (میلیمتر)	۱۱۳/۷۴	۱۱۵/۶۳	۱۱۳/۸۱	۱۱۴/۳۸	۰/۴۴۹۰	۰/۹۱۴	۲/۱۱
وزن ساق پا (گرم)	۸/۱۷۲۹^{b}	۹/۱۱۳۳^{a}	۸/۲۸۴۳^{b}	۸/۶۷۷۱^{ab}	۰/۰۱۵۵	۰/۲۱۴	۶/۱۲
قطر استخوان قشری (میلیمتر)	۰/۷۱^{b}	۰/۷۵^{a}	۰/۷۳^{ab}	۰/۷۶^{a}	۰/۰۱۲۴	۰/۰۱۲	۳/۸۹
محتوی خاکستر ساق (گرم)	۴/۵۳	۵/۰۱	۴/۶۶	۴/۸۲	۰/۰۸۸۸	۰/۱۲۹	۷/۰۷
خاکستر ساق (درصد)	۵۵/۴۶	۵۴/۹۷	۵۶/۱۷	۵۵/۴۹	۰/۶۷۲۸	۰/۶۷۹	۳/۱۷
چگالی ساق پا (گرم/سانتیمتر مکعب)	۱/۳۰	۱/۳۶	۱/۲۹	۱/۳۲	۰/۳۴۹۲	۰/۰۳۰	۵/۹۴
چگالی خاکستر ساق پا (گرم/سانتیمتر مکعب)	۰/۷۲۰۲	۰/۷۵۳۱	۰/۷۲۳۷	۰/۷۳۰۸	۰/۶۴۲۵	۰/۰۱۹	۶/۷۳
هیدراکسی پرولین (میکروگرم/گرم)	۱۲/۰۱	۱۲/۳۷	۱۲/۳۶	۱۲/۱۰	۰/۴۳۶۳	۰/۲۵۱	۵/۰۵
استحکام استخوان (کیلوگرم/گرم)	۱/۷۷^{b}	۲/۰۰^{ab}	۱/۸۹^{b}	۲/۳۶^{a}	۰/۰۱۸۸	۰/۱۲۸	۱۶/۵۲

$^{a-b}$میانگین‌ها در هر ردیف با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری نمی‌باشند ($p>0/05$).

[1]شاهد تنها با ۱۰۰ میکرولیتر از کلرورسدیم ۰/۹ درصد تزریق شده است.

لاکتوفرین۱، ۲ و ۳ به ترتیب با ۲۲/۵، ۴۵/۰ و ۶۷/۵ میکروگرم از لاکتوفرین در ۱۰۰ میکرولیتر از کلرورسدیم تزریق شده است.

SEM، میانگین خطای استاندارد ؛ CV، ضریب تغییرات.

جدول ۳- همبستگی بین استحکام استخوان ساق پا با دیگر متغیرهای این استخوان در مرغ‌های تخم‌گذار در سن ۲۸ هفتگی

	چگالی استخوان	غلظت خاکستر استخوان	خاکستر استخوان	ضخامت استخوان قشری	وزن استخوان	طول استخوان	حجم استخوان	استحکام استخوان
چگالی خاکستر استخوان	۰/۸۶۲***	۰/۳۶۲	۰/۵۰۷**	۰/۳۸۵*	۰/۳۸۲*	-۰/۰۴۱	-۰/۳۹۹*	۰/۱۶۶
چگالی استخوان		-۰/۱۴۱	۰/۳۵۵	۰/۳۳۴	۰/۴۳۹*	-۰/۰۰۷	-۰/۴۴۳*	۰/۳۱۷
غلظت خاکستر استخوان			۰/۳۲۹	۰/۱۳۶	-۰/۰۸۰	-۰/۰۹۳	۰/۰۰۳	۰/۲۴۹
خاکستر استخوان				۰/۴۸۶*	۰/۹۱۴***	۰/۳۸۵*	۰/۵۷۹**	۰/۱۹۵
ضخامت استخوان قشری					۰/۴۵۶*	-۰/۰۳۱	۰/۱۶۱	۰/۴۹۱**
وزن استخوان						۰/۴۴۳	۰/۶۰۷***	۰/۳۱۶
طول استخوان							۰/۴۴۲*	۰/۱۵۳
حجم استخوان								۰/۰۶۱

*ضرایب همبستگی در سطح ($p<0/05$) معنی‌دار است. **ضرایب همبستگی در سطح ($p<0/01$) معنی‌دار است. ***ضرایب همبستگی در سطح ($p<0/001$) معنی‌دار است.

بحث

حداقل تاکنون مطالعات و بررسی‌های کمتری اثرات تزریق لاکتوفرین را در تخم مرغ مادران نژاد تخم‌گذار بررسی نموده‌اند. معیارهای ارزیابی وضعیت استخوان در زمان تفریخ از سطوح لاکتوفرین متأثر نشد که ممکن است با کوتاه بودن دوره جنینی قابل توجیه باشد. هیچ اثر معنی‌داری از تیمار لاکتوفرین بر وزن بدن مرغ‌ها در ۲۰ و ۲۸ هفتگی مشاهده نشد. این نتیجه با گزارشات Blais و همکاران (۲۰۰۹)؛ Svoboda و همکاران (۲۰۰۵) و Uchida و همکاران (۲۰۰۶) در موش، موش صحرایی و خوکچه مطابقت دارد. همان‌طوری که انتظار داشتیم تیمارهای لاکتوفرین، مخصوصاً ۲۲/۵ میکروگرم از لاکتوفرین، منجر به وزن بالاتر استخوان ساق پا نسبت به تیمار شاهد شدند که دلالت بر موفقیت استفاده از لاکتوفرین در بهبود وضع استخوان مرغ تخم گذار دارد. وزن بالاتر ساق پای پرندگان تیمار لاکتوفرین در این مطالعه، با گزارشات Cornish و همکاران (۲۰۰۴)؛ Grey و همکاران (۲۰۰۴) و Hou و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت دارد. مطالعات فوق اثر لاکتوفرین را به عنوان یک عامل محرک در فرایند استخوان‌سازی، با افزایش فعالیت استئوبلاست‌ها و کاهش فعالیت استئوکلاست‌ها که منجر به ساخت بیشتر و بازجذب کمتر استخوان است، به خوبی نشان می‌دهد.

استحکام استخوان از متغیرهای بیومکانیکی استخوان بوده که مستقیماً وضعیت سفتی و سختی استخوان را نشان داده و رابطه مستقیم با ضخامت استخوان قشری دارد. استخوان قشری در استخوان‌های دراز، لایه متراکم و خارجی استخوان بوده و در وسط استخوان دراز، بخش غالب استخوان است (Nilas، ۱۹۹۳). در این مطالعه، ضخامت استخوان قشری در تیمارهای لاکتوفرین، مخصوصاً در تیمارهای ۲۲/۵ و ۶۷/۵ میکروگرم به میزان قابل توجهی افزایش یافته است. این افزایش ضخامت با داده‌های استحکام استخوان در هر تیمار مطابقت دارد که از ضریب همبستگی بین ضخامت استخوان قشری و استحکام استخوان ($r = ۰/۴۹$ ،$p<۰/۰۱$) و همچنین نمودار ۲، قابل استنباط است. به عبارت دیگر در تیمار شاهد کمترین ضخامت منجر به کمترین استحکام؛ و در تیمار ۶۷/۵ میکروگرم از لاکتوفرین به ازای هر تخم مرغ، بیشترین ضخامت منجر به بیشترین استحکام یا بهترین مقاومت به شکستن شده است. مطالعات نشان می‌دهند که محتوی خاکستر و تراکم مواد معدنی استخوان، باعث سختی استخوان می‌شوند(Pan، ۱۹۹۶)، در مقابل، کلاژن این سختی را تعدیل نموده و به استخوان اجازه می‌دهد که بدون شکستن نیروی بیشتری را تحمل کند (Zernicke و همکاران، ۱۹۹۵). چون در این مطالعه این متغیرها معنی‌دار نیستند، بنابراین به نظرمی‌رسد تنها دلیل تفاوت استحکام استخوان در تیمارها، ضخامت استخوان قشری باشد. نتایج معنی‌دار نشده دیگر معیارهای ارزیابی کننده وضعیت استخوان (مانند محتوی ماده معدنی استخوان، خاکستر استخوان، چگالی استخوان و غلظت خاکستر استخوان)، ناتوانی لاکتوفرین در بهبود وضعیت استخوان را نشان می‌دهد. با این‌حال تقریباً نتایج همه این پارامترها به صورت عددی بزرگتر از تیمار شاهد است. بین متغیرهای معنی‌دار شده مورفولوژی استخوان ساق پا، ضریب تغییرات ضخامت استخوان قشری (۳/۸۹٪) از همه کوچکتر بوده که نشان می‌دهد این متغیر اساساً ممکن است بهترین شاخص تعیین‌کننده وضعیت استخوان باشد.

ارزیابی کمی بافت استخوان ساق پای مرغ‌های تخم‌گذار ۲۸ هفته، به این منظور انجام شد که معین شود تفاوت استحکام استخوان تیمارها به شکستن، صرفا به دلیل تفاوت ضخامت استخوان قشری بوده یا تفاوت قطر کانال‌های هاورس تیمارها هم در آن نقش دارد. Newman و Leeson (۱۹۹۸) در ارزیابی کمی استئوپروزیس، به کانال‌های هاورس اشاره نموده و بیان می‌کنند که وجود کانال‌هایی با قطر داخلی بزرگتر از ۲۰۰ میکرومتر دلالت بر وجود استئوپروزیس دارد. طبق شکل ۱، اندازه کانال‌های هاورس حداکثر معادل ۵۰ میکرومتر بوده که نشان می‌دهد پوکی استخوان در سطح داخلی کانال‌های هاورس مرغ‌های ۲۸ هفته، هنوز نفوذ نکرده است. بنابراین تفاوت استحکام استخوان‌ها صرفا بازتاب تفاوت قطر استخوان قشری بوده و تحت تاثیر تحلیل استخوان از سطح داخلی کانال‌های هاورس قرار ندارد.

روی‌هم رفته در این مطالعه با توجه به داده‌های تیمار ۶۷/۵ میکروگرم از لاکتوفرین یعنی وزن استخوان ساق پا و ضخامت استخوان قشری، مشخص می‌شود که این تیمار در بهبود وضعیت استخوان مؤثر بوده است. وزن تخم مرغ این تیمار همچنین به‌طور معنی‌داری از سایر تیمارها بالاتر بود. Taylor و همکاران (۲۰۱۳) نیز نشان دادند که بهبود در وضعیت استخوان با ملاتونین می‌تواند به‌طور معنی‌داری وزن تخم مرغ مرغ های تخم گذار را افزایش دهد. مرغ‌ها قادرند که عملکردشان را با انتقال ذخایر استخوانی خود جهت تشکیل پوسته حفظ نمایند و مجدداً این ذخایر را به‌وسیله مواد معدنی جیره بازسازی نمایند (Knowles و Wilkins، ۱۹۹۸؛ Ekmay و Coon، ۲۰۱۰). بنابراین به نظر می‌رسد که تحت شرایط یکسان مدیریتی، افزایش وزن تخم مرغ به‌وسیله تیمار ۶۷/۵ میکروگرم از لاکتوفرین، به‌خاطر ظرفیت بیشتر بافت استخوانی این تیمار بوده که در جذب و متابولیسم مواد مغذی جیره منعکس شده است.

همبستگی بین استحکام استخوان ساق پا و دیگر متغیرهای این استخوان در جدول ۳ نشان داده شده است. همان‌طورکه مشاهده می‌شود، حجم استخوان با وزن استخوان (p<۰/۰۰۱، r= ۰/۶۱)، با طول استخوان (p<۰/۰۵، r =۰/۴۴) و با وزن خاکستر (p<۰/۰۱، r=۰/۵۸) همبستگی مثبت دارد. Kim و همکاران (۲۰۰۵)، بین حجم استخوان با وزن استخوان و وزن خاکستر استخوان، به ترتیب همبستگی مثبت ۰/۷۴ و ۰/۴۹ را گزارش نموده‌اند. در این مطالعه بین وزن خاکستر با حجم، طول، وزن تر و ضخامت لایه قشری استخوان، به ترتیب ضرایب همبستگی مثبت (r =۰/۵۸ ،p<۰/۰۱)، (r =۰/۳۹ ،p<۰/۰۵)، (p<۰/۰۰۱، r ۰/۹۱ =) و (r =۰/۴۹ ،p<۰/۰۵) دیده می‌شود که ضریب ۰/۹۱، یک همبستگی قوی بین وزن خاکستر با وزن تر استخوان می‌باشد. Zhang و Coon (۱۹۹۷) هم بین وزن خاکستر و وزن خشک استخوان ساق پای مرغ‌های تخم‌گذار، ضریب همبستگی ۰/۹۷۴ را گزارش نموده و بیان می‌کنند که این همبستگی بالا عقیده تجزیه یا جایگزینی هم زمان خاکستر و بخش آلی استخوان را پشتیبانی می‌کند که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. در مقابل، بین درصد خاکستر با حجم، طول، وزن و ضخامت استخوان هیچ نوع همبستگی یا ارتباطی دیده نمی‌شود که ممکن است با نرمال شدن وزن خاکستر با حجم استخوان قابل توجیه باشد (Kocamis و همکاران، ۲۰۰۰). به همین دلیل Kim و همکارن (۲۰۰۵) و Schreiweis و همکاران (۲۰۰۳)، درصد خاکستر استخوان را در ارزیابی کیفیت استخوان موجوات با اندازه‌ها یا وزن‌های متفاوت، متغیر مناسب‌تری می‌دانند. در این مطالعه بین وزن استخوان با سایر متغیرها، نسبت به طول استخوان با سایر متغیرها، ارتباط بیشتری دیده می‌شود که ممکن است به تفاوت معنی دار وزن استخوان تیمارها و عدم تفاوت معنی دار طول استخوان‌ها مربوط باشد.

در این تحقیق، بهبود در وضعیت استخوان‌های تیمار ۶۷/۵ میکروگرم از لاکتوفرین، به‌وسیله افزایش میزان متغیر استحکام استخوان‌ها اثبات گردید. این مطالعه نشان می‌دهد که لاکتوفرین حتی با یک تغییر کوچک در ضخامت استخوان قشری ساق پای مرغ های تخم‌گذار، می‌تواند باعث بهبود چشمگیری در خصوصیات بیومکانیکی استخوان شود. از این رو پیشنهاد می‌شود که ضخامت استخوان قشری ساق پای مرغ‌های تخم‌گذار، یک متغیر مناسب جهت ارزیابی وضعیت استخوان از نظر سلامتی و استحکام آن است. این مطالعه همچنین نشان می‌دهد که بین ضخامت استخوان قشری ساق پا و استحکام استخوان یک همبستگی متوسط وجود دارد.

پاورقی‌ها:

1- Bone mineral content
2- Bone mineral density=Bone ash concentration

منابع

Baker, E.N., Anderson, B F., Baker, H M., Haridas, M., Jameson, G.B., Norris, G E., Rumball, S.V. and Smith, C. . (1991). Structure, function and flexibility of human lactoferrin.*International Journal of Biological Macromolecules*. 13:122-129.

Blais, A., Malet, A., Mikogami, T., Martin-Rouas, C., and Tome, D. (2009). Oral bovine lactoferrin improves bone status of ovariectomized mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology* and *Metabolism*, 296: 1281-1288.

Bovans White Commercial Layer Guide. (2011). Centurion Poult.Inc., Lexington, GA.

Brock, J.H. (2002). The physiology of lactoferrin.*Biochemistry* and *Cell Biology* 80: 1-6.

Cornish, J., Callon, K.E., Naot, D., Palmano, K.P., Banovic, T., Bava, U., Watson, M., Lin, J. M., Tong, P. C., Chen, Q., Chan, V. A., Reid, H. E., Fazzalari, N., Baker, H. M., Baker, E. N., Haggarty, N.W., Grey, A. B., and Reid, I.R. (2004). Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology.* 145: 4366-4374.

Desai, M., Crowther, N. J., Ozanne, S. E., Lucas, A., and Hales, C.N. (1995). Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. Biochemical Society Transactions, 23(2), 331–335.

Ekmay, R.D. and Coon, C.N. (2010). An examination of the P requirements of broiler breeders for performance, progeny quality and P balance 1. Non-phytate phosphorus. *International Journal of Poultry Science.* 9(11): 1043-1049.

Etches, R.J. (1987). Calcium logistics in the laying hen. *The Journal of Nutrition*. 117(3): 619-628.

Godfrey, K. M., and Barker, D. J. P. (2000). Fetal nutrition and adult disease. *American Journal* of Clinical *Nutrition*. 71: 1344-1352.

Grey, A., Banovic, T., Zhu, Q., Watson, M., Callon, K., Palmano, K., Ross, J., Naot, D., Reid, I. R., and Cornish, J. (2004). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a mitogenic receptor for lactoferrin in osteoblastic cells. *Molecular Endocrinology*. 18(9): 2268-2278.

Harris, H.F. (1990). Haematoxylin into haematein in staining reactions. *Journal of applied Microscopy Laboratory Methods.* 3: 777-780.

Hayat, Z., Cherian, G., Pasha, T. N., Khattak, F.M., and Jabbar, M.A. (2009). Effect of feeding flax and two types of antioxidants on egg production, egg quality, and lipid composition of eggs.*The Journal of Applied PoultryResearch.* 18(3): 541-551.

Hester, P. Y., Schreiweis, M. A., Orban, J. I., Mazzuco, H., Kopka, M. N., Ledur, M. C., and Moody, D. E. (2004). Assessing bone mineral density in vivo: dual energy x-ray absorptiometry. *Poultry Science.* 83: 215-221.

Hou, J.M., Xue, Y., and Lin, Q.M. (2012). Bovine lactoferrin improves bone mass and micro-structure in ovariectomized rats via OPG/RANKL/RANK pathway. *PharmacologicaSinica Sin.* 33: 1277-1284.

Kim, W.K., Donalson, L.M., Herrera, P., Kubena, L. F., Nisbet, D.J., and Ricke, S.C. (2005). Comparisons of molting diets on skeletal quality and eggshell parameters in hens at the end of the second egg-laying cycle. *Poultry Science.* 84(4): 522-527.

Knowles, T.G., and Wilkins, L.J. (1998).The problem of broken bones during the handling of laying hens.A Review. *Poultry Science.* 77(12): 1798-1802.

Kocamis, H., Yeni, Y.N., Brown, C.U., Kenney, P.B., Kirkpatrick-Keller, D. C. and Killefer, J. (2000). Effect of in ovo administration of insulin-like growth factor-I on composition and mechanical properties of chicken bone. *Poultry Science.* 79: 1345-1350.

Lorget, F., Clough, J., Oliveira, M., Daury, M. C., Sabokbar, A. and Offord, E. (2002). Lactoferrin reduces in vitro osteoclast differentiation and resorbing activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 296 (2): 261-266.

Malet, A., Bournaud, E., Lan, A., Mikogami, T., Tome, D., and Blais, A. (2011). Bovine lactoferrin improves bone status of ovariectomized mice via immune function modulation. *Bone.* 48 (5): 1028-1035.

Martin, R. B. (1991). Determinants of the mechanical properties of bones.*Journal of Biomechanics,* 24: 79-88.

Martin, R.B. (1993). Aging and strength of bone as a structural material.*Calcified Tissue International,* 53: 34-39.

Mazzuco, H. and Hester, P.Y. (2005). The effect of an induced molt using a non fasting program on bone mineralization of White Leghorns. *Poultry Science.* 84: 1483-1490.

Monnier, V.M., Vishwanath, V., Frank, K.E., Elmets, C.A., Dauchot, P. and Kohn, R.R. (1986). Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *The New England Journal of Medicine.* 314: 403-408.

Mueller, W.J, Schraer, R., and Schraer, H. (1964).Calcium metabolism and skeletal dynamics of laying pullets.*The Journal of Nutrition*. 84: 20-26.

Newman, S., and Leeson, S. (1998). Effect of housing birds in cages or an aviary system on bone characteristics. *Poultry Science*. 77: 1492-1496.

Nilas, L. (1993). Clacium intake and osteoporosis. World Review of Nutrition and Dietetics, 73, 1-26.

Pan, H. (1996). The effect of a 7 T magnetic field on the egg hatching of Heliothisvirescens.*Magnetic Resonance Imaging.* 14(6): 673-677.

Park, S.Y., Birkhold, S.G., Kubena, L.F., Nisbet, D.J. and Ricke, S.C. (2003). Effect of storage condition on bone breaking strength and bone ash in laying hens at different stages in production cycles.*Poultry Science.* 82(11): 1688-1691.

Parkinson, G., andCransberg, P. (2002). Do osteoporosis and skeletal under mineralization limit egg production. *Proceedings, Australian Poultry Science Symposium.* 14: 69–75.

Rennie, J.S., Fleming, R.H., McCormack, H. A., McCorquodale, C.C. and Whitehead, C.C. (1997). Studies on effects of nutritional factors on bone structure and osteoporosis in laying hens.*British poultry Science.* 38(4): 417-424.

Schreiweis, M.A., Orban, J.I., Ledur, M.C. and Hester, P.Y. (2003). The use of densitometry to detect differences in bonemineral density and content of live White Leghorns fedvarying levels of dietary calcium. *Poultry Science.* 82: 1292-1301.

Svoboda, M., Drabek, J., and Ficek, R. (2005). Effect of bovine lactoferrin on utilization of orally administered iron in suckling piglets.*Bulletin of theveterinary institute* in *pulawy.* 49: 471-474.

Taylor, A.C., Horvat-Gordon, M., Moore, A., and Bartell, P.A. (2013). The Effects of Melatonin on the Physical Properties of Bones and Egg Shells in the Laying Hen. *Plos One.* 8 (2): 1-10.

Turner, C.H. (2006). Bone strength: current concepts. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1068: 429-446.

Uchida, T., Oda, T., Sato, K. and Kawakami, H. (2006). Availability of lactoferrin as a natural solubilizer of iron for food products. *International Dairy Journal*. 16: 95-101.

Zernicke, R.F., Salem, G.J., Barnard, R.J. and Schraamm, E. (1995). Long-term, high-fat sucrose diet alters rat demurral neck and vertebral morphology, bone mineral content, and mechanical properties. *Bone*. 16: 25-31.

Zhang, B. and Coon, C.N. (1997).The relationship of various tibia bone measurements in hens. *Poultry Science*. 76(12): 1698-1701.