

"Research Paper"

Studying the Effect of Zeolite, Organic Acid and Silver Nanoparticles Coated on Zeolite on the Expression of BAX and Bcl2 Apoptosis Genes in the Liver of Broiler Chickens

Negin Akhundpour¹, Seyed Reza Hashemi², Ayoub Farhadi³ and Elnaz Arabian⁴

1- M.Sc. Department of Animal Physiology, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- Associate Professor, Department of Animal Physiology, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, (Corresponding author: hashemi711@yahoo.co.uk)

3- Associate Professor, Department of Animal Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran

4- Ph.D. Student, Department of Animal Physiology, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: 22 August, 2022 Accepted: 27 March, 2023

Extended Abstract

Introduction and Objective: Silver nanoparticles are one of the new achievements in nanotechnology, which are used in medicine, veterinary medicine, agriculture, and pharmaceuticals due to their antimicrobial activity. Silver nanoparticles can react with biological macromolecules and induce apoptosis by disrupting intracellular homeostasis. Hence, the aim of this study was to the effect of zeolite, organic acid and silver nanoparticles coated on zeolite on the expression of BAX and Bcl2 apoptosis genes in broiler chickens.

Material and Methods: The number of 450 one-day-old broiler chicks (Cobb 500) were used in five treatments and six repetitions with 15 chicks per replicate in the form of a completely random design. Experimental diets were: control or basal diet (1), a basal diet supplemented by 1% zeolite (2), a basal diet supplemented by 1% zeolite coated with 0.5% nanosilver (3), a basal diet supplemented by 0.15% organic acid (4) and a basal diet supplemented by 1% zeolite coated with 0.5% nanosilver and 0.15% organic (5). The experiment was conducted with broiler chicken from 1 to 42 days old. The expression of the BCL2 and BAX apoptosis genes, liver sampling was done on the 21st and 42nd days of the breeding period.

Results: The results of this experiment showed that in broiler chicks receiving zeolite treatment (Z) on d 21 and silver nanoparticles coated on zeolite treatment (NS) on d 42 of the breeding period the expression level of Bcl2 gene in liver tissue was significantly increased ($p < 0.05$) compared to the control treatment (C). Also, the expression of the BAX gene in the liver tissue in NS and NSOA treatments on d 42 of the breeding period increased significantly compared to the control treatment ($p < 0.05$).

Conclusion: In conclusion, the results of this experiment showed that zeolite and NS and NSOA treatments have an increasing effect on the expression of Bcl2 and BAX genes, while this effect was not observed in organic acid treatment.

Keywords: Apoptosis, BAX, Bcl2, Broilers, Silver nanoparticles

**"مقاله پژوهشی"****مطالعه اثر زئولیت، اسید آرگانیک و نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت بر بیان ژن‌های آپوپتوزیسی BAX و Bcl₂ در کبد جوجه‌های گوشتی**نگین آخوندپور^۱، سید رضا هاشمی^۲، ایوب فرهادی^۳ و الناز عربیان^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
 ۲- دانشیار گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، (نویسنده مسوول: hashemi711@yahoo.co.uk)
 ۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
 ۴- دانشجوی دکتری گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
 تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۵/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱/۷ صفحه: ۱۰۵ تا ۱۱۵

چکیده متوسط

مقدمه و هدف: نانو ذرات نقره یکی از دستاوردهای جدید در فناوری نانو است که به علت فعالیت ضد میکروبی در زمینه‌هایی مانند پزشکی، دامپزشکی، کشاورزی و داروسازی کاربرد دارد. نانوذرات نقره می‌تواند با ماکرومولکول‌های زیستی وارد واکنش شده و با اختلال هموستاز داخل سلولی سبب القای فرآیند آپوپتوز شود. تنظیم آپوپتوز بسیار پیچیده بوده و پروتئین‌های مختلف در آن دخیل هستند. پروتئین Bcl₂ که شامل پروتئین مهارکننده است از تنظیم‌کننده اساسی این فرآیند به‌شمار می‌رود و همچنین پروتئین پیش‌برنده BAX در پیشرفت فرآیند آپوپتوز نقش دارد. لذا این پژوهش با هدف مطالعه اثر زئولیت، اسید آرگانیک و نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت بر بیان ژن‌های آپوپتوز BAX و Bcl₂ در جوجه‌های گوشتی انجام شد.

مواد و روش‌ها: این آزمایش با استفاده از ۴۵۰ قطعه جوجه گوشتی یک روزه سویه کاب ۵۰۰ در پنج تیمار و شش تکرار با ۱۵ قطعه جوجه در هر تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی، انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) تیمار شاهد (C)، (۲) تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد زئولیت (Z)، (۳) تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد زئولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانو نقره (NS)، (۴) تیمار شاهد مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسید آرگانیک (NOA) و (۵) تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد زئولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانو نقره و ۰/۱۵ درصد اسید آرگانیک (NSOA) بودند. جهت بررسی سطوح بیان نسبی ژن‌های Bcl₂ و BAX در روزهای ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش نمونه‌برداری از کبد صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بیان ژن Bcl₂ در جوجه‌های گوشتی دریافت‌کننده تیمار زئولیت در روز ۲۱ دوره پرورش و تیمار نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت در روز ۴۲ دوره پرورش در مقایسه با میزان بیان این ژن در تیمار شاهد به‌صورت معنی‌داری در بافت کبد افزایش یافت (p < ۰/۰۵). همچنین بیان ژن BAX بافت کبد در تیمار NS و تیمار نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت مکمل شده با اسید آرگانیک (NSOA) در روز ۴۲ دوره پرورش در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p < ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که اثر افزایشی بر بیان ژن‌های Bcl₂ و BAX توسط تیمارهای زئولیت و NS و NSOA احتمالاً می‌تواند در تنظیم فرآیند آپوپتوز در طی شرایط تنش‌های اکسایشی نقش داشته باشند. این در حالی است که این اثر در تیمار اسید آرگانیک مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، جوجه‌های گوشتی، ژن BAX، ژن Bcl₂، نانوذرات نقره

مقدمه

از دهه‌های قبل، آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان، پیشگیری از بیماری‌ها و بهبود رشد و سلامت در جیره دام و طیور به‌طور گسترده‌ای در سرتاسر جهان استفاده می‌گردید، اما به دلیل خطر احتمالی در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروب‌های بیماری‌زا به‌کارگیری آنها به‌عنوان محرک رشد و سلامت از سال ۲۰۰۶ منع شده است (Hashemi and Davoodi, 2012). نانوذرات نقره یکی از دستاوردهای جدید در فناوری نانو است که به علت فعالیت ضد میکروبی در زمینه‌هایی مانند پزشکی، دامپزشکی، کشاورزی و داروسازی کاربرد دارد (Choi et al., 2009). مهم‌ترین دلایل استفاده گسترده از نانوذرات نقره ویژگی‌های ضدباکتریایی، پایداری بالا و از بین بردن باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است و استفاده آن در پرورش دام و طیور مورد توجه قرار گرفته است و اعتقاد بر این است که استفاده از نانوذرات نقره می‌تواند مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و واکسن‌ها را محدود کند یا به صفر برساند. همچنین این مواد به دلیل خواص ضدباکتریایی بیشترین سهم نانو مواد را در جهان به‌خود اختصاص می‌دهند (Choi et al., 2009). اسید آرگانیک یکی از افزودنی‌های خوراکی است که دارای خواص ضدباکتریایی بوده و به‌عنوان کنترل‌کننده‌ی عوامل بیماری‌زا

در خوراک و آب طیور می‌باشد (Ricke, 2003) که سبب کاهش تولید متابولیت‌های سمی، جلوگیری از تشکیل باکتری‌های مضر در روده و در نهایت موجب بهبود عملکرد طیور می‌شود (Roth and Kirchgessner, 1998). زئولیت از جمله مواد کانی است که با داشتن خواص فیزیکی و شیمیایی، کاربرد وسیعی در بهبود بازده دام و طیور پیدا کرده است که به‌عنوان حمل‌کننده‌ای مناسب برای نانوذرات نقره در نانو تکنولوژی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. نانوذرات نقره باعث بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش و موجب بهبود بازده استفاده از انرژی و پروتئین می‌گردد. همچنین نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت باعث بهبود برخی خصوصیات مورفولوژی روده و سبب بهبود ضریب تبدیل غذایی و استفاده از نانوذرات در سطح ۰/۵ درصد باعث افزایش وزن سینه جوجه گوشتی می‌شود. ممکن است نانوذرات نقره با تولید رادیکال‌های آزاد منجر به آسیب سیستم ایمنی در طیور گردد، اما استفاده از ۵۰ قسمت در میلیون در نانوذرات نقره در جیره‌ی جوجه گوشتی سیستم ایمنی آنها را به‌خطر نمی‌اندازد و می‌تواند به‌عنوان افزودنی در خوراک طیور مورد استفاده قرار گیرد (Abbasi et al., 2018; Bolandi et al., 2021; Hashemi et al., 2017; Hashemi et al., 2014). آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی

شده سلول با ویژگی‌های متمایز مورفولوژی و مکانیزم‌های بیوشیمیایی وابسته به انرژی مشخص می‌شود و عمده‌ترین شکل خودکنشی سلول است که بدون آسیب به سلول‌ها و یا بافت‌های اطراف باعث حذف سلول‌های ناخواسته، آسیب دیده و یا خطرناک می‌شود (Raff, 1992). این سیستم حذف سلولی برای حفظ تعادل بافتی، هم در دوران جنینی و هم در دوران بلوغ، لازم است و همچنین در بیماری‌های مختلف انسانی مثل سرطان، بیماری‌های خودایمنی و بیماری‌های با کاهش سلولی مانند پارکینسون و آسیب کبدی نقش دارد (Fischer and Schulze-Osthoff, 2005). نانوذرات نقره می‌تواند با ماکرومولکول‌های زیستی وارد واکنش شده و با اختلال در هموستاز داخل سلولی سبب القای فرآیند آپوپتوزی گردد (Sun et al., 2013). اخیراً دریافته‌اند که ایجاد تنش‌های اکسایشی باعث تغییر در بیان ژن‌ها و القای آپوپتوز می‌شود. تنظیم آپوپتوز بسیار پیچیده بوده و پروتئین‌های مختلف در آن دخیل هستند. خانواده پروتئینی Bcl₂ که شامل پروتئین مهارکننده است، از تنظیم‌کننده اساسی این فرآیند به شمار می‌رود. اعضا خانواده به دو گروه پیش‌برنده (BAX, Bad) و مهارکننده (Bcl₂) آپوپتوز تقسیم می‌شوند (Ricci and Zong, 2006). در آپوپتوز آنزیم کاسپاز به دو گروه شروع‌کننده و عمل‌کننده تقسیم می‌شود. بدین جهت با توجه به این‌که تحقیقاتی در زمینه سلولی و مولکولی در مورد اثر نانوذرات نقره بر بیان ژن‌های آپوپتوز و مرگ سلولی صورت نگرفته است، این پژوهش به منظور بررسی اثر ژئولیت، اسید آرگانیک و نانوذرات نقره پوشش داده شده بر ژئولیت با و بدون تنش گرمایی بر بیان ژن‌های آپوپتوز BAX و Bcl₂ در جوجه‌های گوشتی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

اسید آرگانیک مورد استفاده در این تحقیق بایوترونیک اس. ای. فورت (Biotronic SE forte) محصولی از شرکت بایومین‌های ایتوک فردا از کشور اتریش بوده و ترکیبات آن شامل اسید فرمیک و اسید پروپیونیک می‌باشد. ژئولیت مورد استفاده در این آزمایش از چینه‌های ژئولیتی از منطقه استان سمنان به دست آمد. سنگ ژئولیتی استحصالی پودر و الک شد تا ذراتی به اندازه ۲-۱ میلی‌متر تولید شود. آب مقطر برای شستشو و حذف آلودگی از ذرات استفاده شد و متعاقباً در دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد در تمام طول شب در کوره خشک شد. فرمول شیمیایی ژئولیت خالص (K₂, Na₂, Ca, Mg)₃ Al₆Si₃₀O₇₂. 24H₂O بود. ژئولیت مورد استفاده با تکنیک فلورسانس اشعه ایکس (XRF) برای تعیین ترکیب شیمیایی آنها مورد بررسی قرار گرفت و داده‌های XRF جمع‌آوری شده بر روی یک طیف‌سنج XRF PHILIPSPW1480 با لوله Rh آنالیز شدند (جدول ۱).

جهت تهیه نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر ژئولیت با درصد موردنیاز ابتدا هر کیلو ژئولیت در آب مقطر توسط دستگاه

همزن به مدت یک ساعت هم زده شد و pH آن در محدوده ۷-۵ ثابت نگه داشته شد و سپس نانو نقره آماده با درصد موردنظر پس از تنظیم pH به مخلوط اضافه شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و فشار دو اتمسفر مخلوط کردن ادامه یافت و تثبیت کننده‌های موردنظر تا تغییر رنگ به قهوه‌ای اضافه گردید و پس از ته‌نشین شدن، مخلوط ماده ته‌نشین شده در دمای محیط و دور از نور خورشید خشک گردید. نانو ذرات حاصله برای تعیین اندازه، خواص ساختاری، مورفولوژی و ریخت‌شناسی با دستگاه‌های پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی (FESEM, Mira, XMU-3) و آنالیز عنصری نمونه‌های سنتز شده برای به دست آوردن اطلاعات ساختاری به وسیله روش SEM-EDX در مرکز پژوهش متالورژی رازی، (Razi Metallurgical Research Center, Iran) مورد آنالیز و بررسی قرار گرفتند. همچنین تجزیه و تحلیل گروه‌های عاملی با استفاده از فن‌های طیف‌سنجی زیر قرمز تبدیل فوری (FTIR)، به منظور شناسایی گروه‌های عاملی در ژئولیت، ژئولیت پوشش داده شده بر نانو نقره انجام شد. برای اندازه‌گیری محتوای نقره (Ag) ژئولیت از روشی که توسط کولسنگ و همکاران (۲۰۱۰) توضیح داده شده است استفاده شد (Kulthong et al., 2010). به طور خلاصه، ۲/۳-۰/۱ گرم نمونه در ۵ میلی‌لیتر اسید نیتریک (HNO₃) ۱۴/۴ مولار توسط مایکروویو هضم شد تا تمام محتوای نقره حل شود. چرخه تابش مایکروویو ۲۵۰ وات (۵ دقیقه)، ۴۰۰ وات (۵ دقیقه) و ۶۰۰ وات (۵ دقیقه) بود. سپس نمونه هضم شده خشک شد و با ۲۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه رقیق شد تا بتوان مقدار نقره را توسط طیف‌سنجی جذب اتمی (Perkin Elmer Analyst 300, Waltham, MC) مجهز به کوره گرافیتی (GFAAS) تعیین کرد.

همچنین آزمایشات مزرعه‌ای این پژوهش، در ایستگاه تحقیقات طیور دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان واقع در مزرعه آموزشی پژوهشی شماره ۱، به مدت ۴۲ روز با ۴۵۰ قطعه جوجه گوشتی یک روزه سویه کاب ۵۰۰ (Cobb 500) در پنج تیمار و شش تکرار و در هر واحد آزمایشی ۱۵ قطعه انجام شد. شرایط پرورش برای همه تیمارها یکسان اجرا گردید و به منظور اعمال تنش گرمایی در هفته آخر دوره پرورش دمای سالن روزانه به مدت ۴ ساعت از ساعت ۱۲ الی ۱۶ در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) جیره پایه را بدون مکمل دریافت کردند (تیمار شاهد (C)، (۲) جیره پایه مکمل شده با یک درصد ژئولیت (Z)، (۳) تیمار شاهد مکمل شده با یک درصد ژئولیت پوشش داده شده با ۰/۱۵ درصد نانو نقره (NS)، (۴) جیره پایه مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسید آرگانیک (OA) و (۵) جیره پایه مکمل شده با یک درصد ژئولیت پوشش داده شده با ۰/۱۵ درصد نانو نقره و ۰/۱۵ درصد اسید آرگانیک (NSOA) انجام شد. جیره‌های غذایی بر اساس توصیه سویه کاب ۵۰۰ برای دوره آغازین (۱ تا ۲۱ روزگی) و رشد (۲۲ تا ۴۲ روزگی) تهیه شد (جدول ۲).

جدول ۱- خلاصه آنالیز ترکیب شیمیایی ژئولیت با استفاده از تکنیک فلورسانس اشعه ایکس (XRF)

Table 1. Summary of chemical composition analysis of zeolite using X-ray Fluorescence (XRF)¹ technique

| اجزای تشکیل دهنده | Constituents | درصد وزنی (%) | Weight percent (%) |
|--------------------------------|--------------|---------------|--------------------|
| SiO ₂ | 68.95 | | |
| Al ₂ O ₃ | 14.11 | | |
| Fe ₂ O ₃ | 0.97 | | |
| CaO | 4.83 | | |
| Na ₂ O | 0.95 | | |
| K ₂ O | 0.90 | | |
| MgO | 0.79 | | |
| TiO ₂ | 0.20 | | |
| MnO | 0.011 | | |
| P ₂ O ₅ | 0.012 | | |
| SO ₃ | 0.068 | | |
| L.O.I ² | 10.64 | | |
| Si/Al | 4.81 | | |
| Ag ³ | <5ppm | | |

¹ فلورسانس اشعه ایکس (XRF PHILIPS PW1480) با لوله آنالیز Rh شد.² از دست دادن در هنگام احتراق (LOI: loss on ignition)³ محتوای نقره توسط طیف سنجی جذب اتمی (Perkin Elmer Analyst 300, Waltham, MC) مجهز به کوره گرافیتی (GFAAS) تعیین شد.¹ X-ray fluorescence (XRF PHILIPS PW1480) was analyzed with a Rh tube.² Loss on ignition (LOI: loss on ignition)³ The silver content was determined by atomic absorption spectrometry (Perkin Elmer Analyst 300, Waltham, MC) equipped with a graphite furnace (GFAAS).جدول ۲- ترکیب جیره‌های غذایی (برحسب درصد ماده خشک مصرفی)^۱Table 2. Composition of experimental diets (DMI)¹

| اجزای جیره غذایی | Ingredients | جیره آغازین (۱-۲۱) | جیره رشد (۳۲-۴۲) |
|--|------------------------------------|--------------------|------------------|
| | | Starter (1-21) | Grower (22-42) |
| ذرت | Yellow corn | 51.6 | 57.84 |
| کنجاله سویا | Soybean meal | 39.95 | 33.68 |
| روغن سویا | Soybean oil | 3.69 | 4.11 |
| ژئولیت پوشش داده شده با نانونقره (%) | Zeolite coated with nanosilver (%) | 1 | 1 |
| دی کلسیم فسفات (DCP) | Dicalcium phosphate | 1.47 | 1.09 |
| سنگ آهک | Limestone | 1.18 | 1.28 |
| نمک | Salt | 0.43 | 0.32 |
| مکمل ویتامینی ^۲ | Vitamin premix | 0.25 | 0.25 |
| مکمل معدنی ^۳ | Mineral premix | 0.25 | 0.25 |
| DL-متیونین | DL-Methionine | 0.13 | 0.05 |
| L-لیزین | L-Lysine | 0.05 | 0.13 |
| آنالیز مواد مغذی | Chemical analysis | | |
| انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری/کیلوگرم) | ME (Kcal/kg) | 2950 | 3050 |
| پروتئین خام (CP) (%) | | 21.2 | 19.06 |
| کلسیم (Ca) (%) | | 0.92 | 0.86 |
| فسفر (P) (%) | | 0.41 | 0.33 |
| سدیم (Na) (%) | | 0.18 | 0.14 |
| لیزین (Lys) (%) | | 1.01 | 0.95 |
| متیونین (Met) (%) | | 0.47 | 0.36 |
| سیستئین (Cys) (%) | | 0.36 | 0.37 |
| آرژینین (Arg) (%) | | 1.45 | 1.27 |
| ترئونین (Thr) (%) | | 0.84 | 0.74 |

^۱ جیره بر پایه راهنمایی سویه‌ی کاب ۵۰۰ تهیه شده است.^۲ هر کیلوگرم خوراک حاوی: ویتامین A، 1500 IU؛ کوله کلسیفرول، ۲۰۰ IU؛ ویتامین E، 10 IU؛ ریوفلاوین، ۳/۵ mg؛ پانتوتینیک اسید، ۱۰ mg؛ نیاسین، ۳۰ mg؛ کولین کلرید، ۱۰۰۰ mg؛ بیوتین، ۰/۱۵ mg؛ اسید فولیک، ۰/۵ mg؛ تیامین، ۱/۵ mg؛ پیریدوکسین، ۰/۳ mg؛ آهن، ۸۰ mg؛ روی، ۴۰ mg؛ منگنز، ۶۰ mg؛ ید، ۰/۱۸ mg؛ مس، ۸ mg؛ سلنیوم، ۰/۱۵ mg؛ کوبالامین، ۱۵ μg.^۳The diet is prepared based on the guidance of the Cobb 500 strain.^۲Each kilogram of feed contains: vitamin A, 1500 IU; cholecalciferol, 200 IU; Vitamin E, 10 IU; riboflavin, 3.5 mg; pantothenic acid, 10 mg; Niacin 30 mg; choline chloride, 1000mg; biotin, 0.15 mg; folic acid, 0.5 mg; thiamine, 1.5 mg; pyridoxine, 0.3 mg; iron, 80 mg; zinc, 40 mg; Manganese, 60 mg; Iodine, 0.18 mg; copper, 8mg; Selenium, 0.15 mg; cobalamin, 15 μg.

مولکولی ابتدا Total RNA با استفاده از کیت استخراج تریزول (TRIZOL) ساخته شرکت سیگما آلدردیج (Sigma Aldrich) استخراج و برای تعیین کیفیت RNA استخراجی از بافت‌ها، از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد (شکل ۱). برای اطمینان از خلوص RNA استخراجی و عدم وجود آلودگی‌های DNA ژنومی، از آنزیم DNaseI بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز استفاده گردید. پس از آن، سنتز cDNA به‌عنوان الگوی

نمونه‌برداری در روزهای ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش، پس از کالبدشکافی از بافت کبد برای بررسی میزان بیان ژن (۳ تکرار بیولوژیک و ۳ تکرار تکنیکال) انجام شد. بدین‌منظور کبد را از اتصالات احشایی آزاد کرده و در مرحله بعد قطعه‌ای به‌طول ۲ سانتی‌متر جدا گردید. قطعه جداشده جهت تثبیت در محلول فرمالین رقیق شده ۱۰ درصد قرار داده شد و پس از انتقال به میکروتیوب به ازت مایع منتقل شد. برای انجام آزمایشات

iQ5 اپتیکیال انجام شد. با بررسی منحنی‌های ذوب و کسب اطمینان از عمل اختصاصی آغازگرها، تفاوت نسبی نمونه‌های مورد آزمایش در مقابل نمونه کنترل با فرمول $3^{-\Delta\Delta C_t}$ برابر است با ΔC_t (هدف منهای ΔC_t مرجع) محاسبه شد و این داده‌های حاصل از واکنش (C_t) با استفاده از نرم‌افزار Excel، به بیان نسبی ژن موردنظر به ژن مرجع بتا اکتین تبدیل شد (Livak and Schmittgen, 2001). در پایان اعداد به‌دست آمده در نرم‌افزار Excel مرتب و شکل آنها رسم گردید. آنالیز داده‌های آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه واریانس شدند و مقایسه‌ی میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($p < 0.05$) انجام گرفت (SAS, Institute).

اولیه از روی mRNA بالغ به‌عنوان الگو، با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس برای واکنش RT-PCR انجام گرفت. برای نرمال‌سازی نتایج qRT-PCR از ژن مرجع بتا اکتین استفاده و برای بررسی بیان ژن هدف و ژن مرجع، آغازگرهای اختصاصی برای هر ژن با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 و Allele ID و براساس توالی ژن‌های موردنظر در سایت NCBI طراحی شدند و سنتز آن‌ها توسط شرکت پیشگامان انجام شد (جدول ۳). تعیین کمیت نسبی در Real time (۳ بار) RT-PCR بوسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع نور فلورسنت، در نتیجه اتصال رنگ SYBR Green انجام گرفت. در این مرحله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای نمونه‌های cDNA حاصل از بافت کبد، برای ژن‌های BAX و Bcl2 و ژن مرجع بتا اکتین، بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از دستگاه بایورد (BioRad) و نرم‌افزار

جدول ۳- اسامی ژن‌ها و توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Real time-PCR

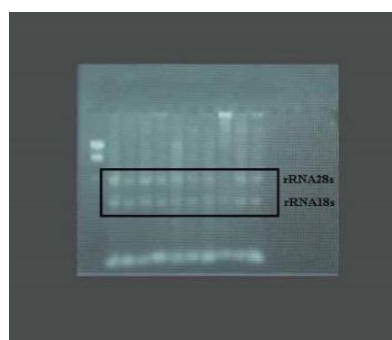
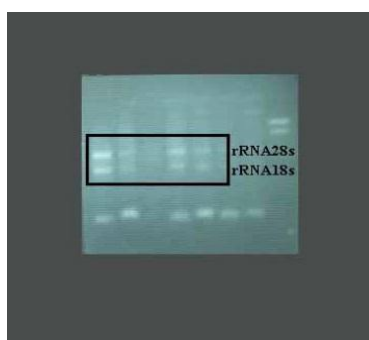
Table 3. Names of the genes and primer sequences used in real-time PCR reaction

| نام پرایمر (Primer name) | توالی پرایمر (Primer sequence) | TM °C | طول محصول (Length) (bp) |
|--------------------------|----------------------------------|-------|-------------------------|
| Beta Actin | F: 5'- AAGTTACTCGCCTCTGTGAA-3' | 56.1 | 198 |
| | R: 5'- CACATCTATCACTGGGAAC-3' | 55.1 | |
| BAX | F: 5'- CAGTCATTGTCTCTCTCTTCA-3' | 57.03 | 157 |
| | R: 5'- GCTCCATAGATGTACTCCTCAG-3' | 57.22 | |
| Bcl2 | F: 5'- CAGGTGTGTGATGTATGTC-3' | 60.2 | 132 |
| | R: 5'- TTGATTGAAGATGGTGTATGTC-3' | 60.1 | |

RNAهای ریبوزوم ۲۸S و ۱۸S در محدوده‌ی ۲۰۰۰-۱۰۰۰ جفت‌بازی به‌طور کاملاً واضح و مشخص دیده شد که نشان دهنده‌ی خلوص و کیفیت بالای RNA تخلیص شده و عدم ایجاد شکستگی و آسیب در ساختار RNA است. در شکل زیر نتیجه‌ی الکتروفورز برخی نمونه‌های RNA آورده شده است.

نتایج و بحث

استخراج RNA به‌وسیله‌ی کیت استخراج تریزول شرکت سیگما تهیه گردید و کیفیت آن با قراردادن نمونه‌های استخراج شده بر روی ژل آگارز یک‌درصد تأیید شد. باندهای rRNA28s و rRNA18s به‌وضوح مشاهده شد و تمامی نمونه‌ها دارای الگوی نواری مناسبی بر روی ژل آگارز بودند. همچنین



شکل ۱- باندهای تشکیل شده مربوط به استخراج RNA از بافت کبد بر روی ژل آگارز

Figure 1. The bands formed related to the extraction of the RNA of liver tissue on agarose gel

ژن Bcl2 در بافت کبد را داشته و در مقایسه با تیمار شاهد (C) دارای تفاوت معنی‌داری بوده است ($p < 0.05$). همچنین دیگر تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد (C) در بیان ژن Bcl2 نداشته‌اند ($p > 0.05$).

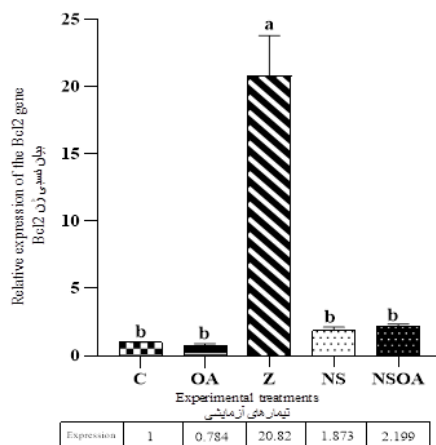
شکل ۳ سطح بیان ژن Bcl2 در بافت کبد جوجه‌های تغذیه شده با تیمارهای آزمایشی در روز ۴۲ دوره پرورش را نشان می‌دهد. نتایج ارزیابی از بیان این ژن بیانگر آن است که تیمارهای نانوذرات نقره پوشش داده شده بر ژئولیت (NS) و

نتایج میزان بیان نسبی ژن‌های Bcl2 و BAX بافت کبد در روزهای ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش با و بدون تنش گرمایی در شکل‌های ۲ تا ۵ آورده شده است.

بیان نسبی ژن Bcl2 در بافت کبد در روز ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش

اثر تیمارهای آزمایشی بر بیان نسبی ژن Bcl2 بافت کبد در روز ۲۱ دوره پرورش در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصله نشان داد که تیمار ژئولیت (Z) بیش‌ترین میزان بیان

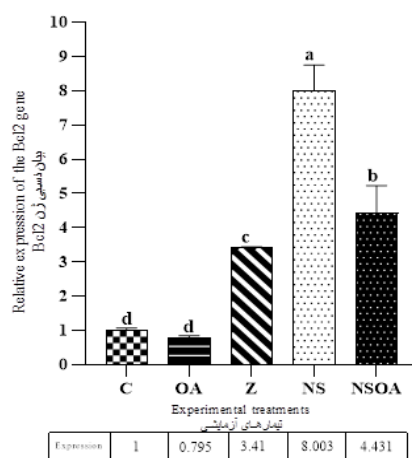
نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت مکمل شده با اسید آرگانیک (NSOA) و زئولیت (Z) به ترتیب دارای بیان افزایشی معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بوده است ($p < 0.05$). تیمار اسید آرگانیک (OA) تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشته است ($p > 0.05$).



شکل ۲- بیان نسبی ژن Bcl2 در روز ۲۱ دوره پرورش در بافت کبد

Figure 2. Relative expression of the Bcl2 gene on day 21 of the breeding period in liver tissue
C: شاهد، OA: اسید آرگانیک، Z: زئولیت، NS: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت و NSOA: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت مکمل شده با اسید آرگانیک

C: control, OA: basal diet supplemented by organic acid, Z: basal diet supplemented by zeolite, NS: basal diet supplemented by zeolite coated with nanosilver, NSOA: basal diet supplemented by zeolite coated with nanosilver and organic acid



شکل ۳- بیان نسبی ژن Bcl2 در روز ۴۲ دوره پرورش در بافت کبد

Figure 3. Relative expression of the Bcl2 gene on day 42 of the breeding period in liver tissue
C: شاهد، OA: اسید آرگانیک، Z: زئولیت، NS: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت و NSOA: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت مکمل شده با اسید آرگانیک

C: control, OA: basal diet supplemented by organic acid, Z: basal diet supplemented by zeolite, NS: basal diet supplemented by zeolite coated with nanosilver, NSOA: basal diet supplemented by zeolite coated with nanosilver and organic acid

تیمار شاهد دارای تفاوت معنی‌داری بود ($p < 0.05$). همچنین میزان بیان این ژن در تیمار NSOA نیز در مقایسه با تیمار شاهد افزایش بیان معنی‌داری داشت ($p < 0.05$) اما در مقایسه با تیمار زئولیت دارای میزان بیان نسبی کمتری بوده است. همچنین میزان بیان این ژن در تیمار نانوذرات نقره نیز در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری داشته است. این در

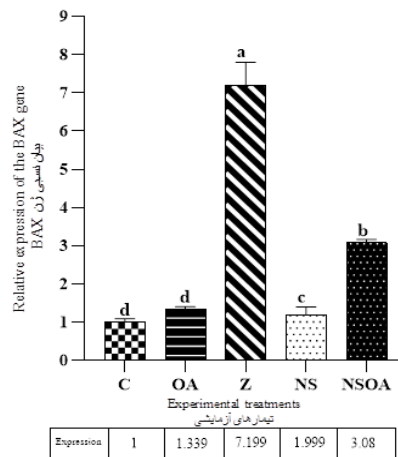
بیان نسبی ژن BAX در بافت کبد در روز ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش

میزان بیان نسبی ژن BAX بافت کبد در روز ۲۱ دوره پرورش در شکل ۴ نشان داده شده است. میزان بیان نسبی ژن BAX در روز ۲۱ دوره پرورش در بافت کبد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمار زئولیت در مقایسه با میزان بیان این ژن در

Z تغذیه کرده بودند دارای اختلاف معنی داری با تیمار شاهد در بیان نسبی ژن BAX داشتند ($p < 0.05$) به طوری که بیشترین بیان نسبی مربوط به تیمارهای NSOA و NS بوده است که از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند ($p > 0.05$). اختلاف معنی داری بین تیمار OA با تیمار شاهد در بیان نسبی ژن BAX در روز ۴۲ دوره پرورش مشاهده نشد ($p > 0.05$).

حالی است که بین جوجه‌های گوشتی دریافت کننده تیمار اسید آرگانیک و تیمار شاهد تفاوت معنی داری در میزان بیان نسبی ژن BAX مشاهده نشد ($p > 0.05$).

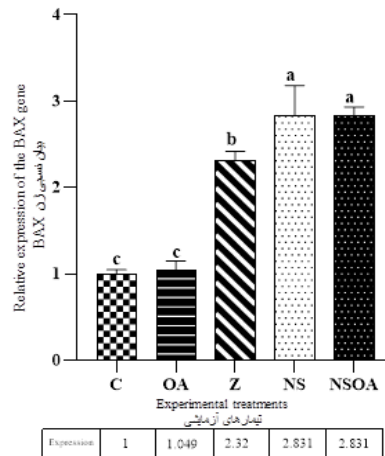
شکل ۵ میزان بیان نسبی ژن BAX را در روز ۴۲ دوره پرورش نشان می‌دهد. میزان بیان نسبی ژن BAX در جوجه‌های تغذیه شده با تیمارهای آزمایشی بیشتر از تیمار شاهد بود. به طوری که جوجه‌هایی که از تیمارهای NSOA و NS و



شکل ۴- بیان نسبی ژن BAX در روز ۲۱ دوره پرورش بافت کبد

Figure 4. Relative expression of the BAX gene on day 21 of the breeding period in liver tissue
C: شاهد، OA: اسید آرگانیک، Z: زئولیت، NS: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت و NSOA: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت مکمل شده با اسید آرگانیک

C: control, OA: basal diet supplemented by organic acid, Z: basal diet supplemented by zeolite, NS: basal diet supplemented by zeolite coated with nanosilver, NSOA: basal diet supplemented by zeolite coated with nanosilver and organic acid



شکل ۵- بیان نسبی ژن BAX در روز ۴۲ دوره پرورش بافت کبد

Figure 5. Relative expression of the BAX gene on day 42 of the breeding period in liver tissue
C: شاهد، OA: اسید آرگانیک، Z: زئولیت، NS: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت و NSOA: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت مکمل شده با اسید آرگانیک

C: control, OA: basal diet supplemented by organic acid, Z: basal diet supplemented by zeolite, NS: basal diet supplemented by zeolite coated with nanosilver, NSOA: basal diet supplemented by zeolite coated with nanosilver and organic acid

را تحت تأثیر قرار دهد (Soto et al., 2005; Soto et al., 2008). طی تحقیقات انجام شده نانو ذرات نقره موجب کاهش فعالیت میتوکندری و افزایش معنی‌دار سطح سرمی لاکتات دهیدروژناز می‌شوند که این امر نشان‌دهنده تخریب سلولی است. همچنین می‌توانند با تغییر در مورفولوژی و نفوذپذیری غشا وارد سلول شده و با تغییر ماده ژنتیکی و اختلال در تقسیم سلولی، سبب مرگ سلول‌ها شوند (Rezazadeh-Reyhani et al., 2015). مشخص شده است نانو ذرات نقره پس از ورود به جریان خون، در بافت‌های مختلف انباشته شده و موجب آسیب کبدی، کلیوی و نیز موجب آسیب بافت بیضه می‌شوند (Tang and Xi, 2008). فوشچیان و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که تجویز داخل صفاقی نانو ذرات نقره در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ قسمت در میلیون باعث افزایش آپوپتوز سلول هیپوکامپ و بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl₂ را کاهش می‌دهد (Ghooshchian et al., 2017). نل و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که بسیاری از پارامترها شامل یونیزاسیون، شکل، اندازه و ساختار کریستالی در توزیع سمیت نانو ذرات مؤثر می‌باشند (Nel et al., 2006). تحقیقات گسترده‌ی دیگری نشان داده است که هر چه قطر نانو ذرات کمتر باشد، سطح آن‌ها بیشتر شده و قدرت نفوذ آن‌ها به سلول‌ها و اثرات مولکولی آن بر سازوکارهای داخل سلولی افزایش می‌یابد (Buzea et al., 2006; Mohanraj and Chen, 2007). تغییر در بیان ژن‌های مختلف تحت تأثیر نانو نقره در مناطق مختلف مغز توسط رحمان و همکاران مطرح شده است، به طوری که نانو ذرات نقره موجب تولید ROS و القای تنش اکسیداتیو و در نهایت منجر به آسیب اکسیداتیو DNA می‌شود (Buzea et al., 2007). همچنین هیلدمان و همکاران نشان دادند که بیان بالای Bcl₂ می‌تواند سلول‌ها را از آپوپتوز حاصل از ROS محافظت کند. با این حال سازوکاری که Bcl₂ توسط آن سلول را از آپوپتوز به وجود آمده به وسیله‌ی ROS محافظت می‌کند را ناشناخته ارزیابی کردند. این محققان، معتقد بودند که Bcl₂ خود فعالیت آنتی‌اکسیدانی انجام نمی‌دهد اما ممکن است که فعالیت غیرمستقیمی در افزایش سطوح و یا فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در داخل سلول داشته باشد و بنابراین بیان بالای Bcl₂ به سلول‌ها اجازه‌ی مقابله‌ی بهتر با اثرات ROS را می‌دهد و این اجازه به وسیله‌ی افزایش در آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به دست می‌آید (Hildeman et al., 2003). پروتئین‌های خانواده‌ی Bcl₂ یکپارچگی غشا خارجی میتوکندری را حفظ می‌کند و از اعضاء آنتی‌آپوپتوتیک و پروآپوپتوتیک تشکیل شده‌اند. این خانواده آزاد شدن سیتوکروم C به درون سیتوزول و در نتیجه فعال شدن کاسپاز-۳ را تنظیم می‌کنند (Ghooshchian et al., 2016). کاهش بیان ژن Bcl₂ با افزایش دوز نانو ذرات نقره در هیپوکامپ مغز موش‌های صحرایی به دنبال تزریق نانو نقره به صورت درون صفاقی گزارش شده است. پروتئین BAX تنظیم‌کننده آپوپتوز، یک پروتئین است که در جانوران توسط ژن BAX کدگذاری می‌شود. این مولکول، نخستین عضو ایجادکننده آپوپتوز شناخته شد. در حالت عادی، این پروتئین در سیتوزول سلول‌ها واقع شده است. داروهایی که BAX را فعال می‌کنند، داروهای نویدبخشی در درمان سرطان

نقره در ابعاد نانو بر متابولیسم، تنفس و تولیدمثل میکروارگانیسم اثر می‌گذارد. یکی از خواص آن تولید رادیکال‌های آزاد یا واکنش‌گر اکسیژن می‌باشد که سبب پراکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌های غشایی و اختلال در ورود و خروج انتخابی غشاها، تولید متابولیت‌های ثانویه و در نهایت مرگ عوامل پاتوژن یا بیماری‌زا می‌گردد. در یک بررسی انجام گرفته در شرایط آزمایشگاهی، اثر ضد باکتریایی نانو ذرات نقره را بر ۶۵۰ میکروارگانیسم از جمله استافیلوکوکوس، سودوموناس و باسیلوس نشان داده است (Choi et al., 2009). اعضای خانواده Bcl₂ به دو گروه پروآپوپتوزی و ضد آپوپتوزی تقسیم می‌شود و نسبت بیان بین این دو گروه نشان می‌دهد که بقا یا مرگ سلول اتفاق بیافتد. گروه ضد آپوپتوزی مانند Bcl₂، Bcl-XL با مهار کردن پروتئین‌های پروآپوپتوزی باعث بقا سلول می‌شوند. گزارش شده است که سطح بیان ژن Bcl₂ بافت کبد در گروه تحت تیمار با نانو ذرات نقره ۲۰۰ قسمت در میلیون در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت. کبد، اندام مرکزی برای تجزیه، سم‌زدایی و دفع مواد زائد از بدن است. طی عمل سم‌زدایی، فعال‌سازی میکروزوم‌های کبدی توسط آنزیم‌های سیتوکروم P450، سبب ایجاد متابولیت‌های ثانویه سمی و فعال می‌شود. این ترکیبات می‌توانند موجب آسیب بافت‌های مختلف از جمله کبد شوند (Gissen and Arias, 2015). مطالعه‌ای دیگر نشان داد که نانو ذرات نقره با تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن سمیت ایجاد می‌کند و سبب آسیب بافت کبد می‌شود. همچنین عنوان شد رادیکال‌های آزاد حاصل از نانو ذرات نقره با عملکرد آن سبب آسیب بافت کبد و متعاقباً منجر به افزایش غلظت پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش سیالیت غشا و از بین رفتن ساختمان و آنزیم‌های کبدی در خون می‌شوند (Seyedalipour et al., 2015). سنایی و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که والپروئیک اسید به طور معنی‌داری باعث مهار رشد سلولی، القای آپوپتوز، کاهش بیان ژن‌های Bcl₂ می‌گردد و به نظر می‌رسد والپروئیک اسید نقش آپوپتوزی خود را از طریق مسیرهای آپوپتوزی داخلی و خارجی در سرطان کبد ایفا می‌کند (Sanaei and Kavooosi, 2021). نشان داده شده است که بیان ژن‌های خانواده Bcl₂ در دو غلظت مورد بررسی در مغز نوزادان رت تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نشان ندادند ولی در مورد ژن کاسپاز ۸ در غلظت ۱۰ قسمت در میلیون در هر دو جنس نر و ماده میزان بالایی از بیان را نسبت به گروه کنترل نشان داد. این مشاهدات بر این موضوع دلالت می‌کند که نانو ذرات نقره سطح اولیه پیشرفت آپوپتوز یعنی بیان ژن را به واسطه‌ی عبور از سد خونی مغزی در یک روش وابسته به غلظت تحت تأثیر خود قرار داده و این القا نامناسب آپوپتوز می‌تواند بر روند تکوین طبیعی مغز جنین تداخل ایجاد کند. در سال ۲۰۰۵ و ۲۰۰۸، سوتو و همکاران بعد از انجام آزمایشات گسترده اعلام کردند که برخی نانو مواد (به ویژه نانو ذرات نقره) و داروهایی که از آن ساخته می‌شوند چه به صورت خوراکی و چه به صورت تماس پوستی می‌توانند یک تهدید مهم برای سلامتی جوامع انسانی باشند. استفاده‌ی درازمدت از این مواد بدون در نظر گرفتن عواقب آن می‌تواند زندگی موجودات زنده

نقره می‌تواند آنزیم‌های میتوکندریایی کاسپازی به‌ویژه کاسپاز ۳ را فعال و سبب القای فرآیند آپوپتوز شود (Khorasani et al., 2016). تحقیقات نشان داد نانوذرات نقره با تغییر در بیان ژن‌های دخیل در فرآیند آپوپتوز در سلول‌های هیپوکامپ موش صحرایی آپوپتوز را القا می‌کند. همچنین مشخص شد نانوذرات نقره می‌تواند موجب افزایش بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl2 و کاهش بیان ژن پروآپوپتوتیک BAX در هیپوکامپ موش‌های تحت تیمار با نانوذرات نقره شود (Ghooshchian et al., 2016).

به گزارش سوندی (۲۰۰۴) و هوات (۲۰۰۴) نانوذرات نقره می‌توانند باعث وقوع تنش اکسیداتیو و افت سلامت و سیستم ایمنی شوند (Hoet et al., 2004; Sondi and Salopek, 2004). گزارش شده است نانوذرات نقره قادرند در بافت‌های گوناگون بدن از جمله کبد، کلیه، بیضه، ریه و معده تجمع یابند (Huang et al., 2012). یکی از دلایل مربوط به آن می‌تواند باند شدن یون‌های نقره با سایر ماکرومولکول‌های موجود در بدن باشد. در گزارش‌های فلهگری و همکاران (۲۰۱۳) وزن کبد در جوجه‌های گوشتی در هنگام استفاده از نانوذرات نقره نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (Felehgari et al., 2013). کبد نخستین ارگانی است که مواد جذب شده از دستگاه گوارش را از طریق سیاهرگ باب دریافت می‌کند. نشان داده شده است که وجود نانوذرات نقره در جیره غذایی منجر به التهاب بافت کبد، انبساط سیاهرگ اصلی، افزایش میزان بافت پیوندی، از بین رفتن بافت مرکزی کبد، تغییر در بافت چربی و همچنین آپوپتوز در سلول‌های کبدی می‌شود (Celik and Erdogan, 2008; Loghman et al., 2012). همچنین احمدی و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که استفاده از ۴، ۸ و ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی منجر به ایجاد جراثیم، خونریزی و تخلیه مایع لنفی در بورس فابریسیوس می‌شود (Ahmadi et al., 2013).

نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج حاصل از این تحقیق، بیان نسبی ژن Bcl2 در بافت کبد در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمار آزمایشی نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت (NS) در روز ۴۲ دوره پرورش در مقایسه با تیمار شاهد (C) به‌صورت معنی‌داری افزایش یافته است ($p < 0.05$). همچنین بررسی حاصل از بیان ژن BAX در بافت‌های کبد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمار آزمایشی نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت (NS) تیمار نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت مکمل شده با اسید آرگانیک (NSOA) در روز ۴۲ دوره پرورش بدون تنش گرمایی در مقایسه با تیمار شاهد (C) به‌صورت معنی‌داری افزایش یافته است ($p < 0.05$). به‌طور کلی نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که اثر افزایشی بر بیان ژن‌های Bcl2 و BAX توسط تیمارهای زئولیت و NS و NSOA می‌تواند در تنظیم فرآیند آپوپتوز در طی شرایط تنش‌های اکسایشی نقش داشته باشند. این در حالی است که این اثر در تیمار اسید آرگانیک دیده نمی‌شود.

هستند. افزایش بیان نسبی ژن BAX بافت کبد در گروه‌های تحت تیمار با نانوذرات نقره، در این آزمایش، بیانگر این مطلب است که مسیر آپوپتوز احتمالاً در بافت کبد گروه‌های مذکور غیرفعال شده است. با توجه به اینکه نانوذرات نقره با بیان بیش از حد فاکتور نکروزکننده تومور آلفا موجب التهاب و شروع فرآیند آپوپتوز در بافت‌های مختلف، احتمالاً در کاهش التهاب ناشی از نانوذرات نقره و مهار آپوپتوز موثر است.

در راستای نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، گزارشات زیادی نشان داده است که افزایش بیان ژن BAX می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌ها، هم در شرایط برون‌تنی (*in vitro*) و هم در شرایط درون‌تنی (*in vivo*) القا کند (Podestà et al., 2000). به‌علاوه، مطالعات دیگری نشان داده‌اند که در شرایط تنش اکسیداتیو مانند دیابت میزان بیان mRNA ژن BAX افزایش می‌یابد (Celik and Erdogan, 2008) که می‌تواند توسط افزایش بیان ژن BAX و کاهش بیان Bcl2 باعث القای آپوپتوز در هیپوکامپ موش‌های دیابتی شود (Huang et al., 2012). تعدادی از آزمایشات، دخالت AgNPS را در اعمال سلولی که منجر به تولید ROS و القای تنش اکسیداتیو و در نهایت باعث سیتوتوکسیتی می‌شود نشان داده است. در این مطالعه نیز ممکن است با افزایش ژن BAX و از طرفی کاهش بیان ژن Bcl2 بعد از تیمار با نانوذرات نقره، ناپایداری غشاء میتوکندری افزایش یافته و در نتیجه نفوذپذیری آن نسبت به سیتوکروم C افزایش پیدا کرده است. لذا احتمال می‌رود که تزریق نانوذرات نقره باعث آسیب غشا میتوکندری و در نتیجه ایجاد آپوپتوز از طریق مسیر داخلی در هیپوکامپ موش صحرایی شده است. هرچند که مطالعات بعدی برای یافتن مسیری که نانوذرات نقره در آنها دخالت می‌کند، موردنیاز است. موافق با نتایج آزمایش حاضر، صدوقی و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که سطح بیان ژن BAX بافت کبد در گروه تحت تیمار با نانوذرات نقره ۲۰۰ قسمت در میلیون در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (Sadoughi, 2017). موافق با نتایج پژوهش حاضر قوشچیان و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که تجویز داخل صفاقی نانوذرات نقره در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ قسمت در میلیون باعث افزایش آپوپتوز سلول هیپوکامپ و بیان ژن BAX شد (Ghooshchian et al., 2017). نشان داده شده است که غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر روی مقدار آنزیم آلکالین فسفاتاز تاثیر معنی‌دار ندارد. به‌علاوه، تغییرات بافتی در دوز ۴۰۰ قسمت در میلیون از نانوذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل دیده شد و یافته‌ها نشان‌دهنده ایمن بودن این نانوذره در شرایط فوق برای فعالیت آنزیم مزبور می‌باشد همچنین نتایج هیستولوژیک در غلظت ۴۰۰ قسمت در میلیون از نانوذرات نقره احتمالاً نشان‌دهنده ایجاد آپوپتوز در بافت کبد می‌باشد. در پژوهشی که به بررسی اثرات آپوپتوتیک تزریق داخل صفاقی نانوذرات نقره بر مغز موش‌های آزمایشگاهی پرداخت، مشخص شد نانوذرات نقره سبب القای آپوپتوز در سلول‌های مغزی می‌شود. این اثر با افزایش دوزهای تزریقی نانوذرات نقره افزایش می‌یابد، ولی وابسته به طول مدت تزریق نیست (Ghooshchian et al., 2016). همچنین عنوان شد نانوذرات

تشکر و قدردانی

طیور و اساتید دانشکده علوم دامی، مسئولان آزمایشگاه‌های علوم دامی و تولید گیاهی که شرایط لازم جهت این پژوهش را فراهم نمودند کمال قدردانی و تشکر را داریم.

از همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و همچنین مسئولان ایستگاه تحقیقات

منابع

- Abbasi, A., Hashemi, S., Hassani, S., & Ebrahimi, M. (2018). Gastrointestinal microbial population response and performance of broiler chickens fed with organic acids and silver nanoparticles coated on zeolite under heat stress condition. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 8(4), 685-691.
- Ahmadi, F., Khah, M. M., Javid, S., Zarneshan, A., Akradi, L., & Salehifar, P. (2013). The effect of dietary silver nanoparticles on performance, immune organs, and lipid serum of broiler chickens during starter period. *International Journal of Biosciences*, 3(5), 95-100. doi.org/10.12692/ijb/3.5.95-100.
- Bolandi, N., Hashemi, S. R., Davoodi, D., Dastar, B., Hassani, S., & Ashayerizadeh, A. (2021). Performance, intestinal microbial population, immune and physiological responses of broiler chickens to diet with different levels of silver nanoparticles coated on zeolite. *Italian Journal of Animal Science*, 20(1), 497-504. doi.org/10.1080/1828051X.2021.1892546.
- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-MR71. doi.org/10.1116/1.2815690.
- Celik, S., & Erdogan, S. (2008). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects brain against oxidative stress and inflammation induced by diabetes in rats. *Molecular and cellular biochemistry*, 312, 39-46. doi.org/10.1007/s11010-008-9719-3.
- Choi, O., Clevenger, T. E., Deng, B., Surampalli, R. Y., Ross Jr, L., & Hu, Z. (2009). Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water research*, 43(7), 1879-1886. doi.org/10.1016/j.watres.2009.01.029.
- Felehgari, K., Ahmadi, F., Rokhzadi, A., Kurdestany, A. H., & Khah, M. M. (2013). The effect of dietary silver nanoparticles and inorganic selenium supplementation on performance and digestive organs of broilers during starter period. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci*, 2(8), 104-108.
- Fischer, U., & Schulze-Osthoff, K. (2005). New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacological reviews*, 57(2), 187-215. doi.org/10.1124/pr.57.2.6.
- Ghooshchian, M., Khodarahmi, P., & Tafvizi, F. (2016). Expression of apoptosis-related genes bcl-2 and bax in rat brain hippocampus, followed by intraperitoneal injection of nanosilver. *ISMJ*, 19(2), 185-193. Doi.org/10.18869/acadpub.ismj.19.2.185.
- Ghooshchian, M., Khodarahmi, P., & Tafvizi, F. (2017). Apoptosis-mediated neurotoxicity and altered gene expression induced by silver nanoparticles. *Toxicology and industrial health*, 33(10), 757-764. doi.org/10.1177/0748233717719195.
- Gissen, P., & Arias, I. M. (2015). Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *Journal of hepatology*, 63(4), 1023-1037. doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.015.
- Hashemi, S., Davoodi, D., & Dastar, B. (2017). Effect of clinoptilolite coated with silver nanoparticles on meat quality attributes of broiler chickens during frozen storage. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 7(2), 321-328.
- Hashemi, S., Davoodi, D., Dastar, B., Bolandi, N., Smaili, M., & Mastani, R. (2014). Meat quality attributes of broiler chickens fed diets supplemented with silver nanoparticles coated on zeolite. *Poultry Science Journal*, 2(2), 183-193.
- Hashemi, S., & Davoodi, H. (2012). Herbal plants as new immuno-stimulator in poultry industry: a review. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(2), 105-116. doi.org/10.3923/ajava.2012.105.116.
- Hildeman, D. A., Mitchell, T., Aronow, B., Wojciechowski, S., Kappler, J., & Marrack, P. (2003). Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 15035-15040. doi.org/10.1073/pnas.1936213100.
- Hoet, P. H., Brüske-Hohlfeld, I., & Salata, O. V. (2004). Nanoparticles—known and unknown health risks. *Journal of nanobiotechnology*, 2, 1-15. doi.org/10.1186/1477-3155-2-12.
- Huang, X., Wang, F., Chen, W., Chen, Y., Wang, N., & von Maltzan, K. (2012). Possible link between the cognitive dysfunction associated with diabetes mellitus and the neurotoxicity of methylglyoxal. *Brain Research*, 1469, 82-91. doi.org/10.1016/j.brainres.2012.06.011.
- Khorasani, N., Baharara, J., Iranbakhsh, A., & Ramezani, T. (2016). Apoptotic effects of silver nanoparticles coated with Zataria multiflora leaves extract on HepG2 cell line. *KAUMS Journal (FEYZ)*, 19(6), 457-467.
- Kulthong, K., Srisung, S., Boonpavanitchakul, K., Kangwansupamonkon, W., & Maniratanachote, R. (2010). Determination of silver nanoparticle release from antibacterial fabrics into artificial sweat. *Particle and fibre toxicology*, 7(1), 1-9. doi.org/10.1186/1743-8977-7-8.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408. doi.org/10.1006/meth.2001.1262.

- Loghman, A., Iraj, S. H., Naghi, D. A., & Pejman, M. (2012). Histopathologic and apoptotic effect of nanosilver in liver of broiler chickens. *African Journal of Biotechnology*, 11(22), 6207-6211. Doi.org/10.5897/AJB11.1768.
- Mohanraj, V., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles-a review. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 5(1), 561-573. Doi.org/10.4314/tjpr.v5i1.14634.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *science*, 311(5761), 622-627. Doi.org/10.1126/science.1114397.
- Podestà, F., Romeo, G., Liu, W.-H., Krajewski, S., Reed, J. C., Gerhardinger, C., & Lorenzi, M. (2000). Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *The American journal of pathology*, 156(3), 1025-1032. Doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64970-X.
- Raff, M. C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 356(6368), 397-400. doi.org/10.1038/356397a0.
- Rezazadeh-Reyhani, Z., Razi, M., Malekinejad, H., & Sadrkhanlou, R. (2015). Cytotoxic effect of nanosilver particles on testicular tissue: evidence for biochemical stress and Hsp70-2 protein expression. *Environmental toxicology and Pharmacology*, 40(2), 626-638. 10.1016/j.etap.2015.08.024.
- Ricci, M. S., & Zong, W.-X. (2006). Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *The oncologist*, 11(4), 342-357. Doi.org/10.1634/theoncologist.11-4-342.
- Ricke, S. (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry science*, 82(4), 632-639. doi.org/10.1093/ps/82.4.632.
- Roth, F., & Kirchgessner, M. (1998). Organic acids as feed additives for young pigs: Nutritional and gastrointestinal effects. *J. Anim. Feed Sci*, 7(Suppl 1), 25-33.
- SAS Institute, Inc. SAS user's guide. 6th ed. SAS Institute Inc. Cary, NC. 1989.
- Sadoughi, S. (2017). Effect of crocin on Bax/Bcl-2 ratio, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in liver tissue of chick embryo treated with silver nanoparticles. *Internal Medicine Today*, 23(4), 293-299 .
- Sanaei, M., & Kavooosi, F. (2021). Effect of valproic acid on extrinsic (DR4, DR5, FAS, FAS-L, TRAIL) and intrinsic (BAX, BAK and APAF1, Bcl-2, and Bcl-xL) apoptotic pathways ,cell viability and apoptosis in hepatocellular carcinoma PLC/PRF5 cell line. *Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences*, 24(6), 601-609 .
- Seyedalipour, B., Arefifar, A., Khanbabaee, R., & Hoseini, S. M. (2015). Toxicity investigating of silver nanoparticles on ALT, AST, ALP and histopathological changes in NMRI mice. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 25(124), 183-193.
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science*, 275(1), 177-182. doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012.
- Soto, K., Carrasco, A., Powell, T., Garza, K., & Murr, L. (2005). Comparative in vitro cytotoxicity assessment of some manufacturednanoparticulate materials characterized by transmissionelectron microscopy. *Journal of Nanoparticle Research*, 7, 145-169. doi.org/10.1007/s11051-005-3473-1.
- Soto, K., Murr, L., & Garza, K. (2008). Cytotoxic responses and potential respiratory health effects of carbon and carbonaceous nanoparticulates in the Paso del Norte airshed environment. *International journal of environmental research and public health*, 5(1), 12-25. doi.org/10.3390/ijerph5010012.
- Sun, J., Zhang, Q., Wang, Z., & Yan, B. (2013). Effects of nanotoxicity on female reproductivity and fetal development in animal models. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 9319-9337. doi.org/10.3390/ijms14059319.
- Tang, J., & Xi, T. (2008). Status of biological evaluation on silver nanoparticles. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi= Journal of biomedical engineering= Shengwu yixue gongchengxue zazhi*, 25(4), 958-961.