



بررسی بیان ژن فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا در بافت کبد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با زئولیت و نانوذرات نقره به عنوان شاخص القاء التهاب در تنفس گرمایی

الناز عربیان^۱, سیدرضا هاشمی^۲, احمد یامچی^۳, هما داوودی^۴ و شریف رستمی^۵

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- استادیار گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

(نویسنده مسouول: hashemi711@yahoo.co.uk)

۳- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۴- استادیار گروه اینمی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

۵- دانشجوی دکتری گروه فیزیولوژی دام، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵ تاریخ دریافت: ۹۸/۳/۱۲

صفحه: ۱۱۱ تا ۱۰۳

چکیده

تنفس گرمایی یکی از مهم‌ترین عامل سرکوب سیستم اینمی در طیور بوده و افزایش آن منجر به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و در نهایت تنفس اکسایشی در سلول‌هاست. از آنجایی که فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا به عنوان فاکتور پاسخ سریع سلولی به انواع استرس با منشأ درونی می‌باشد، بدین منظور پژوهشی جهت بررسی بین نسبی فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا با استفاده از ۴۵۰ قطعه جوجه گوشتی یکروزه سویه کاپ به مدت ۴۲ روز انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل (۱) تیمار شاهد، (۲) تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد زئولیت، (۳) تیمار شاهد مکمل شده با ۱۵ درصد اسید آرگانیک و (۴) تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد زئولیت پوشش داده شده با ۵۰ درصد نانو نقره، (۵) تیمار شاهد مکمل شده با ۱۵ درصد اسید آرگانیک پوشش داده شده با ۵۰ درصد نانو نقره مکمل شده با ۱۵ درصد اسید آرگانیک بودند. به ملاحظه اعمال تنفس گرمایی، از روز ۳۵ دوره پرورش، روزانه به مدت ۴ ساعت دمای سالن به ۳۴ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. نمونه‌برداری از بافت کبد در روزهای ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش انجام شد. نتایج نشان داد که بیان فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا در روز ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش با اعمال تنفس گرمایی سطح بیان نسبی جوجه‌های تغذیه شده با تیمار زئولیت افزایش معنی‌داری یافت. همچنین در روز ۴۲ بدون اعمال تنفس گرمایی سطح بیان نسبی فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمار نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت مکمل شده با اسید آرگانیک، در بافت کبد افزایش معنی‌داری یافت. بطور کلی نتایج نشان داد زئولیت و نانوذرات نقره به عنوان ماده غیرآلی و شیمیایی با منشأ خارجی در بدن شناسایی شده و کبد این مواد را به عنوان ماده زنوبیوتیک، افزایش دهنده بیان نسبی ژن‌های شاخص در مسیر استرس اکسایشی و التهاب شناسایی کرده است در حالی که این اثر در تیمار اسید آرگانیک دیده نشد.

واژه‌های کلیدی: نانو نقره، التهاب، فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا، اینمی، جوجه گوشتی

بیماری آرژریا که از رسوب دادن نقره ناشی می‌شود و تماس طولانی مدت با نقره و یا ترکیبات نقره موجب گسترش آن‌ها می‌گردد. به این علت و همچنین اثرات آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند پنی‌سیلین و سفالوپسپورین‌ها، شهرت نقره به عنوان یک عامل ضد عفونی‌کننده فراموش گردید (۲۶). با پیشرفت علم، فلز نقره با خواص و موفولوژی جدید با توجه به نتایج غیر رایج در تکنولوژی مهندسی جدید مطرح شد. اثرات ضد میکروبی نقره با تغییر در اندازه آن‌ها در سطوح نانو افزایش می‌یابد. نانو نقره ذرات، با اتصال به پروتئین حاوی گوگرد در سطح غشاء باکتری‌ها، وارد آن‌ها شده و با تغییر در موفولوژی و نفوذپذیری غشا و تأثیر در زنجیره تنفسی و تقسیم سلولی در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود (۲۳). همچنین ۵۶٪ از سهم نانوذرات جهان به نانوذرات نقره اختصاص یافته است (۲۰). ابعاد و اندازه بسیار کوچک نانو ذرات باعث عبور آسان از غشاء بیولوژیکی و اثر بر فیزیولوژی سلول شده است بطوریکه با کاهش قطر، سطح تماس افزایش یافته و اثرگذاری و قدرت نفوذ این ذرات بیشتر می‌شود (۲۳). علاوه بر این اندازه نانوذرات از فاکتورهای بسیار مهم در مقدار

مقدمه

فن‌آوری نانو، دانش شناسایی و سنتز مواد در ابعادی بین یک تا ۱۰۰ نانومتر است. نانومادر به دلیل اندازه‌ی کوچک ممکن است اثرات فیزیکی، شیمیایی و آنتی‌بیوتیکی جدیدی از خود نشان دهدن (۱۰). ذرات نانو به ذراتی اطلاق می‌شود که قطر آنها یا میانگین ابعاد آنها در حدود 10^{-9} یا یک میلیاردیم باشد. این ذرات به لحاظ ابعاد کوچک خود دارای خواص فیزیکی، شیمیایی، مکانیکی، الکتریکی و مغناطیسی خاصی هستند، برای مثال آزادانه وارد سلول شده و می‌توانند در روند طبیعی آن تداخل کنند (۷). در این میان، نانو ذرات نقره به دلیل اثرات شگرف ضد میکروبی و مصرف روز افزون در صنایع مختلف نظیر صنایع بهداشتی و آرایشی، اسپری‌های ضد عفونی کننده، شوینده‌ها، خمیردندان‌ها و غیره، به پرکاربردترین این ذرات تبدیل شده است (۱۷). از این رو مصرف روز افزون نانوذرات ضرورت بررسی اینمی زیستی جانوران را بیش از پیش افزایش می‌دهد. ترکیبات نقره سلاح اصلی در مقابل زخم‌های عفونی در جنگ جهانی اول بود. متنه‌ی، لکه‌دار شدن برگشت ناپذیر پوست و چشم ناشی از

در پاسخ‌های اینمی و التهابی را تنظیم می‌کند و به عنوان "کلید تنظیم‌کننده" شبکه‌ای از ژن‌های کنترل‌کننده فعالیت سایتوکاین‌های التهابی مورد تأکید قرار گرفته است (۵). همچنین عوامل داخلی و خارجی بی‌شماری که تهدیدی برای ارگانیسم به شمار می‌روند، قادر به فعل سازی NF-*kB* هستند. برخی از این عوامل عبارت‌اند از: عفونت‌های ویروسی، لیپیدهای باکتریایی، انگل‌ها، اشتعه‌ی ماورای بدن، استرس، برشی (شکافتن)، عوامل شیمی درمانی، استرس اکسایشی، سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و آسیب DNA. شمار بسیار زیادی از ژن‌های متنوع القاء شده توسط NF-*kB* شامل: ژن‌های ویروسی (HIV-۱^۳, CMV)، گیرنده‌های اینمی (گیرنده‌ی B₂ سلول T)، مولکول‌های چسبنده سلولی، سایتوکاین‌ها، فاکتورهای رشد، کیمیوکاین‌ها، پروتئین فاز حاد، آنزیم مرتبط با استرس اکسایشی و پروتئین ضدآپوپتوز هستند. به همین ترتیب NF-*kB* بیان آرایش متنوع ژن سلولی را تنظیم می‌کند. این یافته‌ها نشان‌دهنده اهمیت گستردگی NF-*kB* به عنوان واسطه‌کننده استرس سلولی است (۲۳).

زئولیت در بهبود و پیشگیری از بیماری‌ها در حیوانات، کاهش آمونیاک و از بین‌بردن سموم در جیره غذایی دام و طیور کاربرد دارند (۲۵). استفاده از زئولیت در تغذیه طیور به علت: افزایش کارایی مواد مغذی در تغذیه طیور (۳۰) و افزایش سمزدایی در دستگاه گوارش طیور (۲۵) می‌باشد. از سویی با توجه به عدم همگن بودن نانوذرات نقره در جیره طیور به علت ذرات بسیار کوچک (ppm)، این ذرات بر روی زئولیت پوشش داده (Coating) می‌شود. به عبارت دیگر، زئولیت به عنوان حامل نانوذرات نقره عمل می‌کند. همچنین اسیدهای ارگانیک به طور گسترده در طبیعت موجود بوده و یکی از اجزای اصلی طبیعی گیاهان و بافت‌های حیوانی مطرح است و با آزادسازی H⁺ و اسیدی کردن معده می‌توانند باعث افزایش عملکرد و همچنین جایگزین آنتی‌بیوتیک باشد و با آزادکردن H⁺ می‌تواند حالت احیاکنندگی داشته باشد (۳۱). با توجه به این که مطالعات محدودی که در زمینه اطمینان از سلامت نانو نقره در سطح مولکولی بر عملکرد و سلامتی طیور در زمینه ایمونولوژیک و آسیب و التهاب احتمالی ایجاد شده توسط نانوذرات نقره و ایجاد نانوذرات نقره و ایجاد استرس اکسایشی انجام گردیده است و همچنین با استناد بر این موضوع که ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی نانو مواد موجب برهمن کنش با اجزای زیستی در سلول‌های جانوری می‌شود و اثرهای زیادی بر رفتار و خصوصیات ماکرومولکول‌ها، سلول و اندام‌های جانوران بر جای می‌گذارد (۲۷)، مطالعه حاضر به منظور بررسی NF-*kB* در کبد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت انجام شد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در ایستگاه تحقیقات طیور دانشکده علوم دامی واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، به مدت ۴۲ روز انجام شد. در تمامی مراحل انجام پژوهش اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی براساس قانون مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی از کمیته اخلاق کار پژوهش

سمیت ایجاد شده و توانایی هدف قرار دادن سلول‌ها به شمار می‌رود (۱۴). خواص فیزیکی-شیمیایی نانوذرات همچون اندازه، مساحت سطح، انرژی سطحی و بارها در زمینه‌ی اتصال به بیومولکول‌ها بسیار مهم‌اند و سرنوشت نانوذرات را در سلول‌ها تعیین می‌کنند. درون سلول ممکن است نانوذرات سبب عوارضی همچون بیان افزایشی سایتوکاین‌های التهابی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و شکست رشته‌ی DNA شوند. تولید بیش از حد ROS می‌تواند موجب آسیب در عملکرد و توسعه سلول، تغییر و تبدیل پروتئین‌ها به رادیکال پروتئین، آغاز پراآکسیداسیون لیپید، شکستن ساختار DNA نوسانات بیان ژن و فاکتورهای رونویسی، تغییرات پاسخ‌های التهابی و مسیرهای هدایت پیام و اثرات ژنتیکی (مسومومیت ژنتیکی) و مرگ سلول شود (۱۸). نانوذرات پس از ورود به بافت، در مایع میان‌بافتی تجمع می‌کند و بر حسب برهم کنش با سطح سلول و یا ورودشان به سلول و دسترسی به محل هسته و یا ماده ژنتیکی سلول در سازوکار عملکرد سلول تاثیر می‌گذارد. تشخیص نانوذرات توسط سلول‌های اینمی به عنوان عوامل خارجی، منجر به پاسخ اینمی در مقابل نانوذرات شده و در نهایت بروز سمیت توسط میزان را بدنبال خواهد داشت. براساس بار سطحی نانوذرات جذب آن‌ها توسط سلول‌های اینمی همچون مونوцит‌ها، پلاکت‌ها، لوکوسیت‌ها، سلول‌های دندانیک و ماکروفازها رخ می‌دهد و در نتیجه‌ی آن واکنش‌های التهابی و واکنش‌های استرس اکسایشی ایجاد می‌شود (۲۱). مکانیسم کلیدی مسئول اثرات سایتوکسیک ناشی از نانوذرات، استرس‌های اکسایشی می‌باشد که یک ناهمانگی درون سلولی در نتیجه افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها است. رادیکال‌های آزاد اکسیژن، مولکول‌های بسیار فعالی هستند که موجب برهم‌زدن هموستازی درون سلولی و برهمنکش با ماکرومولکول‌های سلولی مانند DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها می‌شود. آسیب‌های DNA القاء شده با رادیکال‌های آزاد اکسیژن شامل شکستهای تک‌رشته‌ای و دورشته‌ای، تغییرات بازها و اتصالات مقاطع DNA است که در صورت فقدان تعییر سلولی، منجر به شکل‌گیری و پیشرفت سرطان می‌شود (۲۴). استرس‌های اکسایشی مسیرهای پیام‌رانی و پیهای مانند MAPK^۳ و NF-*kB*^۳ را فعال می‌سازد. مسیرهای فعال شده باعث کاهش دفاع آنتی‌اکسیدان‌ها و آزادسازی سایتوکین‌های پیش‌التهابی می‌شود و التهاب ایجاد شده منجر به افزایش آزادسازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن از سلول‌های التهابی مانند نوتوفیل می‌شود. این چرخه معیوب به واسطه‌ی مواجهه با نانوذرات نقره فعال می‌شود (۹). ان‌اف-کاپا بی (NF-*kB*)، با نام کامل "فاکتور هسته‌ای رونویسی" تقویت‌کننده‌ی زنجیره‌ی سبک کاپا از لفونویسیت‌های B فعال شده، یک کمپلکس پروتئینی کنترل‌کننده رونویسی DNA هستند. تقریباً در تمام گونه‌های جانوری یافت می‌شود و در گیر و مسئول در پاسخ‌های سلولی به محرک‌های مانند استرس، سایتوکاین‌ها، رادیکال‌های آزاد، تابش‌های فرابینش، LDL^۳ اکسیده و آنتی‌ژن باکتریایی یا ویروسی می‌باشد. فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا بیان بسیاری از ژن‌های درگیر

برای (*Gallus gallus*) طراحی شدند. ساخت آغازگرها توسط شرکت پیشگامان انجام گرفت. بهمنظور اطمینان از ساخت صحیح DNA مکمل، نمونه‌های cDNA با استفاده از آغازگر مرجع مورد ارزیابی قرار گرفتند. زن β -actin به عنوان کنترل داخلی انتخاب شد (جدول ۲). برای اطمینان از اختصاصی بودن پرایمها، محصول PCR با دمای اتصال متفاوتی در دستگاه PCR گردایانت (Thermal Cycler Gradient) مدل T100، ساخت شرکت BIO-RAD (آمریکا) گذاشته شد. محصول نهایی را روی ژل آگارز الکتروفورز گردید و شارپ‌ترین و واضح‌ترین باندها به عنوان مناسب‌ترین دمای اتصال انتخاب شد. پس از تأیید ساخت صحیح cDNA و اختصاصی بودن آغازگر β -actin به عنوان زن مرجع، به‌منظور بررسی کمی بیان زن‌ها، بهینه‌سازی دما و تکثیر و اتصال و کارکرد درست آغازگر اختصاصی (NF-kB) با ایزوفرم p65 واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی، در بافت کبد انجام شد. واکنش Real-time PCR با استفاده از تکنولوژی رنگ سایبرگرین (SYBR Green I) با استفاده از دستگاه PCR (Thermal Cycler) مدل T100، ساخت شرکت BIO-RAD (آمریکا) و نرمافزار Q5 i اپتیکال انجام شد. مخلوط واکنش شامل Primer Reverse, Primer Forward, DMSO و آنزیم SYBR Green, DEPC-treated water و آنزیم دستگاه Denaturant (Denaturation) درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه با تعداد یک چرخه به‌منظور واسرشت‌سازی اتصال (Annealing) (۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه) و تکثیر (Extension) (۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه) انجام شد. در مرحله سوم تکثیر نهایی با یک چرخه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد و در انتهای مرحله ذوب با ۸۱ چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه انجام گردید. با بررسی منحنی‌های ذوب در پایان هر واکنش، اطمینان از اختصاصی عمل نمودن آغازگرها و فقدان پرایم دایمها تأیید گردید و داده‌های حاصل از واکنش $\Delta\Delta C_t$ (ها) با استفاده از فرمول $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t - \Delta C_0$ برآورده شد. در فضای Excel نرمافزار ذخیره گردید و تبدیل به بیان نسبی زن‌های مورد نظر نسبت به زن مرجع (β -actin) گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها و مشخص کردن سطوح معنی‌داری داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه‌ی میانگین‌ها توسعه آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام گردید. مدل آماری طرح به صورت طرح کامل تصادفی، با فرمول آماری زیر محاسبه گردید.

$$\begin{aligned} y_{ij} &= \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij} \\ \text{مقدار هر فراسنجه } y_{ij} &= \text{میانگین کل } \mu \\ \text{اثر تیمار } \alpha_i &= \text{خطای آزمایش } \varepsilon_{ij} \end{aligned}$$

در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اخذ، و رعایت گردید. بدین منظور پژوهشی با ۴۵۰ قطعه جوجه‌ی گوشتی یکروزه سویه کاب (Cobb 500) در پنج تیمار و شش تکرار و در هر واحد آزمایشی ۱۵ قطعه در نظر گرفته شد. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) تیمار شاهد، (۲) تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد زئولیت، (۳) تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد زئولیت پوشش داده با ۰/۵ درصد نانو نقره، (۴) تیمار شاهد مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسید ارگانیک و (۵) تیمار شاهد مکمل شده با ۰/۱ درصد اسید ارگانیک و (۶) درصد نانو نقره مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسید ارگانیک انجام شد. جبره‌های غذایی براساس توصیه سویه کاب ۵۰۰ برای دوره آغازین (۱ تا ۲۱ روزگی) و رشد (۲۲ تا ۴۲ روزگی) تهیه شد (جدول ۱). دمای سالن در روز اول درجه تنظیم و در نهایت پس از گذشت ۲۱ روز دمای سالن در دمای ۲۱±۱ درجه ثابت شد. به‌منظور اعمال تنفس گرمایی، از روز ۳۵ دوره‌ی پرورش به مدت یک هفته برای نیمی تیمارها تکرار در هر تیمار روزانه به مدت چهار ساعت (از ساعت ۱۲ تا ۱۶) دمای سالن به ۳۴ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. به‌منظور نمونه‌برداری از بافت کبد، از هر واحد آزمایشی دو قطعه پرنده انتخاب و کشتار گردید. در نمونه‌برداری کبد را از اتصالات احتشایی آزاد کرده و در مرحله بعد قطعه‌ای به طول ۲ سانتی‌متر جدا گردید و نمونه‌های کبد پس از انتقال به میکروتیوب‌ها به ازت مایع انتقال داده شد. جهت بررسی بیان زن فاکتور رونویسی کاپا (NF-kB) با ایزوفرم p65 در روزهای ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش، آزمایشات مولکولی، پس از خردکردن نمونه‌ها بافت‌های کبد، استخراج Total RNA با استفاده از بافر استخراج ترازیبول (TRIzol-Sigma) به‌ازای هر نمونه براساس دستورالعمل پیشنهادی شرکت سیگما انجام شد و سپس جهت اطمینان از استخراج درست RNA، چند نمونه به‌طور تصادفی روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند. سپس با استفاده از دستگاه آشکارساز، باند حاصل از استخراج RNA مشاهده شد و با استفاده از Gel Doc از ژل عکس گرفته شد و در نهایت باندهای ایجادشده از نمونه‌های موجود در ژل، آنالیز شد. به‌منظور حذف DNA احتمالی در نمونه‌های RNA استخراج شده، از تیمار I براساس DNase I استخراج شده، از تیمار RNA مکمل با استفاده از RT (Reverse Transcriptase) به این ترتیب در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد ایجادشده از شرکت فرمتاز و آغازگر آلیکوکوئیتی شرکت Ribolock RNase Inhibitor, dNTP, Buffer RT(5X) و RT (Reverse Transcriptase) به میکروتیوب‌های حاوی نمونه اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به دستگاه PCR برای ساخت رشته دوم مکمل (در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت، ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت) منتقل شد. آغازگرهای مرجع و اختصاصی، با استفاده از نرمافزار Oligo7 و NCBI AlleleID براساس توالی زن‌های موردنظر در سایت

جدول ۱- ترکیب جیره‌های غذایی (برحسب درصد ماده خشک^۱)Table 1. Composition of experimental diets (DM basis)¹

اجزای جیره	جیره آغازین (۱-۲۱)	جیره رشد (۲۲-۴۲)
ذرت	۵۳/۷	۵۹/۹۶
کنجاله سویا	۳۹/۵۲	۳۳/۲۵
روغن سویا	۳	۳/۴۱
دی کلسیم فسفات	۱/۴۷	۱/۰۹
سنگ آهک	۱/۱۹	۱/۲۹
نمک	۰/۴۳	۰/۳۲
مکمل ویتامینی	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل معدنی	۰/۲۵	۰/۲۵
متیوینین DL	۰/۱۳	۰/۰۵
L لیزین	۰/۰۶	۰/۱۳
اتالیز مواد مغذی		
انرژی قابل متabolیسم (Kcal/Kg)	۲۹۵۰	۳۰۵۰
پروتئین خام (%)	۲۱/۲	۱۹/۰۶
(٪) کلسیم (%)	۰/۹۲	۰/۸۶
(٪) فسفر (%)	۰/۴۱	۰/۳۳
(٪) سدیم (%)	۰/۱۸	۰/۱۴
(٪) لیزین (%)	۱/۰۱	۰/۹۵
(٪) متیوینین (%)	۰/۴۷	۰/۳۶
(٪) سیسیستان (%)	۰/۳۶	۰/۳۷
(٪) آرزنین (%)	۱/۴۵	۱/۲۷
(٪) ترئونین (%)	۰/۸۴	۰/۷۴

جیره پایه براساس راهنمای پرورش سویه کاب تهیه شده است. ۲ هر کیلوگرم خوارک حاوی: ویتامین A: IU ۵۰۰؛ کوله کلیسیفروول، ۲۰۰ IU؛ ویتامین E: ۱۰ IU؛ ریبوفلافوین، ۳/۵ mg؛ پاتوتونیک اسید، ۱۰ mg؛ نیاسین، ۳۰ mg؛ بیوتین، ۱/۱۵ mg؛ کولین کلرید، ۱۰۰۰ 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؛ سلیوم، ۰/۱۵ mg؛ کوبالامین، ۱۵ µg.

جدول ۲- اسامی ژن‌ها و توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش qRT-PCR

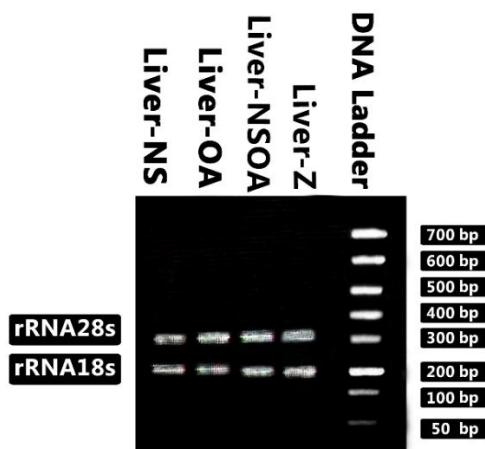
Table 2. The primer sequences used in relative quantitative real-time PCR (q-PCR)

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول محصول (bp)	Access number
NF- <i>kB</i> (p65)	F: 5'- GTCTCTCCAGGCCATCTA-3' R: 5'- TCAGCCCAGAACGAACTC-3'	161	XM-025145278
β-actin	F: 5'- AAGTTACTCGCTCTGTGAA- 3' R: 5'- CACATCTATCACTGGGAAC-3'	198	NM-205518

دما و زمان مناسب برای مراحل واکنش PCR بود. سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی صورت گرفت و با بررسی منحنی ذوب حاصل از Real-time PCR، صحت پیک مربوط به آغازگرهای مورد مطالعه و فقدان پرایمر دایرها تأیید گردید. براساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر، سطح بیان ژن در سلول‌های کبدی در جوجه‌های تغذیه شده با تیمار زئولیت (Z) در روز ۲۱ دوره پرورش (شکل ۳) و روز ۴۲ دوره پرورش با اعمال تنفس گرمایی (شکل ۵) افزایش بیان معنی‌داری در مقایسه با دیگر تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد داشته ($p < 0.05$) است. همچنین سطح بیان ژن NF-*kB* در جوجه‌های تغذیه شده با تیمار نانوذرات نقره مکمل شده با اسید آگانیک (NSOA) در روز ۴۲ دوره پرورش بدون اعمال تنفس گرمایی (شکل ۴) افزایش بیان معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد ($p < 0.05$) داشته است.

نتایج و بحث

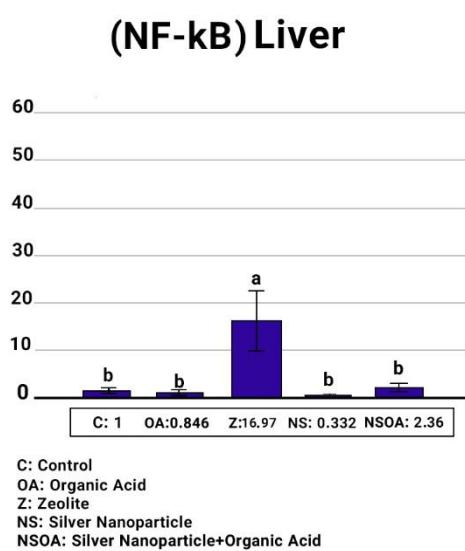
کیفیت RNA، با قراردادن نمونه‌های استخراج شده روی ژل آکارز یک درصد تأیید شد. باندهای rRNA28s و rRNA18s بهوضوح مشاهده شد و تمامی نمونه‌ها دارای الگوی نواری مناسبی روی ژل آکارز بودند که نشان‌دهندهی خلوص و کیفیت بالای RNA تخلیص شده و عدم ایجاد شکستگی و آسیب در ساختار RNA است (شکل ۱). بهمنظور تأیید درستی ساخت cDNA از RNAهای استخراج شده، با استفاده از آغازگر ژن خانه‌دار (β -actin) و نمونه‌های cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استاندارد انجام گرفت و در انتهای محصول PCR برای آغازگر مرجع و آغازگر اختصاصی (شکل ۲) به طور جداگانه، روی ژل آکارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. الگوی باندهای مشاهده شده در این مرحله برای تمامی نمونه‌ها تأیید کنندهی ساخت صحیح DNA مکمل، اختصاصی بودن آغازگر، بهینه‌سازی مناسب



شکل ۱- استخراج شده از بافت کبد جوجه‌های گوشتی
Figure 1. Extraction RNA from liver tissue of broiler chicken

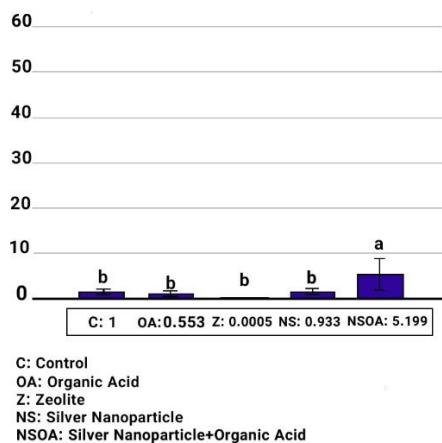


شکل ۲- cDNA با استفاده از آغازگر ژن‌های مرجع و هدف در بافت کبد جوجه‌های گوشتی
Figure 2. Synthesized cDNA by specific primer for housekeeping and target gene in liver tissue of broiler chicken



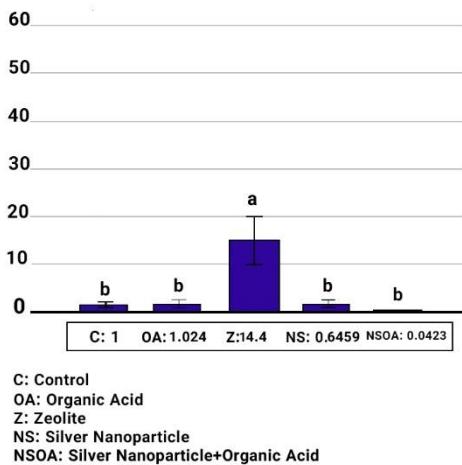
شکل ۳- میزان بیان ژن (p65) NF-κB در روز ۲۱ دوره پرورش در بافت کبد جوجه‌های گوشتی
Figure 3. Expression of NF-κB (p65) gene at 21st day of experiment in liver tissue of broiler chickens

(NF-*kB*) Liver



شکل ۴- میزان بیان ژن (p65) در روز ۴۲ دوره پرورش بدون اعمال تنش گرمایی در بافت کبد جوجه‌های گوشتی
Figure 4. Expression of NF-*kB* (p65) gene at 42nd day of experiment in liver tissue of broiler chickens without heat stress condition

(NF-*kB*) Liver



شکل ۵- میزان بیان ژن (p65) در روز ۴۲ دوره پرورش با اعمال تنش گرمایی در بافت کبد جوجه‌های گوشتی
Figure 5. Expression of NF-*kB* (p65) gene at 42nd day of experiment in liver tissue of broiler chickens with heat stress condition

موجب بهبود رشد و افزایش وزن در جوجه‌های گوشتی گردیده است (۲۸). تنش گرمایی یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش راندمان خوارک، کاهش رشد و سرکوب سیستم ایمنی در جوجه‌های گوشتی می‌باشد (۲). تنش گرمایی تولید رادیکال‌های آزاد مشتقات اکسیژنی را افزایش می‌دهد که اثرات منفی مختلفی بر طیور می‌گذارد. تنش گرمایی با تأثیر بر سیستم اعصاب سمپاتیک موجب آزادسازی کاتکول‌آمین‌ها و به دنبال آن تولید رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها و آغاز کننده استرس اکسایشی در سلول‌ها می‌باشد (۳). گزارشات انجام شده حاکی از این است که نانوذرات نقره می‌توانند تغییر در میزان آنزیمهای دخیل در استرس اکسایشی باشند و همچنین ثابت شده است که تنش گرمایی باعث افزایش رادیکال‌های

تغییرات مولکولی به عنوان اولین تغییرات قابل اندازه‌گیری در رابطه با اثرات تحت‌کشندگی مواد تنش‌زا در موجودات می‌تواند اطلاعات زیادی در رابطه با سلول‌ها و بافت‌ها در اختیار ما قرار دهد (۱۹). پاسخ بیولوژیک موجودات به استرس و تنش از سطح مولکولی آغاز شده و با افزایش زمان مواجهه با استرس، به ترتیب تغییرات در سطح بیوشیمیابی، سلولی، بافت، دستگاه و موجود توسعه می‌یابد (۱۸). براین اساس فاکتور رونویسی هسته‌ای کاپا به عنوان فاکتور پاسخ سریع سلولی به انواع استرس با منشأ درونی می‌باشد و بعد از فعال‌سازی در پاسخ به عوامل مختلف موجب بروز التهاب می‌شود. مکمل زئولیت به عنوان حامل نانوذرات نقره در طیور استفاده می‌شود و در بررسی انجام شده جیره مکمل نانوذرات روی با زئولیت

خوارک جوجه‌های گوشتی در روز ۴۲ با اعمال تنفس گرمایی نتیجه‌های مشابه با روز ۲۱ دوره پرورش با تیمار زئولیت (Z) به دست آمده است. همچنین سطح بیان ژن NF-*kB* در تیمار نانوذرات نقره پوشش داده شده با زئولیت مکمل شده با اسیدارگانیک (NSOA) در روز ۴۲ دوره پرورش بدون اعمال تنفس گرمایی افزایش بیان معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد داشته است ($P < 0.05$). بنابراین افزایش سطح بیان ژن فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا در بافت کبد جوجه‌های گوشتی نشان‌دهنده افزایش احتمالی استرس اکسایشی و رادیکال‌های آزاد و در نهایت آغاز و راهاندازی مسیرهای رونویسی هسته‌ای و فعال‌سازی فاکتور رونویسی NF-*kB* در هسته سلول‌های کبدی می‌باشد. به طور خلاصه نتایج تحقیق بیان گر آن است که سلول‌های بافت کبد تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی به ویژه تیمار آزمایشی زئولیت (Z) قرار گرفته‌اند و اثرات وجود استرس اکسایشی و عدم تعادل سیستم‌های آنتی‌اسیدانی در سلول‌های کبدی با افزایش بیان ژن فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا (NF-*kB*) در جوجه‌های تغذیه‌شده با تیمارهای آزمایشی مشاهده گردیده و وجود فاکتورهای احتمالی اولیه برای وجود التهاب در سلول‌های کبدی را بیان می‌کند. به عبارتی سلول‌های کبد در جوجه‌های گوشتی تیمار زئولیت و نانوذرات نقره پوشش داده بر زئولیت را به عنوان ماده‌ای غیرآلی و شبیه‌یابی با منشأ خارجی در بدن شناسایی کرده و به عنوان ماده زنوبیوتیک (بیگانه‌زیست-ماده‌ای با منشأ خارجی در بدن)، افزایش‌دهنده بیان ژن شاخص در مسیر استرس اکسایشی و شاخص احتمالی وجود التهاب تلقی می‌کند. این درحالی است که تیمار اسیدارگانیک (OA) خود موجب افزایش بیان ژن فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا B نشده است و افزایش بیان معنی‌داری در تیمار اسیدارگانیک که به صورت مکمل با نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت (NSOA) مشاهده گردیده است.

تشکر و قدردانی

از همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و همچنین مسئولان ایستگاه تحقیقات طیور و استادی دانشکده علوم دامی، مسئولان آزمایشگاه‌های علوم دامی و تولید گیاهی که شرایط لازم جهت این پژوهش را فراهم نمودند قدردانی و تشکر می‌گردد.

ازاد می‌شود (۴). فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا، به عبارتی به عنوان تنظیم‌کننده هسته‌ای رونویسی DNA تحت تأثیر ROS می‌باشد و در فرآیندهای زیستی متنوعی از جمله التهاب، کنترل رشد و مرگ سلولی شرکت می‌کند. به نوعی استرس اکسایشی در سلول‌ها می‌تواند مهارکننده NF-*kB* (Inhibitory kappa B kinases) را تحریب کند و با تأثیر مستقیم بر NF-*kB*، فعالیت آن را تحت تأثیر قرار دهد (۲۹). با توجه به این که تاکنون مقالاتی در اثرات نانوذرات نقره بر فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا B (NF-*kB*) در جوجه‌های گوشتی گزارش نشده است، گزارشاتی مبنی بر اثرات نانوذرات دیگر یا دیگر مکمل‌های غذایی بر بیان فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا (NF-*kB*) گزارش شده است. افزایش سطوح بیان فاکتور رونویسی کاپا (NF-*kB*) در سلول‌های سلطانی کبدی انسان که در معرض نانوذرات نقره بودند گزارش شده است (۳۲). همچنین میزان بیان ژن mRNA NF-*kB* در پلاسمای سلول‌های جنین جوجه در معرض نانوذرات مس تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشته است (۱۵). همچنین افزایش بیان معنی‌دار ژن NF-*kB* در بافت کبد جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با عصاره‌ی دارچین در معرض E. coli به اثبات رسیده است (۲۶). افزایش معنی‌داری در سطح بیان ژن NF-*kB* را در جوجه‌های قرارگرفته در معرض باکتری گرم منفی سالمونولا در مقایسه با تیمار شاهد گزارش شده است (۶). محققان گزارش کردند که اضافه کردن ۱ و ۲۵ دی‌هیدروکسی ویتامین D در بیماری‌هایی که در اثر آن سطوح دفاع ایمنی کاهش می‌یابد، منجر به کاهش سطح بیان ژن NF-*kB* شده و از فعل شدن فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا B ممانعت می‌نماید (۱). همچنین براساس یافته‌های محققان با اضافه کردن بوتیرات سدیم به جبره طیور سطح لیپوپلی‌ساکاریدهای سلول‌های روده تعییر کرده و میزان بیان ژن NF-*kB* تغییر می‌کند، به نوعی فعل شدن NF-*kB* را به دنبال دارد (۸). براساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر، سطح بیان ژن NF-*kB* در سلول‌های کبدی در جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با تیمار زئولیت (Z) در روز ۲۱ و روز ۴۲ با اعمال تنفس گرمایی افزایش بیان معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد داشته است ($P < 0.05$). بر اساس داده‌های حاصل می‌توان نتیجه گرفت که روز ۲۱ و روز ۴۲ دوره پرورش با اعمال تنفس گرمایی پاسخ جوجه‌های گوشتی به تیمار زئولیت (Z) به یک اندازه موجب افزایش بیان فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا B گردیده است و افزایش سن و افزایش مصرف

منابع

- Chen, J., B. Bhandar and M. Kavdia. 2015. Interaction of ROS and RNS with GSH and GSH/GPX systems. The FASEB Journal, 29: 636-637.
- Ciftci, M., U.G. Simsek, M.A. Azman, I.H. Cerci and F. Tonbak. 2013. The effects of dietary rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) oil supplementation on performance, carcass traits and some blood parameters of Japanese quail under heat stressed condition. Ankara Universitesy Veteriner Fakultesi Dergisi, 19: 595-599.
- Curi, R., P. Newsholme, M.M.R. Lima, T.C. Pithon-curi and J. Procopio. 2003. Glutamine and glutamate-their central role in cell metabolism and function. Cell Biochemistry and Function, 21: 1-9.
- Esmaili, M., S.R. Hashemi, Y. Jafari Ahangari, S. Hassani and A. Shabani. 2017. Effect of different levels of silver nanoparticles coated with zeolite on performance, function of superoxide dismutase and glutathione peroxidase, carcass characteristics and internal organs weight of broiler chickens. Animal Production Research, 4: 1-11.

5. Gilmore, T.D. 2006. Introduction to NF- κ B: Players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25: 6680-6684.
6. Hsin, Y.H., C.F. Chen, S. Huang and T.S. Shih. 2008. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS-and JNK dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicology Letters*, 179:130-139.
7. Jiang, Z.Y., L.H. Sun, Y.C. Lin, X.Y. Ma, C.T. Zheng, G.L. Zhou, F. Chen and S.T. Zou. 2009. Effects of dietary glycyl-glutamine on growth performance, small intestinal integrity, and immune responses of weaning piglets challenged with lipopolysaccharide. *Journal of Animal Science*, 87: 4050-4056.
8. Jiang, Y., W. Zhang, F. Goa and G. Zhou. 2015. Effect of sodium butyrate on intestinal inflammatory response to lipopolysaccharide in broiler chickens. *Canadian Journal of Animal Science*, 95: 389-395.
9. Kreyling, W.G. 2010. A complementary definition of nanomaterial. *Nano Today*, 5: 165-168.
10. Li, Y., D.H. Chen, J. Yan, Y. Chen, R.A. Mittelstaedt, Y. Zhang, A.S. Biris, R.H. Heflich and T. Chen. 2012. Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and *in vitro* micronucleus assay. *Mutation Research*, 14: 4-10.
11. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. 25: 402-408.
12. Martirosyan, A., A. Bazes and Y.J. Schneider. 2014. *In vitro* toxicity assessment of silver nanoparticles in the presence of phenolic compounds-preventive agents against the harmful effect? *Nanotoxicology*, 8: 573-582.
13. Morones, J.R., J.L. Elechiguerra, A. Camacho and J.T. Ramirez. 2018. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16: 2346-2353.
14. Nagal, R. and R.K. Singla. 2013. Nanoparticles in different delivery systems: A brief review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3: 96-106.
15. Oberdorster, G., V. Stone and K. Donaldson. 2007. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*, 1: 2-25.
16. Pinedaa, L., E. Sawoszb, K.P. Vadala settya and A. Chwalibog. 2013. Effect of copper nanoparticles on metabolic rate and development of chicken embryos. *Animal Feed Science and Technology*, 186: 125-129.
17. Reiner, E., Z. Radic and V. Simeon-Rudolf. 2007. Mechanisms of organophosphate toxicity and detoxication with emphasis on studies in Croatia. *Toxicity and Detoxification of Organophosphates*, 58: 329-338.
18. Ribeiro, C.V., L. Belger, E. Pelletier and C. Rouleau. 2002. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Research*, 90: 217-225.
19. Rose, W.L., R.M. Nisbet, P.G. Green, S. Norris, T. Fan, E.H. Smith, G.N. Cherr and S.L. Anderson. 2006. Using an integrated approach to link biomarker responses and Physiological stress to growth impairment of cadmium-exposed larval topsmelt. *Aquatic Toxicology*, 80: 298-308.
20. Roy, R., R. Kumar and A. Tripathi. 2014. Intractive threats of nanoparticles to the biological system. *Immunology Letters*, 158: 79-87.
21. Salari-Joo, H.R., M.R. Kalbassi and S.A. Johari. 2012. Effect of water salinity on acute toxicity of colloidal silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. *Iranian Journal of Health and Environment*, 5: 121-132.
22. Sambrook, J. and D.W. Russel. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, California, Academic Press, PP: 94-98.
23. Shoelson, S.E., J. Lee and M. Yuan. 2003. Inflammation and the IKK β /I κ B/NF- κ B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *International Journal of Obesity*, 27: 49-52.
24. Singh, N., B. Manshian, G.J. Jenkins, S.M. Griffiths, P.M. Williams and T.G. Maffeis. 2009. Nano Genotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30: 3891-3914.
25. Smical, I. 2011. Properties of natural zeolites in benefit of nutrition and health. *Human and Veterinary Medicine-Bioflux*, 3: 51-57.
26. Susan, W.P.W., J.J.M. Willie, A.H. Carla, I.H. Werner, E.H.W. Heugens, B. Roszek, J. Bisschops and I. Gosens. 2009. Nano-silver-a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, 3: 109-138.
27. Tabatabaei, S.M., R. Badalzade, GH.R. Mohammadnezhad and R. Balaei. 2015. Effects of Cinnamon extract on biochemical enzymes, TNF- α and NF- κ B gene expression levels in liver of broiler chickens inoculated with *Escherichia coli*. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 35: 781-787.
28. Tang, Z.G., G.Y. Chen, L.F. Li, C. Wen, T. Wang and Y.M. Zhou. 2015. Effect of zinc-bearing zeolite clinoptilolite on growth performance, zinc accumulation, and gene expression of zinc transporters in broilers. *American Society of Animal Science*, 93:620-626.
29. Wijnhoven, S.W.P., W.J.G. Peijnenburg, C.A. Herberts, W.I. Hagens, A.G. Oomen and E.H.W. Heugens. 2009. Nanosilver: A review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, 3: 109-138.
30. Wu, Q.J., L.C. Wang, Y.M. Zhou, J.F. Zhang and T. Wang. 2013. Effects of clinoptilolite and modified clinoptilolite on the growth performance, intestinal microflora, and gut parameters of broilers. *Poultry Science*, 92: 684-692.
31. Zhang, K.Y., F. Yan, C.A. Keen and P.W. Waldroup. 2005. Evaluation of microencapsulated essential oils and organic acids in diets for broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 4: 612-619.
32. Zhang, X.F., W. Shen and S. Gurunathan. 2016. Silver nanoparticle-mediated cellular responses in various cell lines: An *in vitro* model. *International Molecular Journal of Science*, 17: 1-26.

Evaluation of NF-*kB* Gene Expression in liver tissue of Broiler Chickens fed with Silver Nanoparticles as an Indicator of Inflammation Induction in Heat Stress Conditions

Elnaz Arabiyan¹, Seyed Reza Hashemi², Ahad Yamchi³, Homa Davoodi⁴ and Sharif Rostami⁵

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

2- Assistant Professor, Department of Animal Physiology, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

4- Assistant Professor, Department of Immunology, Faculty of Medical Science, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran

5- PhD Student, Department of Animal Physiology, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: January 15, 2019 Accepted: June 2, 2019

Abstract

Heat stress is one of the most important immunosuppressive factors in poultry industry and heat stress has been associated with increases reactive oxygen species and oxidative stress in cells. Since the nuclear factor kappa-B is known as fast cellular response factor to endogenous stress; this study was conducted to evaluate relative gene expression in broiler chicken with 450 one-day-old Cobb 500 broiler chickens for 42 days. Treatments included: (1) basal diet (control), (2) basal diet containing 1% zeolite, (3) basal diet containing 1% of zeolite-coated with 0.5% silver nanoparticles, (4) Basal diet containing with 0.15% organic acids and (5) Basal diet containing 1% of zeolite-coated with 0.5% of silver nanoparticles and 0.15% organic acids in with or without heat stress condition. Liver biopsy was done in 21st and 42nd days of experiment. Results demonstrated the level of nuclear factor kappa-B relative gene expression in the 21st and 42nd days of experiment in heat stress condition in zeolite treatment was significant increase expression ($P<0.05$). Also in 42nd days of experiment without heat stress condition in silver nanoparticles coated with zeolite in combination with organic acid treatment in broiler liver was significant increase expression comparison with control and all treatments ($P<0.05$). In conclusion results showed that zeolite and silver nanoparticles identified as an inorganic, chemical and exogenous substances in body tissues and liver identified this substances as a xenobiotics and up-regulated expression of index genes in oxidative stress pathways and inflammation. Whereas this effect is not identified in organic acid.

Keywords: Broiler, Immunity, Inflammation, NF-*kB*, Nano Silver