



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

الناز عربیان^۱، سیدرضا هاشمی^۲، احد یامچی^۳، هما داودی^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 دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

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

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

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

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

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

صفحه: ۱۰۳ تا ۱۱۱

چکیده

تنش گرمایی یکی از مهم‌ترین عامل سرکوب سیستم ایمنی در طیور بوده و افزایش آن منجر به تولید رادیکال‌های آزاد اکتسیژن و در نهایت تنش آکسایشی در سلول‌هاست. از آنجایی که فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا به‌عنوان فاکتور پاسخ سریع سلولی به انواع استرس با منشأ درونی می‌باشد، بدین منظور پژوهشی جهت بررسی بیان نسبی فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا با استفاده از ۴۵۰ قطعه جوجه گوشتی یک‌روزه سویه کاب ۵۰۰ 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 ۱ درصد زئولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانو نقره، (۴) تیمار شاهد مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسید آرگانیک و (۵) تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد زئولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانو نقره مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسید آرگانیک بودند. به‌منظور اعمال تنش 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 تنش گرمایی در جوجه‌های تغذیه شده با تیمار زئولیت افزایش معنی‌داری یافت. همچنین در روز ۴۲ بدون اعمال تنش 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 به‌عنوان ماده غیرآلی و شیمیایی با منشأ خارجی در بدن شناسایی شده و کبد این مواد را به‌عنوان ماده زئوبیوتیک، افزایش‌دهنده بیان نسبی ژن‌های شاخص در مسیر استرس آکسایشی 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، ایمنی، جوجه گوشتی

مقدمه

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 سفالوسپورین‌ها، شهرت نقره به‌عنوان 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 غشا باکتری‌ها، وارد آن‌ها شده و با تغییر در مورفولوژی و نفوذپذیری غشا و تأثیر در زنجیره تنفسی و تقسیم سلولی در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود (۱۳). همچنین ۵۶٪ از سهم نانوذرات جهان به نانوذرات نقره اختصاص یافته است (۲۰). ابعاد و اندازه بسیار کوچک نانو ذرات باعث عبور آسان از غشای 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 (۱۳). علاوه بر این اندازه نانوذرات از فاکتورهای بسیار مهم در مقدار

فن‌آوری نانو، دانش شناسایی و سنتز مواد در ابعادی بین یک تا ۱۰۰ نانومتر است. نانومواد به دلیل اندازه‌ی کوچک ممکن است اثرات فیزیکی، شیمیایی و آنتی‌بیوتیکی جدیدی از خود نشان دهند (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 ایمنی زیستی جانوران را بیش از پیش افزایش می‌دهد. ترکیبات نقره سلاح اصلی در مقابل زخم‌های عفونی در جنگ جهانی اول بود. منتهی، لکه‌دار شدن برگشت ناپذیر پوست و چشم ناشی از

در پاسخ‌های ایمنی و التهابی را تنظیم می‌کند و به‌عنوان "کلید تنظیم‌کننده" شبکه‌ای از ژن‌های کنترل‌کننده فعالیت سایتوکاین‌های التهابی مورد تأکید قرار گرفته است (۵). همچنین عوامل داخلی و خارجی بی‌شماری که تهدیدی برای آرگانسیم به‌شمار می‌روند، قادر به فعال‌سازی NF- κ B هستند. برخی از این عوامل عبارت‌اند از: عفونت‌های ویروسی، لیپیدهای باکتریایی، انگل‌ها، اشعه‌ی ماورای بنفش، استرس برشی (شکافتن)، عوامل شیمی درمانی، استرس آکسایشی، سایتوکاین‌های پیش التهابی و آسیب DNA. شمار بسیار زیادی از ژن‌های متنوع القاء‌شده توسط NF- κ B شامل: ژن‌های ویروسی (CMV^۱، HIV-1^۲)، گیرنده‌های ایمنی (گیرنده‌ی B₂ سلول T)، مولکول‌های چسبنده‌ی سلولی، سایتوکاین‌ها، فاکتورهای رشد، کیموکاین‌ها، پروتئین فاز حاد، آنزیم مرتبط با استرس آکسایشی و پروتئین ضدآپوپتوز هستند. به‌همین ترتیب NF- κ B بیان آرایش متنوع ژن سلولی را تنظیم می‌کند. این یافته‌ها نشان‌دهنده‌ی اهمیت گسترده‌ی NF- κ B به‌عنوان واسطه‌کننده‌ی استرس سلولی است (۲۳). ژن‌تولیت در بهبود و پیشگیری از بیماری‌ها در حیوانات، کاهش آمونیاک و از بین بردن سموم در جیره غذایی دام و طیور کاربرد دارند (۲۵). استفاده از ژن‌تولیت در تغذیه طیور به علت: افزایش کارایی مواد مغذی در تغذیه طیور (۳۰) و افزایش سم‌زدایی در دستگاه گوارش طیور (۲۵) می‌باشد. از سویی باتوجه به عدم همگن بودن نانوذرات نقره در جیره طیور به‌علت ذرات بسیار کوچک (ppm)، این ذرات بر روی ژن‌تولیت پوشش داده (Coating) می‌شود. به‌عبارت دیگر، ژن‌تولیت به‌عنوان حامل نانوذرات نقره عمل می‌کند. همچنین اسیدهای آرگانیک به‌طور 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 ایمنولوژیک و آسیب و التهاب احتمالی ایجادشده توسط نانوذرات نقره و ایجاد نانوذرات نقره و ایجاد استرس آکسایشی انجام گردیده است و همچنین با استناد بر این موضوع که ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی نانو مواد موجب برهم 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 به‌منظور بررسی NF- κ B در کبد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با نانوذرات نقره پوشش داده شده بر ژن‌تولیت انجام شد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در ایستگاه تحقیقات طیور دانشکده علوم دامی واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، به‌مدت 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 به‌شمار 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 اُکسیژن^۱ 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 پراکسیداسیون لیپید، شکستن ساختار DNA، نوسانات بیان ژن و فاکتورهای رونویسی، تغییرات پاسخ‌های التهابی و مسیرهای هدایت پیام و اثرات ژنوتوکسیک (مسمومیت ژنوتیپی) 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 تأثیر می‌گذارد. تشخیص نانوذرات توسط سلول‌های ایمنی به‌عنوان عوامل خارجی، منجر به پاسخ ایمنی در مقابل نانوذرات شده و در نهایت بروز سمیت توسط میزبان را به‌دنبال خواهد داشت. براساس بار سطحی نانوذرات جذب آن‌ها توسط سلول‌های ایمنی همچون مونوسیت‌ها، پلاکت‌ها، لوکوسیت‌ها، سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها رخ می‌دهد و در نتیجه‌ی آن واکنش‌های التهابی و واکنش‌های استرس آکسایشی ایجاد می‌شود (۲۱). مکانیسم کلیدی مسئول اثرات سایتوتوکسیک ناشی از نانوذرات، استرس‌های آکسایشی می‌باشد که یک ناهماهنگی درون سلولی در نتیجه افزایش گونه‌های فعال اُکسیژن^۱ و کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها است. رادیکال‌های آزاد اُکسیژن^۱، مولکول‌های بسیار فعالی هستند که موجب برهم‌زدن هموستازی درون سلولی و برهم‌کنش با ماکرومولکول‌های سلولی مانند DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها می‌شود. آسیب‌های DNA القاء شده با رادیکال‌های آزاد اُکسیژن^۱ شامل شکست‌های تک‌رشته‌ای و دورشته‌ای، تغییرات بازها و اتصالات مقاطع DNA است که در صورت فقدان تعمیر سلولی، منجر به شکل‌گیری و پیشرفت سرطان می‌شود (۲۴). استرس‌های آکسایشی مسیرهای پیام‌رسانی ویژه‌ی مانند MAPK^۲ و NF- κ B^۳ را فعال می‌سازد. مسیرهای فعال شده باعث کاهش دفاع آنتی‌اکسیدان‌ها و آزادسازی سایتوکاین‌های پیش‌التهابی می‌شود و التهاب ایجاد شده منجر به افزایش آزادسازی رادیکال‌های آزاد اُکسیژن^۱ از سلول‌های التهابی مانند نوتروفیل می‌شود. این چرخه معیوب به واسطه‌ی مواجهه با نانوذرات نقره فعال می‌شود (۹). ان اف-کاپا بی (NF- κ B)، با نام کامل "فاکتور هسته‌ای رونویسی تقویت‌کننده‌ی زنجیره‌ی سبک کاپا از لفتوسیت‌های B فعال شده"، یک کمپلکس پروتئینی کنترل‌کننده رونویسی DNA هستند. تقریباً در تمام گونه‌های جانوری یافت می‌شود و درگیر و مسئول در پاسخ‌های سلولی به محرک‌هایی مانند استرس، سایتوکاین‌ها، رادیکال‌های آزاد، تابش‌های فرابنفش، LDL^۴ 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. به منظور اطمینان از ساخت صحیح DNA مکمل، نمونه‌های cDNA با استفاده از آغازگر مرجع مورد ارزیابی قرار گرفتند. ژن β -actin به عنوان کنترل داخلی انتخاب شد (جدول ۲). برای اطمینان از اختصاصی بودن پرایمرها، محصول PCR با دماهای اتصال متفاوتی در دستگاه PCR گرادینت (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 ژن مرجع، به منظور بررسی کمی بیان ژن‌ها، بهینه‌سازی دما و تکثیر و اتصال کارکرد درست آغازگر اختصاصی (NF- κ B) 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 iQ5 اپتی‌کال انجام شد. مخلوط واکنش شامل Primer Forward، Primer Reverse، DEPC-treated water، SYBR Green، DMSO و آنزیم DNA Taq تهیه شد. نمونه‌ها در مرحله اول در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه با تعداد یک چرخه به منظور واسرشت ابتدایی انکوبه شدند. سپس با ۴۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی (Denaturation) (۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ ثانیه) 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 انتها، 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 پرایمر دایمرها تأیید گردید و داده‌های حاصل از واکنش (C_t) با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta C_t}$ برابر است با ΔC_t ژن هدف منهای ΔC_t کالیبراتور (۱۱)، در فضای نرم‌افزار Excel ذخیره گردید و تبدیل به بیان نسبی ژن‌های مورد نظر نسبت به ژن مرجع (β -actin) گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها و مشخص کردن سطوح معنی‌داری داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه‌ی میانگین‌ها توسط 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.

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

مقدار هر فراسنجه Y_{ij} =

میانگین کل μ =

اثر تیمار α_i =

خطای آزمایش ε_{ij} =

در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اخذ، و رعایت گردید. بدین منظور پژوهشی با ۴۵۰ قطعه جوجه‌ی گوشتی یک‌روزه سویه کاب ۵۰۰ (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 شده با ۰/۵ درصد نانو نقره، (۴) تیمار شاهد مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسید آرگانیک و (۵) تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد زئولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانو نقره مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسید آرگانیک انجام شد. جیره‌های 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 32 ± 1 درجه تنظیم و در نهایت پس از گذشت ۲۱ روز دمای سالن در دمای 21 ± 1 درجه ثابت شد. به منظور اعمال تنش گرمایی، از روز ۳۵ دوره‌ی پرورش به مدت یک هفته برای نیمی تیمارها (۳ تکرار در هر تیمار) روزانه به مدت چهار ساعت (از ساعت ۱۲ تا ۱۶) دمای سالن به ۳۴ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. به منظور نمونه‌برداری از بافت کبد، از هر واحد آزمایشی دو قطعه پرند انتخاب و کشتار گردید. در نمونه‌برداری کبد را از اتصالات احشایی آزاد کرده و در مرحله بعد قطعه‌ای به طول ۲ سانتی‌متر جدا گردید و نمونه‌های کبد پس از انتقال به میکروتیوپ‌ها به ازت مایع انتقال داده شد. جهت بررسی بیان ژن فاکتور رونویسی کاپا (NF- κ B) 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 ترایزول (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 ایجاد شده از نمونه‌های موجود در ژل، آنالیز شد. به منظور حذف DNA احتمالی در نمونه‌های RNA استخراج شده، از تیمار DNase I براساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز استفاده شد و سپس ساخت رشته اول cDNA یا DNA مکمل با استفاده از RNA تیمارشده و آغازگر آلیگودی‌تی شرکت فرمنتاز و DEPC-treated water آغاز گردید. در مرحله بعد نمونه‌ها در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس Buffer RT(5X)، Ribolock RNase Inhibitor، dNTP و آنزیم RT (Reverse Transcriptase) (۲۲)، به میکروتیوپ‌های حاوی نمونه اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به دستگاه PCR برای ساخت رشته دوم DNA مکمل (در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۴۲ 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 AlleleID براساس توالی ژن‌های موردنظر در سایت NCBI

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	-/۴۳	-/۳۲
مکمل ویتامینی	-/۲۵	-/۲۵
مکمل معدنی	-/۲۵	-/۲۵
DL متیونین	-/۱۳	-/۰۵
L لیزین	-/۰۶	-/۱۳

آنالیز مواد مغذی

انرژی قابل متابولیسم (Kcal/Kg)	۲۹۵۰	۳۰۵۰
پروتئین خام (%)	۲۱/۲	۱۹/۰۶
کلسیم (%)	-/۹۲	-/۸۶
فسفر (%)	-/۴۱	-/۳۳
سدیم (%)	-/۱۸	-/۱۴
لیزین (%)	۱/۰۱	-/۹۵
متیونین (%)	-/۴۷	-/۳۶
سیستین (%)	-/۳۶	-/۳۷
آرژنین (%)	۱/۴۵	۱/۲۷
ترئونین (%)	-/۸۴	-/۷۴

جیره پایه براساس راهنمای پرورش سویه کاب 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، ۱۵ mg؛ اسید فولیک، ۵ mg؛ تیامین، ۵ mg؛ پیریدوکسین، ۳ mg؛ آهن، ۸۰ mg؛ روی، ۴۰ mg؛ منگنز، ۶۰ mg؛ ید، ۱۸ mg؛ مس، ۸ mg؛ سلنیوم، ۱۵ mg؛ کوبالامین، ۱۵ mg

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

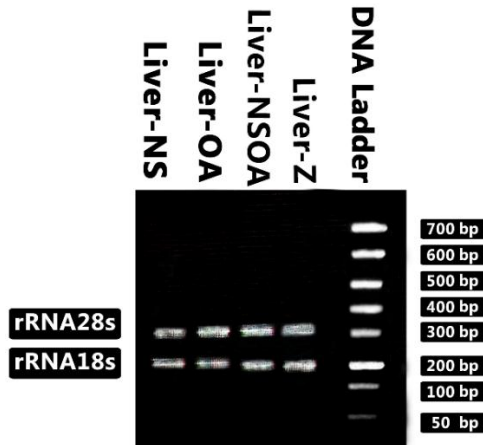
Table 2. The primer sequences used in relative quantitative real-time PCR (q-PCR)

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول محصول (bp)	Access number
NF-kB (p65)	F: 5'- GTCCTCTCCCAGCCCATCTA-3' R: 5'- TCAGCCCAGAAACGACCTC-3'	161	XM-025145278
β-actin	F: 5'- AAGTTACTCGCCTCTGTGAA-3' R: 5'- CACATCTATCACTGGGGAAC-3'	198	NM-205518

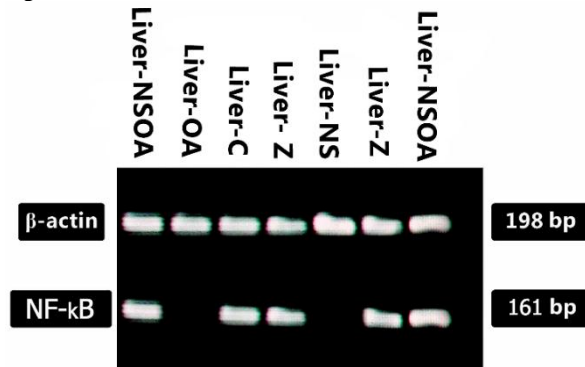
نتایج و بحث

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

دما و زمان مناسب برای مراحل واکنش PCR بود. سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز 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 دایمرها تأیید گردید. براساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر، سطح بیان ژن NF-kB در سلول‌های کبدی در جوجه‌های تغذیه شده با تیمار ژئولیت (Z) در روز ۲۱ دوره پرورش (شکل ۳) و روز ۴۲ دوره پرورش با اعمال تنش 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 اسیدآرگانیک (NSOA) در روز ۴۲ دوره پرورش بدون اعمال تنش گرمایی (شکل ۴) افزایش بیان معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد ($p < 0.05$) داشته است.

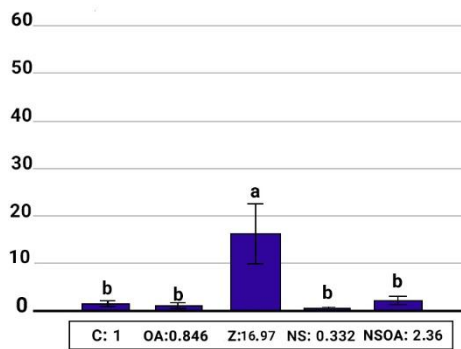


شکل ۱- RNA استخراج شده از بافت کبد جوجه‌های گوشتی
Figure 1. Extraction RNA from liver tissue of broiler chicken



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

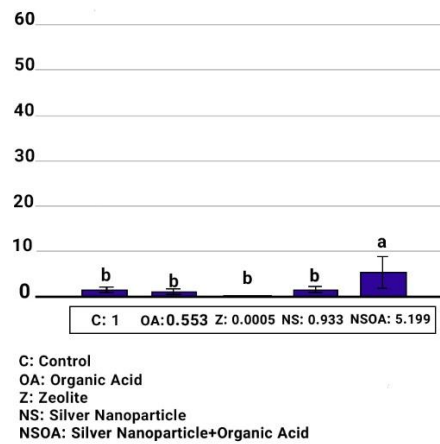
(NF-kB) Liver



C: Control
OA: Organic Acid
Z: Zeolite
NS: Silver Nanoparticle
NSOA: Silver Nanoparticle+Organic Acid

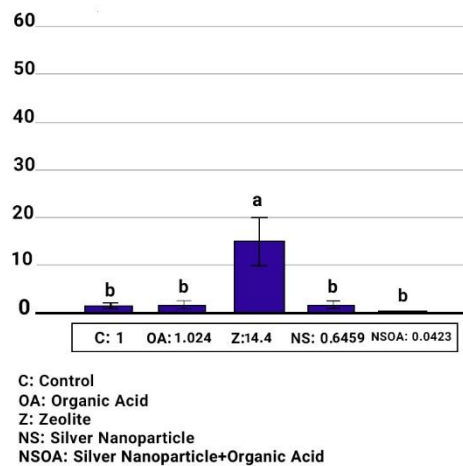
شکل ۳- میزان بیان ژن NF-kB (p65) در روز ۲۱ دوره پرورش در بافت کبد جوجه‌های گوشتی
Figure 3. Expression of NF-kB (p65) gene at 21st day of experiment in liver tissue of broiler chickens

(NF-kB) Liver



شکل ۴- میزان بیان ژن NF-kB (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 NF-kB (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 خوراک، 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 آغازکننده 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 به‌عنوان اولین تغییرات قابل اندازه‌گیری در رابطه با اثرات تحت‌کشنده‌ی 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، به‌ترتیب تغییرات در سطح بیوشیمیایی، سلولی، بافت، دستگاه و موجود توسعه می‌یابد (۱۸). براین اساس فاکتور رونویسی هسته‌ای کاپا به‌عنوان 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 به‌عنوان حامل نانوذرات نقره در طیور استفاده می‌شود و در بررسی انجام‌شده جیره مکمل نانوذرات روی با زئولیت

خوراک جوجه‌های گوشتی در روز ۴۲ با اعمال تنش گرمایی نتیجه‌ای مشابه با روز ۲۱ دوره پرورش با تیمار زئولیت (Z) به‌دست آمده است. همچنین سطح بیان ژن NF-kB در تیمار نانوذرات نقره پوشش داده شده با زئولیت مکمل‌شده با اسیدآرگانیک (NSOA) در روز ۴۲ دوره پرورش بدون اعمال تنش 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 نشان‌دهنده‌ی افزایش احتمالی استرس اُکسایشی و رادیکال‌های آزاد و در نهایت آغاز و راه‌اندازی مسیرهای رونویسی هسته‌ای و فعال‌سازی فاکتور رونویسی NF-kB در هسته سلول‌های کبدی می‌باشد. به‌طور خلاصه نتایج تحقیق بیان‌گر آن است که سلول‌های بافت کبد تحت‌تأثیر تیمارهای آزمایشی به‌ویژه تیمار آزمایشی زئولیت (Z) قرار گرفته‌اند و اثرات وجود استرس اُکسایشی و عدم تعادل سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی 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. به‌عبارتی سلول‌های کبد در جوجه‌های گوشتی تیمار زئولیت و نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت را به عنوان ماده‌ای غیرآلی و شیمیایی با منشأ خارجی در بدن شناسایی کرده و به عنوان ماده زئوبیوتیک (بیگانه‌زیست- ماده‌ای با منشأ خارجی در بدن)، افزایش‌دهنده‌ی بیان ژن شاخص در مسیر استرس اُکسایشی و شاخص احتمالی وجود التهاب تلقی می‌کند. این درحالی است که تیمار اسیدآرگانیک (OA) خود موجب افزایش بیان ژن فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا B نشده است و افزایش بیان معنی‌داری در تیمار اسیدآرگانیک که به‌صورت 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 اساتید دانشکده علوم دامی، مسئولان آزمایشگاه‌های علوم دامی و تولید گیاهی که شرایط لازم جهت این پژوهش را فراهم نمودند قدردانی و تشکر می‌گردد.

آزاد می‌شود (۴). فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا، به‌عبارتی به‌عنوان تنظیم‌کننده هسته‌ای رونویسی DNA تحت‌تأثیر ROS می‌باشد و در فرآیندهای زیستی متنوعی از جمله التهاب، کنترل رشد و مرگ سلولی شرکت می‌کند. به‌نوعی استرس اُکسایشی در سلول‌ها می‌تواند مهارکننده NF-kB (Inhibitory kappa B kinases) را تخریب کند و با تأثیر مستقیم بر NF-kB، فعالیت آن را تحت تأثیر قرار دهد (۲۹). با توجه به این‌که تاکنون مقالاتی در رابطه با اثرات نانوذرات نقره بر فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا B (NF-kB) در جوجه‌های گوشتی گزارش نشده است، گزارشی 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 سرطانی کبدی انسان که در معرض نانوذرات نقره بودند گزارش شده است (۳۲). همچنین میزان بیان mRNA ژن NF-kB در پلاسما سلول‌های جنین جوجه در معرض نانو ذرات 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 فرارگرفته در معرض باکتری گرم منفی سالمونلا در مقایسه با تیمار شاهد گزارش شده است (۶). محققان گزارش کردند که اضافه کردن ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D در بیماری‌هایی که در اثر آن سطوح دفاع ایمنی کاهش می‌یابد، منجر به کاهش سطح بیان ژن NF-kB شده و از فعال‌شدن فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا B مانع می‌نماید (۱). همچنین براساس یافته‌های محققان با اضافه‌کردن بوتیرات سدیم به جیره طیور سطح لیپوپولی‌ساکاریدهای سلول‌های روده تغییر کرده و میزان بیان ژن NF-kB تغییر می‌کند، به‌نوعی فعال شدن NF-kB را به‌دنبال 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 تنش 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 تنش 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

1. 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.
2. 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 University Veteriner Fakültesi Dergisi, 19: 595-599.
3. 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.
4. 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. Vadalasettya 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 topmelt. *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. Maffei. 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, G.H.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- κ B 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- κ B, Nano Silver