

Research Paper

Response of Anti-Oxidative Stress Genes in Liver and Intestine in Broilers Fed Organic Acid and Silver Nanoparticles Coated on Zeolite in Starter Period

Fatemeh Asgharnezhad¹, Seyed Reza Hashemi² , Saeed Hassani³ and Sharif Rostami⁴

1- M.Sc. Student, 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- Professor, Department of Animal Genetics and Breeding, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

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

Received: 17 July, 2024

Revised: 12 September, 2024

Accepted: 19 October, 2024

Extended Abstract

Background: The use of food supplements to improve growth, optimal production and increase feed efficiency in feeding livestock and poultry has become a common thing as a suitable solution in using feed as well as possible. Along with the progress of the nano industry, attention has been paid to nanoparticles, especially silver nanoparticles, as an antibacterial agent and growth promoter. Silver nanoparticles can be considered as growth stimulating antibiotics and affect the growth and health of livestock and poultry. The mechanism of the effect of silver on pathogenic cells can be due to the high absorption capacity of silver ions, which immediately enters the bacterial cell membrane and makes the cell membrane leaky. On the other hand, organic acids and their salts have found a special place as an additive in livestock and poultry nutrition, and by having growth stimulating effects, they are known as a suitable alternative to antibiotics. The use of organic acids supplement improved the performance of broiler chickens by improving feed consumption, digestion and absorption, reducing the production of toxic substances and increasing favorable intestinal microorganisms, reducing the occurrence of infections and modulating the immune response of poultry. Also, zeolite is a mineral material of hydrated aluminosilicates, which has a three-dimensional and highly porous crystalline structure and contains alkaline elements such as potassium, sodium, calcium, and magnesium. Recently, it has been proposed that silver nanoparticles can act as one of the factors inducing oxidative stress and affect the expression of oxidative genes. This research was conducted with the aim of investigating the effect of silver nanoparticles coated on zeolite and organic acid on the relative expression of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase genes in the liver of broiler chickens.

Methods: This experiment was conducted using 450 broiler chickens in five treatments and six replications and 15 broiler chickens in each experimental unit in a completely randomized design at the Poultry Research Station of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Their nutritional requirements for the starter periods (1-21 days) were prepared according to the recommendation of the Cobb 500 strain maintenance guide and the food rations were adjusted using the UFFDA software. Experimental treatments include: 1) control treatment, 2) control treatment supplemented with 1% zeolite, 3) control treatment supplemented with 1% zeolite coated with 0.5% nanosilver, 4) control treatment supplemented with 0.15% The percentage of organic acid and 5) control treatment supplemented with 1% zeolite covered in 0.5% nanosilver and 0.15% organic acid. The composition and properties of silver nanoparticles were determined by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction analysis (XRD). To perform molecular tests, total RNA was first extracted using TRIzol extraction kit (Sigma Aldrich) and 1% agarose gel was used to determine the quality of RNA extracted from tissues. On the 21st day of breeding period, randomly from 3 biological replicates and 3 technical replicates, a piece of 1 cm long was separated from the liver and small intestine tissue and after transferring to a microtube, to check the relative expression of

superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) and catalase (CAT) genes were transferred to liquid nitrogen.

Results: The data of this research showed that the relative expression of SOD gene in all experimental groups was lower than the control group on the 21st day of the breeding period in liver tissue, so that the lowest relative expression of SOD gene was related to Z group ($p<0.05$). The relative expression of GPX gene was significantly increased in the Z, NS and NSOA groups compared to the control group; While in OA group, the relative expression of GPX gene was significantly lower than the control group ($p<0.05$).

In OA, NS and Z groups, the relative expression of CAT gene was significantly lower than the control group ($p<0.05$). Also, in the intestinal tissue, the results of our experiment showed that on the 21st day of the breeding period, the experimental groups decreased the relative expression of the SOD gene, so that the lowest relative expression was related to the NS group ($p<0.05$).

The relative expression of the GPX gene in the intestinal tissue was significantly lower in the experimental groups than in the control group ($p<0.05$). Evaluation of the relative expression of CAT gene in intestinal tissue in NSOA, NS and OA groups were significantly lower than the control group ($p<0.05$); NS and OA groups had the lowest relative expression.

Conclusions: The treatments containing silver nanoparticles and zeolite showed the greatest effect in the relative expression of SOD, GPX and CAT genes, while the organic acid treatment decreased the relative expression of the mentioned genes. Since the intestine is the first site of absorption of digested food, the cells of the intestinal tissue, as the first defense barrier against free radicals, may show a better response to the liver by increasing the expression of oxidative genes against oxidative food compounds or more genes be involved in the antioxidant system. In the present experiment, changes and a decrease in the relative expression of all three SOD, GPX and CAT genes were observed in the intestinal tissue.

Keywords: CAT, GPX, Oxidative stress, Silver nanoparticles, SOD

How to Cite This Article: Asgharnezhad, F., Hashemi, S. R., Hassani, S., & Rostami, S. (2025). Response of Anti-Oxidative Stress Genes in Liver and Intestine in Broilers Fed Organic Acid and Silver Nanoparticles Coated on Zeolite in Starter Period. *Res Anim Prod*, 16(2), 143-154. DOI: 10.61186/rap.16.2.143

مقاله پژوهشی

پاسخ ژن‌های ضد تنش اکسایشی کبدی و روده در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با اسید اُرگانیک و نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت در دوره آغازین

فاطمه اصغر نژاد^۱، سید رضا هاشمی^۲، سعید حسینی^۳ و شریف رستمی^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، (نویسنده مسئول: hashemi711@yahoo.co.uk)
۳- استاد، گروه ژنتیک و اصلاح دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۴- دانش‌آموخته دکتری، گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۸

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۷

صفحه: ۱۴۳ تا ۱۵۴

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: استفاده از مکمل‌های غذایی جهت بهبود رشد، تولید مطلوب و افزایش بهره‌وری خوراک در تغذیه دام و طیور به‌عنوان یک راه‌حل مناسب در به‌کارگیری هرچه بهتر خوراک امری متداول شده‌است. همراه با پیشرفت صنعت نانو، توجه به نانوذرات به‌ویژه نانوذرات نقره به‌عنوان یک ماده‌ی ضدباکتریایی و محرک رشد افزایش یافته‌است. نانوذرات نقره می‌توانند مانند آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد محسوب گردند و بر رشد و سلامت دام و طیور موثر واقع شود. اخیراً مطرح شده‌است که نانوذرات نقره می‌توانند به‌عنوان یکی از عوامل القاکننده‌ی استرس اکسیداتیو عمل کنند و بیان ژن‌های اکسیداتیو را تحت تأثیر قرار دهند. مکانیزم تأثیر نقره بر سلول‌های بیماری‌زا می‌تواند به‌علت بالا بودن قابلیت جذب یون‌های نقره باشد که بلافاصله وارد غشای سلول باکتری بیماری‌زا می‌شود و غشای سلولی را نشت‌پذیر می‌کند. از طرفی اسیدهای اُرگانیک و نمک‌های آن به‌عنوان یک افزودنی در تغذیه دام و طیور جایگاه خاصی پیدا کرده‌است و با دارا بودن اثرات محرک رشدی، جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها شناخته شده‌اند استفاده از مکمل اسیدهای اُرگانیک، سبب بهبود عملکرد جوجه‌های گوشتی از طریق بهبود مصرف خوراک، هضم و جذب آن، کاهش تولید مواد سمی و افزایش میکرواورگانیزم‌های مطلوب روده، کاهش وقوع عفونت‌ها و تعدیل پاسخ ایمنی طیور گردید. همچنین زئولیت یک ماده‌ی معدنی از جنس آلومینوسیلیکات‌های هیدراته‌است که ساختمان سه‌بعدی و کریستالی به‌شدت منفذدار داشته و حاوی عناصر قلیائی مانند پتاسیم، سدیم، کلسیم، منیزیم می‌باشد. این تحقیق با هدف بررسی اثر نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت و اسید اُرگانیک بر بیان نسبی ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز در کبد و روده جوجه‌های گوشتی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: این آزمایش با استفاده از ۴۵۰ قطعه جوجه گوشتی در پنج تیمار و شش تکرار و در هر واحد آزمایشی ۱۵ قطعه در قالب طرح کاملاً تصادفی در ایستگاه تحقیقات طیور دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، انجام شد. نیازهای تغذیه‌ای آن‌ها برای دوره‌های آغازین (۲۱-۱ روزگی) مطابق با توصیه راهنمای نگهداری سویه کاب ۵۰۰ تهیه شد و جیره‌های غذایی با استفاده از نرم‌افزار UFFDA تنظیم 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 نانوذرات نقره (NS)، (۴) تیمار شاهد مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسید اُرگانیک (OA) و (۵) تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد زئولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانوذرات نقره و ۰/۱۵ درصد اسید اُرگانیک (NSOA) بودند. ترکیب و خواص نانو ذرات نقره به وسیله طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR) و آنالیز انکسار اشعه X (XRD) تعیین گردید. برای انجام آزمایشات مولکولی ابتدا Total RNA با استفاده از کیت استخراج ترايزول (TRIzol) ساخته شرکت سیگماآلدريج (Sigma Aldrich) استخراج و برای تعیین کیفیت RNA استخراجی از بافت‌ها، از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. در روز ۲۱ دوره‌ی پرورش به‌طور تصادفی از ۳ تکرار بیولوژیک و ۳ تکرار تکنیکال، قطعه‌ای به طول ۱ سانتی‌متر از بافت کبد و روده کوچک جدا شد و پس از انتقال به میکروتیوب، جهت بررسی بیان نسبی ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) به اِزْت مایع منتقل شد.

نتایج: داده‌های این تحقیق در روز ۲۱ دوره پرورش در بافت کبد نشان داد بیان نسبی ژن SOD در کلیه تیمارهای آزمایشی کمتر از تیمار شاهد بود به‌طوری‌که که کمترین میزان بیان نسبی ژن SOD مربوط به تیمار Z می‌باشد ($p < 0.05$). بیان نسبی ژن GPX در تیمارهای Z، NS و NSOA نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود؛ در حالی‌که در تیمار OA بیان نسبی ژن GPX به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود ($p < 0.05$). در تیمار NS و OA، بیان نسبی ژن CAT به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود ($p < 0.05$). همچنین، در بافت روده، نتایج آزمایش ما نشان داد که در روز ۲۱ دوره پرورش تیمارهای آزمایشی باعث کاهش بیان نسبی ژن SOD شد به‌طوری‌که کمترین میزان بیان نسبی مربوط به تیمار NS بود ($p < 0.05$). بیان نسبی ژن GPX بافت روده در تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($p < 0.05$). ارزیابی بیان نسبی ژن CAT بافت روده در تیمارهای NSOA، NS و OA نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($p < 0.05$)؛ به‌طوری‌که تیمارهای NS و OA از کمترین میزان بیان نسبی برخوردار بودند.

نتیجه‌گیری: تیمارهای حاوی نانوذرات نقره و زئولیت بیشترین اثرگذاری را در بیان نسبی ژن‌های SOD، GPX و CAT از خود نشان دادند، در صورتی‌که تیمار اسید اُرگانیک موجب کاهش بیان نسبی ژن‌های مذکور گردید. از آن‌جا که روده اولین محل جذب مواد خوراکی هضم شده می‌باشد، ممکن است سلول‌های بافت روده به‌عنوان اولین سد تدافعی در برابر رادیکال‌های آزاد، واکنش بیستری نسبت به کبد از طریق افزایش بیان ژن‌های اکسیداتیو در برابر ترکیبات غذایی اکسیدانی از خود نشان دهد یا ژن‌های بیشتری در سیستم آنتی‌اکسیدانی دخیل شوند. در آزمایش حاضر نیز تغییرات و کاهش بیان نسبی ژن در هر سه ژن SOD، GPX و CAT در بافت روده مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: تنش اکسایشی، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز، نانوذرات نقره

مقدمه

امری متداول شده است (Abbasi et al., 2018). آنتی‌بیوتیک‌ها وقتی در مقادیر پایین به جیره افزوده می‌شوند رشد را تحریک می‌کنند ولی مصرف نسبتاً گسترده و جهانی آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت دامپروری با ایجاد نگرانی‌هایی از

استفاده از مکمل‌های غذایی جهت بهبود رشد، تولید مطلوب و افزایش بهره‌وری خوراک در تغذیه دام و طیور به‌عنوان یک راه‌حل مناسب در به‌کارگیری هرچه بهتر خوراک

استرس اکسیداتیو عمل کنند (Ahmadi & Kurdestany, 2010) و بیان نسبی ژن‌های اکسیداتیو را تحت تأثیر قرار دهند. از این رو این تحقیق با هدف بررسی اثر نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت و اسید آرگانیک بر بیان نسبی ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در کبد ورودده جوجه‌های گوشتی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در ایستگاه تحقیقات طیور، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به مدت ۴۲ روز با استفاده از ۴۵۰ قطعه جوجه گوشتی یک‌روزه نژاد کاب ۵۰۰ در پنج تیمار و شش تکرار و در هر واحد آزمایشی ۱۵ قطعه در قالب طرح کاملاً تصادفی، انجام شد. نیازهای تغذیه‌ای آن‌ها برای دوره‌های آغازین (۲۱-۱ روزگی) و رشد (۴۲-۲۲ روزگی) مطابق با توصیه راهنمای نگهداری سویه کاب ۵۰۰ تهیه شد (جدول ۱) و جیره‌های غذایی با استفاده از نرم‌افزار UFFDA تنظیم 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 نانونقره (NS)، (۴) تیمار شاهد مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسید آرگانیک (OA) و (۵) تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد زئولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانونقره و ۰/۱۵ درصد اسید آرگانیک (NSOA) بودند (Bolandi et al., 2021). اسید آرگانیک مورد استفاده در این تحقیق محصولی از شرکت بايومین‌های ایتوک فردا از کشور اتریش بوده و ترکیبات آن شامل اسید فرمیک و اسید پروپیونیک بود. زئولیت مورد استفاده در این آزمایش از چینه‌های زئولیتی از منطقه استان سمنان به دست آمد. فرمول شیمیایی زئولیت خالص $3 \text{ Al}_6\text{Si}_3\text{O}_{72} \cdot 24\text{H}_2\text{O} \cdot (\text{K}_2, \text{Na}_2, \text{Ca}, \text{Mg})$ بود. زئولیت مورد استفاده با تکنیک فلورسانس اشعه ایکس (XRF) برای تعیین ترکیب شیمیایی آن‌ها بررسی گردید. جهت تهیه نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت به‌طور خلاصه، ابتدا زئولیت با آب مقطر در دستگاه همزن به مدت یک ساعت هم‌زده شد و pH آن در محدوده ۵-۷ ثابت نگه‌داشته شد و سپس نانونقره آماده با درصد مورد نظر مخلوط اضافه شد و مخلوط کردن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۲ اتمسفر ادامه یافت و تثبیت کننده‌های مورد نظر تا تغییر رنگ به قهوه‌ای اضافه گردید. پس از ته‌نشین شدن، مخلوط ماده ته‌نشین شده در دمای محیط و دور از نور خورشید خشک گردید (Bolandi et al., 2021). نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت برای تعیین اندازه، خواص ساختاری، مورفولوژی و ریخت‌شناسی با دستگاه‌های پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی (FESEM، Mira، 3-XMU) 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 (شکل ۱) (Bolandi et al., 2021). همچنین تجزیه و تحلیل گروه‌های عاملی با استفاده از فن‌های طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR)،

ظهور میکروب‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و به واسطه‌ی باقی ماندن آن‌ها در بافت‌های حیوانی، مصرف کلیه آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان محرک رشد و سلامت در صنعت دامپروری از سال ۲۰۰۶ ممنوع شد و موجب گردید که استفاده از جایگزین‌های آنتی‌بیوتیک از جمله اسیدهای آلی، پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها، عصاره‌های گیاهی و گیاهان دارویی رایج شوند (Hashemi et al., 2014; Hashemi & Davoodi, 2012). اسیدهای آرگانیک و نمک‌های آن به عنوان یک افزودنی در تغذیه دام و طیور جایگاه خاصی پیدا کرده‌است و با دارا بودن اثرات محرک رشدی، جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها شناخته شده‌اند (Hashemi & Davoodi, 2012). گزارش شده‌است که اسیدهای آرگانیک از توانایی بالقوه جهت بهبود شاخص‌های عملکردی و افزایش وزن در جوجه‌های گوشتی برخوردار هستند (Hashemi et al., 2017; Leeson et al., 2005). استفاده از مکمل اسیدهای آرگانیک، سبب بهبود عملکرد جوجه‌های گوشتی از طریق بهبود مصرف خوراک، هضم و جذب آن، کاهش تولید مواد سمی و افزایش میکرواورگانیزم‌های مطلوب روده، کاهش وقوع عفونت‌ها و تعدیل پاسخ ایمنی طیور گردید (Adams, 1999). همچنین زئولیت یک ماده‌ی معدنی از جنس آلومینوسیلیکات‌های هیدراته است که ساختمان سه‌بعدی و کریستالی به شدت منفذدار داشته و حاوی عناصر قلیائی مانند پتاسیم، سدیم، کلسیم، منیزیم می‌باشد. گزارش شده است که بازده غذایی و سلامت طیور به واسطه مصرف زئولیت در غذای طیور گوشتی به‌طور محسوس افزایش نشان می‌دهد (Poulsen & Oksbjerg, 1995).

از طرفی نانوتکنولوژی به عنوان یکی از پیشرفته‌ترین علوم در عصر حاضر، در تمام زوایای حیات جانوری، گیاهی، زیست محیطی، صنعتی و نفوذ نموده و افق جدیدی را در علوم طبیعی باز کرده‌است. همراه با پیشرفت صنعت نانو توجه به نانوذرات به‌ویژه نانوذرات نقره به عنوان یک ماده‌ی ضدباکتریایی و محرک رشد افزایش یافته است. نانوذرات نقره با داشتن خصوصیات ویژه‌ی ضد میکروبی بیشترین سهم نانو مواد تولید شده در جهان را به خود اختصاص داده‌است (Mantovani et al., 2009). به طوری که در محیط آزمایشگاهی می‌تواند بیش از ۶۵۰ گونه میکروبی را از بین ببرد (Sondi & Salopek-Sondi, 2004). مکانیزم تأثیر نقره بر سلول‌های بیماری‌زا می‌تواند به علت بالا بودن قابلیت جذب یون‌های نقره باشد که بلافاصله وارد غشای سلول باکتری بیماری‌زا می‌شود و غشای سلولی را نشت‌پذیر می‌کند. در غیر این صورت یون نقره به درون سلول نفوذ کرده و با آنزیم‌هایی که از گروه SH و یا COOH هستند متصل می‌شود که بنابراین فرایندهای اکسیداسیون و فسفوریلاسیون اکسیداتیو در زنجیره‌ی تنفسی مختل گشته و در انتها سلول می‌میرد (Ahmadi & Kurdestany, 2010). نانوذرات نقره می‌توانند مانند آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد محسوب گردند و بر رشد و سلامت دام و طیور موثر واقع شود (Abbasi et al., 2018; Hashemi et al., 2017). اخیراً مطرح شده‌است که نانوذرات نقره می‌توانند به عنوان یکی از عوامل القاکننده‌ی

از ژن مرجع بتا اکتینین استفاده و برای بررسی بیان نسبی ژن هدف و ژن مرجع، پرایمرهای مورد نیاز براساس اطلاعات موجود در سایت NCBI و با استفاده از نرم‌افزار Oligo 7 و Allel ID و با در نظر گرفتن خصوصیات مطلوب برای استفاده در روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی طراحی گردیدند. ساخت پرایمرها توسط شرکت پیشگامان صورت گرفت. اطلاعات و توالی پرایمرهای مربوط به ژن‌های هدف در جدول ۲ نشان داده شده است. داده‌های حاصل از دستگاه RT-PCR مربوط به هر ژن توسط نرم‌افزار GenEx6.0 براساس رابطه $Y = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (Livak, 1997) و به منظور نرمال‌سازی داده‌های به دست آمده لگاریتم آن‌ها به دست آمد. نمودار مربوط به بیان نسبی هر ژن در نرم‌افزار اکسل رسم گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون توکی-کرامر در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام گرفت (SAS, 1999).

به منظور شناسایی گروه‌های عاملی در ژئولیت، ژئولیت پوشش داده شده بر نانو نقره انجام شد. نمونه‌برداری از بافت کبد و روده‌ی کوچک (دئودنوم) در روز ۲۱ دوره پرورش، جهت بررسی بیان نسبی ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز انجام شد. به طوری که ۳ تکرار بیولوژیک و ۳ تکرار تکنیکال به طور تصادفی انتخاب و قطعه جدا شده به طول ۱ سانتی‌متر پس از انتقال به میکروتیوپ به ازت مایع منتقل شد (Smaili et al., 2017). برای انجام آزمایشات مولکولی ابتدا Total RNA با استفاده از کیت استخراج تریزول (TRIZOL) ساخته شرکت سیگما آلد ریچ (Sigma Aldrich) استخراج و برای تعیین کیفیت RNA استخراجی از بافت‌ها، از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد (شکل ۲). 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، ایجاد cDNA به عنوان الگوی اولیه از روی mRNA بالغ به عنوان الگو، با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس برای واکنش RT-PCR انجام گرفت. برای نرمال‌سازی نتایج qRT-PCR

جدول ۱- ترکیب جیره‌های آزمایش (برحسب درصد هوا خشک)

اجزاء جیره غذایی Ingredients (%)	آغازین (Starter) (1-21)	رشد (Grower) (22-42)	آغازین (Starter) (1-21)	رشد (Grower) (22-42)
ذرت (Yellow corn)	53.7	59.96	57.84	51.6
کنجاله سویا (Soybean meal)	39.52	33.25	33.68	39.95
روغن سویا (Soybean oil)	3	3.41	4.11	3.69
نانونقره پوشش داده شده بر ژئولیت (%)	0	0	1	1
(Silver Nanoparticles Coated on Zeolite)	1.47	1.09	1.09	1.47
دی کلسیم فسفات (Dicalcium Phosphate)	1.19	1.29	1.28	1.18
سنگ آهک (Limestone)	0.43	0.32	0.32	0.43
نمک (Salt)	0.25	0.25	0.25	0.25
مکمل ویتامینی ۲ (Vitamin premix)	0.25	0.25	0.25	0.25
مکمل معدنی ۲ (Mineral premix)	0.13	0.05	0.05	0.13
DL-متیونین (DL-Methionine)	0.06	0.13	0.13	0.05
L-لیزین (L-Lysine)				
آنالیز مواد مغذی (Chemical analysis)				
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری/کیلوگرم) ME (Kcal/kg)	2950	3050	2950	3050
پروتئین خام (%) CP	21.2	19.06	21.2	19.06
کلسیم (%) Ca	0.92	0.86	0.92	0.86
فسفر (%) P	0.41	0.33	0.41	0.33
سدیم (%) Na	0.18	0.14	0.18	0.14
لیزین (%) Lys	1.01	0.95	1.01	0.95
متیونین (%) Met	0.47	0.36	0.47	0.36
سیستئین (%) Cys	0.36	0.37	0.36	0.37
آرژنین (%) Arg	1.45	1.27	1.45	1.27
ترئونین (%) Thr	0.84	0.74	0.84	0.74

۱ جیره بر پایه توصیه راهنمای نگهداری سویه کاب ۵۰۰ تهیه شده است.

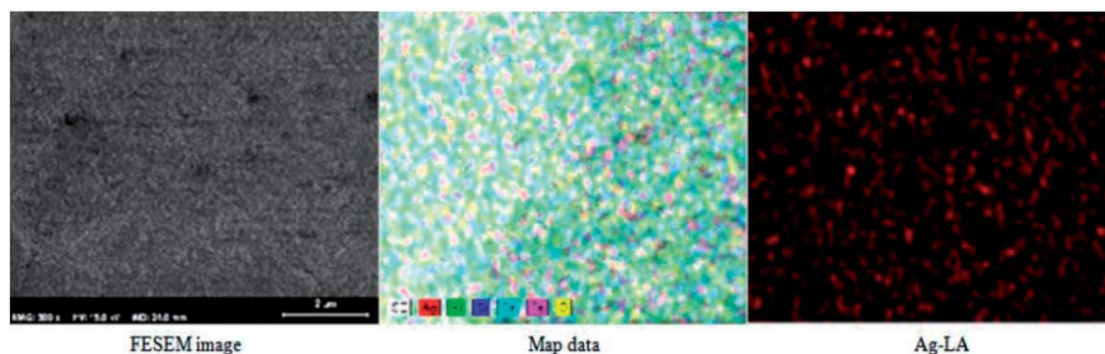
۲ هر کیلوگرم خوراک حاوی: ویتامین A: ۱۵۰۰ واحد بین‌المللی، کوله کلسیفرول: ۲۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین E: ۱۰ واحد بین‌المللی، ریبوفلاوین: ۳/۵ میلی‌گرم، پانتوتیک اسید: ۱۰ میلی‌گرم، نیاسین: ۲۰ میلی‌گرم، کولین کلرید: ۱۰۰۰ میلی‌گرم، بیوتین: ۰/۱۵ میلی‌گرم، اسید فولیک: ۰/۵ میلی‌گرم، پیریدوکسین: ۳ میلی‌گرم، آهن: ۸۰ میلی‌گرم، روی: ۴۰ میلی‌گرم، منگنز: ۶۰ میلی‌گرم، ید: ۰/۱۸ میلی‌گرم، مس: ۸ میلی‌گرم، سلنیوم: ۰/۱۵ میلی‌گرم، کوبالامین: ۱۵ میکروگرم.

1 The diet is prepared based on the guidance of the Cobb 500 strain.

2 Each 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, 1000 mg; 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, 8 mg; Selenium, 0.15 mg; cobalamin, 15 µg.

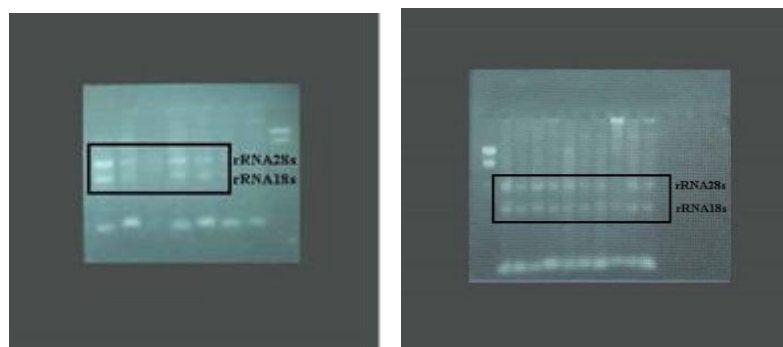
جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده در واکنش RT-PCR

Table 2. The primer sequences used in relative quantitative real-time PCR (q-PCR)					
نام پرایمر Primer name	نوع پرایمر Orientation	توالی 3'.....5' Primer sequence (5'-3')	دمای ذوب TM (°C)	طول قطعه (bp) Length (bp)	Accession No
β-actin	Forward	AAGTTACTCGCCTCTGTGGA	59	198	NM_001101
	Reverse	GCTTCTTCCAATCCAAGTCTA			
SOD	Forward	TGGTGTAAATGGGAATAGC	55	194	NM017050.1
	Reverse	AGTAGTAATGAGATTAAAGTGAT			
GPX	Forward	GTGAGTGTGGGTTTACAGATAGT	60	139	NM030826.3
	Reverse	CTTTGTTGGTGTCTGGTCTTIG			
CAT	Forward	TTACTTTCCTCTTCCCTTACCA	60	105	NM012520.2
	Reverse	GCTTCTTCCAATCCAAGTCTA			



شکل ۱- میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) برای مورفولوژی مورد مطالعه و طیف‌سنجی پرتو ایکس پراکنده انرژی (EDX) برای تجزیه و تحلیل نقشه‌برداری عنصری و ترکیب مواد نانوذرات نقره پوشش داده‌شده روی ژئولیت

Figure 1. Field emission scanning electron microscopy (FESEM) micrographs for morphology studied and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) for elemental map-ping analyses and materials composition of the Ag-NPs coated on zeolite



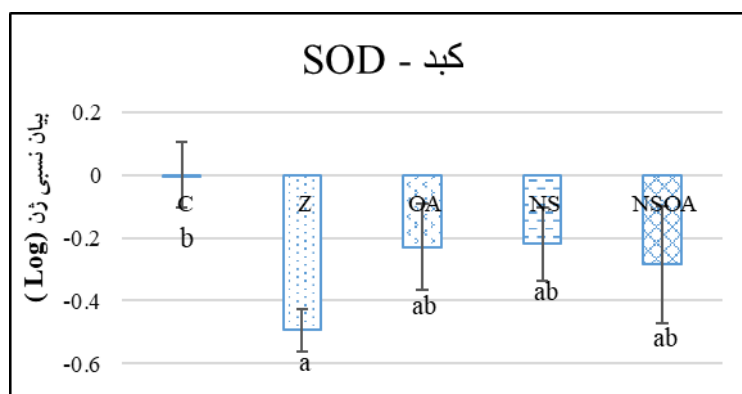
شکل ۲- باندهای تشکیل شده مربوط به استخراج RNA بر روی ژل آگارز

Figure 2: The bands formed related to the extraction of the RNA on agarose gel

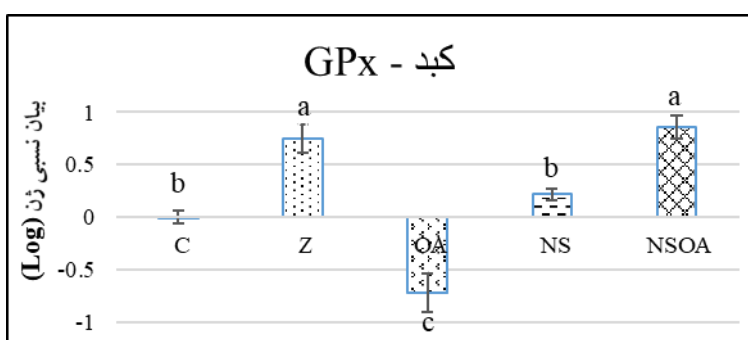
نتایج و بحث

بود ($p < 0.05$). در تیمار OA بیان نسبی ژن GPX به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود ($p < 0.05$). در حالی‌که در تیمارهای Z، NS و NSOA بیان نسبی ژن GPX نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود (شکل ۴، $p < 0.05$). میزان بیان نسبی ژن CAT بافت کبد در روز ۲۱ دوره پرورش در تیمار OA، NS و Z نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($p < 0.05$). بیان نسبی ژن CAT در تیمار NSOA در مقایسه با تیمار شاهد بیشتر بود.

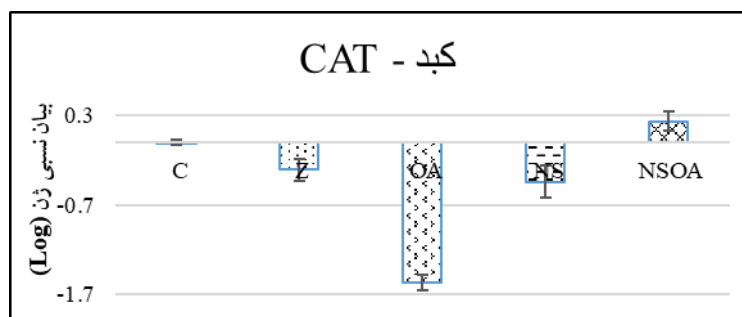
یافته‌های میزان بیان نسبی ژن‌های SOD، GPX و CAT بافت کبد در روز ۲۱ در شکل‌های ۳ تا ۵ آورده شده‌است. اثر تیمارهای آزمایشی بر بیان نسبی ژن SOD بافت کبد در روز ۲۱ دوره پرورش در شکل ۳ گزارش شده‌است. بیان نسبی ژن SOD در کلیه تیمارهای آزمایشی در روز ۲۱ کمتر از تیمار شاهد بود (شکل ۳). بین تیمارهای OA، NS و NSOA با تیمار شاهد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). در تیمار Z میزان بیان نسبی ژن SOD نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کمتر



شکل ۳- بیان نسبی ژن SOD در بافت کبد در روز ۲۱ دوره پرورش
Figure 3. Relative expression of SOD gene in liver tissue on d 21



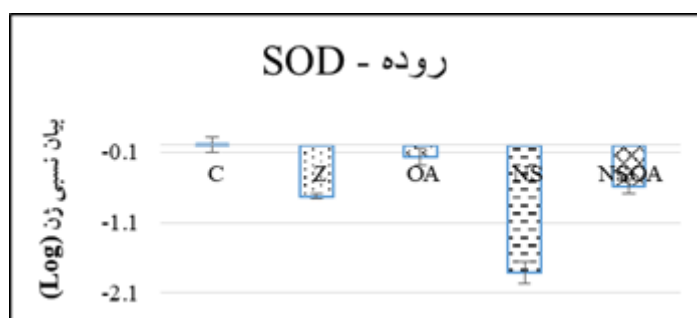
شکل ۴- بیان نسبی ژن GPX در بافت کبد در روز ۲۱ دوره پرورش
Figure 4. Relative expression of GPX gene in liver tissue on d 21



شکل ۵- بیان نسبی ژن CAT در بافت کبد در روز ۲۱ دوره پرورش
Figure 5. Relative expression of CAT gene in liver tissue on d 21

C: شاهد، Z: ژئولیت، OA: اسید آرگانیکی، NS: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر ژئولیت، NSOA: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر ژئولیت مکمل شده با اسید آرگانیکی

C: control or basal diet; 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.

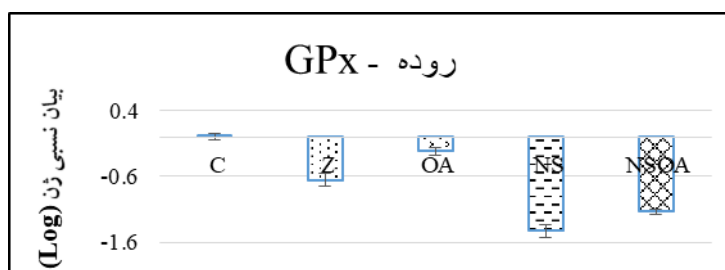


شکل ۶- بیان نسبی ژن SOD در بافت روده در روز ۲۱ دوره پرورش
Figure 6- Relative expression of SOD gene in intestine tissue on d 21

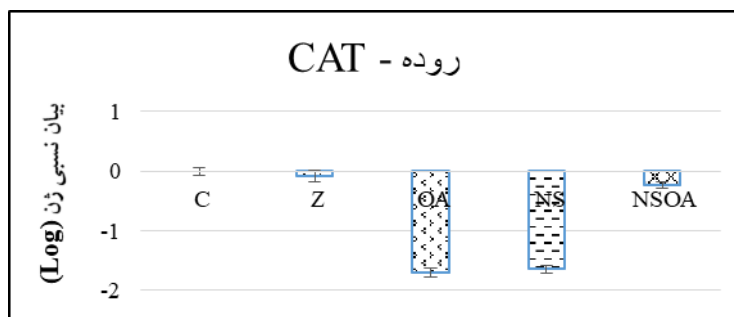
پراکسید هیدروژن داشته‌است که سلول با افزایش بیان نسبی ژن GPX و به دنبال آن به تعادل رساندن سیستم آنتی‌اکسیدانی، درصد کاهش اثرات مضر H_2O_2 موجود برآمده‌است. علاوه بر این، یافته‌های ما در مطالعه دیگری که به بررسی پاسخ رشد و ایمنی هومورال در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با اسیدهای آلی و ژئولیت پوشش داده شده با نانوذرات نقره پرداخته بودیم بیان کرد که جیره غذایی حاوی نانوذرات نقره به همراه اسیدهای آلی منجر به کاهش وزن جوجه‌های گوشتی می‌شود. همچنین، جیره حاوی ژئولیت پوشش داده شده با نانوذرات نقره در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایش، ضریب تبدیل خوراک را به طور معنی‌داری افزایش داد (Abbasi et al., 2021). گزارش شده است که استفاده از نانوذرات نقره تاثیر معنی‌داری بر مصرف خوراک، میزان ضریب تبدیل خوراک و وزن بدن ندارد (Ahmadi et al., 2013). در حالی که مصرف نانوذرات نقره (۹۰۰ قسمت در میلیون در جیره) توانست وزن زنده‌مانی جوجه‌ها را به طور معنی‌داری افزایش دهد و منجر به کاهش معنی‌دار ضریب تبدیل خوراک در مقایسه با گروه شاهد شد (Andi et al., 2011). بهبود وزن‌گیری، ضریب تبدیل خوراک و خوراک مصرفی بر اثر مصرف نانوذرات نقره ممکن است به دلیل بروز اختلال در هضم بر اثر پیوند نانوذرات نقره با اجزاء جیره باشد (Abbasi et al., 2021).

نتایج میزان بیان نسبی ژن‌های SOD، GPX و CAT در بافت روده در روز ۲۱ در شکل‌های ۶ تا ۸ آورده شده است. در بافت روده تیمارهای آزمایشی موجب کاهش بیان نسبی ژن SOD نسبت به تیمار شاهد گردیدند. بین تیمارهای Z و NS، NSOA، تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.05$) که کمترین میزان بیان نسبی مربوط به تیمار NS بود (شکل ۶). بیان نسبی ژن GPX در بافت روده در تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری کمتر بود ($p < 0.05$). اختلاف معنی‌داری از نظر آماری بین تیمارهای Z، NSOA و NS مشاهده نشد (شکل ۷). همچنین ارزیابی بیان نسبی ژن CAT در بافت روده در شکل ۸ نشان داد که در تیمارهای NSOA، NS و OA نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری کمتر بود ($p < 0.05$). تیمارهای NS و OA از کمترین میزان بیان نسبی برخوردار بودند. اختلاف معنی‌داری بین تیمار Z با تیمار شاهد مشاهده نشد ($p > 0.05$).

در این مطالعه، ما به منظور ارزیابی اثرات نانوذرات نقره بر بیان نسبی ژن‌های SOD، GPX و CAT در کبد و روده جوجه‌های گوشتی در دوره آغازین از ۴۵۰ قطعه جوجه گوشتی یک‌روزه نژاد کاب ۵۰۰ در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده کردیم. به طور کلی، یافته‌های ما نشان داد که کمترین میزان بیان نسبی ژن‌های SOD، GPX و CAT مربوط به تیمار اسید آرگانیک می‌باشد. بنابراین، تیمارهای حاوی ژئولیت و نانوذرات نقره در بافت کبد، اثر مستقیم بر تولید یا افزایش



شکل ۷- بیان نسبی ژن GPX در بافت روده در روز ۲۱ دوره پرورش
Figure 7- Relative expression of GPX gene in intestine tissue on d 21



شکل ۸- بیان نسبی ژن CAT در بافت روده در روز ۲۱ دوره پرورش

Figure 8- Relative expression of CAT gene in intestine tissue on d.21

C: شاهد، Z: زئولیت، OA: اسید آرگانیک، NS: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت، NSOA: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت مکمل شده با اسید آرگانیک

C: control or basal diet; 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.

طریق غذا و در نهایت فروپاشی نیروی حرکتی پروتون‌ها می‌شوند. کمپلکس یک در اشریشیاکلی حاوی سیستمین با قدرت جذب بالا برای نقره می‌باشد (Bragg & Rainnie, 1974; Friedrich, 1998). اتصال Ag به این آنزیم‌های زنجیره‌ای تنفسی باکتری باعث ناکارآمدی الکترون‌ها به اکسیژن در اکسیداز نهایی و تولید مقادیر زیادی ROS خواهد شد. استفاده از نانوذرات نقره در مقادیر ۲۵، ۷۵ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب کاهش بیان ژن SOD-1 در سلول‌های سرتولی طیور شد (Surai, 2016). اندازه‌گیری ایزوفرم نوع دوم ژن SOD نشان داد که سطوح مختلف نانوذرات نقره استفاده شده اثرات کاهشی بر بیان ژن SOD-2 در سلول‌های سرتولی طیور دارد (Adewoyin et al., 2017). همچنین نشان داده شد، بیان ژن SOD-1 در همه‌ی غلظت‌های ۲۵، ۷۵ و ۱۲۵ قسمت در میلیون نانوذرات نقره، در سلول‌های سرتولی کاهش یافت (Hassanpour et al., 2015). در اندازه‌گیری بیان ژن SOD و GPX، هفت روز پس از تزریق نانوذرات نقره مشاهده شد که، SOD در هر دو بافت کبد و بیضه موش به‌میزان زیاد بیان شد اما GPX تنها در بافت بیضه بیان شد و در روز ۲۸ پس از تزریق این دو ژن در هر دو بافت بیان نشدند (Coccini et al., 2014).

آنزیم کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز هر دو در کاهش پراکسید هیدروژن نقش دارند. بیشتر بافت‌های حیوانی هم دارای CAT و هم دارای GPX می‌باشند. در میزان زیر حد نرمال تولید H_2O_2 ، به‌طور عمده GPX مسئولیت حذف آن را بر عهده می‌گیرد. در صورتی که غلظت H_2O_2 افزایش یابد، کاتالاز برای حذف H_2O_2 مهم‌تر می‌شود. کبد دارای غلظت بالایی از CAT و GPX می‌باشد. کاتالاز به‌طور عمده در پراکسی‌زوم‌ها قرار دارد و حدود ۱۰ درصد از کل GPX به‌طور عمده در سیتوزول و ماتریکس میتوکندری یافت می‌شود.

کاهش بیان نسبی ژن CAT ناشی از تیمارهای NS، NSOA، به‌دنبال افزایش بیان نسبی ژن GPX را می‌توان این‌گونه تفسیر کرد که تیمارهای مذکور تا حدی بر افزایش پراکسید هیدروژن اثر گذاشتند که افزایش بیان نسبی GPX

میتوکندری محل اصلی تولید ROS در سلول می‌باشد. در طول فسفوریلاسیون اکسیداتیو، اکسیژن با دریافت کنترل‌شده الکترون در زنجیره تنفسی به مولکول آب تبدیل می‌شود. برخی الکترون‌ها از زنجیره‌ای انتقال الکترون فرار می‌کنند و توسط مولکول اکسیژن پذیرفته می‌شوند که تشکیل رادیکال آزاد سوپراکسید آنیون را می‌دهند. در اغلب موارد رادیکال‌های آزاد سوپراکسید آنیون به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شوند و به نوبه‌ی خود می‌تواند به‌طور کامل به آب کاهش یابد یا تاحدودی رادیکال هیدروکسیل تولید کنند (Boonstra & Post, 2004). ترکیبات سمی و زئوبیوتیک‌ها از دو طریق نرخ تولید سوپراکسید آنیون میتوکندریایی را افزایش می‌دهند. برخی از این ترکیبات با مسدود کردن انتقال الکترون در افزایش استرس اکسیداتیو دخیل می‌باشند و دیگر ترکیبات زئوبیوتیک با دریافت یک الکترون از یک حامل تنفسی و انتقال آن به مولکول اکسیژن، و تحریک تشکیل سوپراکسید آنیون بدون مهار چرخه تنفسی نقش خود را ایفا می‌کنند (Turrens, 2003). انتظار می‌رود که مهار زنجیره تنفسی باعث کاهش سنتز ATP شود. تجمع نانوذرات نقره در میتوکندری با اختلال در زنجیره انتقال الکترونی می‌تواند عملکرد طبیعی سلول را تغییر دهد و در نهایت منجر به تولید ROS و کاهش میزان ساخت ATP گردد (Flores-López et al., 2019). فرض بر این است که واکنش بین H_2O_2 و Ag-NP یکی از عواملی است که باعث ایجاد Ag^+ در محیط زنده می‌شود. سمیت یون‌های نقره در اشریشیاکلی و سایر سلول‌های میکروبی به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌است و مکانیسم‌های مختلفی برای عملکرد Ag^+ در زنجیره تنفسی پیشنهاد شده‌است. نشان داده شد که یون‌های نقره با مهار جذب و تعویض فسفات در اشریشیاکلی، باعث خروج فسفات انباشته شده می‌شود (Schreurs & Rosenberg, 1982). همچنین اتصال یون نقره به تیول پروتئین‌های موجود در زنجیره تنفسی با اختلال در عملکرد میتوکندری همراه است. یون‌های نقره احتمالاً با اتصال به پروتئین‌های غشایی میتوکندری باعث نشست پروتون‌ها از

تأکید و اثبات کرد. اما این که ترکیب اسید آرگانیک با نانوذرات نقره چگونه موجب افزایش بیان نسبی برخی از ژن‌های اکسیداتیو شد، علت آن نامشخص است. از آنجاکه روده اولین محل جذب مواد خوراکی هضم شده می‌باشد، ممکن است سلول‌های بافت روده به‌عنوان اولین سد تدافعی در برابر رادیکال‌های آزاد، واکنش بیستری نسبت به کبد از طریق افزایش بیان ژن‌های اکسیداتیو در برابر ترکیبات غذایی اکسیدانی از خود نشان دهد یا ژن‌های بیستری در سیستم آنتی‌اکسیدانی دخیل شوند. در آزمایش حاضر نیز تغییرات و کاهش بیان نسبی ژن در هر سه ژن SOD، GPX و CAT در بافت روده مشاهده شد.

نتیجه‌گیری کلی

در بافت کبد، تیمارهای حاوی نانوذرات نقره و زئولیت بیشترین اثرگذاری را در بیان نسبی ژن‌های SOD، GPX و CAT از خود نشان دادند، درصورتی که تیمار OA موجب کاهش بیان نسبی ژن‌های مذکور گردید. در حالی که بیشترین اثرگذاری در بیان نسبی ژن‌های SOD، GPX و CAT در بافت روده در تیمارهای اسیداورگانیک و زئولیت مشاهده شد. باتوجه به ناشناخته بودن مکانیسم اثر ترکیب اسید آرگانیک با نانوذرات نقره در افزایش بیان برخی از ژن‌های اکسیداتیو، پیشنهاد می‌شود در این زمینه پژوهشی صورت گیرد و چگونگی این فرایند بررسی شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد فاطمه اصغرنژاد می‌باشد. بدین وسیله از جناب آقای دکتر داریوش داودی از موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به‌جهت حمایت‌هایشان در راستای تهیه نانوقره پوشش داده‌شده بر زئولیت قدردانی می‌شود. همچنین از همکاری مسئولان ایستگاه تحقیقات طیور و مسئولان آزمایشگاه‌های علوم دامی و تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که شرایط لازم جهت این پژوهش را فراهم نمودند قدردانی و تشکر گردد. همچنین کلیه امور پژوهشی انجام شده در این تحقیق بر اساس موازین اخلاق در پژوهش صورت پذیرفته و مراتب آن در معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی جهت این تحقیق تأیید و ثبت شده‌است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی را در این پژوهش شناسایی نکردند. این مطالعه تأییدیه اخلاقی (تصویب شماره ۱۳۵۵/۹۷/۲۰) را از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان دریافت کرد. پرورش و مراقبت طیور تحت مدیریت مزرعه دانشکده علوم دامی بود که در آن تحقیق انجام شد.

قادر به کاهش اثر H_2O_2 بوده و نیازی به افزایش بیان نسبی CAT در سلول دیده نشده‌است.

بافت کبد سرشار از گلوکاتیون می‌باشد. توانایی و ظرفیت سیستم گلوکاتیون برای تخریب H_2O_2 در کبد و سایر بافت‌ها به فعالیت GPX، میزان $NADPH-H^+$ ذخیره از مسیر پنتوز فسفات و محتوای GSH بستگی دارد که در زمان یک روز متفاوت است. در کبد سیستم گلوکاتیون ظرفیت زیادی در حذف H_2O_2 دارد. کاتالاز به‌طور فراوان در بافت‌های مختلف وجود دارد و بافت چربی نسبت به بافت کبد و کلیه، کاتالاز بیستری بیان می‌کند (Ishida et al., 1995). همچنین مشاهده شد که در جوجه‌های گوشتی که جیره حاوی نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت دریافت کرده بودند، غلظت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینوترانسفراز، تری‌گلیسرید و کلسترول کبدی کاهش یافت. بر اساس این نتایج ممکن است نانوذرات نقره از صدمات کبدی جلوگیری کرده و بنابراین می‌تواند به عنوان محرک رشد و سلامت در جوجه‌های گوشتی مورد استفاده قرار گیرد (Esmaili et al., 2016).

در آزمایش حاضر از زئولیت جهت پوشش دادن نانوذرات نقره بر آن استفاده شد. باتوجه به ویژگی‌های زئولیت یعنی متخلخل بودن و داشتن سطوح کاتیونی قابل تبادل، این احتمال وجود داشت که زئولیت از طریق به‌دام انداختن یا خنثی کردن رادیکال‌های آزاد بتواند در کاهش اثرات اکسیداتیو، مؤثر واقع شود. اما آزمایش ما نشان داد که زئولیت اثر دو بعدی بر فعال و مهار بیان نسبی ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دارد. علت این عکس‌العمل زئولیت مشخص نیست زیرا هیچ تحقیقی درمورد اثر زئولیت بر بیان نسبی ژن‌های اکسیداتیو مورد مطالعه قرار نگرفته‌است.

نتایج آزمایش ما نشان داد که در روز ۲۱ دوره پرورش در بافت روده، تیمارهای آزمایشی باعث کاهش بیان نسبی ژن‌های مورد تحقیق می‌شود. اسیدهای آرگانیک پس از عبور از دیواره سلولی باکتری‌ها، به یون‌های سازنده خود یعنی $RCOO^-$ و H^+ تجزیه می‌شوند. یون‌های H^+ سبب کاهش pH درون سلولی می‌شوند که باکتری جهت حفظ pH طبیعی داخل سلول، یون‌های مثبت H را با صرف انرژی به محیط بیرون انتقال می‌دهد. تعدیل pH نیازمند صرف انرژی بالایی بوده تا جایی که سلول توانایی رشد و تقسیمات سلولی را از دست می‌دهد و از بین می‌رود. همچنین تجمع آنیون‌ها ($RCOO^-$) در درون سلول از طریق نابودی DNA و ممانعت از سنتز پروتئین، مانع از تکثیر باکتری‌ها می‌شوند (Davidson et al., 2012). در این تحقیق، انتظار می‌رفت اسید آرگانیک با تولید یون هیدروژن (ناشی از تجزیه گروه عاملی $COOH$) به‌عنوان یک احیا کننده، بتواند از طریق ترکیب با رادیکال‌های آزاد و خنثی‌سازی آن‌ها، اثرات اکسیداتیو را تقلیل دهد، که نتایج حاصل از آزمایش حاضر اثرات آنتی‌اکسیدانی اسید آرگانیک به‌عنوان یک افزودنی آلی را

References

- 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.
- Abbasi, A., Hashemi, R., Hassani, S., & Ebrahimi, M. (2021). Growth Response and Humoral Immunity of Broiler Chickens Fed Organic Acids and Zeolite Coated with Silver Nanoparticles under Heat Stress Conditions. *Research on Animal Production*, 12(33), 113-123. doi:10.52547/rap.12.33.113. [In Persian]
- Adams, C. (1999). Poultry and dietary acids. *Feed Int*, 20(19), 1370-1372.
- Adewoyin, M., Ibrahim, M., Roszaman, R., Md Isa, M. L., Mat Alewi, N. A., Abdul Rafa, A. A., & Anuar, M. N. N. (2017). Male infertility: the effect of natural antioxidants and phytochemicals on seminal oxidative stress. *Diseases*, 5(1), 9. https://doi.org/10.3390/diseases5010009.
- Ahmadi, F., & Kurdestany, A. H. (2010). The impact of silver nano particles on growth performance, lymphoid organs and oxidative stress indicators in broiler chicks. *Global Veterinaria*, 5(6), 366-370.
- 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.
- Andi, M. A., Hashemi, M., & Ahmadi, F. (2011). Effects of feed type with/without nanosil on cumulative performance, relative organ weight and some blood parameters of broilers. *Global Veterinaria*, 7(6), 605-609.
- 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. https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.1892546.
- Boonstra, J., & Post, J. A. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*, 337, 1-13. https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.04.032.
- Bragg, P., & Rainnie, D. (1974). The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 20(6), 883-889. https://doi.org/10.1139/m74-135.
- Coccini, T., Gornati, R., Rossi, F., Signoretto, E., Vanetti, I., Bernardini, G., & Manzo, L. (2014). Gene expression changes in rat liver and testes after lung instillation of a low dose of silver nanoparticles. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 5(5), 1-12. https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000227.
- Davidson, P. M., Taylor, T. M., & Schmidt, S. E. (2012). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 765-801. https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch30.
- Esmaili, M., Hashemi, S. R., Davoudi, D., Jafari Ahangari, Y., Hosni, S., Blandi, N., & Shabani, A. (2015). Effect of silver nanoparticles coated on clinoptilolite on functional traits, liver enzymes and blood lipids concentration of broiler chickens. *Livestock Production*, 18(1), 161-171. doi: 10.22059/jap.2016.54849
- Flores-López, L. Z., Espinoza-Gómez, H., & Somanathan, R. (2019). Silver nanoparticles: Electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress, beneficial and toxicological effects. Mini review. *Journal of Applied Toxicology*, 39(1), 16-26. doi.org/10.1128/9781555818463.ch30.
- Friedrich, T. (1998). The NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1364(2), 134-146. https://doi.org/10.1016/s0005-2728(98)00024-3.
- 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. https://doi.org/10.22069/psj.2014.1965.
- 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. https://doi.org/10.3923/ajava.2012.105.116.
- Hassanpour, H., Mirshokraei, P., Sadrabad, E. K., Dehkordi, A. E., Layeghi, S., Afzali, A., & Mohebbi, A. (2015). In vitro effect of nanosilver on gene expression of superoxide dismutases and nitric oxide synthases in chicken Sertoli cells. *Animal*, 9(2), 295-300. https://doi.org/10.1017/S1751731114002262.
- Institute, S. A. S. (1999). SAS/STAT user's guide (Vol. 3): SAS Publ.
- Ishida, A., Kameshita, I., Okuno, S., Kitani, T., & Fujisawa, H. (1995). A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 212(3), 806-812. https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2040.
- Leeson, S., Namkung, H., Antongiovanni, M., & Lee, E. (2005). Effect of butyric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens. *Poultry Science*, 84(9), 1418-1422. https://doi.org/10.1093/ps/84.9.1418.

- Livak, K. (1997). Relative quantification of gene expression: ABI Prism 7700 sequence detection system. *Applied Biosystems User Bulletin*, 2.
- Mantovani, E., Porcari, A., Meili, C., & Widmer, M. (2009). Framing nano project: A multistakeholder dialogue platform framing the responsible development of nanosciences & nanotechnologies. *Mapping Study on Regulation and Governance of Nanotechnologies. Mapping Study on Regulation and Governance of Nanotechnologies*.
- Poulsen, H. D., & Oksbjerg, N. (1995). Effects of dietary inclusion of a zeolite (clinoptilolite) on performance and protein metabolism of young growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 53(3-4), 297-303. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)00744-T](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)00744-T).
- Schreurs, W., & Rosenberg, H. (1982). Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 152(1), 7-13. <https://doi.org/10.1128/jb.152.1.7-13.1982>.
- Smaili, M., Hashemi, S. R., Davoodi, D., Ahangari, Y. J., Hassani, S., & Shabani, A. (2017). Effect of supplementing diet with zeolite coated with silver nanoparticles on performance, intestinal morphology characteristics and ileum microbial population of broiler chickens. *Iranian Journal of Animal Science*, 47(4), 579-588.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>.
- Surai, P. F. (2016). Antioxidant systems in poultry biology: superoxide dismutase. *Journal of Animal Research and Nutrition*, 1(1), 8. <https://doi.org/10.21767/2572-5459.100008>.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(2), 335-344.