Sari Agriculture Sceinces and Natural Resources University

Research on Animal Production, Vol.14, No. 41, Autumn 2023 p: 105-115

"Research Paper"

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

Negin Akhundpour[1], Seyed Reza Hashemi[2], Ayoub Farhadi[3] and Elnaz Arabian[4]

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

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

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

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

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

Extended Abstract

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

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

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

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

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

"مقاله پژوهشی"

مطالعه اثر زئولیت، اسید اُرگانیک و نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت بر بیان ژن‌های آپوپتوزیس BAX و Bcl_2 در کبد جوجه‌های گوشتی

نگین آخوندپور[۱]، سید رضا هاشمی[۲]، ایوب فرهادی[۳] و الناز عربیان[۴]

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

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: نانو ذرات نقره یکی از دستاوردهای جدید در فناوری نانو است که به‌علت فعالیت ضدمیکروبی در زمینه‌هایی مانند پزشکی، دامپزشکی، کشاورزی و داروسازی کاربرد دارد. نانوذرات نقره می‌تواند با ماکرومولکول‌های زیستی وارد واکنش شده و با اختلال هموستاز داخل سلولی سبب القای فرآیند آپوپتوز شود. تنظیم آپوپتوز بسیار پیچیده بوده و پروتئین‌های مختلف در آن دخیل هستند. پروتئین Bcl_2 که شامل پروتئین مهارکننده است از تنظیم‌کننده اساسی این فرآیند به‌شمار می‌رود و همچنین پروتئین پیش‌برنده BAX در پیشرفت فرآیند آپوپتوزی نقش دارد. لذا این پژوهش با هدف مطالعه اثر زئولیت، اسید ارگانیک و نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت بر بیان ژن‌های آپوپتوز BAX و Bcl_2 در جوجه‌های گوشتی انجام شد.

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

یافته‌ها: نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بیان ژن Bcl_2 در جوجه‌های گوشتی دریافت کننده تیمار زئولیت در روز ۲۱ دوره پرورش و تیمار نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت در روز ۴۲ دوره پرورش در مقایسه با میزان بیان این ژن در تیمار شاهد به‌صورت معنی‌داری در بافت کبد افزایش یافت ($p<0/05$). هم‌چنین بیان ژن BAX بافت کبد در تیمار NS و تیمار نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت مکمل شده با اسید اُرگانیک (NSOA) در روز ۴۲ دوره پرورش در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که اثر افزایشی بر بیان ژن‌های Bcl_2 و BAX توسط تیمارهای زئولیت و NS و NSOA احتمالاً می‌تواند در تنظیم فرایند آپوپتوز در طی شرایط تنش‌های اکسایشی نقش داشته باشند. این در حالی است که این اثر در تیمار اسید ارگانیک مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، جوجه‌های گوشتی، ژن BAX، ژن Bcl_2، نانوذرات نقره

مقدمه

از دهه‌های قبل، آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان، پیشگیری از بیماری‌ها و بهبود رشد و سلامت در جیره دام و طیور به‌طور گسترده‌ای در سرتاسر جهان استفاده می‌گردید، اما به‌دلیل خطر احتمالی در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروب‌های بیماری‌زا به‌کارگیری آنها به‌عنوان محرک رشد و سلامت از سال ۲۰۰۶ منع شده است (Hashemi and Davoodi, 2012). نانوذرات نقره یکی از دستاوردهای جدید در فنآوری نانو است که به‌علت فعالیت ضدمیکروبی در زمینه‌هایی مانند پزشکی، دامپزشکی، کشاورزی و داروسازی کاربرد دارد (Choi et al., 2009). مهم‌ترین دلایل استفاده گسترده از نانوذرات نقره ویژگی‌های ضدباکتریایی، پایداری بالا و از بین بردن باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است و استفاده آن در پرورش دام و طیور مورد توجه قرار گرفته است و اعتقاد بر این است که استفاده از نانوذرات نقره می‌تواند مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و واکسن‌ها را محدود کند یا به صفر برساند. همچنین این مواد به‌دلیل خواص ضدباکتریایی بیشترین سهم نانو مواد را در جهان به‌خود اختصاص می‌دهند (Choi et al., 2009). اسید اُرگانیک یکی از افزودنی‌های خوراکی است که دارای خواص ضدباکتریایی بوده و به‌عنوان کنترل کننده‌ی عوامل بیماری‌زا در خوراک و آب طیور می‌باشد (Ricke, 2003) که سبب کاهش تولید متابولیت‌های سمی، جلوگیری از تشکیل باکتری‌های مضر در روده و در نهایت موجب بهبود عملکرد طیور می‌شود (Roth and Kirchgessner, 1998). زئولیت از جمله مواد کانی است که با داشتن خواص فیزیکی و شیمیایی، کاربرد وسیعی در بهبود بازده دام و طیور پیدا کرده است که به‌عنوان حمل‌کننده‌ای مناسب برای نانوذرات نقره در نانوتکنولوژی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. نانوذرات نقره باعث بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش و موجب بهبود بازده استفاده از انرژی و پروتئین می‌گردد. هم‌چنین نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت باعث بهبود برخی خصوصیات مورفولوژی روده و سبب بهبود ضریب تبدیل غذایی و استفاده از نانوذرات در سطح ۰/۵ درصد باعث افزایش وزن سینه جوجه گوشتی می‌شود. ممکن است نانوذرات نقره با تولید رادیکال‌های آزاد منجر به آسیب سیستم ایمنی در طیور گردد، اما استفاده از ۵۰ قسمت در میلیون در نانوذرات نقره در جیره‌ی جوجه گوشتی سیستم ایمنی آن‌ها را به‌خطر نمی‌اندازد و می‌تواند به‌عنوان افزودنی در خوراک طیور مورد استفاده قرار گیرد (Abbasi et al., 2018; Bolandi et al., 2021; Hashemi et al., 2017; Hashemi et al., 2014). آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی

شده سلول با ویژگی‌های متمایز مورفولوژی و مکانیزم‌های بیوشیمیایی وابسته به انرژی مشخص می‌شود و عمده‌ترین شکل خودکشی سلول است که بدون آسیب به سلول‌ها و یا بافت‌های اطراف باعث حذف سلول‌های ناخواسته، آسیب دیده و یا خطرناک می‌شود (Raff, 1992). این سیستم حذف سلولی برای حفظ تعادل بافتی، هم در دوران جنینی و هم در دوران بلوغ، لازم است و همچنین در بیماری‌های مختلف انسانی مثل سرطان، بیماری‌های خودایمنی و بیماری‌های با کاهش سلولی مانند پارکینسون و آسیب کبدی نقش دارد (Fischer and Schulze-Osthoff, 2005). نانوذرات نقره می‌تواند با ماکرومولکول‌های زیستی وارد واکنش شده و با اختلال در هموستاز داخل سلولی سبب القای فرآیند آپوپتوزی گردد (Sun et al., 2013). اخیراً دریافتند که ایجاد تنش‌های اکسایشی باعث تغییر در بیان ژن‌ها و القای آپوپتوز می‌شود. تنظیم آپوپتوز بسیار پیچیده بوده و پروتئین‌های مختلف در آن دخیل هستند. خانواده پروتئینی Bcl_2 که شامل پروتئین مهارکننده است، از تنظیم‌کننده اساسی این فرآیند به شمار می‌رود. اعضا خانواده به دو گروه پیش‌برنده (BAX, Bad و Bid) و مهارکننده (Bcl_2) آپوپتوز تقسیم می‌شوند (Ricci and Zong, 2006). در آپوپتوز آنزیم کاسپاز به دو گروه شروع‌کننده و عمل‌کننده تقسیم می‌شود. بدین‌جهت با توجه به این‌که تحقیقاتی در زمینه‌ی سلولی و مولکولی درمورد اثر نانوذرات نقره بر بیان ژن‌های آپوپتوز و مرگ سلولی صورت نگرفته است، این پژوهش به‌منظور بررسی اثر زئولیت، اسید اُرگانیک و نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت با و بدون تنش گرمایی بر بیان ژن‌های آپوپتوز BAX و Bcl_2 در جوجه‌های گوشتی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

اسید اُرگانیک مورد استفاده در این تحقیق بایوترونیک اس. ای. فورت (Biotronic SE forte) محصولی از شرکت بایومین‌های ایتوک فردا از کشور اتریش بوده و ترکیبات آن شامل اسید فرمیک و اسید پروپیونیک می‌باشد. زئولیت مورد استفاده در این آزمایش از چینه‌های زئولیتی از منطقه استان سمنان به‌دست آمد. سنگ زئولیتی استحصالی پودر و الک شد تا ذراتی به‌اندازه ۲-۱ میلی‌متر تولید شود. آب مقطر برای شستشو و حذف آلودگی از ذرات استفاده شد و متعاقباً در دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد در تمام طول شب در کوره خشک شد. فرمول شیمیایی زئولیت خالص $(K_2, Na_2, Ca, Mg)_3$ $Al_6Si_{30}O_{72}. 24H_2O$ بود. زئولیت مورد استفاده با تکنیک فلورسانس اشعه ایکس (XRF) برای تعیین ترکیب شیمیایی آنها مورد بررسی قرار گرفت و داده‌های XRF جمع‌آوری شده بر روی یک طیف‌سنج XRF PHILIPSPW1480 با لوله Rh آنالیز شدند (جدول ۱).

جهت تهیه نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت با درصد موردنیاز ابتدا هر کیلو زئولیت در آب مقطر توسط دستگاه همزن به‌مدت یک ساعت هم زده شد و pH آن در محدوده ۷-۵ ثابت نگه داشته شد و سپس نانو نقره آماده با درصد موردنظر پس از تنظیم pH به مخلوط اضافه شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و فشار دو اتمسفر مخلوط کردن ادامه یافت و تثبیت کننده‌های موردنظر تا تغییر رنگ به قهوه‌ای اضافه گردید و پس از ته‌نشین شدن، مخلوط ماده ته‌نشین شده در دمای محیط و دور از نور خورشید خشک گردید. نانو ذرات حاصله برای تعیین اندازه، خواص ساختاری، مورفولوژی و ریخت‌شناسی با دستگاه‌های پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی (FESEM، Mira، 3-XMU) و آنالیز عنصری نمونه‌های سنتز شده برای به‌دست آوردن اطلاعات ساختاری به‌وسیله روش SEM-EDX در مرکز پژوهش متالورژی رازی، (Razi Metallurgical Research Center, Iran) مورد آنالیز و بررسی قرار گرفتند. همچنین تجزیه و تحلیل گروه‌های عاملی با استفاده از فن‌های طیف‌سنجی زیر قرمز تبدیل فوری (FTIR)، به‌منظور شناسایی گروه‌های عاملی در زئولیت، زئولیت پوشش داده شده بر نانو نقره انجام شد. برای اندازه‌گیری محتوای نقره (Ag) زئولیت از روشی که توسط کولسنگ و همکاران (۲۰۱۰) توضیح داده شده است استفاده شد (Kulthong et al., 2010). به‌طور خلاصه، ۲/۳-۰/۰ گرم نمونه در ۵ میلی‌لیتر اسید نیتریک (HNO_3) ۱۴/۴ مولار توسط مایکروویو هضم شد تا تمام محتوای نقره حل شود. چرخه تابش مایکروویو ۲۵۰ وات (۵ دقیقه)، ۴۰۰ وات (۵ دقیقه) و ۶۰۰ وات (۵ دقیقه) بود. سپس نمونه هضم شده خنک شد و با ۲۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه رقیق شد تا بتوان مقدار نقره را توسط طیف‌سنجی جذب اتمی (Perkin Elmer Analyst 300, Waltham, MC مجهز به کوره گرافیتی (GFAAS) تعیین کرد.

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

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

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

اجزای تشکیل دهنده Constituents	درصد وزنی (٪)Weight percent
SiO_2	68.95
Al_2O_3	14.11
Fe_2O_3	0.97
CaO	4.83
Na_2O	0.95
K_2O	0.90
MgO	0.79
TiO_2	0.20
MnO	0.011
P_2O_5	0.012
SO_3	0.068
L.O.I[2]	10.64
Si/Al	4.81
Ag[3]	<5ppm

[۱] فلورسانس اشعه ایکس (XRF PHILIPS PW1480) با لوله Rh آنالیز شد.

[۲] از دست دادن در هنگام احتراق (LOI: loss on ignition)

[۳] محتوای نقره توسط طیف سنجی جذب اتمی (Perkin Elmer Analyst 300, Waltham, MC) مجهز به کوره گرافیتی (GFAAS) تعیین شد.

[1] X-ray fluorescence (XRF PHILIPS PW1480) was analyzed with a Rh tube.

[2] Loss on ignition (LOI: loss on ignition)

[3] The silver content was determined by atomic absorption spectrometry (Perkin Elmer Analyst 300, Waltham, MC) equipped with a graphite furnace (GFAAS).

جدول ۲- ترکیب جیره‌های غذایی (برحسب درصد ماده خشک مصرفی[۱])

Table 2. Composition of experimental diets (DMI)[1]

اجزاء جیره غذایی Ingredients	جیره آغازین (۲۱-۱) Starter (1-21)	جیره رشد (۴۲-۲۲) Grower (22-42)
ذرت Yellow corn	51.6	57.84
کنجاله سویا Soybean meal	39.95	33.68
روغن سویا Soybean oil	3.69	4.11
زئولیت پوشش داده شده با نانونقره Zeolite coated with nanosilver (%)	1	1
دی کلسیم فسفات Dicalcium phosphate (DCP)	1.47	1.09
سنگ آهک Limestone	1.18	1.28
نمک Salt	0.43	0.32
مکمل ویتامینی[۲] Vitamin premix	0.25	0.25
مکمل معدنی[۲] Mineral premix	0.25	0.25
DL-متیونین DL-Methionine	0.13	0.05
L-لیزین L-Lysine	0.05	0.13
آنالیز مواد مغذی Chemical analysis		
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری/کیلوگرم) ME (Kcal/kg)	2950	3050
پروتئین خام (CP) (%)	21.2	19.06
کلیسم (Ca) (%)	0.92	0.86
فسفر (P) (%)	0.41	0.33
سدیم (Na) (%)	0.18	0.14
لیزین (Lys) (%)	1.01	0.95
متیونین (Met) (%)	0.47	0.36
سیستئین (Cys) (%)	0.36	0.37
آرژنین (Arg) (%)	1.45	1.27
ترئونین (Thr) (%)	0.84	0.74

[۱] جیره بر پایه راهنمایی سویه‌ی کاب ۵۰۰ تهیه شده است.

[۲] هر کیلوگرم خوراک حاوی: ویتامین A، 1500 IU؛ کوله کلسیفرول، ۲۰۰ IU؛ ویتامین E، 10 IU؛ ریبوفلاوین، ۳/۵ mg؛ پانتوتنیک اسید،۱۰ mg؛ نیاسین ۳۰ mg؛ کولین کلرید، mg۱۰۰۰؛ بیوتین، ۰/۱۵ mg؛ اسید فولیک، ۰/۵ mg؛ تیامین، ۱/۵ mg؛ پیریدوکسین، ۰/۳ mg؛ آهن، ۸۰ mg؛ روی، ۴۰ mg؛ منگنز، ۶۰ mg؛ ید، ۰/۱۸ mg؛ مس، mg۸ ؛ سلنیوم، ۰/۱۵ mg؛ کوبالامین، ۱۵ µg.

[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, 1000mg; biotin, 0.15 mg; folic acid, 0.5 mg; thiamine, 1.5 mg; pyridoxine, 0.3 mg; iron, 80 mg; zinc, 40 mg; Manganese, 60 mg; Iodine, 0.18 mg; copper, 8mg; Selenium, 0.15 mg; cobalamin, 15 µg.

نمونه‌برداری در روزهای ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش، پس از کالبدشکافی از بافت کبد برای بررسی میزان بیان ژن (۳ تکرار بیولوژیک و ۳ تکرار تکنیکال) انجام شد. بدین‌منظور کبد را از اتصالات احشایی آزاد کرده و در مرحله بعد قطعه‌ای به‌طول ۲ سانتی‌متر جدا گردید. قطعه جداشده جهت تثبیت در محلول فرمالین رقیق شده ۱۰ درصد قرار داده شد و پس از انتقال به میکروتیوپ به ازت مایع منتقل شد. برای انجام آزمایشات مولکولی ابتدا Total RNA با استفاده از کیت استخراج ترایزول (TRIzol) ساخته شرکت سیگما آلدریچ (Sigma Aldrich) استخراج و برای تعیین کیفیت RNA استخراجی از بافت‌ها، از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد (شکل ۱). برای اطمینان از خلوص RNA استخراجی و عدم وجود آلودگی‌های DNA ژنومی، از آنزیم DNaseI بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز استفاده گردید. پس از آن، سنتز cDNA به‌عنوان الگوی

[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.41.11.6]
[DOI: 10.61186/rap.14.41.105]

اولیه از روی mRNA بالغ به‌عنوان الگو، با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس برای واکنش RT-PCR انجام گرفت. برای نرمال‌سازی نتایج qRT-PCR از ژن مرجع بتا اکتین استفاده و برای بررسی بیان ژن هدف و ژن مرجع، آغازگرهای اختصاصی برای هر ژن با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 و Allele ID و براساس توالی ژن‌های موردنظر در سایت NCBI طراحی شدند و سنتز آن‌ها توسط شرکت پیشگامان انجام شد (جدول ۳). تعیین کمیت نسبی در Real time (۳ بار) -RT PCR بوسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع نور فلورسنت، در نتیجه اتصال رنگ SYBR Green انجام گرفت. در این مرحله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای نمونه‌های cDNA حاصل از بافت کبد، برای ژن‌های Bcl_2 و BAX و ژن مرجع بتااکتین، بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از دستگاه بایورد (BioRad) و نرم‌افزار iQ5 اپتیکال انجام شد. با بررسی منحنی‌های ذوب و کسب اطمینان از عمل اختصاصی آغازگرها، تفاوت نسبی نمونه‌های مورد آزمایش در مقابل نمونه کنترل با فرمول $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta C_t$ برابر است با ΔC_t ژن هدف منهای ΔC_t مرجع) محاسبه شد و این داده‌های حاصل از واکنش (C_t) با استفاده از نرم‌افزار Excel، به بیان نسبی ژن موردنظر به ژن مرجع بتا اکتین تبدیل شد (Livak and Schmittgen, 2001). در پایان اعداد به‌دست آمده در نرم‌افزار Excel مرتب و شکل آنها رسم گردید. آنالیز داده‌های آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه واریانس شدند و مقایسه‌ی میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($p<۰/۰۵$) انجام گرفت (SAS, Institute).

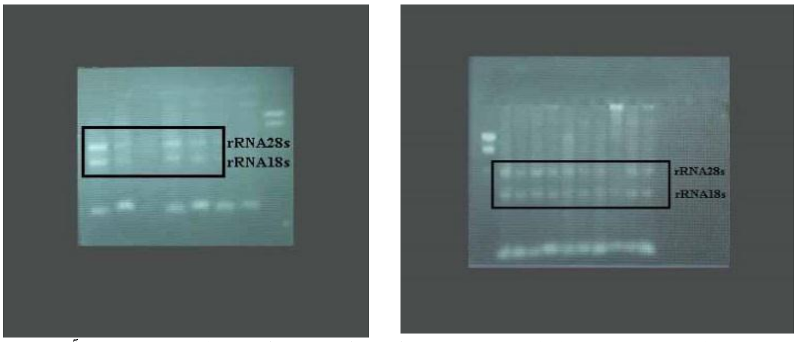
جدول ۳- اسامی ژن‌ها و توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Real time-PCR

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

نام پرایمر (Primer name)	توالی پرایمر (Primer sequence)	TM ºC	طول محصول (Length) (bp)
Beta Actin	F: 5'- AAGTTACTCGCCTCTGTGAA-3'	56.1	198
	R: 5'- CACATCTATCACTGGGGAAC-3'	55.1	
BAX	F: 5'- CAGTCATTGTCCTCTCCTTCA-3'	57.03	157
	R: 5'- GCTCCATAGATGTACTCCTCAG-3'	57.22	
Bcl_2	F: 5'- CAGGTGTGTTGATGTATGTC-3'	60.2	132
	R: 5'- TTGATTGAAGATGGTGATGTC-3'	60.1	

نتایج و بحث

استخراج RNA به‌وسیله‌ی کیت استخراج ترایزول شرکت سیگما تهیه گردید و کیفیت آن با قراردادن نمونه‌های استخراج شده بر روی ژل آگارز یک‌درصد تأیید شد. باندهای rRNA28s و rRNA18s به‌وضوح مشاهده شد و تمامی نمونه‌ها دارای الگوی نواری مناسبی بر روی ژل آگارز بودند. همچنین RNAهای ریبوزوم ۲۸S و ۱۸S در محدوده‌ی ۲۰۰۰-۱۰۰۰ جفت‌بازی به‌طور کاملاً واضح و مشخص دیده شد که نشان دهنده‌ی خلوص و کیفیت بالای RNA تخلیص شده و عدم ایجاد شکستگی و آسیب در ساختارRNA است. در شکل زیر نتیجه‌ی الکتروفورز برخی نمونه‌های RNA آورده شده است.



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

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

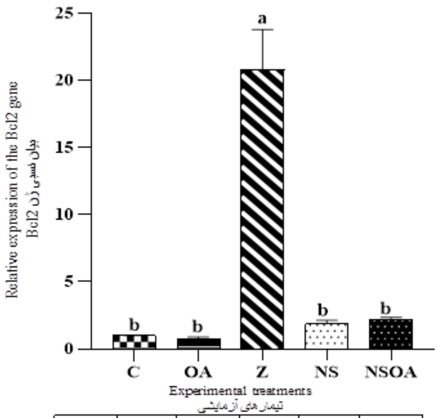
نتایج میزان بیان نسبی ژن‌های Bcl_2 و BAX بافت کبد در روزهای ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش با و بدون تنش گرمایی در شکل‌های ۲ تا ۵ آورده شده است.

بیان نسبی ژن Bcl_2 در بافت کبد در روز ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش

اثر تیمارهای آزمایشی بر بیان نسبی ژن Bcl_2 بافت کبد در روز ۲۱ دوره پرورش در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصله نشان داد که تیمار زئولیت (Z) بیش‌ترین میزان بیان ژن Bcl_2 در بافت کبد را داشته و در مقایسه با تیمار شاهد (C) دارای تفاوت معنی‌داری بوده است ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین دیگر تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد (C) در بیان ژن Bcl_2 نداشته‌اند ($p>۰/۰۵$).

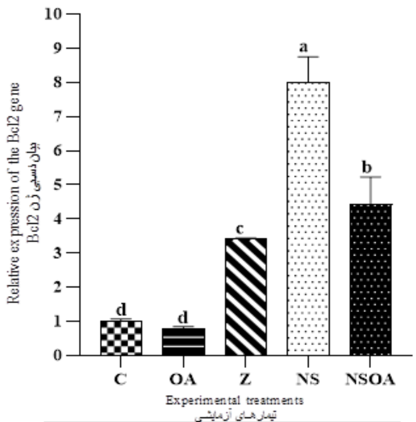
شکل ۳ سطح بیان ژن Bcl_2 در بافت کبد جوجه‌های تغذیه شده با تیمارهای آزمایشی در روز ۴۲ دوره پرورش را نشان می‌دهد. نتایج ارزیابی از بیان این ژن بیانگر آن است که تیمارهای نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت (NS) و

نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت مکمل شده با اسید اُرگانیک (NSOA) و زئولیت (Z) به‌ترتیب دارای بیان افزایشی معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بوده است (p<۰/۰۵). تیمار اسید اُرگانیک (OA) تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشته است (p>۰/۰۵).



Expression	1	0.784	20.82	1.873	2.199

شکل ۲- بیان نسبی ژن Bcl_2 در روز ۲۱ دوره پرورش در بافت کبد
Figure 2. Relative expression of the Bcl2 gene on day 21 of the breeding period in liver tissue
C: شاهد، OA: اسید اُرگانیک، Z: زئولیت، NS: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت و NSOA: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت مکمل شده با اسید اُرگانیک
C: control, OA: basal diet supplemented by organic acid, Z: basal diet supplemented by zeolite, NS: basal diet supplemented by zeolite coated with nanosilver, NSOA: basal diet supplemented by zeolite coated with nanosilver and organic acid



Expression	1	0.795	3.41	8.003	4.431

شکل ۳- بیان نسبی ژن Bcl2 در روز ۴۲ دوره پرورش در بافت کبد
Figure 3. Relative expression of the Bcl2 gene on day 42 of the breeding period in liver tissue
C: شاهد، OA: اسید اُرگانیک، Z: زئولیت، NS: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت و NSOA: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت مکمل شده با اسید اُرگانیک
C: control, OA: basal diet supplemented by organic acid, Z: basal diet supplemented by zeolite, NS: basal diet supplemented by zeolite coated with nanosilver, NSOA: basal diet supplemented by zeolite coated with nanosilver and organic acid

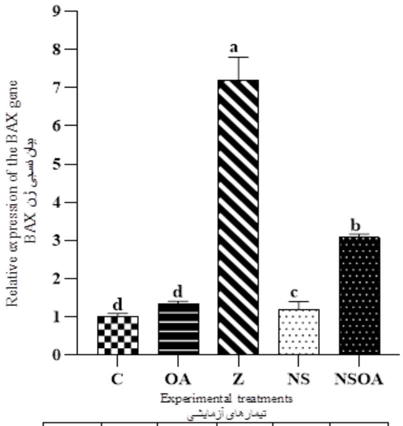
بیان نسبی ژن BAX در بافت کبد در روز ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش

میزان بیان نسبی ژن BAX بافت کبد در روز ۲۱ دوره پرورش در شکل ۴ نشان داده شده است. میزان بیان نسبی ژن BAX در روز ۲۱ دوره پرورش در بافت کبد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمار زئولیت در مقایسه با میزان بیان این ژن در تیمار شاهد دارای تفاوت معنی‌داری بود (p<۰/۰۵). همچنین میزان بیان این ژن در تیمار NSOA نیز در مقایسه با تیمار شاهد افزایش بیان معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵) اما در مقایسه با تیمار زئولیت دارای میزان بیان نسبی کمتری بوده است. همچنین میزان بیان این ژن در تیمار نانوذرات نقره نیز در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری داشته است. این در

[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.41.11.6]
[DOI: 10.61186/rap.14.41.105]

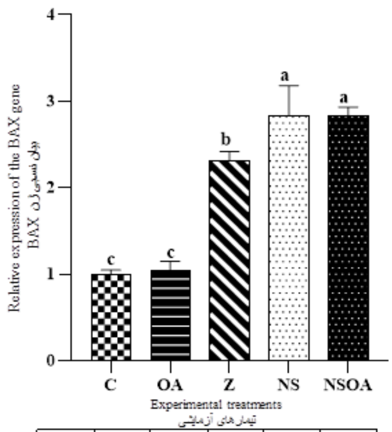
حالی است که بین جوجه‌های گوشتی دریافت کننده تیمار اسید اُرگانیک و تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری در میزان بیان نسبی ژن BAX مشاهده نشد (p> ۰/۰۵).

شکل ۵ میزان بیان نسبی ژن BAX را در روز ۴۲ دوره پرورش نشان می‌دهد. میزان بیان نسبی ژن BAX در جوجه‌های تغذیه شده با تیمارهای آزمایشی بیشتر از تیمار شاهد بود. به‌طوری که جوجه‌هایی که از تیمارهای NSOA و NS و Z تغذیه کرده بودند دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد در بیان نسبی ژن BAX داشتند (p<۰/۰۵) به‌طوری که بیشترین بیان نسبی مربوط به تیمارهای NSOA و NS بوده است که از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند (p>۰/۰۵). اختلاف معنی‌داری بین تیمار OA با تیمار شاهد در بیان نسبی ژن BAX در روز ۴۲ دوره پرورش مشاهده نشد (p>۰/۰۵).



Expression	1	1.339	7.199	1.999	3.08

شکل ۴- بیان نسبی ژن BAX در روز ۲۱ دوره پرورش بافت کبد
Figure 4. Relative expression of the BAX gene on day 21 of the breeding period in liver tissue
C: شاهد، OA: اسید اُرگانیک، Z: زئولیت، NS: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت و NSOA: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت مکمل‌شده با اسید اُرگانیک
C: control, OA: basal diet supplemented by organic acid, Z: basal diet supplemented by zeolite, NS: basal diet supplemented by zeolite coated with nanosilver, NSOA: basal diet supplemented by zeolite coated with nanosilver and organic acid



Expression	1	1.049	2.32	2.831	2.831

شکل ۵- بیان نسبی ژن BAX در روز ۴۲ دوره پرورش بافت کبد
Figure 5. Relative expression of the BAX gene on day 42 of the breeding period in liver tissue
C: شاهد، OA: اسید اُرگانیک، Z: زئولیت، NS: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت و NSOA: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت مکمل شده با اسید اُرگانیک
C: control, OA: basal diet supplemented by organic acid, Z: basal diet supplemented by zeolite, NS: basal diet supplemented by zeolite coated with nanosilver, NSOA: basal diet supplemented by zeolite coated with nanosilver and organic acid

[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.41.11.6]
[DOI: 10.61186/rap.14.41.105]

نقره در ابعاد نانو بر متابولیسم، تنفس و تولیدمثل میکروارگانیسم اثر می‌گذارد. یکی از خواص آن تولید رادیکال‌های آزاد یا واکنش‌گر اکسیژن می‌باشد که سبب پراکسیداسیون لیپیدها، پروتئین غشایی و اختلال در ورود و خروج انتخابی غشاها، تولید متابولیت‌های ثانویه و در نهایت مرگ عوامل پاتوژن یا بیماری‌زا می‌گردد. در یک بررسی انجام گرفته در شرایط آزمایشگاهی، اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره را بر ۶۵۰ میکروارگانیسم از جمله استافیلوکوکوس، سودوموناس و باسیلوس نشان داده است (Choi et al., 2009).

اعضای خانواده Bcl_2 به دو گروه پروآپوپتوزی و ضد آپوپتوزی تقسیم می‌شود و نسبت بیان بین این دو گروه نشان می‌دهد که بقا یا مرگ سلول اتفاق بیافتد. گروه ضد آپوپتوزی مانند Bcl_2، Bcl-XL با مهار کردن پروتئین‌های پروآپوپتوزی باعث بقا سلول می‌شوند. گزارش شده است که سطح بیان ژن Bcl_2 بافت کبد در گروه تحت تیمار با نانوذرات نقره ۲۰۰ قسمت در میلیون در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. کبد، اندام مرکزی برای تجزیه، سم‌زدایی و دفع مواد زاید از بدن است. طی عمل سم‌زدایی، فعال‌سازی میکروزوم‌های کبدی توسط آنزیم‌های سیتوکروم P450، سبب ایجاد متابولیت‌های ثانویه سمی و فعال می‌شود. این ترکیبات می‌توانند موجب آسیب بافت‌های مختلف از جمله کبد شوند (Gissen and Arias, 2015). مطالعه‌ای دیگر نشان داد که نانوذرات نقره با تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اُکسیژن سمیت ایجاد می‌کند و سبب آسیب بافت کبد می‌شود. همچنین عنوان شد رادیکال‌های آزاد حاصل از نانوذرات نقره با عملکرد آن سبب آسیب بافت کبد و متعاقباً منجر به افزایش غلظت پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش سیالیت غشا و از بین رفتن ساختمان و آنزیم‌های کبدی در خون می‌شوند (Seyedalipour et al., 2015). سنایی و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که والپروئیک اسید به‌طور معنی‌داری باعث مهار رشد سلولی، القای آپوپتوز، کاهش بیان ژن‌های Bcl_2 می‌گردد و به‌نظر می‌رسد والپروئیک اسید نقش آپوپتوزی خود را از طریق مسیرهای آپوپتوزی داخلی و خارجی در سرطان کبد ایفا می‌کند (Sanaei and Kavoosi, 2021). نشان داده شده است که بیان ژن‌های خانواده Bcl_2 در دو غلظت مورد بررسی در مغز نوزادان رت تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نشان ندادند ولی در مورد ژن کاسپاز ۸ در غلظت ۱۰ قسمت در میلیون در هر دو جنس نر و ماده میزان بالائی از بیان را نسبت به گروه کنترل نشان داد. این مشاهدات بر این موضوع دلالت می‌کند که نانوذرات نقره سطح اولیه پیشرفت آپوپتوز یعنی بیان ژن را به‌واسطه‌ی عبور از سد خونی مغزی در یک روش وابسته به غلظت تحت‌تأثیر خود قرار داده و این القا نامناسب آپوپتوز می‌تواند بر روند تکوین طبیعی مغز جنین تداخل ایجاد کند. در سال ۲۰۰۵ و ۲۰۰۸، سوتو و همکاران بعد از انجام آزمایشات گسترده اعلام کردند که برخی نانو مواد (به‌ویژه نانوذرات نقره) و داروهایی که از آن ساخته می‌شوند چه به‌صورت خوراکی و چه به‌صورت تماس پوستی می‌توانند یک تهدید مهم برای سلامتی جوامع انسانی باشند. استفاده‌ی درازمدت از این مواد بدون در نظر گرفتن عواقب آن می‌تواند زندگی موجودات زنده را تحت‌تأثیر قرار دهد (Soto et al., 2005; Soto et al., 2008). طی تحقیقات انجام شده نانوذرات نقره موجب کاهش فعالیت میتوکندری و افزایش معنی‌دار سطح سرمی لاکتات دهیدروژناز می‌شوند که این امر نشان‌دهنده تخریب سلولی است. همچنین می‌توانند با تغییر در مورفولوژی و نفوذپذیری غشا وارد سلول شده و با تغییر ماده ژنتیکی و اختلال در تقسیم سلولی، سبب مرگ سلول‌ها شوند (Rezazadeh-Reyhani et al., 2015). مشخص شده است نانوذرات نقره پس از ورود به جریان خون، در بافت‌های مختلف انباشته شده و موجب آسیب کبدی، کلیوی و نیز موجب آسیب بافت بیضه می‌شوند (Tang and Xi, 2008). قوشچیان و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که تجویز داخل صفاقی نانوذرات نقره در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ قسمت در میلیون باعث افزایش آپوپتوز سلول هیپوکامپ و بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl_2 را کاهش می‌دهد (Ghooshchian et al., 2017). نل و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که بسیاری از پارامترها شامل یونیزاسیون، شکل، اندازه و ساختار کریستالی در توزیع سمیت نانو ذرات مؤثر می‌باشند (Nel et al., 2006). تحقیقات گسترده‌ی دیگری نشان داده است که هر چه قطر نانوذرات کمتر باشد، سطح آن‌ها بیشتر شده و قدرت نفوذ آن‌ها به سلول‌ها و اثرات مولکولی آن بر سازوکارهای داخل سلولی افزایش می‌یابد (Buzea et al., 2007; Mohanraj and Chen, 2006). تغییر در بیان ژن‌های مختلف تحت‌تأثیر نانو نقره در مناطق مختلف مغز توسط رحمان و همکاران مطرح شده است، به‌طوری‌که نانوذرات نقره موجب تولید ROS و القای تنش اُکسیداتیو و در نهایت منجر به آسیب اکسیداتیو DNA می‌شود (Buzea et al., 2007). همچنین هیلدمان و همکاران نشان دادند که بیان بالای Bcl_2 می‌تواند سلول‌ها را از آپوپتوز حاصل از ROS محافظت کند. با این‌حال سازوکاری که Bcl_2 توسط آن سلول را از آپوپتوز به‌وجود آمده به‌وسیله‌ی ROS محافظت می‌کند را ناشناخته ارزیابی کردند. این محققان، معتقد بودند که Bcl_2 خود فعالیت آنتی‌اُکسیدانی انجام نمی‌دهد اما ممکن است که فعالیت غیرمستقیمی در افزایش سطوح و یا فعالیت‌های آنتی‌اُکسیدانی در داخل سلول داشته باشد و بنابراین بیان بالای Bcl_2 به سلول‌ها اجازه‌ی مقابله‌ی بهتر با اثرات ROS را می‌دهد و این اجازه به‌وسیله‌ی افزایش در آنزیم‌های آنتی‌اُکسیدانی به‌دست می‌آید (Hildeman et al., 2003). پروتئین‌های خانواده‌ی Bcl_2 یکپارچگی غشا خارجی میتوکندری را حفظ می‌کند و از اعضاء آنتی‌آپوپتوتیک و پروآپوپتوتیک تشکیل شده‌اند. این خانواده آزاد شدن سیتوکروم C به درون سیتوزول و در نتیجه فعال شدن کاسپاز-۳ را تنظیم می‌کنند (Ghooshchian et al., 2016). کاهش بیان ژن Bcl_2 با افزایش دوز نانوذرات نقره در هیپوکامپ مغز موش‌های صحرایی به‌دنبال تزیق نانونقره به‌صورت درون صفاقی گزارش شده است.

پروتئین BAX تنظیم‌کننده آپوپتوز، یک پروتئین است که در جانوران توسط ژن BAX کُدگذاری می‌شود.این مولکول، نخستین عضو ایجادکننده آپوپتوز شناخته شد. در حالت عادی، این پروتئین در سیتوزول سلول‌ها واقع شده‌است. داروهایی که BAX را فعال می‌کنند، داروهای نویدبخشی در درمان سرطان

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

در راستای نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، گزارشات زیادی نشان داده است که افزایش بیان ژن BAX می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌ها، هم در شرایط برون‌تنی (*in vitro*) و هم در شرایط درون‌تنی (*in vivo*) القا کند (Podestà et al., 2000). به‌علاوه، مطالعات دیگری نشان داده‌اند که در شرایط تنش اکسیداتیو مانند دیابت میزان بیان mRNA ژن BAX افزایش می‌یابد (Celik and Erdogan, 2008) که می‌تواند توسط افزایش بیان ژن BAX و کاهش بیان Bcl_2 باعث القای آپوپتوز در هیپوکامپ موش‌های دیابتی شود (Huang et al., 2012). تعدادی از آزمایشات، دخالت AgNPS را در اعمال سلولی که منجر به تولید ROS و القای تنش اکسیداتیو و در نهایت باعث سیتوتوکسیتی می‌شود نشان داده است. در این مطالعه نیز ممکن است با افزایش ژن BAX و از طرفی کاهش بیان ژن Bcl_2 بعد از تیمار با نانوذرات نقره، ناپایداری غشاء میتوکندری افزایش یافته و در نتیجه نفوذپذیری آن نسبت به سیتوکروم C افزایش پیدا کرده است. لذا احتمال می‌رود که تزریق نانوذرات نقره باعث آسیب غشا میتوکندری و در نتیجه ایجاد آپوپتوز از طریق مسیر داخلی در هیپوکامپ موش صحرایی شده است. هرچند که مطالعات بعدی برای یافتن مسیرهایی که نانوذرات نقره در آنها دخالت می‌کند، موردنیاز است. موافق با نتایج آزمایش حاضر، صدوقی و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که سطح بیان ژن BAX بافت کبد در گروه تحت تیمار با نانوذرات نقره ۲۰۰ قسمت در میلیون در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (Sadoughi, 2017). موافق با نتایج پژوهش حاضر قوشچیان و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که تجویز داخل صفاقی نانوذرات نقره در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ قسمت در میلیون باعث افزایش آپوپتوز سلول هیپوکامپ و بیان ژن BAX شد (Ghooshchian et al., 2017). نشان داده شده است که غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر روی مقدار آنزیم آلکالن فسفاتاز تاثیر معنی‌دار ندارد. به‌علاوه، تغییرات بافتی در دوز ۴۰۰ قسمت در میلیون از نانوذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل دیده شد و یافته‌ها نشان‌دهنده ایمن بودن این نانوذره در شرایط فوق برای فعالیت آنزیم مزبور می‌باشد همچنین نتایج هیستولوژیک در غلظت ۴۰۰ قسمت در میلیون از نانوذرات نقره احتمالاً نشان دهنده ایجاد آپوپتوز در بافت کبد می‌باشد. در پژوهشی که به بررسی اثرات آپوپتوتیک تزریق داخل صفاقی نانوذرات نقره بر مغز موش‌های آزمایشگاهی پرداخت، مشخص شد نانوذرات نقره سبب القای آپوپتوز در سلول‌های مغزی می‌شود. این اثر با افزایش دوزهای تزریقی نانوذرات نقره افزایش می‌یابد، ولی وابسته به طول مدت تزریق نیست (Ghooshchian et al., 2016). همچنین عنوان شد نانوذرات نقره می‌تواند آنزیم‌های میتوکندریایی کاسپازی به‌ویژه کاسپاز۳ را فعال و سبب القای فرآیند آپوپتوز شود (Khorasani et al., 2016). تحقیقات نشان داد نانوذرات نقره با تغییر در بیان ژن‌های دخیل در فرآیند آپوپتوز در سلول‌های هیپوکامپ موش صحرایی آپوپتوز را القا می‌کند. همچنین مشخص شد نانوذرات نقره می‌تواند موجب افزایش بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl_2 و کاهش بیان ژن پروآپوپتوتیک BAX در هیپوکامپ موش‌های تحت تیمار با نانوذرات نقره شود (Ghooshchian et al., 2016).

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

نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج حاصل از این تحقیق، بیان نسبی ژن Bcl_2 در بافت کبد در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمار آزمایشی نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت (NS) در روز ۴۲ دوره پرورش در مقایسه با تیمار شاهد (C) به‌صورت معنی‌داری افزایش یافته است ($p<0.05$). هم‌چنین بررسی حاصل از بیان ژن BAX در بافت‌های کبد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمار آزمایشی نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت (NS) تیمار نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت مکمل شده با اسید اُرگانیک (NSOA) در روز ۴۲ دوره پرورش بدون تنش گرمایی در مقایسه با تیمار شاهد (C) به‌صورت معنی‌داری افزایش یافته است ($p<0.05$). به‌طور کلی نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که اثر افزایشی بر بیان ژن های Bcl2 و BAX توسط تیمارهای زئولیت و NS و NSOA می‌تواند در تنظیم فرایند آپوپتوز در طی شرایط تنش‌های اکسایشی نقش داشته باشند. این در حالی است که این اثر در تیمار اسید ارگانیک دیده نمی‌شود.

[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.41.11.6]
[DOI: 10.61186/rap.14.41.105]

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 کمال قدردانی و تشکر را داریم.

منابع

Abbasi, A., Hashemi, S., Hassani, S., & Ebrahimi, M. (2018). Gastrointestinal microbial population response and performance of broiler chickens fed with organic acids and silver nanoparticles coated on zeolite under heat stress condition. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, *8*(4), 685-691.

Ahmadi, F., Khah, M. M., Javid, S., Zarneshan, A., Akradi, L., & Salehifar, P. (2013). The effect of dietary silver nanoparticles on performance, immune organs, and lipid serum of broiler chickens during starter period. *International Journal of Biosciences*, *3*(5), 95-100. doi.org/10.12692/ijb/3.5.95-100.

Bolandi, N., Hashemi, S. R., Davoodi, D., Dastar, B., Hassani, S., & Ashayerizadeh, A. (2021). Performance, intestinal microbial population, immune and physiological responses of broiler chickens to diet with different levels of silver nanoparticles coated on zeolite. *Italian Journal of Animal Science*, *20*(1), 497-504. doi.org/10.1080/1828051X.2021.1892546.

Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, *2*(4), MR17-MR71. doi.org/10.1116/1.2815690.

Celik, S., & Erdogan, S. (2008). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects brain against oxidative stress and inflammation induced by diabetes in rats. *Molecular and cellular biochemistry*, *312*, 39-46. doi.org/10.1007/s11010-008-9719-3.

Choi, O., Clevenger, T. E., Deng, B., Surampalli, R. Y., Ross Jr, L., & Hu, Z. (2009). Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water research*, *43*(7), 1879-1886. doi.org/10.1016/j.watres.2009.01.029.

Felehgari, K., Ahmadi, F., Rokhzadi, A., Kurdestany, A. H., & Khah, M. M. (2013). The effect of dietary silver nanoparticles and inorganic selenium supplementation on performance and digestive organs of broilers during starter period. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci*, *2*(8), 104-108.

Fischer, U., & Schulze-Osthoff, K. (2005). New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacological reviews*, *57*(2), 187-215. doi.org/10.1124/pr.57.2.6.

Ghooshchian, M., Khodarahmi, P., & Tafvizi, F. (2016). Expression of apoptosis-related genes bcl-2 and bax in rat brain hippocampus, followed by intraperitoneal injection of nanosilver. *ISMJ*, *19*(2), 185-193. Doi.org/10.18869/acadpub.ismj.19.2.185.

Ghooshchian, M., Khodarahmi, P., & Tafvizi, F. (2017). Apoptosis-mediated neurotoxicity and altered gene expression induced by silver nanoparticles. *Toxicology and industrial health*, *33*(10), 757-764. doi.org/10.1177/0748233717719195.

Gissen, P., & Arias, I. M. (2015). Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *Journal of hepatology*, *63*(4), 1023-1037. doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.015.

Hashemi, S., Davoodi, D., & Dastar, B. (2017). Effect of clinoptilolite coated with silver nanoparticles on meat quality attributes of broiler chickens during frozen storage. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, *7*(2), 321-328 .

Hashemi, S., Davoodi, D., Dastar, B., Bolandi, N., Smaili, M., & Mastani, R. (2014). Meat quality attributes of broiler chickens fed diets supplemented with silver nanoparticles coated on zeolite. *Poultry Science Journal*, *2*(2), 183-193 .

Hashemi, S., & Davoodi, H. (2012). Herbal plants as new immuno-stimulator in poultry industry: a review. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, *7*(2), 105-116. doi.org/ 10.3923/ajava.2012.105.116.

Hildeman, D. A., Mitchell, T., Aronow, B., Wojciechowski, S., Kappler, J., & Marrack, P. (2003). Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(25), 15035-15040. doi.org/10.1073/pnas.1936213100.

Hoet, P. H., Brüske-Hohlfeld, I., & Salata, O. V. (2004). Nanoparticles–known and unknown health risks. *Journal of nanobiotechnology*, *2*, 1-15. doi.org/10.1186/1477-3155-2-12.

Huang, X., Wang, F., Chen ,W., Chen, Y., Wang, N., & von Maltzan, K. (2012). Possible link between the cognitive dysfunction associated with diabetes mellitus and the neurotoxicity of methylglyoxal. *Brain Research*, *1469*, 82-91. doi.org/10.1016/j.brainres.2012.06.011.

Khorasani, N., Baharara, J., Iranbakhsh, A., & Ramezani, T. (2016). Apoptotic effects of silver nanoparticles coated with Zataria multiflora leaves extract on HepG2 cell line. *KAUMS Journal (FEYZ)*, *19*(6), 457-467.

Kulthong, K., Srisung, S., Boonpavanitchakul, K., Kangwansupamonkon, W., & Maniratanachote, R. (2010). Determination of silver nanoparticle release from antibacterial fabrics into artificial sweat. *Particle and fibre toxicology*, *7*(1), 1-9. doi.org/10.1186/1743-8977-7-8.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. *methods*, *25*(4), 402-408. doi.org/10.1006/meth.2001.1262.

Loghman, A., Iraj, S. H., Naghi, D. A., & Pejman, M. (2012). Histopathologic and apoptotic effect of nanosilver in liver of broiler chickens. *African Journal of Biotechnology, 11*(22), 6207-6211. Doi.org/10.5897/AJB11.1768.

Mohanraj, V., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles-a review. *Tropical journal of pharmaceutical research, 5*(1), 561-573. Doi.org/10.4314/tjpr.v5i1.14634.

Nel, A., Xia, T., Madler, L., & Li ,N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *science, 311*(5761), 622-627. Doi.org/10.1126/science.1114397.

Podestà, F., Romeo, G., Liu, W.-H., Krajewski, S., Reed, J. C., Gerhardinger, C., & Lorenzi, M. (2000). Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *The American journal of pathology, 156*(3), 1025-1032. Doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64970-X.

Raff, M. C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature, 356*(6368), 397-400. doi.org/10.1038/356397a0.

Rezazadeh-Reyhani, Z., Razi, M., Malekinejad, H., & Sadrkhanlou, R. (2015). Cytotoxic effect of nanosilver particles on testicular tissue: evidence for biochemical stress and Hsp70-2 protein expression. *Environmental toxicology and Pharmacology, 40*(2), 626-638. 10.1016/j.etap.2015.08.024.

Ricci, M. S., & Zong, W.-X. (2006). Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *The oncologist, 11*(4), 342-357. Doi.org/10.1634/theoncologist.11-4-342.

Ricke, S. (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry science, 82*(4), 632-639. doi.org/10.1093/ps/82.4.632.

Roth, F., & Kirchgessner, M. (1998). Organic acids as feed additives for young pigs: Nutritional and gastrointestinal effects. *J. Anim. Feed Sci, 7*(Suppl 1), 25-33.

SAS Institute, Inc. SAS user's guide. 6thed. SAS Institute Inc. Cary, NC. 1989.

Sadoughi, S. (2017). Effect of crocin on Bax/Bcl-2 ratio, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in liver tissue of chick embryo treated with silver nanoparticles. *Internal Medicine Today, 23*(4), 293-299 .

Sanaei, M., & Kavoosi, F. (2021). Effect of valproic acid on extrinsic (DR4, DR5, FAS, FAS-L, TRAIL) and intrinsic (BAX, BAK and APAF1, Bcl-2, and Bcl-xL) apoptotic pathways ,cell viability and apoptosis in hepatocellular carcinoma PLC/PRF5 cell line. *Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, 24*(6), 601-609 .

Seyedalipour, B., Arefifar, A., Khanbabaee, R., & Hoseini, S. M. (2015). Toxicity investigating of silver nanoparticles on ALT, AST, ALP and histopathological changes in NMRI mice. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 25*(124), 183-193.

Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science, 275*(1), 177-182. doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012.

Soto, K., Carrasco, A., Powell, T., Garza, K., & Murr, L. (2005). Comparative in vitro cytotoxicity assessment of some manufacturednanoparticulate materials characterized by transmissionelectron microscopy. *Journal of Nanoparticle Research, 7*, 145-169. doi.org/10.1007/s11051-005-3473-1.

Soto, K., Murr, L., & Garza, K. (2008). Cytotoxic responses and potential respiratory health effects of carbon and carbonaceous nanoparticulates in the Paso del Norte airshed environment. *International journal of environmental research and public health, 5*(1), 12-25. doi.org/10.3390/ijerph5010012.

Sun, J., Zhang, Q., Wang, Z., & Yan, B. (2013). Effects of nanotoxicity on female reproductivity and fetal development in animal models. *International journal of molecular sciences, 14*(5), 9319-9337. doi.org/10.3390/ijms14059319.

Tang, J., & Xi, T. (2008). Status of biological evaluation on silver nanoparticles. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi= Journal of biomedical engineering= Shengwu yixue gongchengxue zazhi, 25*(4), 958-961.