

پاسخ ژن‌های موثر در مرگ برنامه ریزی شده سلول در سلول‌های کبدی و روده در شرایط القاء تنش گرمایی حاد در

جوجه های گوشتی تغذیه شده با نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت

نگین آخوندپور<sup>۱</sup>، سید رضا هاشمی<sup>۲\*</sup>، ایوب فرهادی<sup>۳</sup> و الناز عربیان<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup>گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

<sup>۲</sup>گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

مسئول مکاتبات: سید رضا هاشمی، hashemi711@yahoo.co.uk

چکیده. این پژوهش به منظور پاسخ ژن‌های موثر در مرگ برنامه ریزی شده سلول (BAX و Bcl2) در سلول‌های کبدی و روده در جوجه های گوشتی تغذیه شده نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت در شرایط القاء تنش گرمایی حاد انجام گردید. آزمایشی با استفاده از ۴۵۰ قطعه جوجه گوشتی یکروزه در پنج تیمار و شش تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) تیمار شاهد، (۲) تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد کلینوپتیلولیت، (۳) تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد کلینوپتیلولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانونقره، (۴) تیمار شاهد مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسیدآرگانیک و (۵) تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد کلینوپتیلولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانوذرات نقره و ۰/۱۵ درصد اسیدآرگانیک بودند. نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت با استفاده از تکنیکهای XRF (فلوئورسانس اشعه ایکس) و FTIR (طیف سنجی مادون قرمز) مورد بررسی قرار گرفت. به منظور القاء تنش حرارتی، پرندگان به مدت یک هفته در آخرین هفته دوره پرورش تحت تاثیر تنش گرمایی قرار گرفتند و در روز آخر تنش، نمونه های کبد و روده جهت بررسی بیان ژن استحصال گردید. نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که تیمارهای کلینوپتیلولیت و نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت (NS) و اثر افزایشی بر بیان Bcl2 و BAX دارند و این در حالی است که این اثر در تیمار اسید آرگانیک دیده نشد. در مجموع میتوان بیان داشت که چنانچه از نانوذرات نقره در تغذیه دام و طیور استفاده می‌گردد بهتر است از مکمل اسید آرگانیک جهت کاهش اثرات جانبی نانوذرات نقره استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی. آپوپتوز، تنش، ژن BAX، ژن Bcl2، نانوذرات نقره

## Response of genes effective in apoptosis in the liver and intestinal cells of broiler chickens fed silver nanoparticles coated on clinoptilolite under heat stress condition

Akhondpor Negin<sup>1</sup>, Seyed Reza Hashemi<sup>2\*</sup>, Ayoub Farhadi<sup>3</sup> and Elnaz Arabiyan<sup>4</sup>

<sup>1,2,4</sup> Department of Animal Physiology, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

<sup>3</sup> Department of Animal Scienc, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

\*Corresponding author's email: hashemi711@yahoo.co.uk

**Abstract.** The aim of this study was to investigate the effective genes on apoptosis (BAX and Bcl2) in liver and intestinal cells of broiler chickens fed silver nanoparticles coated on clinoptilolite under acute heat stress induction. 450 d old broiler chicks (Cobb 500) were used in five treatments and six repetitions, and 15 pieces were used in each experimental unit in the form of a completely random design. Experimental diets were: 1) control or basal diet 2) basal diet supplemented by 1% clinoptilolite 3) basal diet supplemented by 1% clinoptilolite coated with 0.5% nanosilver 4) basal diet supplemented by 0.15% organic acid and 5) basal diet supplemented by 1% clinoptilolite coated with 0.5% nanosilver and 0.15% organic acid. Silver nanoparticles coated on clinoptilolite were investigated using XRF and FTIR techniques. In order to induce heat stress, the birds were affected by heat stress for one week in the last week of the breeding period, and on the last day of the stress, liver and intestine samples were obtained to check gene expression. The results of this experiment show that the treatments of clinoptilolite and silver nanoparticles coated on clinoptilolite have an increasing effect on the expression of Bcl2 and Bax, while this effect was not seen in the organic acid treatment. In conclusion, it could be said that if silver nanoparticles are used in feeding livestock and poultry, it is better to use organic acid supplements to reduce the side effects of silver nanoparticles.

**Key words:** Apoptosis, BAX, Bcl<sub>2</sub>, Silver nanoparticles, stress

Received 06.10.2022/ Revised 13.09.2023/ Accepted 25.09.2023/ Published 20.12.2023

دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۴، اصلاح: ۱۴۰۲/۰۶/۲۲، پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۳، انتشار: ۱۴۰۲/۱۲/۲۰

## مقدمه

عنوان پیام رسان ردوکس (اکسیداسیون و احیا)، در پیام رسانی و تنظیم درون سلولی عمل می‌کنند، در حالی که در سطوح بالا در ماکرومولکول‌ها تغییرات اکسیداتیو ایجاد کرده و باعث مهار عملکرد پروتئین و پیشبرد مرگ سلولی می‌شوند. اختلال یا آسیب در ماده وراثتی موجود در میتوکندری (mtDNA) باعث القای کاهش عملکرد تنفسی و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌گردد که در نهایت منجر به مرگ سلولی یا آپوپتوز می‌گردد (Oh & Lim, 2006). آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلول عمده‌ترین شکل خودکشی سلول است که بدون آسیب به سلول‌ها و یا بافت‌های اطراف باعث حذف سلول‌های ناخواسته، آسیب دیده و یا خطرناک می‌شود (Senjen, 2007). پروتئین Bcl2 که پروتئین مهارکننده است و پروتئین BAX که پروتئین پیش برنده در روند آپوپتوز است، از تنظیم‌کننده اساسی این فرآیند به شمار می‌رود. اثرات مستقیم رادیکال‌های آزاد اکسیژن روی فعالیت کاسپازها به اثبات رسیده است. اخیراً دریافته‌اند که ایجاد استرس‌های اکسایشی باعث تغییر در بیان ژن‌ها و القای آپوپتوز می‌شود آپوپتوز نوعی مرگ سلولی است که اغلب به طور هدفمند و منظم در سلول‌های بعضی از بافتهای بدن اتفاق می‌افتد ولی ممکن است تحت تاثیر برخی از پاتوژنها، سموم، داروها، مواد افزودنی و همچنین مواد زنبوبیوتیک نیز القاء شود (Stacey & Zong, 2006).

از طرفی دیگر، امروزه استفاده از نانوذرات نقره به عنوان یک ضدقارچ، ضدویروس و ضدباکتری در تغذیه طیور و تاثیرات آن بر تولید، مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. نانوذرات نقره و آلیاژهای آن خواص بالقوه‌ای را به عنوان محرک رشد از خود نشان می‌دهند (Hashemi et al., 2014; 2017). برخی دانشمندان تاثیر مثبت نانوذرات نقره را به عنوان افزودنی بر عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی گزارش کرده‌اند (Taghizadeh & Tarshizi, 2013).

پرندگان در دمایی بالاتر از منطقه آسایش حرارتی (۲۱-۲۳ درجه سانتی‌گراد) دچار تنش گرمایی شده و عکس‌العمل‌های رفتاری، فیزیولوژیک، هورمونی و مولکولی از خود نشان می‌دهند. تنش حرارتی سبب ایجاد ضررهای قابل توجهی در صنعت طیور بویژه در مناطق گرمسیر و استوایی می‌شود. تنش گرمایی با تحریک آزادسازی هورمون‌های فوق‌کلیوی مانند کورتیکوسترون و کاته‌کولامین‌ها باعث اکسیداسیون لیپیدهای غشایی شده و موجب تشکیل رادیکال‌های آزاد می‌گردد (Freeman & Crapo, 1982). در دمای محیطی بالا تولید رادیکال‌های آزاد در بدن طیور افزایش می‌یابد (Sahin et al., 2003) که منجر به تنش اکسیداتیو می‌گردد و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی را تضعیف می‌کند. در این شرایط سطوح پلاسمایی برخی ویتامین‌ها و مواد معدنی دخیل در سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن کاهش می‌یابد. همچنین پراکسیداسیون لیپیدها سبب کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله ویتامین‌های E و C و مواد معدنی می‌شود (Sahin et al., 2003). تنش‌های محیطی با کاهش غلظت پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی همراه می‌باشند. گزارش شده است که اشکال فعال اکسیژن همانند پراکسید هیدروژن، اثر مخربی بر رشد سلول و متابولیسم دارند. رادیکال‌های آزاد سبب پراکسیداسیون لیپیدها شده و به این ترتیب باعث آسیب رسانیدن به لیپیدهای غیر اشباع غشا سلولی، اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدهای DNA می‌شوند و بدین ترتیب با اختلال در یکپارچگی سلول و غشا سلولی عملکرد و سلامت پرند را کاهش می‌دهند (Robert, 2003).

رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) و نیتروژن (RNS) می‌تواند برای سلول‌ها و بافت‌ها سودمند و یا مضر باشد. گونه‌های فعال اکسیژن در سطوح پایین فیزیولوژیکی به

۴۲ روز در شرایط پرورش یکسان اجرا گردید و به منظور اعمال تنش گرمایی در هفته آخر دوره پرورش دمای سالن روزانه به مدت ۴ ساعت از ساعت ۱۲ الی ۱۶ در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. جیره‌های غذایی بر اساس توصیه سویه کاب ۵۰۰ برای دوره آغازین (۱ تا ۲۱ روزگی) و رشد (۲۲ تا ۴۲ روزگی) تهیه شد (جدول ۱). تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) تیمار شاهد (C)، (۲) تیمار شاهد مکمل شده با یک درصد کلینوپتیلولیت (Z)، (۳) تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد کلینوپتیلولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانوذرات نقره (NS)، (۴) تیمار شاهد مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسید ارگانیک (OA) و (۵) تیمار شاهد مکمل شده با یک درصد کلینوپتیلولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانوذرات نقره و ۰/۱۵ درصد اسید ارگانیک (NSOA) بود.

جهت تهیه نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت (زئولیت طبیعی) با درصد مورد نیاز ابتدا هر کیلو کلینوپتیلولیت در آب مقطر توسط دستگاه همزن به مدت یک ساعت هم زده شد و pH آن در محدوده ۵-۷ ثابت نگه داشته شد و سپس نانو نقره آماده با درصد مورد نظر پس از تنظیم pH به مخلوط اضافه شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و فشار دو اتمسفر میکس کردن ادامه یافت و تثبیت کننده‌های مورد نظر تا تغییر رنگ به قهوه‌ای اضافه گردید و پس از ته نشین شدن، مخلوط ماده ته‌نشین شده در دمای محیط و دور از نور خورشید خشک گردید. اسید ارگانیک مورد استفاده در این تحقیق، ترکیبات آن شامل اسید فرمیک و اسید پروپیونیک می‌باشد که محصولی از شرکت بایومین‌های ایتوک فردا از کشور اتریش و با نام تجاری بایوترونیک اس. ای. فورت (Biotronic SE forte) می‌باشد. همچنین کلینوپتیلولیت مورد استفاده در این آزمایش از چینه‌های کلینوپتیلولیت از منطقه استان سمنان به دست آمد و از شرکت افروند توسکا تهیه گردید.

(Ahmadi & Kurdestany, 2010). از طرفی با توجه با استفاده روزافزون نانوذرات بویژه نانوذرات نقره گزارش شده است که نانوذرات نقره دارای سمیت سلولی علیه طیف وسیعی از سلول‌ها می‌باشند که از طریق استرس اُکسیداتیو، تخریب DNA و میتوکندری و القای آپوپتوز سمیت سلولی ایجاد می‌کند (Mohammed et al., 2018). گزارش شده است که نانوذرات نقره می‌تواند با ماکرومولکول‌های زیستی وارد واکنش شده و با اختلال هموستاز داخل سلولی سبب القای فرآیند آپوپتوزی گردد (Sun et al., 2013).

در دهه اخیر استفاده از نانو ذرات نقره افزایش یافته است با این حال اطلاعات محدودی در خصوص اثرات نامطلوب این نانو ذرات بر سلول‌های طبیعی بافت‌های مختلف بویژه در شرایط مختلف تنش در دسترس می‌باشد، همچنین بیشتر مطالعات در مورد تاثیر نانوذرات نقره روی بافت‌های بدن در محیط کشت بوده و مطالعات درون تنی (*in vivo*) کمی در این زمینه به انجام رسیده است. تنش حرارتی یکی از تنش‌های مهم و خسارت بار در صنعت طیور بویژه در مناطق گرمسیر و استوایی می‌باشد. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت و اسید ارگانیک بر بیان ژن‌های BAX و Bcl<sub>2</sub> در سلول‌های کبدی و روده جوجه‌های گوشتی در شرایط تنش حرارتی حاد می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

به منظور بررسی بیان ژن در بافت کبد و روده آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار و شش تکرار با ۱۵ قطعه جوجه گوشتی سویه کاب ۵۰۰ (Cobb 500) در هر تکرار (تعداد ۴۵۰ قطعه جوجه گوشتی یکروزه) در ایستگاه تحقیقات طیور دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان واقع در مزرعه آموزشی پژوهشی شماره یک به مدت

طول یک سانتی‌متر از بافت روده (شاخه بالارو دئودنوم) و قطعه ای از لب چپ کبد جدا گردید. قطعه جدا شده پس از انتقال به میکروتیوپ به ازت مایع منتقل شد. برای انجام آزمایشات مولکولی ابتدا RNA استخراج و برای تعیین کیفیت RNA استخراجی از بافت‌ها، از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. پس از آن، سنتز 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 از ژن مرجع بتا اکتین استفاده و برای بررسی بیان ژن هدف و ژن مرجع، آغازگرهای اختصاصی برای هر ژن با استفاده از نرم افزار Oligo7 و Allele ID و براساس توالی ژن‌های مورد نظر در سایت NCBI طراحی شدند و سنتز آن‌ها توسط شرکت پیشگامان انجام شد (جدول ۲). تعیین کمیت نسبی در Real time RT-PCR بوسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع نور فلورسنت، در نتیجه اتصال رنگ SYBR Green انجام گرفت. با بررسی منحنی‌های ذوب و کسب اطمینان از عمل اختصاصی آغازگرها، تفاوت نسبی نمونه‌های مورد آزمایش در مقابل نمونه کنترل با فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ( $\Delta\Delta Ct$  برابر است با  $\Delta Ct$  ژن هدف منهای  $\Delta Ct$  کالیبراتور) محاسبه شد (2001, Livak & Schmittgen). داده‌های حاصل از واکنش (Ct) با استفاده از نرم افزار Excel، به بیان نسبی ژن مورد نظر به ژن مرجع بتا اکتین تبدیل شد (معادله زیر). در پایان اعداد بدست آمده در نرم افزار Excel مرتب و نمودار 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 توکی-کرامر در سطح احتمال ( $P < 0.05$ ) انجام گرفت (SAS, 2008).

کلینوپتیلولیت مورد استفاده با تکنیک فلورسانس اشعه ایکس (XRF) برای تعیین ترکیب شیمیایی آنها بررسی گردید و داده‌های XRF جمع آوری شده بر روی یک طیف سنج XRF PHILIPSPW1480 با لوله Rh آنالیز شدند. نانو ذرات حاصله برای تعیین اندازه، خواص ساختاری، مورفولوژی و ریخت شناسی با دستگاه های پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی (FESEM، Mira، XMU-3) و آنالیز عنصری نمونه های سنتز شده برای به دست آوردن اطلاعات ساختاری به وسیله روش SEM-EDX در مرکز پژوهش متالورژی رازی، (Razi Metallurgical Research Center, Iran) مورد آنالیز و بررسی قرار گرفتند. همچنین تجزیه و تحلیل گروه‌های عاملی با استفاده از طیف سنجی در محدوده مادون قرمز (FTIR Spectrometer InfraRed) (Bruker Tensor II, Ettlingen, Germany)، به منظور شناسایی گروه‌های عاملی در کلینوپتیلولیت، کلینوپتیلولیت پوشش داده شده بر نانو نقره انجام شد با استفاده از نرم افزار IR Slution طیف‌های بدست آمده مورد پردازش قرار گرفتند. پردازش‌ها شامل اصلاح خطوط پایه و صاف نمودن طیف‌ها و مشتق گیری طیف‌ها بود. برای اندازه‌گیری محتوای نقره (Ag) پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت مقدار نقره را توسط طیف سنجی جذب اتمی (Perkin Elmer Analyst 300, Waltham, MC) مجهز به کوره گرافیتی (GFAAS) تعیین شد.

نمونه‌برداری در روز آخر دوره پرورش و پس از پایان تنش گرمایی، برای بررسی میزان بیان Bcl2 و BAX انجام شد. بدین منظور از هر تکرار یک پرنده بطور تصادفی انتخاب و نمونه بافت روده و کبد، پس از کالبدشکافی، قطعه‌ای به

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{sample} - \Delta Ct_{control})} = \frac{2^{-(\Delta Ct_{sample})}}{2^{-(\Delta Ct_{control})}} = \frac{2^{-(Ct_{target} - Ct_{reference})_{sample}}}{2^{-(Ct_{target} - Ct_{reference})_{control}}}$$

جدول ۱. ترکیب جیره پایه (بر حسب درصد هوا خشک)<sup>۱</sup>Table 1. Composition of basal diets (DM basis)<sup>1</sup>

Ingredients (%)	Starter	Grower
	(1-21)	(22-42)
Yellow corn	51/6	57/84
Soybean meal (44% CP)	39/95	33/68
Soybean oil	3/69	4/11
Dicalcium phosphate (DCP)	1/47	1/09
Limestone	1/18	1/28
Salt	0/43	0/32
Vitamin premix	0/25	0/25
Mineral premix <sup>2</sup>	0/25	0/25
DL-Methionine	0/13	0/05
L-Lysine	0/05	0/13
<b>Chemical analysis</b>		
ME (Kcal/kg)	2950	3050
CP (%)	21/2	19/06
Ca (%)	0/92	0/86
P (%)	0/41	0/33
Na (%)	0/18	0/14
Lys (%)	1/01	0/95
Met (%)	۰/۴۷	0/36
Cys (%)	0/36	0/37
Arg (%)	1/45	1/27
Thr (%)	0/84	0/74

جیره بر پایه راهنمایی سویه‌ی کاپ ۵۰۰ تهیه شده است.

<sup>۱</sup>هر کیلوگرم خوراک حاوی: ویتامین A، 1500 IU؛ کوله کلسیفرول، 200 IU؛ ویتامین E، 10 IU؛ ریوفلاوین، 3.5 mg؛ پانتوتنیک اسید، 10 mg؛ نیاسین 30 mg؛ کولین کلرید، 1000 mg؛ بیوتین، 0.15 mg؛ اسید فولیک، 0.5 mg؛ تیامین، 1.5 mg؛ پیریدوکسین، 0.3 mg؛ آهن، 80 mg؛ روی، 40 mg؛ منگنز، 60 mg؛ ید، 0.18 mg؛ مس، 8 mg؛ سلنیوم، 0.15 mg؛ کوبالامین، 15 μg.

<sup>۱</sup>The diet is prepared based on the guidance of the Cobb 500 strain.

<sup>۲</sup>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.

## جدول ۲. اسامی ژن‌ها و توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Real time-PCR

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

Primer name	Primer sequence (5'-3')	TM °C	length (bp)
Beta Actin	F: 5'- AAGTTACTCGCCTCTGTGAA-3'	56/1	198
	R: 5'- CACATCTATCACTGGGGAAC-3'	55/1	
BAX	F: 5'- CAGTCATTGTCCTCTCCTTCA-3'	57/03	154
	R: 5'- GCTCCATAGATGTACTCCTCAG-3'	57/22	
Bcl <sub>2</sub>	F: 5'- CAGGTGTGTTGATGTATGTC-3'	60/2	132
	R: 5'- TTGATTGAAGATGGTGTATGTC-3'	60/1	

رRNA18s به‌وضوح مشاهده شد و تمامی نمونه‌ها دارای الگوی نواری مناسبی بر روی ژل آگارز بودند.

## نتایج

نتایج ارزیابی بیان نسبی ژن‌های Bcl<sub>2</sub> و BAX بافت روده و کبد در شرایط تنش گرمایی در نمودار ۱ تا ۴ آورده شده است. نمودار ۱ بیان نسبی ژن Bcl<sub>2</sub> را در بافت کبد نشان می‌دهد، تیمارهای نانوذرات نقره پوشش داده شده برکلینوپتیلولیت (NS) و تیمار کلینوپتیلولیت (Z) از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشته اما دارای بیشترین بیان افزایشی معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بوده‌اند ( $P < 0.05$ ). همچنین تیمار نانوذرات نقره پوشش داده شده برکلینوپتیلولیت مکمل شده با اسید آرگانیک (NSOA) و تیمار اسید آرگانیک (OA) از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند ولی نسبت به تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بودند ( $P < 0.05$ ). مطابق با بیان نسبی ژن Bcl<sub>2</sub> در بافت روده در نمودار ۲، تیمارهای NSOA، NS و Z با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند ( $P < 0.05$ ). بیشترین بیان نسبی مربوط به تیمار NS

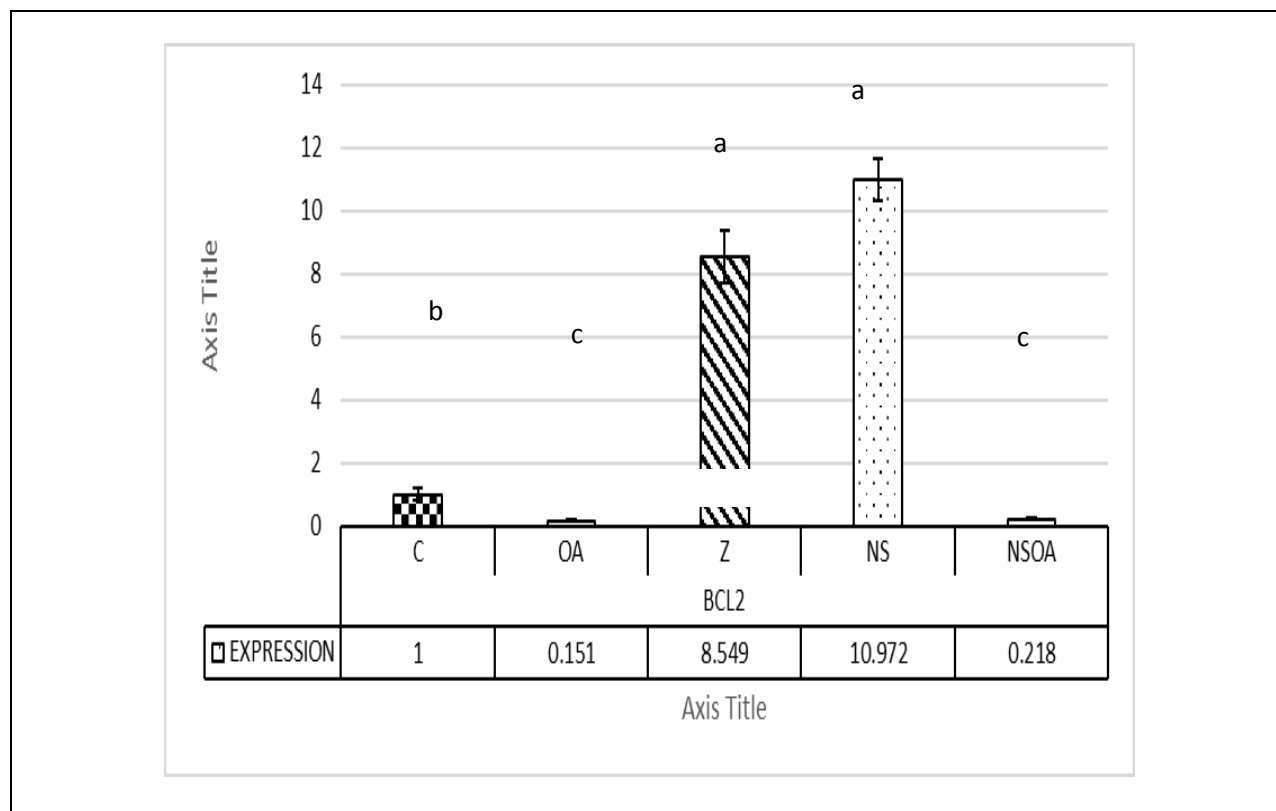
نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت با استفاده از تکنیکهای XRF و FTIR مورد بررسی قرار گرفت و سنتز نانوذرات نقره مورد نظر مورد تأیید بود. طیف سنجی در محدوده مادون قرمز (FTIR) بر اساس جذب تابش و بررسی جهش‌های ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چند اتمی صورت می‌گیرد. طیف‌های مقایسه شده برای ساختار کلینوپتیلولیت و نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت نشان داد که کلینوپتیلولیت باندهای ارتعاشی را در ۱۰۲۸ بر سانتی‌متر برای خمش H-O-H و یک پیک بزرگ در ۱۰۱۶ بر سانتی‌متر برای نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت دارد که به دلیل وجود واکنش-های واندروالس بین گروه‌های هیدروکسیل در ساختار کلینوپتیلولیت مربوط به H<sub>2</sub>O و بار مثبت جزئی روی سطح نانوذرات نقره می‌باشد. (Shameli et al., 2011).

جهت بررسی بیان ژن در بافت روده استخراج RNA انجام شد و کیفیت آن با قراردادن نمونه‌های استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد تأیید شد. باندهای rRNA28s و

معنی‌داری وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). ارزیابی نمودار ۴ بیان ژن BAX در بافت روده نشان‌دهنده این است که تیمارهای آزمایشی NSOA و NS و Z در مقایسه با تیمار شاهد دارای تفاوت معنی‌داری بوده‌اند ( $P < 0.05$ ) که بیشترین بیان افزایشی مربوط به تیمارهای NS و Z است که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین‌شان مشاهده نشده است. همچنین تیمار آزمایشی OA دارای تفاوت معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد نبوده است ( $P > 0.05$ ).

بود و بین تیمار OA با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ).

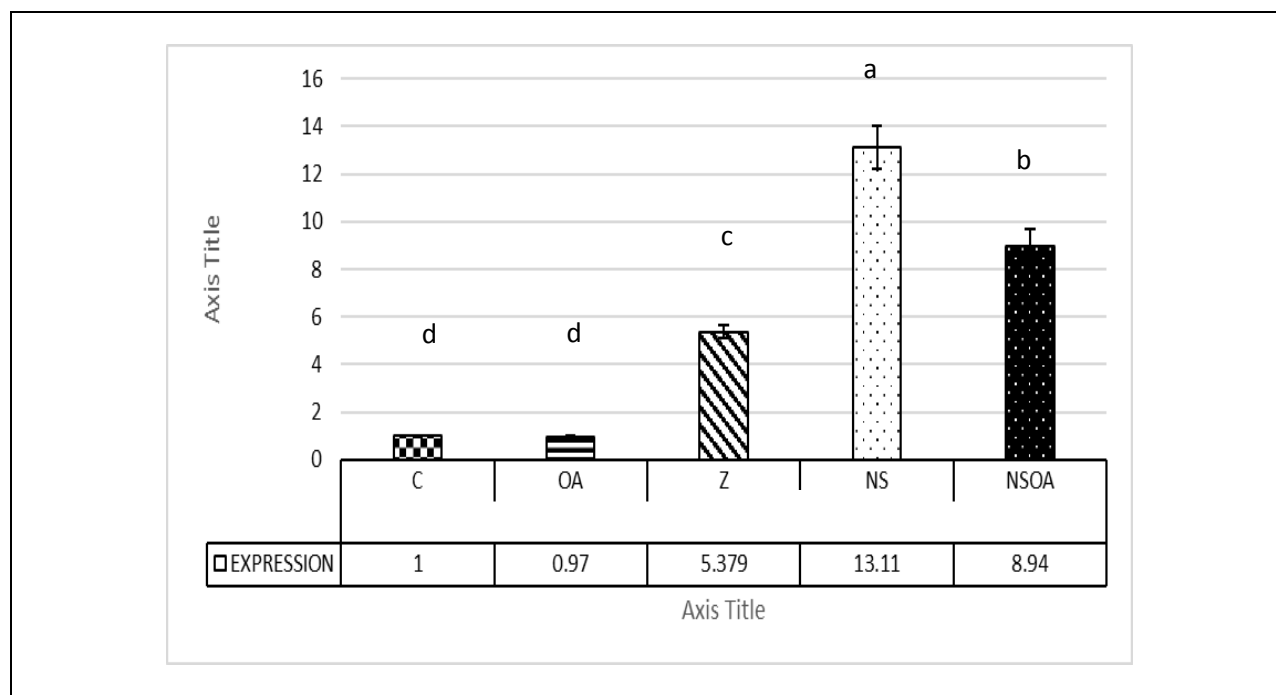
نمودار ۳ ارزیابی بیان ژن BAX در بافت کبد جوجه‌های گوشتی را نشان می‌دهد. میزان بیان نسبی ژن BAX در تیمارهای آزمایشی بیشتر از تیمار شاهد بود. تیمارهای NSOA و NS و Z اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان دادند ( $P < 0.05$ ) که هر ۳ تیمار بیشترین بیان نسبی ژن را داشتند. بین تیمار OA با تیمار شاهد اختلاف



نمودار ۱. بیان نسبی ژن Bcl<sub>2</sub> در بافت کبد در شرایط تنش گرمایی. C: شاهد، OA: اسید آرگانیک، Z: کلینوپتیلولیت، NS: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت و NSOA: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت مکمل شده با اسید آرگانیک

Figure 1. Relative expression of Bcl<sub>2</sub> gene in liver tissue under heat stress conditions

**C:** control or basal diet, **OA:** basal diet supplemented by organic acid, **Z:** basal diet supplemented by clinoptilolite, **NS:** basal diet supplemented by clinoptilolite coated with nanosilver, **NSOA:** basal diet supplemented by clinoptilolite coated with nanosilver and organic acid.

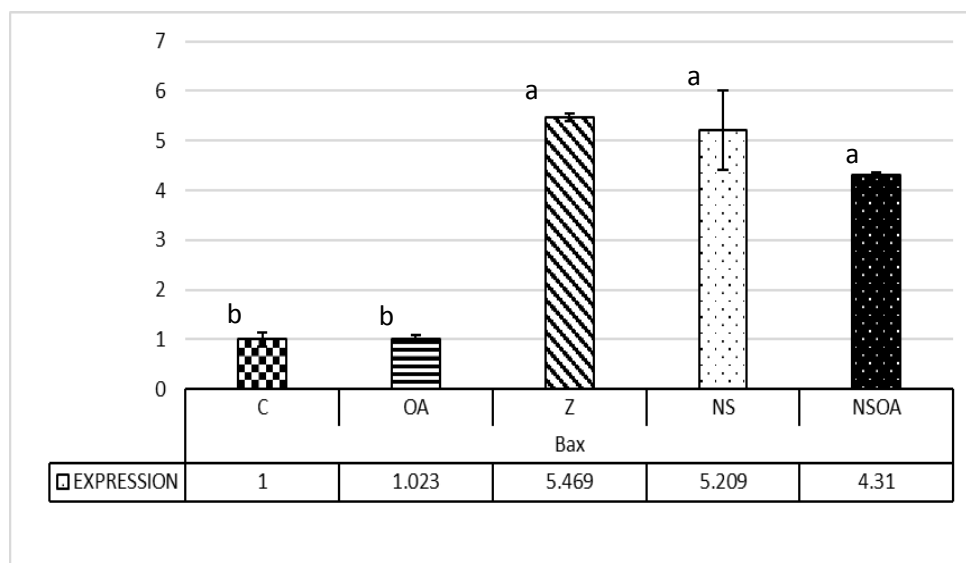


نمودار ۲. بیان نسبی ژن Bcl<sub>2</sub> در بافت روده در شرایط تنش گرمایی. C: شاهد، OA: اسید آرگانیک، Z: کلینوپتیلولیت، NS: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت و NSOA: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت مکمل شده با اسید آرگانیک

Figure 2. Relative expression of Bcl<sub>2</sub> gene in intestine tissue under heat stress conditions

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

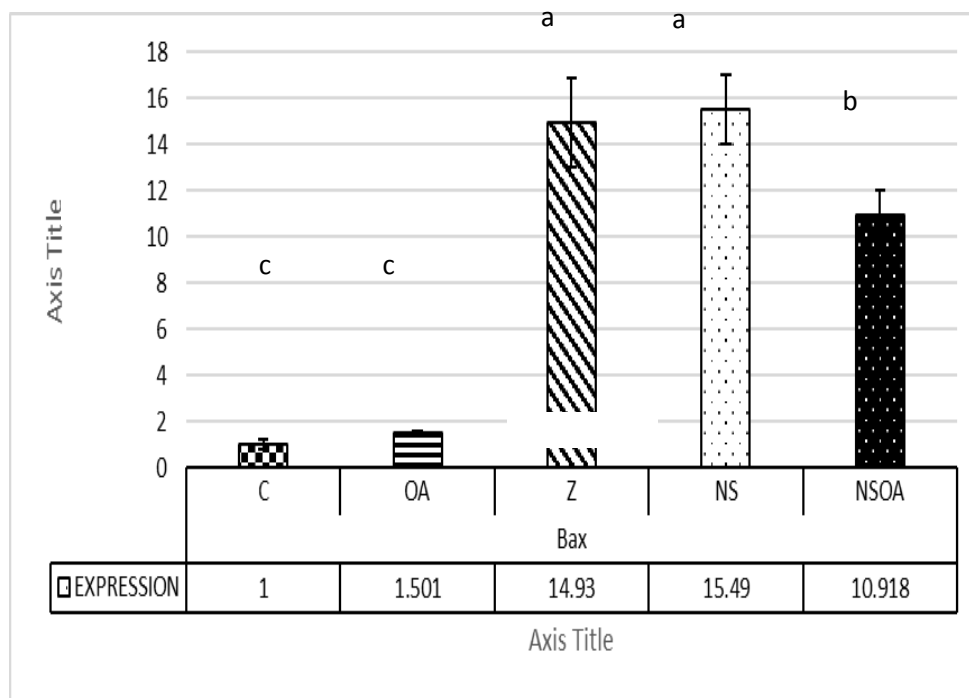




نمودار ۳. بیان نسبی ژن BAX در بافت کبد در شرایط تنش گرمایی. C: شاهد، OA: اسید آرگانیک، Z: کلینوپتیلولیت، NS: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت و NSOA: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت مکمل شده با اسید آرگانیک

Figure 3 .Relative expression of BAX gene in liver tissue under heat stress condition

**C:** control or basal diet, **OA:** basal diet supplemented by organic acid, **Z:** basal diet supplemented by clinoptilolite, **NS:** basal diet supplemented by clinoptilolite coated with nanosilver, **NSOA:** basal diet supplemented by clinoptilolite coated with nanosilver and organic acid.



نمودار ۴. بیان نسبی ژن BAX در بافت روده در شرایط تنش گرمایی. C: شاهد، OA: اسید آرگانیک، Z: کلینوپتیلولیت، NS: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت و NSOA: نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت مکمل شده با اسید آرگانیک

Figure 4. Relative expression of BAX gene in intestine tissue under heat stress conditions

**C:** control or basal diet, **OA:** basal diet supplemented by organic acid, **Z:** basal diet supplemented by clinoptilolite, **NS:** basal diet supplemented by clinoptilolite coated with nanosilver, **NSOA:** basal diet supplemented by clinoptilolite coated with nanosilver and organic acid.

## بحث

اکسیژن محافظت کند. با این حال مکانیسمی که  $Bcl2$  توسط آن سلول را از آپوپتوز به وجود آمده به وسیله‌ی رادیکال‌های آزاد اکسیژن محافظت می‌کند را ناشناخته ارزیابی کردند. این محققان، معتقد بودند که  $Bcl2$  خود فعالیت آنتی‌اکسیدانی انجام نمی‌دهد اما ممکن است که فعالیت غیر مستقیمی در افزایش سطوح و یا فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در داخل سلول داشته باشد و بنابراین بیان بالای  $Bcl2$  به سلول‌ها اجازه‌ی مقابله‌ی بهتر با اثرات رادیکال‌های آزاد اکسیژن را می‌دهد و این اجازه به وسیله‌ی افزایش در آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به دست می‌آید (Hildeman et al., 2003).

نقره در ابعاد نانو بر متابولیسم، تنفس و تولیدمثل میکروارگانیسم‌ها اثر می‌گذارد. یکی از خواص نانوذرات نقره تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد که سبب پراکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌غشایی و اختلال در ورود و خروج انتخابی غشاها، تولید متابولیت‌های ثانویه و در نهایت مرگ عوامل پاتوژن یا بیماری‌زا می‌گردد. برخلاف نتایج ما گزارش شده است که سطح بیان ژن  $Bcl2$  بافت کبد در گروه تحت تیمار با نانوذرات نقره ۲۰۰ قسمت در میلیون در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت. این اختلاف با یافته‌های این آزمایش می‌تواند بعلت سطوح مورد استفاده نانوذرات نقره در این آزمایش (۵۰ قسمت در میلیون) باشد (Sadoughiet al., 2017). 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 نانوذرات نقره با تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن سمیت ایجاد می‌کند و سبب آسیب بافت کبد می‌شود. همچنین عنوان شد رادیکال‌های آزاد حاصل از 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). در سال ۲۰۰۵ و ۲۰۰۸، سوتو و همکاران بعد از انجام آزمایشات گسترده

آپوپتوز یکی از راه‌های حذف سلول‌های ناخواسته می‌باشد، این فرآیند یک رخداد طبیعی است که در شرایط طبیعی باعث حذف سلول‌های آسیب دیده، پیر و مضر می‌شود و در تکثیر و نوسازی سلول‌های بدن نقش دارد، بعلاوه سلول مسئول مرگ خودش می‌باشد از این رو خودکشی سلولی هم نام گرفته است. اختلال در روند آپوپتوز باعث به وجود آمدن مشکلاتی از جمله تومورزایی و یا اختلالات خودایمنی می‌شود.

در این آزمایش تیمارهای نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت (NS) و تیمار کلینوپتیلولیت (Z) دارای بیشترین بیان نسبی معنی‌دار ژن  $Bcl2$  نسبت به تیمار شاهد بوده‌اند ( $P < 0.05$ ). پروتئین  $Bcl2$  به عنوان یک پروتئین‌کوژن در سلول‌های ژرمینال در تنظیم فرآیند آپوپتوز سلولی دخالت می‌نماید و در مهار آپوپتوز سلولی نقش دارد. در صورت کاهش میزان بیان ژن مربوط به پروتئین  $Bcl2$ ، فرآیند مرگ برنامه ریزی شده سلول یا آپوپتوزی بواسطه فعال شدن سایر انکوژن‌های از قبیل P53 شروع می‌شود. با در نظر گرفتن نقش کاسپازها در سلول‌های مختلف، مطالعات نشان داده‌اند که  $Bcl2$  بواسطه مهار سنتز و تولید کاسپازها نیز می‌تواند فرآیند آپوپتوز را مهار نماید. به طور اختصاصی‌تر پروتئین‌های  $Bcl2$  موجود در دیواره میتوکندری‌ها بواسطه‌ی جلوگیری از رها شدن سیتوکروم C و یا با اتصال به Apaf-1 مانع از تشکیل آپوپتوزوم و به راه افتادن آبشار کاسپازی می‌شود. کاهش بیان ژن  $Bcl2$  با افزایش دوز نانوذرات نقره در هیپوکامپ مغز موش‌های صحرایی به دنبال تزریق نانوذرات نقره به صورت درون صفاقی گزارش شده است (Ghooshchian et al., 2016; 2017). تغییر در بیان ژن‌های مختلف تحت تأثیر نانوذرات نقره در مغز مطرح شده است، به طوری که نانوذرات نقره موجب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و القای استرس اکسیداتیو و در نهایت منجر به آسیب اکسیداتیو DNA می‌شود (Buzea et al., 2007). به نظر نمی‌رسد  $Bcl2$  تأثیری در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن داشته باشد، اما این ژن سلول را از آسیب‌های اکسیداتیو سلولی محافظت می‌کند. همچنین گزارش شده است که بیان بالای  $Bcl2$  می‌تواند سلول‌ها را از آپوپتوز حاصل از رادیکال‌های آزاد

سمی توسط باکتری‌ها، تغییر در ریخت شناسی دیواره روده و کاهش تجمع عوامل بیماری‌زا در دیواره روده شود (Taghizadeh & Tarshizi, 2013). همچنین نانوذرات نقره ممکن است هضم و قابلیت دسترسی مواد مغذی را بهبود داده باشند (Ahmadi et al., 2010; 2013). بیست درصد مواد مغذی موجود در جیره برای نگهداری، بازسازی مجدد و جایگزینی اپی‌تلیوم روده به کار می‌رود. به دلیل اینکه نانوذرات نقره ممکن است با کاهش سموم میکروبی، موجب نازک شدن اپی‌تلیوم شود، احتمالاً کاهش در نیاز نگهداری دیده شده است (Morones et al., 2005). همسو با نتایج ما گزارش شده است که سطح بیان ژن BAX در مغز در گروه تحت تیمار با نانوذرات نقره در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی داری افزایش یافت (Ghooshchian et al., 2017).

گزارش شده است که کاهش عملکرد در سطوح بالای مصرف نانو ذرات نقره ممکن است به دلیل التهابی باشد که در نتیجه استفاده از این ذرات، مستقیماً در دستگاه گوارش ایجاد می‌شود. التهاب در نتیجه القاء یا ایجاد اشکال اکسیژنی فعال توسط نانوذرات ایجاد می‌شود. این التهاب، ناهنجاری‌های گوارشی را ایجاد می‌کند که ممکن است موجب کاهش توانایی پرنده در بروز حداکثر توان تولیدی شود، نقش نانوذرات در بیماری‌های التهابی دستگاه گوارش در اثر وجود این ذرات در غذا و به دنبال آن ایجاد التهاب مستقیم دستگاه گوارش و بروز ناهنجاری‌های مزمن گوارشی در انسان گزارش شده است (Gatti et al., 2007). در نمونه بافت کولون سرطانی شده مشاهده شد که این سرطان ناشی از التهاب ایجاد شده توسط نانوذرات موجود در غذا بود (Zhang et al., 2009). با مطالعه روی سلول‌های مغزی سلول‌های نورو اندروکرینی کشت شده نشان داده است که نانو ذرات نقره با افزایش حد تخلیه دوپامین و کاهش فعالیت میتوکندری‌ها، بر سلول‌های ساقه مغزی پستانداران اثر سمی دارند (Hussain et al., 2011).

کاربردهای نانوذرات نقره هر روز افزایش می‌یابد و علیرغم آن هنوز اطلاعات کامل و جامعی راجع به اثرات زیستی و سمیت آنها در دسترس نیست. استفاده گسترده از نانوذرات نقره انسان را در مواجهه بیشتری با آنها قرار داده است. نانوذرات نقره می‌توانند

اعلام کردند که برخی نانو مواد (به ویژه نانوذرات نقره) و داروهایی که از آن ساخته می‌شوند چه به صورت خوراکی و چه به صورت تماس پوستی می‌توانند یک تهدید مهم برای سلامتی جوامع انسانی باشند (Soto et al., 2005; 2008). استفاده‌ی دراز مدت از این مواد بدون در نظر گرفتن عواقب آن می‌تواند زندگی موجودات زنده را تحت تأثیر قرار دهد. 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). گزارش شده است که تجویز داخل صفاقی نانوذرات نقره در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ قسمت در میلیون باعث افزایش آپوپتوز سلول هیپوکامپ و بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl2 را کاهش می‌دهد (Ghooshchian et al., 2017). همچنین همسو با نتایج ما سنایی و همکاران (۱۳۹۹) گزارش کردند که اسیدهای آرگانیک به‌طور معنی‌داری باعث مهار رشد سلولی، القای آپوپتوز، کاهش بیان ژن‌های Bcl2 می‌گردد و به‌نظر می‌رسد که اسیدهای آرگانیک نقش آپوپتوزی خود را از طریق مسیرهای آپوپتوزی داخلی و خارجی در سرطان کبد ایفا می‌کند (Sanaei & Kavosi, 2020).

ارزیابی بیان ژن BAX در بافت کبد و روده در این آزمایش نشان می‌دهد که میزان بیان نسبی ژن BAX در تیمارهای NSOA و NS و Z اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داشتند. تنظیم کننده آپوپتوز BAX، پروتئینی است که به عنوان فعال کننده آپوپتوز عمل می‌کند. گزارش شده است که این پروتئین با کانال آنیونی وابسته به ولتاژ میتوکندری که منجر به از بین رفتن پتانسیل غشا و آزاد شدن سیتوکروم C می‌شود، تعامل دارد و باعث افزایش باز شدن آن می‌شود. کلینوپتیلولیت می‌تواند به دلیل خاصیت ضد میکروبی قوی سبب کاهش تولید ترکیبات

ویتامین C جلوگیری کرده و همین عامل سبب افزایش ویتامین C در بدن می‌شود که نقش مهمی به عنوان آنتی‌اکسیدان در بدن ایفا می‌کند.

همچنین گزارش شده اسیدهای آروگانیک مانند اسیدسیتریک به عنوان یک مهارکننده ی فیزیولوژیکی آنزیم‌های دخیل در مسیر گلیکولیز، در راستای حذف سلولهای سرطانی از طریق القای مرگ برنامه ریزی شده عمل می‌کنند. ارتباط بین گلیکولیز و آپوپتوز به سطح آنزیم هگزوکیناز II برمی‌گردد. آنزیم هگزوکیناز II گلوکز را به گلوکز ۶ فسفات تبدیل می‌نماید و باعث پیشبرد فرآیند گلیکولیز به وسیله آبشار آنزیمی می‌شود و زمانی که منافذ غشاء خارجی میتوکندری باز هستند، باعث پایداری یک جزء ساختاری این منافذ تحت عنوان VDAC شده که نقش آن تنظیم نفوذپذیری منافذ می‌باشد (Pastorino & Hoek, 2008). لذا پایداری ایجاد شده در این جزء توسط هگزوکیناز II نفوذپذیری را در غشاء خارجی غیرفعال می‌کند. با حذف هگزوکیناز II از مجموعه، نفوذپذیری در غشاء خارجی میتوکندری القاء می‌گردد که به دنبال آن سیتوکروم C به درن سیتوپلاسم ترشح شده و آبشار کسپازی به راه می‌افتد و آپوپتوز القاء می‌گردد (Pedersen et al., 2020; Ren et al., 2017; Satoaki et al., 2006).

### نتیجه گیری کلی

به‌طور کلی نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که تیمارهای کلینوپیتیلولیت (Z) و نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپیتیلولیت (NS) و اثر افزایشی بر بیان Bcl2 (ژن آنتی آپوپتیک) و BAX (ژن پرو آپوپتیک) دارند و این در حالی است که این اثر در تیمار اسید آروگانیک دیده نشد و اسید آروگانیک باعث کاهش بیان ژن های مورد مطالعه گشت و بهتر است چنانچه از نانوذرات نقره در تغذیه دام و طیور استفاده می‌گردد از اسید آروگانیک جهت کاهش اثرات جانبی نانوذرات نقره بصورت مکمل استفاده گردد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد خانم نگین آخوندپور می‌باشد. بدین وسیله از جناب آقای دکتر داریوش

از راه های مختلفی مانند تنفس، تماس پوستی و مصرف خوراکی وارد بدن انسان شوند و از طریق جریان خون به اعضای حیاتی بدن برسند. نانوذرات نقره با تغییر در مورفولوژی و نفوذپذیری غشاء، آسیب به DNA، تاثیر در زنجیره تنفسی و توقف سیکل سلولی منجر به آپوپتوزیس و مرگ سلولی می‌شوند. مطالعات نشان داده است که نانوذرات نقره می‌توانند از طریق آزادسازی رادیکالهای آزاد اکسیژن باعث ایجاد آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده سلول) در شرایط آزمایشگاهی شوند (Gurunathan et al., 2013). نانوذرات نقره با اتصال به پروتئین‌های حاوی گوگرد در سطح غشای باکتری‌ها، وارد آنها می‌شوند و با ایجاد تغییر در مورفولوژی و نفوذپذیری غشاء و تأثیرگذاری در زنجیره تنفسی و تقسیم سلولی در نهایت باعث مرگ باکتری‌ها به صورت مؤثر می‌شوند (McShan et al., 2014). اثر نانوذرات نقره بر القای آپوپتوز بر سلولهای بنیادی جنینی و سلول های فیبروبلاست بررسی شده است (Ahamed et al., 2008). آنها نشان دادند که تیمار سلولهای مذکور با نانوذرات نقره به آسیب دیدگی DNA در این سلول‌ها منجر می‌شود. همچنین، گزارش کردند که بیان پروتئین P53 در هر دو نوع سلول بنیادی و فیبروبلاستی افزایش می‌یابد. اثر نانوذرات نقره بر سلولهای سرطان کولون 116H تحت بررسی قرار گرفته است (Satapathy et al., 2013). آنها نشان دادند که نانوذرات نقره به صورت وابسته به مقدار و دوز مصرفی، به القای مرگ سلولی برنامه ریزی شده در سلولهای مذکور منجر می‌شود.

در این آزمایش کاهش بیان ژن‌های مورد مطالعه در تیمارهای مکمل شده با اسید آروگانیک دیده شده است. اگرچه مکانیسم دقیق این امر در منابع توضیح داده نشده است ولی می‌توان بیان کرد که اسیدهای آروگانیک نقش مهمی در فرآیندهای متابولیکی بوسیله انتقال الکترون ها و پروتون ها ایفا می‌کنند و با کاهش اکسیداسیون زوج های ردوکس اصلی در سلول‌ها مانند NAD، NADP، گلوکاتیون و آسکوربات مرتبط هستند. نقش اسیدهای آروگانیک در ایجاد تعادل تعادل اکسیداسیون و احیا، حمایت از شیب یونی روی غشاهای اسیدی شدن محیط خارج سلولی، و تنظیم تولید گونه‌های اکسیژن فعال و نیتروژن تایید شده است (Igamberdiev et al., 2018). همچنین ثابت شده است که اسید آروگانیک موجود در ترکیبات غذایی از اکسیداسیون

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 تایید و ثبت شده است.

داودی از موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به جهت حمایت‌هایشان در راستای تهیه نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت قدردانی می‌شود. همچنین از همکاری مسئولان ایستگاه تحقیقات طیور و مسئولان آزمایشگاه‌های علوم دامی و تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی

## References

- Ahamed, M., Karns, M. Goodson, M. Rowe, J. Hussain, S.M. Schlager, J.J. & Hong Y.** 2008. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 233: 404-410.
- Ahmadi, F., & Hafsi Kurdestany, A.** 2010. The impact of silver nanoparticles on growth performance, lymphoid organs and oxidative stress indicators in broiler chicks. *Global Veterinaria* 5: 366-370.
- Ahmadi, F., Mohammadikhah, 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: 95-100.
- Buzea, C., Pachec, I.I. & Robbie, K.** 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 2: 17-71.
- Freeman, B.A., & Crapo, J.D.** 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. Laboratory investigation. *Journal of Technical Methods and Pathology* 47: 412-426.
- Gatti, A. M.** 2007. Biocompatibility of micro and nano-particles in the colon. Part II. *Biomaterials* 25: 385-392.
- 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. *Iranian South Medical Journal* 19: 185-193.
- Ghooshchian, M., Khodarahmi, P. & Tafvizi, F.** 2017. Apoptosis-mediated neurotoxicity and altered gene expression induced by silver nanoparticles. *Toxicology and industrial health* 33: 757-764.
- Gissen, P. & Arias, I.M.** 2015. Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *Journal of Hepatology* 63: 1023-1037.
- Gurunathan, S., Raman, J. Abd Malek, S.N. John, P.A. & Vikineswary, S.** 2013. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: A potential cytotoxic agent against breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine* 8: 4399-413.
- Hashemi, S.R., 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: 321-328.
- Hashemi, S.R., 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: 183-193.
- 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 of the United States of America* 100: 15035-15040.
- Hussain, S.M., Hess, K.L. Gearhart, J.M. Geiss, K.T. and Schlager, J.J.** 2011. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL3A rat liver cells. *Toxicology in vitro* 19: 975-983.
- Igamberdiev, A.U., & Bykova, N.V.** 2018. Role of organic acids in the integration of cellular redox metabolism and mediation of redox signalling in photosynthetic tissues of higher plants. *Free Radical Biology and Medicine* 122:74-85
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25: 492-498.
- McShan, D., Ray, P.C. & Yu, H.** 2014. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug Analysis* 22: 116-127.
- Mohammed, A.E., Al-Qahtani, A. Al-Mutairi, A. Al-Shamri, B. & Aabed, K. F.** 2018. Antibacterial and cytotoxic potential of

- biosynthesized silver nanoparticles by some plant extracts. *Nanomaterials* 8:36-42.
- Morones, J.R., Elechiguerra, J.L. Camacho, A. Holt, K. Kouri, J.B. Ramirez, J.T. & Yacaman, M.J.** 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16: 2346-2353.
- Oh, S.H., & Lim, S.C.** 2006. A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 212: 212-223.
- Pastorino, J.G., & Hoek, J.B.** 2008. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 40:171-182.
- Pedersen. P.L., Mathupala, S. Rempel, A. Geschwind, J.F.& Ko, Y.H.** 2020. Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochimica et Biophysica Acta* 1-3: 14-20.
- Ren, J.G., Seth, P. Ye, H. Guo, K. Hanai, J. Husain, Z. & Sukhatme, V.P.** 2017. Citrate suppresses tumor growth in multiple models through inhibition of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle and the IGF1R pathway. *Scientific Reports* 7: 4537.
- 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: 626-638.
- Robert, J.** 2003. The effect of selenium supplementation on performance and antioxidant enzyme activity in broiler chickens. Dissertation. North Carolina state university, USA.
- Sadoughi, S.D.** 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. *The Horizon of Medical Sciences*, 23: 293-299.
- Sahin, K., Sahin, N. & Kucuk, O.** 2003. Effects of chromium, and ascorbic acid supplementation on growth, carcass traits, serum metabolites, and antioxidant status of broiler chickens reared at a high ambient temperature (32 °C). *Nutrition Research* 23: 225-238.
- Sanaei, M., & Kavooosi, F.** 2020. 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* 24:601-609.
- SAS (Statistical Analysis System).** 2008. SAS/STAT® 9.2. User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina. USA.
- Satapathy, S., Mohapatra, P. Preet, R. Das, D. Sarkar, B. Choudhuri, T. Wyatt, M. & Kundu, C.** 2013. Silver-based nanoparticles induce apoptosis in human colon cancer cells mediated through p53. *Nanomedicine* 8: 1307-1322.
- Satoaki, M., Kang, J.G. Patino, W.D. Wragg, A. Boehm, M. Gavrilova, O., Hurley, P.J. Bunz, F. & Hwang, P.M.** 2006. P53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312: 1650-1653.
- Senjen., R.** 2007. Nano silver: a threat to soil, water and human health? Friends of the Earth Australia. Available at <http://nano.foe.org.au/node/189>
- 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: 183-193.
- Shameli, K., Bin Ahmad, M. Zargar, M. Wan Zin M.D.Y. & Azowa Ibrahim, N.** 2011. Fabrication of silver nanoparticles doped in the zeolite framework and antibacterial activity. *International Journal of Nanomedicine* 6: 331-341.
- Soto, K.F., Carrasco, A. and Powell, T.G.** 2005. Comparative *in vitro* cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy. *Journal of Nanoparticle Research* 7: 145-169.
- Soto, K.F., Murr L.E. & Garza, K.M.** 2008. Cytotoxic responses and potential respiratory health effects of carbon and carbonaceous nanoparticles in the paso del norte airshed environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 5: 12-25.
- 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: 9319-9337.
- Taghizadeh, M., & Karimi Tarshizi, M.A.** 2013. An evaluation of nano-silver as an alternative antibiotic on performance and intestinal morphometric parameters in broiler chickens. *Iran Journal of Animal science* 44: 262-255. (In Persian)
- Tang, J., and Xi, T.** 2008. Status of biological evaluation on silver nanoparticles. *Journal of*

Biomedical Engineering 25 :958-961.

**Zhang, H., Kong, B. Xiong, Y. & Sun, X. 2009.**  
Antimicrobial activity of spice extracts against  
pathogenic and spoilage bacteria in modified

atmosphere packaged fresh pork and vacuum  
packaged ham slices stored at 4°C. Meat  
Sciences 81: 686-692.

\*\*\*\*\*

**How to cite this article:**

**Akhondpor N, Hashemi.S.R Farhadi.A & Arabiyan.E 2023.** Response of genes effective in apoptosis in the liver and intestinal cells of broiler chickens fed silver nanoparticles coated on clinoptilolite under heat stress condition . Nova Biologica Reperta 10: 41-57. (In Persian).

آخوندپور، ن.، هاشمی، س.ر.، فرهادی.الف، اعرابیان.الف. ۱۴۰۲. پاسخ ژن‌های موثر در مرگ برنامه ریزی شده سلول در سلول‌های کبدی و روده در شرایط القاء تنش گرمایی حاد در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۰: ۴۱-۵۷.