



"مقاله پژوهشی"

بررسی عملکرد و مقایسه ایزوفرم‌های سیتوکروم P450 در جگر جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت

الناز عربیان^۱، سیدرضا هاشمی^۲، احد یامچی^۳، هما داودی^۴ و شریف رستمی^۵

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- استادیار گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، (نویسنده مسوول: hashemi711@yahoo.co.uk)
۳- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۴- استادیار گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان
۵- دانش‌آموخته دکتری گروه فیزیولوژی دام، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ ارسال: ۹۹/۰۴/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۱۱
صفحه: ۱۰۹ تا ۱۱۷

چکیده

به منظور بررسی اثر نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت بر مقدار بیان mRNA سیتوکروم P450 در جگر جوجه‌های گوشتی آزمایشی متشکل از، (۱) تیمار شاهد، (۲) تیمار کلینوپتیلولیت، (۳) تیمار نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت، (۴) تیمار اسید ارگانیک و (۵) تیمار نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت مکمل شده با اسید ارگانیک، در شرایط با و بدون تنش گرمایی طراحی شد. نمونه برداری از بافت جگر در روزهای ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش صورت گرفت. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که اثر متقابلی بین تنش گرمایی و تیمارهای آزمایشی در صفات عملکردی مشاهده نشد. همچنین تیمار کلینوپتیلولیت در روز ۲۱ دوره پرورش و تیمار نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت مکمل شده با اسید ارگانیک در روز ۴۲ دوره پرورش بدون تنش گرمایی، بیشترین مقدار بیان را در هر دو ایزوفرم ژن‌های Cytochrome P450 2C18 و Cytochrome P450 2C23b داشته‌اند ($p < 0.05$). در روز ۴۲ دوره پرورش با اعمال تنش گرمایی، ژن سیتوکروم P450 با ایزوفرم Cytochrome P450 2C18 در تیمار نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت افزایش بیان معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشته است ($p < 0.05$). در حالی که مقدار بیان ایزوفرم Cytochrome P450 2C23b تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت. به طور کلی نتایج نشان داد که مقدار بیان ایزوفرم Cytochrome P40 2C18 در مقایسه با ایزوفرم Cytochrome P40 2C23b در جگر جوجه‌های گوشتی بیشتر بوده است. جگر به عنوان عضو متابولیزه کننده بدن، تیمار کلینوپتیلولیت و نانو ذرات نقره پوشش داده شده را به عنوان ماده‌ای با منشأ خارجی و غیرآلی شناسایی کرده و افزایش بیان ژن سیتوکروم P450 به عنوان نشانگر حضور مواد خارجی و غیرآلی در بدن است.

واژه‌های کلیدی: جگر، جوجه گوشتی، سیتوکروم P450، کلینوپتیلولیت، نانو ذرات نقره

مقدمه

فناوری نانو وابسته به اندازه مواد در مقیاس نانومتر (۹-۱۰ متر) است (۱۸). نانو ذرات با توجه به اندازه، توزیع ذرات و ریخت‌شناسیشان دارای خواص نوین و بهبود یافته نسبت به ذرات بزرگ‌تر و مواد توده‌ای هستند (۱۷). خواص عمده نانو ذرات نقره عدم ایجاد حساسیت، پایداری زیاد، سازگاری با محیط زیست، مقاوم در برابر حرارت، عدم ایجاد یا افزایش مقاومت و سازگاری در میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (۴). علاوه بر خواص مثبت نانو ذرات نقره، گزارش شده است که اندازه، هم‌شکلی ذرات و پایداری بالای نانو ذرات نقره باعث عبور این مواد از غشای بیولوژیکی سلول و اختلال مکانیسم پیام‌رسانی سلول و عملکرد میتوکندری و مواد ژنتیکی داخل سلول می‌شود (۱۰). نانو ذرات نقره می‌تواند با بافت‌های مختلف باند شده و اثرات سمی و مخرب به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) داشته باشند و باعث مرگ سلولی شوند (۶). تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجب آغاز تنش اکسایشی، آسیب به DNA، پروتئین‌های ساختاری و لیپیدها، برانگیخته شدن واکنش‌های اکسیداسیون و پراکسیداسیون می‌شود (۲۵).

همچنین کلینوپتیلولیت (ژئولیت طبیعی) گروهی از آلومینوسیلیکات‌های هیدراته متبلور با خلل و فرج‌های ریز هستند و کاربردهای وسیعی در علوم پزشکی و علوم دامی دارند (۲۰). از مهم‌ترین عواملی که تنش اکسایشی در حیوانات را القاء می‌کند، فلزات سنگین از قبیل نقره می‌باشند (۹). با توجه به افزایش استفاده روزافزون نانو ذرات نقره و آسیب‌های احتمالی، بررسی این آسیب‌ها در سطح مولکولی ضروری است. نشانگرهای زیستی یا بیومارکرها تأثیرپذیری یا تغییر شاخص‌های بیوشیمیایی، ژنتیکی یا ایمنی در ارگانیسم‌های مختلف نشان می‌دهند (۱۴). به طور کلی بیومارکرها گویای تغییرات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و بافت‌شناسی حاصل از مواد شیمیایی با منشأ خارجی وارد شده به بدن هستند (۱۶). تماس یک ماده شیمیایی خارجی یا ماده زنبیوتیک (بیگانه زیست-ماده شیمیایی بیگانه در بدن) در سطوح ارگانیسمی و سلولی می‌تواند منجر به شروع یک پاسخ یا یک تغییر در اجزای بیولوژیک شود و هدف اولیه نشانگرهای زیستی تأثیرپذیری بدن در مقابل زنبیوتیک‌هاست (۵). زیرا تأثیرپذیری یک ارگانیسم از مواد زنبیوتیک می‌تواند

تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) تیمار شاهد (C)، (۲) تیمار یک درصد کلینوپتیلولیت (Z)، (۳) تیمار ۰/۱۵ درصد اسید ارگانیک (OA)، (۴) تیمار یک درصد کلینوپتیلولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانوذرات نقره (NS) و (۵) تیمار یک درصد کلینوپتیلولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانوذرات نقره مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسید ارگانیک (NSOA) بودند. دوره پرورش جوجه‌های گوشتی براساس راهنمای پرورش NRC و جیره‌های آزمایشی براساس توصیه سوبیه کاب ۵۰۰ برای دوره آغازین (۱ تا ۲۱ روزگی) و رشد (۲۲ تا ۴۲ روزگی) تهیه شد (جدول ۱). دمای سالن در روز اول ۳۲±۱ درجه تنظیم و در نهایت پس از گذشت ۲۱ روز دمای سالن در دمای ۲۱±۱ درجه ثابت شد.

به‌منظور اعمال تنش گرمایی، از روز ۳۵ دوره‌ی پرورش به‌منظور اعمال تنش گرمایی، نیمی از جوجه‌ها از تمامی واحدهای آزمایشی تنش گرمایی داده شد و روزانه به‌مدت چهار ساعت دمای سالن به ۳۴ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. بدین‌منظور با استفاده از پارچه‌های برزنتی و پلاستیک، سالن به دو قسمت تقسیم شد و نیمی از جوجه‌ها در معرض تنش گرمایی قرار داده شد. به‌منظور ارزیابی صفات مربوط به عملکرد، مقدار خوراک مصرفی و افزایش وزن جوجه‌های گوشتی هر واحد آزمایشی در کل دوره اندازه‌گیری شد و متوسط خوراک مصرفی هر جوجه در دوره آغازین، رشد و پایانی در شرایط نرمال و تحت تنش گرمایی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین ضریب تبدیل خوراک نیز از تقسیم مقدار خوراک مصرفی بر افزایش وزن محاسبه گردید. در روزهای ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش دو قطعه جوجه گوشتی از هر تکرار (مخلوط دو جنس) به‌صورت تصادفی انتخاب شدند و نمونه‌برداری از بافت جگر انجام گرفت.

به‌منظور بررسی بیان ژن سیتوکروم P450، استخراج RNA کل با استفاده از بافر استخراج ترايزول (TRIzol-Sigma آمریکا) براساس دستورالعمل پیشنهادی شرکت سیگما انجام شد و سپس جهت اطمینان از استخراج درست RNA کل، چند نمونه به‌طور تصادفی روی ژل آگارز یک درصد با استفاده از ایجاد اختلاف ولتاژ در دستگاه الکتروفورز (Bio-Rad-PowerPac Basic آمریکا) و استفاده از تکنولوژی رنگ DNA Safe Stain زیر نور UV دستگاه ژل داگ (Gel Documentation)، مدل FG-1، ساخت شرکت BIO-RAD آمریکا) بررسی و صحت استخراج RNA کل تأیید شد. به‌منظور حذف DNA احتمالی، از تیمار DNase I (DNase I RNase free-0521 Fermentas-USA) براساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز استفاده شد. ساخت رشته اول cDNA با استفاده از آغازگر الیگودی‌تی (Oligo) و (dNTPs) (Fermentas-USA SO132-18Primer) و DPCE-treated water انجام شد.

باعث ایجاد سلسله وقایع ژنتیکی شوند که منجر به تغییرات و صدمه به DNA را به دنبال داشته باشد (۳).

سیتوکروم P450 جزء اولین آنزیم‌هایی است که در فاز اول پاسخ به ورود مواد شیمیایی خارجی و زئوبیوتیک از جگر تولید شده و در اثر ورود فلزات سنگین به بدن مقدار بیان ژن آن تغییر کرده که می‌توان این تغییرات را به‌عنوان بیومارکر آلودگی محسوب کرد (۲۷). سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 در تمامی ارگان‌ها (از باکتری تا پستانداران) وجود دارند و در سوخت‌وساز مواد دخالت داشته و جزء آنزیم‌های اکسایشی است و در صورت ورود مواد زئوبیوتیک، بیان آن افزایش می‌یابد که می‌توان بالا بودن بیان آن در بافت جگر را به فراهم‌بودن شرایط برای فعال‌بودن پروتئین کیناز C که القاء‌کننده بیان این ژن است، در بافت متابولیسم جگر نسبت داد (۲۶). همچنین زئولیت در تغذیه طیور به‌علت بهبود و پیشگیری از بیماری، جذب گازهای سمی، جذب مواد سمی، کاتالیزور و تسریع‌کننده واکنش‌های شیمیایی، خاصیت غربال مولکولی و تنظیم هضم و جذب سیستم گوارش مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۲). همچنین اسیدهای آلی در طیور موجب افزایش قابلیت هضم خوراک، افزایش جذب مواد معدنی، جلوگیری از بیماری‌های طیور و جلوگیری از عارضه‌های گوارشی می‌شود (۱).

بررسی‌های متعددی در تغییرات مقدار بیان سیتوکروم P450 در معرض تیمارهای غیرآلی، زئوبیوتیک و فلزات سنگین در جانوران آبی (تاس‌ماهی ایرانی) (۲۴)، بوقلمون، جوجه‌های گوشتی (۳۴) و بسیاری از جانوران دیگر صورت گرفته است، ولی در زمینه سلولی و مولکولی تاکنون تحقیقات جامعی در رابطه با پاسخ و مقایسه مقدار بیان ایزوفرم‌های مختلف سیتوکروم P450 در سلول‌های جگر جوجه‌های گوشتی با استفاده از نانوذرات نقره و کلینوپتیلولیت ارائه نشده است. از این‌رو هدف پژوهش حاضر بررسی و مقایسه پاسخ ایزوفرم‌های مختلف سیتوکروم P450 در بافت جگر جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت بر مقدار بیان ژن‌های شاخص آلودگی حضور مواد خارجی و زئوبیوتیک در بدن است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در ایستگاه تحقیقات طیور دانشکده علوم دامی واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، به‌مدت ۴۲ روز انجام شد. در تمامی مراحل انجام پژوهش، اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس قانون مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی با شماره مجوز ۵۹-۳۹۳-۹۷ از کمیته اخلاق کار پژوهش در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اخذ و رعایت گردید. بدین‌منظور آزمایشی با استفاده از ۴۵۰ قطعه جوجه گوشتی با پنج تیمار و شش تکرار (۱۵ قطعه در هر تکرار) مخلوط دو جنس طراحی شد.

جدول ۱- ترکیب جیره‌های غذایی (برحسب درصد ماده خشک)^۱

Table 1. Composition of experimental diets (DM basis)¹

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

۱- جیره پایه براساس راهنمای پرورش NRC تهیه شده است. هر کیلوگرم خوراک حاوی: ویتامین A، 1500 IU؛ کوله کلسیفرول، ۲۰۰ IU؛ ویتامین E، 10 IU؛ ریوفلاوین، ۳/۵ میلی‌گرم؛ پانتوتینیک اسید، ۱۰ میلی‌گرم؛ نیاسین ۳۰ میلی‌گرم؛ کولین کلرید، ۱۰۰۰ میلی‌گرم؛ بیوتین، ۰/۱۵ میلی‌گرم؛ اسید فولیک، ۰/۵ میلی‌گرم؛ تیامین، ۱/۵ میلی‌گرم؛ پیریدوکسین، ۰/۳ میلی‌گرم؛ آهن، ۸۰ میلی‌گرم؛ روی، ۴۰ میلی‌گرم؛ منگنز، ۶۰ میلی‌گرم؛ ید، ۰/۱۸ میلی‌گرم؛ مس، ۸ میلی‌گرم؛ سلنیوم، ۰/۱۵ میلی‌گرم؛ کوپالامین، ۱۵ میکروگرم.

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

Table 2. The primer sequences used in relative real-time PCR

| شماره دسترسی | طول محصول (pb) | توالی آغازگر | نام آغازگر |
|--------------|----------------|--|------------|
| NM_001001752 | 114 | F: 5'- AAGACAATCCCAATCACACT-3' R: 5'- GAAGCAGAAGCCCGTATC-3' | CYP2C18 |
| NM_001001757 | 149 | F: 5'-AATCATAAGAGCACACCAGGAATC-3' R: 5'-CCGCAAGGAACAAGTCAAGT-3' | CYP2C23b |
| NM_205518 | 198 | F: 5'- AAGTTACTCGCCTCTGTGAA-3' R: 5'- CACATCTATCACTGGGGAAC-3' | β-actin |

سایبرگرین (SYBR Green I بیوپارس) و دستگاه Thermal Cycler iQ5 Multicolor) Real-Time PCR (BIO-RAD آمریکا) انجام شد. واسرشت ابتدایی، واسرشت‌سازی (Denaturation)، اتصال (Annealing)، تکثیر (Extension) و در انتها تکثیر نهایی و مرحله ذوب انجام شد. بررسی منحنی‌های ذوب در پایان هر واکنش به منظور تأیید صحت اختصاصی عمل نمودن آغازگرها و فقدان پرایمر دایمرها انجام گرفت.

آنالیز آماری داده‌های مربوط به عملکرد در قالب طرح کاملاً تصادفی و با آرایش فاکتوریل (۲×۵) شامل پنج سطح تیمار آزمایشی و دو سطح شرایط نرمال و تنش گرمایی تجزیه و تحلیل و مشخص نمودن سطوح معنی‌داری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار (SAS, 2005) (نسخه ۹/۱) و مقایسه‌ی میانگین‌ها توسط آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام گردید. داده‌های حاصل از واکنش PCR (Ctها) با استفاده از

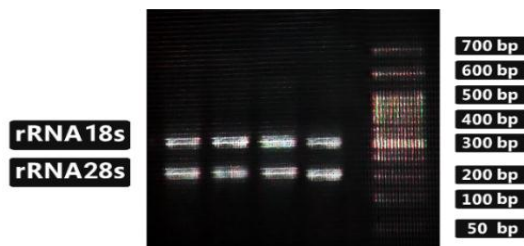
پس از انکوبه شدن نمونه‌ها به منظور ساخت رشته دوم DNA مکمل، آنزیم RT (-) Reverse Transcriptase (0441 Fermentas-USA (۲۳)، نوکلئوتیدهای dNTP و RNasin Ribonuclease Inhibitor (-) (USA-0311) (Fermentase) به PCR، Thermal Cycler، مدل T100TM، ساخت شرکت BIO-RAD آمریکا) منتقل شد. آغازگرهای مرجع و اختصاصی، با استفاده از نرم‌افزار AlleleID و Oligo7 براساس توالی ژن‌های مورد نظر در سایت NCBI برای (*Gallus gallus*) طراحی شدند. همچنین اختصاصی بودن آغازگرها با استفاده از برنامه پرایمر بلاست (Primer-Blast) کنترل شد. ساخت آغازگرها توسط شرکت پیشگامان انجام گرفت. آغازگر β-actin به‌عنوان کنترل داخلی (Internal control) انتخاب شد (جدول ۲) و بررسی صحت ساخت DNA مکمل با استفاده از آغازگر مرجع انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی (real-time PCR) در بافت جگر با استفاده از تکنولوژی رنگ

اعمال اختلاف ولتاژ در دستگاه الکتروفورز مولکول‌های با اندازه بزرگتر سرعت کندتر و مولکول‌های کوچک‌تر دارای سرعت بیشتری در خلل و فرج ژل آگارز می‌باشند که با اختلاف اندازه و وزن مولکول‌ها باندهای متفاوتی ایجاد می‌شود که براین اساس به دو واحد rRNA28s و rRNA18s معیارهای استخراج صحیح RNA می‌باشند. باند rRNA28s سنگین‌تر و نزدیک‌تر به چاهک و باند rRNA18s سبک‌تر و دورتر از چاهک قرار می‌گیرند.

فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برابر است با ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیبراتور (۱۵)، در فضای نرم‌افزار (Excel, 2013) ذخیره و تبدیل به بیان نسبی ژن‌های مورد نظر نسبت به ژن مرجع (β -actin) شد.

نتایج و بحث

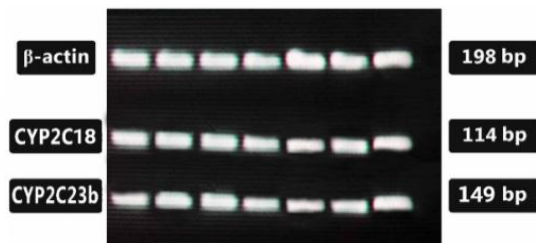
خلوص و کیفیت بالای RNA تخلیص شده و عدم ایجاد شکستگی و آسیب در ساختار RNA با قرار دادن نمونه روی ژل آگارز یک درصد در دستگاه الکتروفورز تأیید شد (شکل ۱).



شکل ۱- بررسی RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز
Figure 1. Evaluation of extracted RNA with agarose gel

نمونه‌های DNA مکمل انجام گرفت و در انتها محصول PCR برای آغازگر مرجع و آغازگرهای اختصاصی (شکل ۲) به‌طور جداگانه، روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند.

پس از ساخت cDNA به منظور اطمینان از درستی سنتز cDNA و درستی طراحی و سنتز آغازگرهای مرجع و اختصاصی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز استاندارد با استفاده از آغازگر ژن خانه‌دار (β -actin) و آغازگرهای اختصاصی



شکل ۲- بررسی ساخت DNA مکمل با استفاده از آغازگرها
Figure 2. Evaluation of cDNA synthesized with primers

آغازگر اطمینان حاصل شد. لازم به ذکر است تیمارهای آزمایشی در قالب دو تکرار با یولوژی‌یکال و سه تکرار تکنیکال مورد ارزیابی بیان کمی در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی قرار گرفتند.

اثر تیمارهای آزمایشی و تنش گرمایی بر عملکرد جوجه‌های گوشتی در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج پژوهش حاضر بیانگر این است هیچ اثر متقابل بین تنش گرمایی و تیمارهای آزمایشی در صفات عملکردی مشاهده نشده است. همچنین اثر تیمارهای آزمایشی بر صفات عملکردی معنی‌دار نبوده است. ولی نتایج حاصل از اعمال تنش گرمایی بر پرندگان نشان داده است که پرندگانی که تحت تأثیر تنش گرمایی بودند نسبت به پرندگانی که در شرایط نرمال پرورش داده شده بودند از مصرف خوراک

بررسی cDNA با استفاده از آغازگرها به منظور اطمینان از ساخت صحیح cDNA انجام شد. الگوی بانندی مشاهده‌شده در این مرحله برای تمامی نمونه‌ها تأیید کننده‌ی ساخت صحیح DNA مکمل، اختصاصی بودن آغازگرها و بهینه سازی مناسب دما و زمان مناسب برای مراحل واکنش PCR بود. پس از اطمینان از ساخت صحیح DNA مکمل، زین پس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی به‌منظور بررسی کمی مقدار بیان ژن‌های مورد آزمایش انجام شد. در پایان هر واکنش با رسم منحنی‌های ذوب برای هر آغازگر می‌توان از اختصاصی بودن آن‌ها اطمینان حاصل کرد. صحت منحنی ذوب در واکنش Realtime-PCR به‌منظور تکثیر صحیح رشته‌های DNA، کارکرد صحیح آغازگرها و فقدان پرایمر دایمرها تأیید شد. با مشاهده تنها یک پیک در حدود درجه حرارت ذوب آغازگر مورد بررسی، به اختصاصی عمل نمودن

سیتوکروم P450 با هر دو ایزوفرم CYP2C18 و CYP2C23b در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد ($p < 0.05$). این در حالی است که مقدار بیان ژن CYP2C18 در روز ۴۲ دوره پرورش با اعمال تنش گرمایی (شکل ۳) در جگر جوجه‌های گوشتی در تیمار نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت (NS) افزایش بیان معنی‌داری با تیمار شاهد داشت ($p < 0.05$). ولی سطح بیان ژن CYP2C23b در روز ۴۲ دوره پرورش با اعمال تنش گرمایی (شکل ۴) اختلاف معنی‌داری را با دیگر تیمارها و تیمار شاهد نشان نداد.

بیشتری و همچنین ضریب تبدیل بالاتری در دوره رشد و کل دوره پرورش برخوردار بودند ($p < 0.05$).

اثر تیمارهای آزمایشی بر مقدار بیان ژن سیتوکروم P450 ایزوفرم‌های CYP2C18 و CYP2C23b در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. براساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر، افزایش بیان معنی‌داری در بافت جگر جوجه‌های گوشتی تیمار شده با کلینوپتیلولیت (Z) در روز ۲۱ (شکل ۳) و تیمار نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت (NSOA) در روز ۴۲ (شکل ۴) در ژن پرورش بدون اعمال تنش گرمایی (شکل ۳ و ۴) در ژن

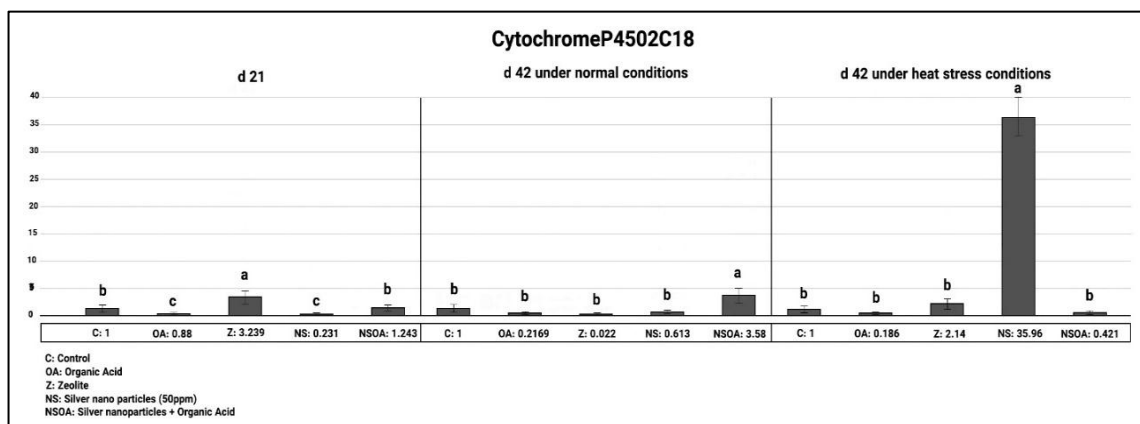
جدول ۳- اثر تیمارهای آزمایشی و تنش گرمایی بر عملکرد جوجه‌های گوشتی در دوره‌های مختلف پرورش^۱

Table 3. Effect of experimental treatments and heat stress conditions on broiler chickens performance during different experimental period

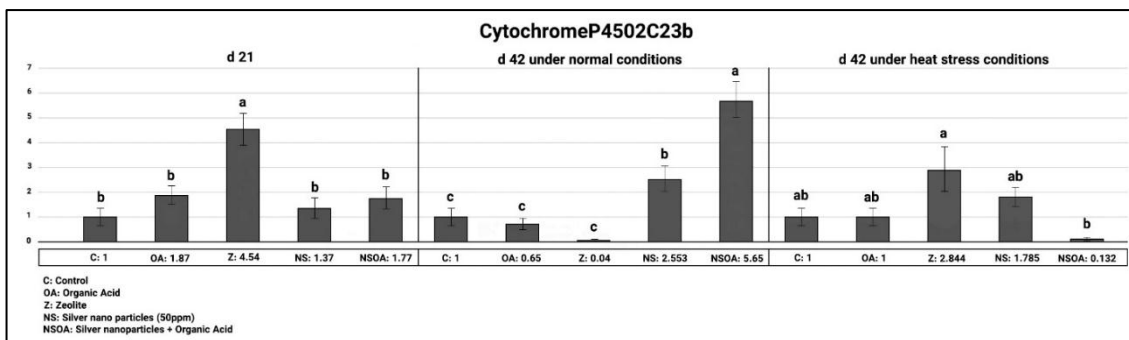
| اثرات اصلی | افزایش وزن (گرم) | | | مصرف خوراک (گرم) | | | ضریب تبدیل خوراک | | |
|--------------------------------|------------------|-------------|----------------|------------------|----------------------|----------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | آغازین (۱-۲۱) | رشد (۲۲-۴۲) | کل دوره (۱-۴۲) | آغازین (۱-۲۱) | رشد (۲۲-۴۲) | کل دوره (۱-۴۲) | آغازین (۱-۲۱) | رشد (۲۲-۴۲) | کل دوره (۱-۴۲) |
| تیمارهای آزمایشی | | | | | | | | | |
| C | ۷۰۲/۷۳ | ۱۶۴۵/۶۴ | ۲۳۴۸/۳۷ | ۱۱۸۵/۰۹ | ۳۴۹۷/۴۴ | ۴۶۸۹/۸۳ | ۱/۶۸ | ۲/۱۲ | ۲/۰۸ |
| Z | ۶۸۴/۵۴ | ۱۶۲۴/۳۷ | ۲۳۰۸/۹۴ | ۱۱۵۵/۵۶ | ۳۴۶۲/۰۳ | ۴۶۱۷/۵۹ | ۱/۶۹ | ۲/۱۲ | ۱/۹۹ |
| OA | ۶۹۹/۲۱ | ۱۶۱۵/۳۹ | ۲۳۱۴/۶۰ | ۱۱۸۷/۳۸ | ۳۴۲۰/۱۶ | ۴۶۱۵/۹۵ | ۱/۷۰ | ۲/۱۲ | ۲/۰۴ |
| NS | ۶۸۱/۰۹ | ۱۵۹۵/۴۴ | ۲۳۰۵/۸۱ | ۱۱۷۹/۲۶ | ۳۴۷۹/۳۴ | ۴۶۵۸/۶۰ | ۱/۷۲ | ۲/۲۰ | ۲/۰۵ |
| NSOA | ۶۸۶/۱۱ | ۱۵۴۹/۶۱ | ۲۲۲۵/۷۳ | ۱۱۶۹/۴۲ | ۳۳۴۵/۹۸ | ۴۵۱۵/۴ | ۱/۷۰ | ۲/۱۷ | ۲/۰۲ |
| خطای استاندارد میانگین | ۱۴/۶۱ | ۲۳/۱۰ | ۳۱/۲۱ | ۲۱/۸۹ | ۴۵/۳۷ | ۶۲/۳۶ | -۰/۰۲ | -۰/۰۲ | -۰/۰۲ |
| تنش گرمایی | | | | | | | | | |
| شرایط نرمال | ۶۹۲/۲۹ | ۱۶۳۶/۲۲ | ۲۳۴۱/۶۵ | ۱۱۴۷/۴۵ | ۳۵۵۶/۷۴ ^a | ۴۶۹۸/۱۱ ^a | ۱/۶۵ | ۲/۱۷ ^b | ۲/۰۱ ^b |
| تحت تنش گرمایی | ۶۷۳/۲۴ | ۱۵۵۲/۴۳ | ۲۲۸۲/۷۳ | ۱۲۰۳/۲۴ | ۳۲۲۵/۲۴ ^b | ۴۴۲۸/۴۸ ^b | ۱/۷۸ | ۲/۲۶ ^a | ۱/۹۶ ^a |
| خطای استاندارد میانگین | ۱۷/۴۲ | ۲۷/۸۲ | ۴۱/۹۲ | ۱۸/۳۴ | ۴۷/۰۲ | ۶۹/۱۳ | -۰/۰۲ | -۰/۰۳ | -۰/۰۲ |
| سطح احتمال | | | | | | | | | |
| اثر تیمار آزمایشی | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| اثر تنش گرمایی | ns | ns | ns | ns | * | * | ns | * | * |
| اثر تیمار آزمایشی × تنش گرمایی | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

a-b: تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون معنی‌دار است ($p < 0.05$). * معنی‌دار ($p < 0.05$). ns: غیرمعنی‌دار ($p > 0.05$).

C: جیره پایه، Z: جیره پایه حاوی یک درصد زئولیت، NS: جیره پایه حاوی ۱ درصد زئولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانوذرات نقره، OA: جیره پایه حاوی ۰/۱۵ درصد اسید ارگانیک، NSOA: جیره پایه حاوی ۱ درصد زئولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانوذرات نقره و ۰/۱۵ درصد اسید ارگانیک. ^۱ جوجه‌ها از روز ۳۵ دوره پرورش تا روز ۴۲ به مدت ۴ ساعت تحت تنش گرمایی $34 \pm 1^\circ\text{C}$ قرار گرفته بودند.



شکل ۳- مقدار بیان ژن CYP2C18 در روز ۲۱، ۴۲ بدون تنش گرمایی و روز ۴۲ دوره پرورش با اعمال تنش گرمایی
Figure 3. Expression of CYP2C18 on d 21, d 42 under normal conditions and d 42 under heat stress conditions



شکل ۴- مقدار بیان ژن CYP2C23b در روز ۲۱، ۴۲ بدون تنش گرمایی و روز ۴۲ دوره پرورش با اعمال تنش گرمایی
Figure 4. Expression of CYP2C23b on d 21, d 42 under normal conditions and d 42 under heat stress conditions

یافته است (۱۳). بیان شده است که افزایش بیان ژن سیتوکروم P450 به‌عنوان زیست‌نشانگری در طی متابولیسم مواد زنبوبیوتیک و متابولیسم مواد دارویی در سلول‌های جگر جوجه‌های گوشتی در نظر گرفته می‌شود (۳۵، ۳۲، ۸). همچنین تحقیقات دیگری بیانگر این هستند که جوجه‌های گوشتی قرار گرفته در معرض سموم افزایش بیان سیتوکروم P450 را نیز داشتند (۳۱، ۱۱).

همچنین قابل ذکر است که ایزوفرم CYP2C45 بررسی شده در مقاله حاضر براساس اطلاعات سایت NCBI تغییر نام داده و از این پس با نام CYP2C18 شناسایی می‌گردد و هردو ایزوفرم دارای توالی یکسان و شماره دسترسی یکسان نیز می‌باشند. بنابراین ایزوفرم CYP2C45 موجود در مقالات با نام قبلی این ژن منتشر شده است (۹).

براساس نتایج به دست آمده از تحقیق دیگری از بین تمامی خانواده‌ی گسترده سیتوکروم P450، خانواده CYP2C دارای بالاترین مقدار بیان و همچنین مهم‌ترین گروه مقابله‌کننده با مواد زنبوبیوتیک و مواد شیمیایی خارجی تهدیدکننده‌ی سلول‌ها می‌باشند. از سوی دیگر از بین تمامی ایزوفرم‌هایی که در mRNA سلول‌های جوجه‌های گوشتی از ژن سیتوکروم P450 بیان می‌گردند، ایزوفرم CYP2C18 دارای بیش‌ترین مقدار بیان در مقایسه با سایر ایزوفرم‌ها است. علاوه بر این اولین ایزوفرم فعال شده در اثر حضور مواد زنبوبیوتیک و شیمیایی خارجی در مقایسه با دیگر ایزوفرم‌های خانواده CYP2C در سلول‌هاست (۳۴). همچنین افزایش بیان قابل توجهی از سطوح سیتوکروم P450 در جوجه‌های قرار گرفته در معرض فنوباریتال گزارش شده است (۲). همچنین در طی پژوهش انجام شده گزارش شده است که در بین تمامی پرندگان مورد بررسی، تنها جوجه‌ها دارای دو ایزوفرم از ژن CYP2C23 بودند که شامل CYP2C23b و CYP2C23a می‌باشد. از سوی دیگر بیان کردند هنگامی که از ژن‌های خانواده CYP2C به‌عنوان نشانگری برای وجود آلودگی در سطح سلول‌های جگر استفاده می‌شود در صورتی که سطح مواد زنبوبیوتیک و مواد شیمیایی خارجی در جیره زیاد نباشد سطح بیان ایزوفرم CYP2C18 در مقایسه با ایزوفرم‌های CYP2C23a و CYP2C23b افزایش معنی‌داری داشته است و با زیاد شدن سطوح مواد زنبوبیوتیک و مواد شیمیایی خارجی در جیره افزایش معنی‌داری در بیان

گزارش‌های فراوانی در مورد اثر تنش گرمایی بر مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک وجود دارد. تنش گرمایی یکی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر عملکرد تولیدی جوجه‌های گوشتی می‌باشند. در شرایط تنش گرمایی به‌علت تأثیر گرما، طیور مصرف خوراک را کاهش داده تا گرمای کمتری در بدن تولید گردد و در نتیجه توانایی مقابله با تنش گرمایی در بدن افزایش یابد. گزارش شده است که تنش گرمایی موجب کاهش مصرف خوراک، کاهش وزن بدن و افزایش ضریب تبدیل در جوجه‌های گوشتی در روز ۴۲ دوره پرورش شده است (۲۱). ضریب تبدیل غذایی مهم‌ترین معیار اقتصادی در ارزیابی سودآوری گله‌های پرورش جوجه‌های گوشتی است (۳۰).

پاسخ بیولوژیک موجودات به استرس و آلودگی‌ها از سطح مولکولی آغاز شده و با افزایش زمان مواجهه به‌ترتیب تغییرات در سطح بیوشیمیایی، سلولی، بافتی، دستگاه و موجود توسعه می‌یابد. از این رو از این تغییرات می‌توان به‌عنوان نشانگرهای زیستی به‌منظور بررسی وجود آلودگی‌ها استفاده نمود (۲۲). از آنجایی که تغییرات مولکولی به‌عنوان اولین تغییرات قابل اندازه‌گیری در رابطه با اثرات مواد تنش‌زا در موجودات تلقی می‌گردند، بدین منظور سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 به‌عنوان اولین سیستم پاسخ به‌وجود و حضور آلودگی در سلول‌ها و به‌عنوان زیست‌نشانگر آلودگی در بافت‌ها و سلول‌ها است. این پروتئین در شرایط بدون تنش نیز بیان می‌شود ولی در معرض آلودگی‌های مختلف از جمله فلزات سنگین مقدار بیان ژن آن تغییر می‌نماید که این تغییرات بیان می‌تواند به‌عنوان بیومارکر آلودگی محسوب شود (۲۸). تعداد مشخصی از سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 در سلول‌های نرمال در تنظیم سوخت و ساز فعالیت دارند. اهمیت این موضوع زمانی است که سلول‌های قرار گرفته در معرض سموم، آلودگی‌ها و یا تنش‌های محیطی و فیزیولوژیکی دارای سطوح بالاتری از سیتوکروم P450 هستند. افزایش مقدار بیان ژن‌های سیتوکروم P450 در شرایط تنش‌های ایجاد شده یا آلودگی‌ها می‌تواند بیان‌کننده اهمیت نقش آن‌ها در کاتابولیسم مواد بیگانه یا آلودگی‌های موجود در بافت یا سلول‌ها باشد (۱۹ و ۳۳ و ۳۶). مطالعات نشان‌دهنده این است که ماهیانی که در معرض کلرید کادمیوم قرار گرفتند، سطوح بیان ژن سیتوکروم P450 به‌عنوان زیست نشانگر فلز سنگین در جگر افزایش

براساس نتایج حاصل از این پژوهش مکمل کلینوپتیلولیت و نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت افزایش‌دهنده سطوح بیان ژن سیتوکروم P450 در هر دو ایزوفرم CYP2C18 و CYP2C23b می‌باشد و هر دو ایزوفرم به‌عنوان زیست‌نشانگر آلودگی و مواد زنبوبیوتیک در سطح سلول‌هاست و تفاوت بیان این ایزوفرم‌ها با اعمال تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی مشاهده شد. همچنین ایزوفرم CYP2C18 به‌عنوان بیش‌ترین ایزوفرم بیان شده و القا شده در جوجه‌های گوشتی بود است. کلینوپتیلولیت و نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت به‌عنوان مواد زنبوبیوتیک و ماده‌ی شیمیایی با منشأ خارجی در بدن تلقی شده و پاسخ سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 را موجب شده است و می‌تواند به‌عنوان نشانگر حضور آلودگی در سطح مولکولی در صنایع طیور مورد توجه قرار گیرد. این در حالی که این پاسخ در تیمار اسیدارگانیک به‌عنوان اسید آلی در بدن مشاهده نشده است.

تشکر و قدردانی

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

ایزوفرم CYP2C23b در مقایسه با تیمارهای CYP2C23a و CYP2C18 مشاهده شد (۳۴).

بدین ترتیب نتایج آزمایش‌های حاضر نشان‌دهنده این است که سطح بیان ژن سیتوکروم P450 با ایزوفرم CYP2C18 و CYP2C23b در روز ۲۱ دوره پرورش با تیمار کلینوپتیلولیت (Z) و روز ۴۲ دوره پرورش بدون اعمال تنش گرمایی در تیمار نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت مکمل شده با اسیدارگانیک (NSOA) در سلول‌های جگر جوجه‌های گوشتی در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشته است ($P < 0.05$) و اختلافی در بین تیمارهای افزایش‌دهنده بیان ژن سیتوکروم P450 در دو ایزوفرم مورد بررسی در روز ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش بدون اعمال تنش گرمایی مشاهده نشد و به همان صورت که در روز ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش بدون اعمال تنش گرمایی شاهد افزایش بیان سطح CYP2C18 در تیمار Z و NSOA بوده‌ایم، افزایش سطح بیان ایزوفرم CYP2C23b نیز در این دو تیمار بوده است. درحالی که در روز ۴۲ با اعمال تنش گرمایی افزایش بیان بسیار زیاد ژن CYP2C18 در تیمار نانوذرات نقره پوشش داده شده بر کلینوپتیلولیت (NS) در جگر جوجه‌های گوشتی در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد ($p < 0.05$) اما اختلاف معنی‌داری در سطوح بیان ایزوفرم CYP2C23b در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده نشد.

منابع

- Adil, S., A. Banday, G. Ahmad Bhat, M. Salahuddin and S. Shanaz. 2011. Response of broiler chicken to dietary supplementation of organic acids. *Journal of Central European Agriculture*, 12: 498-508.
- Baader, M., C. Gnerre, J.J. Stegeman and U.A. Meyer. 2002. Transcriptional activation of cytochrome P450 CYP2C45 by drugs is mediated by the chicken xenobiotic receptor (CXR) interacting with a phenobarbital response enhancer unit. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 15647-15653.
- Bhatt, A.N., R. Mathur, A. Farooque, A. Verma and B.S. Dwarakanath. 2010. Cancer biomarkers- Current perspectives. *Indian Journal of Medical Research*, 132: 129-149.
- Boschetto, D.L., L. Lerin, R. Cansian, S.B.C. Pergher and M.D. Luccio. 2012. Preparation and antimicrobial activity of polyethylene composite films with silver exchanged zeolite-Y. *Chemical Engineering Journal*, 204: 210-216.
- Cajaraville, M.P., M.J. Bebianno, J. Blasco, C. Porte, C. Sarasquete and A. Viarengo. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environment of the Iberian Peninsula: A practical approach. *Science and the Total Environment*, 427: 295-311.
- Cramer, S., S. Tacke, J. Bornhorst, G. Klingauf, T. Schwerdtle and H.J. Galla. 2014. The influence of silver nanoparticles on the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro. *Journal Nanomedicine and Nanotechnology*, 5: 1-12.
- Guo, M., Y. Sun, Y. Zhang, S. Bughio, X. Dai, W. Ren and L. Wang. 2014. *E. coli* infection modulates the pharmacokinetics of oral enrofloxacin by targeting p-glycoprotein in small intestine and CYP450 3A in liver and kidney of broilers. *PLoS One*, 31: e87781.
- Head, J.A., J. O'Brien and S.W. Kennedy. 2006. Exposure to 3, 3', 4, 4', 5'- pentachlorobiphenyl during embryonic development has a minimal effect on the cytochrome P4501A response to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cultured chicken embryo hepatocytes. *Environmental Toxicology Chemistry*, 25: 2981-2989.
- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_001001752.1
- Hyuck, S.J., J. Hojh, J.D. Park, J. Ukyoon, D.S. Kim and K. Soonjean. 2009. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Fundamental and Applied Toxicology*, 108: 452-461.
- Hu, S.X. 2013. Effect of age on hepatic cytochrome P450 of Ross 708 broiler chickens. *Poultry Science*, 92: 1283-1291.
- Jacob, S.J.P., V.L.S. Prasad, S. Sivasankar and P. Muralidharan. 2017. Biosynthesis of silver nanoparticles using dried fruit extract of *Ficus carica*- Screening for its anticancer activity and toxicity in animal models. *Food and Chemical Toxicology*, 109: 951-956.

13. Kim, J.H., S. Raisuddin, J.S. Ki, J.S. Lee and K.N. Han. 2008. Molecular cloning and bnaaphthoflavone- induced expression of a cytochrome P450 1A (CYP1A) gene from an anadromous river Pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Marine Pollution Bulletin*, 57: 433-440.
14. Li, Y., Q. Zheng, C. Bao, S. Li, W. Guo, J. Zhao, D. Chen, J. Gu, X. He and S. Huang. 2015. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell Research*, 25: 981-984.
15. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *Method*, 25: 402-408.
16. Livingstone, D.R. 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 57: 195-211.
17. Maity, D.M., M.R. Mollick, D. Mondal, B. Bhowmick, M.K. Bain, K. Bankura, J. Sarkar, K. Acharya and D. Chattopadhyay. 2012. Synthesis of methylcellulose-silver nanocomposite and investigation of mechanical and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, 90: 1818-1825.
18. Monteiro-Riviere, N.A. and C.L. Tran. 2007. *Nanotoxicology: Characterization, dosing and health effects*. Taylor and Francis.
19. Nelson, D.R. 2011. Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1814: 14-18.
20. Nikolakakis, I., V. Dotas, A. Kargopoulos, L. Hatzizisi, D. Dotas and Z. Ampas. 2013. Effect of natural zeolite (clinoptilolite) on the performance and litter quality of broiler chickens. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37: 682-686.
21. Quinteiro-Filho, W.M., A.V.S. Gomes, M.L. Pinheiro, A. Ribeiro, V. Ferraz-de-Paula, C.S. Astolfi-Ferreira, A.J.P. Ferreira and J. Palermo-Neto. 2012. Heat stress impairs performance and induces intestinal inflammation in broiler chickens infected with *Salmonella enteritidis*. *Avian Pathology*, 41: 421-427.
22. Ribeiro, C.V., L. Belger, E. Pelletier and C. Rouleau. 2002. Histopathological evidence of inorganic mercury and methylmercury toxicity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Research*, 90: 217-225.
23. Safaeikatouli, M., Y. Jafariahangari and A. Baharlouei. 2011. An evaluation on the effects of dietary kaolin and zeolite on broilers blood parameters, T4, TSH and growth hormones. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10: 233-237.
24. Safari, R., H. Kolangi Miandareh and A. Jafer Nodeh. 2014. Investigating P450 gene expression in liver and gill of Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) in exposure to CdCl₂ bstract. *Journal of Applied Ichthyological Research*, 2: 43-58.
25. Sambrook, J. and D.W. Russel. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, California, Academic Press, 94-98.
26. Sepulveda, M.S. 2005. *Biomarkers of exposure and effects*. Molecular biomarkers. Perdue University.
27. Shun, Y.M., Y.H. Wen, C.Y. Yong and G.S. Jian. 2003. Two benzyl dihydroflavones from *phellinus igniarius*. *Chinese Chemical Letters*, 14: 810-813.
28. Siroka, Z. and J. Drastichova. 2004. Biochemical markers of aquatic environment contamination cytochrome P450 in fish. *Journal of Acta Veterinaria Brno*, 73: 123-132.
29. Softeland, L., E. Holen and P.A. Olsvik. 2010. Toxicological application of primary hepatocyte cellcultures of Atlantic cod (*Gadus morhua*), effects of BNF, PCDD and Cd. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 151: 401-411.
30. Sohail, M.U., M.E. Hume, J.A. Byrd, D.J. Nisbet, A. Ijaz, A. Sohail, M.Z. Shabbir and H. Rehman. 2012. Effect of supplementation of prebiotic mannan-oligosaccharides and probiotic mixture on growth performance of broilers subjected to chronic heat stress. *Poultry Science*, 91: 2235-2240.
31. Tabrez, S. and M. Ahmad. 2012. Cytochrome P450 system as potential biomarkers of certain toxicants: comparison between plant and animal models. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185: 2977-2987.
32. Temesvari, M., L. Kobori, J. Paulik, E. Sarvary, A. Belic and K. Monostory. 2012. Estimation of Drug-Metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341: 294-305.
33. Uno, T., M. Ishizuka and T. Itakura. 2012. Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34: 1-13.
34. Watanabe, K.P., Y.K. Kawai, Y. Ikenaka, M. Kawata, S. Ikushiro, T. Sakaki and M. Ishizuka. 2013. Avian cytochrome P450 (CYP) 1-3 family genes: isoforms, evolutionary relationships, and mRNA expression in chicken liver. *PLoS ONE*, 8: e75689.
35. Zanger, U.M., M. Turpeinen, K. Klein and M. Schwab. 2008. Functional pharmacogenetics/ genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392: 1093-1108.
36. Zhang, L.L., J.R. Zhang, Z.G. Yu, J. Zhao, F. Mo and S.X. Jiang. 2010. Effects of ionophores on liver CYP1A and 3A in male broilers. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 33: 551-557.

Investigation of Performance and Comparison of Cytochrome P450 Isoforms in Broiler Chickens Liver Fed Silver Nanoparticles Coated on Clinoptilolite

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

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

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

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

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

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

Received: July 12, 2020 Accepted: December 31, 2020

Abstract

In order to evaluate the effect of silver nanoparticles coated by clinoptilolite on cytochrome P450 gene expression in broiler chicken's liver an experiment consisting of (1) control diet, (2) clinoptilolite, (3) clinoptilolite coated with silver nanoparticles, (4) organic acids and (5) clinoptilolite coated with silver nanoparticles and organic acids in normal and heat stress conditions was designed. Liver biopsy was obtained on 21 and 42 days of experiment. Results of this study demonstrated there were no interaction between experimental treatments and heat stress conditions in chickens. As well as the expression levels of both isoforms of CYP450 gene in clinoptilolite treatment on day 21 and silver nanoparticles coated on clinoptilolite with organic acid treatment on day 42 of experiment in normal conditions, were significantly increased in comparison with control treatment (C) in chicken liver tissue ($P < 0.05$). Level of CYP2C18 on day 42 of experiment in heat stress condition in silver nanoparticles coated on clinoptilolite treatment was significantly increased in comparison with control (C) treatment ($P < 0.05$). Whereas, the level of CYP2C23b gene expression on day 42 of experiment was not significantly different with control treatments ($P > 0.05$) in heat stress conditions. In conclusion, results showed that the expression level of CYP2C18 isoform in liver tissue of broiler chickens was higher in comparison with CYP2C23b isoform. The liver, as a metabolism organism in the body, identified clinoptilolite and silver nanoparticles as inorganic, chemical and exogenous substances and increased the expression level of cytochrome P450 gene acts as a biomarker for the existence of exogenous and inorganic substances in the body.

Keywords: Broiler, Clinoptilolite, Cytochrome P450, Liver, Silver nanoparticles