Research on Animal Production, Vol. 14, No. 40, Summer 2023 p: 44-51

"Research Paper"

# Evaluation of Metallothionein Gene as a Biomarker in the Liver of Broilers Fed Silver Nanoparticles Coated on Zeolite in Heat Stress Conditions

**Mahmoud Taheri Nesab[1], Seyed Reza Hashemi[2], Seyede Sanaz Ramazanpour[3], Sharif Rostami[4] and Elnaz Arabian[5]**

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 Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
4- Ph.D. Department of Animal Physiology, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
5- Ph.D. Student, Department of Animal Physiology, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
Received: 28 December, 2021 Accepted: 13 March, 2023

## Extended Abstract

**Introduction and Objective:** Due to the ban on the use of antibiotics as a growth promoter in the broiler industry since 2007, researchers are always looking for a suitable alternative to antibiotics. Silver nanoparticles with antibacterial, antifungal and antiviral properties were used as one of the proposed alternatives to antibiotics and the purpose of this study was to evaluate the effect of coated silver nanoparticles on zeolite on the expression of metallothionein gene as a biomarker of heavy metals in the liver cells of broiler chickens.

**Materials and methods:** In this experiment, Ross 308 broiler chickens were allocated to five experimental diets: control or basal diet, basal diet supplemented by 1% zeolite, basal diet supplemented by 1% zeolite coated with 0.5% nanosilver, basal diet supplemented by 0.15% organic acid and basal diet supplemented by 1% zeolite coated with 0.5% nanosilver and 0.15% organic acid were designed under normal and heat stress conditions. Liver tissue samples were collected on days 21 and 42 of rearing period. In order to perform gene expression studies, RNA was extracted and its quality was evaluated by electrophoresis and after purification, cDNA synthesis was performed. In the following the polymerase chain reaction was performed for tissue cDNA samples for metallothionein gene and also betaactin as reference gene.

**Results:** The results showed a significant increase in expression of metallothionein gene in the liver tissue of broilers in zeolite treatment on d 21 ($p<0.05$). Also, on d 42 of rearing period without heat stress conditions, a significant increase in metallothionein gene expression were observed on silver nanoparticles coated on zeolite and 0.15% organic acid (NSOA) treatment. Also, on d 42 under heat stress conditions the results showed a significant increase in zeolite (Z) and silver nanoparticles coated on zeolite (NS) treatments in liver tissue in comparison with control treatment ($p<0.05$).

**Conclusion:** The results of present study indicated that metallothionein gene could be considered as a reliable heavy metal biomarker under normal and heat stress conditions in broiler chickens.

**Keywords**: Broiler, Biomarker, Liver, Metallothionein, Silver nanoparticles

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.40.4.7 ]
[ DOI: 10.61186/rap.14.40.44 ]

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

"مقاله پژوهشی"

# بررسی بیان نسبی ژن متالوتیونین به‌عنوان نشانگر زیستی آلودگی در کبد جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت در شرایط تنش گرمایی

محمود طاهری نسب[۱]، سیّد رضا هاشمی[۲]، سیده ساناز رمضانپور[۳]، شریف رستمی[۴] و الناز عربیان[۵]

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 اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۴- دانش‌آموخته دکتری گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۵- دانشجوی دکتری گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۲
صفحه: ۴۴ تا ۵۱

## چکیده مبسوط

**مقدمه و هدف:** با توجه به ممنوعیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان یک افزودنی محرک رشد از سال ۲۰۰۶ درصنعت پرورش جوجه‌های گوشتی، محققان همواره به دنبال جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. نانوذرات نقره با توجه به ویژگی‌های ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی آن‌ها به عنوان یکی از جایگزین‌های پیشنهادی برای آنتی‌بیوتیک‌ها مورد توجه قرار گرفته است و هدف از انجام این آزمایش بررسی اثر نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت بر میزان بیان ژن متالوتیونین به‌عنوان زیست نشانگر فلزات سنگین، در سلول‌های بافت کبد جوجه‌های گوشتی بود.

**مواد و روش‌ها:** برای انجام این تحقیق آزمایشی شامل تیمار شاهد یا کنترل، تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد زئولیت، تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد زئولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانونقره، تیمار شاهد مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسید ارگانیک و تیمار شاهد مکمل شده با ۱ درصد زئولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانونقره و ۰/۱۵ درصد اسید ارگانیک، در شرایط اعمال تنش گرمایی و بدون تنش گرمایی طراحی شد. نمونه‌برداری از بافت کبد در روزهای ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش انجام و به منظور انجام مطالعات بیان ژن، RNA استخراج و با استفاده از دستگاه الکتروفورز کیفیت آن بررسی شد و پس خالص‌سازی، سنتز cDNA صورت گرفت. در ادامه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای نمونه‌های cDNA حاصل از بافت‌ها، برای ژن متالوتیونین و همچنین بتااکتین به عنوان ژن مرجع، انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از این آزمایش در روز ۲۱ دوره پرورش، نشان دهنده افزایش بیان معنی‌دار این ژن در بافت کبد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمار زئولیت (Z بود ($p<۰/۰۵$). بیان ژن متالوتیونین در بافت کبد جوجه‌های تغذیه شده با تیمار نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت مکمل شده با ۱ درصد اسید ارگانیک در روز ۴۲ دوره پرورش بدون تنش گرمایی و همچنین در روز ۴۲ دوره پرورش با اعمال تنش گرمایی افزایش بیان معنی‌داری در ژن متالوتیونین در جوجه‌های تغذیه شده با تیمار نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت (NS) و تیمار زئولیت مشاهده شد ($p<۰/۰۵$).

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از پژوهش حاضر بیان می‌کند که ژن متالوتیونین می‌تواند به‌عنوان یک زیست نشانگر قابل اعتماد فلز سنگین در شرایط نرمال و تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی در نظر گرفته شود.

**واژه‌های کلیدی:** جوجه گوشتی، زیست نشانگر، کبد، متالوتیونین، نانوذرات نقره

## مقدمه

امروزه برای دستیابی به تولید بالا با کمترین هزینه از افزودنی‌های خوراکی در صنعت طیور استفاده می‌شود (۵). از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان افزودنی‌های خوراکی با دوز کمتر که معمولاً از یک پنجم تا یک دهم دوز درمان می‌باشد، برای ممانعت از رشد جمعیت میکروبی بیماری‌زا موجود در دستگاه گوارش و بهبود رشد و عملکرد دام و طیور استفاده می‌شد (۷). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در طیور نگرانی‌هایی را در مورد ظهور و گسترش احتمالی باکتری‌های مقاوم ایجاد کرد (۲۹،۳۲). برای محدود کردن اثرات منفی آنتی‌بیوتیک‌ها، بسیاری از کشورها استفاده از آنها به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌هایی که برای اهداف غیر درمانی استفاده می‌شدند را ممنوع کردند. افزایش شیوع بیماری‌های باکتریایی در دهه اخیر و افزایش مقاومت باکتریایی در برابر مصرف آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم، نیاز به استفاده از روشی که مکمل و یا حتی جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها باشند را ضروری‌تر کرده است (۴۲). امروزه شناسایی، سنتز و کاربرد نانومواد به یک استراتژی جدید و شایع در کنترل فعالیت باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک تبدیل شده است (۱۰). نانوذرات پلی بین حالت حجیم مواد و حالت اتمی یا مولکولی می‌باشند و به‌عنوان یکی از جایگزین‌های آنتی‌بیوتیک‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند (۲۳). در میان نانوذرات متنوع، نقره به علت ویژگی‌های منحصر به فرد خود با توجه به خصوصیات ضدباکتریایی، ضدقارچی، بو زدایی و ضدویروسی که دارد جایگاه خاصی را به خود اختصاص داده است (۳۴). نانوذرات نقره احتمالاً با ایجاد اختلال در تکثیر و سیستم تنفسی باکتری‌ها باعث ایجاد اثرات ضدباکتریایی می‌گردند (۱۴،۱۸،۲۷). بررسی اثرات سطوح ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت در تغذیه جوجه‌های گوشتی نشان داد استفاده از زئولیت پوشش داده شده با نانوذرات نقره ۰/۵ درصد سبب افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز سرم خون و همچنین افزایش درصد نسبی وزن عضله سینه می‌شود (۱۱). از مهم‌ترین دستاوردهای جایگزینی نانونقره در بخش طیور می‌توان به مواردی هم‌چون کاهش میزان تلفات تا بیش از ۷۰ درصد، کاهش چربی و کلسترول گوشت مرغ، افزایش پروتئین‌ها، افزایش درصد وزنی به نسبت میزان خوراک مصرف شده، تولید گوشت طبیعی با بهترین کیفیت و کمیت اشاره کرد (۴،۲۲). در این خصوص نیز گزارش شده است که

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.40.4.7 ]
[ DOI: 10.61186/rap.14.40.44 ]

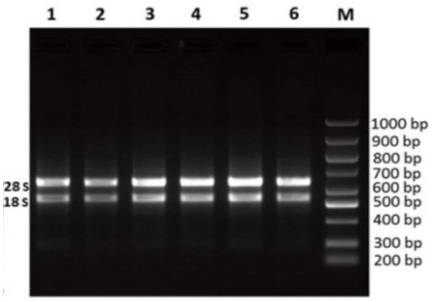
میزان ۵۰ قسمت در میلیون نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت (۵۰ ppm) در جیره جوجه‌های گوشتی منجر به ضایعات بافت کبد و کلیه نمی‌شود (۴۳) نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت (۵۰ ppm) ، سبب بهبود معنی‌دار ضریب تبدیل غذایی در جوجه‌های گوشتی می‌شود (۱۲). با توجه به تحقیقات صورت گرفته در زمینه نانوذرات نقره به‌عنوان مکمل خوراکی در جیره طیور صنعتی، تاکنون مطالعات کمی در زمینه اثرات استفاده از نانو ذرات نقره به‌عنوان یک افزودنی به جیره طیور در سطح مولکولی انجام گرفته است. برخی مطالعات نشان می‌دهند که تجمع نانو ذرات نقره در کبد می‌تواند سمیت سلولی را از طریق آسیب اُکسایشی سلولی القا نماید (۲۶). نانو ذرات نقره می‌توانند به‌طور مستقیم بر روی فعالیت طبیعی سلول‌های بدن تأثیر بگذارند و باعث اختلال در عملکرد اندام‌های بدن شوند (۱). نانوذرات نقره از طریق تولید رادیکال آزاد، سبب تخریب سلول‌های کبدی و افزایش میزان ATP در خون می‌شوند (۱۶). برای بررسی آلودگی یک ماده شیمیایی در سطح سلولی می‌توان از نشانگر زیستی جهت ارزیابی پاسخ یا تغییر حاصل شده در اجزای بیولوژیک استفاده کرد (۶). به‌طور کلی، مولکول بیوشیمیایی در سلول و یا بافت زنده که تغییر فیزیولوژیکی را نسبت به نمونه کنترل نشان می‌دهد و قادر به اندازه‌گیری و آشکار شدن باشد را بیومارکر یا زیست‌نشانگر گویند (۲۸). در میان اکثر زیست نشانگرهای بیوشیمیایی که برای ارزیابی آلودگی‌ها استفاده می‌شوند، متالوتیونین‌ها (MTs) ابزارهای بسیار مهم و مفیدی به‌عنوان شاخص‌های بیوشیمیایی به ویژه برای فلزات به شمار می‌روند (۱۹). همچنین گزارش شده است که غلظت بالای فلزات سنگین در آب، باعث افزایش بیان نسبی ژن متالوتیونین در کبد ماهی می‌شود (۳۵). مقاومت در برابر سمیت فلزات سنگین در ماهی‌ها به توانایی آنها در بیان بیش از حد ژن‌های متالوتیونین پس از قرار گرفتن در معرض یون‌های فلزی مربوط می‌شود (۲۱). متالوتیونین‌ها نقش مهمی در سم‌زدایی و حذف رادیکال‌های آزاد دارند (۴۴).

متالوتیونین‌ها به خانواده‌ای از پروتئین‌های با وزن مولکولی پایین (۶ تا ۷ کیلو دالتون) و با خاصیت متصل شونده به فلزات، تعلق دارند (۴۰). مهم‌ترین و اصلی‌ترین ویژگی متالوتیونین، محتوای سیستئین بسیار بالای آن است. این پروتئین به دلیل ظرفیت بالای ترکیب با اتم‌های فلزی که به گروه‌های SHدر اسیدهای آمینه سیستئین متصل شده و تشکیل خوشه‌های تیولات می‌دهد به‌عنوان مقصد نهایی برخی یون‌های فلزی شناخته می‌شود (۸). اندازه‌گیری میزان متالوتیونین به‌عنوان نشانگر زیستی شاخص می‌توان اطلاعاتی را در ارتباط با آلوده شدن موجود به فلزات و عملکرد بیولوژیک آن به دست آورد (۲۴). بنابراین مطالعه حاضر به‌منظور بررسی میزان بیان نسبی ژن متالوتیونین در بافت کبد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت انجام شد.

## مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در ایستگاه تحقیقات طیور دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی واقع در مزرعه آموزشی پژوهشی شماره ۱، به‌مدت ۴۲ روز با ۴۵۰ قطعه جوجه گوشتی یک روز سویه کاب ۵۰۰ (Cobb 500) در پنج تیمار و شش تکرار و در هر واحد آزمایشی ۱۵ قطعه انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱) تیمار شاهد (C)، ۲) تیمار شاهد مکمل شده با یک درصد زئولیت (z)، ۳) تیمار شاهد مکمل شده با ۱٪ زئولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانو نقره (NS)، ۴) تیمار شاهد مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسید ارگانیک (OA) و ۵) تیمار شاهد 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 ۱). به‌منظور تنش گرمایی، دمای سالن با استفاده از هیتر برقی روزانه به مدت چهار ساعت از ساعت ۱۲ الی ۱۶ در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید.

نمونه‌برداری در روزهای ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش، پس از کالبدشکافی از بافت کبد برای بررسی میزان بیان ژن متالوتیونین به‌عنوان بیومارکر زیستی فلزات سنگین انجام شد. بدین منظور 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 DNase I بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز استفاده گردید.




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

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.40.4.7 ]
[ DOI: 10.61186/rap.14.40.44 ]

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

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

| اجزای جیره (Ingredients) | جیره آغازین (Starter) (1–21) | جیره رشد (Grower) (22–42) |
|---|---|---|
| ذرت (Corn) | 53.7 | 59.96 |
| کنجاله سویا (Soybean meal) | 39.52 | 33.25 |
| روغن سویا (Soybean oil) | 3 | 3.41 |
| دی کلسیم فسفات (Dicalcium phosphate) | 1.47 | 1.09 |
| سنگ آهک (Limestone) | 1.19 | 1.29 |
| نمک (Salt) | 0.43 | 0.32 |
| مکمل ویتامینی (Vitamin premix) | 0.25 | 0.25 |
| مکمل معدنی (Mineral premix) | 0.25 | 0.25 |
| DL متیونین (DL-Methionine) | 0.13 | 0.05 |
| L لیزین (L-Lysine) | 0.06 | 0.13 |
| آنالیز مواد مغذی | | |
| انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری/کیلوگرم) (ME, Kcal/kg) | 2950 | 3050 |
| پروتئین خام (CP) (٪) | 21.2 | 19.06 |
| کلسیم (Calcium) (٪) | 0.92 | 0.86 |
| فسفر (Phosphor) (٪) | 0.41 | 0.33 |
| سدیم (Sodium) (٪) | 0.18 | 0.14 |
| لیزین (Lysine) (٪) | 1.01 | 0.95 |
| متیونین (Methionine) (٪) | 0.47 | 0.36 |
| سیستئین (Cystine) (٪) | 0.36 | 0.37 |
| آرژنین (Arginine) (٪) | 1.45 | 1.27 |
| ترئونین (Threonine) (٪) | 0.84 | 0.74 |

[۱] جیره پایه بر اساس راهنمای پرورش راس سویه ۳۰۸ تهیه شده است.
هر کیلوگرم خوراک حاوی: ویتامین A، 1500 IU؛ کوله کلسیفرول، ۲۰۰ IU؛ ویتامین E، 10 IU؛ ریبوفلاوین، ۳/۵ میلی‌گرم؛ پانتوتنیک اسید،۱۰ میلی‌گرم؛ نیاسین، ۳۰ میلی‌گرم؛ کولین کلرید، ۱۰۰۰میلی‌گرم؛ 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؛ کوبالامین، ۱۵ میکروگرم.
[1] The basic diet is prepared based on the breeding guide of Ross 308.
Each Kg of feed contains: vitamin A, 1500 IU; cholecalciferol, 200 IU; Vitamin E, 10 IU; riboflavin, 3.5 mg; pantothenic acid, 10 mg; Niacin, 30 mg; Choline chloride, 1000 mg; Biotin, 0.15 mg; folic acid, 0.5 mg; thiamine, 1.5 mg; pyridoxine, 0.3 mg; iron, 80 mg; zinc, 40 mg; Manganese, 60 mg; iodine, 0.18 mg; copper, 8 mg; Selenium, 0.15 mg; Cobalamin, 15 µg.

پس از آن، سنتز cDNA به‌عنوان الگوی اولیه از روی mRNA بالغ به‌عنوان الگو، با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس برای واکنش RT-PCR انجام گرفت. برای نرمال‌سازی نتایج q-RT-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 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. در این مرحله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای نمونه‌های cDNA حاصل از بافت کبد، برای ژن متالوتیونین 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta C_t$) برابر است با $\Delta C_t$ ژن هدف منهای $\Delta C_t$ کالیبراتور) محاسبه شد و این داده‌های حاصل از واکنش ($C_t$) با استفاده از نرم‌افزار Excel، به بیان نسبی ژن مورد نظر به ژن مرجع بتا اکتین تبدیل شد (۳۱). 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 دانکن در سطح احتمال ($p<۰.۰۵$) انجام گرفت.

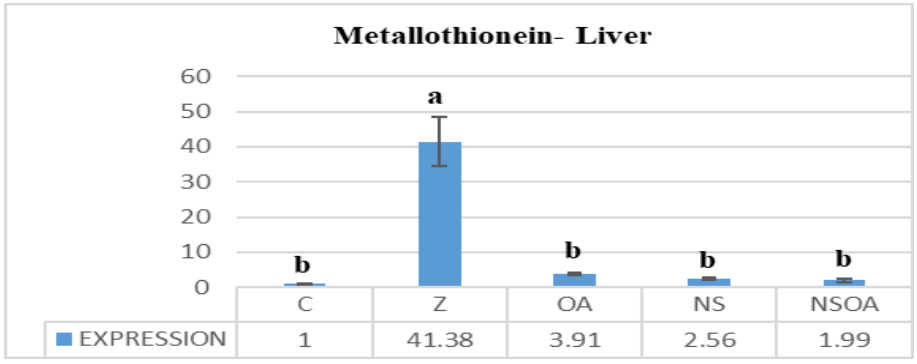
## نتایج و بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، در بین تیمارهای اعمال شده تنها تیمار زئولیت (Z) اثر افزایشی بر بیان ژن متالوتیونین در روز ۲۱ دوره پرورش (شکل ۲) در بافت کبد داشت ($p<۰/۰۵$) و سایر تیمارها تأثیری در افزایش بیان ژن متالوتیونین تأثیر معنی‌داری نداشتند ($p>۰/۰۵$). همچنین بررسی میزان بیان نسبی ژن متالوتیونین در روز ۴۲ دوره پرورش بدون اعمال تنش گرمایی (شکل ۳) حاکی از آن بود که تیمار نانو ذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت با مکمل اسید ارگانیک (NSOA)، دارای بیشترین میزان بیان نسبی ژن در سلول‌های بافت کبد بوده و تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارهای آزمایشی داشت ($p>۰/۰۵$). در روز ۴۲ دوره پرورش با اعمال تنش گرمایی (شکل ۴)، ارزیابی نتایج حاصل از بیان ژن مورد مطالعه بیانگر این بود که تیمارهای زئولیت (Z) و نانونقره پوشش داده شده بر زئولیت (NS) تفاوت معنی‌داری نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی داشتند و همچنین در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند ($p</۰۵$).

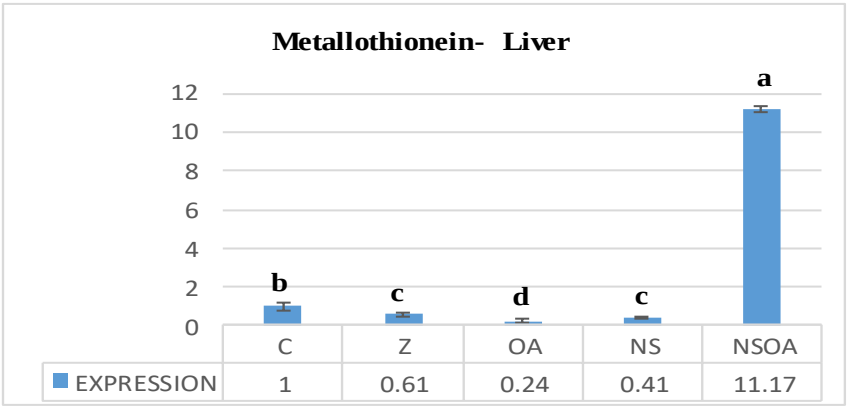
[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.40.4.7 ]
[ DOI: 10.61186/rap.14.40.44 ]

جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Real time-PCR
Table 2. The primer sequences used in relative quantitative real-time PCR (q-PCR)

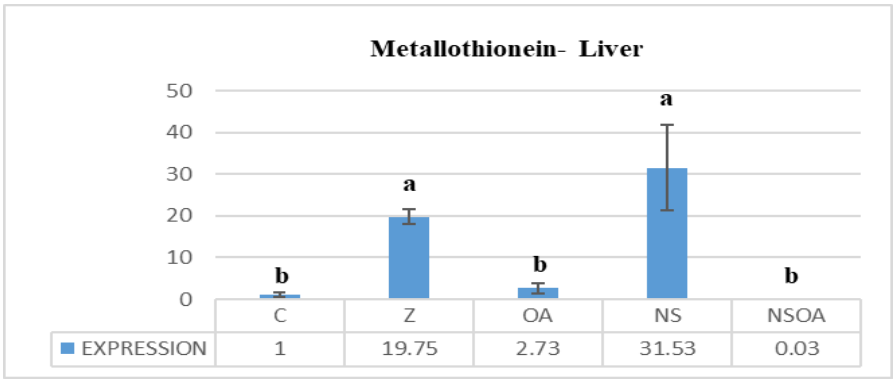
| نام آغازگر (Primer name) | توالی آغازگر (Primer sequence) | شماره دسترسی (Access number) |
|---|---|---|
| متالوتیونین Metallothionein | F: 5'- GCAACAACTGTGCCAAGGGC-3'<br>R: 5'- TTTCGTGGTCCCTGTCACCC-3' | NC_006098.5 |
| بتا-اکتین<br>β-actin | F: 5'- AAGTTACTCGCCTCTGTGAA-3'<br>R: 5'- CACATCTATCACTGGGGAAC-3' | NM_205518 |




شکل ۲- میزان بیان ژن متالوتیونین در روز ۲۱ دوره پرورش بدون تنش گرمایی در بافت کبد
Figure 2. Expression of metallotionein gene on 21 d of experiment without heat stress conditions in liver tissue




شکل ۳- میزان بیان ژن متالوتیونین در روز ۴۲ دوره پرورش بدون تنش گرمایی در بافت کبد
Figure 3. Expression of metallotionein gene on 42 d of experiment without heat stress conditions in liver tissue




شکل ۴- میزان بیان ژن متالوتیونین در روز ۴۲ دوره پرورش با اعمال تنش گرمایی در بافت کبد
Figure 4. Expression of metallotionein gene on 42 d of experiment under heat stress conditions in liver tissue

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.40.4.7 ]
[ DOI: 10.61186/rap.14.40.44 ]

آزمایش حاضر به‌منظور بررسی این ژن در بافت کبد انجام گردید و بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق، سطح بیان ژن متالوتیونین در سلول‌های کبدی در جوجه‌های تغذیه شده با تیمار زئولیت (Z) در روز ۲۱ دوره پرورش و روز ۴۲ با و بدون اعمال تنش گرمایی افزایش بیان معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد داشت و این می‌تواند بیانگر نقش مهم متالوتیونین‌ها به‌عنوان عامل شناسایی فلزات سنگین سنگین در جوجه‌های گوشتی در معرض نانوذرات نقره باشد.

برخی گزارشات در زمینه‌های پزشکی و بیولوژیکی ثابت کرده‌اند که ذرات نقره پس از ورود به بدن و آزادکردن یون‌های نقره، در بافت‌هایی مانند خون، کبد، کلیه، ریه و مغز انباشته شده و باعث سمی شدن سلول‌های آنها و در نهایت منجر به مرگ شوند (۳۷). تغییرات مولکولی به‌عنوان اولین تغییرات قابل اندازه‌گیری در رابطه با اثرات تحت کشنده مواد تنش‌زا در موجودات می‌تواند اطلاعات زیادی در رابطه با سلول‌ها و بافت‌ها در اختیار ما قرار دهد (۳۹). عربیان و همکاران (۲) برای اثبات حضور آلودگی در سطح مولکولی با مکمل نانوذرات نقره و اطمینان از سلامت نانوذرات نقره در طیور، از ژن سیتوکروم ۴۵۰ به‌عنوان زیست نشانگر آلودگی استفاده کردند و نتایج آنها نشان داد

تغییرات سطح بیان این آنزیم می‌تواند به‌عنوان نشانگر آلودگی در نظر گرفته شود و نانوذرات نقره را می‌توان به‌عنوان ماده غیرآلی شیمیایی و ماده‌ی شناخته شده با منشأ خارجی در بافت کبد و روده باریک جوجه‌های گوشتی مدنظر قرار داد. بر اساس مطالعات متعدد، نشان داده است که رابطه مستقیمی بین میزان سنتز پروتئین متالوتیونین با غلظت فلزات سنگین در بافت‌های بدن وجود دارد. از این رو افزایش میزان سنتز متالوتیونین را می‌توان به‌عنوان زیست نشانگر حضور فلزات سنگین در سلول‌ها در نظر گرفت (۳۰). فلزات سنگین می‌توانند در عمل سوخت و ساز بدن وارد شده و متابولیسم را مختل کرده و اثرات مخرب جدی بر سیستم عصبی، کلیه‌ها، کبد و خون می‌گذارند (۴۵). نقش اساسی متالوتیونین‌ها، هومئوستاز فلزات از جمله روی و مس، محافظت در برابر سمیت فلزات و آسیب اکسایشی در ارگانیسم است (۳۶). ممکن است برخی ارگانیسم‌ها در مواجهه با سطح غلظت بالاتر از فلزات، بیشتر تحت تأثیر عوامل استرس‌زا محیطی و تغذیه‌ای قرار بگیرند. بنابراین برای حفظ هومئوستاز بدن به سطوح بالاتری از متالوتیونین نیاز دارند (۱۵). سینایی و همکاران (۴۱) گزارش کردند پس از قرارگیری سلول‌های کبدی ماهی زروک در معرض غلظت‌های مختلف جیوه در زمان‌های مختلف سبب تحریک سنتز و افزایش سریع متالوتیونین در مقایسه با تیمار شاهد بود و میزان بیان در این سلول‌ها به‌طور معنی‌داری افزایشی بود. با توجه به اینکه تاکنون مقاله‌ای در رابطه با اثر نانوذرات نقره بر میزان بیان ژن متالوتیونین به‌عنوان زیست نشانگر فلزات سنگین در جوجه‌های گوشتی گزارش نشده است، نتایجی از اثر سایر نانو ذرات و مکمل‌های غذایی بر بیان ژن متالوتیونین گزارش شده است. نتایج گزارش شده توسط دینگ و همکاران (۹) بیان داشت نانو اکسید روی در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به‌طور قابل توجهی سبب بیان ژن متالوتیونین در مقایسه با تیمار شاهد در سلول‌های کبدی جوجه‌های گوشتی شده است. همچنین مطالعات رازانی و همکاران (۳۸) نشان داد تزریق متیونین–روی و نانو متیونین–روی موجب افزایش معنی‌دار بیان mRNA متالوتیونین کبد و روده و همچنین وزن کبد و روده در جوجه‌های گوشتی یک و هفت روزه می‌شود. بر اساس یافته‌های محققین همانند اسماعیل و همکاران (۲۰) میزان غلظت فلزات سنگین در بافت کبد بیشتر از بافت سینه، ران و سنگدان مرغ است. همچنین حشمتی و سالارآملی (۱۷) گزارش کردند در جوجه‌های گوشتی، با افزایش سطح کادمیوم رژیم غذایی و روزهای مواجهه، تجمع کادمیوم در کلیه و کبد افزایش می‌یابد. فرناندو و همکاران (۱۳) بیان کردند میزان بیان mRNA متالوتیونین در سلول‌های کبدی جوجه‌های گوشتی به سرعت با حضور یون‌های فلزی تحریک می‌شود. همچنین آنها گزارش کردند که میزان بیان mRNA متالوتیونین در سلول‌های کبد جنینی جوجه‌ها پایین بوده ولی پس از تزریق یون‌های فلزی به تخم، بیان آن تحریک و پس از خروج جوجه از تخم میزان بیان آن افزایش زیادی داشت. بررسی میزان بیان ژن متالوتیونین در کبد جوجه‌های گوشتی پر زرد چینی تغذیه شده با روی لاکتات توسط لانگ و همکاران (۳۲) نشان داد استفاده از آن باعث افزایش نسبی بیان mRNA متالوتیونین در سلول‌های کبد می‌شود.

## نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر، ژن متالوتیونین در حیواناتی که در معرض نانوذرات نقره قرار گرفته‌اند به‌عنوان زیست نشانگر فلز سنگین و در حیواناتی که در معرض تیمار زئولیت (به‌عنوان ماده‌ای زنوبیوتیک) قرار گرفته‌اند، به‌عنوان زیست نشانگر می‌تواند در نظر گرفته شوند.

## 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 نمودندکمال قدردانی و تشکر را داریم.

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.40.4.7 ]
[ DOI: 10.61186/rap.14.40.44 ]

## منابع

1. Ahmadi, F. 2011. Impact of different levels of Silver Nanoparticles (Ag-NPs) on performance, oxidative enzymes, and blood parameters in broiler chicks. *Pakistan Veterinary Journal*, 32: 325-328.
2. Arabiyan, E., S. Hashemi, A. Yamchi, H. Davoodi and S. Rostami. 2020. Evaluation of cytochrome P450 gene expression as physiological pollution biomarkers in broiler chickens fed silver nanoparticles. *Journal of Veterinary Research*, 75: 233-241.
3. Bakand, S.H. and A. Hayes. 2012. Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure. *Inhalation Toxicology*, 24: 125-135.
4. Breytenbach, J.H. 2005. Savian Influnza Control. The metris of vaccination. *International Poultry Production*, 13(4): 15-17.
5. Bray, J.L. 2008. The Impacts on Broiler Performance and Yield by Removing Antibiotic Growth Promoters and an Evaluation of Potential Alternatives (Doctoral Dissertation, Texas A and M University). *Texas AandM University.*
6. 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.
7. Castanon, J.I. 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science*, 86(11): 66-71.
8. Dabrio, M., A.R. Rodríguez, G. Bordin, M.J. Bebianno, M. De Ley, I. Šestáková, M. Vašák, M. Nordberg. 2002. Recent developments in quantification methods for metallothionein. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 88: 123-34.
9. Ding, X., L. Wen and H. Yuan. 2009. Effect of nano-zinc oxide on liver metallothionein of AA chicken. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 29: 242-244.
10. Emtiazi, G. and S. Shahrokh. 2009. Toxicity and Unusual Biological Behavior of Nanosilver on Gram Positive and Negative Bacteria Assayed by Microtiter-Plate. *European Journal of Biological Sciences*, 1, 28-31.
11. Esmaili, M., S.R. Hashemi, D. Davoodi, Y. Jafari Ahangari, S. Hassani and A. Shabani. 2017. Effect of different levels of silver nanoparticles coated with zeolite on performance, function of superoxide dismutase and glutathione peroxidase, carcass characteristics and internal organs weight of broiler chickens. *Animal Production Research*, 5: 1-11
12. Esmaili, M., S.R. Hashemi, D. Davoodi, Y. Jafari Ahangari, S. Hassani and A. Shabani. 2017. Response of duodenum histomorphometric characteristics, pH and microbial population of alimentary canal in the broiler chickens fed silver nanoparticles coated on zeolite. *Journal of Livestock Research*, 5(4): 49-59.
13. Fernando, L.P., D. Wei and G.K. Andrews. 1989. Structure and expression of chicken metallothionein. *The Journal of Nutrition*, 119: 309-318.
14. Gajjar, P., B. Pettee, D.W. Britt and W. Huang. 2009. Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe, Pseudomonas putida KT2440. *Journal of Biological Engineering*, 3: 26-29.
15. Garty, J.1985. The amounts of heavy metals in some lichens of the Negev Desert. Environmental Pollution Series B, *Chemical and Physical*, 10: 287-300.
16. Hassaan, S.F., S.A. Abdel-Fattah, A.E. Elsalmoney and M.S.H. Hassan. 2009. Relationship between some serum enzyme activities, liver functions and body weight in growing local chickens. *International Journal of Poultry Science*, 8: 700-705.
17. Heshmati, A. and J. Salaramoli. 2015. Distribution Pattern of Cadmium in Liver and Kidney of Broiler Chicken: An Experimental Study. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 2: 15-19.
18. Holt, K.B. and A.J. Bard. 2005. Interaction of silver (I) ions with the respiratory chain of Escherichia coli: An electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag. *Biochemistry*, 44: 13214-13223.
19. Hamza-Chaffai, A., J.C. Amiard, J. Pellerin, L. Joux and B. Berthet. 2000. The potential use of metallothionein in the clam Ruditapesdecussatus as a biomarker of in situ metal exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, *Toxicology and Endocrinology*, 127: 185-197.
20. Ismail, S.A. and S.K. Abolghait,. 2013. Estimation of Lead and Cadmium residual levels in chicken giblets at retail markets in Ismailia city, Egypt. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 1: 109-112.
21. Inoue, K., N. Akita, T. Shiba, M. Satake and S. Yamashita. 1992. Metal-inducible activities of metallothionein promoters in fish cells and fry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 185: 1108-1114.
22. Jover, A., R. Manvel and R. Gackson. 2004. Screening for Avian Influenza. *World Poultry*, 20(3): 26-27.

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.40.4.7 ]
[ DOI: 10.61186/rap.14.40.44 ]

23. Kaushik, N., M.S. Thakkar, S. Snehit, M.S. Mhatre, Y. Rasesh and M.S. Parikh. 2010. Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, *Biology and Medicine*, 257-262.
24. Kenneth, M.Y., I.M. Morgan, R.R.S. Wu, T.C. Lau and R.W. Furness. 2001. Growth rate as a factor confounding the use of the dogwhelk Nucella lapillus as biomonitor of heavy metal contamination. *Marine Ecology Progress Series*, 221: 145-159.
25. Khoshbavar Rostami, H.A. and Soltani, M. (2005). The effects of diazinon on haematological indices and LC50(96h) of Acipenser nudiventris. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 14: 49-61.
26. Kim, S., J.E. Choi, J. Choi, K.H. Chung, K. Park, J. Yi, D.Y. Ryu. 2009. Oxidative stress dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatomacells. *Toxicology In vitro*, 23: 1076-1084.
27. Kim, J.S., E. Kuk, K.N. Yu, J.H. Kim, S.J. Park, H.I. Lee, S.H. Kim, S.J. Park, Y.H. Park, C.Y. Hwang, Y.K. Kim, Y.S. Lee, D.H. Jeong and M.H. Cho. 2007. Antimicrobial effects of silver nanopaticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(1): 95-101.
28. Lakhan S.E. 2006. Schizophrenia proteomics: biomarkers on the path to laboratory medicine? *Diagnostic Pathology*, 1: 1-13.
29. Landers, T.F., B. Cohen, T.E. Wittum, E.L. Larson. 2012. A review of antibiotic use in food animals: Perspective, policy, and potential. *Public Health Reports*, 127: 4-22.
30. Langston, W.J., M.J. Bebianno and G.R. Burt. 1998. Metal handling strategies in molluscs. In Metal metabolism in aquatic environments. Springer, Boston, MA, 219-283.
31. 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. *Methods*, 25: 492-498.
32. Long, L., X. Zhao, H. Li, X. Yan and H. Zhang. 2021. Effects of zinc lactate supplementation on growth performance, intestinal morphology, serum parameters, and hepatic metallothionein of Chinese yellow-feathered broilers. *Biological Trace Element Research*, 1-9.
33. Marshall, B.M. and S.B. Levy. 2011. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24: 718-733.
34. Michna, A., Z. Adamczyk, B. Siwek and M. Oćwieja. 2010. Silver nanoparticle monolayers on poly (ethylene imine) covered mica produced by colloidal selfassembly. *The Journal of Colloid and Interface Science*, 345: 187-193.
35. Mustafa, M.M. 2016. Toxicity of heavy metals on fish (Barbus Luteus) at Euphrates rRiver: metallothionein expression as a biomarker study on liver and gills. *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(1).
36. Palmiter, R.D., T.B. Cole and S.D. Findley. 1996. ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *The EMBO Journal*, 15: 1784-1791.
37. Park, E.J., E. Bae, J. Yi, Y. Kim, K. Choi, S.H. Lee, J. Yoon, B.C. Lee and K. Park. 2010. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30: 162-168.
38. Razani, K., M. Mottaghitalab and S.H. Heseini Moghaddam. 2017. The effect of intra amniotic injection of zinc-methionine and nano zinc-methionine on metallothionein gene expression in the broiler chickens. *Journal of Animal Science*, 47: 621- 632.
39. Rose, W.L., R.M. Nisbet, P.G. Green, S. Norris, T. Fan, E.H. Smith, G.N. Cherr and S.L. Anderson. 2006. Using an integrated approach to link biomarker responses and Physiological stress to growth im pairment of cadmium-exposed larval topsmelt. *Aquatic Toxicology*, 80: 298-308.
40. Santos C.R., A. Martinho, T. Quintela and I. Gonçalves. 2012. Neuroprotective and Neuroregenerative Properties of Metallothioneins. *IUBMB Life*, 64:126-135.
41. Sinaei, M., K. Darvish Bastami, A. Ziadlu, S. Kordjazi and M. Vojdanian. 2010. Evaluation of metallothionein protein as a biomarker of Mercury pollution in Scat (Scatophagus argus). *Scientific Fisheries Journal*, 19: 77-86.
42. Singh, M., R.K. Srivastava, S.S. Chauhan and K.S. Singh. 2000. Responses of virginiamycin and bacitracin methylene disalicylate on the weight gains and nutrient utilization of broiler chicken. *Journal of Poultry Science*, 35: 272-275.
43. Tavakoli, R., S.R. Hashemi, D. Davoodi, Y. Jafari Ahangari and S. Hassani. 2019. Histopathologic investigation of liver and kidney tissues in broiler chickens fed silver nanoparticles coated on zeolite. *Journal of Animal Science*, 30: 15-23.
44. Urban, T., I. Hurbain, M. Urban, A. Clément, and B. Housset. 1995. Oxidants and antioxidants. Biological effects and therapeutic perspectives. *Annales de Chirurgie*, 49: 427-434.
45. Waalkes, M.P. 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533:107-120.

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-10 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.40.4.7 ]
[ DOI: 10.61186/rap.14.40.44 ]