



بررسی بیان ژن سیتوکروم P450 به عنوان زیست‌نشانگر فیزیولوژیک آلودگی در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با نانوذرات نقره

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

^۱ گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
^۲ گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
^۳ گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

doi 10.22059/jvr.2019.270423.2876

تاریخ دریافت: ۲۴ دی ماه ۱۳۹۸، تاریخ پذیرش: ۱۰ اسفند ماه ۱۳۹۸

چکیده

زمینه مطالعه: امروزه محققان برای دستیابی به عملکرد مطلوب و حفظ سلامت طیور، نقره را با استفاده از فناوری نانو، به ابعاد نانومتر تبدیل کرده و در تغذیه‌ی طیور به عنوان مکمل غذایی مورد استفاده قرار می‌دهند. از سویی در رابطه با نانوذرات نقره در سطح مولکولی در پرورش طیور، گزارشات کاملی ارائه نشده است.
هدف: این پژوهش به منظور بررسی بیان ژن سیتوکروم P450 در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با نانوذرات نقره انجام گردید.
روش کار: این بررسی با استفاده از ۴۵۰ قطعه جوجه گوشتی تغذیه شده با (۱) گروه شاهد (جیره پایه)، (۲) جیره پایه به همراه ۱ درصد زئولیت، (۳) جیره پایه به همراه ۱ درصد زئولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانو نقره، (۴) جیره پایه به همراه ۰/۱۵ درصد اسید آرگانیک و (۵) جیره پایه به همراه ۱ درصد زئولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانو نقره مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسید آرگانیک انجام شد.
نتایج: نتایج نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار سطح بیان ژن سیتوکروم P450 در هر دو بافت روده باریک و کبد در مقایسه با تیمار شاهد در جوجه‌های تغذیه شده با زئولیت (روز ۲۱)، تیمار نانونقره پوشش داده شده بر زئولیت با مکمل اسید آرگانیک (روز ۴۲ بدون تنش گرمایی) و تیمار نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت (روز ۴۲ با تنش گرمایی) بوده است ($P < 0.05$).
نتیجه‌گیری نهایی: بطور کلی زئولیت و نانوذرات نقره به‌عنوان ماده غیرآلی و شیمیایی با منشأ خارجی شناسایی شده و در بافت کبد و روده به‌عنوان ماده زئوبیوتیک افزایش‌دهنده‌ی بیان ژن‌های زیست‌نشانگر آلودگی بود در حالی که این اثر در تیمار اسید آرگانیک، به‌عنوان یک اسید طبیعی دیده نشد.
کلمات کلیدی: نانو نقره، زئوبیوتیک، زیست‌نشانگر، سیتوکروم P450، جوجه گوشتی

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: سیدرضا هاشمی، گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
 پست الکترونیکی: hashemi711@yahoo.co.uk

مقدمه

حد چند نانومتر کوچک شوند، این ذرات ویژگی‌های متفاوتی با ذرات اولیه خواهند داشت که از جمله می‌توان به فضای سطحی بزرگ (بالا رفتن فعالیت‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی)، انحلال‌پذیری و سطح تحرک بالا اشاره کرد (۱۰). خواص ضد میکروبی نقره، سال‌های زیادی شناخته شده است. اما اخیراً به دلیل ساخته شدن آن به صورت نانوذرات، سطح تماس آن افزایش یافته و خاصیت ضد میکروبی آن تا بیش از ۹۹ درصد

فناوری نانو در سال‌های آینده باعث تغییرات شگرفی در تمام جنبه‌های زندگی بشر خواهد شد و کاربردهایی را برای ما فراهم خواهند کرد. نانو مواد عبارتند از مواد طبیعی، تولید شده به صورت اتفاقی و یا ساخته شده بدست بشر که حاوی ذراتی به صورت آزاد، تجمع یافته و از نظر توزیع اندازه، ۵۰ درصد ذرات آن حداقل در یک بُعد دارای اندازه‌ای بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر باشند. همچنین یافته‌های اخیر نشان داده است زمانی که ذرات یک ماده خاص در

نشانگرهای زیستی به منظور بررسی وجود آلودگی‌ها استفاده نمود (۵،۱۲). پروتئین‌هایی هم چون HSP70، متالوتیونین‌ها و آنزیم سیتوکروم P450 می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای مولکولی آلودگی در سطح ژنوم یا پروتئین بررسی شوند (۱۱،۲۷). سیتوکروم P450 جزو اولین آنزیم‌هایی است که در فاز اول پاسخ به آلودگی‌ها تولید می‌شوند (۲۵) و جزء اولین محصولات متابولیتی آلودگی‌ها می‌باشند و در معرض آلودگی‌های مختلف از جمله فلزات سنگین، میزان بیان ژن سیتوکروم افزایش می‌یابد که این تغییرات بیان می‌تواند به‌عنوان بیومارکر آلودگی محسوب گردد (۱۵). در بین تمامی خانواده‌ی سیتوکروم P450، خانواده‌ی CYP2C دارای بالاترین میزان بیان و همچنین مهم‌ترین و اولین گروه در مقابله با مواد زنبیوتیک (ماده بیگانه‌زیست) (۲۲) و مواد شیمیایی خارجی تهدید کننده‌ی سلول‌ها می‌باشند (۲۸). سوبسترای P450ها، شامل واسطه‌های متابولیک مانند لیپیدها و هورمون‌های استروئیدی و همچنین فلزات سنگین و مواد زنبیوتیک مانند مواد مخدر و سایر مواد شیمیایی خارجی سمی هستند. همچنین با توجه به این‌که گزارشاتی مبنی بر افزایش بیان سیتوکروم P450 در کبد، کلیه، پوست، ریه، مغز و سیستم قلبی-عروقی در زمان مواجهه با نانوذرات نقره در پستان‌داران به اثبات رسیده است (۱۷،۱۸،۱۹)، هدف از مطالعه حاضر بررسی بیان ژن سیتوکروم P450 به‌عنوان زیست‌نشانگر فیزیولوژیک آلودگی در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با نانوذرات نقره می‌باشد.

مواد و روش کار

شرایط پرورش و گروه‌های آزمایشی: تحقیق حاضر در ایستگاه تحقیقات طیور دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان واقع در مزرعه آموزشی-پژوهشی شماره ۱ شهرستان گرگان، به مدت ۴۲ روز انجام شد. بدین منظور آزمایشی با ۴۵۰ قطعه جوجه‌ی گوشتی یک روزه سویه کاب ۵۰۰ در پنج تیمار و شش تکرار و در هر واحد آزمایشی ۱۵ قطعه در نظر گرفته شد. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) گروه شاهد (جیره پایه فاقد ژئولیت، اسیدآرگانیک و نانو ذرات نقره)، (۲) گروه شاهد مکمل شده با ۱ درصد ژئولیت، (۳) گروه شاهد مکمل شده با ۱ درصد ژئولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانو ذرات نقره، (۴) گروه شاهد مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسید آرگانیک، (۵) گروه شاهد تیمار شده با ۱ درصد ژئولیت پوشش داده شده با ۰/۵ درصد نانو ذرات نقره مکمل شده با ۰/۱۵ درصد اسید آرگانیک در شرایط با و بدون تنش گرمایی انجام شد.

افزایش پیدا کرده است (۶). در میان نانومواد، نانوذرات نقره به‌عنوان پر مصرف‌ترین نانو ذره در صنعت نانو تکنولوژی دارای اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی می‌باشند (۱۴). کاهش ابعاد مواد حجیم موجب تغییر ویژگی‌های سطحی، افزایش فعالیت‌های شیمیایی، افزایش یافتن بر هم کنش آن با مواد دیگر، منجر به ایجاد سمیت خواهد شد. اندازه کوچک نانومواد، عبور از غشای سلولی در اندام‌هایی همچون میتوکندری را ممکن می‌سازد و امکان فرار از تسویه‌ی سلولی را نیز فراهم می‌کند (۲۵). نانوذرات می‌توانند وارد سلول شوند و با ساختارهای درون سلولی ارتباط یابند. جذب سلولی، موقعیتیابی ساختارهای درون سلولی و سمیت این نانوذرات به اندازه، شکل و ترکیب شیمیایی آن‌ها بستگی دارد (۷). همچنین اندازه نانوذرات نقره باعث می‌شود که از غشای بیولوژیکی سلول عبور کند و از طریق مکانیسم پیام‌رسانی سلول در عملکرد میتوکندری و مواد ژنتیکی درون سلول اختلال ایجاد نماید (۲۶). همچنین اندازه، مساحت سطح، انرژی سطحی و بارها در زمینه‌ی اتصال به بیومولکول‌ها بسیار مهم‌اند و سرنوشت نانوذرات را در سلول‌ها تعیین می‌کنند (۲۴). نانو ذرات نقره احتمالاً با افزایش رادیکال‌های آزاد و تغییرات فیزیکی غشای سلول، موجب آسیب DNA می‌شوند (۹). همچنین تنش گرمایی در طیور موجب برهم‌زدن تعادل اکسایشی شده و موجب افزایش رادیکال‌های آزاد اُکسیژن می‌شوند. افزایش رادیکال‌های آزاد در سلول موجب آسیب به مولکول‌های بزرگ بیولوژیک مانند پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA می‌شود (۲۰). با پیشرفت علم، شاخص‌های جدیدی برای پی بردن به وضعیت فیزیولوژیکی جانوران در مواجهه با آلودگی‌های نانوذرات معرفی گردیده است. زیست‌نشانگرها یا بیومارکرها شاخص‌های بیوشیمیایی، خون‌شناسی، آنزیمی و بافتی هستند که به ردیابی اثرات ثانویه آلودگی‌ها می‌پردازند. از آنجایی‌که پاسخ بیولوژیک یک جانور به استرس از سطح مولکولی آغاز شده و با افزایش زمان مواجهه به ترتیب تغییرات در سطوح بیوشیمیایی، سلولی، بافت، دستگاه و موجود توسعه می‌یابد، بنابراین از این تغییرات می‌توان به‌عنوان نشانگرهای زیستی به منظور بررسی وجود آلودگی‌ها استفاده نمود (۱۳). در مطالعات مواجهه جانداران با غلظت‌های متفاوت فلزهای سنگین آسیب‌های بافتی، تغییرات آنزیمی، تغییرات پارامترهای خون‌شناسی، ژنتیکی، رفتاری، تولیدمثلی و حتی مرگ در گونه‌های مختلف گزارش شده است (۲،۱۱). تغییرات مولکولی به‌عنوان اولین تغییرات قابل اندازه‌گیری در حیوانات مواجهه شده با تنش می‌باشد (۲۳)، که از این تغییرات می‌توان به‌عنوان

جدول ۱. اسامی ژن‌ها و توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش qRT-PCR.

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول محصول (bp)	Access number
CYP2C45	F: 5'- AAGACAATCCCAAATCACACT-3' R: 5'-GAAGCAGAAGCCCGTATC-3'	114	NM_001001752
β -actin	F: 5'- AAGTTACTCGCCTCTGTGAA- 3' R: 5'- CACATCTATCACTGGGGAAC-3'	198	NM_205518

با استفاده از ۱۰ میکرولیتر RNA تیمار شده و ۱ میکرولیتر آغازگر اَلیگودی تی شرکت فرمنتاز و ۲/۵ میکرولیتر DEPC-treated water آغاز گردید. در این مرحله بعد از انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد، به ترتیب ۴ میکرولیتر Buffer RT(5X)، ۲ میکرولیتر dNTP، ۰/۵ میکرولیتر Ribolock RNase Inhibitor و ۱ میکرولیتر آنزیم RT (Reverse Transcriptase) به میکروتیوپ‌های حاوی نمونه اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به دستگاه PCR برای ساخت رشته دوم DNA مکمل در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت، ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت، منتقل شد. آغازگرهای مرجع و اختصاصی، با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 و AlleleID براساس توالی ژن‌های موردنظر در سایت NCBI طراحی شدند. ساخت آغازگرها توسط شرکت پیشگامان انجام گرفت. به منظور اطمینان از ساخت صحیح DNA مکمل، نمونه‌های cDNA با استفاده از آغازگر مرجع مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این تحقیق ژن β -actin به عنوان کنترل داخلی (Internal control) انتخاب شد (جدول ۱). برای اطمینان از اختصاصی بودن پرایمرها، محصول PCR با دماهای انیلینگ متفاوتی (نزدیک به T_M ذکر شده بر روی میکروتیوپ پرایمر سفارشی) در دستگاه PCR گرادینت گذاشته شد. محصول نهایی روی ژل آگارز الکتروفورز گردید و شارپ‌ترین و واضح‌ترین باندها به عنوان مناسب‌ترین دمای انیلینگ برای انجام Real Time-PCR انتخاب شد. پس از تأیید ساخت صحیح DNA مکمل و اختصاصی بودن آغازگر بتا اکتین به عنوان ژن مرجع، به منظور بررسی کمی بیان ژن‌ها، بهینه‌سازی دما و زمان مناسب تکثیر و اتصال و کارکرد درست آغازگر اختصاصی ژن سیتوکروم P450 با ایزوفرم CYP2C45، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی، در دو بافت کبد و روده انجام شد. واکنش Real-time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از تکنولوژی رنگ سایبرگرین (SYBR Green I) با استفاده از

اعمال تنش گرمایی: دمای سالن در روز اول 32 ± 1 درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. که این دما با افزایش رشد جوجه‌ها کاهش یافت. در نهایت پس از گذشت ۲۱ روز دمای سالن در دمای 21 ± 1 درجه سانتی‌گراد ثابت گردید. در این مدت تمام گروه‌ها تحت شرایط استاندارد نگهداری شدند. به منظور اعمال تنش گرمایی، از روز ۳۵ دوره‌ی پرورش، روزانه به مدت چهار ساعت دمای سالن به ۳۴ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. برنامه‌ی واکنش‌های توصیه‌شده در منطقه تا قبل از ۲۰ روزگی براساس توصیه‌ی اداره‌ی دامپزشکی استان گلستان انجام شد. جیره‌ها با توجه به احتیاجات سویه (Cobb) برای دوره‌ی آغازین (۲۱-۱ روزگی) و رشد (۴۲-۲۲ روزگی) تهیه شدند.

نمونه‌برداری: به منظور بررسی بیان ژن سیتوکروم P450

به عنوان بیومارکر یا زیست‌نشانگر حضور آلودگی، جوجه‌های گوشتی تغذیه شده در ۵ تیمار به نوبت در روزهای ۲۱ بدون تنش گرمایی، ۴۲ بدون تنش گرمایی و روز ۴۲ پس از اعمال تنش گرمایی در دوره پرورش، نمونه‌برداری از بافت کبد و روده باریک انجام شد.

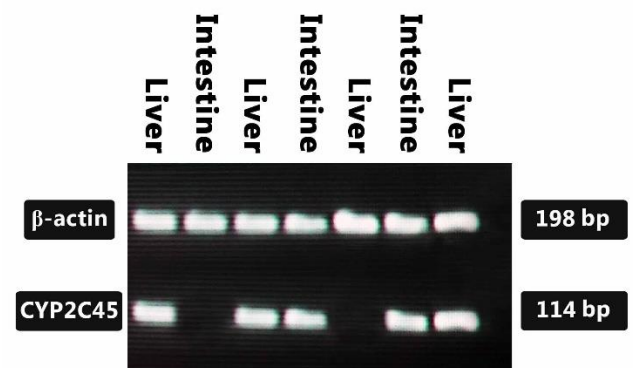
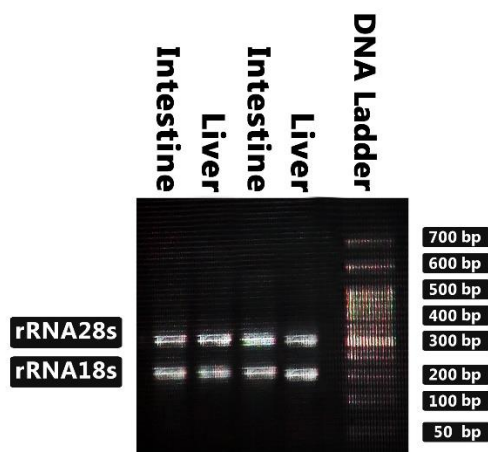
آزمایشات مولکولی: به منظور انجام آزمایشات مولکولی،

پس از خرد کردن نمونه بافت‌های روده باریک و کبد، استخراج Total RNA با استفاده از مقدار ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج تریزول (TRIzol) به ازای هر نمونه براساس دستورالعمل پیشنهادی شرکت سیگما انجام شد و سپس جهت اطمینان از استخراج درست RNA، چند نمونه به طور تصادفی روی ژل آگارز با استفاده از دستگاه الکتروفورز بررسی شدند. سپس با استفاده از دستگاه آشکارساز، باند حاصل از RNA کل مشاهده شد و با استفاده از Gel Doc از ژل عکس گرفته شد و در نهایت باندهای ایجاد شده از نمونه‌های موجود در ژل آگارز آنالیز شد. به منظور حذف DNA احتمالی در نمونه‌های RNA استخراج شده، از تیمار DNase I براساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز استفاده شد و سپس ساخت رشته اول cDNA یا DNA مکمل

سانتی گراد به مدت ۱۰ ثانیه انجام گردید. با بررسی منحنی‌های ذوب در پایان هر واکنش، از اختصاصی عمل نمودن آغازگرها و فقدان پرایمر دایمرها اطمینان حاصل شد.

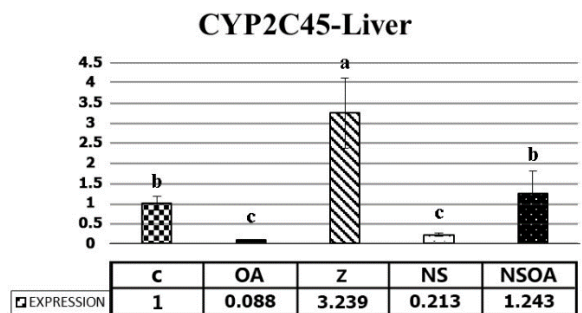
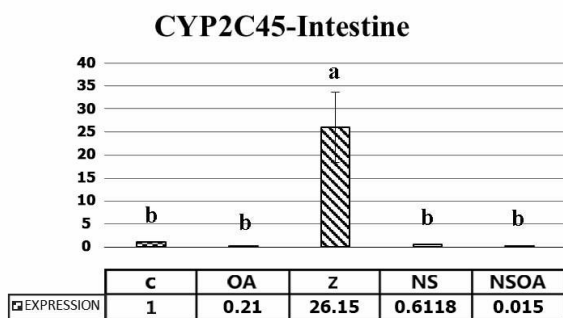
تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی، (C_t) در Excel ذخیره گردید و بیان نسبی ژن‌های مورد نظر نسبت به ژن مرجع در فضای نرم‌افزار Excel با استفاده از فرمول لیواک انجام شد. فرمول لیواک معادل $2^{-\Delta\Delta C_t}$ می‌باشد که در این فرمول برابر است با: ΔC_t ژن هدف - ΔC_t کالیبراتور (۱۸). تجزیه و تحلیل داده‌ها در طرح کاملاً تصادفی و مشخص کردن سطوح معنی‌داری داده‌ها و مقایسه‌ی میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام گردید.

دستگاه بایورِد (BioRad) و نرم‌افزار iQ5 اپتی‌کال انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۰/۱ میکرولیتر Primer Forward، ۰/۱ میکرولیتر Primer Reverse، ۷/۷ میکرولیتر DEPC-treated water، ۱ میکرولیتر DMSO، ۹/۹ میکرولیتر Taq DNA Polymerase و SYBR Green ۰/۲. نمونه‌ها در مرحله اول در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه با تعداد ۱ چرخه به منظور واسرشت ابتدایی در دستگاه ترمال سایکلر انکوبه شدند. سپس مرحله دوم با ۴۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی (Denaturation) (۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ ثانیه)، اتصال (Annealing) (۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه) و تکثیر (Extension) (۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه) انجام شد. در مرحله سوم تکثیر نهایی با ۱ چرخه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد و در انتها، مرحله ذوب با ۸۱ چرخه در دمای ۹۵ درجه



تصویر ۲. بررسی cDNA سنتز شده با آغازگر مرجع و اختصاصی در دو بافت کبد و روده با تیمارهای مختلف.

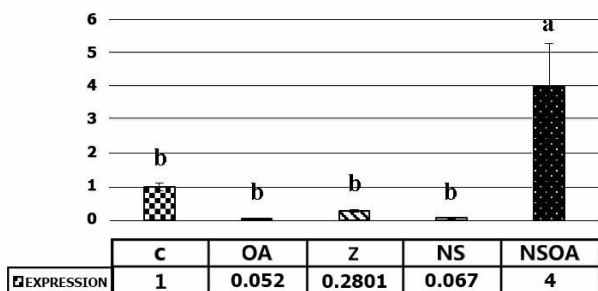
تصویر ۱. بررسی RNA استخراج شده در دو بافت کبد و روده با تیمارهای مختلف.



تصویر ۴. میزان بیان ژن سیتوکروم P450 با ایزوفرم CYP2C45 در روز ۲۱ دوره پرورش در بافت روده باریک جوجه‌های گوشتی.

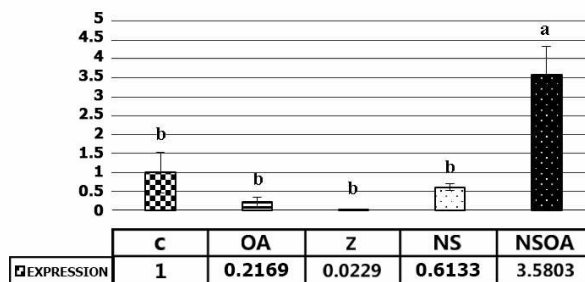
تصویر ۳. میزان بیان ژن سیتوکروم P450 با ایزوفرم CYP2C45 در روز ۲۱ دوره پرورش در بافت کبد جوجه‌های گوشتی.

CYP2C45-Intestine



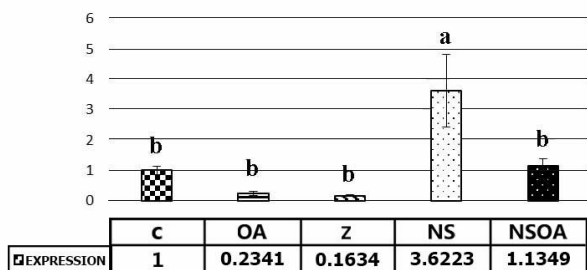
تصویر ۶. میزان بیان ژن سیتوکروم P450 با ایزوفرم CYP2C45 در روز ۴۲ دوره پرورش بدون اعمال تنش گرمایی در بافت روده باریک جوجه‌های گوشتی.

CYP2C45-Liver



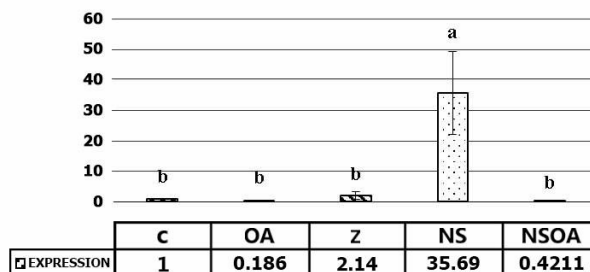
تصویر ۵. میزان بیان ژن سیتوکروم P450 با ایزوفرم CYP2C45 در روز ۴۲ دوره پرورش بدون اعمال تنش گرمایی در بافت کبد جوجه‌های گوشتی.

CYP2C45-Intestine



تصویر ۸. میزان بیان ژن سیتوکروم P450 با ایزوفرم CYP2C45 در روز ۴۲ دوره پرورش با اعمال تنش گرمایی در بافت روده باریک جوجه‌های گوشتی.

CYP2C45-Liver



تصویر ۷. میزان بیان ژن سیتوکروم P450 با ایزوفرم CYP2C45 در روز ۴۲ دوره پرورش با اعمال تنش گرمایی در بافت کبد جوجه‌های گوشتی.

مکمل، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی صورت گرفت و با بررسی منحنی ذوب حاصل از Real-time PCR، صحت پیک مربوط به آغازگرهای مورد مطالعه و فقدان پرایمر دایمرها تأیید گردید.

بحث

با توجه به گزارشاتی که توسط محققین مبنی بر افزایش سطح بیان ژن سیتوکروم P450 به‌عنوان بیومارکر حضور آلودگی در بدن بیان شده است، مطالعه تغییرات سطوح بیان این ژن و اثبات حضور آلودگی در سطح مولکولی با مکمل نانوذرات نقره و اطمینان از سلامت نانوذرات نقره در طیور ضروری به‌نظر می‌رسد. در سطح مولکولی تغییرات ژنتیکی (تغییر در بیان، عملکرد و تنظیم ژنی) و تغییرات سطوح پروتئینی در موجودات را می‌توان شاخص مواجهه با آلودگی در نظر گرفت به‌ویژه اگر مولکول مورد بررسی قسمتی از مکانیسم دفاعی، ترمیمی و یا سم‌زدایی سلول باشد که از آن جمله می‌توان به متالوتیونین‌ها (۸)، گلو‌تاتیون-S ترنس‌فراز (۱)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (۲۰)، پروتئین‌های شوک

نتایج

کیفیت RNA، با قراردادن نمونه‌های استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد تأیید شد. باندهای rRNA18s و rRNA28s به‌وضوح مشاهده شدند و تمام نمونه‌ها دارای الگوی نواری مناسبی بر روی ژل آگارز بودند که نشان دهنده‌ی خلوص و کیفیت بالای RNA تخلیص شده و عدم ایجاد شکستگی و آسیب در ساختار RNA است (تصویر ۱). به‌منظور تأیید درستی ساخت cDNA از RNAهای استخراج شده، با استفاده از آغازگر ژن خانه‌دار (بتا اکتین) و نمونه‌های cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز استاندارد انجام گرفت و در انتها محصول PCR برای آغازگر مرجع و آغازگر اختصاصی (تصویر ۲) به‌طور جداگانه، بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. الگوی باندهای مشاهده شده در این مرحله برای تمام نمونه‌ها تأیید کننده‌ی ساخت صحیح DNA مکمل، اختصاصی بودن آغازگر، بهینه‌سازی مناسب دما و زمان مناسب برای مراحل واکنش PCR بود. سپس با اطمینان از سنتز صحیح DNA

میزان بیان این ژن در تیمار نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت با مکمل اسیدآرگانیک (NSOA) در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده نشده است ($P > 0.05$). تصویر ۴ نشان دهنده افزایش چشمگیری در سطح بیان ژن مذکور در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمار زئولیت در بافت روده باریک است که دارای تفاوت معنی داری با تیمار شاهد بوده است ($P < 0.05$). همچنین میزان بیان ژن CYP2C45 در تیمارهای اسیدآرگانیک (OA)، نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت (NS) و تیمار نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت با مکمل اسیدآرگانیک (NSOA) در روده باریک، تفاوت معنی داری در مقایسه با تیمار شاهد نداشته است ($P > 0.05$).

در روز ۴۲ دوره پرورش بدون اعمال تنش گرمایی، جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمار نانوذرات نقره مکمل شده با اسیدآرگانیک (NSOA)، بیشترین سطح بیان ژن سیتوکروم P450 را به ترتیب در بافت کبد و روده باریک در مقایسه با تیمار شاهد نشان داده است ($P < 0.05$) (تصویر ۵، ۶). بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر، تیمارهای آزمایشی OA، Z و NS تفاوت معنی داری را در میزان بیان ژن CYP2C45 در بافت کبد و روده باریک جوجه‌های گوشتی در مقایسه با تیمار شاهد نشان نداده‌اند ($P > 0.05$).

همچنین روز ۴۲ دوره پرورش با اعمال تنش گرمایی افزایش چشمگیری در میزان بیان ژن سیتوکروم P450 با ایزوفرم CYP2C45 در بافت کبد و روده‌ی جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمار نانوذرات نقره (NS) در مقایسه با تیمار ایجاد شد ($P < 0.05$). با این تفاوت که سلول‌های کبدی بیش‌تر تحت تأثیر تیمار NS قرار گرفته و افزایش بیان بسیار بالاتری نسبت به تیمار شاهد در مقایسه با بافت روده باریک را داشتند (تصویر ۷).

به‌طور کلی نتایج این مطالعه گویای آن است که افزایش سطح بیان ژن CYP2C45 در هر دو بافت کبد و روده در تمام زمان‌های نمونه‌برداری در یک تیمار مشخص رخ داده است که نشان دهنده درستی و یکسان بودن شرایط آزمایش بوده و تیمارهای Z (در روز ۲۱)، NSOA (در روز ۴۲ بدون تنش گرمایی) و NS (روز ۴۲ با اعمال تنش گرمایی) افزایش دهنده‌ی احتمالی سطح آلودگی در هر دو بافت کبد و روده باریک بوده است. با توجه به این که آنزیم سیتوکروم P450 جزء آنزیم‌هایی است که در فاز اول متابولیسم آلودگی در سطح سلولی تولید می‌گردد و اولین واکنش سلول‌ها به شرایط تنش‌زا و استرسی تولید آنزیم سیتوکروم P450 می‌باشد (۲۹)، از این رو نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تغییرات سطح بیان این آنزیم با تیمارهای Z و NSOA

حرارتی (HSP70) (۳) و سیتوکروم P450 (۲۱) اشاره نمود. همچنین گزارشات بیانگر این است که روده آبیانی که در معرض فلزات سنگین قرار گرفتند، افزایش قابل توجهی در میزان بیان ژن سیتوکروم P450، در مقایسه با تیمار شاهد داشته‌اند (۳۰). جوجه‌هایی که در معرض سموم قرار داشتند افزایش بیان ژن سیتوکروم P450 را نشان دادند و این افزایش بیان، به عنوان نشانگری برای افزایش یافتن متابولیسم دارویی در بافت کبد و روده جوجه‌ها در نظر گرفته شده است (۴).

افزایش بیان ژن سیتوکروم P450 در کبد ماهیانی که در معرض فلزات سنگین بودند به اثبات رسیده است (۱۱). همچنین گزارشی مبنی بر افزایش بیان ژن سیتوکروم P450 به‌عنوان زیست‌نشانگری در طی متابولیسم مواد زئوبیوتیک و متابولیسم مواد دارویی در سطح سلول‌های کبدی جوجه‌های گوشتی گزارش شده است و افزایش بیان قابل توجهی از سطح ایزوفرم CYP2C45 در جوجه‌های قرار گرفته در معرض فنوباربتال، گزارش شده است (۲۸). از این رو آغازگر ژن هدف سیتوکروم P450 با ایزوفرم CYP2C45 با استفاده از آغازگر بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی، نرمال گردید و در دو بافت کبد و روده باریک مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. نتایج پژوهش حاضر بیان‌گر این است که سطح بیان ژن CYP2C45 در روز ۲۱ دوره پرورش در سلول‌های کبد و روده جوجه‌های تغذیه شده با تیمار زئولیت (Z) در بیشترین میزان بیان بوده و دارای تفاوت معنی داری با تیمار شاهد بوده است ($P < 0.05$). با این تفاوت که سطح بیان ژن CYP2C45 در سلول‌های روده افزایش بسیار زیادی در مقایسه با تیمار شاهد داشته است در حالی که بیان این ژن در سلول‌های کبدی سطح افزایش کمتری در مقایسه با سلول‌های روده را نشان داده است. بدین ترتیب این احتمال وجود دارد که تیمار زئولیت (Z) در روز ۲۱ دوره پرورش در سطح سلول‌های کبد و روده، سطح بیان ژن سیتوکروم P450 را به‌عنوان زیست‌نشانگر آلودگی افزایش داده و به‌عنوان شاخصی برای حضور آلودگی احتمالی در سلول‌های کبد و روده تلقی گردد. با این تفاوت که سلول‌های روده بیش‌تر از سلول‌های کبد تحت تأثیر تیمار زئولیت قرار گرفته‌اند و سطح آلودگی وسیع‌تری را در سطح مولکولی با توجه به افزایش بیان این ژن نشان داده‌اند. تصویر ۳ نشان دهنده افزایش سطح بیان این ژن در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمار زئولیت در بافت کبد است که دارای تفاوت معنی داری با تیمار شاهد بوده است ($P < 0.05$). از سویی میزان بیان ژن CYP2C45 در تیمار اسیدآرگانیک (OA) و نانوذرات نقره پوشش داده شده بر زئولیت (NS) در کبد در مقایسه با تیمار شاهد دارای کاهش بیان معنی داری بوده است ($P < 0.05$) در حالی که تفاوت معنی داری در

سپاسگزاری

در پایان از همکاری اساتید و مسئولان آزمایشگاه‌های دانشکده علوم دامی و تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

NS می‌تواند به‌عنوان نشانگر آلودگی در نظر گرفته شود و مکمل‌های زئولیت (Z) و نانوذرات نقره (NS) را می‌توان به‌عنوان ماده غیرآلی و شیمیایی و ماده‌ی شناخته شده با منشأ خارجی در بافت کبد و روده باریک جوجه‌های گوشتی مدنظر قرار داد. این در حالی است که تیمار اسیدآرگانیک به‌عنوان اسید طبیعی موجب افزایش سطح بیان ژن سیتوکروم P450 در هیچ‌کدام از زمان‌های دوره پرورش در بافت‌های کبد و روده باریک جوجه‌های گوشتی نشده است.

References

- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A. (2004). Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to Phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. Following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicol Environ Saf*, 57, 290-302. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00080-0](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00080-0) PMID: 15041252
- Akhtar, M.S., Pal, A.K., Sahu, N.P., Alexander, C., Gupta, S.K. (2012). Effect of dietary Pyridoxine on growth and biochemical responses of *Labeo rohita* fingerlings exposed to endosulfan. *Pestic Biochem Physiol*, 103, 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.02.004>
- Archana, P.R., Aleena, J., Pragna, P., Vidya, M.K., Abdul Niyas, P.A., Bagath, M., Krishnan, G., Manimaran, A., Beena, V., Kurien, E.K., Sejian, V., Bhatta, R. (2017). Role of heat shock proteins in livestock adaptation to heat stress. *J Dairy Vet Anim Res*, 5, 13-19. <https://doi.org/10.15406/jdvar.2017.05.00127>
- Bauer, M., Greenwod, S.J., Clark, K.F., Jackman, P., Fairchild, W. (2013). Analysis of gene expression in *Homarus americanus* larvae exposed to sublethal concentration of endosulfan during metamorphosis. *Comp Biochem Physiol*, 8, 300-308. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2013.07.002>
- Benhamed, S., Guardiola, F.A., Martinez, S., Sanchez, M.J.M., Sirvent, C.P., Mars, M., Esteban, M.A. (2016). Exposure of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) to sediments contaminated with heavy metals down-regulates the gene expression of stress biomarkers. *Toxicol Rep*, 3, 364-372. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.02.006> PMID: 28959558
- Bondarenko, O., Ivask, A., Kallinen, A., Kurvet, I., Kahru, A. (2013). Particle-cell contact enhances antibacterial activity of silver nanoparticles. *PloS One*, 8, e64060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064060> PMID: 23737965
- Buzea, C., Blandino, I.I.P., Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2, 17-71. <https://doi.org/10.1116/1.2815690> PMID: 20419892
- Chan, K.M. (1995). Methalothionin: Potential biomarker for monitoring heavy metal Pollution in fish around Hong Kong. *Mar Pollut Bull*, 31, 411-415. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(95\)00125-7](https://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00125-7)
- Colombo, A., Bonfanti, P., Orsi, F., Camatini, M. (2003). Developmental effects of endocrine disturbing chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect*, 101, 378-384. <https://doi.org/10.1289/ehp.93101378> PMID: 8080506
- David, B. (2008). How meaningful are results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization. *Toxicol Sci*, 101, 183-185. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm279> PMID: 18300382
- Dong, M., Zhu, L., Shao, B., Zhu, Sh., Wang, J., Xie, H., Wang, J., Wang, F. (2013). The effects of endosulfan on cytochrome P450 enzymes and glutathione S-transferase in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Ecotoxicol Environ Saf*, 92, 1-9. <https://doi.org/10.1111/jai.13072>
- Dorts, J., Silvestre, F., Tu, H.T., Tyberghein, A.E., Phuong, N.T., Kestemont, P. (2009). Oxidative stress, protein carbonylation and heat shock proteins in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following exposure to endosulfan and deltamethrin. *Environ Toxicol Pharmacol*, 28, 302-310. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.05.006> PMID: 21784020
- Frijhoff, J., Winyard, P.G., Zarkovic, N., Davies, S.S., Stocker, R., Cheng, D., Knight, R.A., Taylor, E.L., Oettrich, J., Ruskovska, T., Gasparovic, A.C., Cuadrado, A., Weber, D., Poulsen, H.E., Grune, T., Schmidt, H.H.W., Ghezzi, P. (2015). Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 23, 1144-1170. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6317> PMID: 26415143
- Govindasamy, R., Ruhuman, A.A. (2012). Histopathological studies and oxidative stress of synthesized particles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Environ Sci*, 24, 1091-1098. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60845-0](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60845-0) PMID: 23505877
- Guo, Y.U., Liu, Y.S., Liu, W.R., Jiang, Y.X., Su, H.C., Zhang, Q.Q., Chen, X.W., Yang, Y.Y., Chen, J., Liu, S.S., Pan, C.G., Huang, G.Y., Ying, G.G. (2015). Tissue-specific bioaccumulation of human and veterinary antibiotics in bile, plasma, liver and muscle tissues of wild fish from a highly urbanized region. *Environ Pollut*, 198, 14-24. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.012> PMID: 24793519
- Huang, G.Y., Ying, G.G., Liang, Y.Q., Liu, S.S., Liu, U.S. (2014). Expression patterns of metallothionein, cytochrome P4501A and vitellogenin genes in western mosquitofish (*Gambusia affinis*) in response to heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf*, 105, 97-102. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.012>
- Kim, J.H., Raisuddin, J.S., Ki, S., Lee, J.S., Han, K.N. (2008). Molecular cloning and bnapthoflavone- induced expression of a cytochrome P450 1A (CYP1A) gene from an anadromous river Pufferfish, *Takifugu obscurus*. *Mar Pollut Bull*, 57, 433-440. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.01.005> PMID: 18304588
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} Method, 25, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262> PMID: 11846609
- Miranda, C.L., Chung, W.G., Wang-Buhler, J.L., Musafia-Jeknic, T., Baird, W.M., Buhler, D.R. (2006). Comparative in

- vitro metabolism of benzo[a]pyrene by recombinant zebrafish CYP1A and liver microsomes from beta-naphthoflavone-treated rainbow trout. *Aquat Toxicol*, 80, 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.07.018> PMID: [16963132](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16963132/)
20. Mujahid, A., Sato, K., Akiba, Y., Toyomizu, M. (2006). Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via down-regulation of uncoupling protein content. *Poultry Sci*, 85, 1259-1265. <https://doi.org/10.1093/ps/85.7.1259>
 21. Nebert, D.W., Wikvall, K., Miller, W.L. (2013). Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368, 1612-1635. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0431> PMID: [23297354](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23297354/)
 22. Nelson, D., Schuler, A., Paquette, M., Reichhart, W., Bak, S. (2004). Comparative genomics of rice and Arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiol*, 135, 756-772. <https://doi.org/10.1104/pp.104.039826> PMID: [15208422](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15208422/)
 23. Rose, W.L., Nisbet, R.M., Green, P.G., Norris, S., Fan, T., Smith, E.H., Cherr, G.N., Anderson, S.L. (2006). Using an integrated approach to link biomarker responses and Physiological stress to growth impairment of cadmium-exposed larval topmselt. *Aquat Toxicol*, 80, 298-308. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.09.007> PMID: [17083987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17083987/)
 24. Rothen-Rutishauser, B., Muhlfeld, C., Blank, F., Musso, C., Gehr, P. (2007). Translocation of particles and inflammatory responses after exposure to fine particles and nanoparticles in an epithelial airway model. *Part Fibre Toxicol*, 25, 4-9. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-4-9> PMID: [17894871](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17894871/)
 25. Siroka, Z., Drastichova, J. (2004). Biochemical markers of aquatic environment contamination cytochrome P450 in fish. *Acta Vet Brno*, 73, 123-132. <https://doi.org/10.2754/avb200473010123>
 26. Sung, J.H., Ji, J.H., Park, J.D., Yoon, J.U., Kim, D.S., Jeon, K.S., Song, M.Y., Jeong, J., Han, B.S., Han, J.H., Chung, Y.H., Chang, H.K., Lee, J.H., Cho, M.H., Kelman, B.J., Yu, I.J. (2009). Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Sci*, 108, 452-461. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn246> PMID: [19033393](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19033393/)
 27. Tedeschi, J.N., Kennington, W.J., Berry, O., Whiting, S., Meekan, M., Mitchell, N.J. (2015). Increased expression of HSP70 and HSP90 mRNA as biomarkers of thermal stress loggerhead turtle embryos (*Caretta caretta*). *J Therm Biol*, 47, 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.11.006> PMID: [25526653](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25526653/)
 28. Watanabe, P.K., Kawai, K.Y., Ikenaka, Y., Kawata, M., Ikushiro, S., Sakaki, T., Ishizuka, M. (2013). Avian cytochrome P450 (CYP) 1-3 family genes: isoforms, evolutionary relationships, and mRNA expression in chicken liver. *PloS one*, 8, e75689. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075689> PMID: [24098714](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24098714/)
 29. Xu, L., Dan, M., Shao, A., Cheng, X., Zhang, C., Yokel, R., Takemura, T., Hanagata, N., Niwa, M., Watanabe, D. (2015). Silver nanoparticles induce tight junction disruption and astrocyte neurotoxicity in a rat blood-brain barrier primary triple coculture model. *Int J Nanomedicine*, 10, 6105-6119. <https://doi.org/10.2147/IJN.S85265> PMID: [26491287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26491287/)
 30. Zhang, X.D., Wu, H.Y., Wu, D., Wang, Y.Y., Chang, J.H., Zhai, Z.B., Fan, F.Y. (2010). Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *Int J Nanomed*, 5, 711-781. <https://doi.org/10.2147/IJN.S8428> PMID: [21042423](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21042423/)



Evaluation of Cytochrome P450 Gene Expression as Physiological Pollution Biomarkers in Broiler Chickens Fed Silver Nanoparticles

Elnaz Arabiyan¹, Seyed Reza Hashemi¹, Ahad Yamchi², Homa Davoodi³, Sharif Rostami¹

¹ Department of Animal Physiology, Faculty of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

² Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

³ Department of Immunology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

doi: [10.22059/jvr.2019.270423.2876](https://doi.org/10.22059/jvr.2019.270423.2876)

Received: 14 January 2020, Accepted: 29 February 2020

Abstract

BACKGROUND: Nowadays, researchers are converted silver to nanometer dimensions and using nanotechnology to achieve suitable performance and preserve the poultry health and they are used silver nanoparticles are used for poultry nutrition as a nutritional supplement. On the other hand, at the molecular level no complete reports in poultry breeding have been provided.

OBJECTIVES: This study was conducted to evaluate cytochrome P450 gene expression in broiler chickens fed with silver nanoparticles.

METHODS: This experiment a completely randomized design with 450 single-day Cobb 500 broiler chicks was divided into five treatments and six replications (15 birds in each replicate). Chickens were fed with (1) control (basal diet), (2) basal diet containing 1% zeolite, (3) basal diet containing 1% of zeolite-coated with 0.5% silver nanoparticles, (4) Basal diet containing with 0.15% organic acids and (5) Basal diet containing 1% of zeolite-coated with 0.5% of silver nanoparticles and 0.15% organic acids in with or without heat stress condition.

RESULTS: Results demonstrated the level of expression of cytochrome P450 in broilers fed zeolite (Z) in the 21st day of experiment, silver nanoparticles coated with zeolite in combination with organic acid (NSOA) in 42nd day without heat stress condition and silver nanoparticles coated with zeolite (NS) in day 42 with heat stress condition in intestine and liver had significant increase in expression in comparison with control (C) treatment ($P < 0.05$).

CONCLUSIONS: In conclusion, result showed that zeolite and silver nanoparticles were identified as inorganic, chemical and exogenous substances in liver and intestine and up-regulated expression of pollution biomarkers genes. Whereas this effect is not identified in organic acid.

Keywords: Silver nanoparticles, Xenobiotic, Biomarker, Cytochrome P450, Broiler chickens

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: hashemi711@yahoo.co.uk Tel/Fax: 017-32262008 / 017-32240013

How to cite this article:

Arabiyan, E., Hashemi, S., Yamchi, A., Davoodi, H., Rostami, S. (2020). Evaluation of Cytochrome P450 Gene Expression as Physiological Pollution Biomarkers in Broiler Chickens Fed Silver Nanoparticles. J Vet Res, 75(2), 233-241.

<https://doi.org/10.22059/jvr.2019.270423.2876>

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Names and sequence specific primers used for qRT-PCR.

Figure 1. RNA extracted from liver and intestine tissue with all treatments.

Figure 2. Synthesis of cDNA with reference and specific primers in liver and intestine with all treatments.

Figure 3. Melting curve in real-time PCR reaction for β -actin (right) and CYP2C45 specific primer (left).

Figure 4. Expression of CYP2C45 in 21st day of experiment in liver (right) and intestine (left) of broiler chickens.

Figure 5. Expression of CYP2C45 in 42nd day of experiment in liver (right) and intestine (left) of broiler chickens without heat stress.

Figure 6. Expression of CYP2C45 in 42nd day of experiment in liver (right) and intestine (left) of broiler chickens with heat stress.