Iranian Journal of Animal Science
Vol 50, No 1, Spring 2019 (79-88)
DOI: 10.22059/ijas.2019.261406.653649

علوم دامی ایران
دورۀ ۵۰، شمارۀ ۱، بهار ۱۳۹۸ (ص ۸۸-۷۹)

اثر یک خوراک غنی از ترکیبات فنلی بر بیان ژن‌های آمیلاز و β-Actin در بافت‌های کبد و پانکراس جوجه‌های گوشتی

اسما مرادعلی‌پور[۱*]، مصطفی محقق دولت‌آبادی[۲]، محمد هوشمند[۲] و موسی زرین[۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۲۰)

چکیده

این پژوهش به‌منظور بررسی میزان بیان ژن آمیلاز و β-Actin در بافت‌های کبد و پانکراس جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح مختلف میوه بلوط انجام شد. تعداد ۲۶۴ قطعه جوجه گوشتی با جیره شاهد (بدون میوه بلوط) و جیره‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد میوه بلوط تغذیه شدند. در پایان دوره آغازین و پایانی، از هر تیمار آزمایشی، ۶ قطعه جوجه به‌طور تصادفی انتخاب و نمونه‌گیری از بافت پانکراس و کبد انجام شد. جهت آنالیز بیان ژن از نرم‌افزارهای REST و SAS استفاده شد. از نرم‌افزار Bestkeeper 2004 نیز به‌منظور بررسی پایداری بیان ژن β-Actin استفاده شد. نتایج نشان داد که ژن β-Actin تحت تأثیر عوامل جنس، سن و تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت، بنابراین از آن به‌منظور نرمال سازی داده‌های بیان ژن استفاده شد. در سن ۲۱ روزگی، سطح mRNA ژن آمیلاز پانکراس در جوجه‌های گوشتی تیمار ۱۵ درصد نسبت به گروه شاهد، به‌طور معنی‌داری بالاتر بود (P<۰/۰۵). در سن ۴۲ روزگی، اختلاف معنی‌داری از نظر میزان بیان ژن آمیلاز کبد و پانکراس مشاهده نشد (P>۰/۰۵) همچنین، تغذیه جوجه‌ها با جیره حاوی ۲۰ درصد میوه بلوط، موجب افزایش وزن نسبی پانکراس شد (P<۰/۰۵). به‌طور کلی، نتایج این بررسی نشان داد بیان ژن آمیلاز پانکراس در گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۱۵ درصد میوه بلوط در سن ۲۱ روزگی افزایش معنی‌داری را نشان داد. در سایر موارد، بیان ژن‌ها تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند.

واژه‌های کلیدی: آمیلاز، سن، میوه بلوط، β-Actin، mRNA.

Effect of a Phenolic compounds-rich feedstuff on expression of amylase and β-Actin genes in liver and pancreas tissues of broilers

Asma Moradalipour[1*], Mostafa Muhaghegh-Dolatabady[2], Mohammad Houshmand[2] and Mousa Zarrin[3]
1, 2, 3. Former M.Sc. Student, Assocaite Professor and Assistnat Professor, Faculty of Agriculture Science, University of Yasouj, Yasouj, Iran
(Received: Jul. 4, 2018 - Accepted: Jul. 11, 2019)

ABSTRACT

This study was conducted to determine the amylase gene expression in liver and pancreas tissues of broiler chicks fed with two levels of oak acorn (OA) fruit. A total of 264 broiler chicks were fed a control diet (without oak) and diets containing 15 and 20% OA. At the end of starter and finisher period, 6 birds from each treatment were randomly selected and Tissue samples were taken from their pancreas and liver. REST and SAS software were used to analyze gene expression. The 2004 Bestkeeper software was also used to determine the sustainability of β-Actin gene expression. Results showed that β-Actin gene was not affected by sex, age and experimental treatments. Thus, it was used to normalize the gene expression data. At 21d of age, the level of mRNA of the pancreatic amylase gene was significantly higher in broilers fed with 15% OA compared to the control group (p<0.05). On d 42, significant differences in expression of liver and pancreas amylase gene were not observed (p>0.05). Also, feeding birds with diet containing 20% OA increased the relative weight of pancreas (p<0.05). In conclusion, the results showed that amylase gene expression in birds fed diets containing 15% OA significantly increased at 21d of age. In other cases, genes expression was not influenced by experimental treatments.

Keywords: Age, Amylase, β-actin, mRNA, Oak acorn.

* Corresponding author E-mail: moradalipoor.a70@gmail.com

مقدمه

امروزه گوشت مرغ به‌دلیل ارزش تغذیه‌ای بالا، هضم آسان، میزان کلسترول پایین و نیز ارزان بودن نسبت به گوشت قرمز، مورد تقاضای بیشتر مصرف‌کنندگان قرار گرفته است. بنابراین تأمین این منبع پروتئینی، یکی از چالش‌های مهم پیش‌روی صنعت پرورش طیور با توجه به هزینه بالای خوراک مصرفی می‌باشد. استفاده از منابع تغذیه‌ای جدید، ارزان قیمت، و در دسترس، امروزه یکی از موضوعات مورد بحث متخصصین و محققین می‌باشد. استفاده از منابع جدید تغذیه‌ای، نیازمند بررسی و شناخت تمامی مزیت‌ها و معایب احتمالی می‌باشد تا بتوان در زمان استفاده، بیش‌ترین بهره‌وری و کم‌ترین خطر و اختلال را به همراه داشت. بررسی تغییرات بیان ژن‌ها و کنترل خوراک مصرفی، قطعاً به حفظ سلامت، بهبود عملکرد و افزایش سطح تولید کمک خواهد کرد. یکی از خوراک‌های جایگزین که مورد توجه پرورش‌دهندگان قرار گرفته است، میوه بلوط می‌باشد که ۴۷ تا ۶۰ درصد آن را نشاسته تشکیل می‌دهد (Bouderoua *et al*., 2009). از طرفی این میوه حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنلی مانند تانن‌ها (Manach *et al*., 2004)، گالیک اسید، الاجیک اسید و مشتقات گالویل یا هگزا هیدروکسی دی فنوئیل می‌باشد (Rakic *et al*., 2006). از ویژگی‌های قابل تمایز تانن‌ها از دیگر ترکیبات فنلی، توانایی تشکیل کمپلکس نامحلول با ترکیبات مغذی جیره از جمله پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و آنزیم‌های گوارشی می‌باشد که با رسوب آن‌ها، موجب کاهش قابلیت هضم مواد خوراکی می‌شوند (Mueller-Harvey, 2006; Santos-Buelga & Scalbert, 2000). تانن‌ها موجب آسیب به برخی از اندام‌های داخلی بدن مانند کبد، معده (Kumar *et al*., 2007) و پانکراس می‌شوند و با اختلال در فعالیت آنزیم‌های هضم‌کننده نشاسته، قابلیت هضم غذا و انرژی مصرفی را کاهش می‌دهند (Bravo, 1998). همچنین ترکیبات فنلی تنظیم‌کننده بیان ژن هستند و می‌توانند فعالیت‌های آنزیمی و رونویسی را تغییر دهند (Kumari & Jain, 2012).

نشاسته منبع اصلی انرژی در جیره طیور است که حدود ۴۰ درصد خوراک را تشکیل می‌دهد. هیدرولیز نشاسته غالباً توسط فعالیت آمیلاز پانکراس در دوازدهه و ژوژنوم انجام می‌شود که اغلب پیوندهای گلیکوزیدی ۱-۴ در آمیلوز و آمیلوپکتین را هیدرولیز می‌کند (Lehmann & Robin, 2007). با توجه به اهمیت آنزیم آمیلاز در کنترل متابولیسم و هضم نشاسته، شناسایی تغییرات بیان این ژن لازم می‌باشد. لذا هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن آمیلاز در بافت پانکراس و کبد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد میوه بلوط در سنین ۲۱ و ۴۲ روزگی و ارتباط آن با وزن نسبی پانکراس و کبد بود.

استفاده از ژن مرجع مناسب، کاربردی‌ترین راهکار برای نرمال سازی داده‌های حاصل از Real time PCR است (Han *et al*., 2010). در مطالعات ارزیابی تغییرات بیان ژن‌ها ابتدا باید بیان ژن مرجع مورد نظر در شرایط آزمایشی بررسی شود و در صورت عدم تغییر بیان ژن، به‌عنوان استاندارد داخلی مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به این‌که در اغلب مطالعات مولکولی بدون توجه به جنس حیوان و نوع بافت مورد مطالعه، از ژن β-Actin به‌عنوان استاندارد داخلی استفاده می‌شود، بنابراین در این پژوهش تأثیر تفاوت جنسی، تیمارهای آزمایشی و سن بر بیان ژن β-Actin در بافت کبد و پانکراس جوجه‌های گوشتی مورد مطالعه قرار گرفت تا رهنمودی برای محققین در به کارگیری استاندارد داخلی مناسب ارائه گردد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۶۴ قطعه جوجه گوشتی یک‌روزه سویه کاب ۵۰۰ به‌صورت تصادفی به سه گروه آزمایشی اختصاص داده شد که در آن، گروه ۱ به عنوان شاهد با جیره بر پایه ذرت-کنجاله سویا (بدون استفاده از میوه بلوط) و گروه‌های ۲ و ۳ به ترتیب با جیره حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد میوه بلوط تا سن ۴۲ روزگی تغذیه شدند. میوه بلوط بدون هیچ‌گونه تغییری در میزان درصد دیگر مواد خوراکی جیره، جایگزین ذرت شد. هر گروه دارای ۴ تکرار و هر تکرار شامل ۲۲ قطعه جوجه (مخلوط نر و ماده) بود. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی (با مدل $Y=\mu+A_i+e_{ij}$ که μ میانگین، A_i اثر تیمار و e_{ij}

اثرات باقی‌مانده) انجام شد. جیره‌های آزمایشی با نرم‌افزار UFFDA و بر اساس توصیه‌های NRC (1994)، تنظیم شدند.

میزان ماده خشک، پروتئین، فیبر، عصاره فاقد ازت، عصاره اتری، خاکستر و تانن کل موجود در میوه بلوط مورد استفاده در این پژوهش به‌ترتیب ۹۱/۳۷، ۶/۵۳، ۵/۵۱، ۶۵/۴۵، ۱۲/۱۲، ۱/۷۶ و ۶/۰۸ درصد بود. در پایان دوره ۲۱ و ۴۲ روزگی، از هر گروه به‌طور تصادفی ۶ قطعه جوجه (۳ قطعه مرغ، ۳ قطعه خروس) انتخاب و پس از ثبت وزن زنده (با ترازوی دیجیتالی با دقت ۵ گرم)، کشتار شدند. پانکراس و کبد هر جوجه به‌طور کامل جدا و توزین (با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم) شدند. سپس ۱۰۰ میلی‌گرم از هر بافت با استفاده از تیغ استریل جدا و مراحل استخراج RNA کل طبق دستورالعمل کیت استخراج TRIzol شرکت دناژن تجهیز انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی به ترتیب با استفاده از UV اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به‌منظور ساخت قطعات ژنومی cDNA با استفاده از مسترمیکس لیوفیلیزه بایونیز شرکت تکاپوزیست و تحت شرایط دمای ۱۵ ℃ برای ۱ دقیقه، دمای ۵۰ ℃ برای ۶۰ دقیقه و دمای ۹۵ ℃ برای ۵ دقیقه انجام شد. توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای اختصاصی (ساخت شرکت تکاپوزیست) در جدول ۱ آورده شده است.

واکنش Real Time PCR با استفاده از کیت SYBR-Green PCR Master Mix (شرکت فرمنتاز) و دستگاه BIO RAD CFX, 96 انجام شد. برای هر نمونه دو تکرار در نظر گرفته شد و مخلوط واکنش (۱۰ میکرولیتر) شامل ۴ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین، ۳ میکرولیتر آب DNase Free، ۲ میکرولیتر cDNA سنتزشده، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر رفت و ۰/۵ میکرولیتر آغازگر برگشت (۱۰ پیکومول) بود. برنامه حرارتی مورد استفاده برای واکنش Real time PCR ژن β-Actin در مرحله واسرشته‌سازی، یک چرخه ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه بود و در ادامه ۴۵ چرخه شامل مرحله واسرشته‌سازی (دمای ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه)، اتصال آغازگرها (دمای ۵۶ °C به مدت ۳۰ ثانیه) و بسط آغازگرها (دمای ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه) تکرار گردید (Yang *et al*., 2013). برنامه حرارتی ژن آمیلاز نیز شامل دمای ۹۵ °C به مدت ۱ دقیقه، ۴۹ چرخه در شرایط دمایی ۹۵ ℃ به مدت ۱۰ ثانیه، ۵۵ ℃ به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ ℃ برای مدت زمان ۲۰ ثانیه بود (Jiang *et al*., 2008). از نرم‌افزار Bestkeeper 2004 (Pfaffl *et al*., 2004) و SAS 9.1 (SAS, Institute, 2003) به‌منظور بررسی پایداری و اثر عوامل آزمایشی بر بیان ژن β-Actin استفاده گردید. مقایسه‌ی بیان ژن آمیلاز بین تیمارهای آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار REST, 2009, V2.0.13 و براساس تفاوت n- برابری بیان ژن آمیلاز در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد میوه بلوط نسبت به جوجه‌های گوشتی گروه شاهد محاسبه گردید (Pfaffl *et al*., 2002). مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. آزمون ارتباط پارامتریک پیرسون نیز به‌منظور بررسی همبستگی بین مقدار mRNA ژن آمیلاز و وزن نسبی بافت‌ها مورد استفاده قرار گرفت. سطح معنی‌داری تست‌های آماری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های Real-Time PCR

Table 1. Properties of Primers used in Real-Time PCR

Gene	Accession Number	Sequence (5’-3’)	Amplicon Length (bp)	Reference
β-Actin	NM_205518	CTGTGCCCATCTATGAAGGCTA ATTTCTCTCTCGGCTGTGGTG	139	Yang *et al*, 2013
Amylase	NM_001001473	GACGGTCAGCCTTTCTCA TACACGCACTGCCTTCCT	184	Wen *et al*, 2012

نتایج و بحث

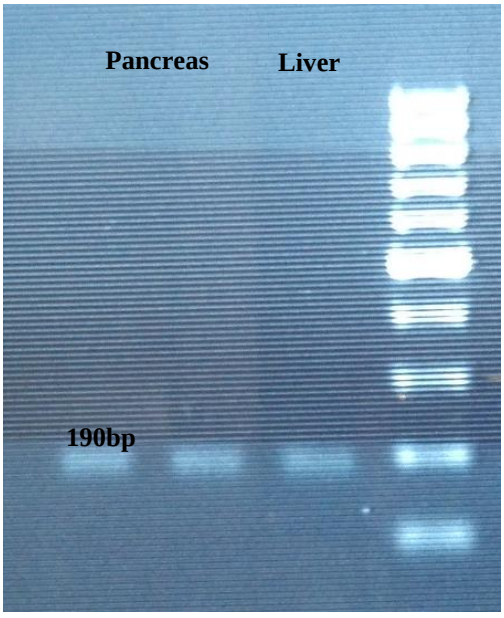
محصول تکثیری هر ژن بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد و تکثیر قطعات اختصاصی و عدم حضور محصولات غیر اختصاصی (پرایمر دایمر) تأیید شد (شکل ۱).

نتایج حاصل از بررسی تفاوت جنسی در بیان ژن β-Actin نشان داد که جنس تأثیری بر میزان بیان ژن β-Actin بافت کبد و پانکراس جوجه‌های گوشتی ندارد (شکل ۲، داده‌ها به‌صورت Mean±SEM ارائه شده‌اند)، در حالی که محققان دیگر تفاوت‌های وابسته به جنس در بیان ژن β-Actin را گزارش نموده‌اند (Verma & Shapiro, 2006).

همچنین داده‌های توصیفی ژن β-Actin، با نرم‌افزار Bestkeeper 2004 مورد بررسی قرار گرفت. انحراف استاندارد کمتر از یک (Pfaffl *et al*., 2004) و ضریب تغییرات پایین نشان‌دهنده آن است که ژن β-Actin تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی و حتی افزایش سن قرار نگرفت (جدول ۲). عدم معنی‌داری تأثیر فاکتورهای مختلف بر بیان این ژن، نشان‌دهنده پایداری بیشتر آن به‌خصوص در بافت پانکراس جوجه‌های گوشتی می‌باشد. اگرچه برخی از محققان گزارش کردند که بیان ژن β-Actin تحت تأثیر عوامل متعددی نظیر هورمون‌ها و عادت‌های غذایی قرار می‌گیرد (Janovick-Guretzky *et al*., 2007; Yamada *et al*., 1997).

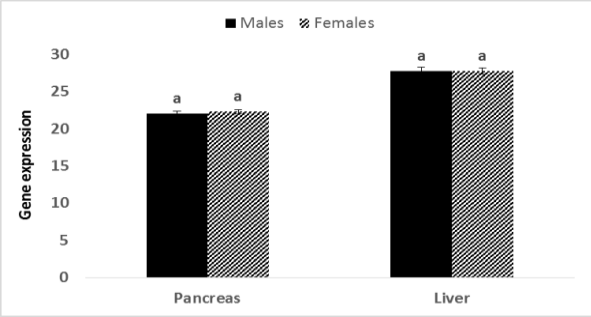
در این مطالعه بیان ژن β-Actin در بافت کبد جوجه‌های گوشتی ۴۲ روزه به‌طور قابل توجهی بالاتر از بیان این ژن در بافت پانکراس همان جوجه‌ها (CP ۲۱/۸۶ > CP ۲۷/۸۲) بود (جدول ۲). این نتایج با گزارش‌های قبلی مبنی بر یکسان بودن و عدم تغییر بیان این ژن در بافت‌های مختلف موش (Bustin, 2000; Radonic *et al*., 2004)، هم‌خوانی ندارد. این پژوهش برای اولین بار روی طیور انجام شد و نشان داد که ژن β-Actin تحت تأثیر شرایط آزمایشی، تیمارهای غذایی (میوه بلوط) و شرایط فیزیولوژیک (سن و جنس) قرار نگرفت، بنابراین به عنوان ژن مرجع مناسب برای نرمال کردن داده‌های بیان ژن استفاده شد.

نتایج اثر تیمارهای آزمایشی بر وزن نسبی پانکراس (شکل ۳) نشان داد که جوجه‌های تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۲۰ درصد میوه بلوط تا سن ۴۲ روزگی، افزایش معنی‌داری از نظر وزن نسبی پانکراس داشتند (P<۰/۰۵)، اما وزن بافت کبد تحت تأثیر تیمارهای مختلف آزمایشی قرار نگرفت (P>۰/۰۵).



شکل ۱. الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR ژن آمیلاز، مارکر M100

Figure 1. RT-PCR results of Amylase gene, Ladder: M100



شکل ۲. مقایسه بیان ژن β-Actin در بافت پانکراس و کبد جوجه‌های گوشتی نر و ماده

(حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد).

Figure 2. The Comparison of Actin-β gene expression in pancreas and liver tissues of male and female broilers

(different letters indicate a significant difference of P<0.05).

جدول ۲. داده‌های توصیفی ژن β-Actin

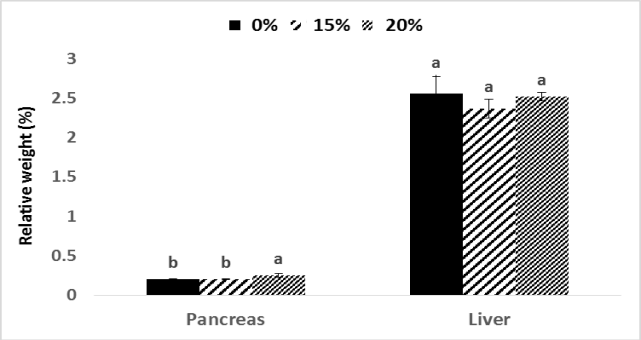
Table 2. Descriptive statistics of β-Actin gene

	Pancreas		Liver
	Day 21	Day 42	Day 42
N	18	18	18
Geometric Mean [CP]	22.57	27.82	21.86
Arithmetic Mean [CP]	22.61	27.83	21.89
Minimal Value [CP]	19.57	26.01	20.14
Maximal Value [CP]	25.59	29.10	24.11
Standard Deviation [± CP]	0.89	0.66	0.98
Coefficient of Variance [% CP]	3.95	2.37	4.48
*Min [x-fold]	-8.01	-3.50	-3.29
*Max [x-fold]	8.10	2.43	4.76
*SD [± x-fold]	1.86	1.58	1.97

*Min [x-fold] و Max [x-fold]: کمترین حد بیان و بیشترین حد بیان داده‌های موجود در یک گروه نسبت به میانگین داده‌ها

*SD [± x-fold]: انحراف استاندارد حد بیان

* Min [x-fold] and Max [x-fold]: the extreme values of expression levels expressed as an absolute x-fold over- or under-regulation coefficient.
SD [± x-fold]: standard deviation of the absolute regulation coefficient.



شکل ۳. اثر تیمارهای آزمایشی بر وزن نسبی پانکراس و کبد در سن ۴۲ روزگی

0%: جیره شاهد (بدون بلوط)، 15%: جیره حاوی ۱۵ درصد میوه بلوط، 20%: جیره حاوی ۲۰ درصد میوه بلوط.

(حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد).

Figure 3. Effect of treatments on relative weight of pancreas and liver at 42 d of age

0%: control diet based on corn-soybean meal, 15%: diet containing 15% oak acorn, 20%: diet containing 20% oak acorn.
(different letters indicate a significant difference of P<0.05).

تانن‌ها با تشکیل کمپلکس‌های غیرقابل هضم تانن-آنزیم، باعث مهار فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌شوند و هرگونه اختلال در عمل آنزیم‌ها باعث فعال شدن بی‌رویه پانکراس و بزرگ شدن غیر طبیعی آن می‌شود (Bravo, 1998). همچنین افزایش وزن نسبی پانکراس می‌تواند به‌دلیل پاسخ رشد تطبیقی در ارتباط با وجود تانن در روده باشد (Santos-Buelga & Scalbert, 2000). در این پژوهش تیمارهای آزمایشی بر وزن نسبی کبد اثر معنی‌داری نداشت که با نتایج پژوهش‌های دیگر (Rezaei & Semnaninejad, 2016; Bouderoua *et al*., 2009)، مطابقت دارد.

بیان ژن آمیلاز کبد بین گروه‌های مختلف تفاوت

معنی‌داری نداشت و در تیمارهای ۱۵ و ۲۰ درصد کاهش غیر معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵، جدول ۳). با توجه به اینکه کبد از اندام‌های حساس بدن در برابر هر گونه مسمومیت می‌باشد، می‌توان چنین تفسیر نمود که مواد ضد تغذیه‌ای موجود در بلوط مورد استفاده در این پژوهش به میزانی نبوده که برای جوجه‌ها مسمومیت ایجاد کند و باعث التهاب کبد شود. Sell & Rogler (1983) گزارش کردند که سطح آنزیم‌های کبدی در جوجه‌هایی که با جیره حاوی مقدار زیادی تانن تغذیه شده بودند، افزایش یافت. این محققین اظهار داشتند که این افزایش به‌دلیل فعالیت سم‌زدایی تانن به وسیله‌ی کبد می‌باشد.

در سن ۲۱ روزگی بیان ژن آمیلاز پانکراس در تیمار ۱۵ درصد نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). در سن ۴۲ روزگی، تفاوت معنی‌داری از نظر میزان بیان ژن آمیلاز پانکراس بین جوجه‌های گوشتی مشاهده نشد، اگر چه بیان ژن آمیلاز در تیمار ۲۰ درصد میوه بلوط، کاهش غیر معنی‌داری را نشان داد (جدول ۳).

نتایج قبلی ما نشان داد، جوجه‌هایی که از جیره حاوی ۱۵ درصد میوه بلوط به مدت ۲۱ روز استفاده کردند، مصرف خوراک بالاتری داشتند (Moradalipour *et al*., 2018). بنابراین می‌توان چنین تفسیر نمود که با افزایش مصرف خوراک و به دنبال آن دریافت مقادیر بیشتری از نشاسته، بیان ژن آمیلاز در این تیمار افزایش معنی‌داری داشته است. در واقع با افزایش مقدار مصرف نشاسته، جوجه‌ها قادر به افزایش ترشح آلفا آمیلاز پانکراس هستند (Moran, 1985). Xu *et al*. (2006) گزارش کردند که با مصرف خوراک حاوی مقادیر کمتر نشاسته، فعالیت آمیلاز پانکراس کاهش می‌یابد. میزان ترشح هر کدام از آنزیم‌های هضمی، نوع و میزان سوبسترا را در مواد غذایی تخمین می‌زند بنابراین سنتز آنزیم‌های پانکراس توسط ترکیب و مقدار خوراک تنظیم می‌شود (Brannon, 1990).

در این پژوهش غلظت کم تانن‌های جیره (۱۵ درصد میوه بلوط)، بیان ژن آمیلاز پانکراس را افزایش داد (۲۱ روزگی). در حالی که غلظت‌های بالای تانن خوراک، بیان ژن آمیلاز را به‌طور غیر معنی‌داری کاهش داده و با کاهش فعالیت این آنزیم، احتمالاً هضم نشاسته هم کاهش می‌یابد. چنین آثار مضر تانن‌ها روی هضم ممکن است در نتیجه یک کمپلکس منظم از تعاملات بین تانن‌ها و سوبستراها و تعاملات بین تانن‌ها و آنزیم‌ها باشد که تحت تأثیر شرایط درون دستگاه گوارش قرار می‌گیرد (Longstaff & McNab, 1991). دلیل افزایش در بیان ژن آمیلاز پانکراس در سن ۲۱ روزگی را می‌توان به توسعه نیافتن دستگاه گوارش و نیز عادت پذیر نبودن با مواد غذایی حاوی تانن هم نسبت داد. در این پژوهش با افزایش سن جوجه‌ها (۴۲ روزگی)، تغییر معنی‌داری در بیان ژن آمیلاز مشاهده نشد و جوجه‌هایی که غلظت بالایی از تانن (۲۰ درصد) را مصرف کرده بودند، با افزایش اندازه پانکراس توانستند با مهارکننده‌های آمیلاز سازگاری پیدا کنند که با نتایج تحقیقات دیگر مطابقت دارد (Bouderoua *et al*., 2009; Macri *et al*., 1977). این در حالی است که با افزایش سن، فعالیت آمیلاز نیز افزایش می‌یابد (Mahmood *et al*., 1997).

جدول ۳. بیان نسبی ژن آمیلاز

Table 3. Relative expression of amylase gene

Tissue	Age	Treatment	Expression	P(H1)	Result
Pancreas	Day 21	15%	5.938	0.026	UP- regulated
		20%	1.408	0.643	-
		20% to 15%	0.237	0.075	-
Pancreas	Day 42	15%	1.353	0.568	-
		20%	0.574	0.366	-
		20% to 15%	0.424	0.191	-
Liver	Day 42	15%	0.958	0.945	-
		20%	0.796	0.773	-
		20% to 15%	0.830	0.821	-

15%: جیره حاوی ۱۵ درصد میوه بلوط نسبت به شاهد، 20%: جیره حاوی ۲۰ درصد میوه بلوط نسبت به شاهد، 20% to 15%: جیره حاوی ۲۰ درصد میوه بلوط نسبت به جیره حاوی ۱۵ درصد میوه بلوط.

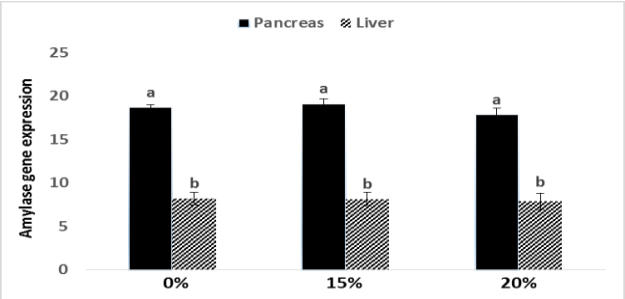
15%: diet containing 15% oak acorn, 20%: diet containing 20% oak acorn, 20% to 15%: diet containing 20% oak acorn in comparison to diet containing 15% oak acorn.

پژوهش‌های انجام‌شده بر روی خوک نشان داده است که با افزایش سن، فعالیت آمیلاز و پروتئازهای معده به علت افزایش در وزن بافت و فعالیت آنزیم در هر گرم بافت، افزایش می‌یابد (Lindemann *et al*., 1986).

نتایج حاصل از مقایسه بیان ژن آمیلاز پانکراس نسبت به آمیلاز کبد (شکل ۴) نشان داد که در همه تیمارها بیان ژن آمیلاز در بافت پانکراس بسیار بالاتر از بیان این ژن در بافت کبد می‌باشد (P<۰/۰۵). این نتایج می‌تواند مؤید این واقعیت باشد که پانکراس جوجه گوشتی مکان غنی از فعالیت آمیلاز بوده و آمیلاز در درجه اول توسط پانکراس تولید می‌شود (Mocharla *et al*., 1990).

وزن پانکراس تنظیم‌کننده تولید و ترشح آمیلاز می‌باشد (Wang *et al*., 1998). تغییر در وزن پانکراس می‌تواند نتیجه تفاوت در مقدار آلفا آمیلاز کل باشد (Swanson *et al*., 2000). نتایج این مطالعه نشان داد که در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمار ۲۰ درصد میوه بلوط تا سن ۴۲ روزگی، بیان ژن آمیلاز تمایل به کاهش داشته و وزن نسبی پانکراس در این جوجه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، اما همبستگی بین آن‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۴). تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که سنتز آلفا آمیلاز ممکن است باعث تأخیر در رشد پانکراس شود (Barrett *et al*., 2013). بین بیان ژن آمیلاز پانکراس و وزن نسبی پانکراس در جوجه‌های ۴۲ روزه با تیمار ۱۵ درصد، همبستگی مثبت، مستقیم و شدیدی مشاهده شد (r=۰/۹۳، P<۰/۰۱)، اما بین بیان ژن آمیلاز کبد و وزن نسبی کبد همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۴).

نتایج یک پژوهش نشان داد که مصرف میوه درخت سال (*Shorea robusta*) که حاوی مقدار زیادی تانن می‌باشد باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های تریپسین، کیموتریپسین، آلفا آمیلاز و دی‌پپتیداز در روده و افزایش اندازه پانکراس در جوجه‌های گوشتی شد. فعالیت پایین‌تر آلفا آمیلاز در پانکراس پرندگان تغذیه شده با دانه سال ممکن است به‌دلیل کاهش سنتز و ترشح این آنزیم به روده باشد (Mahmood *et al*., 1997). طی پژوهشی نشان داده شد که بازدارنده‌های پروتئاز موجود در سویا، ترشح آنزیم‌های آمیلاز، تریپسین، کیموتریپسین و پانکراتوپپتیداز پانکراس را افزایش، اما فعالیت آمیلاز و تریپسین را در مجرای روده کاهش دادند و با آزادسازی کوله‌سیستوکینین، سبب بزرگ شدن پانکراس شدند (Gueguen *et al*., 1993).



شکل ۴. مقایسه بیان ژن آمیلاز پانکراس نسبت به آمیلاز کبد در سن ۴۲ روزگی

0%: جیره شاهد (بدون بلوط)، 15%: جیره حاوی ۱۵ درصد میوه بلوط، 20%: جیره حاوی ۲۰ درصد میوه بلوط.

(حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد).

Figure 4. The Comparison of pancreatic amylase gene expression compared to liver amylase at 42 days of age

0%: control diet based on corn-soybean meal, 15%: diet containing 15% oak acorn, 20%: diet containing 20% oak acorn.

(different letters indicate a significant difference of P<0.05).

جدول ۴. همبستگی بین بیان ژن آمیلاز و وزن نسبی بافت

Table 4. Correlation between amylase gene expression and tissue relative weight

Treatment	Pancreas (%)				Liver (%)	
	Day 21		Day 42		Day 42	
	*r	p-value	R	p-value	r	p-value
0 %	0.40	0.43	0.22	0.73	-0.14	0.79
15 %	-0.65	0.16	0.93	0.007	0.70	0.20
20 %	-0.008	0.99	-0.36	0.48	0.89	0.07

* r: coefficient of correlation

پاسخ متفاوت آلفا آمیلاز در پژوهش‌های مختلف ممکن است به علت تنظیم آن توسط انسولین باشد (Croom *et al*., 1992). مطالعات انجام شده بر روی موش نیز نشان داده‌اند که تانن‌ها باعث افزایش تولید تمام آنزیم‌های گوارشی توسط لوزالمعده می‌شوند و مهار آنزیم‌ها در روده رخ می‌دهد (Griffiths & Moseley, 1980). اسید فیتیک نیز می‌تواند از طریق تعامل با آنزیم آمیلاز و یا با اتصال به کلسیم که یک کوفاکتور برای فعالیت آمیلاز است، هضم نشاسته را تحت تأثیر قرار دهد (Yoon, 1983). پژوهش‌های پزشکی نشان داد که رابطه مستقیم بین مقدار تانن خوراک و مهار آمیلاز وجود دارد (Adetunji *et al*., 2013). در واقع مقدار و ساختار این ترکیبات، درجه مهارکنندگی را تعیین می‌کند (Lo Piparo *et al*., 2008; McDougall *et al*., 2005)، اما باید گفت که همه تانن‌ها قادر به مهار آمیلاز نیستند (De Sales *et al*., 2012). بنابراین طبق نتایج این پژوهش، احتمال می‌رود که تانن و ترکیبات فنلی موجود در سطح بلوط مورد استفاده در جیره (۱۵ و ۲۰ درصد جیره) به اندازه‌ای نباشد که موجب بروز اثرات مضر شود ولی از آن‌جایی که هدف تولیدکنندگان دام و طیور، افزایش سریع وزن در مدت زمان اندک می‌باشد، این گونه ترکیبات فنلی باید با احتیاط مصرف شوند.

در این پژوهش تأثیر مصرف میوه بلوط تنها در سطح رونویسی بررسی شده است ولی احتمال می‌رود که ترکیبات فنلی موجود در میوه بلوط بیشترین تأثیرات خود را در سطوح پس از رونویسی اعمال کنند. Wen *et al*. (2012) با انجام پژوهشی نشان دادند که با مصرف مکمل آنزیمی (شامل فیتاز، زایلاناز، سلولاز، آلفا آمیلاز و پروتئاز) توسط مرغ‌های تخم‌گذار، بیان ژن آمیلاز پانکراس در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت. همچنین مصرف مکمل آنزیمی در مرغ‌های تخم‌گذار، فعالیت‌های آنزیمی را در محتویات روده‌ای افزایش داد. این محققین نشان دادند که کاهش بیان ژن آمیلاز پانکراس، با کاهش فعالیت‌های آنزیم پانکراس همراه نیست، بنابراین بیان ژن آمیلاز نه تنها در سطح رونویسی بلکه در سطح پس از رونویسی تنظیم می‌شود (Swanson *et al*., 2000). افزایش بیان ژن‌ها در این مطالعه بیانگر افزایش پروتئین مورد نظر نیست و نیاز به بررسی در سطح پروتئین دارد ولی این افزایش و کاهش بیان می‌تواند نقطه شروع پاسخ‌های مولکولی باشد.

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از میوه بلوط در جیره جوجه‌های گوشتی تا سن ۲۱ روزگی اگر چه باعث افزایش بیان ژن آمیلاز پانکراس در تیمار ۱۵ درصد شد ولی سبب بروز هایپرتروفی پانکراس و کبد نشد. افزایش در بیان ژن آمیلاز در این جوجه‌ها، می‌تواند یک پاسخ سازشی در برابر مصرف بالای خوراک حاوی ۱۵ درصد میوه بلوط باشد. استفاده از سطوح ۱۵ و ۲۰ درصد میوه بلوط تا سن ۴۲ روزگی، تأثیری بر بیان ژن آمیلاز کبد نداشت. همچنین استفاده از این میوه تا سن ۴۲ روزگی، بیان ژن آمیلاز پانکراس را تغییر نداد ولی چون در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمار ۲۰ درصد، بیان ژن آمیلاز کاهش غیر معنی‌داری داشت و از طرفی هایپرتروفی پانکراس مشاهده شد، بنابراین پیشنهاد می‌شود برای جلوگیری از اختلال در هضم نشاسته، از سطوح پایین‌تر میوه بلوط (۱۵ درصد) استفاده شود. در این مطالعه تیمارهای آزمایشی و جنس بر بیان ژن β-Actin در هر دو بافت کبد و پانکراس تأثیری نداشتند، بنابراین ژن β-Actin یک ژن مرجع مناسب برای نرمال‌سازی داده‌های حاصل از بیان ژن‌های بافت پانکراس و کبد در جوجه می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از دکتر رضا محمودی، مدیریت پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج که در به انجام رسیدن این پژوهش همکاری داشتند، تشکر و قدردانی نمایند.

REFERENCES

1. Adetunji, A. I., Khoza, S., de Kock, H. L. & Taylor, J. R. N. (2013). Influence of sorghum grain type on wort physico-chemical and sensory quality in a whole-grain and commercial enzyme mashing process. *Journal of the Institute of Brewing*, 119, 156-163.

2. Barrett, A., Ndou, T., Hughey, C. A., Straut, C., Howell, A., Dai, Z. & Kaletune, G. (2013). Inhibition of α-amylase and glucoamylase by tannins extracted from cocoa, pomegranates, cranberries, and grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1477-1486.
3. Bouderoua, K., Mourot, J. & Selselet-Attou, G. (2009). The effect of green oak acorn (*Quercus ilex*) based diet on growth performance and meat fatty acid composition of broilers. *Asian Australasian Journal of Animal Science*, 6, 843-848.
4. Brannon, P. M. (1990). Adaptation of the exocrine pancreas to diet. *Annual Review of Nutrition*, 10, 85-105.
5. Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
6. Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using realtime reversetranscription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 169-193.
7. Croom, W. J. J.r., Bull, L. S. & Taylor, I. L. (1992). Regulation of pancreatic exocrine secretion in ruminants: A review. *Journal of Nutrition*, 122, 191-202.
8. De Sales, P. M., Souza, P. M., Simeoni, L. B., Magalhaes, P. O. & Damaris, S. (2012). α-Amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15, 141-183.
9. Griffiths, D. W. & Moseley, G. (1980). The effect of diets containing field beans of high and low polyphenolic content on the activity of digestive enzymes in the intestine of rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31, 255-259.
10. Gueguen, J., Van Oort, M. G., Quillien, L. & Hessing, M. (1993). The composition, biochemical characteristics and analysis of proteinaceous antinutritional factors in legume seeds. *Publication-European Association for Animal production*, 70, 9-9.
11. Han, L. Q., Yang, G. Y., Zhu1, H. S., Wang, Y. Y., Wang, L. F., Guo, Y. J., Lu1, W. F., Li, H. J. & Wang, Y. L. (2010). Selection and use of reference genes in mouse mammary glands. *Genetics and Molecular Research*, 9(1), 449-456.
12. Janovick-Guretzky, N. A., Dann, H. M., Carlson D. B., Murphy, M. R., Loor, J. J. & Drackley, J. K. (2007). Housekeepinggene expression in bovine liver is affected byphysiological state, feed intake, and dietary treatment. *Journal of Dairy Science*, 90, 2246-2252.
13. Jiang, Z., Zhou, Y., Lu, F., Han, Z. & Wang, T. (2008). Effects of different levels of supplementary alpha-amylase on digestive enzyme activities and pancreatic amylase mRNA expression of young broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21, 97-102.
14. Kumar, V., Elangovan, A. V., Mandal, A. B., Tyagi, P. K., Bhanja, S. K. & Dash, B. B. (2007). Effects of feeding raw and reconstituted high tannin red sorghum on nutrient utilization and certain welfare parameters of broiler chickens. *British Poultry Science*, 48, 198-204.
15. Kumari, M. & Jain, S. (2012). Tannins: an antinutrient with positive effect to manage diabetes. *Research Journal of Recent Sciences*, 1(12), 1-8.
16. Lehmann, U. & Robin, F. (2007). Slowly digestible starch- its structure and health implications: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 18, 346-355.
17. Lindemann, M. D., Cornelius, S. G., El Kandelgy, S. M., Moser, R. L. & Pettigrew, J. E. (1986). Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in the piglet. *Journal of Animal Science*, 62(5), 1298-1307.
18. Lo Piparo, E., Scheib, H., Frei, N., Williamson, G., Grigorov, M. & Chou, C. J. (2008). Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human α-amylase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(12), 3555-3561.
19. Longstaff, M. A. & McNab, J. M. (1991). The effect of concentration of tannin-rich bean hulls (*Vicia faba* L.) on activities of lipase (EC 3.1. 1.3) and α-amylase (EC 3.2. 1.1) in digesta and pancreas and on the digestion of lipid and starch by young chicks. *British Journal of Nutrition*, 66(01), 139-147.
20. Macri, A., Parlamenti, R., Silano, V. & Valfre, F. (1977). Adaptation of the domestic chicken. Callus Domesticus, to continuous feeding of albumin amylase inhibitors from wheat flour as gastro-resistant microgranules. *Poultry Science*, 56, 434-441.
21. Mahmood, S., Smithard, R. & Sarwar, M. (1997). Effects of salseed (Shorea robustal) tannins, restricted feed intake and age on relative pancreas weight and activity of digestive enzymes in male Broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 65(1), 215-230.
22. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of clinical nutrition*, 79, 727-747.
23. McDougall, G. J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A. & Stewart, D. (2005). Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α-amylase and α-glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2760-2766.

24. Mocharla, H., Mocharla, R. & Hodes, M. E. (1990). α-Amylase gene transcription in tissues of normal dog. *Nucleic Acids Research*, 18, 1031-1036.
25. Moradalipour, A., Muhaghegh-Dolatabady, M. & Houshmand, M. (2019). Effects of Different Levels of oak acorn in the diet on Pancreatic Weight and expression of pancreatic Charboxypeptidase gene in Broiler Chickens. *Journal of Animal Science* (Pajuhesh and Sazandegi), 31(121), 39-52. (In Farsi).
26. Moran, E. T. (1985). Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through perinatal development. *Journal of Nutrition*, 115, 665-674.
27. Mueller-Harvey, I. (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2010-2037.
28. National Research Council. (1994). *Nutrient requirements of poultry*. (9th Ed.). National Academy Press. Washington, DC.
29. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), 36-36.
30. Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, 26(6), 509-515.
31. Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W. & Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313, 856-862.
32. Rakic, S., Povenovic, D., Tesvic, V., Simic, M. & Maletic, R. (2006). Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in function food. *Journal of Food Engineering*, 74, 416-423.
33. Rezaei, M. & Semnaninejad, H. (2016). Effects of Different Levels of Raw and Processed Oak Acorn (*Quercus castaneifolia*) on Performance, Small Intestine Morphology, Ileal Digestibility of Nutrients, Carcass Characteristics and Some Blood Parameters in Broiler Chickens. *Poultry Science Journal*, 4(2), 127-138.
34. Santos-Buelga, C. & Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tanninlike compounds nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1094-1117.
35. SAS Institute [computer software]. (2003). SAS User's Guide. Version 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.
36. Sell, D. R. & Rogler, J. C. (1983). Effects of sorghum grain tannins and dietary protein on the activity of liver UDP-glucuronyltransferase. *Experimental Biology and Medicine*, 174, 93-101.
37. Swanson, K. C., Matthews, J. C., Matthews, A. D., Howell, J. A., Richards, C. J. & Harmon, D. L. (2000). Dietary carbohydrate source and energy intake influence the expression of pancreatic α-amylase in lambs. *Journal of Nutrition*, 130(9), 2157-2165.
38. Verma, A. S. & Shapiro, B. H. (2006). Sex-dependent expression of seven housekeeping genes in rat liver. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21, 1004-1008.
39. Wang, X. B., Ogawa, T., Suda, S., Taniguchi, K., Uike, H., Kumagai, H. & Mitani, K. (1998). Effects of nutritional level on digestive enzyme activities in the pancreas and small intestine of calves slaughtered at same body weight. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 11, 375-380.
40. Wen, C., Wang, L. C., Zhou, Y. M., Jiang, Z. Y. & Wang, T. (2012). Effect of enzyme preparation on egg production, nutrient retention, digestive enzyme activities and pancreatic enzyme messenger RNA expression of late-phase laying hens. *Animal Feed Science and Technology*, 172, 180-186.
41. Xu, M., Yao, J. H., Wang, Y. H. & Wang, F. N. (2006). Influence of rumen escape starch on α-amylase activity in pancreatic tissue and small intestinal digesta of lambs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19, 1749-1754.
42. Yamada, H., Chen, D., Monstein, H. J. & Hakanson, R. (1997). Effects of fasting on the expression of gastrin, cholecystokinin, and somatostatin genes and of various housekeeping genes in the pancreas and upper digestive tract of rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 231, 835-838.
43. Yang, F., Lei, X., Rodriguez-Palacios, A., Tang, C. & Yue, H. (2013). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in chicken embryo fibroblasts infected with avian leukosis virus subgroup. *BMC research notes*, 6(1), 1.
44. Yoon, J. H. (1983). The effect of phytic acid on in vitro rate of starch digestibility and blood glucose response. *American Journal of Clinical Nutrition*, 38, 835-842.