نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۴ شماره ۱/ سال۱۳۹۳

تأثیر ترکیب جیره بر بیان ژن برخی آنزیم‌های کبدی دخیل در متابولیسم در بره‌های پرواری

الهه یزدانخواه[۱]، علی حسین‌خانی*[۲]، حسین دقیق کیا[۳]، سید علیرضا وکیلی[۴] و حسن صدری[۵]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۰

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه تبریز
[۲] استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه تبریز
[۳] دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه تبریز
[۴] دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد
[۵] استادیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز
*مسئول مکاتبه: Email:a.hosseinkhani@tabrizu.ac.ir

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی تاثیر ترکیب جیره بر متابولیت‌های خونی و بیان ژن برخی آنزیم‌های کبدی انجام گرفت. از ۱۸ رأس بره نر آمیخته (قزل- مرینوس، قزل- بلوچی و مرینوس- مغانی) در سه گروه آزمایشی استفاده شد. دانه جو به عنوان بخش عمده جیره در دو سطح ۵۰ و ۱۰۰ درصد با پسماند رستوران جایگزین گردید. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱) جیره کنترل (بدون پسماند رستوران)، ۲) جایگزینی ۵۰ درصد دانه جو با پسماند رستوران و ۳) جایگزینی ۱۰۰ درصد جو با پسماند رستوران بودند. جیره‌ها به صورت کاملا مخلوط و سه بار در روز به مدت ۱۱۰ روز به گوسفندان تغذیه شدند. نمونه‌های بافت کبد در انتهای آزمایش برای مطالعه بیان ژن مربوط به آنزیم های آسپارتات آمینوترانسفراز و فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز گرفته شدند. اثر تیمارهای آزمایشی روی غلظت گلوکز پلاسمای خون معنی‌دار بود (P<۰/۰۵)، اما غلظت نیتروژن اوره‌ای و بتا هیدروکسی بوتیرات خون را تحت تأثیر قرار ندادند. از طرف دیگر، دوره‌های آزمایشی بر غلظت گلوکز پلاسمای خون تأثیر معنی‌داری نداشتند، اما این اثر برای غلظت نیتروژن اوره‌ای و بتا هیدروکسی بوتیرات خون معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). بیان ژن آنزیم‌های آسپارتات آمینو ترانسفراز و فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز تحت تاثیر جیره‌های خوراکی تغییر یافت (P<۰/۰۵). نتایج این مطالعه نشان داد تغییر اقلام جیره با تاثیر بر فرآیند هضم و جذب و تغییرغلظت متابولیت‌های خونی، بیان ژن مربوط به آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز از آنزیم‌های کلیدی دخیل در متابولیسم را تغییر داد.

واژگان کلیدی: آسپارتات آمینو ترانسفراز، بره‌های پرواری، بیان ژن، فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز، متابولیت‌های خونی

مقدمه

تغذیه حیوانات مزرعه‌ای با حداقل هزینه و بهره‌دهی بالا مهم‌ترین عامل در پرورش اقتصادی دام به شمار می‌رود. یکی از روش‌های کاهش هزینه پرورش دام، کاهش هزینه‌های تغذیه است که بالغ بر ٦٠ تا ٧٠ درصد هزینه‌های پرورش را شامل می‌شود. استفاده از ضایعات و پسماند ها در تغذیه دام به‌عنوان یکی از راهکارهای مهم به ویژه در سیستم‌های پرورش صنعتی و نیمه صنعتی می‌باشد. تحقیقات متعددی جهت استفاده از پسماندها، علی الخصوص پسماند رستوران در جیره نشخوارکنندگان صورت گرفته است (مرادی و همکاران ۱۳۹۲، والکر و همکاران ۱۹۹۸ و ۲۰۰۲). این تحقیقات حاکی از عملکرد تقریبا یکسان حیوانات به هنگام جایگزینی پسماند رستوران با مواد خوراکی معمول در تغذیه چه از نظر عملکرد دام و چه از نظر ارزش تغذیه‌ای و قابلیت هضم بوده است.

ترکیبات بیواکتیو موجود در خوراک می‌توانند با ژن‌های مؤثر بر عوامل نسخه برداری، بیان پروتئین و تولید متابولیت‌ها اثر متقابل داشته باشند. نوتریژنومیک یا ژنومیک تغذیه‌ای، اثر خوراک و اجزای تشکیل دهنده آنها روی بیان ژن‌ها و چگونگی رونویسی DNA به mRNA و سپس تولید پروتئین را بررسی می‌کند. بنابر این افزایش آگاهی در زمینه روش‌های نوتریژنومیک، توانمندی محققین را در حفظ سلامتی، بهبود عملکرد دام و ارتقای سطح تولید شیر و گوشت ارتقا می‌بخشد. روش‌های زیست ملکولی پیشرفته حاصل از اطلاعات حیوانی مانند افزایش وزن و یا ترکیب و تولید شیر، امکان ایجاد دگرگونی شگرفی را در تغذیه دام برای الحاق اطلاعات کد شده در ژنوم، جهت به کارگیری در تغذیه دام مهیا می‌نماید (وایشالی و همکاران ۲۰۰۱).

با توجه به جایگاه مهم کبد در متابولیسم و تغذیه، به نظر می رسد که بررسی فعالیت آنزیم‌های کبدی مشارکت کننده در متابولیسم، آگاهی ما را از تعاملات موجود بین تغذیه و عملکرد حیوان افزایش دهد. آنزیم‌های آسپارتات آمینو ترانسفراز و فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز از مهم‌ترین آنزیم‌های کبدی دخیل در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها هستند. بنابر این هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی بیان ژن این آنزیم‌ها و همچنین مطالعه ارتباط آن با برخی تغییرات در متابولیت‌های خونی به منظور مشخص نمودن تغییرات احتمالی در وضعیت متابولیکی دام‌ها در اثر استفاده از پسماند رستوران بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۱۸ رأس بره نر آمیخته شامل: قزل × مرینوس (۱۲ راس)، مرینوس × مغانی (۱۸ راس) و قزل × بلوچی (٦ راس) استفاده گردید. پسماند رستوران در دو سطح ۵۰ و ۱۰۰ درصد جایگزین دانه جو در جیره‌های غذایی مورد آزمایش گردیده و به همراه گروه کنترل (جیره فاقد پسماند) گروه‌های آزمایشی را تشکیل دادند. خوراک طی سه وعده در ساعات ٦، ١٤ و ٢٠ و به صورت انفرادی در اختیار بره‌ها قرار گرفت. در تمام تیمارها نسبت علوفه به کنسانتره ۳۰ به ۷۰ درصد بود. جیره‌های آزمایشی با استفاده از جداول استاندارد NRC (۱۹۸۵) تنظیم گردیدند. اجزای تشکیل دهنده جیره‌های آزمایشی در جدول ۱ نشان داده شده است.

نمونه‌گیری و ثبت نتایج: بره ها به مدت ۱۱۰ روز با استفاده از جیره‌های آزمایشی تغذیه و پروار شدند. ۲۰روز اول این دوره به عادت پذیری به محیط آزمایش و جیره‌های آزمایشی اختصاص یافت. در طول دوره پروار، در سه نوبت با فواصل زمانی برابر (ماه‌های اول، دوم و سوم دوره اصلی پروار) از بره‌ها خون‌گیری به عمل آمد. پس از سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه (با ۳۰۰۰ دور در دقیقه)، پلاسمای خون جدا شده و تا زمان تجزیه آزمایشگاهی برای تعیین گلوکز، نیتروژن اوره‌ای خون و بتاهیدروکسی بوتیرات در دمای $-20^{\circ}C$ نگهداری شدند. اندازه‌گیری متابولیت‌ها با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون (گلوکز:

QC.M.87.23.3، نیتروژن اوره‌ای خون: QC.M.89.71.4) و بتاهیدروکسی بوتیرات (Co.Antrim,United Kingdom, BT29 4QY) و توسط دستگاه اسپکتروفتومتری (Spekol 1500 Germany) انجام شد. پس از پایان دوره پرواربندی تمام گوسفندان کشتار شده و نمونه‌های بافت کبدی از آنها برای مطالعه بیان ژن آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز گرفته شد. نمونه‌های بافت کبد بلافاصله در محلول تثبیت کننده RNA Later (شرکت کیاژن) به مدت یک روز در دمای ٤ $^{\circ}C$ نگهداری شده و سپس تا زمان آنالیز به فریزر با دمای ۲۰ $^{\circ}C$- انتقال یافتند.

جدول ۱- اجزاء و ترکیب شیمیایی تیمارهای مورد آزمایش [۱]

		کنترل	تیمار ۵۰	تیمار ۱۰۰
اجزای جیره ها				
(درصد ماده خشک)	یونجه	۱۵	۱۵	۱۵
	کاه گندم	۱۵	۱۵	۱۵
	دانه سورگوم	۷	۷	۷
	دانه جو	۳۸	۱۹	۰
	پسماند رستوران	۰	۱۹	۳۸
	سبوس گندم	۱۸	۱۸	۱۸
	تفاله چغندر قند	۵	۵	۵
	ملاس چغندر قند	۱	۱	۱
	مکمل مواد معدنی و ویتامینی	۰/۵	۰/۵	۰/۵
	نمک	۰/۵	۰/۵	۰/۵
ترکیبات شیمیایی				
	ماده خشک	۸۹/۱±۱/۸	۸٤/۱±۲/۲	۸۱/۸±۲/٦
	پروتئین خام	۱۱/۹±۲/۲	۱۲/۳±۳/۰	۱۲/۷±۳/۲
	عصاره اتری	۲/۱±۰/۸	٤/۳±۲/۱	٦/۷±۳/٦
	دیواره سلولی	۳۸/۵±۲/۵	۳۷/٦±۳/۳	۳۵/۵±٤/٤
	دیواره سلولی بدون همی سلولز	۱۹/۵±۱/۷	۱۹/٤±۲/۲	۱۹/٤±۲/۹
	انرژی قابل متابولیسم(مگا کالری در کیلوگرم ماده خشک)	۲/٦±۰/۳	۲/۷±۰/۸	۲/۷±۱/۳

[۱]تیمار کنترل (فاقد پسماند رستوران) ، تیمار ۵۰: جیره حاوی ۵۰ درصد پسماند جایگزین با جو تیمار۱۰۰: جیره فاقد جو (۱۰۰ درصد پسماند رستوران).

بیان ژن آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز

استخراج RNA: استخراج RNA از نمونه‌های کبدی، با استفاده از کیت استخراج AccuzolTM Total RNA Extraction Reagent (Gentaur Ltd. Howard Frank Turnberry, London, UK شرکت BIONEER و بر اساس پروتکل پیشنهادی انجام گرفت. بر اساس این پروتکل و به طور خلاصه ابتدا نمونه‌های بافت کبد به‌کمک نیتروژن مایع، به صورت پودر یکنواختی (هموژن) در آمد. سپس ۰/۱ میلی گرم از این پودر را در میکروتیوب

قرار داده و ۱/۵ میلی لیتر از محلول Accuzol به آن اضافه کرده و به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شد. میکروتیوب‌های حاوی نمونه در ٤°C و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ انکوبه شدند. به میکروتیوب‌ها ۲۰۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم: ایزوآمیل الکل (با نسبت ٤۹:۱) اضافه کرده و محتویات داخل میکروتیوب‌ها مخلوط گردید. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤°C انکوبه شده سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰g و در دمای ٤°C سانتریفوژ شدند. بخش شفاف بالایی حاوی RNA با احتیاط به میکروتیوب تمیز ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد. به تمام میکروتیوب‌ها به طور یکسان ایزوپروپانل به میزان ٤۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. محتویات داخل میکروتیوب‌ها مخلوط شده و سپس در داخل فریزر تحت دمای ۲۰°C- و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. مجددا میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰g در ٤°C سانتریفوژ شدند. پس از سانتریفیوژ بخش بالایی مایع حذف گردیده (حذف سوپرناتانت) و به منظور حفظ رسوب RNA، به کمک پمپ هوا عمل خشک کردن انجام گرفت. سپس یک میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ سرد به میکروتیوب‌ها افزوده شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰g در ٤°C سانتریفوژ شده و سپس با احتیاط سوپرناتانت داخل میکروتیوب‌ها حذف گردید. رسوب باقیمانده در دمای ٦۰°C به مدت ۵ دقیقه خشک گردید. در مرحله بعد رسوب حاصله در آب دارای ماده DEPC (Diethylpyrocarbonate) حل گردید. در مرحله بعد RNA استخراج شده جهت سنتز cDNA استفاده شد. جهت سنتز cDNA از کیت (RevertAid^{TM} HMinus) و طبق پروتکل شرکت سازنده استفاده شد و تا زمان آنالیز cDNA سنتز شده در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

طراحی پرایمرها: ژن‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز و ژن GAPDH به ترتیب به عنوان ژن‌های هدف و ژن مرجع انتخاب شدند. سپس با اخذ توالی ژن‌ها از سایت http://www.ncbi.nlm.nih.gov، پرایمرهای اختصاصی طراحی گردید. با استفاده از نرم افزار BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) از عدم وجود همولوژی و مکمل بودن توالی پرایمرها با توالی‌های نوکلئوتیدی بخش‌های دیگر ژنوم اطمینان حاصل شد. مشخصات ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای اختصاصی گوسفندی مورد استفاده در واکنش‌های Real- Time PCR

ژن‌ها	توالی پرایمرها	شماره دسترسی در بانک ژن	طول(bp)
AST Forward AST Reverce	ACAGCCCAGCTCTGCAA CGATTCGAAGTGCACCTGTTC	BT020856	۷۲
PEPCK-c Forward PEPCK-c Reverse	GCGTTCAACGTCCGATTTCC CATGCTGAACGGGATGACATAC	EF062862.1	٦٦
GAPDH Forward GAPDH Reverse	GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA AAGCAGGGATGATGTTCTGG	NM_001190390.1	۲۲۸

Real-Time RT-PCR: در این مطالعه از دستگاه Real-Time PCR مدل ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) استفاده شد. برنامه زمانی-گرمایی دستگاه شامل سه مرحله بود. مرحله اول منجر به واسرشته شدن مولکول cDNA بود که در دمای ۹۵°C و در مدت ۱۰ دقیقه انجام شد، مرحله دوم در ٤۰ سیکل و در دمای ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه و ٦۰°C به مدت یک دقیقه و مرحله نهایی جهت ترسیم منحنی تفکیک یا منحنی ذوب (Melting Curve) در دمای ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه، ٦۰°C به مدت ۲۰ ثانیه و ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. واکنش‌های Real-Time PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت سه‌تایی (Triplicate) در

پلیت‌های ۹۶ چاهکی انجام شدند. مخلوط هر واکنش شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر SYBR-Green PCR Master Mix (شرکت فرمنتاز) ، یک میکرولیتر (۴۰۰ نانومولار) از پرایمرهای مستقیم (Forward) و معکوس (Reverse) اختصاصی هر ژن، ۵ میکرولیتر cDNA (۱۰۰ نانوگرم) و مابقی آب مقطر دوبار تقطیر اضافه شد تا به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. جهت اطمینان از تکثیر قطعات اختصاصی هر ژن و عدم حضور محصولات غیراختصاصی و جفت شدن پرایمرها (پرایمر دایمر)، محصولات تکثیری هر ژن در ژل آگارز یک درصد (یک گرم پودر آگارز در ۱۰۰ میلی لیتر بافر Tris- Borate-EDTA 0.5X) دارای رنگ اتیدیوم بروماید) بارگذاری و الکتروفورز انجام شد.

تجزیه آماری داده‌ها و مدل آماری: داده‌های به دست آمده توسط نرم افزار SAS (۲۰۰۳) تجزیه آماری گردید. مدل زیر برای متغیرهایی در نظر گرفته شد که تکرار در زمان (Repeated measurement) داشته و با استفاده از رویه مختلط (Mixed Model) تجزیه گردید:

مدل ۱

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + B_j + P_k + (T \times P)_{ik} + Animal_l(T_i) + e_{ijkl}$$

در این مدل Y_{ijkl} متغیر وابسته، μ میانگین کل، T_i اثر تیمار i (سطح پسماند رستوران)، B_j اثر ترکیب نژادی j، P_k اثر زمان نمونه‌گیری k، $(T \times P)_{ik}$ اثر متقابل بین جیره i و زمان K و e_{ijkl} اثر باقیمانده در نظر گرفته شد. جهت سنجش تعداد کپی‌های ژن‌های هدف و مرجع از نرم افزار REST و روش ΔCt استفاده شد(فاف و همکاران ۲۰۰۲).

نتایج

نتایج به دست آمده از بررسی اثر پسماند رستوران روی پارامترهای بیوشیمیایی پلاسمای خون بره‌های پرواری در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که جایگزینی جو با پسماند رستوران در جیره میزان گلوکز پلاسمای خون را تحت تاثیر قرار داد (P<۰/۰۵)، ولی بر میزان نیتروژن اوره‌ای خون و بتاهیدروکسی بوتیرات اثری نداشت.

جدول ۳- اثر پسماند رستوران بر روی متابولیت‌های خون در گوسفندان آزمایشی

فراسنجه‌های خونی	تیمارهای آزمایشی*		
	کنترل	تیمار ۵۰	تیمار ۱۰۰
گلوکز (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۸۸/۷۶^{b} ± ۱/۸۳	۷۷/۱^{a} ± ۱/۸۳	۸۴/۸۴^{b} ± ۱/۸۳
نیتروژن اوره‌ای خون (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۱۹/۷۷ ± ۰/۱۲	۱۹/۹۷ ± ۰/۱۲	۱۹/ ۹۲± ۰/۱۲
بتاهیدروکسی بوتیرات (میلی گرم در لیتر)	۳/۵ ± ۰/۲	٤ ± ۰/۲	۳/٦ ± ۰/۰۲

*تیمار کنترل (فاقد پسماند رستوران)، تیمار ۵۰: جیره حاوی ۵۰ درصد پسماند جایگزین با جو، تیمار۱۰۰: جیره فاقد جو (۱۰۰ درصد پسماند رستوران).

- میانگین های با حروف لاتین غیر مشابه در هر ردیف تفاوت معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

همچنین بررسی روند تغییرات متابولیت‌های خونی در دوره پروار نشان داد که غلظت گلوکز پلاسما در ماه-های مختلف تغییری نیافت اما غلظت‌های نیتروژن اوره-ای خون و بتاهیدروکسی بوتیرات با گذشت زمان کاهش معنی‌داری نشان دادند (P<۰/۰۵) (جدول ٤).

تأثیر سطوح مختلف پسماند رستوران بر بیان نسبی ژن های آسپارتات آمینوترانسفراز و فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز کبدی به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد میزان بیان نسبی آسپارتات آمینوترانسفراز کبدی در تیمار حاوی ۵۰ درصد پسماند رستوران به طور معنی‌داری نسبت به

سایر تیمارها بیشتر بود (P<۰/۰۵). همچنین بیان نسبی فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز کبدی به طور معنی-داری در تیمار حاوی ۱۰۰ درصد پسماند رستوران نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود (P<۰/۰۵).

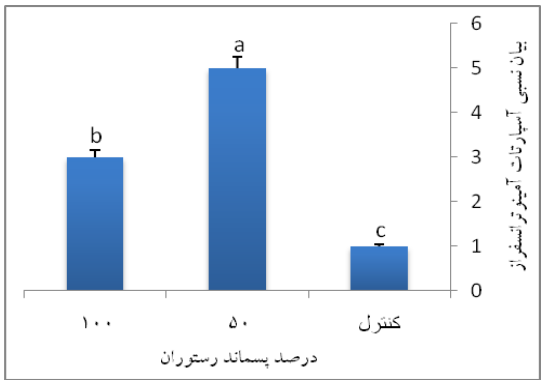
جدول ۴- غلظت متابولیت‌های خون گوسفندان آزمایشی در ماه‌های مختلف

فراسنجه‌های خونی	ماه‌های آزمایشی*		
	کنترل	تیمار ۵۰	تیمار ۱۰۰
گلوکز (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۸٤/۸۸ ± ۱/۷۲	۸۳/۰۸ ± ۱/۷۲	۸۲/۷۳ ± ۱/۷۲
نیتروژن اوره‌ای خون (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۲۰/۳۳ a ± ۰/۱۱	۱۹/۸۸b ± ۰/۱۱	۱۹/٤٥ c ± ۰/۱۱
بتاهیدروکسی بوتیرات (میلی گرم در لیتر)	٤/٤ b ± ۰/۲	۳/٥ a ± ۰/۲	۳/۲a ± ۰/۲

*: ماه‌های آزمایشی شامل ماه‌های اول، دوم و سوم خون‌گیری (روزهای ۳۰، ٦۰ و ۹۰).

- تیمار کنترل (فاقد پسماند رستوران)، تیمار ۵۰: جیره حاوی ۵۰ درصد پسماند جایگزین با جو، تیمار۱۰۰: جیره فاقد جو (۱۰۰ درصد پسماند رستوران).

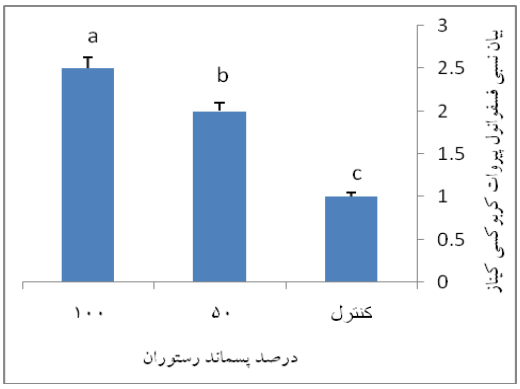
- میانگین های با حروف لاتین غیر مشابه در هر ردیف تفاوت معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).



شکل ۱- تأثیر جایگزینی جو با پسماند رستوران بر بیان نسبی آسپارتات آمینوترانسفراز

- تیمار کنترل (فاقد پسماند رستوران)، تیمار ۵۰: جیره حاوی ۵۰ درصد پسماند جایگزین با جو، تیمار۱۰۰: جیره فاقد جو (۱۰۰ درصد پسماند رستوران).

- میانگین های با حروف لاتین غیر مشابه دارای تفاوت معنی دار می باشند (P<۰/۰۵).



شکل ۲- تأثیر جایگزینی جو با پسماند رستوران بر بیان نسبی فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز

- تیمار کنترل (فاقد پسماند رستوران)، تیمار ۵۰: جیره حاوی ۵۰ درصد پسماند جایگزین با جو، تیمار۱۰۰: جیره فاقد جو (٪۱۰۰ پسماند رستوران).

- میانگین های با حروف لاتین غیر مشابه دارای تفاوت معنی‌دار می باشند (P<۰/۰۵).

بحث

مقایسه میانگین غلظت گلوکز پلاسما در بین تیمارهای آزمایشی حاکی از تغییرات معنی‌دار آن با جایگزینی جو با پسماند رستوران بود. غلظت گلوکز پلاسما در تیمار کنترل (فاقد پسماند رستوران) و تیمار سوم (جیره فاقد جو) نسبت به تیمار دوم (جیره حاوی ۵۰ درصد پسماند رستوران) بیشتر بود (P<۰/۰۵). این تفاوت می‌تواند ناشی از تولید اسید پروپیونیک بیشتر در این جیره‌ها باشد. مس و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند افزایش گلوکز خون نتیجه تغییر در الگوی تخمیر شکمبه و افزایش نسبت مولار پروپیونات به اسیدهای چرب فرار دیگر می‌باشد. پروپیونات تنها اسید چرب فرار گلوکزساز شکمبه می‌باشد که بعد از جذب از شکمبه در کبد تبدیل به گلوکز شده و بعد از انتقال به بافت‌ها به عنوان منبع انرژی مصرف می‌شود. همچنین بالا بودن غلظت گلوکز در تیمار سوم در مقایسه با تیمار دوم می‌تواند از کاهش تخمیر نشاسته در شکمبه و افزایش عبور آن به روده کوچک و افزایش جذب گلوکز از روده در نتیجه هضم آنزیمی در روده ناشی گردد. این احتمال وجود دارد که پسماند رستوران که بخش عمده آن را برنج تشکیل می دهد بدلیل محتوای بالای روغن، با محافظت نشاسته برنج از تخمیر شکمبه‌ای، بخشی از آن‌را به روده منتقل نموده و بنابر این افزایش گلوکز خون در این تیمار را باعث گردیده است. مقایسه ترکیبات شیمیایی این جیره‌ها نیز می‌تواند موید این فرضیه باشد چرا که میزان عصاره اتری در تیمار سوم بالاتر از جیره دوم بوده (٦/٧ در مقابل ٤/٣ درصد)، اما در محدوده مرزی توصیه شده برای حیوانات نشخوار کننده می‌باشد (جدول ۱). بر اساس توصیه‌ها میزان چربی جیره در نشخوارکنندگان بدلیل محدود نمودن تخمیر شکمبه‌ای نبایستی از ۷ درصد بیشتر شود. رینولدز (۲۰۰٦) نشان داد که ورود نشاسته به روده باریک (از طریق تزریق نشاسته به شیردان) علاوه بر افزایش جذب گلوکز به داخل سیاهرگ باب کبدی، باعث افزایش جذب گلوکز به داخل بافت‌های منشعب از باب (روده باریک، پانکراس و طحال) نیز می‌گردد.

از نیتروژن اوره‌ای خون به عنوان شاخصی که منعکس کننده تجزیه و استفاده از پروتئین خام درشکمبه است، استفاده می‌شود (چامپاوادی و همکاران ۲۰۰٦). تاثیر تیمارهای آزمایشی بر غلظت نیتروژن اوره‌ای خون در پژوهش حاضر غیر معنی‌دار بود (جدول ۳). مطالعات انجام شده توسط اشمدلی و همکاران (۱۹۹٦) نشان داد که تراکم زیاد آمونیاک در جیره‌های دارای منابع پروتئینی با سرعت تجزیه پذیری بالا، باعث افزایش تراکم نیتروژن در شکمبه می شودکه ممکن است به علت عدم کارائی استفاده از نیتروژن در شکمبه باشد و حتی منجر به افزایش نیتروژن اوره پلاسما نیز گردد. بر اساس نتایج بدست آمده در این تحقیق، جایگزینی پسماند رستوران تأثیر منفی در کارایی استفاده از منابع پروتئینی جیره‌های آزمایشی نداشته و همزمان سازی بین منابع کربوهیدراتی و پروتئینی جیره‌ها در شکمبه به طور مطلوبی صورت گرفته است (جدول ۳). با این حال بررسی غلظت نیتروژن اوره‌ای خون در دوره های خونگیری نشان داد که زمان، تاثیر معنی‌داری بر این فاکتور داشته است (P<۰/۰۵) (جدول ٤). غلظت نیتروژن اوره‌ای خون در بالاترین سطح خود در دوره اول نمونه گیری خون (ماه اول پروار) قرار داشته و با سپری شدن زمان روند نزولی به خود گرفت به طوری که پایین‌ترین غلظت آن در دوره سوم مشاهده گردید. روند مشابه مشاهده شده در بین تمام تیمارهای آزمایشی می‌تواند حاکی از عادت پذیری میکروارگانیسم‌های شکمبه به جیره‌های آزمایشی در طول زمان و قابلیت استفاده بهینه از آمونیاک آزاد شده از تجزیه پروتئین در شکمبه باشد.

وینهویزن و همکاران (۱۹۹۱) نشان دادند برای اینکه اسید های چرب غیر استریفه (NEFA) به طور کامل اکسید شوند بایستی پیش سازهای گلوکوژنیک در چرخه کربس قابل دسترس باشند. در صورتی که پیش

سازهای گلوکوژنیک (گلوکز ساز) به میزان کافی تامین نشوند، اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراستریفه توسط کبد به طور ناقص انجام گرفته و منجر به تولید اجسام کتونی می‌گردد. از طرف دیگر بر اساس گزارش دراکلی و همکاران (۱۹۸۹) افزایش بتاهیدروکسی بوتیرات معمولا توام با کاهش گلوکز خون و ذخایر گلیکوژن کبد می‌باشد. اگرچه در تحقیق حاضر اثر تیمارهای آزمایشی بر میزان بتاهیدروکسی بوتیرات پلاسما غیرمعنی‌دار بود، اما غلظت بتاهیدروکسی بوتیرات در تیمار ۵۰ (جیره حاوی۵۰ پسماند رستوران جایگزین جو) به لحاظ عددی در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایشی بالاتر بود (جدول ۳). در عین حال، پایین‌ترین مقدار گلوکز خون نیز در تیمار ۵۰ مشاهده گردید (P<۰/۰۵)، بنابر این به نظر می‌رسد که بخشی از افزایش عددی مشاهده شده در غلظت بتاهیدروکسی بوتیرات در تیمار دوم می‌تواند ناشی از غلظت پایین گلوکز و در نتیجه اکسیداسیون ناقص اسید های چرب غیر استریفه در کبد باشد. در ضمن در نشخوارکنندگان یکی از منابع تولید بتاهیدروکسی بوتیرات در دیواره شکمبه، بوتیرات تولید شده ناشی از تخمیرات شکمبه‌ای است، بنابراین بخشی از تفاوت‌های مشاهده شده در بتاهیدروکسی بوتیرات خون می‌تواند ناشی از تفاوت در نسبت اسیدهای چرب فرار تولید شده به ویژه بوتیرات در بین تیمارهای مورد آزمایش باشد.

گلوکونئوژنز فرآیند تولید گلوکز یا گلیکوژن از ترکیبات غیر کربوهیدراتی می‌باشد که به طور عمده در کبد و به میزان کمتری در کلیه انجام می‌گیرد (کربس و همکاران ۱۹۶۳). میزان کارایی گلوکونئوژنز توسط دو عامل تنظیم می‌گردد: فعالیت آنزیم‌های کلیدی دخیل در گلوکونئوژنز و میزان تامین پیش‌سازهای گلوکونئوژنیک (ژانگ و همکاران ۲۰۰۹). آنزیم فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز یکی از آنزیم‌های کلیدی در فرایند گلوکونئوژنز می‌باشد که در کاتالیز اگزالواستات به فسفوانول پیروات نقش مهمی دارد (آگکا و همکاران ۲۰۰۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد بیان نسبی ژن فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز در تیمار ۱۰۰ (جایگزینی ۱۰۰ درصد دانه جو با پسماند رستوران) بیشتر از سایر تیمارهای آزمایشی بود (نمودار۲). گرین فیلد و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که آنزیم فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز به عنوان مهم‌ترین آنزیم برای تولید گلوکز از پروپیونات در نشخوارکنندگان به شمار می‌رود. همچنین کارچر و همکاران (۲۰۰۷) گزارش نمودند به دلیل نیاز مداوم نشخوارکنندگان به گلوکونئوژنز، استفاده از پروپیونات برای تولید گلوکز بسیار حیاتی است. غلظت بالای گلوکز خون در تیمار سوم می‌تواند انعکاس دهنده تولید بیشتر پیش‌ساز آن یعنی پروپیونات در شکمبه باشد. بنابر این بالا بودن بیان فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز در تیمار سوم با نتایج مربوط به سطوح گلوکز خون در این گروه کاملاً مطابقت دارد. افزایش در تولید پیش‌ساز گلوکز در شکمبه باعث تنظیم افزایشی بیان ژن مرتبط با آنزیم فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز گردیده که افزایش فعالیت این آنزیم به عنوان یکی از آنزیم‌های کلیدی مسیر گلوکونئوژنز، باعث افزایش سنتز گلوکز در این گروه گردیده است. لازم به ذکر است که پروپیونات تولیدی، طی واکنش‌هایی تبدیل به سوکسینیل کوآنزیم آ شده، که با ورود به چرخه کربس منجر به تولید اگزالواستات می‌شود. اگزالواستات به عنوان یکی از اجزای اساسی در مسیر گلوکونئوژنز برای تولید گلوکز مورد استفاده قرار می‌گیرد (مورای و همکاران ۲۰۰۳).

در مطالعه حاضر بیان فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز در جیره شاهد کاهش یافته بود (شکل ۲). کاهش بیان نسبی ژن فسفو انول پیروات کربوکسی کیناز را می‌توان به دلیل اثرات انسولین بر گلوکونئوژنز در نشخوارکنندگان دانست (بروکمن ۱۹۸۶). وقتی که گلوکز خون بالاست آنزیم‌های درگیر در مصرف گلوکز (نظیر آنزیم‌های مسیر گلیکولیز و لیپوژنسیز)، فعال‌تر می‌شوند. تحت چنین شرایطی آنزیم‌های گلوکونئوژنز

فعالیت کمی دارند. همچنین انسولین در پاسخ به افزایش گلوکز خون ترشح شده و تولید آنزیم‌های کلیدی گلیکولیز را تقویت می‌کند. انسولین همچنین با تأثیرات cAMP تحریک شده توسط گلوکاگون و گلوکوکورتیکوئیدها که سنتز آنزیم‌های کلیدی گلوکونئوژنز را القاء می‌کنند، مقابله می نماید (مورای و همکاران ۲۰۰۳). انسولین با افزایش کمی و همچنین افزایش فعالیت تعدادی از آنزیم‌های کلیدی در واکنش‌های گلیکولیز کبدی مانند آنزیم‌های گلوکوکیناز و پیروات کیناز، مصرف گلوکز در مسیر گلیکولیز را افزایش داده و به طور غیرمستقیم از رها شدن گلوکز در پلاسمای خون جلوگیری می‌کند. بنابراین، اگرچه در این آزمایش انسولین پلاسما اندازه‌گیری نشده است، اما تنظیم کاهشی بیان ژن آنزیم فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز همراه با مقدار قابل مقایسه گلوکز خون در گروه شاهد با تیمار ۱۰۰، می‌تواند انعکاس دهنده اثر گلوکز روی کاهش بیان ژن از طریق انسولین باشد، به عبارت دیگر، وجود مقدار نرمال گلوکز خون در جیره شاهد ممکن است باعث فیدبک منفی روی بیان ژن آنزیم کلیدی موثر در مسیر گلوکونئوژنز و در نهایت تولید گلوکز شده است.

آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز نیز در گلوکونئوژنز نقش مهمی ایفا میکند. در این مطالعه بیان ژن آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در تیمار ۵۰ نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی بیشتر بود (شکل ۱). این تنظیم افزایشی با غلظت پایین و معنی‌دار گلوکز و غلظت بالا ولی غیرمعنی‌دار نیتروژن اوره‌ای خون همراه بود. غلظت پایین گلوکز ممکن است شرایط متابولیکی بدن را به سمت افزایش فعالیت‌های گلوکونئوژنز از منابع غیرکربوهیدراتی به ویژه اسیدهای آمینه پیش برده، به طوری که باعث تنظیم افزایشی آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در کبد گردیده است. این آنزیم به عنوان یکی از آنزیم‌های کلیدی در دآمینه شدن اسیدهای آمینه و استفاده از اسکلت کربنی آنها در سنتز گلوکز بوده و همچنین در انتقال اگزالواستات از میتوکندری به سیتوپلاسم نقش اساسی دارد. بالا بودن غلظت ازت اوره‌ای خون به طور عددی در تیمار ۵۰، می‌تواند بازتابی از فعالیت بیشتر سیکل اوره به خاطر دآمینه شدن اسیدهای آمینه جهت شرکت در فرآیندهای گلوکونئوژنز باشد که با تنظیم افزایشی بیان آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز و با در نظر گرفتن نقش آن در سیکل اوره مطابقت دارد (مورای و همکاران ۲۰۰۳).

نتیجه گیری :نتایج این مطالعه نشان داد تغییر اقلام جیره با تاثیر بر فرآیند هضم و جذب و تغییرغلظت متابولیت‌های خونی، بیان ژن مربوط به آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز از آنزیم‌های کلیدی دخیل در متابولیسم را تغییر داد.

تشکر و قدردانی

از زحمات دکتر غلامرضا حمیدیان در تهیه نمونه‌های کبدی و دکتر امیر علی شهبازفر در بررسی سلامت لاشه بره‌ها و همچنین کارکنان ایستگاه آموزشی تحقیقاتی خلعت پوشان به ویژه آقای حبیب چراغی کمال تشکر و قدردانی به عمل می آید.

منابع مورد استفاده

مرادی م، حسین خانی ع، تقی زاده ا، علیجانی ص و دقیق کیا ح، ۱۳۹۲. جایگزینی سطوح مختلف پسماند رستوران با دانه جو در جیره و تاثیر آن بر عملکرد بره های دورگ. نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران صفحه‌های ۳۸-۲۹.

Agca C, Greenfield RB, Hartwell JR and Dunking S, 2002. Cloning and characterization of bovine cytosolic and mitochondrial PEPCK during transition to lactation. Physiological Genomics 11: 53–63.

Brockman RP, 1986. Pancreatic and adrenal hormonal regulation of metabolism. In: Milligan LP, Grove WL and Dobson A. Control of digestion and metabolism. Proceeding Sixth Int'l Symposium on Ruminant Physiology. Banff, Canada. 405– 419.

Chumpawadee S, Smart K, Vongpralub T and Pattarajinda V, 2006. Effects of synchronizing the rate of dietary energy and nitrogen release on ruminal fermentation, microbial protein synthesis, blood urea nitrogen and nutrient digestibility in beef cattle. J Anim Sci Vol 19. No. 2: 181-188.

Drackley JK, Kim YK, Strang BD and Young JW, 1989. Metabolic responses of lactating goats to feed restriction and dietary 1, 3 butanediol. J Dairy Sci 72:11-3204.

Greenfield RB, Cecava MJ and Donkin SS, 2000. Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation. J Dairy Sci 83: 1228–1236.

Karcher EL, Pickett MM, Varga GA and Donkin SS, 2007. Effect of dietary carbohydrate and monensin on expression of gluconeogenic enzymes in liver of transition dairy cows. J Anim Sci 85: 690–699.

Krebs HA, Bennett DAH, Degasquet P, Gascoigne T and Joshed T, 1963. Renal gluconeogenesis. The effect of diet on the gluconeogenic capacity of ratkidney- cortex slices. Brioche J 86: 22.

Maas JA, Wilson GF, McCutcheon SN, Lynch GA, Burnham DL and France J, 2001. The effect of season and monessen sodium on the digestive characteristics of autumn and spring pasture fed to sheep. J Anim Sci 79: 1052-1058.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA and Rodwell VW, 2003. Harper's Illustrated Biochemistry. McGraw-Hill Companies, Inc. 26th ed.

National Research Council, Nutrient Requirements of Sheep, 1985. Subcommittee on sheep nutrition, committee on animal nutrition. Board on Agriculture, National Research Council. National Academy Press. Washington, D.C., USA. 6th end.

Pfaffl MW, Horgan GW and 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 Res 30, p. 36.

Reynolds CK, 2006. Production and metabolic effects of site of starch digestion dairy cattle. Anim Feed Sci Technol 130: 78-940.

SAS Institute Inc. SAS User's Guide. 2003. Version, 9.2. Institute, Cary, NC, USA.

Schmidely P, Archimede H, Bas P, Rousseau A, Munoz S and Savant D, 1996. Effects of the synchronization of the rate of carbohydrate and nitrogen relapse of the concentrate on rumen fermentation, plasma metabolites and insulin, in the dry pregnant goat. Anim Feed Sci Technol 63: 163-178.

Vaishali G, Ankur K and Baghel RPS, 2011. Nutrigenomics and its application in animal science. Vet Res Forum 2: 147-155.

Veenhuizen JJ, Drackley JK, Richard MJ, Sanderson TP, Miller LD and Young JW, 1991. Metabolic changes in blood and liver during development and the early treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows. J Dairy Sci 74: 4238–4253.

Walker PM, Hoelting FB and Wertz AE, 1998. Fresh pulped food waste replaces supplemental protein and a portion of the dietary energy in total mixed rations for beef cows. Th Prof Anim Sci 14:207-216.

Walker PM, Brown SA, Dust JM and Finnigan DM, 2002. Evaluation of feed mixtures amended with processed food waste as feedstuffs for finishing lambs. The Prof Anim Sci 237-246.

Zhang XD, Chen WJ, Li CY and Liu JX, 2009. Effects of protein-free energy supplementation on blood metabolites, insulin and hepatic PEPCK gene expression in growing lambs offered rice straw-based diet. Czech J Anim Sci 54 11: 481–489.

Effect of ration composition on gene expression of some metabolism contributing hepatic enzymes in fattening lambs

E Yazdankhah[1], A Hosseinkhani[2*], H Daghigh Kia[3], A Vakili[4] and H Sadri[5]

Received: January 28, 2014 Accepted: March 01, 2014

[1]MSc Graduated, Department of Animal Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3]Associated Professor, Department of Animal Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[4]Associate Professor Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashad, Iran
[5]Assistant Professor, Faculty of Veterinary, University of Tabriz

[*]Corresponding Author: Email:a.hosseinkhani@tabrizu.ac.ir

Abstract

This research was conducted to study the effects of ration composition on blood metabolites and gene expression of some hepatic enzymes. 18 hybrids (crossbred) male lambs (*Ghezel- Merino, Ghezel- Baloochi and Merino- Moghani*) were randomly assigned to one of the three experimental treatments. Barley grain as the main part of the ration was replaced with restaurant waste (RW) in the levels of 50 and 100 percent, so dietary treatments were as follow: 1) control group (no RW), 2) T_{50} or replacement of 50% of barley grain by RW and 3) T_{100} or replacement of whole barley grain with RW. Rations were fed to the lambs three times daily as total mixed rations for 110 days. After slaughtering the lambs, samples of liver were collected for gene expression study of hepatic *aspartate aminotransferase* (AST) and *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (*PEPCK*) enzymes. The results illustrated that blood glucose content significantly affected by experimental treatments ($p<0.05$) however there was no effect detected on blood BUN and BHBA. Inversely experimental periods affected blood BUN and BHBA significantly ($p<0.05$) but not for glucose. Gene expression of hepatic AST and *PEPCK* enzymes were affected by dietary treatments ($p<0.05$). In conclusion, the results of the study confirmed that replacement of dietary barley grain by RW indirectly influenced gene expression of the liver AST and *PEPCK* enzymes through modification of digestion and absorption process and blood metabolites changes.

Key words: *Aspartate aminotransferase*, Blood metabolites, Finishing lambs, Gene expression, *Phosphoenolpyruvate carboxykinase*