



اثر مکمل عنصر روی و جایگزینی بتائین با بخشی از متیونین بر بیان ژن بتائین هموسیستئین متیل ترانسفراز و ژنهای لیپوژنیک کبدی مرغ تخمگذار تحت شرایط تنش گرمایی

محمود نظری^{*}، سمیه سالاری^۲، محمدرضا قربانی^۳

استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز، ایران
آدانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز، ایران
آستادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۱۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۲۷

چکیده

به منظور بررسی تاثیر عنصر روی و سطوح مختلف بتائین جایگزین شده با متیونین بر بیان ژن بتائین هموسیستئین متیل ترانسفراز و ژنهای لیپوژنیک کبدی (آنزیم مالیک و اسید چرب سنتاز) در مرغان تخمگذار لگهورن سویه تجاری های-لاین (W-36) با استفاده از تکنیک ریل تایم qPCR، آزمایشی با استفاده از ۲۸۸ قطعه مرغ تخمگذار در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل (۳×۲×۲) با ۱۲ تیمار آزمایشی، ۳ تکرار و ۸ قطعه مرغ در هر تکرار از سن ۵۰ الی ۶۲ هفتگی اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل سه سطح مختلف جایگزینی بتائین با متیونین (صفر و ۱۳ و ۲۶ درصد) و دو سطح مختلف مکمل روی (۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم سولفات روی) در دو شرایط دمایی متفاوت (استرس گرمایی و دمای معمولی) با سه تکرار در هر تیمار بودند. نتایج نشان داد که افزودن روی تاثیری بر بیان ژنهای بتائین هموسیستئین متیل ترانسفراز و ژنهای لیپوژنیک کبدی نداشت. جایگزین نمودن بتائین با متیونین سبب افزایش بیان بتائین هموسیستئین متیل ترانسفراز به میزان ۲/۱۱ واحد و کاهش معنی دار بیان ژن آنزیم مالیک و اسید چرب سنتاز به میزان ۱/۹۸ و ۲/۴۷ واحد در بافت کبد شد. همچنین، تحت تنش گرمایی بیان ژن بتائین هموسیستئین متیل ترانسفراز، آنزیم مالیک و اسید چرب سنتاز به ترتیب به میزان ۱/۵۸، ۱/۹۶ و ۲/۱۵ واحد کاهش پیدا کرد ($P < 0/01$). بنابراین بتائین می تواند با افزایش بیان ژنهای بتائین هموسیستئین متیل ترانسفراز و کاهش بیان آنزیم مالیک و اسید چرب سنتاز، سبب کاهش تنش حرارتی مرغ تخمگذار تحت تنش حرارتی گردد.

کلمات کلیدی: تنش حرارتی، عنصر روی، بتائین هموسیستئین متیل ترانسفراز، متیونین، ژنهای لیپوژنیک.

(Murray *et al.*, 2009). تنش حرارتی سطح پلاسمایی اسیدهای چرب، تری گلیسریدها، کلاسترول و آنزیم های دخیل در انتقال و اکسیداسیون اسیدهای چرب را افزایش می دهد (Mujahe *et al.*, 2007).

همچنین تنش حرارتی باعث کاهش ضریب تنفسی پرندگان می شود که حاکی از آن است که گرما زدگی تشدید کننده ی اکسیداسیون اسیدهای چرب است. گمان می رود اکسیداسیون اسیدهای چرب به منظور دستیابی به انرژی موردنیاز پرندگان در معرض استرس گرمایی افزایش یافته است که اکسیداسیون شدید اسیدهای چرب و تجمع آنها در میتوکندری منجر به تنش اکسیداتیو می شود. بنابراین در رفع این عارضه از بتائین به عنوان یک عامل ضد استرس و عاملی مؤثر در توزیع مجدد چربی ها در بدن حیوانات استفاده می شود (Mcke *et al.*, 1997). به علاوه، یکی از مهم ترین آنزیم های مسیر سنتز اسیدهای چرب آنزیم مالیک است. آنزیم مالیک یک پروتئین سیتوپلاسمی است که دکربوکسیلاسیون مالات به پیرووات را کاتالیز می کند. اکثر NADPH لازم برای سنتز اسیدهای چرب از فعالیت آنزیم مالیک ایجاد می شود. فعالیت آنزیم مالیک کبدی همبستگی مثبتی با سرعت سنتز اسیدهای چرب دارد (Kristin *et al.*, 2001).

بتائین یک تری متیل مشتق شده از گلیسین بوده که در بسیاری از سلول ها یافت می شود و قادر است اثرات منفی استرس حرارتی را در طیور کاهش دهد (Konca and Kirkpinar, 2008). خاصیت متیل دهندگی بتائین در حدود ۳/۷۵ برابر متیونین می باشد. هر مولکول بتائین قادر به تبدیل کردن ۳ مولکول هموسیستئین به متیونین است. بنابراین بتائین مؤثرترین ترکیب برای جایگزینی متیونین در جیره است که به عنوان گروه دهنده متیل عمل می کند (Sun *et al.*, 2008). بتائین در متابولیسم لیپیدها با اثر در تحریک متابولیسم اکسیداتیو اسیدهای چرب از طریق شرکت در سنتز ترکیبات متیله شده نظیر کارنیتین و فسفولیپیدها نقش دارد. بتائین موجب افزایش ترکیبات متیله می شود و در سنتز فسفاتیدیل کولین و اکسیداسیون اسید چرب در متابولیسم لیپیدها نقش دارد (Carter *et al.*, 1995).

تمامی واکنش های بیوسنتز اسیدهای چرب توسط یک کمپلکس چندآنزیمی، به نام اسید چرب سنتاز، کاتالیز می شود (Cox and Nelson, 2008). آنزیم اسید چرب سنتاز موجود در مهره داران نیز کمپلکس های چندآنزیمی هستند که در تمامی فعالیت های آنزیمی به همراه یک فعالیت هیدرولیتیک، اسید چرب خاتمه یافته را از بخش ACP- مانند کمپلکس آنزیمی جدا می کنند

قطعه مرغ تخمگذار با میانگین وزنی 50 ± 1500 گرم در سن ۵۰ الی ۶۲ هفتگی از سویه تجاری های لاین W 36 در سیکل دوم تولید به صورت آزمایش فاکتوریل $2 \times 2 \times 3$ در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و هشت مشاهده در هر تکرار به اجرا در آمد. تیمارهای آزمایشی شامل سه سطح مختلف جایگزینی بتائین با متیونین (صفر، ۱۳ و ۲۶ درصد) و دو سطح مختلف مکمل روی (۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم سولفات روی) در دو شرایط دمایی متفاوت (استرس گرمایی و بدون استرس) با سه تکرار در هر تیمار بودند. برای محاسبه میزان مواد مغذی موجود در مواد خوراکی، از راهنمای آنالیز مواد خوراکی (NRC 1994) و برای تعیین احتیاجات مرغ‌های تخم‌گذار از راهنمای های-لاین استفاده شد. جدول ترکیب مواد خوراکی جیره‌ها در جداول ۱ نشان داده شده است

مرغ‌های تحت تنش حرارتی روزانه به مدت شش ساعت (از ساعت یازده صبح تا ۵ عصر) تحت تنش حرارتی قرار گرفتند. ۱۴۴ قطعه مرغ در یک سالن در دمای (۲۳ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند و جهت انجام تنش حرارتی، ۱۴۴ قطعه مرغ دیگر روزانه به مدت شش ساعت تحت دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ماه پرورش یافتند. در انتهای آزمایش چهار پرنده از هر تکرار کشتار شده و کبد آنها در ازت مایع نگهداری و به فریزر با

همچنین یکی از انزیمهای موثر که در بیوسنتز متیونین نقش دارد آنزیم بتائین-هموسیستین متیل ترانسفراز (BHMT) می‌باشد که از متالوآنزیم های حاوی عنصر روی می‌باشد و گروه متیل آزاد شده از بتائین تحت تاثیر این آنزیم به هموسیستین انتقال یافته و آنرا به متیونین تبدیل می‌نماید. ترکیب دی متیل گلیسین حاصل از هیدرولیز بتائین مجدداً هیرولیز شده و گروه متیل آزاد شده از آن برای متیلاسیون اسید فولیک به کار می‌رود که ماده حاصل از این واکنش به نام متیل تتراهیدروفولات به همراه ویتامین B12 به عنوان کوآنزیم در چرخه دیگری با انتقال یک گروه متیل به هموسیستین و تبدیل آن به متیونین دخالت دارد (Jason et al., 1998). بنابراین، این مطالعه جهت بررسی اثر سطوح مختلف مکمل روی و جایگزینی بخشی از متیونین جیره با بتائین بر بیان ژن بتائین هموسیستین متیل ترانسفراز و ژنهای لیپوژنیک کبدی (آنزیم مالیک و اسید چرب سنتاز) مرغ تخمگذار در شرایط تنش گرمایی به کمک روش ریل تایم qPCR انجام شد.

مواد و روشها

شرایط پرورش و اعمال تنش حرارتی

این پژوهش در فصل بهار (ماه‌های اردیبهشت و خرداد) در ایستگاه دامپروری دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان با استفاده از ۲۸۸

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز برای ژن‌های موردنظر با استفاده از نرم افزار vector NTI advance 11 انجام شد. توالی، شماره دسترسی به ژنهای موردنظر در سایت NCBI و خصوصیات آغازگر ژن اختصاصی در جدول ۲ ارائه شده است.

روش انجام ریل تایم qPCR

برای انجام تکنیک ریل تایم qPCR از دستگاه Applied Step one plus ساخت شرکت Biosystem آمریکا استفاده شد. واکنش‌ها در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر از Master mix SYBER Green ساخت شرکت ABI آمریکا صورت گرفت. تکنیک PCR طبق پروتکل جدول (۳) در ۴۰ سیکل انجام شد. روش بررسی تغییرات بیان ژن در این پژوهش روش $\Delta\Delta CT$ (آستانه مقایسه‌ای) و نسبت به بیان ژن بتا اکتین بود. در روش مقایسه نسبی تفاوت نسبی نمونه مورد آزمایش در مقابل نمونه‌ی کنترل با فرمول: $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام گردید (Pfaffl *et al.*, 2002). بررسی آماری داده‌ها توسط نرم افزار SAS ۹,۱ و آزمون t انجام شد.

دمای ۸۰- سانتیگراد منتقل شد. سرم خون توسط سانتریفیوژ جدا شده و نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. غلظت کلسترول، تری‌گلیسرید و گلوکز با کیت تجاری شرکت پارس آزمون تعیین شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

در این پژوهش، استخراج RNA از ۳۰ میلی گرم بافت کبد با استفاده از کیت استخراج SV Total RNA Isolation System (محصول شرکت پرومگا، آمریکا) انجام شد. نمونه‌ها تا زمان ساخت cDNA در فریزر ۸۰- درجه‌ی سانتیگراد، نگهداری شدند. غلظت RNA با استفاده از قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر نانودراپ (ترمو، آمریکا) محاسبه گردید و چنانچه نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ بالای ۱/۸ بود نمونه‌ها برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار می‌گرفتند. برای ساخت cDNA، از کیت cDNA Synthesis Revert Aid First Strand (شرکت فرمتاز) استفاده گردید. طراحی آغازگر برای کمیت سنجی با

جدول ۱- ترکیب مواد خوراکی جیره‌ها (برحسب درصد).

Table 1- Composition of diets (%).

Diet جیره						Ingredients مواد خوراکی
6	5	4	3	2	1	
61	61	61	61	61	61	ذرت (Corn)
23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	کنجاله سویا (Soybean meal)
1	1	1	1	1	1	پودر ماهی (Fish meal)
2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	روغن گیاهی (Plant oil)
0.0334	0.0334	0.0867	0.0867	0.14	0.14	دی ال- متیونین (DL- methionine)
0.0533	0.0533	0.0266	0.0266	0	0	بتائین آنهیدروس (Anhydrous betaine)
0.0309	0.0177	0.0309	0.0177	0.0309	0.0177	سولفات روی (ZnSO ₄)
2821	2821	2821	2821	2821	2821	انرژی متابولیسمی (kcal/kg) (Metabolism energy)
16	16	16	16	16	16	پروتئین خام (%) (Crude protein %)
0.3034	0.3034	0.3567	0.3567	0.41	0.41	متیونین (%) (Methionine %)
20.11	20.11	20.11	20.11	20.11	20.11	روی تامین شده از جیره بدون مکمل (mg/kg) Dietary Zinc without supplement (mg/kg)

جدول ۲- توالی و مشخصات پرایمرها برای انجام Real time qPCR.

Table 2- Sequences for real time qPCR primers.

دمای اتصال (درجه سانتیگراد) Annealing temperature (0C)	طول محصول (جفت باز) Product size (bp)	آغازگرها Primers	شماره دسترسی Accession Number	ژن Gene
59	113	F: 5'- TGTGCTGTCCAACCTGGTGAA-3' R:5'- GCAGCTTGCAAACCCTCTTT-3'	416371	بتایین هموسیسنتین متیل ترانسفراز (BHMT)
59	101	F: AGTGCCTACCTGTGATGTTG-3' R: GGCTTGACCTCTGATTCTCT-3'	AF408407	آنزیم مالیک (Malic) (Enzyme)
59	116	F:5'- AAGCAATTCGTCACGGACAG -3' R:5'- GGCACCATCAGGACTAAGCA -3'	J03860	اسیدچرب سنتاز (Fatty Acid) (Synthase)
59	150	F: 5'-GTGATGGACTCTGGTGATGG-3' 5'-TGGTGAAGCTGTAGCCTCTC-3':R	NM-205518	بتا اکتین (β-actin)

جدول ۳- دستورالعمل Real-time qPCR

Table 3- Real-time qPCR protocol.

توضیح Description	دما (oC) Temperature	زمان Time	تعداد چرخه Number of cycle	سیکل Cycle
	55	2 min	1 X	سیکل اول First cycle
	95	10 min	1 X	سیکل دوم Second cycle
دناتور شدن denaturation	95	15 s		سیکل سوم Third cycle
اتصال annealing	59	30 s	40 X	
تکثیر extension	72	30 s		
تهیه نمودار ذوب Melting curve preparation	70-95	10 s	51 X	سیکل چهارم Forth cycle

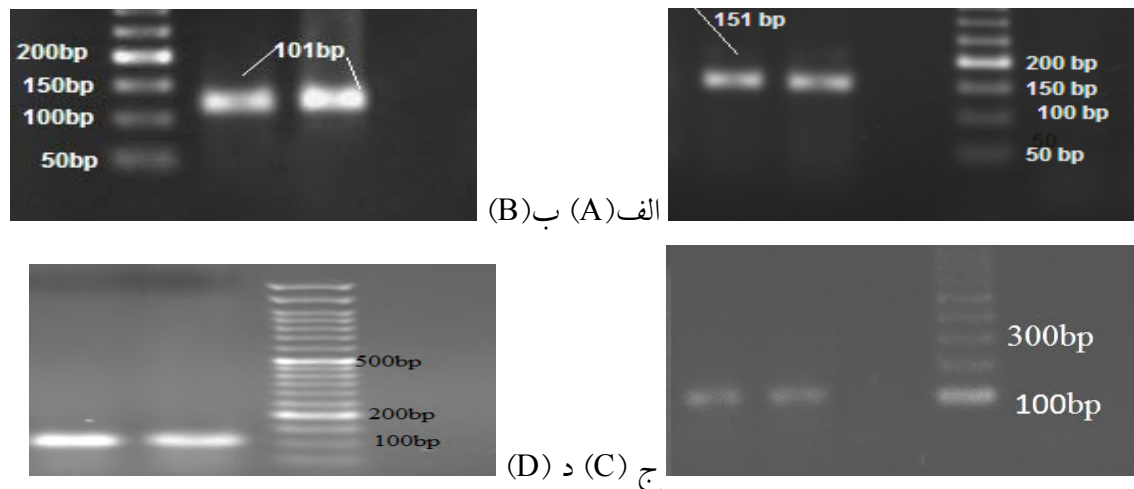
نتایج و بحث

قطعات مورد نظر، تکنیک ریل تایم qPCR جهت بررسی بیان ژنهای مورد نظر اجرا گردید.

اثر دما، جایگزینی بتائین و مکمل روی بر فاکتورهای خونی

نتایج تأثیر سطوح مختلف بتائین جایگزین شده با متیونین، دما و عنصر روی بر فاکتورهای خونی (گلوکز، کلسترول و تری گلیسیرید) در جدول ۴ نشان داده شده است.

پس از استخراج RNA به منظور اندازه گیری میزان غلظت RNA استخراج شده و میزان خلوص آن، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از نانودراپ نشان داد که کیفیت RNA های استخراج شده جهت آزمایشات ریل تایم qPCR بسیار مناسب است. واکنش PCR جهت بررسی خصوصیات دمایی و اختصاصی بودن پرایمرها اجرا گردید. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR برای ژنهای بتا اکتین، BHMT و ژنهای لیپوژنیک در شکل ۱ نشان داده شده است. پس از تایید تکثیر



شکل ۱- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز ژنهای بتا اکتین (الف) آنزیم مالیک (ب)، اسید چرب ستاز (ج) بتاین هموسیستین متیل ترانسفراز (د) روی ژل آگارز (۱٪).

Figure 1- A sample of electrophoresis of PCR products for (A) B-actin (B) malic enzyme (C) fatty acid synthase (D) betaine-homocysteine methyltransferase on the 1% Agarose gel.

گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسرید سرم کاهش یافته است. این یافته‌ها با داده‌های محققین دیگر مطابقت دارد (Rashidi *et al.*, 2010). آنها اعلام کردند که افزودن ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روی به جیره سبب کاهش کلسترول، تری‌گلیسرید و گلوکز می‌شود ($P < 0/05$).

اثر تیمار دمایی بر سطح گلوکز، تری‌گلیسرید و کلسترول در بین گروه‌های آزمایشی از نظر آماری معنی‌دار گردید ($P < 0/01$). سطح این فاکتورهای خونی در تیمارهای دمایی استرس نسبت به تیمارهای دمایی فاقد استرس افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. اثرات متقابل تیمارها معنی‌دار نگردید به همین دلیل این داده‌ها ارائه نگردیده

نتایج مندرج در این جدول نشان می‌دهد که تاثیر سطوح مختلف بتاین بر گلوکز خون معنی‌دار نبوده ولی بر کلسترول و تری‌گلیسرید تاثیر معنی‌داری داشته است. گزارشات نشان داده که افزودن بتاین به جیره مرغ تخمگذار سبب کاهش کلسترول و تری‌گلیسرید سرم خون خواهد شد. یکی از دلایل اثر بتاین بر غلظت تری‌گلیسرید را می‌توان به اثر آنزیم بتاین هموسیستین متیل ترانسفراز نسبت داد که در متابولیسم لیپیدها دخیل است (Zou *et al.*, 1998).

اثر مقادیر مختلف مکمل خوراکی روی بر تمام فاکتورهای خونی ذکر شده در جدول معنی‌دار بوده است ($P < 0/01$). با افزایش میزان روی جیره سطح

اثر افزودن روی بر بیان ژن

نتایج نشان داد که افزودن روی تاثیری بر بیان ژنهای BHMT و ژنهای لیپوژنیک کبدی نداشت (داده ها به دلیل محدودیت ارائه نشده اند). عنصر روی یک عنصر ضروری در ساختار بیش از ۲۰۰ آنزیم مختلف است که در مسیرهایی مانند متابولیسم کربوهیدراتها، انرژی، سنتز پروتئین، متابولیسم اسید نوکلئیک، یکپارچگی اپیتلیوم، ترمیم و تکثیر سلول و مورد استفاده قرار گرفتن ویتامین A و E فعال می باشد. عنصر روی بر فعالیت آنزیم می تواند تاثیر گذار باشد ولی بر بیان ژن تاثیری ندارد (Prasad and Kucuk, 2002).

اثر جایگزینی بتائین با متونین بر بیان ژن

اثر جایگزینی بتائین با متونین بر بیان ژنهای BHMT و ژنهای لیپوژنیک کبدی مرغ تخمگذار در جدول ۵ ارائه شده است. نتایج مندرج در این جدول نشان می دهد که میانگین تغییرات بیان ژن BHMT در گروه دریافت کننده بتائین نسبت به کنترل به میزان ۲/۱۱ واحد افزایش یافته است ($P < 0.01$).

است. علت افزایش این پارامترها می تواند به سبب رهاسازی گلیکوکورتیکوئیدهای در اثر استرس گرمایی و متحرک شدن چربی ها و مخصوصاً تری گلیسیریدها از بافت باشد. چربی های رها شده به جگر منتقل و به تری گلیسیریدها تبدیل می گردد. لیپوپروتئین های با چگالی کم (VLDL) تری گلیسیریدها را از کبد به بافت ها منتقل می کند و سبب افزایش تری گلیسیریدها خون می شود (Sahin and Kucuk, 2001). در تحقیقی اثر استرس گرمایی بر پارامترهای خونی مثل گلوکز، کورتیکوسترون و اسید اوریک مرغ تخمگذار بررسی گردید و مشخص شد که استرس گرمایی سبب افزایش گلوکز در سرم خون می گردد (Star *et al*, 2008). در دمای محیطی بالا ظرفیت غشاء موکوسی روده برای جذب قندها افزایش می یابد و استرس گرمایی باعث افزایش انتقال گلوکز از ژوژنوم می گردد (Garriga *et al.*, 2006). گزارشات نشان داده که دمای محیطی بالا با کاهش در مصرف خوراک باعث افزایش کلسترول و تری گلیسیرید و گلوکز گردیده زیرا در زمان تنش گرمایی که مصرف خوراک کاهش می یابد جوجه های گوشتی نیاز انرژی خود را به وسیله لیپولیز لیپیدهای بدن تامین می کنند که این امر منجر به افزایش کلسترول و تری گلیسیرید پلاسما می گردد (Rashidi *et al.*, 2010).

جدول ۴ - اثرات تیمارها بر غلظت گلوکز، کلسترول و تری گلیسیرید.

Table 4- The effects of treatment on blood glucose, cholesterol and triglyceride.

مکمل روی (میلی گرم بر کیلوگرم) Zinc supplementation (mg/kg)		درصد جایگزینی بتائین با متیونین (percentage of betaine substitution to methionine)		دما (Temperature)		
100	50	13%	0%	استرس Stress	معمولی Neutral	
226.31 ^b	234.69 ^a	141.19 ^{ns}	144.19 ^{ns}	153.57 ^a	133.43 ^b	گلوکز Glucose
121.96 ^b	132.75 ^a	189.26 ^b	227.41 ^a	214.45 ^a	189.26 ^b	کلسترول Cholesterol
159.61 ^b	164.71 ^a	1108.73 ^b	1279.89 ^a	161.45 ^a	147.26 ^b	تری گلیسرید Triglyceride

حروف غیر مشترک در هر ردیف و برای هر فاکتور جدول دارای اختلاف معنی داری در سطح (P < ۰/۰۱) می باشد و Ns به معنای عدم اختلاف معنی دار است.

در گروه دریافت کننده بتائین نسبت به کنترل به ترتیب به میزان ۲/۴۷ و ۱/۹۸ واحد کاهش یافته است (P < ۰/۰۱). این موضوع نشاندهنده این است که افزودن ۱۳ درصد بتائین به جیره سبب کاهش معنی داری در میزان بیان ژن آنزیم مالیک و اسید چرب سنتز شد. کاهش میزان بیان ژن آنزیم مالیک و اسید چرب سنتز نسبت به گروه فاقد بتائین ممکن است به این دلیل باشد که بتائین به عنوان یک دهنده متیل از طریق انتقال متیلی می تواند سنتز ترکیبات متیلی از قبیل کارنیتین و فسفولیپیدها را تسهیل کند. از این رو بتائین می تواند تماماً در متابولیسم لیپیدها بواسطه نقش خود در سنتز فسفاتیدیل کولین و در اکسیداسیون اسیدهای چرب

بیشترین میزان بیان در ژن BHMT مربوط به تیمار مصرف کننده ۱۳ درصد بتائین است و این نشان می دهد که افزودن ۱۳ درصد بتائین به جیره سبب افزایش معنی داری در میزان بیان ژن آنزیم BHMT گردیده است. گزارشات نشان داده که افزودن بتائین سبب افزایش بیان ژن BHMT می گردد (Cheng et al., 2008; Jia et al., 2015). آنزیمی که مسئول تبدیل هموسیستئین به متیونین است، آنزیم BHMT است که تنها آنزیم تجزیه کننده بتائین در بدن است و در کبد و کلیه مهره داران به مقدار زیادی وجود دارد (Pillai et al., 2006). نتایج مندرج در جدول ۵ نشان می دهد که میانگین بیان ژن آنزیم مالیک و اسید چرب سنتز

شرکت کند، زیرا کارنیتین برای انتقال اسیدهای چرب بلند زنجیر به میتوکندری مورد نیاز است.

جدول ۵- اثر جایگزینی بتائین با متیونین بر بیان ژنهای بتائین هموسیستین متیل ترانسفراز، آنزیم مالیک و اسید چرب سنتاز کبدی مرغ تخمگذار.

Table 5- The effect of betaine substitution to methionine on liver betaine homocysteine methyltransferase, malic enzyme and fatty acid synthase genes expression in laying hens.

خطای معیار میانگین Standard error mean (SEM)	درصد جایگزینی بتائین با متیونین (percentage of betaine substitution to methionine)		
	13%	0%	
0.098	0.720 ^b	0.340 ^a	بتائین هموسیستین متیل ترانسفراز betaine-homocysteine methyl transferase
0.098	0.329 ^b	0.814 ^a	آنزیم مالیک Malic enzyme
0.032	0.442 ^b	0.187 ^a	اسید چرب سنتاز Fatty acid synthase (FAS)

حروف غیر مشترک در هر ردیف در جدول دارای اختلاف معنی داری در سطح (P < 0.01) می باشد.

با بتائین کاهش یافته است. ارتباط محسوس بین فعالیت آنزیم اسید چرب سنتاز و سطح بیان mRNA، خود بر این امر اشاره می کند که اسید چرب سنتاز ممکن است بوسیله بتائین در مرحله قبل از ترجمه تنظیم شود (Huang *et al.*, 2007). اثرات بتائین بر متابولیسم چربی و همچنین بر بیان ژن اسید چرب سنتاز در گونه های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است که نتایج مشابهی را با مطالعه حاضر گزارش کردند (Xing and Jiang, 2012; Etherton, 2000). همانطور که در جدول ۴

اثر اصلی بتائین بر کاهش چربی، افزایش لیپولیز است، در طیور لیپوژنز در بافت کبد انجام می گیرد. بیان اسید چرب سنتاز، آنزیم مالیک و میزان سنتز اسید چرب تحت تأثیر برهمکنش های متعدد تغذیه ای و هورمونی قرار می گیرد. تمامی واکنش های بیوسنتز توسط یک کمپلکس چند آنزیمی، بنام اسید چرب سنتاز کاتالیز می شوند. گزارش نشان داده که فعالیت و بیان mRNA ی اسید چرب سنتاز و آنزیم مالیک به طرز قابل توجهی در بافت زیر جلدی خوک های تغذیه شده

لیپید کاهش داده که به تبع آن نیز می تواند منجر به کاهش تجمع چربی در بدن گردد. کاهش چربی در بافت چربی در اثر گنجاندن بتائین در جیره مرغان تخمگذار نیز می تواند تاییدی بر این مطلب باشد (Sun et al., 2008; Xing and Jiang, 2012). این محققین پیشنهاد دادند که بتائین می تواند سنتز چربی مرغان تخمگذار را با تأثیر بر رونویسی ژن اسیدچرب سنتاز تنظیم نماید.

اثر تنش حرارتی بر بیان ژن

نتایج تأثیر تیمارهای دمایی بر بیان ژن آنزیم بتائین هموسیستئین متیل ترانسفراز و ژنهای لیپوژنیک کبدی مرغ تخمگذار در جدول ۶ نشان داده شده است. نتایج مندرج در این جدول نشان می دهد که میانگین تغییرات بیان ژن آنزیم BHMT در تیمار دمایی ۳۵ درجه سانتیگراد نسبت به کنترل به میزان ۱/۵۸ واحد کاهش یافته است و این کاهش در سطح ۱ درصد معنی دار می باشد ($P < 0/01$). این مقایسه نشان می دهد که تیمار دمایی ۳۵ درجه سانتیگراد نسبت به گروه شاهد بیان کمتری داشته است. افزایش دما سبب کاهش معنی داری در میزان بیان ژن آنزیم BHMT شد. افزایش دما سبب کاهش مصرف خوراک می گردد در نتیجه بیان ژنها کاهش می یابد. نتایج تأثیر تیمارهای دمایی بر بیان ژن آنزیم مالیک و ژن اسید چرب سنتاز در طیور تخمگذار در جدول ۶ نشان داده شده است.

ارائه شد افزودن بتائین به جیره مرغ تخمگذار سبب کاهش کلسترول و تری گلیسیرید سرم خون خواهد شد. یکی از دلایل اثر بتائین بر غلظت تری گلیسیرید را می توان به اثر آنزیم BHMT نسبت داد که در متابولیسم لیپیدها دخیل است (Zou et al., 1998). گزارشات نشان داده که افزودن بتائین در سطح ۱۲۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به جیره، علاوه بر بهبود عملکرد رشد، در پی کاهش بیان ژن اسید چرب سنتاز و آنزیم مالیک، باعث کاهش چربی بافتی و افزایش گوشت لاشه می شود (Huang et al., 2007). البته باید ذکر کرد که سوخت و ساز چربی در بدن توسط یک مجموعه فاکتورهای بهم مرتبط از قبیل مواد مغذی، هورمونها، فاکتورهای رونویسی هسته و آنزیم های لیپوژنیک تحت تأثیر قرار می گیرند (Mersmann et al., 1973). از طرف دیگر آنزیم اسید چرب سنتاز آخرین مرحله ساخت چربی را در مسیر متابولیسم لیپوژنیک کاتالیز می کند که یک تعیین کننده اصلی برای حداکثر ظرفیت ساخت چربی توسط بافت بدن می باشد. بنابراین با کاهش بیان mRNA اسید چرب سنتاز، به دلیل همبستگی معنی داری که بین فعالیت آنزیم اسیدچرب سنتاز با سطح mRNA آن وجود دارد، می تواند این مطلب را برساند که اسیدچرب سنتاز در مرحله قبل از ترجمه توسط بتائین تنظیم گردد (Huang et al., 2007). این یافته ها پیشنهاد می کنند که بتائین ظرفیت بافت چربی را برای سنتز

جدول ۶- اثر تیمار دمایی بر بیان ژنهای BHMT، آنزیم مالیک و اسید چرب سنتاز کبدی مرغ تخمگذار.

Table 6- The effect of temperature on liver betaine homocysteine methyltransferase, malic enzyme and fatty acid synthase genes expression in laying hens.

خطای معیار میانگین Standard error mean (SEM)	Temperature دما	
	35 oC	23 oC
0.098	0.410 ^b	0.650 ^a
0.098	0.386 ^b	0.757 ^a
0.032	0.423 ^b	0.912 ^a

بتاین هموسیستین متیل ترانسفراز
betaine-homocysteine methyl
transferase (BHMT)
آنزیم مالیک
Malic enzyme
اسید چرب سنتاز
Fatty acid synthase (FAS)

حروف غیر مشترک در هر ردیف در جدول دارای اختلاف معنی داری در سطح (P < ۰/۰۱) می باشد.

میر و تحریک تنش اکسیداتیو شود (Lin *et al.*, 2006; Azad *et al.*, 2010).

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که افزودن روی تأثیری بر بیان ژن بتاین هموسیستین متیل ترانسفراز نداشت. اگرچه بیان ژن بتاین هموسیستین متیل ترانسفراز در شرایط استرس گرمایی در مقایسه با گروه کنترل (بدون استرس) ۱/۵۸ واحد کاهش یافت. بعلاوه بیان ژن بتاین هموسیستین متیل ترانسفراز با جایگزین نمودن بتاین با متیونین ۲/۱۱ واحد افزایش نشان داد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که جایگزینی مقداری از متیونین جیره مرغهای تخم-گذار با بتاین می تواند با مهار بیان ژن اسید چرب

نتایج مندرج در این جدول نشان می دهد که میانگین تغییرات بیان ژن آنزیم مالیک در تیمار دمایی ۳۵ درجه سانتیگراد نسبت به کنترل به میزان ۱/۹۶ واحد کاهش یافته است (P < ۰/۰۱). همچنین میانگین تغییرات بیان ژن اسید چرب سنتاز در تیمار دمایی ۳۵ درجه سانتیگراد نسبت به کنترل به میزان ۲/۱۵ واحد کاهش یافته است (P < ۰/۰۱). یافته های پژوهش حاضر با نتایج محققین دیگر مطابقت دارد. این محققین بیان کردند که در طی تنش حرارتی بیان ژن های سنتز کننده اسید چرب کاهش می یابد (Mujahid *et al.*, 2007). تنش حرارتی اثرات مضر زیادی در پرندگان دارد از جمله اینکه می تواند باعث کاهش مصرف خوراک و وزن بدن، سرکوب سیستم ایمنی، افزایش مرگ و

عارضه کبد چرب در شرایط تنش حرارتی موثر باشد.

سپاسگذاری

بودجه این پروژه از طرح شماره ۳۹-۸۹ دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان تامین گردیده است لذا از کلیه مسئولین پژوهشی دانشگاه بدلیل همکاری صمیمانه شان تشکر بعمل می آید.

سنتاز و آنزیم مالیک، ظرفیت بافت چربی را برای سنتز لیپید کاهش دهد و ممکن است عوارض ناشی از تنش حرارتی در طیور را بهبود بخشد. با توجه به اقتصادی بودن بتائین با افزودن بتائین به جیره می توان اثرات مضر تنش اکسیداتیو ناشی از تنش حرارتی را کاهش دهد. همچنین کاهش سنتز چربی در بدن به واسطه کاهش بیان ژن اسید چرب سنتاز به علت مصرف بتائین می تواند در پیشگیری از

منابع

- Azad K, Kikusato M, Hoque AM, Toyomizu M (2010). Effect of chronic heat stress on performance and oxidative damage in different strains chickens. *Poultry Science* 47: 333-337.
- Carter AL, Abney T O, Lapp DF (1995). Biosynthesis and metabolism of Carnitine. *Journal of Child Neurology* 10 (suppl2): S3-S7.
- Cox MM, Nelson DL (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 2. Publisher, WH Freeman, 5th edition. USA.
- Cheng Ji, Masao S, Dennis V, Tin Aung T, Murad O, Christine C, Neil K (2008). Effect of transgenic extra-hepatic expression of betaine-homocysteine methyltransferase on alcohol or homocysteine-induced fatty liver. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* 32(6): 1049-1058.
- Etherton TD (2000). The biology of somatotropin in adipose tissue growth and nutrient partitioning. *Journal of Nutrition* 130: 2623-2625.
- Garriga C, Richard R, Hunter C, Amat J, Planas M, Malcolm A, Moreto M, Moreto M (2006). Regulatory, integrative and comparative physiology. *American Journal of Physiology* 290: R195-R201.
- Huang QC, Xu ZR, Han XY, Li WF (2007). Effect of dietary betaine supplementation on lipogenic enzyme activities and fatty acid synthase mRNA expression in finishing pigs. *Animal Feed Science and Technology* 140: 365-375.
- Jason LE, Douglas MW, Robert RB, Margaret A G, David HB (1998). Hepatic and renal betaine-homocysteine methyl transferase activity in pigs as affected by dietary intakes of sulfur amino acids, choline and betaine. *Journal of Animal Science* 76: 606-610.
- Jia Y, Song H, Gao G, Cai D (2015). Maternal betaine supplementation during gestation enhances expression of mtDNA-encoded genes through D-Loop DNA hypomethylation in the skeletal muscle of newborn piglets. *Journal Agriculture Food Chemistry* 63: 10152-60

- Konca Y, Kirkpinar F (2008). Effect of betaine on performance, carcass, bone and blood characteristics of broilers during natural summer temperatures. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 7: 930-937.
- Kristin A, Adam J.D (2001). Dietary protein concentration regulates the mRNA expression of chicken hepatic malic enzyme. *Journal of Nutrition* 131: 2269–2274.
- Lin H, Decuypere E, Buyse J (2006). Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology* 144: 11-17.
- Mckee JS, Harrison PC, Riskowski GL (1997). Effect of supplemental ascorbic acid on the energy conversion of broiler chicks during heat stress and feed withdrawal. *Poultry Science* 76: 1278-1286.
- Mersmann HJ, Houk JM, Phinney G, Underwood MC (1973). Effect of diet and weaning age on in vitro lipogenesis in young swine. *Journal of Nutrition* 103: 821–828.
- Mujahid A, Pumford NR, Bottje W, Nakagawa K, Miyazawa T, Akiba Y, Toyomizu M (2007). Mitochondrial oxidative damage in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. *Poultry Science* 44: 439-445.
- Murray RK, Granner DK, Rodwell VW (2009). *Harper's Illustrated Biochemistry*. McGraw Hill Professional Publisher, 2009. 792.
- Prasad AS, Kucuk O (2002). Zinc in cancer prevention. *Cancer and Metastasis Review*. 21: 291–295.
- Pfaffl MW, Horgan GW, 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: 1-10.
- Rashidi AA, Gofrani Ivary Y, Khatibjoo A, Vakili R (2010). Effect of dietary fat, vitamin E and zinc on immune response and blood parameters of broiler reared under heat stress. *Research Journal of Poultry Science* 3: 32-38.
- SAS Institute. 2004. *The SAS User's Guide: Statistics*. Version 9.1. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Sahin R, Kucuk O (2001). A simple way to reduce heat stress in laying hens as judged by egg laying, body weight gain and biochemical parameters. *Acta Veterinaria Hungarica* 49: 421–430.
- Star L, Decuypere E, Parmentier HK, Kemp B (2008). Effect of single or combined climatic and hygienic stress in four layers. *Poultry Science* 87: 1031–1038.
- Sun HR, Yang ZB, Wang SZ, Zhang G (2008). Effects of betaine supplementation to methionine deficient diet on growth performance and carcass characteristics of broilers. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 3: 78-84.
- Xing J, Jiang Y (2012). Effect of dietary betaine supplementation on mRNA level of lipogenesis genes and on promoter CpG methylation of fatty acid synthase (FAS) gene in laying hens. *African Journal of Biotechnology* 11: 6633-6640.
- Xu ZR, Zhan XA (1998). Effect of betaine on methionine and fat metabolism in broiler chickens. *Acta Veterinaria Zootechnologia Sinica* 29: 212-219.
- Zou XT, Ma YL, Xu ZR (1998). Effects of betaine and thyroprotein on laying performance and approach to mechanism of the effects in hens. *Acta Agriculture Zhejiang* 10: 144-149.

Effects of zinc supplementation and betaine substitution to methionine on hepatic betaine - homocysteine methyltransferase and lipogenic genes expression in laying hens under heat stress

Nazari M.^{1*}, Sallari S.², Ghorbani M.R.³

¹Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran.

²Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran.

³Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran.

Abstract

To investigate the effects of dietary zinc and betaine (Bet) substitution to methionine (Met) on hepatic betaine - homocysteine methyltransferase (BHMT) and lipogenic (malic enzyme and fatty acid synthase) genes expression in laying hens under heat stress by using real-time qPCR, an experiment was performed with 288 Hy-line W-36 leghorn (at 50 to 62 weeks of age) in complete randomized design (CRD) with a 3×2×2 factorial arrangement of treatments including twelve treatments, 3 replicates and 8 hens in each replicate. There were 6 dietary treatments: three doses of Bet (0, 13 and 26%) substitute to Met combined with three levels of zinc (90 and 100 mg/kg) supplemented to the basal diets that were combined with two environmental conditions (thermoneutral and heat stress conditions). Results showed that dietary supplemental zinc had no effect on BHMT, malic enzyme and fatty acid synthase (FAS) genes expression. The results confirmed that Bet substitution to methionine due to a 2.11-fold increase ($P < 0.01$) compared to the control in BHMT gene expression whereas; it due to a 2.47 and 1.98-fold decrease ($P < 0.01$) compared to the control in malic enzyme and FAS genes expression. Moreover, BHMT, malic enzyme and FAS genes expression was significantly reduced 1.58, 1.96 and 2.15 fold by heat stress when compared with control group, respectively ($P < 0.01$). Therefore, betaine can reduce the harmful effects of heat stress by increasing the expression of BHMT gene and reducing the expression of malic enzyme and FAS genes in laying hens under heat stress.

Keywords: *Heat stress, Zn, BHMT, Metionine, lipogenic genes*

* Corresponding Author: Nazari.M.

Tel: 09166036404

Email: fat_sa_2005@yahoo.com

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500