مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

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

**محمودنظری*[۱]، سمیه سالاری[۲]، محمدرضا قربانی[۳]**

[۱]استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز، ایران

[۲]دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز، ایران

[۳]استادیار 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 بتایین 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 (۲×۲×۳) با ۱۲ تیمار آزمایشی، ۳ تکرار و ۸ قطعه مرغ در هر تکرار از سن ۵۰ الی ٦٢ هفتگی اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل سه سطح مختلف جایگزینی بتائین با متیونین (صفر و ۱۳ و ٢٦ درصد) و دو سطح مختلف مکمل روی (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم 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 بتایین هموسیستئین متیل ترانسفراز و ژنهای لیپوژنیک کبدی نداشت. جایگزین نمودن بتایین با متیونین سبب افزایش بیان بتائین هموسیستئین متیل ترانسفراز به میزان ۲/۱۱ واحد و کاهش معنی‌دار بیان ژن آنزیم مالیک و اسید چرب سنتاز به میزان ۲/٤۷ و ۱/۹۸ 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، ۱/۹٦ و ۲/۱۵ واحد کاهش پیدا کرد (P<۰/۰۱). 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، بتایین هموسیستئین متیل ترانسفراز، متیونین، ژنهای لیپوژنیک.***

* نویسنده مسئول: محمود نظری تلفن: ۰۹۱٦٦۰۳٦٤۰٤ Email: fat_sa_2005@yahoo.com

**مقدمه**

بتائین یک تری متیل مشتق شده از گلیسین بوده که در بسیاری از سلول‌ها یافت می‌شود 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 می‌باشد. 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 می‌کند (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 فعالیت‌های آنزیمی به همراه یک فعالیت هیدرولیتیک، اسید چرب خاتمه یافته را از بخش ACP- مانند کمپلکس آنزیمی جدا می¬کنند (Murray *et al.*, 2009). تنش حرارتی سطح پلاسمایی اسیدهای چرب، تری گلیسریدها، کلسترول 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 می‌شود 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 پرندگانِ 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 چربی‌ها در بدن حیوانات استفاده می‌شود ( Mcke *et al.*, 1997). به‌علاوه، یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های 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 می‌شود. فعالیت آنزیم مالیک کبدی همبستگی مثبتی با سرعت سنتز اسیدهای چرب دارد (Kristin *et al.*, 2001).

همچنین یکی از انزیمهای موثر که در بیوسنتز متیونین نقش دارد آنزیم بتائین- هموسیستئین متیل ترانسفراز (BHMT) می‌باشد که از متالوآنزیم های حاوی عنصر روی می باشد و گروه متیل آزاد شده از بتائین تحت تاثیر این آنزیم به هموسیسئین 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 هموسیستئین 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 بتایین هموسیستئن 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 قطعه مرغ تخمگذار با میانگین وزنی۵۰± ۱۵۰۰ گرم در سن ۵۰ الی ٦٢ هفتگی از سویه تجاری های لاین W 36 در سیکل دوم تولید به صورت آزمایش فاکتوریل ۲×۲×۳ 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 ٢٦ درصد) و دو سطح مختلف مکمل روی (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم 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)[1] 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. ١٤٤ قطعه مرغ در یک سالن در دمای (۲۳ درجه سانتیگراد ) نگهداری شدند و جهت انجام تنش حرارتی، ١٤٤ 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

1- National Research Council

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. نمونه ها 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 فرمنتاز) استفاده گردید. طراحی آغازگر برای کمیت سنجی با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز 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 Step one plus ساخت شرکت Applied Biosystem آمریکا استفاده شد. واکنش‌ها درحجم نهایی ۲۵ میکرولیتر از Master mix SYBER Green ساخت شرکت ABI آمریکا صورت گرفت. تکنیک PCR طبق پروتکل جدول (۳) در ٤٠ سیکل انجام شد. روش بررسی تغییرات بیان ژن در این پژوهش روش ΔΔCT (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: $^{-\Delta\Delta CT}$ ۲ انجام گردید (Pfaffl *et al*., 2002). بررسی آماری داده ها توسط نرم افزار SAS ۹,۱ و آزمون t انجام شد.

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

**Table 1- Composition of diets (%).**

| مواد خوراکی Ingredients | جیره Diet | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| ذرت (Corn) | 61 | 61 | 61 | 61 | 61 | 61 |
| کنجاله سویا (Soybean meal) | 23.3 | 23.3 | 23.3 | 23.3 | 23.3 | 23.3 |
| پودر ماهی (Fish meal) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| روغن گیاهی (Plant oil) | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| دی ال- متیونین (DL- methionine) | 0.14 | 0.14 | 0.0867 | 0.0867 | 0.0334 | 0.0334 |
| بتائین آنهیدروس (Anhydrous betaine) | 0 | 0 | 0.0266 | 0.0266 | 0.0533 | 0.0533 |
| سولفات روی ($ZnSo_4$) | 0.0177 | 0.0309 | 0.0177 | 0.0309 | 0.0177 | 0.0309 |
| انرژی متابولیسمی(kcal/kg) (Metabolism energy) | 2821 | 2821 | 2821 | 2821 | 2821 | 2821 |
| پروتئین خام (٪) (Crude protein %) | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 |
| متیونین (٪) (Methionine %) | 0.41 | 0.41 | 0.3567 | 0.3567 | 0.3034 | 0.3034 |
| روی تامین شده از جیره بدون مکمل (mg/kg) Dietary Zinc without supplement (mg/kg) | 20.11 | 20.11 | 20.11 | 20.11 | 20.11 | 20.11 |

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

**Table 2- Sequences for real time qPCR primers.**

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

**جدول۳- دستورالعمل Real- time qPCR.**

**Table 3- Real- time qPCR protocol.**

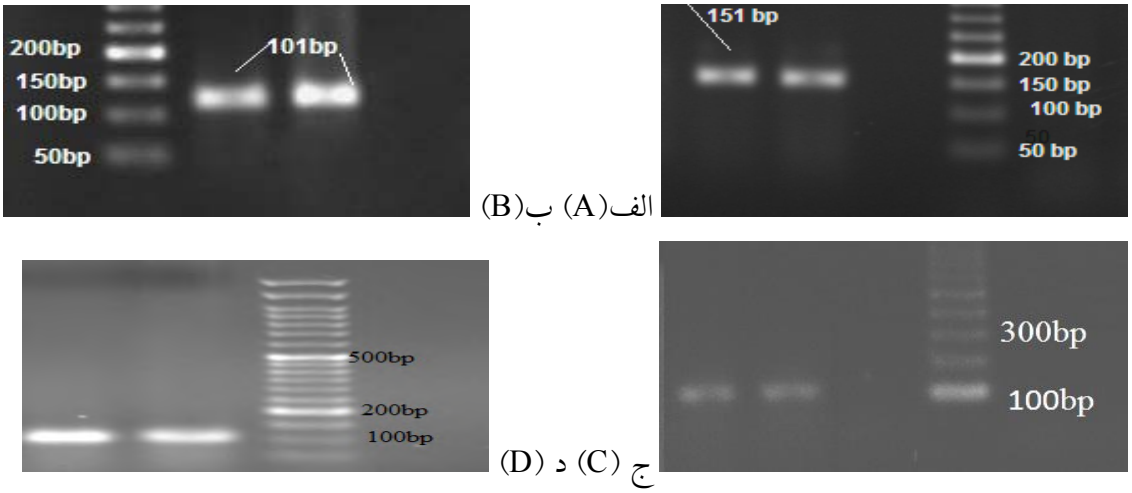
| سیکل<br>Cycle | تعداد چرخه<br>Number of cycle | زمان<br>Time | دما (oC)<br>Temperature | توضیح<br>Description |
|---|---|---|---|---|
| سیکل اول<br>First cycle | 1 X | 2 min | 55 | |
| سیکل دوم<br>Second cycle | 1 X | 10 min | 95 | |
| سیکل سوم<br>Third cycle | | 15 s | 95 | دناتوره شدن<br>denaturation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

**نتایج و بحث**

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

**اثر دما، جایگزینی بتایین و مکمل روی بر فاکتورهای خونی**

نتایج تأثیر سطوح مختلف بتائین جایگزین شده با متیونین، دما و عنصر روی بر فاکتورهای خونی (گلوگز، کلسترول و تری گلیسیرید) در جدول ٤ نشان داده شده است.




الف(A) ب(B)

ج (C) د (D)

**شکل ۱- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز ژنهای بتا اکتین (الف) آنزیم مالیک(ب)، اسید چرب سنتاز (ج) بتایین هموسیستئین 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.**

نتایج مندرج در این جدول نشان می‌دهد که تاثیر سطوح مختلف بتائین بر گلوکز خون معنی‌دار نبوده ولی بر کلسترول و تری‌گلیسرید تأثیر معنی‌داری داشته است. گزارشات نشان داده که افزودن بتائین به جیره مرغ تخمگذار سبب کاهش کلسترول و تری گلیسیرید سرم خون خواهد شد. یکی از دلایل اثر بتائین بر غلظت تری‌گلیسرید را می‌توان به اثر آنزیم بتائین هموسیستئین 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 ($P< ۰/۰۱$). با افزایش میزان روی جیره سطح گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسرید سرم کاهش یافته است. این یافته ها با دادهای محققین دیگر مطابقت دارد (Rashidi *et al*., 2010). آنها اعلام کردند که افزودن ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم روی به جیره سبب کاهش کلسترول، تری گلیسیرید و گلوکز می شود ($P< ۰/۰۵$).

اثر تیمار دمایی بر سطح گلوکز، تری گلیسرید و کلسترول در بین گروه‌های آزمایشی از نظر آماری معنی‌دار گردید ($P< ۰/۰۱$). سطح این فاکتورهای خونی در تیمارهای دمایی استرس نسبت به تیمارهای دمایی فاقد استرس افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. اثرات متقابل تیمارها معنی دار نگردید به همین دلیل این داده ها ارائه نگردیده

است. علت افزایش این پارامترها می تواند به سبب رهاسازی گلیکوکورتیکوئیدهای در اثر استرس گرمایی و متحرک شدن چربی‌ها و مخصوصاً تری‌گلیسیریدها از بافت باشد. چربی‌های رها شده به جگر منتقل و به تری‌گلیسیریدها تبدیل می‌گردد. لیپوپروتئین‌های با چگالی کم (VLDL) تری‌گلیسیریدها را از کبد به بافت‌ها منتقل می‌کند و سبب افزایش تری‌گلیسیریدها خون می‌شود (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 می‌گردد (Star *et al*, 2008). در دمای محیطی بالا ظرفیت غشاء موکوسی روده برای جذب قندها افزایش می‌یابد و استرس گرمایی باعث افزایش انتقال گلوکز از ژوژنوم می‌گردد (Garriga *et al*., 2006). گزارشات نشان داده که دمای محیطی بالا با کاهش در مصرف خوراک باعث افزایش کلسترول و تری‌گلیسرید و گلوکز گردیده زیرا در زمان تنش گرمایی که مصرف خوراک کاهش می‌یابد جوجه‌های گوشتی نیاز انرژی خود را به وسیله لیپولیز لیپیدهای بدن تامین می‌کنند که این امر منجر به افزایش کلسترول و تری‌گلیسرید پلاسما می‌گردد (Rashidi *et al*., 2010).

**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 متیونین بر بیان ژنهای BHMT و ژنهای لیپوژنیک کبدی مرغ تخمگذار در جدول ۵ ارائه شده است. نتایج مندرج در این جدول نشان می‌دهد که میانگین تغییرات بیان ژن BHMT در گروه دریافت کننده بتائین نسبت به کنترل به میزان ۲/۱۱ واحد افزایش یافته است ($P < ۰/۰۱$).

**جدول ٤ – اثرات تیمارها بر غلظت گلوکز، کلسترول و تری گلیسرید.**

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

| مکمل روی (میلی گرم بر کیلوگرم) Zinc supplementation (mg/kg) | | درصد جایگزینی بتایین 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] | تری‌گلیسرید Triglyceride |

حروف غیر مشترک در 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.

بیشترین میزان بیان در ژن BHMT مربوط به تیمار مصرف کننده ۱۳ درصد بتائین است و این نشان می‌دهد که افزودن ۱۳ درصد بتائین به جیره سبب افزایش معنی داری در میزان بیان ژن انزیم BHMT گردیده است. گزارشات نشان داده که افزودن بتائین سبب افزایش بیان ژن BHMT می گردد (Cheng *et al.*, 2008; Jia *et al.*, 2015). آنزیمی‌که 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 می‌دهد که میانگین بیان ژن آنزیم مالیک و اسید چرب سنتاز در گروه دریافت کننده بتائین نسبت به کنترل به ترتیب به میزان ۲/٤۷ 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 انزیم مالیک و اسید چرب سنتاز شد. کاهش میزان بیان ژن آنزیم مالیک و اسید چرب سنتاز نسبت به گروه فاقد بتائین ممکن است به این دلیل باشد که بتائین به عنوان یک دهنده متیل از طریق انتقال متیلی می‌تواند سنتز ترکیبات متیلی از قبیل کارنیتین و فسفولیپیدها را تسهیل کند. از این رو بتائین می‌تواند تماماً در متابولیسم لیپیدها بواسطه نقش خود در سنتز فسفاتیدیل کولین و در اکسیداسیون اسیدهای چرب

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

**جدول۵- اثر جایگزینی بتائین با متیونین بر بیان ژنهای بتایین هموسیستئن 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 lying hens.**

| | درصد جایگزینی بتایین با متیونین (percentage of betaine substitution to methionine) | | خطای معیار میانگین Standard error mean (SEM) |
|---|---|---|---|
| | 13% | 0% | |
| بتایین هموسیستئن متیل ترانسفراز betaine-homocysteine methyl transferase | $0.720^{b}$ | $0.340^{a}$ | 0.098 |
| آنزیم مالیک Malic enzyme | $0.329^{b}$ | $0.814^{a}$ | 0.098 |
| اسید چرب سنتاز Fatty acid synthase (FAS) | $0.442^{b}$ | $۰/۸۷۹^{a}$ | 0.032 |

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

اثر اصلی بتائین بر کاهش چربی، افزایش لیپولیز است، در طیور لیپوژنز در بافت کبد انجام می‌گیرد. بیان اسید چرب سنتاز، آنزیم مالیک و میزان سنتز اسید چرب تحت تأثیر برهمکنش‌های متعدد تغذیه-ای و هورمونی قرار می‌گیرد. تمامی واکنش‌های 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 وآنزیم مالیک به طرز قابل توجهی در بافت زیر جلدی خوک‌های تغذیه شده با بتائین کاهش یافته است. ارتباط محسوس بین فعالیت آنزیم اسید چرب سنتاز و سطح بیان mRNA، خود بر این امر اشاره می‌کند 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 گونه‌های 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 ٤

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 تری‌گلیسرید را می‌توان 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 می‌شود (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 تاثیر قرار می‌گیرند (Mersmann *et al*., 1973). از طرف دیگر آنزیم اسید چرب سنتاز آخرین مرحله ساخت چربی را در مسیر متابولیکی لیپوژنیک کاتالیز می کند که یک تعیین کننده اصلی برای حداکثر ظرفیت ساخت چربی توسط بافت بدن می‌باشد. بنابراین با کاهش بیان mRNA اسید چرب سنتاز، به دلیل همبستگی معنی‌داری که بین فعالیت آنزیم اسیدچرب سنتاز با سطح mRNA آن وجود دارد، می‌تواند 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 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 می‌تواند تاییدی بر این مطلب باشد(Sun *et al*., 2008; Xing and Jiang, 2012). این محققین پیشنهاد دادند که بتائین می‌تواند 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 بتایین هموسیستئین متیل ترانسفراز و ژنهای لیپوژنیک کبدی مرغ تخمگذار در جدول ٦ نشان داده شده است. نتایج مندرج در این جدول نشان می‌دهد 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 ($P < ۰/۰۱$). این مقایسه نشان می‌دهد 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 می‌یابد. نتایج تأثیر تیمارهای دمایی بر بیان ژن آنزیم مالیک و ژن اسید چرب سنتاز در طیور تخمگذار در جدول ٦ نشان داده شده است.

**جدول ٦- اثرتیمار 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 lying hens.**

| خطای معیار میانگین | Temperature | دما | |
|---|---|---|---|
| Standard error mean (SEM) | 35 oC | 23 oC | |
| 0.098 | 0.410[b] | 0.650[a] | بتایین هموسیستئن متیل ترانسفراز betaine-homocysteine methyl transferase (BHMT) |
| 0.098 | 0.386[b] | 0.757[a] | آنزیم مالیک Malic enzyme |
| 0.032 | 0.423[b] | 0.912[a] | 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.

نتایج مندرج در این جدول نشان می‌دهد که میانگین تغییرات بیان ژن آنزیم مالیک در تیمار دمایی ۳۵ درجه سانتیگراد نسبت به کنترل به میزان ۱/۹٦ 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 می‌تواند باعث کاهش مصرف خوراک و وزن بدن، سرکوب سیستم ایمنی، افزایش مرگ و میر و تحریک تنش اکسیداتیو شود (Lin *et al*., 2006; Azad *et al*., 2010).

## نتیجه گیری

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

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 بتایین 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 می‌تواند در پیشگیری از 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 همکارای صمیمانه شان تشکر بعمل می آید.

**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 onin 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 Ivari 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 Vetenarium Hungarcia 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, YangZB, 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 Zootechnology 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]**

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