

## تأثیر مکمل بتائین بر بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های لیپوژنیک و سطوح لیپیدهای خون و کبد جوجه‌های گوشتی

نیما مساوات<sup>۱\*</sup> محمد چمنی<sup>۲</sup> فرهاد فرودی<sup>۳</sup> علی اصغر صادقی<sup>۲</sup>

۱) گروه علوم دامی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران  
۲) گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
۳) گروه علوم دامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

(دریافت مقاله: ۷ اسفند ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۱۷ اردیبهشت ۱۳۹۷)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** بتائین مشتق تری‌متیله‌ای از آمینواسید گلیسین است که در بدن بسیاری از جانوران یافت می‌شود. هدف: این پژوهش به منظور تعیین اثر افزودن مکمل بتائین در جیره بر بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های لیپوژنیک و لیپیدهای سرم و کبد در جوجه‌های گوشتی انجام شد. روش کار: در مجموع ۳۲۰ قطعه جوجه گوشتی (راس ۳۰۸) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۴ تکرار، با جیره‌های آزمایشی که شامل تیمار شاهد، بدون مصرف مکمل بتائین، و تیمارهای دوم، سوم و چهارم که به ترتیب شامل ۰/۰۵، ۰/۰۸ و ۰/۱۱٪ بتائین هیدروکلراید بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج: افزودن بتائین به جیره اثر معنی‌داری بر بیان ژن لیپوپروتئین لیپاز و فعالیت آنزیم‌های استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز و فتی‌اسید سینتاز نداشت ( $P > 0/05$ ). افزودن مکمل بتائین سبب کاهش معنی‌دار کلسترول و تری‌آسیل‌گلیسرول در کبد جوجه‌های تیمار چهارم (حاوی ۰/۰۸٪ بتائین هیدروکلراید) نسبت به گروه شاهد گردید ( $P < 0/05$ ). نتیجه‌گیری نهایی: به طور کلی نتایج نشان داد که بیان ژن لیپوپروتئین لیپاز و فعالیت آنزیم‌های استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز و فتی‌اسید سینتاز در جوجه‌های گوشتی، کمتر زیر تأثیر افزودن بتائین به جیره قرار می‌گیرد.

**واژه‌های کلیدی:** بتائین، لیپیدهای خون، آنزیم‌های لیپوژنیک، لیپیدهای کبد، بیان ژن

### مقدمه

بتائین مشتق تری‌متیله‌ای از آمینواسید گلیسین است ( $N,N,N$ -trimethylglycine) که در بدن بسیاری از جانوران یافت می‌شود. بتائین در دستگاه گوارش به عنوان یک تنظیم‌کننده فشار اسمزی، و در مسیرهای متابولیکی به عنوان یک دهنده گروه متیل عمل می‌کند. از آن جایی که بتائین به عنوان یک دهنده گروه متیل عمل می‌کند، می‌تواند تا حدی جایگزین متیونین و کولین جیره غذایی گردد (۱۱). بتائین در متابولیسم چربی شرکت کرده و مانعاز تجمع بیش از حد چربی در کبد می‌شود (۴۶، ۱۱، ۷). به‌طور کلی، ذخیره‌سازی چربی در بدن به‌وسیله تعادل میان جذب چربی از روده، بیوسنتز اسیدهای چرب و کاتابولیسم چربی از راه بتا اکسیداسیون انجام می‌شود؛ بنابراین، اگر مقدار چربی جذب شده از روده یکسان باشد، ذخیره‌سازی مقادیر کم‌تر چربی در بدن ممکن است مربوط به افزایش کاتابولیسم و یا کاهش بیوسنتز اسیدهای چرب، و یا هر دو باشد (۲۲). پژوهش‌های گوناگونی در مورد اثرات بتائین در کاهش تجمع چربی در بدن پرندگان و نیز اثر آن بر فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز چربی و میزان چربی کبد صورت گرفته است (۴۴، ۳۲، ۱۲). Hung و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که افزودن مکمل بتائین به جیره غذایی خوک، فعالیت آنزیم‌های استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز و فتی‌اسید سینتاز را در بافت چربی کاهش می‌دهد. Ji و Zi-Rong در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند که استفاده از بتائین در جیره غذایی خوک، سبب افزایش لسیترین کبدی شده و در نتیجه

متابولیسم لیپیدها در کبد را بهبود می‌بخشد. Rahmani و Jahanian در سال ۲۰۰۸ بیان کردند که افزودن بتائین به جیره جوجه‌های گوشتی، درصد چربی کبدی را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. گام اساسی در انتقال اسیدهای چرب، تری‌گلیسریدها، کیلومیکرون‌ها و لیپوپروتئین‌های با چگالی بسیار کم به درون بافت‌ها، هیدرولیز هسته تری‌گلیسریدی ذرات لیپوپروتئین به‌وسیله لیپوپروتئین لیپاز است (۴۳). لیپوپروتئین لیپاز با فعالیت کاتالیتیک روی لیپوپروتئین‌ها، اسیدهای چرب را برای جذب و ذخیره‌سازی در بافت چربی، و یا اکسیداسیون در اندام‌هایی چون قلب و ماهیچه آزاد می‌کند (۶). لیپوپروتئین لیپاز نقشی اساسی در تجمع چربی در بافت چربی داشته و کاهش لیپوپروتئین لیپاز در بافت چربی به‌وسیله‌ی برخی عوامل تغذیه‌ای، ممکن است در آهسته کردن چاقی در جوجه‌های گوشتی موثر باشد (۴۳). بازنوسازی (سنتز De novo) اسیدهای چرب در بیش‌تر گونه‌های جانوری رخ می‌دهد و نتیجه آن سنتز اسیدهای چرب از پیش‌سازهای غیرچربی‌است (۹، ۲۷). بیشتر چربی انباشته شده در فرآورده‌های جانوری، از بازنوسازی اسیدهای چرب ایجاد می‌شود. بازنوسازی اسیدهای چرب در پرندگان به‌طور عمده در کبد رخ می‌دهد (۱۶). دو آنزیم مهم در متابولیسم چربی در کبد پرندگان، استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز (EC ۶/۴/۸) و فتی‌اسید سینتاز (EC ۲/۳/۱/۸۵) هستند. استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز (ACC) با کربوکسیلاسیون استیل کوآنزیم A سبب تولید مالونیل کوآنزیم A شده، و فتی‌اسید سینتاز (FAS) نیز سنتز پالمیتات از استیل کوآنزیم A



Aldrich آمریکا تهیه شد. این مواد و شماره کاتالوگ مربوطه عبارت بودند از: (RES<sup>3</sup>09AT-BY) Tris-HCl، (PHR1359) Glutathione، Bovine serum albumin، (E6758) EDTA، (MA266) MgCl<sub>2</sub>، (05470) Potassium citrate، (60153) Adenosine tri-phosphate، (A26209) Acetyl CoA، (A2056) Malonyl CoA، (685518) NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>، (314234) KCl، (P9541) Isopropyl ether، (296856) NADPH، (N5130) Dithiothreitol، (43815) Isopropyl alcohol (W292907)، محلول Aquasol 2 از شرکت PerkinElmer آمریکا (شماره کاتالوگ 6NE9529) تهیه شد. DEPC-treated water (شماره کاتالوگ AM 9922) و واکنشگر TRIzol® (شماره کاتالوگ 15596-018) از شرکت Life technologies آمریکا تهیه شد.

**اندازه‌گیری لیپیدهای سرم:** در پایان دوره آزمایشی (روز ۴۲)، دو جوجه از هر تکرار (۸ پرنده در هر تیمار) انتخاب، و نمونه خون از سیاهرگ زیر بال گرفته شد. نمونه خون (بدون ماده ضدانعادی) برای جداسازی سرم به آزمایشگاه منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (g × 6000، 4°C). برای سنجش فراسنجه‌های لیپیدی سرم از کیت‌های شرکت پارس آزمون استفاده شد. این فراسنجه‌ها شامل تری-آسیل گلیسرول (شماره کاتالوگ 0325001)، کلسترول (شماره کاتالوگ 1010500)، و HDL (شماره کاتالوگ 0111501) بودند. اندازه‌گیری این فراسنجه‌ها به روش رنگ‌سنجی و به ترتیب بر پایه GPO-PAP، CHOD-PAP، VLDL، PRECIPITANT با استفاده از اسپکتروفوتومتر (مدل Cary 100، USA) انجام شد. لیوپروتئین‌های با چگالی بسیار کم (VLDL) و LDL با استفاده از معادله‌های زیر به دست آمدند (۱۴):

$$VLDL = TAG \div 5$$

$$LDL = \text{Total cholesterol} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

**نمونه‌برداری از کبد:** در پایان آزمایش (۴۲ روزگی)، ۲ پرنده از هر تکرار (۸ پرنده در هر تیمار) انتخاب و کشتار شدند. سپس کبد آن‌ها جدا و بی‌درنگ با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت  $\pm 0.001$  g وزن گردید. کبد‌ها در محلول سالین (۰/۹٪ NaCl) درون ظروف حاوی یخ قرار داده شدند و برای انجام آزمایش‌های بعدی به آزمایشگاه منتقل گردیدند (۴۸).

**هوموژنیزه کردن نمونه‌های کبدی و استخراج محتوای لیپیدی برای اندازه‌گیری TAG، کلسترول و فسفولیپیدها:** نمونه‌های کبدی سه بار با استفاده از محلول سالین شستشو داده شد و سپس ۱ g از بافت کبد در ۲۰ ml محلول فولج (کلروفرم-متانول به نسبت ۲ به ۱ vol/vol) قرار داده شد (۱۳). محلول فولج محتوی نمونه کبدی با استفاده از دستگاه هوموژنایزر (مدل IKA، ۲۵ T، آلمان)، هوموژنیزه شد. نمونه هوموژنیزه به مدت یک ساعت به حال خود رها شد تا از انتقال همگی محتوای لیپیدی آن به محلول فولج اطمینان حاصل شود. پس از سپری شدن یک ساعت،

و مالونیل کوآنزیم A را کاتالیز می‌کند (۲۴). فتی اسید سینتاز مرحله پایانی مسیر بیوسنتز اسیدهای چرب را کاتالیز می‌کند. غلظت بافتی فتی اسید سینتاز که زیر تأثیر عوامل هورمونی و تغذیه‌ای قرار دارد، تعیین کننده اصلی حداکثر ظرفیت یک بافت برای سنتز اسیدهای چرب به روش بازسازي است. به نظر می‌رسد که از یک سو کاهش فعالیت فتی اسید سینتاز باعث کاهش ظرفیت سنتز اسیدهای چرب می‌گردد، و از سوی دیگر، فعالیت استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز زیر اثر شرایط تغذیه‌ای قرار دارد (۱۹).

پژوهش‌های بسیاری برای بررسی اثرات بتائین در کاهش چربی شکمی جوجه‌های گوشتی انجام شده است، ولی ساز و کار اصلی کاهش دهنده متابولیسم چربی در کبد - که خود منجر به کاهش چربی شکمی می‌شود - هنوز به درستی روشن نشده است. در سال‌های اخیر، این مهم در تغذیه دام‌های تک‌معدده‌ای و پرندگان مورد توجه بیش تری قرار گرفته است. با توجه به اطلاعات اندک درباره اثرات بتائین بر بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های موثر بر متابولیسم چربی در جوجه‌های گوشتی، انجام این پژوهش ضروری به نظر می‌رسید و بنابراین، هدف از پژوهش حاضر بررسی اثرات مکمل جیره‌ای بتائین (به‌عنوان دهنده گروه متیل) بر بیان ژن لیپوپروتئین لیپاز در بافت چربی شکمی، فعالیت آنزیم‌های ACC و FAS در کبد، و نیز سطوح لیپیدها در کبد و سرم خون می‌باشد.

## مواد و روش کار

**پرندگان و جیره‌های آزمایشی:** در این آزمایش از ۳۲۰ قطعه جوجه یگوشینر یکروزه استفاده شد. جوجه‌ها به‌طور تصادفی به ۱۶ گروه ۲۰ تایی با میانگین وزنی  $8 \pm 0.4$  گ در این آزمایش از چهار نوع جیره غذایی به عنوان تیمارهای آزمایشی در قالب یک طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. هر تیمار شامل ۴ پن (تکرار) به ابعاد  $1 \times 1/5 \text{ m}^2$  بود. برای بستر این پن‌ها از پوشینه دانه برنج استفاده شد. برنامه‌ی روشنایی از آغاز دوره پرورش تا پایان آن به صورت ۲۳ ساعت روشنایی و ۱ ساعت خاموشی بود. دمای سالن در آغاز ۳۲°C بود و در طول دوره آزمایش به تدریج کاهش داده شد به گونه‌ای که در پایان دوره به ۲۳°C رسانده شد. جیره‌های آزمایشی عبارت بودند از: تیمار اول، جیره پایه ذرت-سویا بدون افزودن مکمل بتائین؛ تیمار دوم، جیره شاهد که به آن ۰/۰۵٪ مکمل بتائین هیدروکلراید ۹۸٪ (Weifang Sunwin Chemicals Co., Ltd) افزوده شد؛ تیمار سوم، جیره شاهد که به آن ۰/۰۸٪ مکمل بتائین هیدروکلراید ۹۸٪ افزوده شد؛ و تیمار چهارم، جیره شاهد که به آن ۰/۱۱٪ مکمل بتائین هیدروکلراید ۹۸٪ افزوده شد. جیره‌های آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار WUFFDA بر اساس کاتالوگ نیازهای غذایی جوجه‌های گوشتی (۲۰۰۹) سویه راس ۳۰۸ و با توجه به یکسانی انرژی متابولیسمی و پروتئین خام برای تمام سطوح در هر دوره، تهیه و تنظیم گردیدند (جدول ۱).

مواد شیمیایی: همه مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت Sigma-

۲۲۵°C، نگهداری این دما به مدت ۵ دقیقه، و سپس افزایش دما با نرخ ۱۰°C در دقیقه تا رسیدن به دمای ۲۳۵°C تا پایان کار بود. دمای آشکارساز نیز ۲۷۵°C بود. برای کالیبراسیون کروماتوگراف نیز از استاندارد ۰۰۷۷۵۶-AMP (Supelco، USA) به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد (۳۱).

#### هوموژنیزه کردن نمونه‌های کبدی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های

کبدی: در آغاز ۵ g از بافت کبد به قطعات کوچک تقسیم و سپس در لوله‌های حاوی ۱۵ ml محلول بافر ۰/۱M EDTA-۲Na، سوکروز در ۱۰ mM ریخته و هوموژنیزه شد. نمونه هوموژنیزه سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد (۱۰۰۰۰ ×g). مایع رویی دوباره به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد (۱۰۵۰۰ ×g). مایع رویی حاصل برای سنجش فعالیت آنزیم‌های کبدی مورد استفاده قرار گرفت (۳۷، ۳).

#### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کبدی (اندازه‌گیری فعالیت آنزیم

استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز (ACC): فعالیت آنزیم ACC بر اساس سنجش میزان ورود کربن نشان‌دار (۱۴C) موجود در  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  به درون ساختار مولکولی مالونیل کوآنزیم A استوار شده است. این سنجش در واقع بر پایه میزان تثبیت بی‌کربنات رادیواکتیو ( $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ ) در حضور سیترات، تریس، و کاتیون منیزیم انجام می‌شود (۳۷). در پژوهش حاضر نیز برای سنجش فعالیت آنزیم ACC از این روش به صورت زیر استفاده شد. ۷ μl مایع رویی حاصل از هوموژنیزه بافت کبدی (توضیحات بالا)، همراه با ۱۷۵ μl محلول واکنشگر، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شد. محلول واکنشگر (pH=۷) دارای این مواد بود: Tris-HCl (۱۵ μmol)، گلوکاتایون (۰/۷۵ μmol)، کلرید منیزیم (۲ μmol)، EDTA (۲۵ nmol)، BSA (۱۵ mg/ml پروتئین)، سیترات پتاسیم (۵ μmol). برای آغاز واکنش کربوکسیلاسیون، به این مخلوط انکوبه شده در دمای ۳۷°C، ۵۰ μl محلول حاوی ATP (۵ M/۰/۵)، استیل کوآنزیم A (۵۰ nM)، و نیز ۲۵ μl محلول حاوی  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  رادیواکتیو (۲/۵ μM) و ۱۰۶ dpm) افزوده شد. این محلول به مدت ۱۰ دقیقه دیگر در دمای ۳۷°C انکوبه شد. پس از سپری شدن زمان ۱۰ دقیقه، و برای توقف واکنش آنزیمی، ۵۰ کلریدریک‌اسید  $\text{N}_6$  به محلول افزوده شد. محلول به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (۱۰۰۰۰ ×g). ۲۰۰ μl از محلول رویی در ویال شمارشگر سنتیلاسیون ریخته شد و با قرار دادن ویال در بن‌ماری ۸۰°C، عمل تبخیر و خشک کردن مایع رویی انجام شد. ۲۰۰ μl آب مقطر به ویال سنتیلاسیون افزوده شد تا رسوب حل شود. برای بهبود راندمان شمارش رادیواکتیویته، ۲ ml Aquasol به ویال افزوده شد. سپس شدت رادیواکتیویته ویال به وسیله دستگاه شمارشگر سنتیلاسیون مایع (PerkinElmer، مدل ACC برحسب nmol مالونیل کوآنزیم A تولید شده در دقیقه به ازای هر mg بافت کبد (برابر با nmol بی‌کربنات تثبیت شده در دقیقه به ازای هر mg بافت کبدی) محاسبه شد (۳۷، ۴۹، ۸).

نمونه هوموژنیزه به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره یک فیلتر شد. به فیلتره حاصل، محلول آبی ۰/۲۵٪ KCl (به حجم یک چهارم حجم فیلتره) افزوده و پس از مخلوط کردن، در بن‌ماری ۵۰°C به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد تا محلول دوفاز شود. فاز بالایی که شامل آب، متانول و مواد محلول غیر لیپیدی است، دور ریخته شد. سپس مقداری متانول (به حجم یک سوم حجم فاز پایینی) و آب مقطر (یک چهارم حجم متانول + فاز پایینی) به آن افزوده و پس از مخلوط کردن، مانند حالت پیش در بن‌ماری ۵۰°C قرار داده شد (تا هنگامی که محلول دو فاز شود). فاز رویی محلول حاصل جمع‌آوری و دور ریخته شد. فاز پایینی با استفاده از تبخیر کننده (Stuart RE ۳۰۰، rotary evaporator، USA) در دمای ۶۰°C تبخیر شد. به ماده حاصل از تبخیر، ۱۰ ml اتانول ۹۹٪ افزوده و بار دیگر به وسیله دستگاه تبخیر کننده، عمل تبخیر و خشک کردن انجام شد (در دمای ۴۰°C). لیپیدهای خشک شده با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ ±g، وزن کشتی، و در ۵ ml محلول بنزن-متانول (به نسبت ۲ به ۱ vol/vol) حل شد. این محلول برای اندازه‌گیری TAG، کلسترول و فسفولیپیدها در دمای ۳۰°C نگهداری شد (۳۱).

#### جداسازی TAG، کلسترول و فسفولیپیدهای کل به روش کروماتوگرافی

روی لایه نازک (TLC): ۱ تا ۲ mg از محلول بنزن-متانول حاوی لیپیدهای کبدی، با استفاده از حلال ایزوپروپیل اتر (به عنوان فاز متحرک) و پلیت شیشه‌ای TLC (سیلیکاژل F۲۵۴-G۶۰، شماره کاتالوگ ۱۰۰۳۹۰، Merck-Millipore، آلمان) مورد کروماتوگرافی روی لایه نازک قرار گرفت (۳۱، ۳۸). لکه‌های حاصل از حضور تری‌آسیل گلیسرول‌ها، کلسترول و فسفولیپیدها روی پلیت TLC مورد شناسایی قرار گرفته و به طور جداگانه از سطح پلیت تراشیده و در لوله‌های با دریچ تفلونی ریخته شدند. به هر یک از لوله‌ها ۲۰۰ μl هگزان افزوده شد تا لیپیدهای موجود در سیلیکاژل تراشیده شده را در خود حل کند (به مدت یک ساعت در دمای ۸۰°C). سپس محلول‌های هگزان حاوی لیپید از رسوب سیلیکاژل جدا و در لوله‌های دیگری ریخته و با استفاده از گاز  $\text{N}_2$  (در دمای اتاق) خشک شدند. با استفاده از محلول HClM۱-متانول (۵۰۰ μl)، لیپیدهای مربوطه مورد متیلاسیون مستقیم قرار گرفته و متیل استرها حاصل برای انجام کروماتوگرافی گازی در لوله‌های شیشه‌ای با درب تفلونی نگهداری شدند (۳۱، ۴۸).

#### کروماتوگرافی گازی متیل استرها: با استفاده از دستگاه کروماتوگراف

گازی Shimadzu (مدل ۸A-GC، ژاپن)، مجهز به آشکارساز FID، متیل استرها تری‌آسیل گلیسرول‌ها، کلسترول و فسفولیپیدها مورد سنجش کیفی و کمی قرار گرفتند. آنالیز آنالیت‌ها به وسیله یک ستون مویین ۸۰ m (Agilent، USA، ۸۸ CP-Sil) با فاز ساکن Cyanopropylpolysiloxane و گاز  $\text{N}_2$  به عنوان فاز متحرک انجام گرفت. برنامه دمایی کروماتوگراف به صورت ۱۹۰°C (۵ دقیقه نخست)، افزایش دما با نرخ ۲°C در دقیقه به مدت ۱۷/۵ دقیقه تا رسیدن به دمای



حل شود. غلظت و خلوص RNA با استفاده از نانودراپ - اسپکتروفوتومتر (UV-Vis Spectrophotometer, Thermo ۲۰۰۰ NanoDrop Scientific, USA) مورد سنجش قرار گرفت. برای این کار یک میکرولیتر محلول RNA با  $39 \mu\text{l}$  DEPC-treated water رقیق و  $10 \mu\text{l}$  OD از آن به وسیله نانودراپ اسپکتروفوتومتر در طول موج  $260 \text{ nm}$  و  $280 \text{ nm}$  سنجیده شد (۴).

**سنتز cDNA و انجام Real-Time PCR:** برای سنتز cDNA، از کیت سنتز cDNA (Vivantis technologies, Malaysia) با شماره کاتالوگ RTPL۲۲ و طبق راهنمای پروتکل شرکت تولیدکننده، استفاده شد. در آغاز مخلوط RNA-Primer در یک تیوب میکروسانتریفیوز  $1.5 \text{ ml}$  تهیه شد. برای این کار،  $10 \mu\text{l}$  محلول RNA مستخرج از بافت چربی شکمی،  $1 \mu\text{l}$  پرایمر  $(T_{m})$  Oligo d ( $40 \mu\text{M}$ )،  $1 \mu\text{l}$  مخلوط dNTPs  $(10 \text{ mM})$ ،  $10 \mu\text{l}$  آب Nuclease-free به میکروتیوب افزوده و سپس میکروتیوب به مدت  $5$  دقیقه در دمای  $65^{\circ}\text{C}$  انکوبه شد. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، میکروتیوب به مدت  $2$  دقیقه در یخ سرد شد. برای تهیه مخلوط سنتز cDNA، در یک میکروتیوب دیگر،  $2 \mu\text{l}$  بافر M-MuLV،  $100$  واحد آنزیم Reverse transcriptase، و  $10 \mu\text{l}$  آب Nuclease-free ریخته شد.  $10 \mu\text{l}$  از این مخلوط سنتز cDNA به میکروتیوب محتوی مخلوط RNA-Primer افزوده و به آرامی اینورسیون، و در دمای  $42^{\circ}\text{C}$  به مدت  $60$  دقیقه انکوبه شد. میکروتیوب به مدت  $5$  دقیقه در  $85^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت تا واکنش متوقف شود و پس از سرد کردن، به مدت  $5$  دقیقه سانتریفیوز شد ( $300 \times g$ ). مایع رویی حاوی cDNA در یک میکروتیوب دیگر تا انجام RT-PCR در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد. از cDNA سنتز شده برای Real-time PCR استفاده شد. واکنش‌های Real-time PCR با استفاده از دستگاه Applied Step-One Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA) انجام شد. شرایط برای RT-PCR در گام اول شامل  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت  $5$  دقیقه و به دنبال آن  $40$  چرخه  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت  $23$  ثانیه،  $52^{\circ}\text{C}$  به مدت  $30$  ثانیه و  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت  $30$  ثانیه بود. برای واکنش Real-Time PCR، مخلوط شامل  $2 \mu\text{l}$  cDNA،  $10 \mu\text{l}$  Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)،  $0.4$  از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت و  $7.2 \mu\text{l}$  آب مقطر بود. توالی آغازگرها در جدول ۲ ارائه شده است. توالی برای آغازگرهای رفت و برگشت با نرم افزار Oligo ۷/۰ بر اساس توالی‌های مرغ موجود در GenBank طراحی شد. بیان ژن لیپوپروتئین لیپاز (LPL)، با استفاده از ژن GAPDH (به عنوان نرمال کننده) و مطابق با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  - محاسبه شد (۲۹).

**طرح آزمایشی و مدل ریاضی طرح:** این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار (جیره)، چهار تکرار و  $20$  جوجه در هر تکرار انجام گرفت. مدل ریاضی طرح به صورت زیر می‌باشد:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_j$$

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فتی‌اسیدسینتاز (FAS):**  $10 \mu\text{l}$  مایع رویی حاصل از هوموژن‌سازی بافت کبدی، همراه با  $200 \mu\text{l}$  محلول واکنشگر (بر پایه بافر فسفات)، به مدت  $15$  دقیقه در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه شد. محلول واکنشگر ( $\text{pH} = 7$ ) دارای این مواد بود: بافر فسفات پتاسیم ( $1 \text{ mM}$ )، EDTA ( $2 \text{ mM}$ )، Dithiothreitol ( $1 \text{ mM}$ )، سپس NADPH ( $100 \mu\text{mol}$ )، استیل کوآنزیم A ( $35 \mu\text{mol}$ )، و مالونیل کوآنزیم A ( $100 \mu\text{mol}$ ) به این محلول افزوده شد. این محلول به مدت  $10$  دقیقه دیگر در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه شد. پس از سپری شدن زمان  $10$  دقیقه، و برای توقف واکنش آنزیمی،  $50 \mu\text{l}$  کلریدریک‌اسید  $6 \text{ N}$  به محلول افزوده شد. محلول به مدت  $10$  دقیقه سانتریفیوز شد ( $10000 \times g$ ).  $200 \mu\text{l}$  از محلول رویی برای سنجش رنگ‌سنجی با اسپکتروفوتومتر مورد استفاده قرار گرفت. در این سنجش، تغییر جذب این محلول نسبت به محلول بلنک (که شامل محلول واکنشگر و آنزیم مهار شده توسط HCl بود) در طول موج  $340 \text{ nm}$  و دمای  $30^{\circ}\text{C}$  خوانده شد. هر واحد فعالیت FAS برابر  $1 \text{ nmol NADPH}$  اکسید شده در دقیقه به ازای هر  $\text{mg}$  بافت کبدی است (۳۴، ۴۵).

**استخراج RNA از بافت چربی شکمی:** با استفاده از پروتوکل TRIZOL (و استفاده از واکنشگر TRIzol<sup>®</sup>)، کل RNA از بافت چربی شکمی استخراج گردید. در آغاز  $100 \text{ mg}$  بافت چربی شکمی و یک میلی‌لیتر واکنشگر TRIzol<sup>®</sup> در لوله شیشه‌ای هوموژن‌ساز ریخته و مورد هوموژن‌سازی قرار گرفت. تک لایه سلولی (Cell monolayer) حاصل با محلول PBS سرد شستشو داده شد و پس از ورتکس، به مدت  $5$  دقیقه در  $300 \times g$  سانتریفیوز شد. مایع رویی دور ریخته شد و دوباره PBS سرد به لوله افزوده شد. بار دیگر عمل سانتریفیوز ( $5$  دقیقه در  $300 \times g$ ) انجام و مایع رویی دور ریخته شد. به پلت حاصل،  $1 \text{ ml}$  واکنشگر TRIzol<sup>®</sup> افزوده و لوله به مدت  $5$  دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بار دیگر عمل سانتریفیوز ( $5$  دقیقه در  $300 \times g$ ) انجام و مایع رویی به یک میکروتیوب  $2 \text{ ml}$  منتقل شد. به این میکروتیوب،  $200 \mu\text{l}$  کلروفرم افزوده و پس از ورتکس ( $15$  ثانیه) به مدت  $2$  تا  $3$  دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. میکروتیوب به مدت  $15$  دقیقه در دمای  $2^{\circ}\text{C}$  تا  $8$  سانتریفیوز شد ( $12000 \times g$ ). مایع رویی شفاف به یک میکروتیوب جدید انتقال یافت (این مایع رویی حاوی RNA است). به این مایع، ایزوپروپیل الکل افزوده (به ازای هر  $1 \text{ ml}$  مایع رویی،  $0.5 \text{ ml}$  ایزوپروپیل الکل) و سپس میکروتیوب به مدت  $10$  دقیقه در دمای  $15^{\circ}\text{C}$  تا  $30$  انکوبه شد. میکروتیوب به مدت  $10$  دقیقه در دمای  $2^{\circ}\text{C}$  تا  $4$  سانتریفیوز شد ( $12000 \times g$ ) تا RNA رسوب کند. مایع رویی دور ریخته و پلت حاصل با  $1 \text{ ml}$  میلی‌لیتر اتانل  $75\%$  شستشو داده شد (ورتکس شد). میکروتیوب به مدت  $5$  دقیقه در دمای  $2^{\circ}\text{C}$  تا  $8$  سانتریفیوز شد ( $7500 \times g$ ). عمل شستشو با اتانل  $75\%$  و سانتریفیوز کردن یک بار دیگر تکرار شد. پلت RNA به مدت  $5$  تا  $10$  دقیقه هوا خشک شد و پیش از آن که به‌طور کامل خشک شود، به آن به مقدار کافی DEPC-treated water افزوده شد تا RNA در آن

جدول ۱. ترکیب جیره‌های آزمایشی و آنالیز آن‌ها. ۱- هر کیلوگرم مخلوط مواد معدنی و ویتامینی حاوی: ۹۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۲۰۰۰ واحد بین المللی D<sub>3</sub>، ۱۸ واحد بین المللی ویتامین E، ۱/۸ mg، ۶/۶ mg، ۳۰ mg نیاسین، ۲۵ mg اسید پانتوتنیک، ۲/۹ mg پیریدوکسین، ۰/۰۱۵ mg، ۱/۱۵ mg، ۱ mg بیوتین، ۱ mg اسید فولیک، ۸۴ mg روی، ۵۰ mg آهن، ۱۰ mg مس، ۹۹ mg منگنز، ۰/۲ mg سلنیوم، ۰/۹۹ mg ید. ۲- فیلر در تیمار شاهد حاوی ۰/۱٪ شن؛ در تیمار دوم حاوی ۰/۰۵٪ بتائین هیدروکلراید + ۰/۰۶٪ شن؛ در تیمار سوم حاوی ۰/۰۸٪ بتائین هیدروکلراید + ۰/۰۳٪ شن، و در تیمار چهارم حاوی ۰/۱۱٪ بتائین هیدروکلراید است.

ترکیب جیره (%)	آغازین (۱۰ تا ۱۰ روزگی)	رشد (۱۱ تا ۲۴ روزگی)	پایانی (۲۵ تا ۴۲ روزگی)
ذرت	۵۴/۲۲	۶۰/۰۶	۶۵/۸۴
روغن گیاهی	۲	۲/۳	۲
کنجاله سویا	۳۹	۳۳/۲	۲۸
دی ال-متیونین	۰/۳۲	۰/۲۸	۰/۲۳
ال-لایزین هیدروکلراید	۰/۱۷	۰/۱۵	۰/۱۲
ال-ترئونین	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۵
دی کلسیم فسفات	۲/۲	۲	۱/۸
کربنات کلسیم	۱/۱	۱	۱
سدیم بی کربنات	۰/۰۵	۰/۰۲	۰/۱
نمک طعام	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
پرمیکس معدنی-ویتامینی <sup>۱</sup>	۰/۵	۰/۵	۰/۵
فیلر (Filler) <sup>۲</sup>	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۱
آنالیز جیره (محاسباتی)			
انرژی متابولیسمی (kcal/kg)	۲۹۰۰	۳۰۰۰	۳۰۴۸
پروتئین خام %	۲۲	۲۰	۱۸
لیزین (SID) %	۱/۲۱۳	۱/۰۶۶	۰/۹۲۶
متیونین (SID) %	۰/۶۱۱	۰/۵۴۹	۰/۴۷۹
متیونین + سیستئین (SID) %	۰/۹۰۲	۰/۸۱۷	۰/۷۲۸
ترئونین (SID) %	۰/۷۸۹	۰/۷۱۷	۰/۶۲۳
تریپتوفان (SID) %	۰/۲۳۸	۰/۲۰۹	۰/۱۸۴
آرجینین (SID) %	۱/۳۷۶	۱/۲۲۰	۱/۰۸۱
کلسیم %	۰/۹۷۷	۰/۸۸۵	۰/۸۳۱
فسفر قابل دسترس %	۰/۴۷۹	۰/۴۴۰	۰/۴۰۳
سدیم %	۰/۱۳۷	۰/۱۴۲	۰/۱۴۹
کلر %	۰/۲۱۲	۰/۲۱۰	۰/۲۰۵

جدول ۲. آغازگرهای مورد استفاده در واکنش Real Time PCR.

نام ژن	شماره‌ی بانک ژن	توالی آغازگر	طول محصول (bp)	(Tm °C)
LPL	X1۴۶۷۰	F:GGATTGCTGGAAGTTTAACCAAG R:AGAGATGGATGGATCGTTCATGA	۳۲۷	۵۹
GAPDH	K۰۱۴۵۸	F:CTACACACGGACACTTCAAG R:ACAAACATGGGGGCATCAG	۲۴۴	۵۲

### نتایج

لیپیدهای سرم: نتایج تجزیه و تحلیل آماری اثرات بتائین جیره‌ای بر لیپیدهای سرم خون در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهند که استفاده از سطوح مختلف مکمل بتائین هیدروکلراید در جیره، اثر معنی‌داری بر سطوح سرمی کلسترول، تری‌آسیل‌گلیسرول (TAG)، لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL)، لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL)، و لیپوپروتئین با چگالی بسیار کم (VLDL) نداشت ( $p > ۰/۰۵$ ).

$\mu$  = میانگین

$\delta$  = اثر سطح بتائین هیدروکلراید

$\epsilon$  = اثر خطا

داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت (۱۰).





جدول ۳. نتایج حاصل از افزودن مکمل بتائین بر لیپیدهای سرم (mg در dl سرم خون) و لیپیدهای کبد (mg در هر g بافت) (میانگین±SE). a, b و c: میانگین‌های با حروف مشابه در هر سطر اختلاف معنی‌دار ندارند.

P	تیمار اول (%)	تیمار دوم (۰/۰۵٪)	تیمار سوم (۰/۰۸٪)	تیمار چهارم (۰/۱۱٪)	لیپیدهای سرم و کبد
۰/۸۳۵	۱۳۷±۵/۱۱	۱۳۹±۴/۴۳	۱۴۷±۵/۳۰۹	۱۳۴±۵/۸۷۶	کلسترول سرم
۰/۹۸۸	۱۲۶±۵/۱۷۴۷	۱۲۹±۵/۱۲۰۳	۱۲۵±۵/۴۰۹۶	۱۲۵±۱۲/۱۲	تری‌آسیل‌گلیسرول سرم
۰/۵۱۷	۴۵±۷/۹۳	۴۷±۵/۳۰۹	۴۶±۷/۵۳۶۸	۴۷±۵/۲۷۸	HDL سرم
۰/۸۷۹	۶۶±۴/۶۴	۶۵±۵/۲۳	۷۰±۲/۵۲	۶۷±۵/۴۸۶	LDL سرم
۰/۹۸۹	۲۵±۲/۳۶	۲۶±۲/۴۸	۲۵±۰/۹۱	۲۵±۲/۵۰	VLDL سرم
۰/۰۴۸	۹/۴۶±۱/۴۴ <sup>a</sup>	۸/۸۵±۱/۴۹ <sup>ab</sup>	۷/۷۸±۱/۵۳ <sup>ab</sup>	۶/۴۷±۱/۸۰ <sup>b</sup>	تری‌آسیل‌گلیسرول کبد
۰/۰۳۶	۵/۱۸±۰/۷۱ <sup>a</sup>	۵/۲۳±۰/۵۰ <sup>a</sup>	۴/۳۴±۰/۶۰ <sup>ab</sup>	۴/۱۴±۰/۴۱ <sup>b</sup>	کلسترول کبد
۰/۵۹۳	۳۴/۵۵±۵/۳۴	۳۳/۸۷±۵/۶۷	۳۴/۱۷±۶/۰۵	۲۹/۹۵±۳/۷۴	فسفولیپید کبد

جدول ۴. نتایج حاصل از افزودن مکمل بتائین بر فعالیت آنزیم‌های کبدی (ACC و SE) FAS± میانگین).

P	تیمار اول (%)	تیمار دوم (۰/۰۵٪)	تیمار سوم (۰/۰۸٪)	تیمار چهارم (۰/۱۱٪)	فعالیت آنزیمی (nmol/min/mg بافت کبد)
۰/۱۱۳	۲/۱۸±۰/۱۶	۲/۰۸±۰/۱۵	۱/۹±۰/۱۳	۱/۶۵±۰/۱۵	ACC
۰/۴۲۱	۲/۷۲±۰/۲۵	۲/۵۹±۰/۲۳	۲/۴±۰/۲۶	۲/۱۶±۰/۲۳	FAS

معنی‌داری بر لیپیدهای خون ندارد (۱،۲۵،۳۰). با این وجود، Jahanian و Rahmani در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که افزودن بتائین به جیره سبب کاهش معنی‌دار TAG و VLDL در سرم می‌گردد. Zou و همکاران در سال ۱۹۹۸ افزایشی را در فعالیت آنزیم لیپاز کبدی مرغان تخم‌گذار مشاهده نمودند که ممکن است دلیلی بر کاهش سطح TAG سرمی باشد. افزون بر این، کاهش VLDL احتمالاً به دلیل ارتباط مستقیم سطح آن با TAG خون است (۱۴).

**لیپیدهای کبدی:** در سازگاری با پژوهش حاضر، Jahanian و Rahmani در سال ۲۰۰۸ بیان کردند که افزودن بتائین به جیره جوجه‌های گوشتی به‌طور معنی‌داری سبب کاهش درصد چربی کبدی می‌گردد (p<۰/۰۵). به نظر می‌رسد که بتائین با دخالت در سنتز کاربنتین، می‌تواند در متابولیسم لیپیدها نقش داشته باشد (۲۳). برخی گزارش‌های سازگار با پژوهش حاضر نشان می‌دهند که بتائین دارای نقشی مثبت در سنتز فسفاتیدیل‌کولین که یک ماده‌ی ضروری در ساخت VLDL است، می‌باشد. VLDL از ذخیره چربی در کبد جلوگیری کرده و برداشت چربی از آن را افزایش می‌دهد؛ بنابراین، ممکن است افزایش سنتز VLDL دلیلی بر کاهش درصد چربی کبد باشد (۴۷،۵۴،۵۵).

**فعالیت آنزیم‌های ACC و FAS:** شواهد قابل توجهی موجود است که نشان می‌دهند ACC و FAS آنزیم‌های کلیدی در تنظیم بیوسنتز اسیدهای چرب در بافت‌های جانوری هستند. ACC به عنوان یک آنزیم محدود کننده سرعت لیپوژنز عمل می‌کند و FAS آخرین مرحله در مسیر لیپوژنیک را کاتالیز می‌نماید (۲۴،۳۵). در مرغ، کبد محل اصلی سنتز de novo اسیدهای چرب است (۳۹،۴۰). بررسی‌های ما نشان داده‌اند که تاکنون هیچ گزارشی در زمینه‌ی اثرات بتائین بر فعالیت آنزیم‌های لیپوژنیک در

**لیپیدهای کبدی:** نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری افزودن مکمل بتائین بر لیپیدهای کبد در جدول ۳ ارایه شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌گردد، افزودن بتائین به جیره سبب کاهش معنی‌دار TAG و کلسترول در کبد جوجه‌های تیمارهای سوم (حاوی ۰/۰۸٪ بتائین هیدروکلراید ۹۸٪) و چهارم (حاوی ۰/۱۱٪ بتائین هیدروکلراید ۹۸٪) گردید (p<۰/۰۵). از نظر میزان کل فسفولیپیدهای کبدی، در میان تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (p>۰/۰۵). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که درصد TAG و کلسترول کبدی در تیمارهای سوم و چهارم به‌طور معنی‌داری کاهش داشت (p<۰/۰۵).

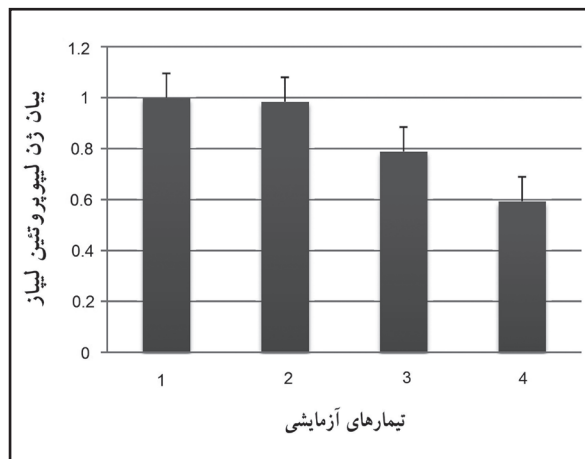
**فعالیت آنزیم‌های ACC و FAS:** اثرات مکمل غذایی بتائین بر فعالیت آنزیم‌های استیل‌کوآنزیم A کربوکسیلاز و فتی‌اسیدسینتاز در جدول ۴ ارایه شده است. افزودن بتائین به جیره و افزایش مقدار آن باعث بروز یک روند کاهشی در فعالیت هر دو آنزیم در تیمارهای دوم تا چهارم نسبت به گروه شاهد گردید؛ ولی این روند کاهشی دارای تفاوت معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵). **بیان ژن لیپوپروتئین‌لیپاز:** در نمودار ۱، اثرات مکمل بتائین بر بیان ژن لیپوپروتئین‌لیپاز ارایه شده است. افزودن بتائین هیدروکلراید به جیره‌های تیمارهای دوم (۰/۰۵٪)، سوم (۰/۰۸٪) و چهارم (۰/۱۱٪)، به ترتیب باعث یک روند کاهشی ۲، ۲۱ و ۴۱ درصدی برای بیان ژن لیپوپروتئین‌لیپاز در مقایسه با تیمار شاهد گردید؛ با این حال، اختلاف معنی‌داری میان تیمارها مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

## بحث

**لیپیدهای سرم:** برخی از پژوهش‌ها که در سازگاری با نتایج ما هستند، نشان می‌دهند که افزودن مکمل بتائین در جیره جوجه‌های گوشتی، اثر

و پیامدهای متابولیکی ناشی از آن (انسولین و گلوکاگون)، عوامل مهم و تعیین کننده‌ای برای لیپوژن در کبد پرندگان هستند (۲۶، ۲۱، ۲۰، ۱۹). به نظر می‌رسد در پژوهش حاضر، مقادیر بتائین افزوده شده به جیره، به اندازه‌ای نبوده که توانایی کاهش فعالیت این دو آنزیم لیپوژنیک (ACC و FAS) در کبد را داشته باشد و احتمالاً فعالیت این آنزیم‌ها بیش‌تر زیر اثر مقدار انرژی و کربوهیدرات جیره قرار گرفته است.

**بیان ژن لیپوپروتئین لیپاز: لیپوپروتئین لیپاز آنزیمی است که محل اصلی فعالیت کاتالیتیکی آن در سطح لومینال سلول‌های اندوتلیال مویرگی است؛ جایی که این آنزیم، بخش تری‌آسیل‌گلیسرولی کمپلکس‌های لیپوپروتئینی خون (کیلومیکرون‌ها و VLDL) را هیدرولیز می‌کند. در طی این عمل، اسیدهای چرب آزاد و مونوآسیل‌گلیسرول‌های لازم برای تأمین انرژی برخی بافت‌ها (به‌ویژه قلب)، و نیز تولید تری‌آسیل‌گلیسرول برای ذخیره‌سازی در بافت چربی، ایجاد می‌شوند (۴۳، ۴۲، ۲). نتایج پژوهش حاضر، همانند گزارش Sato و Akiba در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که بیان ژن لیپوپروتئین لیپاز در چربی شکمی جوجه‌های در حال رشد، کم‌تر زیر تأثیر دستکاری‌های تغذیه‌ای است. در سازگاری با نتایج پژوهش حاضر، Xing و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که افزودن بتائین به میزان ۰/۰۴، ۰/۰۶ و ۰/۰۸٪ به جیره غذایی مرغ‌ان تخم‌گذار، بیان ژن لیپوپروتئین لیپاز را در سن ۱۶۵ و ۱۸۵ روزگی (در مقایسه با گروه شاهد) به طور غیرمعنی‌داری کاهش می‌دهد. Xing و همکاران در سال ۲۰۱۱ بیان کردند که افزودن بتائین به جیره جوجه‌های گوشتی، سبب کاهش بیان ژن LPL در بافت چربی شکمی در ۵۶ روزگی می‌گردد؛ هر چند این کاهش، معنی‌دار نیست. با این حال، آن‌ها گزارش کردند که افزودن بتائین به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی در سن ۶۶ روزگی، سبب کاهش معنی‌داری در بیان ژن LPL در چربی شکمی می‌شود ( $p < 0/05$ ). یافته‌های پژوهش حاضر مطابق با گزارش‌های Xing و همکاران در سال ۲۰۱۱ در سن ۵۶ روزگی است، اما با نتایج این تحقیق در سن ۶۶ روزگی تفاوت دارد. در پژوهشی Claire D'Andre و همکاران در سال ۲۰۱۳ مشخص کردند که بیان ژن LPL، در زمانی که جوجه‌های گوشتی در مرحله رشد سریع می‌باشند، ۲/۵ برابر زمانی است که رشد آن‌ها آهسته‌تر است. به نظر می‌رسد که تفاوت میان یافته‌های پژوهش حاضر، و نتایج بررسی‌های Xing و همکاران در سال ۲۰۱۱ که بیان کننده کاهش معنی‌دار بیان ژن LPL در جوجه‌های گوشتی در سن ۶۶ روزگی بود احتمالاً به رشد سریع‌تر جوجه‌های گوشتی در پژوهش حاضر مربوط می‌شود؛ زیرا جوجه‌های گوشتی در سن ۴۲ روزگی نسبت به ۶۶ روزگی از رشد سریع‌تری برخوردار هستند. بنابراین، می‌توان چنین فرض کرد که در جوجه‌های گوشتی، در مرحله‌ای که رشد سریع‌تر است، بیان ژن لیپوپروتئین لیپاز نیز بیش‌تر است و احتمالاً اثر افزودن بتائین به جیره، بر کاهش بیان ژن LPL کم‌تر می‌باشد. در تأیید این فرضیه، می‌توان به گزارش Griffin و همکاران در سال ۱۹۸۷**



نمودار ۱. اثر مکمل بتائین بر بیان ژن LPL در بافت چربی شکمی. (S.E.M. میانگین.  $p > 0/05$ ).

پرندگان ارایه نشده است. پژوهش حاضر برای نخستین بار به بررسی تأثیر بتائین بر فعالیت ACC و FAS در کبد جوجه‌های گوشتی پرداخته است. در این پژوهش، هرچند افزودن بتائین به جیره جوجه‌های گوشتی سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های ACC و FAS در کبد گردید (در مقایسه با گروه شاهد)، ولی اختلاف میان تیمارها معنی‌دار نبود ( $p > 0/05$ ). نتایج پژوهش حاضر، با نتایج گزارش شده توسط برخی پژوهشگران که نشان داده‌اند افزودن بتائین به جیره مرغ‌های تخم‌گذار در سن ۱۶۵ و ۱۸۵ روزگی، بیان ژن FAS و ACC در بافت چربی شکمی را به‌طور غیرمعنی‌داری کاهش می‌دهد، سازگاری دارد (۵۱).

Lien و Jan در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که افزودن کولین به جیره غذایی اردک، سبب کاهش غیرمعنی‌داری در فعالیت ACC و FAS در کبد می‌شود که با نتایج پژوهش حاضر سازگاری دارد. از سوی دیگر، Huang و همکاران در سال ۲۰۰۸ که اثر افزودن مکمل بتائین به جیره غذایی خوک‌ها را مورد بررسی قرار دادند، مشاهده کردند که فعالیت ACC و FAS در بافت چربی زیر جلدی به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. همچنین، Xing و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که افزودن مکمل بتائین به جیره جوجه‌های گوشتی، بیان ژن FAS در بافت چربی شکمی جوجه‌های گوشتی در سن ۵۶ و ۶۶ روزگی را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. با توجه به تحقیقات انجام شده، مشخص شده که لیپوژن (چربی‌سازی) به‌وسیله طیف گسترده‌ای از عوامل گوناگون و مرتبط به هم مانند تغذیه، هورمون‌ها، فاکتورهای رونویسی هسته‌ای، آنزیم‌های لیپوژنیک، گزینش ژنتیکی و شرایط زیست‌محیطی، تنظیم می‌گردد (۵۰، ۲۲، ۱۵، ۵). در میان عوامل ذکر شده در بالا، به نظر می‌رسد که شرایط تغذیه‌ای به‌ویژه کربوهیدرات‌های جیره، دارای نقش موثری در تنظیم لیپوژن در کبد مرغ هستند. در همین رابطه مشخص گردید که مقدار و فعالیت آنزیم‌های ACC و FAS در کبد جوجه‌های گوشتی، با تغذیه یک جیره غذایی با کربوهیدرات بالا افزایش‌شان می‌دهد؛ بدین ترتیب وضعیت تغذیه‌ای و انرژی جیره غذایی



## References

1. Baghaei, M., Eslami, M., Chaji, M., Mamoue, M., Bojarpour, M. (2011) Effect of different levels of DL-methionine replaced with betafin on some of blood parameters on broiler chickens. *J Anim Vet Adv.* 10: 777-779.
2. Braun, J. E. A., Severson, D. L. (1992) Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J.* 15; 287 (Pt2): 337-347.
3. Chen, K. L., Hsieh, T. Y., Chiou, P. W. S. (2006) Caponization effects on growth performance and lipid metabolism in Taiwan country chicken cockerels. *Asian Australas J Anim Sci.* 19(3): 438-443.
4. Chomczynski, P., Mackey, K. (1995) Short technical report. Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from Polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques.* 19(6): 942-5.
5. Claire D' Andre, H., Paul, W., Shen, X., Jia, X., Zhang, R., Sun, L., Zhang, X. (2013) Identification and characterization of genes that control fat deposition in chickens. *J Anim Sci Biotechnol.* 4(1): 43.
6. Cooper, D. A., Stein, J. C., Strieleman, P. J., Ben-sadoun, A. (1989) Avian adipose lipoprotein lipase: cDNA sequence and reciprocal regulation of mRNA levels in adipose and heart. *Biochim Biophys Acta.* 1008:92-101.
7. Craig, S. A. S. (2004) Betaine in human nutrition. *Am J Clin Nutr.* 80(3): 539-549.
8. Dean, D., Daugaard, J. R., Young, M. E., Saha, A., Vavvas, D., Asp, S., Kiens, B., Kim, K. H., Witters, L., Richter, E. A., Ruderman, N. (2000) Exercise diminishes the activity of acetyl-CoA carboxylase in human muscle. *Diabetes.* 49: 1295-1300.
9. Ding, F., Pan, Z., Kou, J., Li, L., Xia, L., Hu, S., Liu, H., Wang, J. (2012) De novo lipogenesis in the liver and adipose tissues of ducks during early growth stages after hatching. *Comp. Biochem. Physiol B. Biochem Mol Biol.* 163(1): 154-160.
10. Duncan, D. B. (1955) Multiple range and multiple F test. *Biometrics.* 11: 1-42.

اشاره کرد که در آن فعالیت LPL در بافت چربی شکمی جوجه‌های گوشتی از سن ۴ تا ۶ هفته‌گی افزایش نشان می‌دهد.  
**نتیجه‌گیری:** نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهند که افزودن بتائین، اثری بر لیپیدهای سرمی نداشت، ولی سبب کاهش معنی‌دار کلسترول و تری-آسیل‌گلیسرول در کبد جوجه‌های تیمار چهارم (حاوی ۰/۱۱٪ بتائین، هیدروکلراید) گردید. همچنین، افزودن بتائین به جیره، اثری بر بیان ژن لیپوپروتئین لیپاز و نیز فعالیت آنزیم‌های استیل‌کوآنزیم A کربوکسیلاز و فتی‌اسیدسینتاز نداشت. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که (احتمالاً) بیان ژن لیپوپروتئین لیپاز بافت چربی شکمی در جوجه‌های گوشتی کم‌تر زیر تأثیر دستکاری‌های تغذیه‌ای باشد. افزون بر این، (احتمالاً) فعالیت آنزیم‌های استیل‌کوآنزیم A کربوکسیلاز و فتی‌اسیدسینتاز در کبد جوجه‌های گوشتی، کم‌تر زیر تأثیر بتائین قرار دارد. شاید اثر عوامل دیگری همچون انرژی جیره و مقدار کربوهیدرات‌های موجود در جیره بر افزایش فعالیت این آنزیم‌ها، بیش‌تر از اثرات بتائین باشد.

## تشکر و قدردانی

از زحمات کلیه پرسنل محترم آزمایشگاه پیشگامان انتقال ژن خصوصاً جناب آقای آقایی پور، همچنین از زحمات دکتر بوجار در آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه خوارزمی، و مساعدت‌های آقایان شهاب و کشتکاران که در پرورش جوجه‌ها در سالن از هیچ کمکی دریغ نورزیده‌اند کمال سپاس را دارم.

11. Eklund, M., Bauer, E., Wamatu, J., Mosenthin, R. (2005) Potential nutritional and physiological functions of betaine in livestock. *Nutr Res Rev.* 18(1): 31-48.
12. Esteve-Garcia, E., Mack, S. (2000) The effect of DL-methionine and betaine on growth performance and carcass characteristics in broilers. *Anim Feed Sci Tech.* 87(1): 85-93.
13. Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 226(1): 497-509.
14. Friedewald, W. T., Levy, R. I., Fredrickson, D. S. (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 18(6): 499-502.
15. Girard, J., Perdereau, D., Foufelle, F., Prip-buus, C., Ferre, P. (1994) Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hor-



- mones. FASEB. J. 8(1): 36-42.
16. Griffin, H. D., Guo, K. D., Windsor, D., Butterwith, S. C. (1992) Adipose-tissue lipogenesis and fat deposition in leaner broiler-chickens. J Nutr. 122(2): 363-368.
  17. Griffin, H. D., Butterwith, S. C., Goddard, C. (1987) Contribution of lipoprotein lipase to differences in fatness between broiler and layer-strain chickens. Br Poult Sci. 28(2): 197-206.
  18. Hazelwood, R. L. (1971) Endocrine control of avian carbohydrate metabolism. Poult Sci. 50(1): 9-18.
  19. Hillgartner, F. B., Charron, T., Chesnut, K. A. (1996) Alterations in nutritional status regulate acetyl-CoA carboxylase expression in avian liver by a transcriptional mechanism. Biochem J. 1; 319(Pt 1): 263-268.
  20. Hillgartner, F. B., Salati, L. M., Goodridge, A. G. (1995) Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. Physiol Rev. 75(1): 47-76.
  21. Hillard, B. L., Lundin, P., Clarke, S. D. (1980) Essentiality of dietary carbohydrate for maintenance of liver lipogenesis in the chick. J Nutr. 110(8): 1533-1542.
  22. Huang, Q. C., Xu, Z. R., Han, X. Y., Li, W. F. (2008) Effect of dietary betaine supplementation on lipogenic enzyme activities and fatty acid synthase mRNA expression in finishing pigs. Anim Feed Sci Tech. 140(3): 365-375.
  23. Jahanian, R., Rahmani, H. R. (2008) The effect of dietary fat level on the response of broiler chicks to betaine and choline supplements. J Biol Sci. 8(2): 362-367.
  24. Kersten, S. (2001) Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. EMBO. Rep. 2(4): 282-286.
  25. Konca, Y., Kinkpinar, F., Mert, S., Yaylak, E. (2008) Effect of betaine on performance carcass, bone and blood characteristics of broilers during natural summer temperature. J Anim Vet Adv. 7(8): 930-937.
  26. Leclercq, B. (1984) Adipose tissue metabolism and its control in birds. Poult Sci. 63(10): 2044-2054.
  27. Leung, T., Bauman, D. (1975) In vivo studies of the site of fatty acid synthesis in the rabbit. Int J Biochem. 6: 801 -805.
  28. Lien, T. F., Jan, D. F. (1999) The effect on the lipid metabolism of Tsaiya ducks when high levels of choline and methionine are added to duck's diet. Asian- Australas J Anim Sci. 12(7): 1090-1095.
  29. Livak, K.J., Schmittengent, T.D. (2001) Methods analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta Ct$ . Methods. 25(4): 402-408.
  30. Maghoul, M. A., NassiriMoghadam, H., Kermanshahi, H., DaneshMesgaran, M. (2009) The effect different levels of choline and betaine on broiler performance carcass characteristics. J Anim Vet Adv. 8(1): 125-128.
  31. McClelland, G., Zwingelstein, G., Weber, J. M., Brichon, G. (1995) Lipid composition of tissue plasma in two mediterranean fishes, the gilt-head sea bream (*Chrysophrys auratus*) and the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Can J Fish Aquat Sci. 52: 161-170.
  32. McDevitt, R. M., Mack, S., Wallis, I. R. (2000) Can betaine partially replace or enhance the effect of methionine by improving broiler growth and carcass characteristics? Br Poult Sci. 41(4): 473-480.
  33. Nepokroef, C. M., Lakshmanan, M. R., Porter, J. W. (1975) Fatty acid synthase from rat liver. Methods Enzymol. 35: 37-44.
  34. Numa, S., Nakanishi, S., Hashimoto, T., Iritani, N., Okozaki, T. (1971) Role of acetyl-CoA carboxylase in the control of fatty acid synthesis. Vitam Horm. 28: 213-243.
  35. Pothoven, M. A., Beitz, D. C. (1975) Changes in fatty acid synthesis and lipogenic enzymes in adipose tissue from fasted and fasted-refed steers. J Nutr. 105(8): 1055-1061.
  36. Qureshi, A. A., Burger, W. C., Prentic, N., Bird, H. R., Sunde, M. L. (1980) Regulation of lipid metabolism in chicken liver by dietary cereals. J Nutr. 110(3): 388-393.
  37. Romanowicz, L., Jaworski, S., Galewska, Z., Gogiel, T. (2008) Separation and determination



- of fatty acids from lipid fractions by high-performance liquid chromatography: cholesterol esters of umbilical cord arteries. *Toxicol Mech Methods*. 18(6):509-513.
38. Saadoun, A., Leclercq, B. (1983) Comparison of in vivo fatty acid synthesis of the genetically lean and fat chickens. *Comp Biochem Physiol B*. 75(4): 641-644.
39. Sanz, M.C., Lopez-Bote, J., Menoyo, D., Bautista, J. M. (2000) Abdominal fat deposition and fatty acid synthesis are lower and  $\beta$ -oxidation is higher in broiler chickens fed diets containing unsaturated rather than saturated fat. *J Nutr*. 130(12): 3034-3037.
40. Sato, K., Akiba, Y. (2002) Lipoprotein lipase mRNA expression in abdominal adipose tissue is little modified by age and nutritional state in broiler chickens. *Poult Sci*. 81(6): 846-852.
41. Sato, K., Sook, S. H., Kamada, T. (2010) Tissue distribution of lipase genes related to triglyceride metabolism in laying hens (*Gallus gallus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 155(1): 62-66.
42. Sato, K., Akiba, Y., Chida, Y., Takahashi, K. (1999) Lipoprotein hydrolysis and fat accumulation in Chicken adipose tissues are reduced by chronic administration of lipoprotein lipase monoclonal antibodies. *Poult Sci*. 78(9): 1286-1291.
43. Saunderson, C. L., Mackinlay, J. (1990) Changes in body-weight, composition and hepatic enzyme activities in response to dietary methionine, betaine and choline levels in growing chicks. *Br J Nutr*. 63(2): 339-349.
44. Shillabeer, G., Hornford, J., Forden, J. M., Wong, N. C. W., Russell, J. C., Lau, D. C. W. (1992) Fatty acid synthase and adipisin mRNA levels in obese and lean JCR:LA-cp rats: effect of diet. *J Lipid Res*. 33(1): 31-39.
45. Simon, J. (1999) Choline, betaine and methionine interactions in chickens, pigs and fish (including crustaceans). *World Poult Sci J*. 55(4): 353-374.
46. Sparks, J. D., Sparks, C. E. (1994) Insulin regulation of triacylglycerol-rich lipoprotein synthesis and secretion. *Biochim Biophys Acta*. 17; 1215(1-2): 9-23.
47. Tanakara, K., Kitahara, K., Shigeno, K. (1979) Effect dietary protein level on lipid metabolism in growing chicks. *Jpn J Zootechn Sci*. 50: 44-54.
48. Thomson, L. W., Zalik, S. (1981) Acetyl coenzyme A carboxylase activity in developing seedlings. *Plant Physiol*. 67(4): 655-661.
49. Wolf, G. (1996) Nutritional and hormonal regulation of fatty acid synthase. *Nutr Rev*. 54(4 Pt 1): 122-123.
50. 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. *Afr J Biotechnol*. 11(24): 6633-6640.
51. Xing, J., Kang, L., Jiang, Y. (2011) Effect of dietary betaine supplementation on lipogenesis gene expression and CpG methylation of lipoprotein lipase gene in broilers. *Mol Biol Rep*. 38(3): 1975-1981.
52. Xing, J., Kang, L., Hu, Y., Xu, Q., Zhang, N., Jiang, Y. (2009) Effect of dietary betaine supplementation on mRNA expression and promoter CpG methylation of lipoprotein lipase gene in laying hens. *Jpn Poult Sci*. 46(3): 224-228.
53. Yao, Z., McLeod, R. S. (1994) Synthesis and secretion of hepatic apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 13; 1212(2): 152-166.
54. Yao, Z., Vance, D.E. (1989) Head group specificity in the requirement of phosphatidylcholine biosynthesis for very low density lipoprotein secretion from cultured hepatocytes. *J Biol Chem*. 5; 264(19): 11373-11380.
55. Zi-Rong, X., Jie, F. G. (2002) Lipotropy effect of betaine in swine. *Acta Zool Sin*. 48(3): 358-362.
56. Zou, X. T., Ma, Y. L., Xu, Z.R. (1998) Effects of betaine and thyroprotein on laying performance and approach to mechanism of the effects in hens. *Acta Agric Zhejiangensis*. 10: 144-149.

# The Effect of Betaine Supplementation on Gene Expression and Activities of Lipogenic Enzymes, and Lipid Levels in Liver and Blood of Broiler Chicks

Mosavat, N.<sup>1\*</sup>, Chamani, M.<sup>2</sup>, Foroudi, F.<sup>3</sup>, Sadeghi, A.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Sciences, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran

<sup>2</sup>Department of Animal Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Department of Animal Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

(Received 26 March 2018, Accepted 7 May 2018)

## Abstract:

**BACKGROUND:** Betaine is a derivative of three methylates of glycine amino acids, found in the body of many animals. **OBJECTIVES:** The study was conducted to investigate the effects of betaine supplementation in the diet on gene expression and activities of lipogenic enzymes, and lipid levels of blood and liver in broilers. **METHODS:** A total of 320 broilers were evaluated (Ross 308) in a completely randomized design with 4 treatments and 4 replicates, with the diets consisted of the control treatment which did not use the betaine supplementation. The second, third and fourth treatments contained 0.05, 0.08 and 0.11% betaine hydrochloride 98%, respectively. **RESULTS:** Betaine supplementation to the diet has no significant effect on lipoprotein lipase gene expression, and the activities of enzyme Acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase ( $p > 0.05$ ). Betaine supplementation caused a significant decrease in liver cholesterol and triglyceride chicks fourth treatment (containing betaine hydrochloride 0.11 percent) compared to the control group ( $p < 0.05$ ). **CONCLUSIONS:** In general, the results show that in broilers lipoprotein lipase gene expression and the activities of enzyme Acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase are less influenced by betaine.

**Keyword:** Betaine, Blood lipids, Lipogenic enzymes, Liver lipids, Gene expression

## Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Ingredients and nutrients analysis of the experimental diets. 1- Vitamin & mineral premix (each kg contained): vitamin A 9000 IU; vitamin D3 2000 IU; vitamin E 18 IU; vitamin K3 4 mg; thiamine 1.8 mg; riboflavin 6.6 mg; niacin 30 mg; vitamin B6 2.9 mg; vitamin B5 25 mg; vitamin B12 0.015 mg; biotin 0.15 mg; Folic Acid 1 mg; zinc 84 mg; iron 50 mg; copper 10 mg; manganese 99 mg; selenium 0.2 mg; iodine 99 mg. 2- Filler for T1 (control) equal to 0.11% sand, for T2 equal to 0.06% sand + 0.05 percent of Betaine hydrochloride, for T3 equal to 0.03% sand + 0.08 percent of Betaine hydrochloride, and for T4 equal to 0.11% Betaine hydrochloride.

**Table 2.** Primer sequences of LPL and GAPDH gene.

**Table 3.** Effect of betaine supplementation on the serum (mg/dl) and liver (mg/g) lipids. a, b, c: Means with similar letter are not significantly different.

**Table 4.** The effect of betaine supplementation on ACC and FAS activities in liver (Mean  $\pm$  SE).

**Figure 1.** The effect betaine supplementation on expression of LPL mRNA in abdominal adipose tissue (Means  $\pm$  S.E.M,  $p > 0.05$ ).

