

بررسی بیان ژن آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تفاله انگور

شماره صفحات

۹۰-۸۱

فاطمه قربانی رشنودی^۱، محمدتقی بیگی نصیری^۲، فاطمه ثعلبی^{۳*} و احمدطاهر^۴

۱، ۲ و ۴) گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.
 ۳) گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران.

نویسنده مسئول: f.salabi@rvsri.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۱۲

چکیده

یکی از فرآورده‌های فرعی کارخانجات صنایع تبدیلی کشاورزی در ایران تفاله‌ی انگور می‌باشد. تفاله انگور حاوی ترکیبات پلی فنولی است که خاصیت آنتی اکسیدانی دارند. از این رو، این تحقیق به منظور بررسی اثر تفاله انگور بر بیان ژن آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در جوجه‌های گوشتی اجرا گردید. بدین منظور از ۶۰ قطعه جوجه گوشتی ۱ روزه محصول تجاری راس در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲ تیمار (جیره پایه بدون تفاله انگور و جیره حاوی ۹٪ تفاله انگور)، ۳ تکرار و ۱۰ قطعه جوجه در هر تکرار استفاده شد. در پایان دوره پرورش استخراج RNA کل از ۲ نمونه کبد از هر تکرار انجام جهت تولید cDNA مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت بیان ژن آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز به روش Real time PCR ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تفاله انگور بر بیان ژن آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز اثر افزایش بیان معنی‌داری داشت ($p < 0.01$). نتایج Real time PCR نشان داد که بیان ژن آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (۳/۹۴ برابر) و کاتالاز (۲/۲۴ برابر) در تیمار حاوی ۹٪ تفاله انگور نسبت به شاهد افزایش یافت ($p < 0.01$). به طور کلی، استفاده از تفاله انگور توانست میزان بیان آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را افزایش دهد. بنابراین با بالا بردن سطح آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در کبد جوجه‌های گوشتی تحت اثر تفاله انگور، ممکن است بتوان نقش مهمی در حفاظت از سلول در برابر اکسیداسیون ایفا کرد. تفاله انگور با خاصیت آنتی اکسیدانی خود می‌تواند در اثر کمبود آنتی اکسیدان، اثرات آنتی اکسیدانی نشان دهد و باعث بیان بیشتر آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز شود. در نتیجه با افزودن تفاله انگور در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی می‌توان تا حدودی از آسیب‌های اکسیداسیون به سلول پیشگیری کرد. این مطالعه به درک بیشتر اثرات تغذیه و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی بر جوجه‌های گوشتی کمک می‌کند.

کلمات کلیدی: تفاله انگور، جوجه‌های گوشتی، ژن سوپراکسید دیسموتاز، ژن کاتالاز، ریل تایم PCR.

مقدمه

در سال‌های اخیر به دلیل افزایش روز افزون نیاز به تولیدات دامی و هم‌چنین کمبود مواد خوراکی، استفاده از پسماندها و فرآورده‌های فرعی در تغذیه حیوانات اهلی، مورد توجه خاص پرورش‌دهندگان دام و متخصصین تغذیه دام قرار گرفته است (Rabieh *et al.*, 2021). معمولاً مصرف این خوراک‌ها با توجه به ویژگی‌های تغذیه‌ای آن‌ها از ۵ تا ۳۰ درصد ماده خشک در جیره متغیر است. بعلاوه کاربرد پسماندهای کشاورزی به عنوان خوراک دام باعث می‌شود که اولاً وابستگی دام به غلاتی که توسط انسان مصرف می‌شود، کم شود و ثانیاً باعث جلوگیری از آلودگی زیست محیطی حاصل از انباشت این پسماندها می‌شود (Grasser *et al.*, 1995). از جمله ضایعات کشاورزی که در کشورمان دارای تولید بالا و حجم انبوهی هستند می‌توان به تفاله انگور و تفاله دانه انار اشاره نمود. تفاله انگور یک پسماند لیگنوسلولزی و باقیمانده فرایند آبیگری از میوه انگور است و حدود ۲۰ درصد وزن مرطوب میوه اولیه را تشکیل می‌دهد. با توجه به تولید ۲/۵ میلیون تنی انگور در کشور، میزان تولید تفاله انگور در سال بالغ بر ۵۰۰۰۰ تن است (Alipour and Rouzbehan, 2007). با تجزیه تقریبی تفاله انگور، درصد فیبر خام و پروتئین خام به ترتیب ۳۸ درصد و ۱۳/۷ درصد و میزان انرژی خام ۲۶۹۰ کیلوکالری بر کیلو گرم بدست آمد و مشخص شد که با وجود پروتئین خام نسبتاً قابل قبول، فیبر خام این تفاله برای استفاده در تغذیه طیور بالا است (Mirghelenj *et al.*, 2018). بسیاری از ترکیبات ثانویه گیاهان به دلیل دارا بودن ترکیبات فعال از نظر بیولوژیکی می‌توانند به‌عنوان افزودنی‌های خوراکی در جیره استفاده شوند. پلی فنول‌های موجود در تفاله میوه‌ها یکی دیگر از ترکیباتی هستند که به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه گیاهی به‌شمار می‌آیند. ثابت شده است که تفاله انگور نیز حاوی ترکیبات پلی فنولی است و این ترکیبات دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می‌باشند. این ترکیبات بخاطر تنوع گسترده و داشتن طیف وسیعی از خصوصیات بیوفیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد، مورد توجه محققین می‌باشند. فعالیت بیولوژیکی پلی فنول‌ها شامل ممانعت از عمل آنزیم‌های کلیدی، تنظیم گیرنده‌های سلولی، تنظیم فاکتورهای رونویسی و تنظیم عملکرد سلولی از طریق تاثیر بر مسیرهای پیام‌رسانی می‌باشد (Quideau *et al.*, 2011). برخی از ترکیبات ثانویه گیاهان دارویی به سبب نقش آنتی اکسیدان طبیعی، اثرات تحریک کننده بر سیستم ایمنی مصرف کننده دارند (Tizard, 2000). بعنوان مثال، گزارش شده رسوراترول موجود در انگور قرمز قادر است پراکسیداسیون لیپید را کاهش دهد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز را افزایش دهد (Kasdallah-Grissa *et al.*, 2007). امروزه به خوبی مشخص شده که آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در حفظ پاسخ‌های ایمنی بدن دارند و از راهکارهای دفاعی مرغ برای خنثی کردن رادیکال‌های آزاد در محیط داخلی بدن می‌باشند. در این میان، آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز، و کاتالاز نقش مهمی در حذف رادیکال‌های آزاد دارند. آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به سرعت آنیون سوپر اکسید را به هیدروژن پراکسید که سمیت کمتری دارد، تبدیل کرده و گلوکاتایون پراکسید و کاتالاز H_2O_2 را به آب تجزیه می‌کنند (Michiels *et al.*, 1994). کاتالاز نیز یک آنزیم تترامری متشکل از چهار زنجیره‌ی پلی‌پپتیدی با طول بیش از ۵۰۰ اسید آمینه و چهار گروه پورفرین آهن

است که توانایی انجام واکنش با پراکسید هیدروژن را به آن می‌دهد. این آنزیم در حفاظت سلول از آسیب اکسیداتیو گونه‌های اکسیژن فعال نقش به سزائی دارد و توانایی تجزیه‌ی پنج میلیون مولکول پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن را در هر ثانیه دارد (Chelikani *et al.*, 2004). برخی از محققین گزارش کردند که مصرف ۶ درصد کنسانتره تفاله انگور در جیره جوجه‌ها، فعالیت آنتی اکسیدانی را در بافت سینه افزایش می‌دهد (Brenes *et al.*, 2008). در تحقیق دیگری نشان داده شده است که با افزایش سطح تفاله انگور در جیره، مقدار آنتی اکسیدان سرم افزایش می‌یابد (Khodayari and Razakzadeh, 2018). یکی از فرآورده‌های فرعی کارخانجات صنایع تبدیلی کشاورزی در ایران تفاله‌ی انگور می‌باشد و تفاله انگور حاوی ترکیبات پلی فنولی است که خاصیت آنتی اکسیدانی دارند. با توجه به اینکه تاکنون تحقیقی در زمینه اثرات تفاله انگور بر بیان ژن آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز صورت نگرفته است، لذا این تحقیق به منظور بررسی اثر تفاله انگور بر بیان ژن آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در جوجه‌های گوشتی طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از ۶۰ قطعه جوجه گوشتی یک روزه محصول تجاری راس در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲ تیمار ۳ تکرار و ۱۰ قطعه جوجه در هر تکرار استفاده شد. پس از کشتار ۲ نمونه کبد از هر تکرار سریعاً جدا گردید و در ازلت مایع به آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان منتقل و در دمای ۸۰- ذخیره شد. به منظور ارزیابی میزان بیان ژن‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز، استخراج RNA ی کل با استفاده از محلول استخراج شرکت دنازیست (DNAzist column RNA isolation kit, S-1020) انجام شد. برای بررسی کمیت و خلوص RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ مدل (ThermoScientific NanOdrOp, 2000C.USA) استفاده شد. ساخت cDNA نیز با استفاده از کیت سیناکلون و طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. به طور خلاصه، ترکیبی شامل ۵ میکرولیتر RNA، ۱ میکرولیتر Oligodt DT و ۴ میکرولیتر H₂O، به صورتی که حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر باشد تهیه گردید. ترکیب حاصل ابتدا به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر انکوبه شد، سپس به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفت. در مرحله دوم ۴ میکرولیتر 5X Buffer، ۱ میکرولیتر DTT، ۰/۵ میکرولیتر M-Mel، ۰/۵ میکرولیتر RNase inhibitor، ۲ میکرولیتر dNTP و ۲ میکرولیتر H₂O به ترکیب بالا اضافه گردید. سپس در دستگاه ترموسایکلر در ۱ چرخه به مدت زمان ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در مرحله نهایی محلول‌های حاصل در یک چرخه به مدت زمان ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد جهت غیر فعال سازی آنزیم‌ها قرار داده شدند. سپس cDNA ساخته شده تا شروع آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر، ابتدا واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از پرایمرهای طراحی شده (Rabieh *et al.*, 2021) برای کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و بتا اکتینین (جدول ۱) انجام شد. تکثیر قطعه ۲۴۵ جفت بازی ژن آنزیم کاتالاز، قطعه ۱۲۲ جفت بازی ژن آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و قطعه ۱۵۰ جفت بازی ژن بتا اکتینین

توسط واکنش PCR با دستگاه ترموسایکلر صورت گرفت.

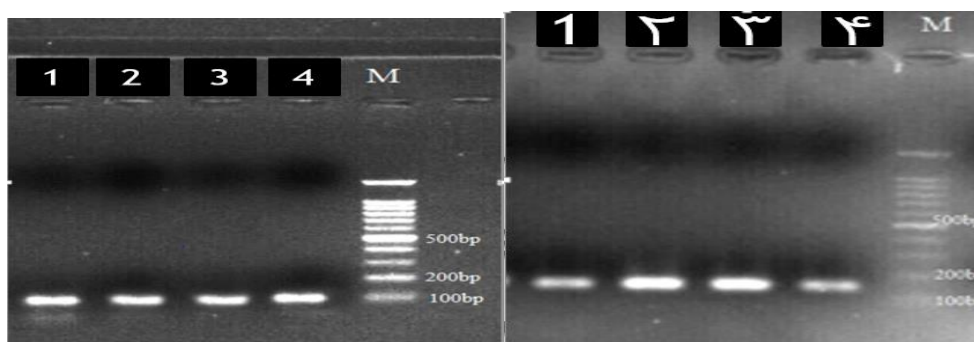
جدول ۱- خصوصیات و توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه
Table 1- The sequence and characteristics of the primer used in this study

نام ژن Gene name	توالی پرایمر (۵'-۳')	شماره دسترسی Accession number	دمای اتصال Annealing temperature
کاتالاز Catalase	5'ACCAAGTACTGCAAGGCGAA3' 5'TGAGGGTTCCTCTCTGGC-3'	NM-001031215.1	61
سوپراکسید دیسموتاز Superoxide Desmutase	5'AGGGGGTCATCCACTTCC-3' 5'CCCATTTGTGTTGTCTCCA-3'	NM-205064.1	58
بتا اکتینین B-actin	5'TGCTGTGTTCCCATCTATCG-3' 5'TTGGTGACAATACCGTGTCA-3'	NM-205518	59

تعداد چرخه‌های انجام واکنش PCR برای هر جفت آغازگر ۳۵ چرخه در نظر گرفته شد. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۳ میکرولیتر شامل ۶/۵ میکرولیتر آب استریل، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت (به غلظت ۴ پیکومول به میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر نمونه cDNA استخراج شده (به غلظت ۵۰ نانوگرم) و ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس می‌باشند. لازم به ذکر است که در این آزمایش از Master mix 1.5 محصول شرکت سیناکلون که مخلوطی آماده از بافر NH_4^+ ، MgCl_2 ، dNTP و آنزیم تک پلیمرز بود، استفاده شد و برنامه حرارتی شامل: (۱) مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه با دمای واسرشت سازی ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال به مدت ۴۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و (۳) مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه می‌باشد. الکتروفورز محصولات PCR نیز با استفاده از ژل آگارز ۲٪ و رنگ آمیزی آن با ماده safe stain صورت گرفت. برای انجام واکنش qPCR - RT از دستگاه Step One Plus Real Time PCR System شرکت ABI و کیت RealQ Plus 2X Master Mix Green High ROXTM ساخت شرکت آپلیکون استفاده شد. برای هر ژن سه تکرار بیولوژیکی (از دو نمونه کبد متفاوت) و دو تکرار تکنیکی (دو تکرار برای هر cDNA) در نظر گرفته شد. اجزای واکنش Real Time PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل: ۲ میکرو لیتر cDNA رقیق شده، ۰/۲ میکرولیتر از هر آغازگر، ۲/۶ میکرولیتر آب مقطر، ۵ میکرو لیتر از کیت تجاری Real q plus master mix hirox 2x می‌باشد. برنامه دمایی این مرحله عبارت بود از: مرحله اول واسرشت سازی اولیه ۱ چرخه دمای ۹۵ درجه ۱۵ ثانیه، مرحله دوم ۴۰ چرخه با واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه ۱۵ ثانیه، دمای اتصال ۶۲ درجه ۳۰ ثانیه، دمای گسترش ۷۲ درجه ۳۰ ثانیه، مرحله سوم ۵۱ چرخه در دمای ۹۵-۷۰ با ۱۰ ثانیه. داده‌های به دست آمده برای تعیین بیان نسبی ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نسبت به بتا-اکتین به عنوان ژن خانگی (مرجع) مورد آنالیز قرار گرفتند و پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها، تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به بیان نسبی ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نسبت به بتا-اکتین توسط آزمون تحلیل واریانس یکطرفه صورت گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. در روش مقایسه‌ی نسبی تفاوت نسبی نمونه‌ی موردآزمایش در مقابل نمونه‌ی کنترل با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام گردید

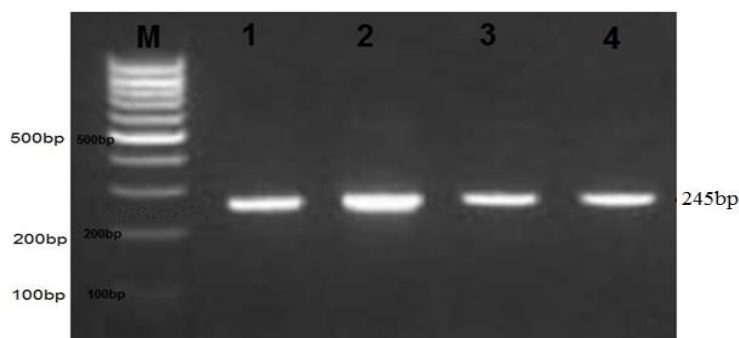
نتایج و بحث

پس از استخراج RNA به منظور اندازه‌گیری میزان RNA استخراج شده و نیز بررسی میزان خلوص آن، ۲ میکرو لیتر از هر RNA توسط دستگاه نانودراپ مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان خلوص آن با نسبت جذب نوری A260 به A280 بررسی شد. این نسبت در تمام RNAهای استخراج شده در این پژوهش بین ۲/۲-۱/۹ بود که نشانگر اینست که RNA مورد استفاده برای سنتز cDNA تا حد امکان عاری از هر گونه آلودگی با DNA بود. سپس کیفیت سنجی RNA استخراج شده با دستگاه الکتروفورز افقی روی ژل ۲ درصد انجام شد. بررسی کیفیت RNA تکثیر شده بر روی ژل آگارز عدم شکستگی RNA را تایید می‌کند و نشان‌دهنده‌ی کیفیت مناسب RNA تولید شده است. به منظور بررسی cDNA های ساخته شده با آغازگرهای بتا اکتین، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کلتالاز، واکنش زنجیره ای PCR انجام گردید. پس از انجام PCR بر روی نمونه‌های cDNA بافت‌های کبدی، جهت تایید نتایج الکتروفورز افقی صورت گرفت که ظهور ژن بتا اکتین با باند ۱۵۰ bp (شکل ۱- الف)، ژن سوپراکسید دیسموتاز با باند ۱۲۲ bp (شکل ۱- ب) و ژن کاتالاز با طول باند ۲۴۵ bp (شکل ۱- پ) بر روی ژل آگارز، ساخت صحیح cDNA را تایید کرد.



ب- ژن سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

الف- ژن بتا اکتین (B-actin gene)



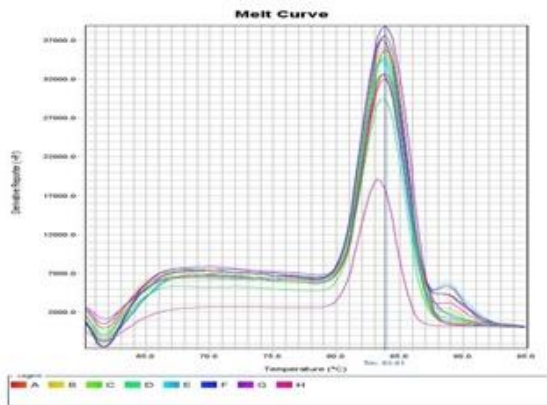
پ- ژن کاتالاز (CAT)

شکل ۱- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز ژن‌های بتا اکتین (الف) ژن سوپراکسید دیسموتاز (ب) و ژن کاتالاز (پ)

روی ژل آگارز ۲ درصد. M: مارکر ۱۰۰ bp

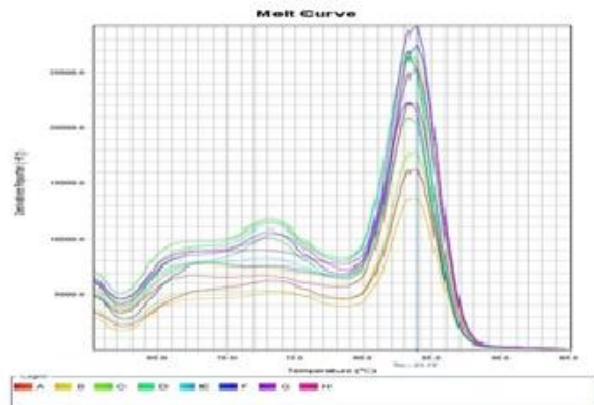
Fig. 1- A sample of electrophoresis of PCR products for A) B-actin, B) Superoxide Desmutase (SOD) and C) Catalase on the 2% Agarose gel. M: size marker 100bp

برای تخمین عملکرد آغازگرهای مورد استفاده برای واکنش qPCR - RT با استفاده از رنگ سایبرگرین، منحنی ذوب ترسیم گردید که نتایج نشانگر اتصال صحیح آغازگرها بود (شکل ۲).



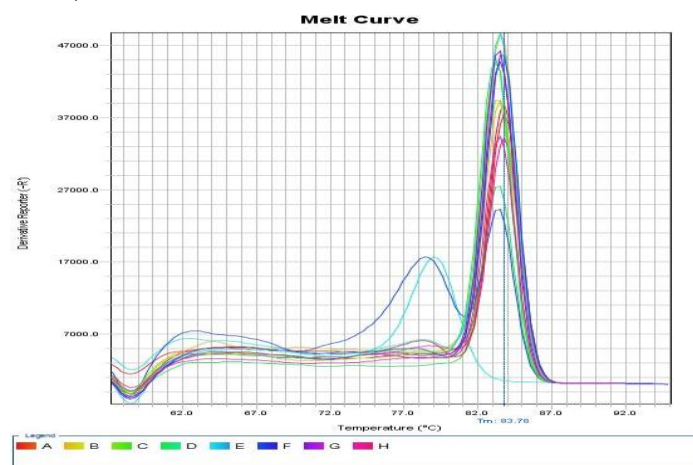
نمودار (۲) منحنی ذوب کاتالاز

ب



نمودار (۱) منحنی ذوب ژن بتا اکتین

الف



پ- منحنی ذوب سوپراکسید دیسموتاز

شکل ۲: منحنی ذوب ریل تایم PCR مربوط به ژن‌های ژن بتا اکتین (الف) کاتالاز (ب) و سوپراکسید دیسموتاز (پ) در جوجه‌های گوشتی

Fig. 2: Real-time PCR melting curves. Pictures Show real-time PCR melting curves for A) B-actin, B) Catalase and C) Superoxide Desmutase (SOD) genes in broiler chickens.

در نهایت بیان ژن آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و آنزیم کاتالاز محاسبه شد و مقادیر نهایی توسط نرم افزار SAS آنالیز گردید. نتایج آنالیزهای آماری داده‌های حاصل از نتایج Real-time PCR در این تحقیق نشان داد که میزان بیان ژن آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز به ترتیب در گروه‌های تغذیه شده با تفاله انگور برابر با ۳/۹۴۶ و ۲/۲۴۳ برآورد شد که این افزایش سطح، معنی‌دار می‌باشد (جدول ۲). طبق نتایج جدول (۲) میانگین تغییرات بیان ژن آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در تیمار تغذیه شده با تفاله انگور برابر با ۳/۹۴۶ نسبت به میانگین تغییرات کنترل که برای تمامی تیمارها ۱ در نظر گرفته شد، افزایش

یافته است و این افزایش در سطح ۹۹ درصد معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.01$). با توجه به نتایج ثبت شده در جدول (۲)، اثر تفاله انگور در تیمارها منجر به افزایش بیان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز شده است. سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) مهم‌ترین و اولین آنزیم آنتی اکسیدانی در تمام ارگانیسم‌های هوازی می‌باشد که در کاهش مستقیم متابولیت‌های اکسیژن فعال نقش دارد. این آنزیم به عنوان آنتی کارسینوژن عمل کرده و مانع شروع و تبدیل مراحل کارسینوژنز می‌شود (Cunningham *et al.*, 1984). علاوه بر این، سوپر اکسید یکی از اصلی‌ترین گونه‌های اکسیژن فعال در سلول است که می‌تواند باعث تبدیل رادیکال سوپر اکسید (O_2^-) به هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و اکسیژن (O_2) شود (McCord *et al.* 1969). کاهش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز، اثرات سمیت O_2 را افزایش داده و منجر به افزایش آسیب سلولی می‌شود. وقتی سطح استرس‌های اکسیداتیو افزایش یابد سطح SOD افزایش می‌یابد (Oberley *et al.*, 1979). نتایج جدول (۲) بیانگر اثر معنی‌دار تفاله انگور در تیمارها می‌باشد که باعث افزایش بیان آنزیم کاتالاز شده است. طبق نتایج (جدول ۲) میانگین تغییرات بیان ژن آنزیم کاتالاز در تیمار تغذیه شده با تفاله انگور برابر با ۲/۲۴۳ نسبت به میانگین تغییرات کنترل که برای همه‌ی تیمارها ۱ در نظر گرفته شد، افزایش یافته است و این افزایش در سطح ۹۹ درصد معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.01$). آنزیم کاتالاز، سلول را از اثرات پراکسید هیدروژن محافظت می‌کند. این آنزیم با اثر مستقیم بر پراکسید هیدروژن، این ماده را به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌کند و با تجزیه سریع این ماده به آب و اکسیژن، اثرهای مخرب آن را مهار می‌کند (Habibi *et al.*, 2004). از تفاله‌ها و گیاهان زیادی جهت افزایش بیان ژن‌های آنتی اکسیدانی استفاده شده است. تحقیقات نشان داده که ترکیب عصاره‌ی پسته‌ی وحشی و گیاه خرفه در کنار هم می‌تواند تأثیر به‌سزایی بر بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدانی (سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز) داشته باشد (Rabieh *et al.*, 2021).

جدول ۲- اثر تفاله انگور بر بیان ژن آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در جوجه گوشتی

Table 3- Effects of grape pomace treatments on Superoxide desmutase (SOD) and Catalase (CAT) genes expression in broiler chickens

ژن کاتالاز Catalase (CAT)	ژن سوپر اکسید دیسموتاز Superoxide Desmutase (SOD)	تیمارها Treatments
1 ^b	1 ^b	جیره پایه بدون تفاله انگور (Basal diet without grape pomace)
2.243 ± 0.310 ^a	3.946 ± 1.705 ^a	جیره کنترل به اضافه ۹٪ تفاله انگور (Basal diet containing 9% grape pomace)

بیان ژن‌ها نسبت به بیان بتا‌اکتین نرمال شدند. حروف غیر مشترک در جدول دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ($p < 0.01$) می‌باشد.

The amount of mRNAs was normalized to the amount B-actin mRNA. Different letters superscripts (a and b) in each row indicates a significant difference between the treatments ($P < 0.01$)

تفاله انگور منبع غنی از ترکیبات پلی فنول است که این ترکیبات به عنوان منابع آنتی اکسیدانی می‌باشد که از بین آن‌ها می‌توان به کاتچین‌ها، اپی کاتچین‌ها و پروسیانیدین‌ها اشاره کرد که دارای اثرات ضد میکروبی،

ضدویروسی، ضدالتهابی، ضدسرطانی و ضداکسیدانی نیز می‌باشند (Brans *et al.*, 2016). در تحقیق دیگری گزارش شده است که محتوای بالای ترکیبات فنولی و نیز سطح بالای رسوراترول و آنتوسیانین‌های موجود در شیرهی انگور در افزایش سیستم‌های دفاعی آنتی اکسیدانی آنزیمی نقش دارند (Dani *et al.*, 2008). اثر تحریک کننده مکملی با ترکیبات فنلی (اسید گالیک، اسید فرولیک و P اسید- کوماریک) بر فعالیت GSH-PX, SOD و CAT در قلب موش صحرایی نر نژاد Sprague-Dawley در سال ۲۰۰۹ گزارش شد و تغییرات مشابهی را در سطوح mRNA به همراه داشت (Yeh *et al.*, 2009). برخی از محققین نیز گزارش کردند که مصرف ۶ درصد کنسانتره تفاله انگور در جیره جوجه‌ها، فعالیت آنتی اکسیدانی را در بافت سینه افزایش می‌دهد (Brenes *et al.*, 2008). در تحقیق دیگری نشان داده شده است که با افزایش سطح تفاله انگور در جیره، مقدار آنتی اکسیدان سرم افزایش و مقدار مالون دی آلدیند خون کاهش می‌یابد. اثرات مثبت تفاله انگور بر مقدار آنتی اکسیدان سرم به خاطر این است که با افزایش سطح تفاله انگور در جیره مقدار فلاوونوئیدها که خاصیت آنتی اکسیدانی دارند نیز در خون افزایش می‌یابد (Khodayari and Razakzadeh, 2018). ولی این نکته را نباید از نظر دور داشت که استفاده از دوز بسیار بالای آنتی اکسیدان‌ها ممکن است اثر معکوسی داشته باشد و خود موجب ایجاد پراکسیداسیون گردد (Shahabodin *et al.*, 2008). نشان داده شد که افزودن ویتامین E و تفاله انگور در سطوح مختلف به جیره جوجه‌های گوشتی اثر نامناسبی بر بازدهی خوراک نداشتند (Goñi *et al.*, 2007). همچنین محققین نشان دادند که استفاده از سطوح مختلف تفاله خشک انگور بر قابلیت هضم ایلئومی مواد مغذی و مورفولوژی روده جوجه‌های گوشتی تاثیر نامناسبی نداشت (Dari *et al.*, 2013). تفاله انگور دارای خصوصیات فیزیکی و دارای پروتئین خام مناسبی است. نتایج تحقیقات نشان داده که مصرف تفاله انگور در جیره جوجه‌های گوشتی در سطح ۹ درصد عملکرد را بهبود می بخشد (Pirmohamadi *et al.*, 2010). در مطالعه‌ای دیگر گزارش شد که مصرف شیرهی انگور باعث افزایش فعالیت SOD و CAT گردید که دلیل آن خواص آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی موجود در شیرهی انگور ذکر شده است که شامل مهار رادیکال هیدروژن یا اهدا الکترون و فعالیت فلزی است (Balasubramanian *et al.*, 2006). علاوه بر این، پلی فنول‌ها یک آرایه بزرگ از فعالیت‌های بیولوژیکی از جمله مدولاسیون مسیرهای سیگنال دهی سلولی و اثرات بیان ژن هستند (Rodrigo *et al.*, 2011). از این رو، اثرات آن‌ها به طور کلی بسیار پیچیده و در میان مطالعات سازگار نیست. استفاده از آن‌ها در رژیم غذایی مرغ باید به شدت مورد بررسی قرار گیرد (Surai *et al.*, 2014).

نتیجه گیری کلی

به طور کلی با توجه به نتایج مطالعه حاضر، افزودن تفاله انگور به جیره جوجه‌های گوشتی بر بیان ژن آنزیم‌های آنتی اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز تاثیر معنی‌داری داشت. استفاده از سطح ۹ درصد از تفاله انگور توانست میزان بیان آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز را افزایش دهد. بنابراین با بالا بردن سطح آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در

کبد جوجه‌های گوشتی تحت اثر تفاله انگور، ممکن است بتوان نقش مهمی در حفاظت از سلول در برابر اکسیداسیون ایفا کرد. تفاله انگور با خاصیت آنتی اکسیدانی خود می‌تواند در اثر کمبود آنتی اکسیدان، اثرات آنتی اکسیدانی نشان دهد و باعث بیان بیشتر آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز شود. در نتیجه با استفاده از گیاهان با خاصیت آنتی اکسیدانی در جیره غذایی دام می‌توان تا حدودی از آسیب‌های اکسیداسیون به سلول پیشگیری کرد و بر این اساس استفاده از تفاله میوه‌های داری ترکیبات فنولی برای بهبود حفاظت بیشتر سلول پیشنهاد می‌شود.

منابع

- Alipour, D. & Rouzbehan, Y. (2007).** Effects of ensiling grape pomace and addition of polyethylene glycol on in vitro gas production and microbial biomass yield. *Animal Feed Science and Technology* 137 (1-2): 138-149.
- Balasubramanian, N., Sundram, K. & Samman, S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry* 99(1): 191-203.
- Brans, J. P. & De Smet, Y. (2016).** Promethee methods. In multiple criteria decision analysis. Springer, New York, NY. pp. 187-219.
- Brenes, A., Viveros, A., Goni, I., Centeno, C., Sayago-Ayerdy, S.G., Arija, I. & SauraCalixto, F. (2008).** Effect of grape pomace concentrate and vitamin E on digestibility of polyphenols and antioxidant activity in chickens. *Poultry Science* 87: 307-316.
- Chelikani, P., Fita, I. & Loewen, P. C. (2004).** Diversity of structures and properties among catalases (review). *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (2): 192-208.
- Cunningham, M. L., Ringrose, P. S. & Lokesh, B. R. (1984).** Inhibition of the genotoxicity of bleomycin by superoxide dismutase. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 135(3): 199-202.
- Dani, C., Pasquali, M. A., Oliveira, M. R., Umez, F. M., Salvador, M., Henriques, J. A. & Moreira, J. C. (2008).** Protective effects of purple grape juice on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in brains of adult Wistar rats. *Journal of medicinal food* 11(1): 55-61.
- Dari, S., Tebaidian, S.A., Taghiani, M., Jahanian, R. & Behnamnejad, F. (2013).** The effect of using different levels of grape pomace on ileal digestibility of nutrients and intestinal morphology of broiler chickens. The 5th Congress of Animal Sciences of Iran, Isfahan University of Technology.
- Goní, I., Brenes, A., Centeno, C., Viveros, A., Saura-Calixto, F., Rebole, A. & Estevez, R. (2007).** Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in chickens. *Poultry science* 86(3): 508-516.
- Grasser, L. A., Fadel, J. G., Garnett, I. & DePeters, E. J. (1995).** Quantity and economic importance of nine selected by-products used in California dairy rations. *Journal of Dairy Science* 78(4): 962-971.
- Habibi, D., Boojar, M.M., Mahmoudi, A., Ardakani, M.R. & Taleghani, D. (2004).** Antioxidative enzymes in sunflower subjected to drough stress. In 4th Internatioal Crop Science Congress, Australia, pp1-4.
- Kasdallah-Grissa, A., Mornagui, B., Aouani, E., Hammami, M., El May, M., Gharbi, N., & El-Fazaâ, S. (2007).** Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life sciences* 80(11): 1033-1039.
- Khodayari, F. & Razakzadeh, S. (2018).** The effect of red grape pomace on performance, fat peroxidation index (MDA) and some biochemical parameters of blood serum of broiler chickens. The

4th Congress of Animal Sciences of Iran, Tehran, Tehran University of Agriculture and Natural Resources (Karaj), 1042-1052.

McCord, J. M. & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase, enzymatic function for erythrocyte. *Journal of Biological Chemistry* 244: 6049-6055.

Michiels, C., Raes, M., Toussant, O. & Remacle, J. (1994). Importance of Se glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radicals Biology Medicien* 17: 235-248.

Mirghelenj, S. A., Kianfar, R., Janmohammadi, H. & Taghizadeh, A. (2018). Effect of different levels of grape pomace on egg production performance and egg internal quality during different keeping times and temperatures. *Animal Production Research* 6(4): 81-91.

Oberley, L. W., & Buettner, G. R. (1979). Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer research* 39(4): 1141-1149.

Pirmohamadi, R., Teimouri Yansari, A., Bbaeei, E. & Zali karehnab, L. (2010). Investigation of Physical Effectiveness of Grape Pomace in Comparison to Alfalfa Hay in Makui Sheep. *Research on Animal Production* 1(2): 10-21.

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. & Pouysegue, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* 50(3): 586-621.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.H. & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real- time PCR. *Nucleic Acids Research* 30(9): 36.

Rabieh, M., Roshanfekr, H., nazari, M. & Ghorbani, M. (2021). Gene expression of antioxidant enzymes fed wild pistachio (*Pistachio atlantica*), purslane (*portulaca oleracea*) extract and vitamin E under in broiler chickens under heat stress condition. *Iranian Veterinary Journal* 17(2): 51-60.

Rodrigo, R., Miranda, A. & Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta* 412(5-6): 410-424.

Shahabodin, M. E., Pour Amir, M., Pour Amir, A. A., Rasaie M. J. & Parastouee, K. (2008). Evaluating protective effect of grape seed suspension on glucose, insulin and serum total antioxidant levels after alloxan injection in rat. *Feyz Medical Sciences Journal* 12 (2):28-33

Surai, P. F. (2014). Polyphenol compounds in the chicken/animal diet: from the past to the future. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 98(1): 19-31.

Tizard, I. R. (2000). *Veterinary Immunology: An Introduction*. WB Saunders, Edition 6, New York.

Yeh, C. T., Ching, L. C. & Yen, G. C. (2009). Inducing gene expression of cardiac antioxidant enzymes by dietary phenolic acids in rats. *The Journal of nutritional biochemistry* 20(3): 163-171.