مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال سوم، شماره دوم، پیاپی دهم، پاییز ۱۳۹۳ (۹-۱)

تأثیر اسیدآمینه ترئونین جیره و سنین بعد از جوجه درآوری بر بیان ژن اینترلوکین ۸ در بافت روده در جوجه‌های گوشتی

شکوفه غضنفری[۱]*، حشمت سپهری مقدم[۲]، کریم نوبری[۳]
۱. استادیار، گروه علوم دام و طیور پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ۲. استادیار، دانشگاه پیام نور، گروه کشاورزی
۳. دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۲۵، تاریخ تصویب: ۹۳/۹/۵)

چکیده
هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی سطوح مختلف اسیدآمینه ترئونین (معادل احتیاجات [۱۹۹۴] NRC، میانگین احتیاجات راس [۲۰۰۷] و [۱۹۹۴] NRC، احتیاجات راس [۲۰۰۷] و بیشتر از احتیاجات راس [۲۰۰۷]) و سنین بعد از جوجه درآوری بر بیان ژن اینترلوکین ۸ در بافت روده جوجه گوشتی بود. احتیاجات اسیدآمینه ترئونین، مطابق توصیه‌های راس (۲۰۰۷)، ۱۴ درصد بیشتر از (۱۹۹۴) NRC است. بنابراین، در آزمایش اول، اثر اسیدآمینه ترئونین بر بیان ژن اینترلوکین ۸ در بافت ژژنوم روده کوچک در جوجه‌های گوشتی نر سویه راس و همچنین در آزمایش دوم، تأثیر سنین اولیه بعد از جوجه درآوری بر بیان ژن اینترلوکین ۸ بررسی شد. در آزمایش اول، سطوح مختلف ترئونین عبارت بودند از: ۱) ۰/۸ درصد (معادل احتیاجات NRC)، ۲) ۰/۸۷ درصد (میانگین احتیاجات NRC و راس)، ۳) ۰/۹۴ درصد (احتیاجات راس) و ۴) ۱/۰۱ درصد (بیشتر از احتیاجات راس). در سن ۱۴ روزگی، یک پرنده از هر تکرار کشته شد و از بافت ژژنوم نمونه‌گیری به عمل آمد. در آزمایش دوم، از تیمار ۱ آزمایش اول که سطح اسیدآمینه ترئونین جیره ۰/۸ درصد (معادل احتیاجات NRC) بود، در سنین ۱، ۳، ۶ و ۹ روزگی از هر تکرار یک پرنده کشته و از بافت ژژنوم مطابق با آزمایش اول نمونه‌گیری شد. جهت انجام مقایسات آماری، طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. نتایج آزمایشات نشان داد که بیان ژن اینترلوکین۸ در بافت ژژنوم در طول ۱۴ روز اول زندگی جوجه با افزایش سطوح اسیدآمینه ترئونین تا سطح ۰/۹۴ درصد جیره (احتیاجات راس) (P<۰/۰۰۰۱) و نیز با افزایش سن، افزایش می‌یابد (P<۰/۰۱).

واژه‌های کلیدی: جوجه گوشتی، اینترلوکین ۸، ترئونین.

* نویسنده مسئول: E-mail: shghazanfari@ut.ac.ir

Effect of Dietary Threonine and Age after Hatching on Interleukin-8 Gene Expression in Intestinal Tissue of Broiler Chicken

SH. GHAZANFARI[1]*, H. SEPEHRI MOGHADDAM[2], K. NOBARI[3]
1. Assistant Professor, Department of Animal and Poultry Sciences, University of Tehran, Aburaihan Campus, Pakdasht, Tehran, Iran, 2. Assistant Professor, Department of Agriculture, Payam-e-Noor University, Mashhad, Iran, 3. Post Graduate Student, Department of Animal Science, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
(Received: Sep. 16, 2014; Accepted: Nov. 26, 2014)

ABSTRACT
The aim of present research was to study influence of different levels of threonine amino acid (equal to requirements of NRC (1994), average of NRC (1994) requirements and ROSS (2007), requirements ROSS (2007) and more than requirements of ROSS (2007)) and age after hatching on interleukin-8 (IL8) gene expression in intestinal tissue in broiler chickens. Threonine requirements in accordance with the recommendations ROSS (2007) are 14% higher than NRC (1994). In the first experiment, effect of threonine on IL8 gene expression in the jejunum in Ross male broilers and also in the second experiment, effect of age on IL8 gene expression was studied after hatching. In the first experiment, different levels of threonine were: 1) 0.8%, 2) 0.87, 3) 0.94 % and 4) 1.01%. At 14 days, one bird from each replicate was killed and the jejunum tissue samples were obtained. In the second experiment, from first experiment 1 treatment that level of threonine amino acid diet was 0.8%, at 1, 3, 6 and 9 days, a bird killed and jejunum tissue samples were obtained in accordance with first experiment. Trizol kit was used for RNA extraction. Then remove genomic remnants and cDNA was synthesized. Realtime PCR reactions using primers and SYBR Green kit was performed. Experiments results showed that IL8 mRNA expression in jejunum tissue increased during the first 14 days of live chickens with increase threonine amino acid level until 0.94 percentage diet (P<0.0001) and also with age increase (P<0.01).

Keywords: Broiler chicken, Interleukin-8, Threonine.

مقدمه

اسیدهای آمینه جیره، احتیاجات رشد و نگهداری جوجه‌های گوشتی را تأمین می‌کنند و جیره‌هایی که حاوی مقدار اسیدهای آمینه کمتر یا بیشتر از احتیاجات هستند، به ترتیب باعث کاهش عملکرد و افزایش دفع نیتروژن می‌شوند (Kidd *et al.*, 2004). استفاده از مکمل‌های اسیدهای آمینه باعث بهبود تعادل کل اسیدهای آمینه شده و سطح پروتئین خام مورد نیاز را کاهش می‌دهند(Waldroup *et al.*, 2005). از کشف اسیدآمینه ترئونین حدود ۶۰ سال می‌گذرد و متخصصان تغذیه، ترئونین را به عنوان سومین اسیدآمینه ضروری در جیره جوجه‌های گوشتی بر پایه ذرت-کنجاله سویا می‌دانند (Waldroup *et al.*, 2005). از آنجایی که اسیدآمینه ضروری ترئونین به عنوان یکی از اجزاء مهم و موثر در رشد و توسعه روده می‌باشد (Horn *et al.*, 2009)، باید میزان احتیاج آن دقیقا در فرمولاسیون جیره جوجه گوشتی مشخص شود؛ زیرا مقادیر اضافی این اسیدآمینه باعث افزایش هزینه خوراک می‌شود و کمبود آن بازده استفاده از اسیدهای آمینه گوگرددار و لیزین را کاهش می‌دهد (Kidd, 2000). بازده استفاده از ترئونین جیره، بستگی به سطح پروتئین خام دارد (Kidd *et al.*, 2004). Schaart et al (2005) گزارش کردند که بین ۸۰ تا ۹۰ درصد از ترئونین جیره بوسیله روده سنتز می-شود. از آن جایی که ترئونین در سنتز پروتئین‌های مخاطی به کار می‌رود، نیاز معده، روده کوچک، روده بزرگ، پانکراس و کبد به ترئونین بالاست. در حالی که در این اندام‌ها، از سایر اسیدهای آمینه حدودا ۳۰ درصد استفاده می‌شود. ترئونین یکی از اجزای اصلی ساختمان موسین است. افزایش ترئونین منجر به کاهش مصرف اسیدهای آمینه خنثی (شامل اسیدهای آمینه منشعب) بوسیله مخاط روده می‌شود؛ زیرا سیستم انتقال آنها مشابه ترئونین است؛ همچنین سنتز پروتئین‌های خاص و عام کاهش می‌یابد. علاوه بر آن، عدم تعادل مصرف ترئونین بر هورمون‌های عمومی و محلی که تنظیم کننده متابولیسم پروتئین روده هستند، تأثیر می‌گذارد (Wang *et al.*, 2007). کمبود یا زیادی ترئونین، سنتز پروتئین مخاطی روده، موسین‌ها و پروتئین ماهیچه را کم می‌کند. کاهش ترئونین به سنتز پروتئین کبد زیان وارد کرده و سنتز پروتئین‌ها و موسین‌ها در روده کوچک و پروتئین در ماهیچه اسکلتی به میزان بیشتری نسبت به کبد کاهش می‌یابد. ترئونین مورد نیاز برای تأمین احتیاجات روده بخش معنی‌داری از کل احتیاجات ترئونین را تشکیل می‌دهد. ترئونین نقش مهمی در سنتز پرها دارد، نه فقط به عنوان جزئی از پروتئین پر، بلکه به عنوان پیش ساز گلایسین و سرین می‌باشد. این مطلب نشان دهنده یک عکس‌العمل متقابل بین پتانسیل رشد پر و گلایسین ، سرین و ترئونین است. از آنجایی که غلظت ترئونین در گاماگلوبولین‌های جوجه بالاست، در نتیجه این اسیدآمینه برای پاسخ سیستم ایمنی مورد نیاز می‌باشد. علاوه بر این به علت نقشی که ترئونین در تولید موسین در دستگاه گوارش دارد، نگهداری مقادیر قابل توجهی از ترئونین به منظور تأمین احتیاجات نگهداری لازم است (Kidd *et al.*, 2004). همچنین شواهدی وجود دارد که حاکی از افزایش احتیاجات ترئونین به منظور بهبود توانایی حیات پرنده در شرایط استرس گرمایی می‌باشد (Uni *et al.*, 2001).

سیستم ایمنی روده در گونه‌های پرندگان باید با سرعت شروع تغذیه سازگار شود. سیستم ایمنی اکتسابی در ناحیه هضمی پرندگان به طور کامل در پایان هفته اول بعد از جوجه‌درآوری، توسعه پیدا می‌کند. سلول‌های سیستم ایمنی برای انتقال پیام و تأثیر بر سایر سلول‌ها نیازمند ترشح محصولات و فراورده‌هایی هستند تا واسطهٔ اعمال این پیام‌ها باشند. مولکول‌های پروتئینی که توسط سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی و اختصاصی در پاسخ به میکروب‌ها و سایر آنتی ژن‌های موجود، تولید شده و هر یک اثرات متفاوتی را

ایجاد می کنند، به‌نام کلی ترشح سلولی یا سیتوکین[1] نامیده می‌شوند. سیتوکین‌ها نقش مهمی را در دفاع در برابر عفونت ویروسی ایفا می‌کنند (Sturm *et al.*, 2005). اینترلوکین۸ نیز یکی از سیتوکین‌ها می‌باشد که از مهم‌ترین عوامل پیش التهابی به شمار می‌رود و نقشی مرکزی در التهاب و انهدام ویروسی دارد. اینترلوکین۸ توسط انواع سلولها نظیر لنفوسیت-های T، مونوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اندوتلیال تولید شده و بر روی طیف گسترده‌ای از سلول‌ها از جمله نوتروفیل‌ها، بازوفیل‌ها و لنفوسیت‌ها تأثیر می‌گذارد. اولین بار اینترلوکین۸ را با توجه به اثر کموتاکسی و فعال‌کنندگی آن بر روی نوتروفیل‌ها شناخته و آن‌را پروتئین یک جاذب و فعال‌کنندهٔ نوتروفیل یا (NAP-1)[2] نامیدند ولی امروزه می دانیم که این فاکتور بر روی بسیاری از سلول‌ها موثر است. این سیتوکین در ارتشاح نوتروفیل و لنفوسیت‌ها به نواحی التهابی نقش کلیدی داشته و به صورت خودبه‌خودی توسط بسیاری از سلول‌های توموری نیز تولید می‌شود. اینترلوکین۸ موجب ازدیاد جمعیت سلول‌های بافت خون ساز و تحریک رگ‌سازی می-شود. گرچه رگ‌سازی برای التیام زخم ضروری است ولی اگر با رشد تومور و بیماری‌های التهابی باشد خطرناک است (Modi *et al.*, 1990). در این تحقیق دو آزمایش انجام شد. در آزمایش اول تأثیر سطوح مختلف ترئونین جیره بر بیان ژن اینترلوکین۸ در جوجه-های گوشتی بررسی شد و در آزمایش دوم بیان ژن اینترلوکین۸، در سنین مختلف در جوجه‌گوشتی پس از جوجه درآوری تا کامل شدن سیستم ایمنی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در یک واحد مرغداری تجاری در تربت‌حیدریه در بهار سال ۱۳۹۱ اجرا گردید. در آزمایش اول، تعداد ۳۲۰ قطعه جوجه‌گوشتی نر در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تیمار، ۸ تکرار و ۱۰ قطعه پرنده در هر تکرار در ۳۲ پن تقسیم شدند، به طوری‌که میانگین وزنی جوجه‌ها به یکدیگر نزدیک بود. طول دوره آزمایش ۱۴ روز بود. جیره‌ها به نحوی فرموله و آماده شدند که ۱۰۰ درصد از احتیاجات توصیه شده NRC (1994) را تامین کنند (جدول ۱). جیره‌های آزمایشی بر پایه ذرت – کنجاله سویا با ۴ سطح مختلف ترئونین و از لحاظ پروتئین مشابه بودند. سطوح مختلف ترئونین عبارت بودند از: ۱) ۰/۸ درصد (معادل احتیاجات NRC)، ۲) ۰/۸۷ درصد (میانگین احتیاجات NRC و راس)، ۳) ۰/۹۴ درصد (احتیاجات راس) و ۴) ۱/۰۱ درصد (بیشتر از احتیاجات راس). تیمارها با استفاده از اسیدآمینه ال–ترئونین با خلوص ۹۸/۵ درصد ترئونین (شرکت اونیک دگوسا، آلمان) در حضور یک رقیق‌کننده ساخته شدند.

در سن ۱۴ روزگی، یک پرنده از هر تکرار کشته شد و از بافت ژژنوم نمونه‌گیری به عمل آمد. نمونه‌ها (۴ سانتی‌متر) از قسمت میانی ژژنوم گرفته شدند و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی در نیتروژن مایع منجمد (Smirnow *et al.*, 2006) و بلافاصله در دمای ۸۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در آزمایش دوم، از تیمار ۱ آزمایش اول که سطح اسیدآمینه ترئونین جیره ۰/۸ درصد (معادل احتیاجات NRC) بود، در سنین ۱، ۳، ۶ و ۹ روزگی از هر تکرار یک پرنده کشته و از بافت ژژنوم مطابق با آزمایش اول نمونه‌گیری شد.

به‌منظور مشخص‌شدن میزان بیان ژن اینترلوکین۸ در بافت ژژنوم روده کوچک، بافت‌های منجمد شده در نیتروژن ۸۰– درجه سانتی‌گراد کاملاً همگن شده و برای استخراج RNA آماده گردیدند. جهت استخراج RNA از کیت ترایزول مطابق روش توصیه شده کیت استفاده شد. سپس cDNA با استفاده از کیت cDNA شرکت فرمنتاز (آلمان) ساخته شد.

1. Cytokines
2. Neutrophil Attractant / Activation Protein-1

واکنش‌های Realtime PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و کیت سایبر گرین (شرکت Applied Biosystems (ABI)، آمریکا) و با استفاده از دستگاه مدل ABI ساخت همین شرکت انجام شد. آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های اینترلوکین۸ و ۱۸s به ترتیب از مطالعات Park et al. (2008) و Paczoska-Eliasiewicz *et al.* (2006) اقتباس و انتخاب گردیدند. توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش در جدول ۲ گزارش شده است.

جدول ۱. ترکیب شیمیایی جیره پایه آزمایشات در مرحله آغازین (۱ تا ۱۴ روزگی)

مواد خوراکی (٪)	مرحله آغازین (۱ تا ۱۴ روزگی)
ذرت	۶۰/۵۵
کنجاله سویا	۲۷/۴۵
کنجاله گلوتن ذرت	۵/۷۹
روغن آفتاب‌گردان	۱/۲۲
سنگ آهک	۱/۷
دی کلسیم فسفات	۱/۱۹
نمک معمولی	۰/۲۳
بی کربنات سدیم	۰/۲۶
مکمل ویتامینه و معدنی[۱]	۰/۴
دی ال- متیونین	۰/۲۵
ال- لیزین هیدروکلرید	۰/۲۵
رقیق کننده[۲]	۰/۶
ال- اسید گلوتامیک	۰/۱
مقدار مواد مغذی محاسبه شده	
پروتئین خام (٪)	۲۱/۲۲
انرژی قابل سوخت و ساز (Kcal/Kg)	۲۹۵۲/۹
کلسیم (٪)	۱
فسفر قابل دسترس (٪)	۰/۴۵
لیزین (٪)	۱/۱
متیونین + سیستین (٪)	۰/۸۳
متیونین (٪)	۰/۴۹
ترئونین (٪)	۰/۸
تریپتوفان (٪)	۰/۲۳
آرژنین (٪)	۱

۱- مکمل معدنی، به ازای هر کیلوگرم جیره، شامل ترکیب مغذی زیر بود: ۶۵ میلی‌گرم منگنز، ۵۵ میلی‌گرم روی، ۵۰ میلی‌گرم آهن، ۸ میلی‌گرم مس، ۱/۸ میلی‌گرم ید، ۰/۳ میلی‌گرم سلنیم، ۰/۲ میلی‌گرم کبالت، ۰/۱۶ میلی‌گرم مولیبدن. مکمل ویتامینی به ازاء هر کیلوگرم جیره، شامل این ترکیبات مغذی بود: ۹۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A (رتینول استات)، ۲۱۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۲۲ میلی‌گرم ویتامین E، ۰/۶ میلی‌گرم ویتامین B_{12} ، ۴/۴ میلی‌گرم ریبوفلاوین، ۴۰ میلی‌گرم نیکوتین آمید، ۱۴ میلی‌گرم اسید پانتوتنیک، ۱/۵ میلی‌گرم منادیون، ۰/۸ میلی‌گرم اسید فولیک، ۳ میلی‌گرم تیامین، ۱۰ میلی‌گرم پیرودوکسین، ۱ میلی‌گرم بیوتین، ۵۶۰ میلی‌گرم کولین کلراید، ۱۲۵ میلی‌گرم اتوکسی کوئین. ۲- ماسه شسته شده.

جدول ۲. توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های Realtime PCR

ژن	توالی آغازگر (′۳–′۵)		طول فرآورده (جفت باز)
اینترلوکین ۸	GGC TTG CTA GGG GAA ATG A	رفت	۲۰۰
	AGC TGA CTC TGA CTA GGA AAC TGT	برگشت	
۱۸s	CGC GTG CAT TTA TCA GAC CA	رفت	۱۴۸
	ACC CGT GGT CAC CAT GGT A	برگشت	

واکنش‌های Realtime RT-PCR [1] در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شدند. هر واکنش حاوی اجزایی به این شرح می‌باشد: ۱۰ میکرولیتر مستر میکس سایبر گرین حاوی رنگ ROX، ۰/۷ میکرولیتر برای هر کدام از آغازگر رفت و برگشت،۳ میکرولیتر نمونه cDNA، که با ۵/۶ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، که در نهایت، به حجم ۲۰ میکرولیتر می‌رسد. لازم به توضیح است که آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده، غلظتی معادل ۱۰ میکرومولار داشتند. واکنش‌های Realtime PCR طی مراحل زیر انجام شد: واسرشته‌سازی cDNA به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ $^{\circ}C$ و به دنبال آن ۴۰ چرخه واسرشته‌سازی cDNA به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۵ $^{\circ}C$ و اتصال آغازگر به مدت ۱ دقیقه در دمای ۶۱ $^{\circ}C$. پس از پایان این مراحل، منحنی ذوب هر یک از فرآورده‌های PCR با شرایط ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ $^{\circ}C$، ۱ دقیقه در دمای ۶۰ $^{\circ}C$ و ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ $^{\circ}C$ ترسیم شد. واکنش‌های Realtime PCR و تشکیل منحنی‌های ذوب توسط دستگاه ABI (شرکت Applied Biosystems، آمریکا) انجام شد.

میزان بیان ژن اینترلوکین۸ بر اساس بازدهی PCR و تفاوت انحراف شماره سیکل آستانه (C_t) ژن هدف نسبت به یک ژن مرجع [2] در یک نمونه مورد مطالعه نسبت به نمونه شاهد و به روش $\Delta\Delta C_t$ برآورد گردید (Bustin *et al.*, 2009). mRNA ۱۸s به عنوان ژن مرجع مورد استفاده قرار گرفت. در این روش، میانگین مقادیر C_t مربوط به ژن اینترلوکین ۸ و ژن ۱۸s محاسبه شده و از تفاوت آنها ΔC_t بدست آمد. مقادیر مثبت برای ΔC_t نشاندهنده کاهش میزان بیان ژن هدف در مقایسه با ژن مرجع (با بیان ثابت در هر شرایط) و برعکس مقادیر منفی حاکی از افزایش بیان ژن هدف می‌باشد. سپس تیماری که به طور آزاد با جیره مطابق با NRC تغذیه شده بود، به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد و انحراف ΔC_t برای هریک از تیمارهای مورد مطالعه از ΔC_t تیمار شاهد محاسبه شد. آنگاه ۲ به توان منفی $\Delta\Delta C_t$ بیانگر بیان ژن کمی برای هر تیمار نسبت به تیمار شاهد [3] (RQ) خواهد بود و نشان می‌دهد بیان ژن هدف در تیمار مورد نظر نسبت به تیمار شاهد (با نسبت RQ معادل یک) چند برابر افزایش (مقادیر مثبت) و یا کاهش (مقادیر منفی) داشته است. جهت انجام آزمون معنی‌داری تفاوت‌ها و انحرافات میزان بیان ژن در تیمارهای مختلف، از روش تجزیه واریانس (ANOVA) و نیز آزمون مقایسه میانگین‌های با تفاوت معنی‌دار آماری به روش دانکن چند دامنه‌ای و در سطح احتمال خطای ۵٪ با استفاده از نرم‌افزار SAS (SAS، ۲۰۰۵) انجام شد. مدل آماری زیر در قالب طرح کاملاً تصادفی متعادل برای توصیف مشاهدات مورد استفاده قرار گرفت:

$$Y_i = \mu + T_i + e_i$$

1. Realtime Reverse transcription polymerase chain reaction
2. Housekeeping (Reference) Gene
3. Relative Quantification

که در آن:

Y_i= مقدار هر مشاهده، μ= میانگین جامعه، T_i = اثر i امین تیمار و e_i = خطای آزمایش (مجموع اثرات باقیمانده).

نتایج

بیان ژن اینترلوکین۸ در ژژنوم جوجه‌های گوشتی تشخیص داده شد. برای اطمینان یافتن از وجود قطعات تکثیر شده مورد نظر در محصول PCR، در انتهای واکنش محصولات تکثیر شده روی ژل آگارز ۱٪ برده شد (شکل ۱).

نتایج آزمایش اول نشان داد که بیان ژن اینترلوکین ۸ در بافت ژژنوم در طول ۱۴ روز اول زندگی جوجه با افزایش سطح اسیدآمینه ترئونین تا سطح ۰/۹۴ درصد (احتیاجات راس) افزایش می‌یابد (P<۰/۰۰۰۱). اثر سطوح مختلف ترئونین بر بیان ژن اینترلوکین ۸ در بافت روده در جدول ۳ گزارش شده است. در جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی ۱/۰۱ درصد ترئونین (بیشتر از احتیاجات راس)، ژن اینترلوکین ۸ بیان کمتری داشتند (P<۰/۰۰۰۱) که احتمالاً حاکی از آن است که با افزایش غلظت ترئونین بیشتر از حد مورد نیاز به علت رقابت بین اسیدهای آمینه با سیستم انتقالی مشابه با ترئونین، بین اسیدهای آمینه عدم تعادل ایجاد خواهد شد و در نتیجه بیان ژن اینترلوکین ۸ کاهش می‌یابد. ترئونین مازاد به گلیسین متابولیزه می‌شود و گلیسین مازاد بر نیاز صرف تشکیل کراتین با استفاده از آرژنین و آنزیم آمیدینوترانسفراز خواهد شد (Bird *et al*., 1984). همچنین تولید کراتین، باعث مصرف بیشتر آرژنین و متیونین و کم شدن ذخایر این اسیدهای آمینه ضروری و حیاتی می‌شود و این وضعیت ممکن است باعث بروز عدم توازن این دو اسیدآمینه گردد. این کاهش راندمان استفاده از اسیدهای آمینه، افزایش غلظت اسید اوریک پلاسما و دفع بیشتر نیتروژن به صورت اسید اوریک را موجب می‌شود. به عبارت دیگر، مصرف سطوح بالای ترئونین، احتمالاً باعث کاهش عملکرد خواهد شد (Bird *et al*., 1984). این آزمایش برای اولین بار انجام شده و تحقیقی مشابه آن یافت نشد. Sepehri Moghaddam *et al*. (2011) سطوح تغذیه‌ای ترئونین را بر بیان ژن موسین ۲ بررسی کردند. اگر چه آنها تأثیر معنی‌داری از سطوح مختلف ترئونین بر بیان ژن موسین ۲ مشاهده نکردند، با این حال بیان ژن موسین ۲ پرندگانی که سطح ۱/۰۱ درصد ترئونین دریافت می‌کردند تمایل به کاهش داشت. Smirnov *et al*. (2006) گزارش کردند که جیره‌ای شامل ۳/۳ و ۸/۲ گرم ترئونین بر کیلوگرم برای ۷ روز بر بیان ژن موسین ۲ در جوجه‌ها تأثیری نداشت و ارتباطی بین ترشح پروتئین موسین و بیان ژن موسین ۲ در جوجه‌ها وجود نداشت.

شکل ۱. بیان محصول Real Time PCR بر روی ژل آگازر و تولید قطعه ۲۰۰ جفت باز برای ژن اینترلوکین ۸ و ۱۴۸ جفت باز برای ژن ۱۸s

جدول ۳. تأثیر سطوح مختلف ترئونین بر بیان ژن اینترلوکین ۸ در بافت روده

ترئونین (٪)	بیان ژن اینترلوکین ۸ (n=۸)
۰/۸ (تیمار شاهد)	۱[d]
۰/۸۷	۲/۲[b]
۰/۹۴	۳/۴[a]
۱/۰۱	۱/۶[c]
خطای استاندارد میانگین (SEM)	۰/۰۲
احتمال (p)	<۰/۰۰۰۱

a-b-c: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف غیر مشابه معنی‌دار است (P <۰/۰۵).

اثر سنین مختلف بعد از هچ بر بیان ژن اینترلوکین۸ در بافت ژژنوم روده در طول ۹ روز اول زندگی جوجه در جدول ۴ گزارش شده است. نتایج آزمایش دوم نشان داد که با افزایش سن، بیان ژن اینترلوکین ۸ افزایش می‌یابد (P<۰/۰۱). این افزایش احتمالاً تأیید کننده نقش مهمی است که اینترلوکین۸ در توسعه سیستم ایمنی در هفته اول و دوم بعد از هچ دارد. اینترلوکین۸ به عنوان یکی از عمده‌ترین کیموکین‌های خانواده CXC و CC است. سیگنال‌های کموتاکتیک، ترشح لوکوسیت‌ها را به درون بافت‌ها تنظیم می‌کنند. همچنین، اینترلوکین ۸ در استفاده از سلول‌های تک هسته‌ای و توسعه مایلوئید در جوجه درگیر می‌باشند (Sick *et al*., 2000; Kaiser *et al*., 1999). Friedman & Bar-Shira (2006) ارتباط توسعه تدریجی ایمنی را با افزایش بیان ژن‌های دفاعی از جمله اینترلوکین۸ در جوجه‌های گوشتی تازه هچ‌شده نشان دادند. همچنین، Smirnov *et al*. (2006) گزارش کردند که بیان ژن موسین از روز ۱۷ انکوباسیون تا ۳ روز بعد از هچ افزایش می‌یابد.

جدول ۴. تأثیر سنین مختلف بعد از هچ بر بیان ژن اینترلوکین ۸ در بافت روده

سنین (روز)	بیان ژن اینترلوکین۸ (n=۸)
۱ (تیمار شاهد)	۱ [c]
۳	۱/۰۶[bc]
۶	۱/۲۳[b]
۹	۱/۶[a]
خطای استاندارد میانگین (SEM)	۰/۰۵
احتمال (p)	<۰/۰۱

a-b-c: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف غیرمشابه معنی‌دار است (P <۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

این تحقیق نشان داد که با افزایش سن، بیان ژن اینترلوکین۸ در بافت روده افزایش می‌یابد و احتمالاً به عملکرد بهتر سیستم ایمنی کمک می‌کند. همچنین یکی از فاکتورهای تغذیه‌ای که می‌تواند بیان ژن اینترلوکین۸ بافت روده را افزایش دهد، اسیدآمینه ترئونین است که استفاده از آن در حد احتیاجات سویه راس (۰/۹۴ درصد) احتمالاً به عملکرد بهتر ژن اینترلوکین۸ و تقویت سیستم ایمنی می‌انجامد.

سپاسگزاری

نویسندگان از پردیس ابوریحان- دانشگاه تهران به خاطر حمایت مالی تحت گرنت شماره ۲۷۳۴۱/۰۷ برای اجرای این طرح کمال سپاس را دارند.

REFERENCES

Bar-Shira E, Friedman A (2006) Development and adaptations of innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chick. Dev. Comp. Immunol, 30: 930-941.

Bird M, Nunn PB, Lord L (1984) Formation of glycine and aminoacetone from L-threonine by rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 802: 229-236.

Bustin SA, Benes Y, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffle MW, Shipley G, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guideline: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem, 55: 611-622.

Horn NL, Donkin SS, Applegate TJ, Adeola O (2009) Intestinal mucin dynamics: Response of broiler chicks and white pekin ducklings to dietary threonine. Poult. Sci, 88: 1906-1914.

Kaiser P, Hughes S, Bumstead N (1999) The chicken 9E3/CEF4 CXC chemokine is the avian orthologue of IL8 and maps to chicken chromosome 4 syntenic with genes flanking the mammalian chemokine cluster. Immunogenetics, 49: 673-684.

Kidd MT, McDaniel CD, Branton SL, Miller ER, Boren BB, Fancher BI. (2004). Increasing amino acid density improves live performance and carcass yield of commercial broilers. J. Appl. Poultry. Res, 13: 593-604.

Kidd MT (2000) Nutritional consideration concerning threonine in broilers. World. Poultry. Sci. J, 56: 139-151.

Modi WS, Dean M, Seuanez HN, Mukaida N, Matsushima K, O'Brien SJ (1990)Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a gene cluster along with several other members of the platelet factor 4 gene superfamily. Hum. Genet, 84: 185–187.

NRC (1994) Nutrient Requirements of Poultry. 9th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.

Park SS, Lillehoj HS, Allen PC, Park DW, FitzCoy S, Bautista DA, Lillehoj EP (2008) Immunopathology and cytokine responses in broiler chickens coinfected with eimeria maxima and clostridium perfringens with the use of an animal model of necrotic enteritis. Avian Dis, 52: 14-22.

Paczoska-Eliasiewicz HE, Gertler A, Proszkowiec M, Proudman J, Hrabia A, Sechman A, et al. (2006) Attenuation by leptin of the effects of fasting on ovarian function in hens (Gallus domesticus). Reproduction, 126: 739-751.

Ross Broiler Nutrition Specification (2007) http://www.aviagen.com/.

SAS (2005) SAS User′s guideStatistics. Version 8. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.

Schaart MW, Schierbeek H, Van Der Schoor SR, Stoll B, Burrin DG, Reeds P, Van Goudoever GB (2005) Threonine utilization is high in the intestine of piglets. J. Nutr, 135: 765-770.

Sepehri Moghaddam H, Nassiri Moghaddam H, Kermanshahi H, Heravi Mousavi A, Raji A (2011) The effect of threonine on mucin2 gene expression, intestinal histology and performance of broiler chicken. Italian J. Anim. Sci, 10: 66-71.

Sick C, Schneider K, Staeheli P, Weining KC (2000) Novel chicken CXC and CC chemokines. Cytokine, 12: 181-186.

Smirnov A, Tako E, Ferket PR, Uni Z (2006) Mucin gene expression and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by inovo feeding of carbohydrates. Poult. Sci, 85: 669-673.

Sturm DC, Baumgart J, Harder d'Heureuse A, Hotz B, Wiedenmann AU (2005) CXCL8 modulates human intestinal epithelial cells through a CXCR 1 dependent pathway. Cytokine, 29: 42-48.

Uni Z, Gal-Garber O, Geyra A, Sklan D, Yahav S (2001) Changes in growth and function of chick small intestine epithelium due to early thermal conditioning. Poult. Sci, 80: 438-445.

Waldroup PW, Jiang Q, Fritts CA (2005) Effects of glycine and threonine supplementation on performance of

broiler chicks fed diets low in crude protein. Int. J. Poult. Sci, 4: 250-257.

Wang X, Qiao S, Yin Y, Yue L, Wang Z (2007) A deficiency or excess of dietary threonine reduces protein synthesis in jejunum and skeletal muscle of young people. J. Nutr, 137: 1442-1446.