



اثر منابع مختلف چربی بر انرژی تیک و وضعیت اکسایش کاهش میتوکندری های جگر جوجه های گوشتی تحت شرایط تنش گرمایی بلندمدت

کاظم سیفی^۱، منصور رضایی^۲، اسداله تیموری یانسری^۳، غلامحسین ریاضی^۴ و محمدجواد ضمیری^۵

۱- دانش آموخته دکتری، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: kazem.seifi@gmail.com)

۲ و ۳- استاد و دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۴- استاد، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک (IBB)، دانشگاه تهران

۵- استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه شیراز

تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۲۹

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲۹

چکیده

تنش گرمایی اثرهای ناخوشایندی بر عملکرد جانوران مزرعه و در پی آن بر اقتصاد صنعت پرورش آن ها دارد. در این راستا و با هدف کاهش گرمای تولیدی در درون سلول، اثر منابع مختلف چربی از نظر طول زنجیر و درجه اشباع بر کنش میتوکندری های جگر جوجه های گوشتی انجام شد. چربی های مورد استفاده در این آزمایش شامل: الف) چربی گاو (Tallow) به عنوان منبع اسیدهای چرب اشباع بلند زنجیر، ب) روغن نارگیل به عنوان منبع اسیدهای چرب اشباع متوسط و کوتاه زنجیر، پ) روغن زیتون به عنوان منبع اسیدهای چرب تک نا اشباع و ت) روغن سویا به عنوان منبع اسیدهای چرب چند نا اشباع بودند. جوجه های گوشتی نر سوپه تجاری راس ۳۰۸ از روز ۳۲ تا روز ۴۲ در دمای ۳۶ درجه سلسیوس قرار گرفتند. در میتوکندری های جگر گروه های که چربی گاو و یا روغن نارگیل خورده بودند، فعالیت دهیدروژنازها، پتانسیل غشا و غلظت گونه های واکنش پذیر اکسیژن بیشتر ($P < 0.01$) و غلظت گلوکوتایون کمتر ($P < 0.01$) از دو گروه دیگر بود. یافته های این آزمایش نشان دادند که مصرف اسیدهای چرب اشباع، به ویژه انواع بلند زنجیر، می تواند در شرایط تنش گرمایی به کاهش تولید گرما در جوجه های گوشتی کمک کند.

واژه های کلیدی: میتوکندری، انرژی تیک، اکسیداسیون، تنش گرمایی، چربی، جوجه های گوشتی

مقدمه

مطالعه ها و گزارش های سازمان های ملی و بین المللی بیانگر آن است که در چند دهه گذشته، اقلیم کره زمین شاهد گرمایی بی سابقه بوده است. شورای بین المللی تغییر آب و هوا^۱ پیش بینی کرده است که تا سال ۲۱۰۰ میلادی دمای سطح کره زمین ۱/۸ تا ۴ درجه سلسیوس افزایش خواهد یافت (۲۲).

پرندگان در مواجهه با افزایش دمای پیرامونی، متحمل تغییرهای ویژه رفتاری، هورمونی و فیزیولوژیکی می شوند تا با حفظ تعادل دمایی درون بدن خود از اثرهای ناخوشایند دمای پیرامونی بالا (که در نهایت ممکن است به مرگ بیانجامد) در امان بمانند. با افزایش بیشتر دمای پیرامونی و عبور آن از دامنه دمایی خنثی، سازوکارهای رفتاری کارایی چندانی در سازش پذیری جانور به شرایط جدید نخواهند داشت و به دنبال آن سازوکارهای فیزیولوژیکی و هورمونی آغاز می شوند. از مهم ترین رفتارهای جانوران برای سازش پذیری به دمای محیطی بالا می توان به فاصله گرفتن از یکدیگر و تماس دادن بدن با سطوح خنک جایگاه نگهداری و کاهش مصرف خوراک (باهداف کاهش گرمای متابولیکی ناشی از مصرف خوراک) اشاره نمود. تغییر در روند تراوش و غلظت برخی هورمون ها، انقباض رگ های عمقی بدن به همراه انبساط رگ های سطحی (برای انتقال گرما از عمق به سطح بدن و از آنجا دفع گرما از سطح پوست) و یا افزایش نرخ تنفس نیز از مهم ترین رخدادهای فیزیولوژیکی و هورمونی برای مقابله با اثرهای ناخوشایند گرمای زیاد محیط هستند.

چنین رخدادهایی فزون بر اعمال هزینهای انرژی برای تغییر مسیرهای فیزیولوژیکی، موجب افت عملکرد دام ها نیز می شوند که تبعات اقتصادی آن بر کسی پوشیده نیست.

باور متخصصان بیوشیمی بر این است که بیش از ۹۰ درصد ATP یسلول های بدن در میتوکندری ها تولید می شود (۱۱). به این صورت که درون سلول الکترون های حاصل از اکسید شدن مواد غذایی، در قالب اکی والان های احیا (NADH و FADH₂) به زنجیره انتقال الکترون می رسند و انتقال الکترون ها در طول زنجیره در نهایت منجر به تولید ATP می شود. حال اگر زنجیره انتقال الکترون میتوکندری نتواند از الکترون های منتقل شده از چرخه های مرتبط با متابولیسم مواد غذایی، مقدار بیشینه ATP را تولید نماید، باقی مانده انرژی از برای تبدیل گرما خواهد شد. این گرما، در شرایط دمایی سرد برای حفظ دمای طبیعی بدن سودمند است، حال این پرسش به ذهن می آید که ۱۰۰ درصد نبودن بازده تولید ATP از اکی والان های احیا در زنجیره انتقال الکترون، آیا در شرایط دمای محیطی گرم می تواند برای جانوران خطر ساز باشد؟

مواد غذایی مختلف، گرمایی متفاوتی دارند. برای مثال درون بدن، پروتئین ها همواره در حال ساخت و تجزیه^۲ هستند که این مورد، به ویژه ساخت پروتئین، فرآیندی به شدت گرمازا است. با وجود این که چربی ها در مقایسه با پروتئین ها و کربوهیدرات ها گرمای متابولیکی کمتری تولید می کنند، مشخص شده است که اسیدهای چرب متفاوت از نظر طول زنجیر و درجه اشباع، رفتار متفاوتی در میتوکندری و بیان

X: درصد چربی در جیره‌ی آزمایشی
آزمایش دوم

در آزمایش دوم، شمار ۳۲ قطعه جوجه‌ی گوشتی نر از سویه‌ی تجاری راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار گروه و هشت تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. جوجه‌ها از روز ۳۲ آزمایش به تفکیک تیمارهای آزمایشی گروه‌بندی و وزن شدند. جیره‌های آزمایشی بر اساس راهنمای جوجه‌های گوشتی سویه‌ی تجاری راس ۳۰۸ تنظیم شدند (جدول ۲). دمای سالن پرورش ۳۶ درجه‌ی سلسیوس (تنش گرمایی) تنظیم شد. این دوره (یعنی دوره‌ی اعمال تنش گرمایی) به مدت ده روز و از روز ۳۲ تا پایان دوره‌ی پرورش (۴۲ روزگی) ادامه داشت. پس از کشتار، از جگر پرنده‌ها نمونه گرفته شد و نمونه‌ها بی‌درنگ در نیتروژن مایع قرار داده شدند. نمونه‌ها سپس برای انجام آزمایش‌های مربوط به میتوکندری، به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی میتوکندری‌های بافت جگر

برای جداسازی اندامک میتوکندری از بافت جگر، از روش سانتیفریوژ افتراقی^۶ استفاده شد (۵).

اندازه‌گیری غلظت پروتئین میتوکندری‌های جدا شده

اندازه‌گیری غلظت پروتئین میتوکندریایی با روش Bradford و بر پایه‌ی رویه‌ی توضیح داده شده توسط لارنس و داویس (۱۰) انجام شد. گزارش همه‌ی سنجش‌ها بر اساس غلظت پروتئین میتوکندری انجام شد.

اندازه‌گیری فعالیت دهیدروژنازهای میتوکندری‌های جدا شده (سنجش MTT)

از سنجش MTT برای اندازه‌گیری فعالیت دهیدروژنازهای میتوکندری و سنجش مقدار زنده و کارا بودن میتوکندری‌ها استفاده شد (۲۵). در این سنجش، جذب نور در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزای EPOCH (BioTek Instruments, Highland Park, USA) خوانده شد.

اندازه‌گیری پتانسیل غشا (ΔΨ) در میتوکندری‌های جدا شده (سنجش MMP)

برای سنجش میزان پتانسیل غشای میتوکندری از رودامین (Rhodamine 123) استفاده شد. رودامین یک ماده‌ی فلوروسنت است که می‌تواند توسط میتوکندری‌ها برداشت شود. هرچه پتانسیل غشای میتوکندری (گرادیان H⁺ میان غشا و ماتریکس میتوکندری) بیشتر باشد، میتوکندری قابلیت بیشتری در انتقال رودامین به ماتریکس و به‌دام انداختن آن دارد (۱). در این آزمایش، مقدار رودامین ۱۲۳ موجود در محیط واکنش با روش فلومتری و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر فلورسنت Jasco® FP-750 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) در طول موج‌های ۴۹۰ نانومتر برای تحریک و ۵۲۰ نانومتر برای نشراندازه‌گیری شد.

برخی پروتئین‌های آن دارند (۲۴) که می‌تواند در سرنوشت تولید ATP (و در نتیجه گرما) نقش داشته باشد. بنابراین، نام گرفتن اندامک میتوکندری به‌عنوان نیروگاه یا موتورخانه‌ی سلول^۱ به این مفهوم است که سرنوشت نهایی تمام مواد غذایی از نظر تولید انرژی (ATP و یا گرما) را باید در این اندامک درون سلولی جستجو نمود.

این آزمایش به دنبال این بود که اثر انواع چربی از نظر طول زنجیر و درجه‌ی اشباع‌اسیدهای چرب در شرایط تنش گرمایی بر انرژی و گرمایی میتوکندری‌های جوجه‌های گوشتی را بررسی نماید.

مواد و روش‌ها

آزمایش نخست

آزمایش نخست به‌منظور تعیین مقدار انرژی قابل متابولیسم چربی‌های مورد استفاده در آزمایش دوم، به روش جمع‌آوری کل فضولات^۲ و جایگزینی چربی با بخشی از جیره‌ی پایه انجام شد (۲۶). ترکیب جیره‌ی پایه در جدول ۱ ارائه شده است. چربی‌هایی که در این آزمایش استفاده شدند شامل: الف) چربی گاو^۳ به‌عنوان منبع اسیدهای چرب اشباع بلندزنجیر (که پس از ذوب و تصفیه شدن، به‌صورت مایع (روغن) به جیره افزوده شد، ب) روغن نارگیل به‌عنوان منبع اسیدهای چرب اشباع متوسط و کوتاه زنجیر، پ) روغن زیتون به‌عنوان منبع اسیدهای چرب تک‌ناشباع^۴ و ت) روغن سویا به‌عنوان منبع اسیدهای چرب چند نااشباع^۵، بودند. این آزمایش شامل ۱۳ تیمار (سطوح سه، شش و نه درصد از هر کدام از چهار منبع چربی به‌علاوه‌ی سطح صفر) و شش تکرار بود.

$$\text{AME diet} = \frac{\{(\text{FI} \times \text{GE diet}) - (\text{Excreta} \times \text{GE excreta})\}}{\text{FI}} \quad (1)$$

$$\text{AMEN diet} = \text{AME} - (\text{NR} \times \frac{1}{22}) \quad (2)$$

$$\text{NR} = (\text{FI} \times \text{N diet}) - (\text{Excreta} \times \text{N excreta}) \quad (3)$$

$$\text{AME of fat} = (\text{AMEN of test diet} - (\text{AMEN of basal diet} \times \text{Y})) / \text{X} \quad (4)$$

AME diet: انرژی قابل متابولیسم ظاهری

GE diet: انرژی خام جیره

GE excreta: انرژی خام فضولات

FI: مقدار خوراک مصرف شده

Excreta: مقدار فضولات تولید شده

AMEN diet: انرژی قابل متابولیسم ظاهری تصحیح شده

برای نیتروژن

N diet: نیتروژن جیره

N excreta: نیتروژن فضولات

NR: نیتروژن ابقا شده در بدن

۱/۲۲: انرژی هر گرم اسید اوریک

AME bsal diet: انرژی قابل متابولیسم جیره‌ی پایه

Y: درصد جیره‌ی پایه در جیره‌ی آزمایشی

1- Power house

2- Total excreta

3- Tallow

4- Monounsaturated fatty acid

5- Polyunsaturated fatty acid

6- Differential centrifugation

7- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

8- Mitochondrial Membrane Potential

جدول ۱- اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیب شیمیایی جیره‌ی پایه در آزمایش نخست (درصد جیره)

Table 1. Ingredients and chemical composition of the basal diet fed in experiment 1 (percentage of diet)	
۶۹/۹۰	ذرت
۲۶/۴۰	کنجاله‌ی سویا
۱/۵۱	کربنات کلسیم
۱/۱۲	DCP
۰/۳۷	نمک
۰/۲۵	مکمل ویتامینی ^۱
۰/۲۵	مکمل مواد معدنی ^۲
۰/۰۹	متیونین
۰/۰۵	لیزین
۰/۰۶	ماسه
۱۰۰	کل
ترکیبات محاسبه شده	
۲۹۰۰	انرژی قابل متابولیسم
۱۷/۰۸	پروتئین خام
۰/۹۰	کلسیم
۰/۴۵	فسفر قابل دسترس
۰/۱۶	سدیم
۰/۹۰	لیزین قابل هضم
۰/۷۱	متیونین + سیستین قابل هضم
۰/۷۶	ترئونین قابل هضم

۱- هر کیلوگرم از مکمل ویتامینی شامل: ۸۷,۵۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۲۵,۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۲۲۵ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۲۵ میلی‌گرم ویتامین K3، ۱۲/۵ میلی‌گرم ویتامین B1، ۱۲/۵ میلی‌گرم ویتامین B9، ۲/۵ میلی‌گرم ویتامین H2، ۸۲/۵ میلی‌گرم ویتامین B2، ۱۲/۵ میلی‌گرم ویتامین B3، ۳۷۵ میلی‌گرم ویتامین B5، ۳۷/۵ میلی‌گرم ویتامین B6، ۰/۱۸۷ میلی‌گرم ویتامین B12، ۶۲۵ میلی‌گرم کولین کلراید بود.
 ۲- هر کیلوگرم از مکمل معدنی شامل: ۱۲۵۰ میلی‌گرم منگنز، ۶۲۵ میلی‌گرم آهن، ۱۲۵۰ میلی‌گرم روی، ۱۲۵ میلی‌گرم مس، ۱۲/۵ میلی‌گرم ید و ۲/۵ میلی‌گرم سلنیوم بود.

اندازه‌گیری غلظت گلوکوتایون احیا در میتوکندری‌های جدا شده

برای اندازه‌گیری غلظت گلوکوتایون (GSH) در میتوکندری‌های ایزوله از ماده‌ی دی تیو بیس- نیتروبنزوتیک اسید (DTNB) استفاده شد (۱۷) و شدت رنگ زرد تولید شده، با استفاده از Ultrospec® 2000 (Sweden) که یک اسپکتروفوتومتر فرابنفش است، در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شد.

روش تجزیه و تحلیل و مدل آماری طرح

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد (۲۱) و از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین‌ها در سطح معنی‌داری ۰/۰۱ استفاده شد.

اندازه‌گیری غلظت گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن^۱ (ROS) در میتوکندری‌های جدا شده

دی کلروفلورسئین دی استات (DCF-DA) به‌عنوان شناساگر^۲ تولید گونه‌های واکنش‌پذیر در میتوکندری‌های ایزوله مورد استفاده قرار گرفت (۷). این ماده در مواجهه با گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن به‌صورت DCF^۳ فلوروسنت در می‌آید، که شدت فلوروسنت تولید شده متناسب با تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) در محیط است. شدت فلوروسنت DCF با روش فلومتری و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر فلوروسنت Jasco® FP-750 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) در طول موج‌های ۴۹۰ نانومتر برای تحریک و ۵۲۰ نانومتر برای نشر اندازه‌گیری شد.

جدول ۲- اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی در آزمایش دوم (درصد جیره)

Table 2. Ingredients and chemical composition of the test diets fed in experiment 2 (percentage of diet)

گروه‌های آزمایشی				ترکیب جیره
روغن سویا	روغن زیتون	روغن نارگیل	چربی گاو	
۶۱/۳۴	۶۱/۸۵	۶۰	۵۹/۲۳	ذرت
۳۱/۳۰	۳۱/۱۹	۳۱/۵۳	۳۱/۶۷	کنجاله‌ی سویا
۳/۸۹	۳/۳۹	۴/۹	۵/۵۲	روغن
۱/۲۲	۱/۲۳	۱/۲۲	۱/۲۲	کربنات کلسیم
۱/۴۲	۱/۴۲	۱/۴۲	۱/۴۲	DCP
۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۳۶	نمک
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	مکمل ویتامینی ^۱
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	مکمل مواد معدنی ^۲
۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۰۷	متیونین
۰/۰۱	۰	۰/۰۱	۰/۰۱	ماسه
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	کل
				ترکیبات محاسبه شده
۳۱۰۰	۳۱۰۰	۳۱۰۰	۳۱۰۰	انرژی قابل متابولیسم
۱۸/۴۰	۱۸/۴۰	۱۸/۴۰	۱۸/۴۰	پروتئین خام
۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۸۷	کلسیم
۰/۴۶	۰/۴۶	۰/۴۶	۰/۴۵	فسفر قابل دسترس
۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	سدیم
۱/۱۸	۱/۱۸	۱/۱۸	۱/۱۸	آرزئین قابل هضم
۰/۹۷	۰/۹۸	۰/۹۸	۰/۹۸	لیزین قابل هضم
۰/۶۷	۰/۶۷	۰/۶۷	۰/۶۷	متیونین + سیستین قابل هضم
۰/۶۹	۰/۶۹	۰/۶۹	۰/۷۰	ترئونین قابل هضم
۰/۲۶	۰/۲۶	۰/۲۶	۰/۲۶	تریپتوفان قابل هضم

هر کیلوگرم از مکمل ویتامینی شامل: ۸۷,۵۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۲۵,۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D₃، ۲۲۵ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۲۵ میلی‌گرم ویتامین k₃، ۲۲/۵ میلی‌گرم ویتامین B₁، ۱۲/۵ میلی‌گرم ویتامین B₆، ۸۲/۵ میلی‌گرم ویتامین B₂، ۱۲/۵ میلی‌گرم ویتامین B₃، ۳۷۵ میلی‌گرم ویتامین B₅، ۳۷/۵ میلی‌گرم ویتامین B₆، ۰/۱۸۷ میلی‌گرم ویتامین B₁₂، ۲/۵ میلی‌گرم بیوتین و ۶۲۵ میلی‌گرم کولین کلراید بود. هر کیلوگرم از مکمل معدنی شامل: ۱,۲۵۰ میلی‌گرم منگنز، ۶۲۵ میلی‌گرم آهن، ۱۲۵۰ میلی‌گرم روی، ۱۲۵ میلی‌گرم مس، ۱۲/۵ میلی‌گرم ید و ۲/۵ میلی‌گرم سلنیوم بود.

نتایج و بحث

در آزمایش نخست، میانگین انرژی قابل متابولیسم شش تکرار برای چربی گاو، روغن نارگیل، روغن سویا و روغن زیتون به ترتیب ۷,۳۶۸، ۷,۸۴۴، ۸,۹۴۹ و ۹,۷۳۸ کیلوکالری در هر کیلوگرم به دست آمد. در ضمن، انرژی قابل متابولیسم جیره‌ی پایه هم ۲,۹۰۲ کیلوکالری در هر کیلوگرم به دست آمد که تنها ۰/۰۲ کیلوکالری در هر کیلوگرم با انرژی محاسبه شده در فرمول جیره‌ی پایه تفاوت داشت. یافته‌های آزمایش دوم در جدول ۳ آمده است. بیشترین فعالیت دهیدروژنازها (سنجش MTT) در گروه‌هایی که چربی گاو و روغن نارگیل (به ترتیب دارای اسیدهای چرب اشباع

بلندزنجیر و متوسط‌زنجیر) مصرف کرده بودند، مشاهده شد ($P < 0/01$). بیشترین پتانسیل غشا در گروه چربی گاو به ثبت رسید ($P < 0/01$) و پس از آن، گروه مصرف کننده‌ی روغن نارگیل قرار داشت که با دو گروه دیگر (که اسیدهای چرب غالب آن‌ها ناشباع بودند) تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P < 0/01$). غلظت گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن در گروه‌های مصرف کننده‌ی روغن سویا و روغن زیتون در مقایسه با دو گروه دیگر یعنی چربی گاو و روغن نارگیل که اسیدهای چرب غالب آن‌ها از نوع اشباع است، به‌طور معنی‌داری بیشتر ($P < 0/01$) و غلظت گلوکاتیون احیا به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($P < 0/01$).

جدول ۳- اثر منابع چربی بر برخی از سنج‌های میتوکندری‌های جگر جوجه‌های گوشتی در شرایط تنش گرمایی

Table 3. Effects of fat sources on some mitochondrial parameters of liver of heat stressed-broilers

گلوکاتیون	ROS	پتانسیل غشا	سنجش MTT (واحد در هر میلی‌گرم پروتئین میتوکندری)	سنجش MTT (واحد در هر میلی‌گرم پروتئین میتوکندری)
(نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین میتوکندری)	(شدت فلورسنت)	(شدت فلورسنت)		
۰/۲۱۱۳ ^c	۷۳۴۵ ^a	۸۳۵۱۳ ^a	۰/۱۰۸۹ ^a	چربی گاو
۰/۳۰۱۴ ^d	۶۷۵۸۶ ^d	۶۱۹۵۷ ^d	۰/۱۱۵۳ ^b	روغن نارگیل
۰/۳۰۷۹ ^d	۵۰۷۷۸ ^c	۵۱۶۱۱ ^c	۰/۰۹۰۱ ^d	روغن سویا
۰/۳۶۰۶ ^a	۵۰۰۹۲۰ ^c	۴۹۷۱۲ ^c	۰/۰۲۱۰ ^c	روغن زیتون
۰/۰۱۳۸۸	۲۴۵۸	۳۴۸۳	۰/۰۰۷۹	SEM
<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	معنی‌داری

abc میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ستون، از نظر آماری متفاوت‌اند.

ROS: گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن

میتوکندری‌های زنده مورد متابولیسم قرار می‌گیرد و نتیجه‌ی آن با روش‌های نورسنجی قابل سنجش است. بنابراین، مقدار متابولیسم MTT، می‌تواند شاخصی از عملکرد و سلامت

سنجش MTT که در واقع فعالیت کمپلکس II زنجیره‌ی انتقال الکترون را نشان می‌دهد، گویای زنده‌مانی و کارکرد درست میتوکندری است. رنگ MTT توسط

گرما به روش نالرزشی^۵ در ماهیچه‌های اسکلتی، دمای بدن خود را افزایش دهند (۶). در این راستا، نخستین بار ریمبولت و همکارانش وجود پروتئینی از خانواده‌ی UCPها را در ماهیچه‌ی اسکلتی اردک‌های مواجه شده با تنش سرمایی گزارش نمودند (۱۴). این پروتئین با UCP2 و UCP3 دما را پستانداران، ۷۰ درصد مشابهت در الگوی اسیدآمینه‌ها دارد (۱۴). پس از آن، پژوهشگران دیگری هم افزایش بیان avUCP mRNA را در جوجه‌های گوشتی (۲۷) و اردک (۱۷) در شرایط تنش سرمایی گزارش نمودند که نشان از نقش این پروتئین در تولید گرما در درون تنی دارد. البته وظیفه‌ی avUCP محدود به گرم‌زایی نیست و چندین گزارش از آنتی‌اکسیدان بودن این پروتئین وجود دارد (۱۲، ۱۳). بنابراین، avUCP به‌عنوان تنها پروتئین جدا کننده در پرندگان، می‌تواند تمام کنش‌های منتسب به UCPها در پستانداران را انجام دهد.

در این راستا، گزارش شده است که ۲۰ تا ۲۵ درصد نرخ متابولیسم پایه به‌خاطر نشت پروتون میتوکندریایی ناشی از پروتئین‌های جداکننده است (۱۹). بنابراین، گرم‌زایی UCPها در تنظیم دمای بدن و یا گرم کردن بدن در شرایط دمایی سرد سودمند است؛ حال این پرسش به ذهن می‌آید که عملکرد این پروتئین‌ها در شرایط دمای محیطی گرم آیا می‌تواند برای جانوران خطرناک باشد؟

پروتئین‌های جداکننده‌ی ۲ و ۳ (UCP2 و UCP3) پستانداران نقش واسطه‌ای در متابولیسم مواد به‌ویژه در مورد اسیدهای چرب دارند (۲۰، ۹). گزارش‌های زیادی از تغییر در بیان ژن‌های کد کننده‌ی UCP2 و UCP3 در اثر تغییر غلظت اسید چرب‌های آزاد خون در شرایطی همچون گرسنگی (۲) و یا خوردن غذای پرچرب (۱۸) در انسان و پستانداران دیگر وجود دارد. همچنین، گزارش‌هایی هم از همبستگی میان ترکیب اسیدهای چرب غشای میتوکندری و نشت پروتون در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی وجود دارد (۳، ۴). پیشنهاد شده است که آنیون اسیدهای چرب پس از ورود به ماتریکس میتوکندری، از راه UCPها از غشای درونی گذشته (برگشته) و به فضای میان دو غشا وارد می‌شوند و در آنجا به پروتون‌های انتقال یافته در جریان انتقال الکترون (زنجیره‌ی تنفسی) متصل شده و با سازوکاری به نام flip-flop یا بازچرخش اسیدهای چرب^۷، به ماتریکس برمی‌گردند (۹، ۲۳) و به این ترتیب با نشت پروتون به درون ماتریکس، سبب تولید گرما و کاهش تولید ATP می‌شوند؛ ("اثر مستقیم اسیدهای چرب بر گرم‌زایی میتوکندری")

پیش‌تر مشخص شده است که غذاهای پرچرب سبب افزایش بیان UCPها در میتوکندری‌ها می‌شوند (۱۸)؛ ("اثر نامستقیم اسیدهای چرب بر گرم‌زایی میتوکندری"). در آزمایشی که اثر چربی‌های مختلف را بر بیان و عملکرد UCPها در خرگوش بررسی کرده بود، مشخص شد که اسیدهای چرب ناشباع اثر بسیار بیشتری بر بیان UCPها دارند (۱). در آزمایش کنونی، گروه‌هایی که روغن سویا و یا روغن زیتون خورده بودند، کمترین پتانسیل غشا را داشتند. همچنین در این دو گروه در مقایسه با دو گروه دیگر که

میتوکندری باشد (۲۸). در این آزمایش، بیشترین مقدار این سنجش در گروه‌هایی که چربی گاو و روغن نارگیل مصرف کرده بودند، مشاهده شد که نشان‌دهنده‌ی سالم‌تر بودن میتوکندری‌ها در پرندگان این دو گروه در مقایسه با دو گروه دیگر است.

پتانسیل غشا، پتانسیل الکتروشیمیایی و تشکیل شده از پتانسیل الکتربیکی غشا و شیب غلظت پروتون در فضای میان دو غشای میتوکندری‌ها است. در پی متابولیسم مواد مغذی در مسیرها و چرخه‌های مرتبط با متابولیسم درون میتوکندری‌های سلول، اکسی‌والان‌های احیا (NADH و FADH₂) تولید می‌شوند. با ورود این اکسی‌والان‌ها به زنجیره‌ی انتقال الکترون میتوکندری، الکترون‌ها در طول زنجیره حرکت می‌کنند و با احیا شدن مولکول اکسیژن توسط این الکترون‌ها، آب تولید می‌شود. در روند حرکت الکترون‌ها در طول زنجیره، پروتون‌ها از کمپلکس‌های I، III و IV در طول زنجیره به فضای میان دو غشا پمپ می‌شوند. انباشت پروتون‌ها در فضای میان غشایی سبب ایجاد نیرویی به نام "نیروی محرک پروتونی"^۱ می‌شود؛ در اثر این نیرو، در برگشت پروتون‌ها از کمپلکس V زنجیره (که ATPsyntase هم نامیده می‌شود) به درون ماتریکس میتوکندری، با پیوند شدن فسفر و ADP، انرژی به شکل ATP فراهم می‌شود. با آگاهی از این که بیش از ۹۰ درصد ATP سلول‌ها در میتوکندری‌های آن‌ها تولید می‌شود (۱۱) و اگر میتوکندری نتواند از الکترون‌های منتقل شده از چرخه‌های مرتبط با متابولیسم مواد مغذی که در شکل اکسی‌والان‌های احیا به زنجیره‌ی انتقال الکترون می‌رسند، مقدار بیشینه‌ی ATP را تولید نماید، بر اساس قانون‌های ترمودینامیک باقی‌مانده‌ی انرژی پتانسیل موجود در خوراک مصرف شده، به گرما تبدیل خواهد شد.

در غشای درونی میتوکندری‌ها پروتئین‌هایی وجود دارند که با ایجاد راه میان‌بر سبب برگشت پروتون‌ها به درون ماتریکس از راهی به‌جز کمپلکس V می‌شوند (نشت پروتون^۲) که نتیجه‌ی آن کاسته شدن از نیروی پروتونی و در پی آن کاهش تشکیل ATP، اما افزایش تولید گرما است. این پروتئین‌ها را جدا کننده (UCP) نامیده‌اند. شناخته‌شده‌ترین UCPها، در میتوکندری سلول‌های بافت چربی قهوه‌ای نوزاد انسان و چوندگان و جانورانی که خواب زمستانی دارند شناسایی شده است که با تولید گرما (منحرف کردن پروتون‌ها از مسیر تولید ATP در زنجیره‌ی انتقال الکترون میتوکندری) به حفظ دمای طبیعی بدن کمک می‌کند (۱۶). در انسان پنج نوع از این پروتئین‌ها شناسایی شده‌اند. پروتئین جدا کننده‌ی کشف شده در ماهیچه‌ی سینه‌ی پرندگان، avUCP^۴ نامیده شده است (۱۴). آن‌گونه که از نام این پروتئین‌ها پیداست، کنش آن‌ها ایجاد اختلال در کار زنجیره‌ی انتقال الکترون میتوکندری و تبدیل انرژی موجود در اکسی‌والان‌های احیا (در واقع مواد مغذی انرژی‌زای مصرف شده) به گرما است (۸). این کار در شرایط سرما به حفظ دمای بدن کمک می‌کند.

پیش‌تر مشخص شده است که پرندگان هم می‌توانند همچون پستانداران در شرایط دمایی سرد، از راه سازوکار تولید

1- Proton motive force

2- Proton leak

3- Uncoupling protein

4- Avian UCP

5- Non-shivering thermogenesis (NST)

6- Rat

7- Fatty acid cycling

avANT در جگر با شرکت در فرآیند نشت پروتون سبب کاهش نیروی پروتونی شده و تولید ROSها را کاهش می‌دهند. مشاهده می‌شود که در آزمایش کنونی تولید ROSها در جگر گروه‌هایی که اسیدهای چرب اشباع مصرف کرده بودند، بیشتر است که می‌تواند ناشی از بیان کمتر پروتئین avANT در جگر آنها در مقایسه با دو گروه دیگر باشد. همچنین در پی افزایش تولید ROSها در گروهی که چربی گاوخورده بود، گلوکاتینون به شدت کاهش یافت که نشان‌دهنده‌ی اکسید شدن گلوکاتینون در مسیر خنثی‌سازی گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن است.

به‌طور کلی، یافته‌های این آزمایش نشان دادند که مصرف منابعی از چربی که اسیدهای چرب اشباع، به‌ویژه انواع بلندزنجیر در آنها بیشتر باشد، با کاهش تولید گرما در سلول، می‌تواند مقاومت پرند را به تنش‌های گرمایی محیطی افزایش داده و از کاهش تولید جلوگیری کند.

اسیدهای چرب چیره‌ی مصرفی آنها از نوع اشباع بود، مقدار ATP کمتر و بیان mRNAی ژن avUCP در ماهیچه‌ی سینه بیشتر بود (داده‌های منتشر نشده). این یافته‌ها بیانگر این است که اسیدهای چرب نااشباع نقش بیشتری در منحرف کردن پروتون‌ها از مسیر تولید ATP دارند که به دنبال آن سبب گرمایی درون سلول و بافت می‌شوند.

پروتئین جداکننده‌ی ۲ی پستانداران در کنترل تولید ROSها نیز نقش دارد. گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن، نقشی بسیار اساسی در روند فرآیند پیری^۱ دارند (۱۵). اصلی‌ترین محل تولید ROSها درون سلول، کمپلکس‌های I و III و زنجیره‌ی انتقال الکترون هستند. یکی از دلایل تشکیل ROSها در میتوکندری‌ها افزایش بیش از اندازه‌ی نیروی پروتونی در فضای میان‌غشایی است که در نهایت منجر به نشت الکترون و تولید یون سوپر اکسید می‌شود. در پستانداران UCP2 و در پرندگان احتمالاً avUCP در ماهیچه‌ی سینه و

منابع

1. Baracca, A., G. Sgarbi, G. Solaini and G. Lenaz. 2003. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. *BiochimicaetBiophysicaActa (BBA)-Bioenergetics*, 1606, (1): 137-146.
2. Bevilacqua, L., E.L. Seifert, C. Estey, M.F. Gerrits and M.E. Harper. 2010. Absence of uncoupling protein-3 leads to greater activation of an adenine nucleotide translocase-mediated proton conductance in skeletal muscle mitochondria from calorie restricted mice. *BiochimicaetBiophysicaActa (BBA)-Bioenergetics*, 1797(8): 1389-1397.
3. Brand, M.D., P. Couture and A.J. Hulbert. 1994. Liposomes from mammalian liver mitochondria are more polyunsaturated and leakier to protons than those from reptiles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 108(2): 181-188.
4. Brookes, P.S., J.A. Buckingham, A.M. Tenreiro, A.J. Hulbert and M.D. Brand. 1998. The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 119(2): 325-334.
5. Cawthon, D., R. McNew, K.W. Beers and W.G. Bottje. 1999. Evidence of mitochondrial dysfunction in broilers with pulmonary hypertension syndrome (Ascites): effect of t-butyl hydroperoxide on hepatic mitochondrial function, glutathione, and related thiols. *Poultry Science*, 78(1): 114-124.
6. Duchamp, C., F. Marmonier, F. Denjean, J. Lachuer, T.P. Eldershaw, J.L. Rouanet and A. Morales. 1999. Regulatory, cellular and molecular aspects of avian muscle nonshivering thermogenesis. *OrnisFennica*, 76(4): 151-166.
7. Gao, X., C.Y. Zheng, L. Yang, X.C. Tang and H.Y. Zhang. 2009. Huperzine A protects isolated rat brain mitochondria against β -amyloid peptide. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(11): 1454-1462.
8. Harper, M.E., R. Dent, S. Monemdjou, V. Bézaire, L. Van Wyck, G. Wells, G.N. Kavasar, A. Gauthier, F. Tesson and R. McPherson. 2002. Decreased mitochondrial proton leak and reduced expression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle of obese diet-resistant women. *Diabetes*, 51(8): 2459-2466.
9. Harper, M.E., A. Antoniou, L. Bevilacqua, V. Bezaire and S. Monemdjou. 2002. Cellular energy expenditure and the importance of uncoupling. *Journal of Animal Science*, 80, E-Suppl. (2): E90-E97.
10. Lawrence, C.B. and N.T. Davies. 1986. A novel, simple and rapid method for the isolation of mitochondria which exhibit respiratory control, from rat small intestinal mucosa. *BiochimicaetBiophysicaActa (BBA)-Bioenergetics*, 848(1): 35-40.
11. Lehninger, A.L., D.L. Nelson and M.M. Cox. 1993. *Principles Biochemistry*. 2nd ed. Worth Publishers, New York, NY.
12. Mujahid, A., K. Sato, Y. Akiba and M. Toyomizu. 2006. Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via downregulation of uncoupling protein content. *Poultry Science*, 85(7): 1259-1265.
13. Mujahid, A., Y. Akiba and M. Toyomizu. 2007. Acute heat stress induces oxidative stress and decreases adaptation in young white leghorn cockerels by downregulation of avian uncoupling protein. *Poultry Science*, 86(2): 364-371.
14. Raimbault, S., S. Dridi, F. Denjean, J. Lachuer, E. Couplan, F. Bouillaud, A. Bordas, C. Duchamp, M. Taouis, and D. Ricquier. 2001. An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochemical Journal*, 353(3): 441-444.

15. Ramsey, J., M.E. Harper, S.J. Humble, E.K. Koomson, J.J. Ram, L. Bevilacqua and K. Hagopian. 2005. Influence of mitochondrial membrane fatty acid composition on proton leak and H₂O₂ production in liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 140(1): 99-108.
16. Reitman, M.L., Y. He and D.W. Gong. 1999. Thyroid hormone and other regulators of uncoupling proteins. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 23.
17. Rey, B., D. Roussel, C. Romestaing, M. Belouze, J-L. Rouanet, D. Desplanches, B. Sibille, S. Servais and C. Duchamp. 2010. Up-regulation of avian uncoupling protein in cold-acclimated and hyperthyroid ducklings prevents reactive oxygen species production by skeletal muscle mitochondria. *BMC Physiology*, 10(1): 1.
18. Rodríguez, V.M., M.P. Portillo, C. Picó, M.T. Macarulla and A. Palou. 2002. Olive oil feeding up-regulates uncoupling protein genes in rat brown adipose tissue and skeletal muscle. *The American journal of Clinical Nutrition*, 75(2): 213-220.
19. Rolfe, D.F.S, J. M.B Newman, J.A. Buckingham, M.G. Clark and M.D. Brand. 1999. Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 276(3): C692-C699.
20. Rousset, S., M-C. Alves-Guerra, J. Mozo, B. Miroux, A-M. Cassard-Doulcier, F. Bouillaud and D. Ricquier. 2004. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*, 53, suppl. (1): S130-S135.
21. SAS. 2001. SAS 8.2. (Cary, NC, SAS Institute Inc).
22. Sefi, K., S. Yousefian and M.M., Ommati. 2017. Heat stress and animal productivity. 1th ed, Tak press, Tehran, Iran, 314 pp (In Persian).
23. Skulachev, V.P. 1991. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Letters*, 294(3): 158-162.
24. Strieleman, P.J., K.L. Schalinske and E. Shrago. 1985. Fatty acid activation of the reconstituted brown adipose tissue mitochondria uncoupling protein. *Journal of Biological Chemistry*, 260(25): 13402-13405.
25. Sylvester, P.W. 2011. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Drug Design and Discovery: Methods and Protocols*, 157-168.
26. Tancharoenrat, P., V. Ravindran, F. Zaefarian and G. Ravindran. 2013. Influence of age on the apparent metabolisable energy and total tract apparent fat digestibility of different fat sources for broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 186(3): 186-192.
27. Toyomizu, M., M. Ueda, S. Sato, Y. Seki, K. Sato and Y. Akiba. 2002. Cold induced mitochondrial uncoupling and expression of chicken UCP and ANT mRNA in chicken skeletal muscle. *FEBS Letters*, 529: 313-318.
28. Wang, C., N. Sadovova, H.K. Ali, H.M. Duhart, X. Fu, X. Zou and T.A. Patterson. 2007. L-carnitine protects neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neuronal apoptosis in rat forebrain culture. *Neuroscience*, 144(1): 46-55.

Effects of Different Fat Sources on Energetics and Redox Status of Liver Mitochondria of Broilers in Chronic Heat-Stress Condition

Kazem Seifi¹, Mansour Rezaei², Asadollah Teimouri Yansari³, Gholam Hossein Riazi⁴ and Mohammad Javad Zamiri⁵

1- Graduate Ph.D. Student, Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Sciences University, (Corresponding author: Kazem.seifi@gmail.com)

2 and 3- Professor and Associate Professor, Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Sciences University

4- Professor, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran

5- Professor, Department of Animal Science, Shiraz University

Received: August 19, 2016 Accepted: November 19, 2017

Abstract

Heat stress has adverse effects on livestock production, hence reducing benefits of them. With the viewpoint of reducing heat production within cells, an experiment was conducted to investigate the effects of different sources of fat on mitochondrial energetics of broilers in chronic heat-stress condition. The consumed fat included: a) tallow; as a source of long-chain fatty acids, b) coconut oil; as a source of short and medium-length-chain fatty acids, c) olive oil; as a source of monounsaturated fatty acid (MUFA) and d. soy oil; as a source of polyunsaturated fatty acid (PUFA). Broilers were under chronic heat stress (36 °C) from 32 to 42 d of the experiment. Broilers fed with tallow or coconut oil showed higher mitochondrial dehydrogenases activity, membrane potential and ROS production ($p < 0.01$) and lower glutathione concentration ($p < 0.01$) than those fed with olive oil or soy oil. The results suggest that in heat stress conditions using saturated fat sources especially those with long-chain fatty acids could help in reducing heat production in broilers.

Keywords: Broiler, Energetics, Fat, Mitochondria, Heat stress, Oxidation