نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۱، زمستان ۱۳۹۷
ص‌ص: ۳۹~۵۲

اثرات استفاده از سطوح مختلف آرد میوهٔ بلوط در جیرهٔ غذائی بر تغییرات وزن پانکراس و بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز پانکراس در جوجه‌های گوشتی

- **اسما مرادعلی‌پور** (نویسنده مسئول)
دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
- **مصطفی محقق دولت‌آبادی**
دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
- **محمد هوشمند**
استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

تاریخ دریافت : آبان ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش : بهمن ۱۳۹۶

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۷۵۴۰۰۱۲۸
Email: moradalipoor.a70@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2018.120131.1609

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز پانکراس و تغییرات وزن پانکراس در جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با سطوح مختلف آرد میوهٔ بلوط بود. بدین منظور سه تیمار غذایی (شاهد، ۱۵ درصد و ۲۰ درصد آرد میوهٔ بلوط) در قالب طرح کاملاً تصادفی از سن ۱ تا ۴۲ روزگی در اختیار جوجه‌های گوشتی قرار گرفت. در سنین ۲۱ و ۴۲ روزگی، تعداد ۳۶ قطعه جوجه‌ی گوشتی (۱۸ قطعه در هر سن، ۶ قطعه برای هر تیمار) کشتار گردید و وزن بدن و وزن پانکراس اندازه‌گیری شد. سپس RNAاز بافت پانکراس استخراج و ساخت cDNA انجام شد. بیان ژن با استفاده از Real Time PCR و آنالیز داده‌ها با نرم‌افزارهای REST و SAS انجام شد. نتایج نشان داد که بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز در جوجه‌های گوشتی که به مدت ۲۱ روز با تیمار ۱۵ درصد میوه بلوط تغذیه شده بودند، نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۵). در سن ۴۲ روزگی، بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز در جوجه‌های تغذیه‌شده با جیرهٔ حاوی ۲۰ درصد میوهٔ بلوط نسبت به جوجه‌های تیمار ۱۵ درصد، به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود (P<۰/۰۵). وزن نسبی پانکراس نیز در جوجه‌هایی که به مدت ۴۲ روز از تیمار ۲۰ درصد استفاده کرده بودند، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). به‌طور کلی استفاده از میوهٔ بلوط به‌عنوان جایگزین ذرت، باعث تغییر در بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز، کاهش وزن بدن و افزایش وزن نسبی پانکراس شد و این تأثیرات به مقدار خوراک مصرفی، درصد بلوط مورد استفاده، طول دوره استفاده از آن و سایر عوامل بستگی دارد. مصرف غذای حاوی ترکیبات فنلی (میوه بلوط) بیان ژن‌ها را تغییر می‌دهد که به منظور درک مکانیسم‌های مولکولی عملکرد پلی‌فنل‌ها نیاز به انجام تحقیقات بیشتر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، ترکیبات فنلی، جوجه گوشتی، کربوکسی‌پپتیداز، هایپرتروفی پانکراس

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 121 pp: 39-52

Effects of Different Levels of oak acorn in the diet on Pancreatic Weight and expression of pancreatic Charboxypeptidase gene in Broiler Chickens

By: A. Moradalipour[1]*, M. Muhaghegh-Dolatabady[2], M. Houshmand[3]
1. M.Sc Graduated of Genetics and Animal Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture Science, University of Yasouj.
2. Associate professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture Science, University of Yasouj.
3. Assistant professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture Science, University of Yasouj.

Received: November 2017 **Accepted: February 2018**

The aim of this study was to evaluate the expression of pancreatic Charboxypeptidase gene and changes of pancreas weight of broiler chickens fed with different levels of oak acorn. For this purpose, three diets (control, 15% and 20% oak acorn) were fed to broilers during 1 to 42 days of age. On days 21 and 42, body weight and pancreatic weight of 36 broiler chickens (18 birds in each age, 6 birds /treatment) were measured. Then, the total RNA was extracted from the pancreatic tissue and cDNA was synthesized. Gene expression was performed using Real Time PCR and data were analyzed with the REST and SAS software. The gene expression results showed that mRNA expression levels of Charboxypeptidase gene were significantly higher in birds fed diet containing 15 percent oak acorn for 21 days compared to the control group ($P<0.05$). On day 42, the gene expression in chickens fed with diet containing 20% oak was significantly lower in compared to 15% oak diet ($P<0.05$). Pancreas relative weight was significantly increased in broilers fed with diet containing 20% oak acorn on day 42 ($P<0.05$). Generally, the substitution of dietary corn with oak acorn led to a change in expression of Charboxypeptidase gene, reduction in body weight and an increase in the relative weight of the pancreas, and these effects depend on the feed intake, the percentage of oak acorn, time period of its use and other factors. The consumption of food containing phenolic compounds (oak acorn) can alter genes expression, which requires more research to understand the molecular mechanism of polyphones function.

Key words: Broiler, Carboxypeptidase, Gene expression, Pancreatic hypertrophy, Phenolic compounds

مقدمه

پرورش طیور بخش جدایی ناپذیر صنعت دام در جهان می‌باشد و سهم قابل توجهی از نیاز پروتئینی جهان از این طریق تأمین می‌شود (Conolly, 2012). اما هزینه‌های بالای خوراک در صنعت طیور که حدود ۷۰ درصد کل هزینه‌های یک واحد تولیدی را شامل می‌شود، این صنعت را با مشکل مواجه کرده است. همچنین وارداتی بودن ذرت و سویا که از اقلام خوراکی عمده در تغذیهٔ طیور هستند و نیز رقابت بین انسان و طیور در استفاده از دانهٔ غلات، متخصصان تغذیه را بر آن داشته تا به بررسی خوراک‌های جدید بپردازند (Sharif و همکاران، ۲۰۱۲). یکی از خوارک‌هایی که اخیراً پروش‌دهندگان جوجه‌های گوشتی از آن به عنوان یک منبع انرژی در تغذیهٔ طیور استفاده می‌کنند، میوهٔ درخت بلوط می‌باشد که حاوی مقادیر قابل توجهی نشاسته و چربی است (Saffarzadeh و همکاران، ۱۹۹۹). طی پژوهشی، جایگزینی بلوط تا سطح ۲۲/۵ درصد با ذرت در جیرهٔ جوجه‌های

گوشتی، باعث بهبود ضریب تبدیل غذایی، افزایش وزن و افزایش مصرف خوراک گردید (Bojarpour و همکاران، ۲۰۱۰). این میوه علاوه بر ترکیبات تغذیه‌ای مهم، دارای ترکیبات فنلی نظیر تانن‌ها (گالیک اسید و الاجیک اسید) می‌باشد که خاصیت ضد تغذیه‌ای داشته و از مواد محدود کننده‌ی مصرف میوهٔ بلوط می‌باشند. مصرف این ترکیبات می‌تواند فرآیند گوارش را تحت تأثیر قرار دهد (McDougall و همکاران، ۲۰۰۸). وجود تانن‌ها در جیرهٔ طیور منجر به ضخیم شدن چینه‌دان، زخمی‌شدن دوازدهه و سائیدگی جداره‌های داخلی دستگاه گوارش شده است که در نتیجه باعث کاهش هضم مواد خوراکی می‌شود (Makkar, 2003).

پروتئین‌ها که از مهمترین اجزاء خوراک هستند، توسط پپسین به پلی‌پپتیدها شکسته شده و سپس توسط آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسینو الاستاز به پپتیدهایی با انتهای C تبدیل و در نهایت توسط کربوکسی‌پپتیدازها به اسیدهای آمینه و الیگوپپتیدها شکسته می‌شوند (Stevens and Hume, 1995). ترکیبات فنلی با اتصال به گروه‌های دارای بار مثبت موجود در ساختار پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه، کاتیون‌های چند ظرفیتی و مواد معدنی از قبیل آهن، روی و کلسیم، باعث کاهش ارزش تغذیه‌ای خوراک می‌شوند (Khandelwal و همکاران، ۲۰۰۹). این ترکیبات از طریق تعامل با پروتئین‌ها، ساختار، عملکرد و کیفیت آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Yuksel و همکاران، ۲۰۱۰). تانن‌ها که ترکیبات فنلی با وزن مولکولی بالا می‌باشند، با پروتئین‌های داخلی بدن نظیر آنزیم‌های دستگاه گوارش باند می‌شوند و در نتیجه فعالیت آن‌ها را مهار کرده و مانع هضم پروتئین‌ها و سایر ماکرومولکول‌ها نظیر نشاسته می‌شوند (Rawel و همکاران، ۲۰۰۳). تانن این پتانسیل را دارد که ۱۲ برابر وزن خودش پروتئین‌ها را رسوب دهد (Jansman, 1993). بنابراین با اتصال به پروتئین، نشاسته و سایر ماکرومولکول‌ها، مقاومت آن‌ها را نسبت به حمله آنزیم‌های گوارشی افزایش داده و با این عمل قابلیت هضم این ماکرومولکول‌ها را کاهش می‌دهد (Mahmood و همکاران، ۲۰۰۸). همچنین با تشکیل کمپلکس تانن-آنزیم، فعالیت آنزیم‌های گوارشی کاهش یافته (Yuste و همکاران، ۱۹۹۲؛ Mahmood و همکاران، ۲۰۰۷؛ Mansoori و همکاران، ۲۰۰۷) و پانکراس با فعالیت زیاد خود، بزرگتر می‌شود (Ahmed و همکاران، ۱۹۹۱؛ Mahmood and Smithard, 1993؛ Mahmood و همکاران، ۱۹۹۷). ترکیبات فنلی تنظیم‌کننده‌ی فعالیت آنزیم‌های هدف و نیز تنظیم‌کننده‌ی بیان ژن هستند و می‌توانند باعث تغییر فعالیت‌های آنزیمی و رونویسی شوند (Kumari and Jain, 2012).

نوتریژنومیک (ژنومیک تغذیه‌ای)، اثر جیره و اجزای تشکیل‌دهنده‌ی آن را روی بیان ژن‌ها و چگونگی رونویسی DNA به mRNA و سپس تولید پروتئین بررسی می‌کند. همچنین این علم با بررسی اثر تغذیه بر اختلالات ژنتیکی می‌تواند به تغییر جیرهٔ غذایی کمک کند. یکی از روش‌های رایج برای بررسی تغییرات بیان ژن‌ها در بافت‌های مختلف، Real Time PCR می‌باشد که امروزه این تکنیک به میزان گسترده‌ای برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Dhar و همکاران، ۲۰۰۹؛ Weyrich و همکاران، ۲۰۱۰). با توجه به اهمیت پانکراس در تولید آنزیم‌های گوارشی و نیز نقش آنزیم کربوکسی‌پپتیداز در هضم پروتئین‌ها، تغییرات بیان این ژن در بافت پانکراس جوجه‌های گوشتی که به مدت ۲۱ و ۴۲ روز از جیره‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد آرد میوهٔ بلوط استفاده کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. انتظار می‌رود با توجه به این نتایج بتوان مناسب‌ترین مقدار میوهٔ بلوط را به عنوان جایگزین بخشی از ذرت جیره به پرورش‌دهندگان جوجه‌های گوشتی توصیه کرد تا از هایپرتروفی پانکراس (افزایش اندازهٔ سلول‌های پانکراس)، تغییر در بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز و به دنبال آن اختلال در هضم پروتئین و مواد مغذی جلوگیری کرد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، تعداد ۲۶۴ قطعه جوجهٔ گوشتی سویهٔ کاب ۵۰۰ در ۳ تیمار آزمایشی با ۴ تکرار و هر تکرار شامل ۲۲ قطعه جوجهٔ یک‌روزه (نر و ماده) در قالب طرح کامل تصادفی مورد بررسی

قرار گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار شاهد (جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با جیرهٔ بر پایهٔ ذرت-کنجاله سویا و بدون میوه بلوط) و تیمار ۱۵ و ۲۰ درصد (جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد آرد میوهٔ بلوط) بود. میزان ماده خشک، پروتئین، فیبر و تانن (مجموع تانن متراکم و تانن قابل هیدرولیز) موجود در میوهٔ بلوط مورد استفاده در این پژوهش به ترتیب ۹۱/۳۷، ۶/۵۳، ۵/۵۱ و ۶/۰۸ درصد بود. تنظیم جیره‌های آغازین (۱ تا ۲۱ روزگی) و پایانی (۲۲ تا ۴۲ روزگی) با استفاده از نرم‌افزار UFFDA و بر اساس توصیه‌های NRC (۱۹۹۴)، صورت گرفت (جدول ۱).

جدول ۱- اجزای تشکیل دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره‌های مورد استفاده در آزمایش

ترکیبات جیره (درصد)	آغازین[1]	پایانی[1]
ذرت	۵۶/۰۴	۶۱/۸۹
کنجاله سویا	۳۷/۱۷	۳۱/۲۴
کربنات کلسیم	۱/۲۵	۱/۳۶
دی کلسیم فسفات	۱/۶۲	۱/۱۵
روغن گیاهی	۲/۸۶	۳/۴۶
مکمل ویتامینه[2]	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل معدنی[3]	۰/۲۵	۰/۲۵
نمک	۰/۴۲	۰/۳۲
DL- متیونین	۰/۱۴	۰/۰۶
لیزین	۰	۰/۰۲
ترکیب مواد مغذی جیره		
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری در کیلوگرم جیره)	۲۹۵۰	۳۰۵۰
پروتئین خام (درصد)	۲۱/۲۰	۱۹/۰۶
کلسیم (درصد)	۰/۹۳	۰/۸۶
فسفر (درصد)	۰/۴۲	۰/۳۳
سدیم (درصد)	۰/۱۸	۰/۱۴
متیونین (درصد)	۰/۴۶	۰/۳۶
لیزین (درصد)	۰/۹۹	۰/۹۵

۱. در جیره‌های حاوی میوهٔ بلوط، این خوراک به میزان ۱۵ و ۲۰ درصد جیره، جایگزین ذرت شد بدون اینکه در درصد سایر مواد خوراکی جیره، تغییری داده شود.

۲. این مکمل در هر کیلوگرم جیره، مقادیر زیر را تأمین می‌نماید: ویتامین A: واحد بین‌المللی (IU) ۱۸۰۰۰، ویتامین D3: IU ۴۰۰۰، ویتامین E: ۷۲ میلی‌گرم، ویتامین K3: ۴ میلی‌گرم، ویتامین B1: ۳/۵۵ میلی‌گرم، ویتامین B2: ۱۳/۲ میلی‌گرم، ویتامین B6: ۵/۸۸ میلی‌گرم، ویتامین B9: ۲ میلی‌گرم، ویتامین B12: ۰/۰۳ میلی‌گرم، پانتوتنات کلسیم: ۱۹/۶ میلی‌گرم، نیاسین: ۵۹/۴ میلی‌گرم، کلرید کولین: ۱گرم.

۳. این مکمل در هر کیلوگرم جیره، مقادیر زیر را تأمین می‌نماید: منگنز: ۶۵ میلی‌گرم، روی: ۵۵ میلی‌گرم، آهن: ۵۰ میلی‌گرم، مس: ۸ میلی‌گرم، ید: ۱/۹۸۵ میلی‌گرم، سلنیوم: ۰/۴ میلی‌گرم.

در پایان دورهٔ آغازین (۲۱ روزگی) و همچنین پایان دورهٔ آزمایش (۴۲ روزگی)، از هر تیمار به‌طور تصادفی شش قطعه جوجه (نر و ماده) انتخاب و پس از اندازه‌گیری وزن بدن، کشتار گردیدند. سپس بافت پانکراس هر جوجه به‌طور کامل جدا و وزن گردید. مراحل استخراج RNA از نمونه پودر شده بافت پانکراس (۱۰۰ میلی‌گرم) با استفاده از کیت استخراج RNX-Plus شرکت سیناژن و طبق دستورالعمل شرکت انجام گرفت. سپس برای اطمینان از عدم حضور DNA، RNA استخراج شده با آنزیم DNase I تیمار گردید. کمیت و کیفیت RNA استخراجی نیز با استفاده از اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. سنتز cDNA با استفاده از مسترمیکس لیوفیلیزه بایونیر شرکت تکاپوزیست انجام شد. حجم نهایی میکروتیوب‌های حاوی مسترمیکس با ۲۰ پیکومول از آغازگر تصادفی هگزامر، ۶ میکرولیتر از نمونه‌های RNA و آب عاری از RNase به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تحت شرایط دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ دقیقه و دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه به منظور سنتز cDNA انجام شد. از ژل آگارز ۱ درصد نیز به منظور بررسی کیفیت cDNA سنتز شده استفاده شد.

در تکنیک PCR کمی به منظور کمی‌سازی داده‌های حاصل از اندازه‌گیری سطوح mRNA، می‌توان میزان mRNA ژن هدف را نسبت به میزان mRNA یک ژن مرجع داخلی مورد سنجش قرار داد. بنابراین در این مطالعه دو ژن مرجع β-Actin و YWHAZ مورد استفاده قرار گرفت و از نرم‌افزار Bestkeeper 2004 (Pfaffl و همکاران، ۲۰۰۴) به منظور آنالیز پایداری بیان ژن‌های مرجع استفاده گردید. مشخصات آغازگرها در جدول ۲ آمده است. آغازگرهای ژن کربوکسی‌پپتیداز با استفاده از توالی mRNA این ژن در پایگاه (National Center for Biotechnology Information) NCBI و توسط نرم‌افزار primer 3 طراحی شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار BLAST از یکتا بودن محل اتصال جفت آغازگرها اطمینان حاصل شد. آغازگرهای ژن‌های YWHAZ و Actin-β، از مقاله Yang و همکاران (۲۰۱۳) اقتباس شده است.

جدول۲- مشخصات آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در واکنش Real Time PCR

نام آغازگر	شماره دستیابی	توالی آغازگرها ('۳-'۵)	طول قطعه (bp)
β-Actin	NM-205518	CTGTGCCCATCTATGAAGGCTA ATTTCTCTCTCGGCTGTGGTG	۱۳۹
YWHAZ	NM-001031343	TCCACCACGACAGACCA CCAGCCTTCCAACTTCC	۳۵۸
Carboxypeptidase	NM-204584	GGAACCATCGACTGGACCTA CAGTAGAGGTGACCCCGTGT	۱۷۳

به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز، از واکنش PCR در زمان حقیقی استفاده شد که این کار با استفاده از مسترمیکس سیناژن Q-RT-PCR و با استفاده از دستگاه Real Time PCR, BIO RAD CFX, 96 انجام شد. مواد این واکنش برای هر نمونه حاوی ۴ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر رفت با غلظت ۱۰ پیکومول، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول، ۳ میکرولیتر آب DNase Free و ۲ میکرولیتر cDNA بود (حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر). برنامه‌ی حرارتی مورد استفاده برای واکنش Real time PCR ژن‌های مرجع شامل مرحله واسرشته سازی با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۴۵ چرخه در شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۳۰ ثانیه (واسرشته سازی)، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (اتصال آغازگرها)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (بسط آغازگرها) می‌باشد (Yang و همکاران، ۲۰۱۳). برنامه حرارتی برای ژن کربوکسی‌پپتیداز نیز شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۱ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد با ۴۰ چرخه و در مرحلهٔ تفکیک نهایی (جهت ترسیم منحنی ذوب) در شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه بود.

به منظور محاسبه بازده PCR، از مخزن ژن حاوی کل cDNA، ۶ رقت در دو تکرار تهیه شد و نمودار استاندارد توسط دستگاه رسم شد. سپس بازده ژن مرجع و ژن هدف با استفاده از نرم‌افزار REST, 2009, V2.0.13 و از طریق فرمول $E=10^{[-1/s]}-1$ (Kubista و همکاران، ۲۰۰۶) محاسبه شد. در این فرمول S نشان‌دهنده‌ی شیب خط می‌باشد. مقایسهٔ بیان ژن در جوجه‌های گوشتی با استفاده از برنامه REST (Pfaffl و همکاران، ۲۰۰۲) و بر اساس تفاوت n- برابری بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز در جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با سطح ۱۵ و ۲۰ درصد آرد میوهٔ بلوط نسبت به جوجه‌های گوشتی گروه شاهد محاسبه گردید. این نرم‌افزار برای بررسی تفاوت بیان mRNA، از فرمول زیر استفاده می‌کند (Pfaffl، ۲۰۰۱).

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{target})^{\Delta Ct_{target}(MEAN_{control}-MEAN_{sample})}}{(E_{reference})^{\Delta Ct_{reference}(MEAN_{control}-MEAN_{sample})}}$$

Ratio در این فرمول نشان‌دهنده‌ی مقایسه‌ی اختلاف بیان ژن‌ها در دو نمونه می‌باشد. E_{target} و E_{ref} به ترتیب بازده PCR ژن هدف و ژن مرجع و $CT\Delta$ اختلاف Ct کنترل با نمونه هدف می‌باشد.

بیان ژن در هر تیمار با استفاده از نرم‌افزار SAS و رویه‌ی ANOVA نیز انجام شد (SAS, Institute, 2003). تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با مدل $Y=\mu+A_i+e_{ij}$ صورت گرفت که μ میانگین، A_i اثر تیمار و e_{ij} اثرات باقی‌مانده می‌باشد. مقایسهٔ میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. همچنین از نرم‌افزار SAS برای محاسبهٔ تغییرات وزن نسبی پانکراس استفاده شد.

نتایج و بحث

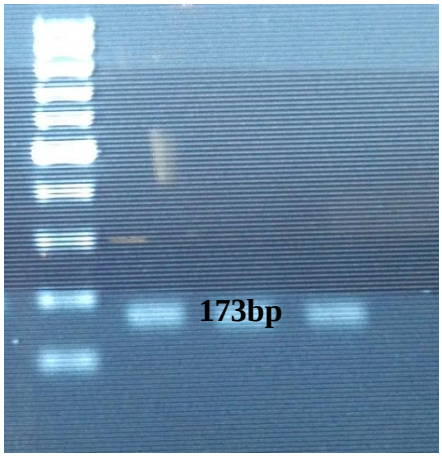
به منظور شناسایی ژن مرجع مناسب برای بافت پانکراس، نتایج حاصل از آنالیز ژن‌های مرجع با نرم‌افزار Bestkeeper 2004 در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- داده‌های توصیفی ژن‌های مرجع در سنین ۲۱ و ۴۲ روزگی

	۲۱ روزگی		۴۲ روزگی	
	YWHAZ	β-Actin	YWHAZ	β-Actin
تعداد داده‌ها	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸
میانگین هندسی (Cq)	۳۳/۷۴	۲۲/۵۷	۳۴/۲۵	۲۷/۸۲
میانگین حسابی (Cq)	۳۳/۸۰	۲۲/۶۱	۳۴/۳۰	۲۷/۸۳
کمترین داده (Cq)	۲۹/۸۵	۱۹/۵۷	۳۱/۲۲	۲۶/۰۱
بیشترین داده (Cq)	۳۷/۷۱	۲۵/۵۹	۳۷/۲۶	۲۹/۱۰
انحراف استاندارد (±Cq)	۱/۶۰	۰/۸۹	۱/۴۵	۰/۶۶
ضریب تغییرات (%Cq)	۴/۷۳	۳/۹۵	۴/۲۳	۲/۳۷
min [x-fold]	-۱۴/۸۴	-۸/۰۱	-۸/۱۹	-۳/۵۰
max [x-fold]	۱۵/۶۵	۸/۱۰	۸/۰۴	۲/۴۳
std dev [± x-fold]	۳/۰۳	۱/۸۶	۲/۷۳	۱/۵۸

ژن β-Actin، در هر دو دورهٔ ۲۱ و ۴۲ روزگی از انحراف استاندارد و ضریب تغییراتی پایینی برخوردار می‌باشد. بنابراین این ژن با کمترین تنوع (انحراف استاندارد کمتر از ۱)، بیان پایدارتری دارد (Pfaffl و همکاران، ۲۰۰۴). تفاوت بین مقدار min [x-fold] و max [x-fold] نشان‌دهندهٔ تفاوت بین کمترین حد بیان و بیشترین حد بیان داده‌های موجود در یک گروه نسبت به میانگین داده‌ها می‌باشد. ژن β-Actin با تفاوت بیان کمتر، دارای ثبات بیان بالاتری در شرایط آزمایشی (تیمارهای مختلف) بود. طبق این نتایج، β-Actin تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت، از این رو ژن مرجع مناسبی برای مطالعات بیان ژن‌های پانکراس می‌باشد. بنابراین از ژن β-Actin به منظور نرمال کردن داده‌های بیان ژن استفاده شد.

الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد انجام گرفت و تکثیر اختصاصی قطعه مورد نظر تأیید شد. (شکل ۱).



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن کربوکسی‌پپتیداز روی ژل آگارز (۱٪)، نشانگر M100

در این پژوهش بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز در جوجه‌های گوشتی که به مدت ۲۱ روز با جیرهٔ حاوی ۱۵ درصد آرد میوهٔ بلوط تغذیه شده بودند، نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P<0/05$) (جدول ۴).

جدول ٤- بیان نسبی ژن کربوکسی‌پپتیداز پانکراس در دو دورهٔ ۲۱ و ٤۲ روزگی

سن	تیمار	بیان	سطح احتمال	نتایج
۲۱ روزگی	۱۵ درصد نسبت به شاهد	۴/۲۴۶	۰/۰۱۷	افزایش بیان
	۲۰ درصد نسبت به شاهد	۲/۵۳۳	۰/۱۴۷	–
	۲۰ درصد نسبت به ۱۵ درصد	۰/۵۹۷	۰/۴۰۵	–
۴۲ روزگی	۱۵ درصد نسبت به شاهد	۱/۱۹۱	۰/۵۶۴	–
	۲۰ درصد نسبت به شاهد	۰/۶۳۷	۰/۲۰۶	–
	۲۰ درصد نسبت به ۱۵ درصد	۰/۵۳۵	۰/۰۳۹	کاهش بیان

شاهد: جیرهٔ شاهد بر پایهٔ ذرت-کنجاله سویا (بدون استفاده از بلوط)، ۱۵ درصد: جیرهٔ حاوی ۱۵ درصد آرد میوهٔ بلوط، ۲۰ درصد: جیرهٔ حاوی ۲۰ درصد آرد میوهٔ بلوط.

انتظار می‌رفت با بالا رفتن درصد میوهٔ بلوط و بیشتر بودن ترکیبات فنلی موجود در جیره، بیان ژن در این جوجه‌ها تغییرات بیشتری را نشان دهد، اما این تغییر در جوجه‌های تغذیه شده با تیمار ۲۰ درصد (سن ۲۱ روزگی) مشاهده نشد. بدین منظور مصرف خوراک جوجه‌ها در تیمارهای مختلف و در دوره آغازین (۱ تا ۲۱ روزگی) و کل دوره (۱ تا ۴۲ روزگی) بررسی شد (جدول ۵). نتایج نشان داد که در دوره آغازین، جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با تیمار ۱۵ درصد، مصرف خوراک بالاتری نسبت به جوجه‌های گوشتی تیمار ۲۰ درصد داشتند (P<۰/۰۵) که با نتایج حاصل از مطالعات دیگر، مطابقت دارد (Houshmand و همکاران، ۲۰۱۵).

جدول ۵- اثر سطوح مختلف میوهٔ بلوط بر مصرف خوراک جوجه‌های گوشتی

تیمارهای آزمایشی	مصرف خوراک (g)	
	۲۱-۱ روزگی	۴۲-۱ روزگی
شاهد	۹۶۶^{ab}	۳۶۶۸
۱۵ درصد	۹۸۴^{a}	۳۸۲۹
۲۰ درصد	۹۳۰^{b}	۳۵۱۹
SEM	۱۴	۱۱۳
P value	۰/۰۴	۰/۵۲

شاهد: جیرهٔ شاهد بر پایهٔ ذرت-کنجاله سویا (بدون استفاده از بلوط)، ۱۵ درصد: جیرهٔ حاوی ۱۵ درصد آرد میوهٔ بلوط، ۲۰ درصد: جیرهٔ حاوی ۲۰ درصد آرد میوهٔ بلوط.
a-b: در هر ستون تفاوت ارقام با حروف نامشابه، معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

پژوهش‌گران دلیل افزایش مصرف خوراک حاوی تانن را تلاش جوجه‌ها برای جبران کمبود انرژی ناشی از مصرف این جیره‌ها بیان نموده‌اند (Nyachoti و همکاران، ۱۹۹۶). بنابراین می‌توان گفت که با افزایش مصرف خوراک حاوی تانن در جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با تیمار ۱۵ درصد، بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز در این تیمار افزایش یافته است. به‌طور کلی تانن‌ها باعث افزایش تولید آنزیم‌های گوارشی توسط پانکراس می‌شوند و مهار فعالیت آنزیم‌ها در روده رخ می‌دهد (Griffiths and Moseley, 1980). همچنین می‌توان این‌گونه تفسیر نمود که با افزایش مصرف خوراک، پروتئین بیشتری دریافت شده و به دنبال آن بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز نیز افزایش یافته است. افزایش فعالیت پروتئاز پانکراس با افزایش پروتئین غذا مشاهده می‌شود (Harmon, Swanson and 2002). به‌طور کلی بیان ژن به وسیله‌ی عوامل محیطی و با تغییر در غذای مصرفی تنظیم می‌شود (Scheele and Kern, 1989) و میزان ترشح هر کدام از آنزیم‌های هضمی، نوع و میزان ماده مصرفی را در خوراک تخمین می‌زنند. در مراحل اولیه زندگی تولید آنزیم های گوارشی ناقص می باشد، بنابراین افزایش در بیان ژن آنزیم‌های گوارشی و افزایش ترشح آنزیم‌های هضمی، موجب بهبود عملکرد جوجه‌ها می‌شود. تحقیقات صورت گرفته توسط Lee و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که ترکیبات ضد میکروبی و ترکیبات فنلی مانند ترپن‌ها و

تیمول (در سطح ۱۰۰ پی‌پی‌ام) در جیره جوجه‌های گوشتی، ترشحات آنزیمی پانکراس را با توجه به کامل نبودن فعالیت آنزیم‌های هضمی در جوجه‌های کم سن افزایش می‌دهد. Noy و Sklan (۱۹۹۵) گزارش کردند که مقدار آنزیم‌های آمیلاز، تریپسین و لیپاز در جوجه‌های ۲۱ روزه، به ترتیب به ۱۰۰، ۵۰ و ۲۰ برابر افزایش می‌یابد.

بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز در جوجه‌های گوشتی که به مدت ۴۲ روز با تیمار ۲۰ درصد تغذیه شده بودند نسبت به جوجه‌های تغذیه‌شده با تیمار ۱۵ درصد، حدود ۵۰ درصد کاهش یافته است ($P<0/05$) (جدول ۴). جیرهٔ حاوی ۲۰ درصد آرد میوهٔ بلوط به علت دارا بودن مقادیر بیشتر مواد ضد تغذیه‌ای مانند تانن‌ها، خوشخوراک نبوده و به مقدار کمتر مصرف شده (غیر معنی‌دار)، بنابراین بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز در جوجه‌های گوشتی ۴۲ روزه کم شده است. مطالعات دیگر نیز حضور مقادیر بالای تانن را عامل کاهش مصرف خوراک گزارش کرده‌اند (Acamovic and Brooker, 2005؛ Sharif و همکاران، ۲۰۱۲؛ Hamou و همکاران، ۲۰۱۲). کاهش در بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز و نیز کاهش فعالیت و ترشح آن، موجب کاهش هضم پروتئین می‌شود. همچنین تانن‌ها با اتصال به پروتئین، مانع از هضم آن‌ها توسط آنزیم‌ها می‌شوند و جذب مواد پروتئینی جیره را با مشکل مواجه می‌کنند. Rezaei و Semnaninejad (۲۰۱۶) گزارش کردند که استفاده از سطوح ۱۰ و ۲۰ درصد میوه بلوط در جیره جوجه‌های گوشتی، مصرف خوراک، وزن و افزایش وزن بدن و نیز قابلیت هضم ماده خشک و پروتئین خام را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. به‌طور کلی عوامل مختلفی مانند افزایش وزن، مصرف خوراک، بازده غذایی، منبع تانن و نوع ماده خوراکی مورد استفاده، غلظت تانن، عوامل حیوانی (گونه، سن و میزان تولید)، دوره تغذیه با تانن و ساختار جیره می‌توانند اثرات تانن‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (Jansman, 1993). همچنین ساختار، وزن مولکولی و تعداد گروه‌های هیدروکسیل پلی‌فنل‌ها، نقش مهمی در ایجاد تعاملات ایفا می‌کنند (Hasni و همکاران، ۲۰۱۱).

در این پژوهش با افزایش درصد آرد میوهٔ بلوط در جیرهٔ جوجه‌های گوشتی (۲۰ درصد) و نیز مصرف طولانی مدت آن (۴۲ روز)، وزن پانکراس نسبت به وزن زنده جوجه افزایش یافت ($P<0/05$) (جدول ۶). مطالعات مختلف، دلیل افزایش وزن نسبی پانکراس در جوجه‌های تغذیه‌شده با یک منبع حاوی ترکیبات فنلی را مهار آنزیم‌های گوارشی توسط مواد ضد تغذیه‌ای نظیر تانن می‌دانند. تانن‌ها با ایجاد کمپلکس غیر قابل هضم تانن-آنزیم، مانع از فعالیت آنزیم‌ها گردیده و باعث بزرگ شدن اندازه پانکراس می‌شوند (Margaret and Mcnab, 1991).

جدول ٦- اثر تیمارهای آزمایشی بر وزن حقیقی و وزن نسبی پانکراس

تیمارهای آزمایشی	وزن نسبی پانکراس (درصد وزن بدن)		وزن حقیقی پانکراس (گرم)	
	۲۱ روزگی	۴۲ روزگی	۲۱ روزگی	۴۲ روزگی
شاهد	۰/۳۳±۰/۰۰۷	۰/۲±۰/۰۰۹ [b]	۲/۴۸±۰/۱۲	۴/۵۵±۰/۳۹
۱۵ درصد	۰/۳۴±۰/۰۱۶	۰/۲±۰/۰۰۶ [b]	۲/۰۷±۰/۱۶	۴/۰۶±۰/۱۴
۲۰ درصد	۰/۳۷±۰/۰۱	۰/۲۵±۰/۰۲ [a]	۲/۴۳±۰/۱۲	۴/۳۷±۰/۳۴

شاهد: جیرهٔ شاهد بر پایهٔ ذرت-کنجاله سویا (بدون استفاده از بلوط)، ۱۵ درصد: جیرهٔ حاوی ۱۵ درصد آرد میوهٔ بلوط، ۲۰ درصد: جیرهٔ حاوی ۲۰ درصد آرد میوهٔ بلوط. داده‌ها به صورت Mean±SD ارائه شده‌اند.

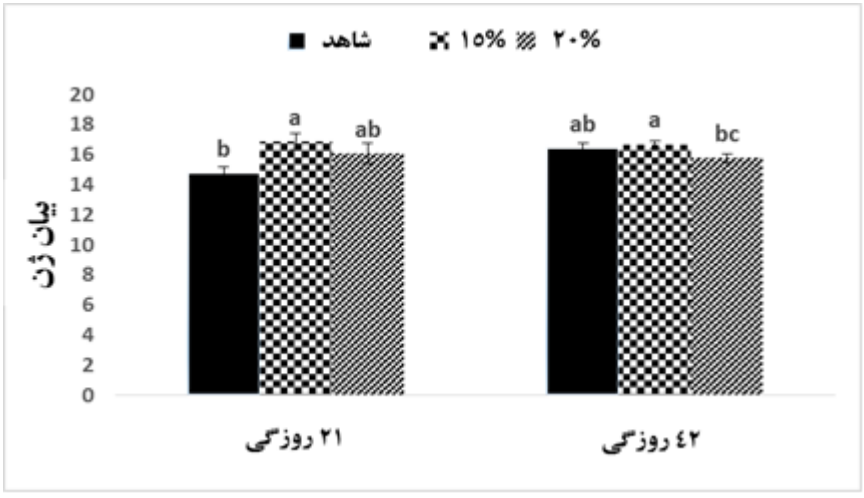
a-b: در هر ستون تفاوت ارقام با حروف نامشابه، معنی‌دار است ($P<0/05$).

پانکراس در هنگام تغذیه با جیره حاوی تانن، مجبور به انجام سوخت و ساز بیشتر (برای تولید آنزیم به منظور شکستن پیوندهای شیمیایی تانن و خنثی کردن اثرات آن) می‌شود و برای جبران مهار آنزیمی دچار هایپرتروفی می‌شود (Ahmed و همکاران، ۱۹۹۱). بر اساس مطالعات صورت گرفته، به کارگیری میوهٔ درخت سال (*Shorea robusta*) در جیرهٔ جوجه‌های گوشتی به علت تانن زیاد موجود در آن، باعث کاهش قابلیت هضم پروتئین و کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده و پانکراس (تریپسین، کیموتریپسین و آلفا آمیلاز) می‌شود (Mahmood و همکاران، ۲۰۰۷؛ ۲۰۰۸) و اندازه پانکراس را افزایش می‌دهد (Mahmood و همکاران، ۱۹۹۷) که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت دارد. در این مطالعه مصرف خوراک در جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با ۲۰ درصد آرد میوهٔ بلوط نسبت به تیمار ۱۵ درصد به‌طور غیر معنی‌داری کاهش یافته است و این کاهش اندک نیز می‌تواند یکی از عوامل افزایش وزن نسبی پانکراس باشد. در مطالعات مختلف، افزایش اندازه پانکراس با مصرف خوراک کمتر گزارش شده است (Acamovic and Brooker, 2005؛ Mahmood و همکاران، ۱۹۹۷). مصرف کمتر خوراک، فعالیت آنزیم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. فعالیت‌های کمتر آنزیم‌ها در پرندگان تغذیه‌شده با خوراک فاقد تانن، ممکن است به دلیل کاهش توانایی کوله‌سیستوکاینین (CCK) برای تحریک ترشحات پانکراس به روده، و مصرف کمتر خوراک باشد (Mahmood و همکاران، ۱۹۹۷). این پژوهشگران گزارش کردند که فعالیت پایین‌تر آنزیم‌ها در پرندگان تغذیه‌شده با دانهٔ سال به دلیل مهار آنزیم با تشکیل کمپلکس تانن-آنزیم و یا به دلیل ترشح کمتر این آنزیم‌ها به داخل روده می‌باشد (Mahmood و همکاران، ۱۹۹۷). کاهش پاسخ سلول‌های آسینار به کوله‌سیستوکاینین در موش‌ها به دلیل محدودیت پروتئین، گزارش شده است (Prost and Belleville, 1991).

در پژوهش حاضر، وزن نسبی پانکراس در جوجه‌های گوشتی که تا ۴۲ روزگی با تیمار ۲۰ درصد تغذیه شده بودند، به‌طور قابل توجهی افزایش یافت ($P<0/05$)، در حالیکه وزن حقیقی پانکراس در بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0/05$). بنابراین وزن بدن جوجه‌ها کاهش یافته بود ($P<0/05$). کاهش وزن در دوره پایانی احتمالاً به دلیل آسیب دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی با مصرف ترکیبات ضد تغذیه‌ای موجود در میوهٔ بلوط مانند تانن‌ها و فیبرها می‌باشد. از این رو می‌توان اینگونه تفسیر نمود که تغذیه با جیرهٔ حاوی ۲۰ درصد آرد میوهٔ بلوط تا سن ۴۲ روزگی باعث کاهش غیرمعنی‌دار مصرف خوراک، کاهش دسترسی به پروتئین و به دنبال آن کاهش در وزن جوجه‌ها شده و بدین ترتیب بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز کاهش و وزن نسبی پانکراس افزایش یافته است. در پژوهشی بین اندازه پانکراس و اندازه بدن در جوجه خروس‌های گوشتی تغذیه‌شده با تانن خوراکی دانهٔ سال یک رابطه معکوس مشاهده شد، این پژوهش‌گران گزارش کردند که فعالیت آنزیم‌های گوارشی شامل تریپسین، آلفا آمیلاز و دی پپتیداز تا حدودی تحت تأثیر وزن زنده و مصرف خوراک قرار دارد (Mahmood and Smithard, 1993).

میوهٔ بلوط همچنین حاوی مقداری فیبر می‌باشد. برخی از منابع فیبر، وزن اندام‌های دستگاه گوارش را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Amerah و همکاران، ۲۰۰۹). این مواد دارای توانایی مهارکنندگی آنزیم‌ها نیز هستند و موجب هایپرتروفی پانکراس و در نهایت افزایش ترشحات پانکراس می‌شوند (Kratzer و همکاران، ۱۹۶۷). طی پژوهشی، بازدارنده‌های پروتئاز موجود در سویا ترشح آنزیم‌های آمیلاز، تریپسین، کیموتریپسین و پانکراتوپپتیداز پانکراس را افزایش، اما فعالیت آمیلاز و تریپسین را در مجرای روده کاهش دادند. این بازدارنده‌های پروتئاز با کاستن از فعالیت آنزیم در روده و در نتیجه آزادسازی کوله‌سیستوکینین، سبب بزرگ شدن پانکراس شدند (Gueguen و همکاران، ۱۹۹۳).

در این پژوهش بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز در بافت پانکراس جوجه‌های گوشتی گروه شاهد در سن ۴۲ روزگی بیشتر از جوجه‌های گوشتی گروه شاهد در سن ۲۱ روزگی بود (شکل ۲). در واقع با افزایش سن، ترشح آنزیم‌های پانکراس بیشتر شد (Noy and Sklan, 1995).



شکل ۲- اثر تیمارهای مختلف بر بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز پانکراس

شاهد: جیرهٔ شاهد بر پایهٔ ذرت-کنجاله سویا (بدون استفاده از بلوط)، ٪۱۵: جیرهٔ حاوی ۱۵ درصد آرد میوهٔ بلوط، ٪۲۰: جیرهٔ حاوی ۲۰ درصد آرد میوهٔ بلوط.

در مطالعه‌ای که بر روی آنزیم‌های گوارشی پانکراس و روده‌ی کوچک در نژاد مرغ قرمز جنگلی و مرغ گوشتی در سنین مختلف صورت گرفت، با افزایش سن، فعالیت آنزیم‌های پانکراس هم افزایش یافت (Khalid و همکاران، ۲۰۱۱). افزایش فعالیت آنزیم با افزایش سن به افزایش ظرفیت گیرنده‌های کوله‌سیستوکینین با میل ترکیبی بالا در سلول‌های آسینار پانکراس، بستگی دارد (Prost و همکاران، ۱۹۸۸). به‌طور کلی بیان افزایشی یا کاهشی ژن‌ها ضرورتاً بیانگر افزایش یا کاهش پروتئین مورد نظر نیست اما می‌تواند نقطه شروع پاسخ‌های مولکولی باشد. در اینجا افزایش و کاهش بیان ژن‌ها و نیز افزایش وزن نسبی پانکراس، می‌تواند یک پاسخ سازگاری در برابر مصرف مواد حاوی ترکیبات فنلی (بلوط) باشد. پژوهشگران گزارش کردند، هورمون‌های زیادی توسط سوبستراهای تغذیه‌ای خاص (پروتئین، چربی یا کربوهیدرات) در غذا آزاد می‌شوند. این هورمون‌ها الگوهای انتخابی بیان ژن مربوط به پانکراس برون‌ریز را در پاسخ به تغییرات غذا میانجی‌گری می‌کنند و ساخت گروه‌های آنزیمی (پروتئینازها، لیپازها و گلیکوزیدازها) را تنظیم می‌کنند و به پانکراس اجازه می‌دهند تا با سطوح تغییرات سوبستراها در غذا سازگار شوند (Bieger and Scheele, 1980).

نتیجه‌گیری کلی

این پژوهش برای اولین بار به بررسی بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز در بافت پانکراس جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با آرد میوهٔ بلوط پرداخت. در این پژوهش، مصرف بالای جیرهٔ حاوی ۱۵ درصد آرد میوهٔ بلوط تا سن ۲۱ روزگی، باعث افزایش بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز شد. همچنین سطح ۲۰ درصد آرد میوهٔ بلوط در جیره و استفاده طولانی مدت از آن (۴۲ روز)، موجب کاهش بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز، کاهش وزن بدن و افزایش وزن نسبی پانکراس شد در صورتی که مصرف جیره حاوی ۱۵ درصد آرد میوه بلوط تا سن ۴۲ روزگی این مشکل را ایجاد نکرد. بنابراین برای جلوگیری از افزایش وزن نسبی پانکراس و نیز جلوگیری از کاهش هضم مواد با ارزش پروتئینی (به دلیل نقش مهم آنزیم کربوکسی‌پپتیداز در هضم پروتئین)، و به دنبال آن کاهش وزن، توصیه می‌شود که در صورت مصرف طولانی مدت از آرد میوهٔ بلوط در جیرهٔ جوجه‌های گوشتی، از سطوح پایین‌تر این میوه و یا از میوهٔ فرآوری شده آن استفاده شود. همچنین به منظور کاهش اثرات منفی تانن‌ها، توصیه می‌شود از مقدار بیشتری پروتئین در جیره استفاده شود. الگوهای پاسخ به تغییرات محیطی و مکانیسم‌های مولکولی با بیان ژن‌های پانکراس در هر دو سطوح رونویسی و ترجمه تنظیم می‌شوند که نیاز به بررسی جامع در هر دو سطح دارد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقایان دکتر موسی زرین و دکتر رضا محمودی جهت همکاری در انجام پژوهش، صمیمانه قدردانی و تشکر بعمل می‌آید.

منابع

Acamovic, T. and Brooker, J.D. (2005). Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society*. 64:403–412.

Ahmed, A.E., Smithard, R. and Ellis, M. (1991). Activities of enzymes of the pancreas, and the lumen and mucosa of the small intestine in growing broiler cockerels fed on tannin-containing diets. *British Journal of Nutrition*. 65:189-197.

Amerah, A.M., Ravindran, V. and Lentle, R.G. (2009). Influence of insoluble fibre and whole wheat inclution on the performance, digestive tract development and ileal microbiota profile of broiler chickens. *British Poultry Science*. 50(3):366-375.

Bieger, W. and Scheele, G. (1980). Two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis of protein mixtures containing active or potentially active proteases. *Analytical biochemistry*. 109(2):222-230.

Bojarpour, M., Bahmaninia, E., Ebrahimi, R. and Fayazi, J. (2010). Evaluate effects of different inclusion of oak kernel with determine food potential oak kernel substitute with corn seed on broiler chickens ration. *Research Journal of Biological Sciences*. 5:17-19.

Conolly, A. (2012). Seminar presentation on pushing the boundaries performance and profit ability. Poultry International Magazine, Mark Clement, pp: 18.

Dhar, A.K., Bowers, R.M., Licon, K.S., Veazey, G. and Read, B. (2009). Validation of reference genes for quantitative measurement of immune gene expression in shrimp. *Molecular Immunology*. 46:1688-1695.

Griffiths, D.W. and Moseley, G. (1980). The effect of diets containing field beans of high and low polyphenolic content on the activity of digestive enzymes in the intestine of rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 31:255-259.

Gueguen, J., Van Oort, M.G., Quillien, L. and Hessing, M. (1993). The composition, biochemical characteristics and analysis of proteinaceous antinutritional factors in legume seeds. *Publication-European Association for Animal production*. 70:9-9.

Hamou, H., Bouderoua, K., Sisbane, I. and Mourot, J. (2012). Effect of green oak acorn based diet on performance and fatty acid composition of cooked breast meat. *International Journal of Applied Animal Sciences*. 1:94-101.

Hasni, I., Bourassa, P., Hamdani, S., Samson, G., Carpentier, R. and Tajmir-Riahi, H.A. (2011). Interaction of milk α and b-casein with tea polyphenols. *Food Chemistry*. 126:630–639.

Houshmand, M., Hojati, F. and Parsaie, S. (2015). Dietary nutrient manipulation to improve the performance and tibia characteristics of broilers fed oak acorn (*Quercus Brantii Lindl*). *Brazilian Journal of Poultry Science*. 1:17-24.

Jansman, A.J.M. (1993). Tannins in feedstuffs for simple stomached animals. *Nutrition Research Reviews*. 6:209-236.

Khalid, K., Kadhim, A., Zuki, B.Z., Noordin, M.M., Babjee, S.M.A. and Zamri-Saad, M. (2011). Activities of amylase, trypsin and chymotrypsin of pancreas and small intestinal contents in the red jungle fowl and broiler breed. *African Journal of Biotechnology*. 10(1):108-115.

Khandelwal, S., Udipi, S.A. and Ghuger, P. (2009). Polyphenols and tannins in Indian pulses: Effect of soaking, germination and pressure cooking. *Food Research International*. 43:526-530.

Kratzer, F.H., Rajagura, R.W.A.S. and Vohra, P. (1967). The effect of polysaccharides on energy utilization, nitrogen retention and fat absorption in chickens. *Poultry Sciences*. 46:1489–1493.

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., et al (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 27(2):95-125.

Kumari, M. and Jain, S. (2012). Tannins: an antinutrient with positive effect to manage diabetes. *Research Journal of Recent Sciences*. 2277-2502.

Lee, K.W., Everts, H., Kappert, H.J., Frehner, M., Losa, R. and Beynen, A.C. (2003) Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *British Poultry Science*. 44:450-7.

Mahmood, S., Ajmal Khan, M., Sarwar, M. and Nisa, M. (2008). Use of chemical treatments to reduce antinutritional effects of tannins in salseed meal: Effect on performance and digestive enzymes of broilers. *Livestock Science*. 116:162-170.

Mahmood, S., Ajmal Khan, M., Sarwar, M., Nisa, M., Lee, W.S., Kim, S.B., et al (2007). Use of chemical treatments to reduce tannins and trypsin inhibitor contents in salseed (*Shorea robusta*) meal. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 20:1462–1467.

Mahmood, S. and Smithard, R. (1993). A comparison of effects of body weight and feed intake on digestion in broiler cockerels with effects of tannins. *British Journal of Nutrition*. 70:701–709.

Mahmood, S., Smithard, R. and Sarwar, M. (1997). Effects of salseed (*Shorea robusta*) tannins, restricted feed intake and age on relative pancreas weight and activity of digestive enzymes in male Broilers. *Animal Feed Science and Technology*. 65 (1):215–230.

Makkar, H.P.S. (2003). Effects and fate of tannins in ruminant animal, adaptation to tannins and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*. 49:241-256.

Mansoori, B., Nodeh, H., Modirsanei, M., Kiaei, M.M. and Farkhoy, M. (2007). Evaluating the influence of tannic acid alone or with polyethylene glycol on the intestinal absorption capacity of broiler chickens, using d-xylose absorption test. *Animal Feed Science and Technology*. 134:252–260.

Margaret, L. and Mcnab, J.M. (1991). The inhibitory effects of hull polysaccharides a tannins of field beans (*Vicia faba L.*) on the digestion of amino acids, starch and lipid and on digestive enzyme activities in young chicks. *British Journal of Nutrition*. 65:199-216.

McDougall, G.J., Kulkarni, N.N. and Stewart, D. (2008). Current developments on the inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors*. 34.73–80.

National Research Council. (1994). *Nutrient requirements of poultry* (9th rev. ed). National Academy Press. Washington, DC.

Noy, Y. and Sklan, D. (1995). Digestion and absorption in the young chick. *Poultry Science Journal*. 74:366-373.

Nyachoti, C.M., Atkinson, J.L. and Lesson, S. (1996). Response of broiler chicks fed a high-tannin sorghum diets. *Journal of Applied Poultry Research*. 5:239-245.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and 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):36-36.

Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. and Neuvians, T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-

wise correlations. *Biotechnology letters*. 26(6):509-515.

Pfaffl, W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29:2002–7.

Prost, J. and Belleville, J. (1991). Age and protein restriction followed by balanced refeeding affect pancreatic digestive enzyme outputs and turnover times in rats. *Journal of Nutrition*. 121:2044-2054.

Prost, J., Belleville, J. and Valantin-Rollet, C. (1988). Effects of age, and protein malnutrition followed by a balanced diet on the non-parallel change in digestive enzymes in the pancreas and their secretion in the rat. *British journal of nutrition*. 60(03):619-631.

Rawel, H.M., Rohn, S. and Kroll, J. (2003). Influence of a sugar moiety (Rhamnosylglucoside) at 3-o-position on the reactivity of quercetin with whey proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*. 32:109-120.

Rezaei, M. and Semnaninejad, H. (2016). Effects of different levels of raw and processed oak acorn (*Quercus castaneifolia*) on performance, small intestine morphology, ileal digestibility of nutrients, carcass characteristics and some blood parameters in broiler chickens. *Poultry Science Journal*. 4:127-138.

Saffarzadeh, A., Vincze, L. and Csapo, J. (1999). Determiniation of the chemical composition of acorn (*Quercus brantii*), pistacia atlantica and pistacia khinjuk seed as non-conventional feedstuff. *Acta Agraria Kaposvariensis*. 3:59-69.

SAS Institute. (2003). SAS User's Guide. Version 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Scheele, G. and Kern, H.F. (1989). Selective regulation of gene expression in the exocrine pancreas. In: J. Forte (Ed), *Handbook of physiology, Section 6, the gastrointestinal system; Volume III, Salivary, gastric, pancreatic, and hepatobiliary secretion.* pp: 499-513. *New York, Oxford University Press*.

Sharif, M., Idrees, M., Tauqir, N.A., Shahzad, M.A., Khalid, M.F., Nisa, M., et al (2012). Effect of water treatment of sorghum on the performance of broiler chicks. *South African Journal of Animal Science*. 42:23-32.

Stevens, C.E. and Hume, I.D. (1995). Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System. Cambridge University Press, Cambridge.

Swanson, K.C. and Harmon, D.L. (2002). Dietary influences on pancreatic α-amylase expression and secretion in ruminants. *Biology of Growing Animals*. 1:515-537.

Weyrich, A., Axtner, J. and Sommer, S. (2010). Selection and validation of reference genes for real-time RT-PCR studies in the non-model species Delomyssublineatus, an endemic Brazilian rodent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 392:145-149.

Yang, F., Lei, X., Rodriguez-Palacios, A., Tang, C. and Yue, H. (2013). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in chicken embryo fibroblasts infected with avian leukosis virus subgroup. *J. BMC research notes*. 6(1):1.

Yuksel, Z., Avci, E. and Erdem, Y.K. (2010). Characterization of binding interactions between green tea flavonoids and milk proteins. *Food Chemistry*. 121:450–456.

Yuste, P., Longstaff, M. and McCorquodale, C. (1992). The effect of proanthocyanidin-rich hulls and proanthocyanidin extracts from bean (*Vicia faba L.*) hulls on nutrient digestibility and digestive enzyme activities in young chicks. *British Journal of Nutrition*. 67:57–65.