

مقاله تحقیقی

تأثیر سطوح مختلف پروتئین جیره غذایی بر رابطه بین فعالیت آنزیم لوسین آمینوپپتیداز و نسبت طول پرزها به عمق کریپت‌های روده باریک موش صحرایی

جعفر سعیدی^{۱*}، مهری لطفی^۲، حسین نوروزی مقدم^۳

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نیشابور، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، نیشابور، ایران

۲. بیمارستان قمر بنی‌هاشم نیشابور، نیشابور، ایران

۳. مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مشهد، مشهد، ایران

* مسؤل مکاتبات: جعفر سعیدی، نیشابور، خیابان پژوهش (جاده صومعه)، مجتمع دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نیشابور، گروه زیست‌شناسی، آدرس الکترونیکی: s_milad2003@yahoo.com

محل انجام تحقیق: گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نیشابور و پژوهشکده بوعلی مشهد

تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۱۸

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۷

چکیده

مورفولوژی پرزهای روده باریک و فعالیت آنزیمی غدد آن (آنزیم لوسین آمینو پپتیداز) رابطه مهمی با جیره غذایی دارد. هدف از این تحقیق نشان‌دادن رابطه بین جیره‌های غذایی دارای پروتئین کم و پروتئین زیاد با مورفولوژی پرزها و فعالیت آنزیمی غدد روده باریک است. تعداد ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بلافاصله پس از طی دوره شیرخوارگی انتخاب و به سه گروه ۱۶ تایی (هر گروه ۴ تکرار ۴ تایی) تقسیم شدند و با جیره‌های ایزوکالریک بر اساس احتیاجات غذایی استاندارد موش صحرایی (NRC-1995) به مدت ۳۱ روز تغذیه گردیدند. سپس موش‌ها کشته شدند و روده باریک آن‌ها خارج گردید و از ابتدا و انتهای نواحی مختلف روده باریک نمونه برداری و ارتفاع پرزها و عمق کریپت‌های لیبرکون روده و فعالیت آنزیم لوسین آمینو پپتیداز ناحیه حاشیه مسواکی آنتروسیت‌ها اندازه‌گیری شد. طول پرزها و عمق کریپت‌های لیبرکون روده باریک در گروه T₁ (۱/۵ درصد پروتئین بیشتر از نیاز استاندارد) افزایش و در گروه T₂ (۱/۵ درصد پروتئین کمتر از نیاز استاندارد) کاهش معنی‌داری یافت، ولی نسبت طول پرزها به عمق کریپت‌ها در گروه T₁ و T₂ نسبت به گروه کنترل، تغییر قابل ملاحظه‌ای نداشت. لذا در گروه T₁ و T₂ تجدید سلولی (Cell Turnover) تغییر قابل ملاحظه‌ای نکرده بود. همچنین، در گروه T₁، تقریباً در تمام قسمت‌های روده باریک فعالیت آنزیم لوسین آمینو پپتیداز نسبت به گروه کنترل، به طور معنی‌داری افزایش، و در گروه T₂ کاهش یافته بود. پس تغییر در مقدار پروتئین جیره غذایی می‌تواند سطح فعالیت آنزیم لوسین آمینو پپتیداز را در روده باریک تغییر دهد و بر هضم و جذب این مواد اثرگذار.

واژه‌های کلیدی: لوسین آمینو پپتیداز، طول پرز، عمق کریپت، جیره پروتئین

مقدمه
اثر دو جیره غذایی دارای پروتئین کم و پروتئین زیاد بر میزان فعالیت آنزیم لوسین آمینو پپتیداز و رابطه آن با نسبت طول پرزها به عمق کریپت‌های لیبرکون

تاکنون مطالعات زیادی در مورد تأثیر جیره‌های غذایی بر مخاط روده باریک صورت گرفته است، ولی

سوء تغذیه پروتئینی باعث اختلال رشد، اتلاف پروتئین از بافت‌ها، تغییرات پاتولوژیک در مخاط ژژونوم (۶)، کاهش وزن و تغییر عمل دستگاه گوارش مخصوصاً در کبد و روده باریک می‌شود (۷) که این نیز روی فعالیت آنزیمی ناحیه حاشیه مسواکی آنتروسیت‌ها و وزن مخاط روده باریک (۸،۹) و شکل و اندازه پرزها اثر دارد (۱۰). مطالعات روشن نموده که کمترین طول پرزها در جیره دارای پروتئین کم و ماکزیمم طول پرزها در جیره دارای پروتئین زیاد وجود دارد (۱۱) و افزایش وزن باعث کاهش تعداد پرزهای روده باریک نیز می‌شود (۱۲،۱۳). چون در موش صحرایی چین‌های حلقوی وجود ندارند، لذا طول و عرض پرزها می‌توانند معیار مناسبی برای سنجش هضم و جذب مواد غذایی باشد (۱۴). هدف از این تحقیق نشان‌دادن رابطه بین جیره‌های غذایی دارای سطوح مختلف پروتئین با مورفولوژی پرزها و فعالیت آنزیمی غدد روده باریک است.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد آزمایش

تعداد ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بلافاصله پس از طی دوره شیرخوارگی از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه مشهد خریداری گردید و به سه گروه ۱۶ تایی (هر گروه ۴ تکرار ۴ تایی) تقسیم و با جیره‌های ایزوکالریک بر اساس احتیاجات غذایی استاندارد موش صحرایی (NRC-1995) به مدت ۳۱ روز تغذیه شدند. الف) گروه کنترل یا C با نیاز استاندارد پروتئین. ب) ۱/۵ درصد پروتئین بیشتر از سطح نیاز استاندارد (T_۱). ج) ۱/۵ درصد پروتئین کمتر از سطح نیاز استاندارد (T_۲) (جدول ۱).

نمونه‌برداری

پس از دوره تغذیه، موش‌ها توزین و کشته شدند و لوله گوارش آن‌ها از ابتدای دوازدهم تا آخر ایلئوم قطع و مزانتر آن جدا شد و طول و وزن روده باریک تعیین گردید.

روده باریک در موش صحرایی به صورت مقایسه‌ای بررسی نشده است. تنظیم غلظت آنزیم‌ها به روش‌های متعددی انجام می‌شود که یکی از آنها القاء سنتز یک آنزیم به وسیله سوبستراهای مختلف، دیگری تنظیم به‌وسیله تعادل در عمل سنتز آنزیم و تجزیه آن است که ممکن است عامل آن نوع جیره غذایی باشد. سومین تنظیم، به وسیله فعال شدن برخی از آنزیم‌های پروتئولیتیک به‌دنبال استفاده از سوبسترای پروتئینی است. در برخی موارد نیز عمل پروتئولیتیکی برخی از آنزیم‌های پروتئازی باعث فعال شدن آنزیم‌های سیتوزولی یا غشائی سلول‌ها می‌گردد که مکانیسم آن مشخص نیست. در این تحقیق از بین ترکیبات آلی سه‌گانه، سوبسترای پروتئینی انتخاب شده است. سوء تغذیه مجموعه‌ای از تغییرات متابولیکی را ایجاد می‌کند که منجر به کاهش وزن بدن و تغییر عملکرد سیستم گوارشی مخصوصاً کبد و روده باریک می‌شود. این تغییرات تأثیر عمیقی بر وزن مخاط روده باریک، شکل و اندازه پرزها و فعالیت آنزیمی غدد آن دارد و می‌تواند در افزایش و یا کاهش سطح جذب روده مؤثر باشد (۱).

مورفولوژی پرزهای روده باریک و فعالیت آنزیمی غدد آن (آنزیم لوسین آمینو پپتیداز) رابطه مهمی با جیره غذایی دارد. یکی از مهم‌ترین مسائل تغذیه‌ای این است که چگونه حیوانات با جیره‌های غذایی جدید سازش می‌کنند. برای مثال تفاوت‌های هیستولوژیک و مورفومتریک در برخی قسمت‌های دستگاه گوارش موش صحرایی، خفاش و پنگوئن نشانه‌ای از تغییرات سازشی موفق با جیره غذایی در ایلئوم آن‌ها است (۲). تغییر در ارتفاع پرزها نمونه‌ای از این پاسخ‌های سازشی است. برای اندازه‌گیری کیفیت پروتئین‌های جیره غذایی می‌توان از روش‌های بررسی مورفولوژیکی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی مخاط روده باریک استفاده کرد (۳).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی مخاط روده باریک برای سنجش کیفیت پروتئین غذایی و تغییرات مورفولوژیک آن برای تشخیص آسیب‌شناسی روده (۴) یا برای مطالعات رشد روده در طی دوره جنینی مفید است (۵).

جدول ۱ - آنالیز غذایی موش صحرائی در مرحله رشد.

ماده مغذی	جیره استاندارد (مقدار در هر کیلوگرم جیره)	جیره حاوی ۱/۵٪ پروتئین بالاتر از استاندارد	جیره حاوی ۱/۵٪ پروتئین پائین تر از استاندارد
اسید لینولئیک	۶ گرم	۶ گرم	۶ گرم
پروتئین	۱۵۰ گرم	۱۸۰ گرم	۱۲۰ گرم
اسیدهای آمینه			
آرژنین	۳/۴ گرم	۵/۱۶ گرم	۳/۴۴ گرم
اسیدهای آمینه حلقوی	۱۰/۲ گرم	۱۲/۲۴ گرم	۸/۱۶ گرم
هیستیدین	۲/۸ گرم	۳/۳۶ گرم	۲/۲۴ گرم
ایزولوسین	۶/۲ گرم	۷/۴۴ گرم	۴/۹۶ گرم
لوسین	۱۰/۷ گرم	۱۲/۸۴ گرم	۸/۵۶ گرم
لیزین	۹/۲ گرم	۱۱/۰۴ گرم	۷/۳۶ گرم
منیونین +سیستئین	۹/۸ گرم	۱۱/۷۶ گرم	۷/۸۴ گرم
ترئونین	۶/۲ گرم	۷/۴۴ گرم	۴/۹۶ گرم
تریپتوفان	۲ گرم	۲/۴ گرم	۱/۸ گرم
والین	۷/۴ گرم	۸/۸۸ گرم	۵/۹۲ گرم
سایر (غیر ضروریها)	۶۶ گرم	۷۹/۲ گرم	۵۲/۸ گرم
مواد معدنی			
کلسیم	۵ گرم	۵ گرم	۵ گرم
کلر	۰/۵ گرم	۰/۵ گرم	۰/۵ گرم
منیزیم	۰/۵ گرم	۰/۵ گرم	۰/۵ گرم
فسفر	۳ گرم	۳ گرم	۳ گرم
پتاسیم	۳/۶ گرم	۳/۶ گرم	۳/۶ گرم
سدیم	۰/۵ گرم	۰/۵ گرم	۰/۵ گرم
مس	۵ میلی‌گرم	۵ میلی‌گرم	۵ میلی‌گرم
آهن	۳۵ میلی‌گرم	۳۵ میلی‌گرم	۳۵ میلی‌گرم
منگنز	۱۰ میلی‌گرم	۱۰ میلی‌گرم	۱۰ میلی‌گرم
روی	۱۲ میلی‌گرم	۱۲ میلی‌گرم	۱۲ میلی‌گرم
ید	۱۵۰ میکروگرم	۱۵۰ میکروگرم	۱۵۰ میکروگرم
مولیبدن	۱۵۰ میکروگرم	۱۵۰ میکروگرم	۱۵۰ میکروگرم
سلنیوم	۱۵۰ میکروگرم	۱۵۰ میکروگرم	۱۵۰ میکروگرم
ویتامین‌ها:			
ویتامین A	۰/۷ میلی‌گرم	۰/۷ میلی‌گرم	۰/۷ میلی‌گرم

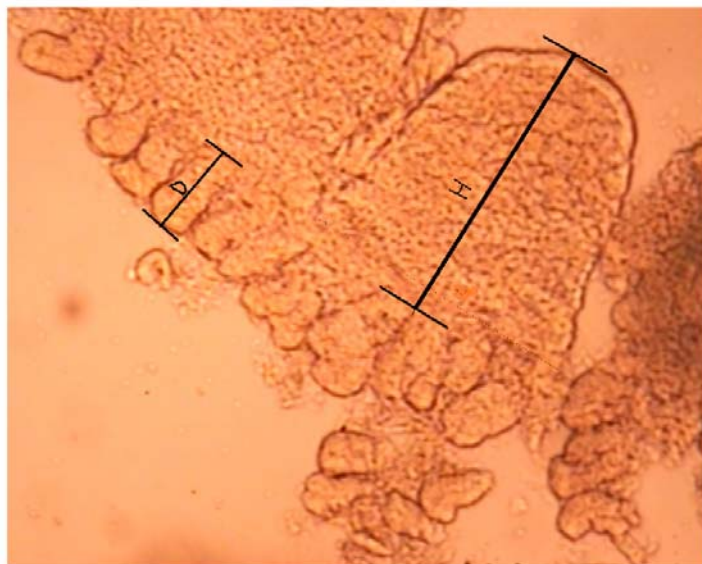
دقیقه فیکس گردید و در اتانول ۵۰ درصد نگهداری شد.

اندازه‌گیری طول پرزها و عمق کریپتها

برای این منظور از هر نمونه قطعه‌ای به مساحت ۲-۱/۵ سانتی‌متر مربع با قیچی جدا و ابتدا عضله مخاطی آن را با قرار دادن نمونه در اسید کلریدریک ۱۰ درصد به مدت ۳-۱ دقیقه و در دمای ۷۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد جدا کرده و سپس با رنگ P.A.S. رنگ‌آمیزی گردید. آن‌گاه ۵ تا ۶ ردیف طولی از پرزها

سپس از ابتدا و انتهای سه ناحیه مختلف روده یعنی دئودنوم، ژژونوم و ایلئوم هر کدام جداگانه نمونه‌برداری شد. هر نمونه مجدداً به دو قطعه جداگانه و مساوی تقسیم گردید. قطعه اول برای محاسبه ارتفاع پرزها و عمق کریپتها لیبرکون و قطعه دوم جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لوسین آمینو پپتیداز استفاده شد. قطعه اول به وسیله محلول تامپونی فسفات سدیم (P.B.S.) با pH=۷ شستشو و سپس با فیکساتور کلارک به مدت ۴۵

پایه تا رأس آن‌ها و برای تعیین میزان عمق کریپت‌های لیبرکون، فاصله بین پایه پرزها تا پایین‌ترین ناحیه کریپت‌ها به صورت خطی و بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد (تصویر ۱).



تصویر ۱ - نحوه اندازه‌گیری طول پرزها (H) و عمق کریپت‌های لیبرکون روده (D).

(1964) و همکاران استفاده شد (۱۵). در این روش برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم لوسین آمینوپپتیداز نیاز به محلول سوبسترا است. لذا ابتدا محلول بافر فسفات (P.B.S) با غلظت ۱۰۰ میلی-مول در لیتر و $pH = 7/2$ ساخته شد و با استفاده از بافر فوق و آل لوسین پارانیتروآنیلید به فرمول $C_{12}H_{17}N_3C_3$ (Leupa, Merck) متعلق به شرکت مرک محلول ۰/۸ میلی‌مول در لیتر سوبسترا ساخته شد.

در مرحله بعد محلول هموژنیزه و سوبسترا با هم مخلوط شده و در حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و طول موج ۴۰۵ نانومتر، در مقابل هوا، جذب نوری اولیه خوانده و ثبت گردید. با بدست آوردن متوسط جذب نوری در دقیقه و ضرب نمودن آن در ثابت ۱۶۱۶ به واحد در لیتر تبدیل گردید. پروتئین تام نمونه‌ها با روش Pyrogallol Red و با دستگاه اتوانالایزر اندازه‌گیری شد.

را جدا کرده و با میکروسکوپ دارای گراتیکول مدرج، ۱۵ تا ۲۰ عدد از بلندترین پرزها و عمیق‌ترین کریپت‌های لیبرکون به صورت تصادفی انتخاب و بررسی شد. برای اندازه‌گیری طول پرزها، فاصله بین

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لوسین آمینوپپتیداز
 قطعه دوم جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لوسین آمینوپپتیداز، در بشرهای جداگانه حاوی محلول P.B.S. با $pH=7$ شستشو داده شد و پس از پیچیدن در فویل آلومینیومی برچسب‌دار، در تانک حاوی نیتروژن مایع نگهداری شد. پس از خاتمه نمونه‌برداری، نمونه‌ها از تانک نیتروژن مایع خارج و به داخل فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در زمان تهیه محلول‌های هموژنیزه، نمونه‌ها از فریزر خارج شدند و بر روی یک فویل آلومینیومی کوچک، مقدار ۰/۰۵ گرم مخاط روده را برداشته و با مقدار ۱۰ میلی‌لیتر P.B.S. ($pH=7$) به داخل یک لوله فالکن شستشو داده شد و با استفاده از دستگاه تخریب‌کننده سلولی (ultrasonic disintegrator) نمونه‌های هموژنیزه تهیه و وارد میکروتیوپ‌ها گردید و در فریزر ۸۰- درجه سانتی-گراد نگهداری شد. برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم لوسین آمینوپپتیداز از روش نیجل Nagel

آنالیز آماری

کلیه اطلاعات به دست آمده در خصوص آنزیم لوسین آمینو پپتیداز و پارامترهای مورفولوژیک از قبیل طول پرزها، عمق کریپت‌های لیبرکون، نسبت طول پرزها به عمق کریپت‌های لیبرکون، پس از محاسبه و انجام تست نرمال، توسط نرم افزار SPSS مورد آزمایش t-test و آنالیز واریانس قرار گرفتند.

نتایج

فعالیت آنزیم لوسین آمینو پپتیداز در تمام قسمت‌های روده باریک در گروه با پروتئین بالا افزایش و در گروه با پروتئین پائین، کاهش معنی - داری را نشان داد. طول پرزها و عمق کریپت‌های لیبرکون در تمام قسمت‌های روده باریک در گروه با پروتئین بالا افزایش و در گروه با پروتئین پائین، کاهش معنی داری را نشان داد. نسبت طول پرزها به عمق کریپت‌های لیبرکون روده باریک، تغییری قابل ملاحظه‌ای نداشت (جدول ۲) (تصویر ۱).

بحث

همان طوری که در جدول ۲ مشخص شده است تقریباً در تمام قسمت‌های روده باریک طول پرزها و عمق کریپت‌های لیبرکون به طور معنی داری در گروه T_1 افزایش و در گروه T_2 نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است.

مشخص شده است طول پرزها وابسته به دو عامل است اول تکثیر سلولی و تمایز آنها از کریپت‌ها و دوم مهاجرت سلول‌های بالغ در طول محور پرز و نهایتاً ریزش آنها از راس پرز.

تنظیم این دو فاکتور بیان کننده این است که روده باریک چگونه با جیره غذایی سازش می کند (۱۱). به عقیده Hampson (1986) طول و شکل پرزها با جمعیت سلولی آنها رابطه دارد (۱۶).

Montoya (2006) معتقد است که عمق کریپت - های لیبرکون و مساحت روده باریک در جیره غذایی فاقد پروتئین کاهش می یابد (۷). یافته‌های این تحقیق با تحقیق Montoya (2006) مطابقت دارد. نسبت طول پرزها به عمق کریپت‌های لیبرکون که نشان دهنده Cell turnover یا تجدید سلولی روده است، در گروه T_1 و T_2 نسبت به گروه کنترل تغییر قابل ملاحظه‌ای نکرده است (جدول ۲). یعنی در گروه T_1 و T_2 تجدید سلولی (Cell turnover) تغییر فاحشی نکرده است (۷).

Montoya در سال ۲۰۰۶ نشان داد که نسبت طول پرزها و عمق کریپت‌های لیبرکون در جیره غذایی فاقد پروتئین در دئودنوم و ایلئوم کاهش می - یابد که با یافته‌های این تحقیق متفاوت است و احتمالاً به خاطر کاهش سطح پروتئین (و نه حذف کامل آن از جیره غذایی) در گروه T_2 در این کار تحقیقاتی است (۷).

با توجه به جدول ۲، مشخص می شود که تقریباً در تمام قسمت‌های روده باریک فعالیت آنزیم لوسین آمینوپپتیداز به طور معنی داری در گروه T_1 نسبت به گروه کنترل افزایش و در گروه T_2 نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. فعالیت بسیاری از آنزیم - های ناحیه حاشیه مسواکی روده باریک در قسمت - های مختلف پرزها متفاوت است (۱۷، ۱۸).

Montoya در سال ۲۰۰۶ معتقد است که فعالیت آمینوپپتیدازهای روده باریک در جیره غذایی فاقد پروتئین کاهش می یابد که با یافته‌های این تحقیق منطبق است (۷). لذا تغییرات سطح پروتئین جیره غذایی باعث تغییراتی در معماری پرزها و عمق کریپت‌های لیبرکون و فعالیت آنزیمی در روده باریک موش صحرایی می شود که بر هضم و جذب مواد غذایی در روده موثر است.

جدول ۲ - مقایسه میانگین طول پرزها، عمق کریپت‌های لیبرکون، نسبت طول پرزها به عمق کریپت‌های لیبرکون و مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم لوسین آمینوپپتیداز در روده باریک بین گروه کنترل (C) و گروه‌های آزمایشی (T₁ و T₂) (Mean±SE).

محل نمونه‌برداری	فعالیت آنزیم لوسین آمینو پپتیداز (U/g protein)											
	طول پرزها (میکرومتر)			عمق کریپت‌ها (میکرومتر)			نسبت طول پرزها به عمق کریپت‌ها					
	C	T1	T2	C	T1	T2	C	T1	T2	C	T1	T2
ابتدای دئودنوم	464.48	476.56	352.96	235.56	243.99	176.55	1.964	1.965	2.099	2198.1	2803.3	1866.6
	±1.9 ^a	±7.3 ^b	±14.9 ^c	±4.6 ^a	±5.9 ^b	±3.5 ^c	±0.04 ^a	±0.07 ^a	±0.11 ^a	±152.73 ^a	±168.97 ^b	±42.46 ^c
انتهای دئودنوم	454.19	46.319	407.50	210.82	216.53	167.26	2.159	2.183	2.460	2862.4	3439.1	2605.7
	±6.0 ^a	±5.0 ^b	±4.1 ^c	±4.4 ^a	±7.3 ^b	±5.0 ^c	±0.05 ^a	±0.08 ^b	±0.07 ^c	±164.87 ^a	±315.96 ^b	±81.12 ^c
ابتدای ژژونوم	427.98	458.23	383.63	200.15	215.67	147.54	2.046	2.145	2.334	3548.9	3635.2	3334.7
	±4.5 ^a	±5.3 ^b	±7.8 ^c	±18.4 ^a	±5.6 ^b	±3.9 ^c	±1.72 ^a	±0.06 ^b	0.09 ^c	±78.42 ^a	±261.55 ^a	±117.71 ^a
انتهای ژژونوم	357.44	367.05	320.89	228.52	234.20	161.61	1.574	1.589	1.986	3782.8	4477.4	2681.2
	±8.8 ^a	±9.5 ^b	±5.7 ^c	±4.4 ^a	±6.8 ^b	±4.7 ^c	±0.06 ^a	±0.07 ^b	±0.08 ^c	±139.55 ^a	±214.17 ^b	±74.89 ^c
ابتدای ایلئوم	323.21	338.73	269.87	183.46	192.21	146.14	1.769	1.782	1.880	3548.1	4122.5	3192.9
	±5.6 ^a	±3.6 ^b	±6.1 ^c	±8.5 ^a	±5.3 ^b	±4.1 ^c	±0.09 ^a	±0.05 ^a	±0.06 ^a	±224.01 ^a	±361.63 ^b	±121.29 ^c
انتهای ایلئوم	255.17	309.19	251.86	216.31	229.54	159.71	1.191	1.354	1.639	2619.2	2788.4	2363.0
	±6.6 ^a	±8.9 ^b	±5.8 ^c	±6.3 ^a	±3.8 ^b	±6.5 ^c	±0.05 ^a	±0.05 ^b	±0.03 ^c	±189.73 ^a	±90.32 ^b	±71.19 ^c

abc یعنی هر سه گروه با هم دارای تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ می‌باشند ($0.01 < p < 0.05$)

تقدیر و تشکر

مسئولین پژوهشکده بوعلی مشهد به خاطر همکاری-
های ارزنده‌شان تقدیر و تشکر می‌نمایند.

مسئول مکاتبات و کلیه همکاران این طرح از
معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور و

منابع مورد استفاده

1. Chen, M., Zhang, S., Duan, L., 2003. Changes of microvasclar architecture, ultra structure and permeability of rat jejunal villi at different ages. World J Gastroenterol 9: 795-799.
2. Ofusari, A., Caxtonmartins, A., Komolafe, O., Oluyemi, A., Adeeyo, A., Ajayi, A., Oluwayinka, O., Adelokun, A., Keji, T., Adesanya, A., 2008. A Comparative study of the ileum in rat (*Rattus norvegicus*), bat (*Eidolon helvum*) and pangolin (*Manis tricuspis*) as investigated using histological method. Int J Morphol 26: 137-141.
3. Zambonino, L., Rouanet, M., Caporiccio, B., Besancon, P., 1989. Effects of dietary protein and carbohydrate level in the rat small intestine: enzymatic, histological and electron microscopic studies. Nut Rep Int 40: 313-321.
4. Davidson, B., 1987. Coeliac disease: a critical review of etiology and pathogenesis. Clin Chim Acta 163: 1-40.
5. King, S., Paterson, F., Peacock, A., Smith, W., Syme, G., 1983. Effect of diet upon enterocyte differentiation in the rat jejunum. J Physiology 344: 465-481.
6. Teichberg, S., Fagundes, U., Bayne, A., Lifshitz, F., 1981. Jejunal macromolecular absorption and bile salt deconjugation in protein-energy malnourished rats. Am J Clin Nutr 34: 1281-1291.
7. Montoya, A., Leterme, P., Lalles, P., 2006. A protein – free diet alters small intestinal architecture and digestive enzyme activities in Rats. Report Nut Dev 46: 49-56.
8. Firmansyah, A., Suwanditol, L., Penn, D., 1989. Lebenthal biochemical and morphological changes in the digestive tract of rats' prenatal and postnatal malnutrition. Am J Clin Nutr 50: 261-268.
9. Ortega, A., Nunez, C., Suarez, D., Gil, A., 1996. Age-related response of the small intestine to sever starvation and refeeding in rat. Ann Nut Metab 40: 351-358.
10. Boza, J., Jimenez, J., Martinez, O., Suarez, D., Gil, A., 1996. Effects of native and hydrolyzed whey protein on intestinal repair of malnourished rats at weaning. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2: 186-193.
11. Zambonino, L., Rouanet, M., Besancon, P., 1993. Mathematical correlation between villous height and the nutritional state in Sprague-Dawley rats. Gut 34: 1066-1068.
12. Viguera, M., Castaneda, R., Hernandez, R., Reyes, G., Alvarez, C., 1999. Histological characteristics of the intestinal mucosa of the rat during the first year of life. Lab Animal 33: 393-400.
13. Clarke, F., 1977. The effects of age on mucosal morphology and epithelial cell production in the rat small intestine. J Anat 123: 805-811.
14. Mayhew, M., 1985. Crypts, villi and microvillus in the small intestine of the rat. A stereological study of their variability within and between animals. J Anat 141: 1-17.
15. Nagel, W., Willing, F., Schmidt F. H., 1964. Für die Aminosäurearylamidase (sog .Leucineaminopeptidase-) Aktivität im menschlichen serum. Klin Wschr 42: 447-449.
16. Hampson, J., 1986. Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. Res Vet Sci 40: 32-40.
17. Abbas, B., Hayes, L., Wilson, J., Carr, K. E., 1989. Internal structure of the intestinal villous: Morphological and morphometric observation at different levels of the mouse villous. J Anat 162: 263-273.
18. Pothier, P., Hugu, S., 1980. Characterization of isolated villous and crypt cells from the small intestine of the adult mouse .Cell Tiss Res 211: 405-418.