تولیدات دامی
دوره ۲۴ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۴۰۱
صفحه‌های ۲۹۰-۲۸۱
DOI: 10.22059/jap.2022.330829.623639

مقاله پژوهشی

اثر تغذیه دانه شاهدانه بر بیان ژن *CPT1B* درگوسفند بلوچی

امیرمسعود اسماعیلیان[۱]، علی اسمعیلی‌زاده[۲*]، محمدرضا محمدآبادی[۲]، مهدی منصوری[۳]، محمدعلی فرهوشی[۴]، حامد خراتی کوپایی[۵]
۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۲. استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۳. استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۴. دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۵. دانش‌آموخته دکتری، پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۰/۰۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۰۱/۲۶

چکیده
هدف دانش نوتریژنومیکس مطالعه مواد مغذی به‌عنوان سیگنال‌هایی است که به‌وسیله گیرنده‌های سلولی دریافت می‌شوند و می‌توانند روی ژنوم، بیان ژن‌ها و تولید متابولیت‌ها تأثیرگذار باشند. در این پژوهش، برای بررسی اثر دانه شاهدانه بر تغییرات بیان ژن کارنیتین پالمیتوئیل ترانسفراز-۱-B (*CPT1B*) درگوسفند بلوچی، تعداد ۱۲ رأس بره نر با سن پنج ماهگی در طرح کاملاً تصادفی در دو گروه قرار گرفتند. گروه‌ها با جیره شاهد بدون شاهدانه و با جیره دارای ۱۰ درصد شاهدانه تغذیه شدند. پس از دوره ۱۱۰ روزه پرواربندی، از بافت‌های قلب، کبد، بیضه، ماهیچه راسته (*Longissimus dorsi* muscle) و چربی پشت (subcutaneous back fat) نمونه‌برداری شد. استخراج RNA برای واکنش Real Time PCR و اندازه‌گیری تغییرات بیان ژن *CPT1B* بین گروه‌ها انجام شد. تغییرات بیان ژن *CPT1B* بین گروه شاهد و تیمار در بافت کبد معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). بیان ژن *CPT1B* در کبد بره‌های تحت تیمار شاهدانه ۵/۷۴ برابر نسبت به گروه شاهد افزایش بیان داشت. در بافت‌های قلب، چربی پشت، ماهیچه راسته، بیضه در گروه تیمار نسبت به شاهد به‌ترتیب ۳/۱، ۲/۳۶، ۲/۱۲ و ۲/۴۷ برابر کاهش بیان ژن *CPT1B* را نشان داد. دانه شاهدانه حاوی اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد و این ترکیبات از طریق بیان ژن‌هایی مانند *CPT1B* می‌توانند موجب تغییر متابولیسم چربی در کبد شوند. بنابراین می‌توان بیان داشت که با توجه به این‌که *CPT1B* یکی از ژن‌های مؤثر در سوخت‌وساز چربی می‌باشد، افزودن دانه شاهدانه به جیره از طریق افزایش فعالیت بافت کبد می‌تواند اثر مفیدی بر توان تولیدی حیوان داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: بیان ژن، ژن*CPT1B*، شاهدانه، گوسفند بلوچی، متابولیسم چربی، نوتریژنومیکس.

The effect of feeding cannabis seed on *CPT1B* gene expression in Baluchi sheep

Amir Masoud Esmailian[1], Ali Esmailizadeh[2*], Mohammadreza Mohammadabadi[2], Mehdi Mansouri[3], Mohamadali Farahvashi[4], Hamed Kharrati-Koopaee[5]
1. Former M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
4. Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
5. Former Ph.D. Student, Institute of Biotechnology, Shiraz University, Shiraz, Iran.
Received: December 26, 2021 Accepted: April 15, 2022

Abstract
The goal of nutrigenomics is to study nutrients as signals that are received by cellular receptors, which can affect the genome, gene expression and metabolite production. In this research, to investigate the effect of cannabis seed on the fold change of carnitine palmitoyl transferase-1-B (*CPT1B*) expression in Baluchi sheep, 12 five-month-old male lambs were divided into two groups in a completely randomized design. The groups were fed with a control diet without cannabis seed and with a diet containing 10% cannabis seed. After the fattening period of 110 days, samples were taken from the heart, liver, testis, subcutaneous back fat and *Longissimus dorsi* muscle. Total RNA was extracted for Real Time PCR reaction and measurement of *CPT1B* gene expression change between groups. The change of *CPT1B* gene expression in liver tissue was significant between control and treatment groups (P<0.05). The expression of *CPT1B* gene was 5.74 times higher in liver of lambs treated with Cannabis seed compared with the control group. The *CPT1B* gene expression in heart, subcutaneous back fat, *Longissimus dorsi* muscle, and testis decreased by 3.1, 2.36, 2.12 and 2.47 times, respectively compared to control group. Cannabis seeds contain unsaturated fatty acids and these compounds can change the fat metabolism in the liver through the expression of genes such as CPT1B. Therefore, it can be stated that, *CPT1B* is one of the effective genes in fat metabolism and the addition of cannabis seeds to the diet can have a beneficial effect on the animal's production performance by increasing the activity of the liver tissue.

Keywords: Baluchi sheep, Cannabis seed, *CPT1B gene*, Gene expression, Lipid metabolism, Nutrigenomics.

* نویسنده مسئول
Email: aliesmaili@uk.ac.ir

مقدمه

رشد جمعیت انسانی و کمبود منابع غذایی اصلی‌ترین عامل برای توسعه و پیشرفت سیستم‌های تولید غذا در دهه‌های آینده است. پیشرفت‌های حاصل در علم تغذیه نشان داده‌اند که مواد مغذی یا متابولیت‌های آن‌ها می‌توانند به‌عنوان تنظیم‌کننده مستقیم یا غیرمستقیم عملکردهای مختلف بدن مطرح باشند. در این راستا نوتریژنومیکس با هدف تعامل بین ژنومیکس و تغذیه در زمینه علم تغذیه مطرح شد [۱۰]. از دیدگاه نوتریژنومیکس مواد مغذی جیره غذایی سیگنال‌هایی هستند که به‌وسیله گیرنده‌های سلولی دریافت می‌شوند و می‌توانند بر بیان ژن‌ها و پروتئین‌ها و تولید متابولیت‌ها تأثیرگذار باشند [۱]. طی سال‌های اخیر توجه پژوهش‌گران و تولیدکنندگان به سمت استفاده از مواد افزودنی و خوراکی‌هایی معطوف شده است که علاوه بر تأمین نیازهای غذایی، دارای خواص درمانی نیز باشند و بتوانند تأثیر مثبتی بر سلامت دام و انسان داشته باشند. برای نمونه می‌توان به استفاده از برخی گیاهان دارویی به‌صورت کامل و یا عصاره آن‌ها، استفاده از برخی میکروارگانیسم‌ها و مواد معدنی اشاره کرد [۱۸].

شاهدانه گیاهی یکساله با برگ‌های قطره‌ای است. دانه این گیاه ریز و روغنی بوده و پراکنش آن در استان‌های فارس، کرمان، اصفهان، تهران و شمال ایران گزارش شده است. دانه شاهدانه، یکی از مغذی‌ترین و قابل‌هضم‌ترین دانه‌ها می‌باشد. دانه شاهدانه سرشار از پروتئین، اسیدهای آمینه ضروری و اسیدهای چرب ضروری است. افرادی که به‌طور منظم دانه‌های شاهدانه را مصرف می‌کنند، فشار خون و هم‌چنین میزان کلسترول با چگالی پایین (LDL) در خون آن‌ها کاهش می‌یابد [۳]. پروتئین و آنزیم‌های موجود در دانه‌های بدون پوست شاهدانه موجب کاهش ورم و التهاب می‌شود و از این‌رو، برای مبتلایان به آرتروز و هم‌چنین درد مفاصل مورداستفاده قرار می‌گیرد. پروتئین شاهدانه از دو نوع پروتئین ادستین (مشابه پروتئین سویا) و پروتئین آلبومین (مشابه پروتئین تخم‌مرغ) تشکیل شده است [٦].

ژن *CPT1B* یکی از ژن‌های مهم در بتااکسیداسیون چربی‌هاست. مسیر اصلی کاتابولیسم اسیدهای چرب، بتااکسیداسیون می‌باشد. آنزیم‌های این مسیر در ماتریکس (قسمت داخلی) میتوکندری قرار دارند. به‌علت غیرقابل نفوذ بودن غشای درونی میتوکندری نسبت به اسیدهای چرب آزاد، اسیدهای چرب ابتدا باید به فرم دیگری درآیند تا بتوانند از غشای میتوکندری عبور نمایند. بدین منظور اسیدهای چرب به ناقلی به‌نام کارنیتین که همان کارنیتین پالمیتوئیل ترانسفراز 1-B (*CPT1B*) نامیده می‌شود متصل می‌شوند و سپس وارد میتوکندری می‌شوند [١٤ و ١٦].

فعالیت *CPT1B* در حالت مصرف خوراک مناسب کاهش می‌یابد و بدین ترتیب اکسیداسیون اسیدهای چرب نیز کاهش پیدا می‌کند. از طرف دیگر در هنگام گرسنگی فعالیت *CPT1B* افزایش می‌یابد و امکان افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب را فراهم می‌کند. مالونیل کوآ که نخستین واسطه در ساخت اسیدهای چرب است، در مسیری تحت تأثیر استیل‌کوآ کربوکسیلاز ساخته می‌شود و از بازدارنده‌های قوی *CPT1B* است هم‌چنین در مطالعه‌ای که بر روی بیان ژن *CPT1B* در گوسفندان دنبه‌دار و بی‌دنبه صورت گرفت مشخص شد که بیان این ژن در بافت کبد گوسفندان دنبه‌دار نسبت بی‌دنبه بالاتر است [۲۵]. در پژوهشی در کشور چین با گوسفند سونیت (Sunit)، مشخص شد که اثر رژیم غذایی به شکل چرا در مرتع و تغذیه دستی بر بیان ژن *CPT1B* اثر ندارد [٢٤]. در طیور نیز گزارش شده است که استفاده از روغن کتان در جیره غذایی بر بیان ژن *CPT1B* در ماهیچه سینه طیور گوشتی اثر ندارد [۲۲].

به‌دلیل اهمیت نقش ژن *CPT1B* در مسیر کاتابولیسم چربی‌ها و در نهایت افزایش تولید دام، مطالعات زیادی در

این زمینه بر روی حیوانات مزرعه‌ای انجام شده است، اما هنوز پژوهش‌های بیش‌تری برای درک نقش این ژن نیاز می‌باشد. گوسفند بلوچی یکی از مهم‌ترین نژادهای گوسفند بومی ایران است و به‌خوبی با شرایط محیطی خشن و نامطلوب قسمت جنوب‌شرقی کشور که آب‌وهوای گرم و خشک غالب است و مراتع کم‌کیفیت هستند، سازگار شده است. این گوسفند دنبه‌دار است با اندازه متوسط و دارای پشم سفید است که برای تولید گوشت و پشم نگهداری می‌شود [۲۱]. هدف از انجام این پژوهش بررسی بیان ژن *CPT1B* در بافت‌های قلب، کبد، بیضه، ماهیچه راسته و چربی پشت در گوسفند نژاد بلوچی با تغذیه جیره حاوی دانه شاهدانه بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، برای بررسی اثر دانه شاهدانه بر بیان ژن *CPT1B*، از ۱۲ رأس گوسفند نر نژاد بلوچی در سن پنج ماهگی در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار و شش بره در هر تیمار (تکرار) استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل جیره شاهد (بدون شاهدانه) و جیره حاوی ۱۰ درصد شاهدانه بود. دوره آزمایش ۱۱۰ روز بود که ۲۰ روز ابتدایی به‌عنوان دوره عادت‌پذیری و ۹۰ روز هم دوره اصلی پرواربندی در نظر گرفته شد. بره‌ها در دوره آزمایش، درون قفس‌های انفرادی به ابعاد ۱×۲ متر نگهداری و به‌صورت انفرادی و آزاد تغذیه شدند. هم‌چنین پیش از شروع دوره پرواربندی تمام بره‌ها پشم‌چینی شدند و علیه آنتروتوکسمی واکسینه شدند و به آن‌ها داروی ضد انگل خورانده شد.

صفات وزن اولیه پروار، وزن پایانی پروار، ماده خشک مصرفی، افزایش وزن روزانه، وزن لاشه سرد و گرم، وزن دنبه، ضخامت چربی پشت، وزن کبد و وزن ماهیچه راسته در دوره پرواربندی برای گروه‌های آزمایشی موردبررسی قرار گرفتند. جیره‌های آزمایشی دارای انرژی متابولیسمی و پروتئین خام یکسان (۱۴ درصد) بودند و به‌صورت کاملاً مخلوط دو بار در روز در ساعت‌های معین ۸ صبح و ۱۷ عصر در آخورهای هر باکس در اختیار بره‌ها قرار داده شد و باقی‌مانده خوراک پیش از تغذیه نوبت بعد بره‌ها جمع‌آوری می‌شد. آب نیز به‌صورت آزاد در اختیار واحدهای آزمایشی قرار گرفت. پس از پایان دوره پرواربندی، بره‌ها توزین و کشتار شدند. از بافت‌های کبد، بیضه، قلب، چربی ناحیه پشت و ماهیچه راسته بره‌ها نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد واقع در آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان منتقل شدند و تا زمان استخراج RNA در آن محل ذخیره شدند.

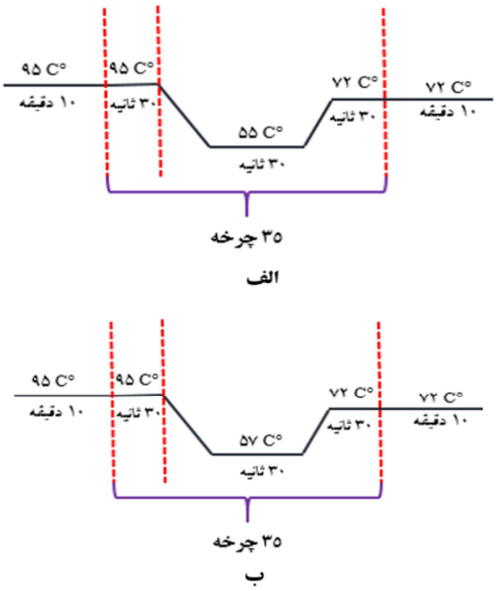
استخراج RNA از بافت‌ها با استفاده از کیت اختصاصی (شرکت دنازیست آسیا) و مطابق دستورالعمل ارائه‌شده همراه کیت انجام شد. پس از استخراج RNA کیفیت و کمیت آن با روش الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانودراپ (مدل NDNM96، ایران) ارزیابی شد. میزان جذب RNA استخراج‌شده در طول موج‌های ۲۸۰، ۲۳۰ و ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند و نسبت‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ برحسب نانومتر محاسبه شدند [۱۷].

در این پژوهش طراحی آغازگر با استفاده از توالی ژن *CPT1B* با شماره دسترسی (XM_042245191.1) موجود در پایگاه NCBI (www.ncbi.com) و نرم‌افزار (نسخه ٦) Primer quest انجام شد. برای حصول اطمینان از اختصاصی‌بودن آغازگرها از ابزار BLAST در پایگاه NCBI استفاده شد. در انتها آغازگرهای طراحی‌شده به‌وسیله شرکت ماکروژن کره جنوبی سنتز شدند. قابل ذکر است که از ژن *β-actin* به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. جدول (۱) توالی آغازگرها را نشان می‌دهد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای ژن *CPT1B* و *β-actin* برای اندازه‌گیری بیان ژن

توالی آغازگر	ژن	طول قطعه (جفت باز)
5′-TGTTCAACACCACTCGCATC-3′ 5′-CTCGTAGAGCCACAGCTTGA-3′	*CPT1B*	۱۱۶
5'- GCACCACACCTTCTACAAC-3' 5'- CATGATCTGGGTCATCTTCTC -3'	*β-actin*	۱۱۲

جهت حذف آلودگی احتمالی RNA به DNA ژنومی از آنزیم DNaseI شرکت فرمنتاز طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. تیمار DNase I به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ سانتی‌گراد بر روی نمونه‌ها اعمال شد. درنهایت جهت غیرفعال‌سازی آنزیم DNaseI مقدار یک میکرولیتر EDTA ۵۰ میلی‌مولار به محلول واکنش افزوده شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٦۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سنتز cDNA با استفاده از دستورالعمل کیت شرکت Thermo انجام شد. سنتز cDNA در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. به‌منظور تأیید سنتز رشته اول cDNA و تعیین دمای اتصال ژن کنترل داخلی از واکنش PCR برای تکثیر قطعه ۱۱۲ جفت بازی مربوط به ژن *β-actin* استفاده شد. واکنش زنجیره پلی‌مراز در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. اجزای واکنش شامل آب مقطر اتوکلاوشده ۱۱ میکرولیتر، مسترمیکس هفت میکرولیتر، غلظت هر آغازگر ۰/٦ پیکومول، دو میکرولیتر cDNA به‌عنوان الگو با غلظت ۱۰۰ نانوگرم. چرخه‌های گرمایی PCR در شکل (۱-الف) نمایش داده شده است. محصول تکثیرشده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد تأیید شد. علاوه بر این، به‌طور مشابه واکنش PCR نیز برای تعیین دمای اتصال آغازگرهای ژن *CPT1B* نیز انجام شد. چرخه‌های دمایی واکنش PCR برای ژن *CPT1B* در شکل (۱-ب) نمایش داده شده است.



شکل ۱. چرخه‌های واکنش PCR برای ژن‌های کنترل داخلی *β-actin* (الف) و ژن *CPT1B* (ب) برای تعیین دمای اتصال و تأیید سنتز cDNA

در این پژوهش برای انجام Real Time PCR از مسترمیکس 5x Hot FIREPOL Eva Green (شرکت Solisbiodine، کشور استونی) استفاده شد. میزان واکنش‌گرها برای اندازه‌گیری بیان ژن براساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت استفاده شد. چرخه‌های گرمایی واکنش Real Time PCR برای ژن‌های کنترل داخلی و CPT1B در جدول (۲) نشان داده شده است.

نتایج به‌دست‌آمده از Real Time PCR با استفاده از نرم‌افزار آماری (نسخه ۲۰۰۹) REST (http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/) و روش ΔΔCt مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و تغییرات بیان ژن *CPT1B* در بافت‌های (کبد، بیضه، قلب، چربی ناحیه پشت و ماهیچه راسته) بین تیمار و شاهد ارزیابی شد. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) برای مدل (۱) تجزیه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD مقایسه شدند.

جدول ۲. چرخه‌های دمایی Real Time PCR برای ژن کنترل داخلی و *CPT1B*

ژن	مرحله	دما (سانتی‌گراد)	زمان	تعداد چرخه
کنترل داخلی *β-actin*	واسرشته سازی اولیه	۹٤	۱۲ دقیقه	۱
	مرحله اتصال	۹٤	۱ دقیقه	٤۰
		٥٥	٥۰ ثانیه	
		۷۲	٤۰ ثانیه	
	گسترش نهایی	۷۲	۹۰ ثانیه	۱
ژن *CPT1B*	واسرشته سازی اولیه	۹٥	۳ دقیقه	۱
	مرحله اتصال	۹٥	۲۰ ثانیه	۳٥
		٥۷	۲۰ ثانیه	
		۷۲	۲۰ثانیه	
	گسترش نهایی	۷۲	٤٥ ثانیه	۱

$$Y_{ij}= \mu + T_i + e_{ij} \quad (۱)$$

در این رابطه، Y_{ij}، رکورد مشاهده‌شده؛ μ، میانگین کل؛ T_i، اثر تیمار آزمایشی iام و e_{ij}، اثر خطای آزمایشی می‌باشد.

نتایج

برای بررسی اثر شاهدانه بین گروه‌های موردمطالعه داده‌های فنوتیپی مرتبط با فعالیت ژن *CPT1B* ثبت شد. نتایج واکاوی آماری صفات عملکردی و لاشه در جدول (۳) آورده شده است. بره‌هایی که از جیره حاوی شاهدانه تغذیه کردند وزن کبد، میانگین وزن پایانی پروار، میانگین افزایش وزن روزانه بالاتر و میانگین ماده خشک مصرفی کم‌تری از بره‌های گروه شاهد داشتند. تفاوتی بین تیمارهای آزمایشی از نظر وزن اولیه پروار، وزن دنبه، ضخامت چربی پشت و وزن ماهیچه راسته، وزن لاشه سرد و گرم بین گروه شاهد و تیمار مشاهده نشد.

در ارزیابی کیفیت RNA با استفاده از ژل آگارز و الکتروفورز، وجود دو باند 18S و 28S و عدم وجود باندهای اضافی در نمونه‌های استخراج‌شده نشان‌دهنده کیفیت مناسب RNA بود. برای بررسی کمی نمونه‌های RNA استخراج شده و هم‌چنین تعیین مقدار لازم برای ساخت cDNA تمامی نمونه‌های استخراج‌شده با استفاده از نانودراپ مورد ارزیابی قرار گرفتند. بعد از انجام نانودراپ و تعیین غلظت نمونه‌ها، cDNA آن‌ها ساخته شد و برای اطمینان از صحت cDNA ابتدا با آغازگرهای ژن کنترل داخلی یک PCR معمولی انجام شد و محصول به‌دست‌آمده روی ژل آگارز یک درصد موردبررسی قرار گرفت (شکل ۲).

به‌منظور اطمینان از صحت Real Time PCR و تکثیر اختصاصی ژن‌های کنترل داخلی و ژن *CPT1B* از نتایج منحنی ذوب استفاده شد. وجود یک پیک در منحنی ذوب برای هر یک از آغازگرهای طراحی‌شده نشان‌دهنده تکثیر اختصاصی ژن‌ها بود. شکل (۳) منحنی ذوب ژن کنترل داخلی و *CTP1B* را نشان می‌دهد.

در نهایت بررسی Ctهای حاصل از واکنش Real Time PCR نشان داد که بیان ژن *CPT1B* در بافت‌های بیضه، عضله راسته، قلب و چربی پشت در اثر تیمار شاهدانه کاهش یافت و بیان این ژن در بافت کبد افزایش یافت. تغییرات بیان ژن *CPTIB* در بافت‌های موردمطالعه در شکل (٤) نمایش داده شده است.

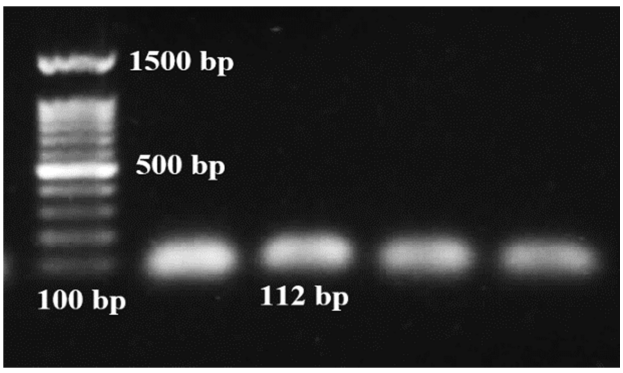
بحث

در این آزمایش، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی از نظر ضخامت چربی پشت و وزن دنبه مشاهده نشد که نتایج اندازه‌گیری بیان ژن *CPT1B* در بافت چربی پشت را تأیید می‌نماید.

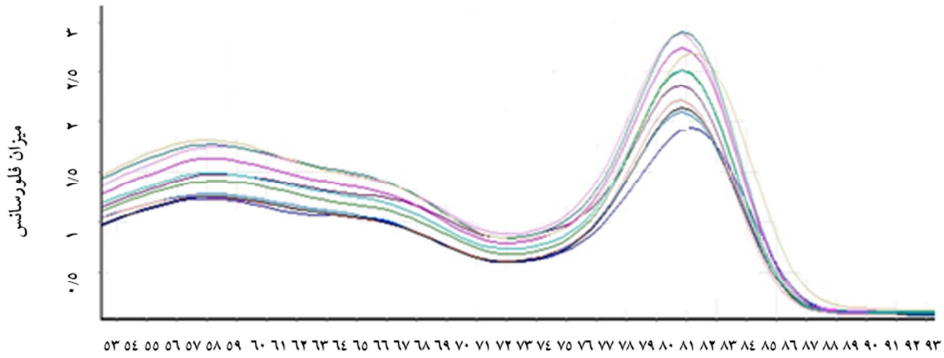
میزان بیان این ژن نیز در بافت ماهیچه راسته بین گروه‌های آزمایشی تفاوتی نداشت با وزن ماهیچه راسته در این آزمایش همسو بود. مطالعات نشان داده‌اند که بافت کبد یکی از اصلی‌ترین اندام‌ها برای متابولیسم چربی‌ها می‌باشد که هم‌راستای با تغییرات وزن کبد در این آزمایش بود [۲]. براساس یافته‌های این مطالعه میزان ماده خشک مصرفی، میانگین افزایش وزن روزانه و میانگین وزن پایانی پروار بین گروه‌های شاهد و تیمار معنی‌دار شد. در تأیید این مطلب، نتایج مشابه نشان داده‌اند که استفاده ۱۰ درصدی از دانه شاهدانه در جیره حاوی ١٤ درصد پروتئین خام از طریق بهبود قابلیت هضم ماده خشک و پروتئین خام می‌تواند موجب افزایش وزن روزانه و مصرف ماده خشک شود [۱۵].

جدول ۳. نتایج ثبت معیارهای فیزیکی به‌منظور تأیید داده‌های بیان ژن *CPT1B*

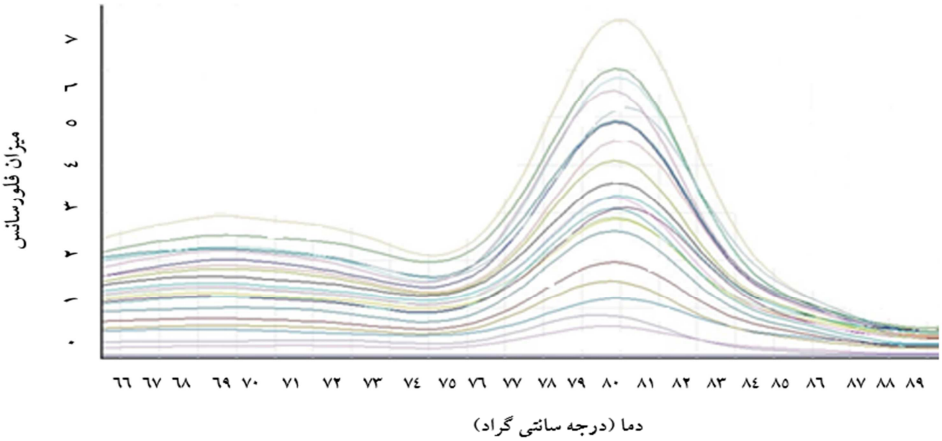
معیارها	شاهد	۱۰ درصد شاهدانه	معنی‌داری
وزن کبد (کیلوگرم)	۰/٦٢ ۰±/۰۲	۰/۸۳ ۰±/۰۵	۰/۰٤
میانگین وزن پایانی پروار (کیلوگرم)	٤٢/۰۳ ۱±/۸۹	٤۳/٦٤ ۱±/۹۵	۰/۰۲
میانگین ماده خشک مصرفی (کیلوگرم در روز)	۱/۳۳ ۰±/۰۲	۱/۱۵ ۰±/۰۲	۰/۰۰۳
میانگین افزایش وزن روزانه (گرم)	۱۹٤/۲۸ ۰±/٦٢	۲۱۱/۷۳ ۰±/۸۵	۰/۰۲
وزن لاشه گرم (کیلوگرم)	۲۰/۷٦ ۱±/۲۲	۲۱/۲۲ ۱±/۲۵	۰/۰۹
وزن لاشه سرد (کیلوگرم)	۱۹/۰۳ ۱±/۲۵	۲۰/۲۹ ۱±/۱۲	۰/۳۰
وزن دنبه (کیلوگرم)	۲/۱۷ ۰±/۸٦	۲/۲٦ ۰±/۹۵	۰/۰۸
ضخامت چربی پشت (سانتی متر)	۳/۱۰ ۰±/۲٤	۳/۲٦ ۰±/۳۵	۰/۱۰
وزن ماهیچه راسته (کیلوگرم)	۵/۵۳ ۰±/۱۲	۵/٤٦ ۰±/۱٤	۰/۱۵
میانگین وزن اولیه پروار (کیلوگرم)	۲۵/۷۱ ۱±/٤۳	۲۵/۸۵ ۱±/۸۹	۰/۷۰



شکل ۲. آشکارسازی نتایج PCR ژن کنترل داخلی به‌وسیله ژل آگارز یک درصد. تکثیر قطعه ۱۱۲ جفت بازی ژن کنترل داخلی با استفاده از cDNA سنتزشده به‌عنوان الگو نشان‌دهنده تأیید سنتز صحیح cDNA می‌باشد.

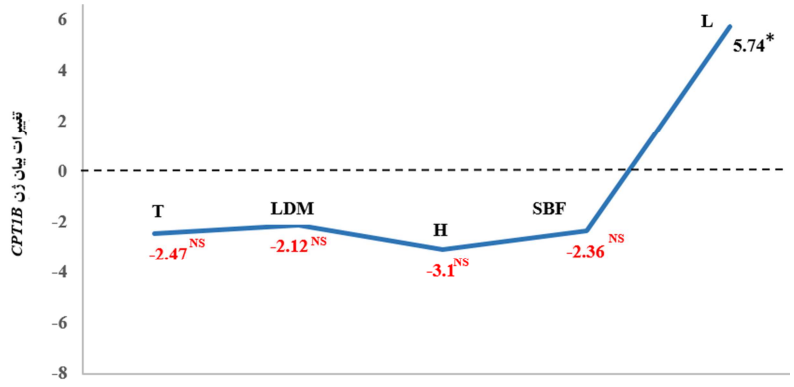


منحنی ذوب ژن بتا اکتین



منحنی ذوب ژن **CPT1B**

شکل ۳. منحنی ذوب واکنش Real Time PCR برای ژن‌های کنترل داخلی و CPTIB. وجود یک پیک در منحنی ذوب برای هر یک از آغازگرهای طراحی‌شده نشان‌دهنده تکثیر اختصاصی ژن‌ها می‌باشد.



شکل ٤. نمودار تغییرات بیان ژن CPTIB بین گروه‌های تیمار و شاهد در نتیجه تغذیه با دانه شاهدانه در بافت‌های مختلف. بیضه (T: Testis)، ماهیچه راسته (LDM: *Longissimus dorsi muscle*)، قلب (H: Heart)، چربی پشت ((SBF: Subcutaneous back fat، کبد (L: Liver) (* معنی‌داری در سطح ۵ درصد، ns غیر معنی‌دار.)

آنزیم *CPT1B* یک آنزیم کلیدی در کنترل اکسیداسیون اسیدهای چرب بلندزنجیر است. این آنزیم وظیفه اکسیداسیون اسیدهای چرب را در درون میتوکندری به‌عهده دارد. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که اسیدهای چرب متوسط‌زنجیر (اکتانوئات و دکانوئات) بیان ژن *CPT1B* را در بره‌ها افزایش نمی‌دهند، در مقابل بیان ژن *CPT1B* می‌تواند تحت تأثیر سایر اسیدهای چرب مانند اسیدهای چرب اشباع (پالمیتات)، اسیدهای چرب غیراشباع با یک پیوند دوگانه (اولئات) و اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه قرار گیرد [۷ و ۱۱]. برای نمونه لینولئات (اسید چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه) موجب افزایش بیان ژن *CPT1B* می‌شود [۷]. قابل ذکر است که، افزایش بیان ژن *CPT1B* تحت تأثیر اسیدهای چرب بلندزنجیر هم در مرحله رونویسی هم در مراحل پس از رونویسی این ژن انجام می‌گیرد. شواهد نشان می‌دهد که اسیدهای چرب بلندزنجیر باید به استرهای کوآنزیم-آ خود تغییر یابند تا بتوانند موجب افزایش بیان ژن *CPT1B* شوند.

مکانیسم مولکولی نحوه تحریک بیان ژن *CPT1B* توسط اسیدهای چرب بلندزنجیر هنوز مشخص نشده است. برخی گزارش‌ها حاکی از آن است که اسیدهای چرب بلندزنجیر به‌واسطه گیرنده‌های هسته‌ای استروئیدی- تیروئیدی موسوم به (Peroxisome PPARα(proliferator-activatedreceptoralpha موجب تنظیم بیان ژن *CPT1B* و در نهایت اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری می‌شوند [۱۱]. ورود اسید چرب به مسیر اکسیداتیو با فعالیت آنزیم *CPT1B* کنترل می‌شود. در حضور کارنیتین، *CPT1B* در غشای داخلی میتوکندری، آسیل‌کو-آ بلند را به آسیل‌کارنیتین تبدیل می‌کند تا پس از عبوراز غشای داخلی، به سیستم آنزیمی اکسیداسیون دسترسی یابد. آسیل کارنیتین تحت تأثیر *CPT2* در سمت درونی غشای داخلی میتوکندری با کوآنزیم-آ واکنش داده و ضمن تشکیل دوباره آسیل‌کو-آ درماتریکس میتوکندری، کارنیتین آزاد می‌شود. هم‌چنین مشخص شده است که اسیدهای چرب غیراشباع از طریق بیان ژن‌هایی چون *CPT1B* موجب تغییر متابولیسم چربی در کبد می‌شوند [۱۳]. ایزوفرم‌های عضلانی این آنزیم (*CPT1B-M*) به‌شدت در سلول‌های عضلانی قلب و اسکلتی و سلول‌های چربی قهوه‌ای بیان شده‌اند [۵]. *CPT1B-M* عاملی برای تنظیم مالونیل‌کو-آ در سطح رونویسی می‌باشد [۱۹]. پیشنهاد شده است که انقباض عضلات، استیل‌کو-آ کربوکسیلاز را مهار می‌کند و یک مکانیسم برای افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب را ایجاد می‌نماید [۱۷].

در پژوهشی چگونگی تأثیر سیستم تغذیه‌ای بر تغییر در پروفایل اسیدهای چرب از طریق تغییر در سطح بیان ژن‌های مرتبط با متابولیسم چربی در ماهیچه *Semitendinous* در بره‌های نژاد راسا آراگونسا (Rasa Aragonesa) موردمطالعه قرار گرفت [۸]. سیستم‌های مختلف تغذیه‌ای منجر به پروفایل‌های مختلف اسیدهای چرب و سطوح مختلفی از بیان ژن‌های مرتبط با متابولیسم چربی می‌شوند، به‌طوری‌که بره‌های تغذیه‌شده با سیستم آزاد و چرای یونجه به‌همراه مکمل در مقایسه با گروه‌های داخل سالن سطح بالاتری از بیان ژن *CPT1B* را نشان دادند. این نشان می‌دهد که سیستم‌های با چرای آزاد سطح بالاتری از بیان ژن *CPT1B* در ماهیچه *Semitendinous* و احتمالاً اکسیداسیون اسیدهای چرب برای تولید انرژی را ایجاد می‌نمایند [۸]. هنگامی‌که حیوانات در معرض سیستم‌های تغذیه‌ای مختلف قرار می‌گیرند، تغییرات قابل‌توجهی در متابولیسم آن‌ها ایجاد می‌شود. این تغییرات ممکن است شامل یک تغییر عمده در نرخ سنتز اسید چرب و رسوب لیپیدی در بافت چربی باشد [۲۰]. در روش تغذیه‌ای دستی بیان ژن‌های مربوط به چربی

افزایش پیدا کرد، در حالی‌که بیان ژن *CPT1B* کاهش یافت [۱۲]. در مطالعه دیگری به‌طور مشابهی مشخص شد که بیان ژن *CPT1B* در چرای آزاد(چرای یونجه به‌همراه مکمل‌ها) بالاتر از گروه‌های تغذیه‌شده به شکل دستی در داخل سالن بود [٤].بررسی تأثیر دانه شاهدانه در تغذیه بره‌ها بر بیان ژن *NPY* نشان می‌دهد که تغذیه بره‌ها با دانه شاهدانه بیان ژن *NPY* را در کبد افزایش و در بافت چربی کاهش می‌دهد، که با نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر بر روی ژن *CPT1B* مطابقت دارد. در واقع تغذیه با دانه شاهدانه که حاوی اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد احتمالاً فعالیت کبد و تجمع چربی در بدن را تا حدودی تحت تأثیر قرار می‌دهد (فعالیت کبد را بیش‌تر و تجمع چربی را کم‌تر می‌کند [۲۳]. هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر بررسی تأثیر دانه شاهدانه در تغذیه بره‌ها بر بیان ژن میوژنین در جمعیتی که در پژوهش حاضر موردبررسی قرار گرفته بود نشان داد، بیان ژن میوژنین در بافت‌های چربی پشت و قلب در اثر مصرف شاهدانه افزایش داشته است [۹]. درحالی‌که نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان ژن *CPT1B* در بافت‌های چربی و قلب گروه دریافت‌کننده شاهدانه کاهش می‌یابد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده و پژوهش‌های پیشین می‌توان چنین بیان کرد، به‌دلیل این‌که دانه شاهدانه حاوی اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد و ازآنجاکه اسیدهای چرب غیراشباع از طریق بیان ژن‌هایی چون *CPT1B* موجب تغییر متابولیسم چربی در کبد می‌شوند، اثر تغذیه شاهدانه در این پژوهش باعث افزایش بیان ژن *CPT1B* در کبد شده است.

تشکر و قدردانی

از کلیه دانشجویان تحصیلات تکمیلی بخش علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان به‌منظور همیاری در ثبت داده‌ها، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع مورداستفاده

1. Almeida AM, Bassols A, Bendixen E, Bhide M, Ceciliani F, Cristoba S, Eckersa PD, Hollung K, Lisacek F, Mazzucchelli G, McLaughlin M, Miller I, Nally JE, Plowman J, Renaut J, Rodrigues P, Roncada P, Staric J and Turk R (2015) Animal board invited review: advances in proteomics for animal and food sciences. Animal 9: 1-17.
2. Alves-Bezerra M, Cohen DE (2017) Triglyceride Metabolism in the Liver. Comprehensive Physiology 8(1): 1-8.
3. Bahmani M, Zargaran A, Rfieian-Kopaei M (2014) Identification of medicinal plants of Urmia for treatment of gastrointestinal disorders. Revista Brasileira de Farmacognosia 24(4): 468-480.
4. Brandstetter AM, Sauerwein H, Veerkamp JH, Geay Y and Hocquette JF (2002) Effects of muscle type, castration, age and growth rate on H-FABP expression in bovine skeletal muscle. Livestock Production Science 75: 199-208.
5. Brown NF, Hill JK, Esser V, Kirkland JL, Corkey BE, Foster DW, McGarry JD (1997) Mouse white adipocytes and 3T3-L1 cells display an anomalous pattern of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I isoform expression during differentiation. Inter-tissue and inter-species expression of CPT I and CPT II enzymes. The Biochemical Journal 327 (1): 225-31.
6. Callaway JC (2004) Hempseed as a nutritional resource: An overview. Euphytica 140(2): 65-72.
7. Dervishi E, González-Calvo L, Blanco M, Joy M, Sarto P, Martín-Hernandez R, Ordovás JM, Serrano M, Calvo JH (2019) Gene expression and fatty acid profiling in longissimus thoracis muscle, subcutaneous fat, and liver of light lambs in response to concentrate or alfalfa grazing. Frontiers in genetics 31(10): 1070-1084.
8. Dervishi E, Serrano C, Joy M, Serrano M, Rodellar C, Calvo JH (2011) The effect of feeding system in the expression of genes related with fat metabolism in semitendinous muscle in sheep. Journal of Meat science 89: 91-97.
9. Farahvashi MA (2019) The effect of feeding cannabis seed on *MyoG* gene expression in Baluchi Sheep. Shahid Bahonar University of Kerman, M.Sc. Dissertation. (In Persian).

10. Ghormade V, Khare A and Baghe RPS (2011) "Nutrigenomics and its Applications in Animal Science. Veterinary Research Forum 2: 147-155.
11. Girard J, Chatelain F, Boillot J, Prip-Buus C, Thumelin S, Pégorier JP, Foufelle F and Ferré P (1997) Nutrient Regulation of Gene Expression. Journal of Animal Science 75(2): 46-59.
12. Graugnard DE, Piantoni P, Bionaz M, Berger LL, Faulkner DB, Loor JJ (2009) Adipogenic and energy metabolism gene networks in longissimus lumborum during rapid post-weaning growth in Angus and Angus×Simmental cattle fed high-starch or low-starch diets. BMC Genomics 10: 42-151.
13. Grum DE, Drackley JK, Younker RS, LaCount DW and Veenhuizen JJ (1996) Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows. Journal of Dairy Science 79(10): 1850-1864.
14. Kang D, Zhou G, Zhou S, Zeng J, Wang X, Jiang Y, Yang Y, Chen Y (2017) Comparative transcriptome analysis reveals potentially novel roles of Homeobox genes in adipose deposition in fat-tailed sheep. Scientific reports 7(1): 1-7.
15. Karamshahi Amjazi K, Jalilvand GH, Dayani O and Banadak MD (2019) Effects of feeding hemp seeds in diets with different levels of crude protein on Performance, Digestibility, Ruminal metabolites and Synthesis of Microbial Protein in Baluchi fattening lambs. Journal Ruminant Research 7(2): 33-58. (In Persian).
16. Kerner J and Hoppel Ch (2000) Fatty acid imports into mitochondria. Biochimica etBiophysica Acta, 1486: 1-17.
17. Kharrati-Koopaee H, Ebrahimie E, Dadpasand M, Niazi A, Esmailizadeh A (2019) Genomic analysis reveals variant association with high altitude adaptation in native chickens. Scientific reports 25; 9(1): 1-22.
18. Mahmoodi M, Farhomand P, Arash A (2012) Effect of different levels of cannabis (*Cannabis sativa* L.) diet on yield, internal organ weight and serum cholesterol level of broilers. Journal of Medicinal Plants 11(2): 121-129. (In Persian)
19. McGarry JD, Leatherman GF and Foster DW (1978) Carnitine palmitoyltransferase I: the site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA. The Journal of Biological Chemistry 253: 4128-4136.
20. Moibi JA, Christopherson RJ and Okine EK (2000) Effect of environmental temperature and dietary lipid supplement on activity and protein abundance of Acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase in skeletal muscle, liver and adipose tissue of sheep. Canadian Journal of Animal Science 80: 69-77.
21. Gholizadeh M, Fayazi J, Valizadeh R, Hamed Kharrati Koopaee H, Dashab GR (2020) Polymorphism of some microsatellites of chromosome 3 and their association with wool production in Baluchi sheep. Animal Sciences Journal 33(127): 31-42. (In Persian)
22. Ponnampalam EN, Vahedi V, Giri K, Lewandowski P, Jacobs JL, Dunshea FR (2019) Muscle antioxidant enzymes activity and gene expression are altered by diet-induced increase in muscle essential fatty acid (α-linolenic acid) concentration in sheep used as a model. Nutrients 11(4): 723.
23. Rashedifar M (2019) The effect of feeding cannabis seed on *NPY* gene expression in Baluchi Sheep. Shahid Bahonar University of Kerman. M.Sc. Dissertation. (In Persian)
24. Wang B, Yang L, Luo Y, Su R, Su L, Zhao L, Jin YE (2018) Effects of feeding regimens on meat quality, fatty acid composition and metabolism as related to gene expression in Chinese Sunit sheep. Small Ruminant Research 169: 127-33.
25. Zakariapour Bahnamiri H, Ganjkhanlou M, Zali A, Sadeghi M, Moradi Shahrbabak H, Nehzati Paghaleh GA (2019) Expression of genes related to liver fatty acid metabolism in fat-tailed and thin-tailed lambs during negative and positive energy balances. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 103(2): 427-435.