نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 7، شماره 4، زمستان 1394، ص. 511-504

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 7, No. 4, Winter 2016, p. 504-511

تأثیر تغذیه متوالی و متناوب بتاآگونیست زیلپاترول هیدروکلراید روی بیان ژن گیرنده‌های بتاآدرنرژیک ماهیچه در بره‌های نر پرواری

وحید واحدی[1*]- مصطفی صادقی[2]- نعمت هدایت اوریق[3]- محمد جواد نجف پناه[4]- عیسی دیرنده [5]

تاریخ دریافت: 1393/08/21
تاریخ پذیرش: 1394/06/10

چکیده

هدف از این آزمایش ارزیابی اثرات سه روش مختلف مصرف زیلپاترول هیدروکلراید به مدت 42 روز آخر دوره پرواربندی روی بیان ژن گیرنده‌های β1 و β2 آدرنرژیک در بره‌های نر پرواری لری-بختیاری بود. تغذیه متوالی زیلپاترول (روزانه)، تغذیه متناوب و به صورت یک روز در میان (1on 1 off) و تغذیه متناوب و به صورت دو روز مصرف و دو روز استراحت (2on 2off) به عنوان روش‌های مختلف تغذیه به کار برده شدند. تعداد 32 راس بره نر با میانگین وزن اولیه 4/7± 44 کیلوگرم براساس وزن اولیه به 4 گروه (n=8) تقسیم و تا آخر دوره پرواربندی با جیره حاوی 14 درصد پروتئین و 0/2 میلی‌گرم زیلپاترول به ازای هر کیلوگرم وزن زنده بره‌ها تغذیه شدند. جیره پایه بدون زیلپاترول به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. به منظور تعیین بیان ژن گیرنده‌های بتاآدرنرژیک، سه مرحله نمونه‌گیری به روش بیوپسی از ماهیچه ران از 3 راس بره در هر تیمار در روزهای صفر، 21 و 42 آزمایش انجام شد و نمونه ها بلافاصله در نیتروژن مایع قرار داده شدند. در آزمایشگاه پس از استخراج RNA کل از بافت ماهیچه، cDNA با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس سنتز شد. پس از طراحی آغازگرها، RT-PCR برای نمونه‌های cDNA، با استفاده از دستگاه iQ5 BioRad انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد که اثرات اصلی و اثر متقابل مدت زمان مصرف و روش مصرف زیلپاترول روی بیان نسبی ژن گیرنده β1 وβ2 آدرنرژیک معنی‌دار نبود. همچنین در مقایسه تیمارها با گروه شاهد نیز تفاوت معنی‌داری در سطح 0/05 مشاهده نشد. بنابراین تغذیه متناوب زیلپاترول هیدروکلراید بیان ژن گیرنده‌های بتاآدرنرژیک را تحت تأثیر قرار نداد.

واژه‌های کلیدی: بره‌های پرواری، زیلپاترول هیدروکلراید، گیرنده‌های بتاآدرنرژیک، RT-PCR.

مقدمه

گوشت گوسفند در ایران مهمترین منبع تأمین کننده گوشت قرمز است و در مقایسه با گوشت گاو و بز مصرف آن بالاتر است. کمبود گوشت یکی از مسائل مهم کشور است و چند سالی است که کشور ما نیز به جرگه وارد کنندگان گوشت قرمز پیوسته است. افزایش بازدهی در تولید گوشت به طرق مختلف از اهمیت به سزایی برخوردار است. یکی از راه‌های بهبود در عملکرد رشد و افزایش تولید در گوسفند می‌تواند استفاده از محرک‌های رشد در جیره باشد. بتاآگونیست‌ها به عنوان محرک رشد شناخته شده‌اند. زیلپاترول هیدروکلراید به عنوان یک β2-آگونیست فعال در ماده تجاری به نام زیلمکس[6] یک بتاآگونیست قوی است. گزارش شده است که مکمل نمودن زیلپاترول می‌تواند اثر سودمندی بر عملکرد رشد و محصول لاشه در گوساله‌های اخته پرواری داشته باشد. این ماده در آمریکا، آفریقای جنوبی و مکزیک به صورت تجاری در صنعت پرواربندی مصرف می‌شود و در سال 2005 توسط سازمان دارو و غذای آمریکا[7] برای مصرف گاو مورد تأیید قرار گرفته است (6). زیلپاترول به طور معمول در 30 و 40 روز پایانی دوره پرواربندی در جیره خوراکی دام استفاده می‌شود. بر طبق تحقیقات انجام شده زیلپاترول باعث افزایش وزن روزانه، افزایش وزن کل، افزایش مساحت مقطع ماهیچه راسته و بازده لاشه، کاهش چربی لاشه، کاهش مصرف ماده خشک و بهبود ضریب تبدیل غذایی می‌شود. زیلپاترول نه تنها باعث بهبود خصوصیات کمی

1- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی مغان، دانشگاه محقق اردبیلی،
2و 4- استادیار و دانش آموخته گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران،
3- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی،
5- استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.
(* نویسنده مسئول: vahediv@uma.ac.ir)

6- Zilmax
7- Food and Drug Administration (FDA)

Archive of SID
www.SID.ir

لاشه می‌شود، بلکه سبب ارتقای خصوصیات کیفی لاشه نیز می‌شود (2).

آگونیست‌های بتاآدرنرژیک به وسیله گیرنده‌های بتا (β1، β2 و β3) بر روی ماهیچه اثر می‌کنند. زیلپاترول تمایل بیشتری به گیرنده‌های β2 دارد و اثرات خود را بیشتر از طریق این گیرنده اعمال می‌کند. اثرات بتاآگونیست‌ها بر ماهیچه اسکلتی وابسته به زمان بوده و بیشترین پاسخ به بتاآگونیست‌ها در یک دوره کوتاه مدت (پایانی) اتفاق می‌افتد. کاهش پاسخ‌های رشد به این محرک‌ها با گذشت زمان ممکن است به دلیل تنظیم کاهشی[1] گیرنده‌های β در سطح سلول‌ها باشد. با به کارگیری یک تیمار متناوب به طور مثال تغذیه آن به صورت یک روز در میان و یا دو روز اعمال تیمار و دو روز استراحت، احتمالاً می‌توان از تنظیم کاهشی گیرنده‌های بتا و کاهش اثرات بتاآگونیست‌ها در طی زمان طولانی جلوگیری به عمل آورد (4). تا کنون مطالعه‌ای در مورد تغذیه متناوب بتاآگونیست‌ها بر روی بیان ژن‌های بتاآدرنرژیک انجام نشده است. لذا هدف اصلی این آزمایش، مطالعه پاسخ گیرنده‌های بتاآدنرژیک (β1 و β2) به تغذیه متوالی و متناوب زیلپاترول هیدروکلراید از طریق بیان ژن این گیرنده‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مدیریت بره ها و جیره مورد استفاده

این آزمایش با استفاده از 32 راس بره نر لری بختیاری 5 تا 6 ماهه در ایستگاه پرورش و توسعه گوسفند لری بختیاری (ایستگاه شولی) واقع در 15 کیلومتری جاده شهرکرد (در 51 درجه و 50 دقیقه طول جغرافیایی و 32 درجه و 17 دقیقه عرض جغرافیایی و در ارتفاع 2049 متری از سطح دریا) انجام شد. در این آزمایش بره‌های مورد نیاز از گله‌های مردمی خریداری شدند و پس از نصب شماره گوش و ثبت مشخصات در اوایل دوره پرواربندی واکسن آنتروتوکسمی تزریق و برای مبارزه با انگل‌های داخلی از شربت آلبندازول به صورت خوراکی استفاده شد. دوره پرواربندی به مدت 90 روز انجام گرفت و مدت آزمایش شامل 45 روز آخر دوره پرواربندی بود. بره‌ها 45 روز قبل از کشتار، بعد از وزن کشی اولیه و تیماربندی تصادفی بر اساس وزن اولیه به 4 گروه آزمایشی (n=8) تقسیم و به جایگاه‌های انفرادی به طول دو متر و عرض یک متر منتقل شدند. میانگین وزن بره‌ها در شروع آزمایش 4/7± 44 کیلوگرم بود. کلیه ابزارهای موجود در سالن اعم از آخورها و آبخوری‌ها شستشو و ضدعفونی شدند و برای هر دو بره از یک سطل آبخوری استفاده می‌شد.

جیره مصرفی بر اساس نرم‌افزار NRC (2007) تنظیم و برای 90 روز پرواربندی تهیه شد. بره‌ها در سه نوبت ساعت 6 صبح، 12 ظهر و 8 شب با جیره یکسان تا آخر دوره پرواربندی تغذیه شدند. در ابتدای دوره پرواربندی به منظور سازگاری با خوراک، در هفته اول، بره‌ها با یونجه تغذیه شدند و به تدریج با اضافه کردن کنسانتره به همراه یونجه سهم کنسانتره در خوراک مصرفی افزایش یافت به طوری که بعد از دو هفته نسبت کنسانتره به یونجه 60 به 40 شد و بره‌ها تا آخر دوره پروار با جیره حاوی 14 درصد پروتئین و 2/36 مگاکالری بر کیلوگرم انرژی قابل متابولیسم تغذیه شدند. درصد مواد خوراکی تشکیل دهنده جیره و ترکیب شیمیایی جیره مورد مصرف در جدول 1 نشان داده شده است. مقدار مصرف زیلپاترول هیدروکلراید 0/2 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن زنده بره‌ها بود. به منظور حصول اطمینان از اینکه محرک به طور کامل توسط بره‌ها مصرف شده است، بعد از محاسبه مقدار زیلپاترول مورد نیاز برای هر بره، زیلپاترول در داخل 10 گرم خمیر گذاشته شد و بعد از اینکه خمیر به شکل قرص در آورده شد با قرص خوران به بره‌ها خورانده شد. همچنین برای ایجاد شرایط یکسان آزمایشی برای تمامی بره‌ها، قرص‌های بدون زیلپاترول به بره‌های گروه شاهد خورانده شد. بره‌ها زیلپاترول مورد آزمایش را در قالب 4 تیمار به صورت زیر دریافت کردند. تیمار 1) این تیمار به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد که زیلپاترول دریافت نکردند. تیمار 2) به صورت روزهای متوالی بره‌ها در 42 روز انتهایی دوره پرواربندی (از روز 45 دوره پروار) هر روز زیلپاترول دریافت کردند (روزانه 42). تیمار 3) به صورت یک روز در میان بره ها در 42 روز انتهایی دوره پرواربندی زیلپاترول دریافت کردند (42 1on 1off). تیمار 4) بره‌ها در 42 روز انتهایی دوره پرواربندی دو روز زیلپاترول را دریافت می‌کردند و دو روز بعدی را دریافت نکردند (42 2on 2off).

نمونه برداری از ماهیچه ران به روش بیوپسی

جهت تعیین پاسخ فیزیولوژیک گیرنده‌های β1 و β2 آدرنرژیک و میزان بیان آنها در طول دوره تغذیه زیلپاترول، نمونه برداری از ماهیچه ران از 3 راس بره در هر تیمار در روزهای صفر، 21 و 42 آزمایش انجام گرفت. برای این منظور ابتدا پشم ناحیه‌ای از ماهیچه ران با تیغ تراشیده شد و بعد از بی‌حس شدن آن ناحیه با لیدوکائین 2 درصد، نمونه برداری با گان مخصوص بیوپسی با سر سوزن G 14 انجام گرفت. سپس نمونه‌های جمع آوری شده بلافاصله در کرایوتیوپ شماره‌دار قرار داده شد و در نیتروژن مایع (196- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. بعد از نمونه‌برداری، ناحیه بیوپسی شده با اسپری تتراسایکلین ضدعفونی شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای 80- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا بیان ژن‌های مرتبط ارزیابی شود.

1- Down regulation

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 1- درصد مواد خوراکی تشکیل دهنده جیره و ترکیب شیمیایی جیره

Table 1- Ingredients and chemical analyses of the experimental diet offered to lambs

درصد مواد خوراکی Ingredient, %	مقدار مورد استفاده Amount
یونجه Alfalfa hay	40
جو Barley	20
گندم Wheat grain	9
ذرت Corn	8
کنجاله سویا Soybean meal	5.4
سبوس گندم Wheat bran	9
تفاله چغندرقند Beet pulp	3
ملاس Cane molasses	3
بیکربنات سدیم Sodium bicarbonate	0.48
نمک Salt	0.3
کربنات کلسیم Calcium carbonate	0.4
زئولیت Zeolite	0.6
مکل دامی(ویتامین ها و مواد معدنی) Vitamin–mineral premix[1]	1.2
ترکیبات شیمیایی جیره *Nutrient composition (g/kg)*	
ماده خشک Dry matter	89.9
پروتئین خام Crude protein	14.0
انرژی قابل متابولیسم Metabolizable energy (Mcal/kg DM)	2.45
چربی خام Ether extract	1.9
خاکستر Ash	8.5

[1]Each kg of the vitamin–mineral premix contained: vitamin A (50,000 IU), vitamin D3 (10,000 IU), vitamin E (0.1 g), calcium (196 g), phosphorus (96 g), sodium (71 g), magnesium (19 g), iron (3 g), copper (0.3 g), manganese (2 g), zinc (3 g), cobalt (0.1 g), iodine (0.1 g), selenium (0.001 g).

روش تعیین بیان ژن گیرنده‌ها

استخراج RNA کل از بافت ماهیچه

بیان نسبی ژن گیرنده‌های بتا در بافت ماهیچه با استفاده از RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور نمونه بیوپسی شده به داخل میکروتیوب 2 ml انتقال داده شد، میکروتیوپ در ازت مایع قرار گرفت تا نمونه بافت به طور کامل منجمد شده و با استفاده از

Archive of SID

www.SID.ir

میکروپستل نمونه پودر شد. سپس RNA با استفاده از محلول جداسازی Tripure (شرکت Roche آلمان) مطابق با دستورالعمل کارخانه سازنده جداسازی شد. پس از بررسی غلظت و خلوص RNA استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Thermo، باقی‌مانده‌های DNA ژنومی با استفاده از آنزیم DNase I (شرکت فرمنتاز) حذف شد.

سنتز cDNA

در این مطالعه برای سنتز cDNA، به عنوان الگوی اولیه برای واکنش‌های RT-PCR از آنزیم رونوشت بردار معکوس (شرکت بایونیر) استفاده شد. برای این منظور ابتدا 100 نانوگرم RNA، و 100 پیکومول آغازگر الیگو dT به داخل تیوب‌های حاوی آنزیم افزوده شدند. سپس حجم نهایی آن با استفاده از آب تیمار شده با DEPC به 20 میکرولیتر رسانده شد. در مرحله بعد واکنش‌های چرخه سنتز cDNA، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر تحت چرخه‌های دمایی جدول 2 صورت گرفتند.

جدول 2- چرخه دمایی مورد استفاده در فرآیند سنتز cDNA

Table 2- temperature cycle used in cDNA synthesis

مرحله Step	دما Temperature (°C)	زمان Time (m)
اتصال آغازگر Primer binding	37	1
ساخت cDNA cDNA synthesis	50	60
غیرفعال‌سازی آنزیم Enzyme inactivation	95	5

در این تحقیق جهت بررسی میزان بیان ژن گیرنده‌های β1 و β2 آدرنرژیک از آغازگرهای اختصاصی این ژن‌ها استفاده گردید. ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. اطلاعات مربوط به آغازگرهای طراحی شده برای ژن‌های مورد مطالعه به شرح جدول (3) بود.

واکنش Real - time PCR

طی این مرحله، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز پیشرفته برای نمونه‌های cDNA حاصل از بافت ماهیچه، با 4 تیمار آزمایشی، 3 تکرار بیولوژی و 3 تکرار آزمایشی، با استفاده از دستگاه iQ5 BioRad انجام شد. مواد مورد نیاز برای واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز شامل سه میکرولیتر cDNA، یک میکرولیتر آغازگر رفت (غلظت pmol 10)، یک میکرولیتر آغازگر برگشت (غلظت pmol 10)، 5 میکرولیتر آب مقطر و 10 میکرولیتر SYBR Green – Master Mix بود. پس از آماده‌کردن پلیت، تنظیمات مربوط به دستگاه انجام و تحت دستور العمل جدول 4 چرخه‌های دمایی واکنش‌ها صورت گرفتند.

به منظور محاسبه بیان نسبی ژن‌ها، میانگین چرخه آستانه (C_T)، برای تکرارهای تکنیکی ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار Excel محاسبه شد. سپس با استفاده از رابطه $\Delta C_T = C_{T(\text{Target})} - C_{T(\text{Refrence})}$ میزان ΔCT، تعیین شد. سپس با استفاده از رابطه زیر میزان بیان نسبی ژن‌های β1 و β2 تعیین شد.

جدول 3- توالی آغازگرهای مورد استفاده در فرآیند Real – Time PCR

Table 3- Sequence of primers used in Real – Time PCR

نام ژن Gene	توالی آغازگر Primer sequence	شماره بانک ژن Genebank accession number	دمای اتصال آغازگر Temp binding primer (°C)	طول محصول Product size (bp)
GAPDH	F 5´- GGCACAGTCAAGGCAGAGAA -3´ R 5´- TCTCGCTCCTGGAAGATGGT -3´	AJ431207.1	59.8	71
گیرنده آدرنرژیک بتا 1 β1-adrenergic receptor	5´- TGCTGCGACTTCATCATCAACG -3´ R F 5´- CGATCTTCTTCACCTGCTTCTG -3´	S81783.1	59.8	133
گیرنده آدرنرژیک بتا 2 B2-adrenergic receptor	´F 5´- TGCAGACGGTCACCAACTAC -3´ R 5´- TCACGCACAGGGTCTCAATG -3´	NM_001130154.1	59.8	191

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 4- چرخه دمایی مورد استفاده در واکنش Real – Time PCR

Table 4- Temperature cycle used in Real – Time PCR

مراحل Steps		دما Temperature (°C)	زمان Time (s)
مرحله اول (1 بار تکرار) First step (one time repeat)	(واسرشت‌سازی اولیه) Denaturation	95	30
مرحله دوم (35 بار تکرار) Second step (35 times repeat)	(واسرشت‌سازی) Denaturation	95	10
	(اتصال پرایمر) Annealing	59.8	10
	(واسرشت‌سازی) Denaturation	72	10
		55-95	10
مرحله سوم (81 بار تکرار)* Third step (81 times repeat)	کسترش Extension	از چرخه 2 به بعد به ازای هر چرخه 0/5 درجه سانتی‌گراد کاهش دما اعمال می‌شود. Temperature decrease 0.5 °C per cycle from 2 cycle	

*در مرحله سوم منحنی ذوب شکل می‌گیرد و داده‌ها آنالیز می‌شوند.

* In the third stage create the melt curve and the data analyze

بیان نسبی ژن $= 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta CT_{Treated} - \Delta CT_{Control})}$

داده‌ها در قالب طرح اندازه گیری‌های مکرر بر اساس مدل آماری زیر تجزیه و تحلیل شدند.

$$y_{ijk} = \mu + T_i + \delta_{ik} + C_j + (T*C)_{ij} + e_{ijk}$$

که μ میانگین کل، T_i اثر تیمار، δ_{ik} اثـر خطـای درون تیمـار، C_jاثر دوره، $(T*C)_{ij}$ اثر متقابل بین تیمار و دوره و e_{ijk} اثرات خطـای درون حیوانات می‌باشـد. تجزیـه و تحلیـل داده‌هـا بـه روش تجزیـه واریانس، توسط برنامه SAS و با استفاده از رویه MIXED انجام شد.

نتایج و بحث

همانطور که در جـداول 5 نشـان داده شـده اسـت، مـدت زمـان مصرف و روش مصرف زیلپاترول، بیان نسـبی ژن گیرنـده β1 وβ2 را تحت تأثیر قرار نداد (P> 0/05). همچنین اثر متقابـل ایـن دو عامـل روی بیان نسبی ژن این گیرنده‌ها و همچنین مقایسه تیمارها با گـروه شاهد نیز در سطح 0/05 معنی‌داری نبود (جدول 6).

از بین گیرنده‌های بتاآدرنرژیک، گیرنده‌های β2 بیشترین فراوانـی را در سلول‌های ماهیچه اسکلتی دارند (9). بتاآگونیست‌ها بـا تغییـر در بیان ژن گیرنده‌های بتاآدرنرژیـک و تعـداد آنهـا در سـطح سـلول‌هـا می‌توانند نقش مهمی در تنظیم پاسخ بافـت‌هـای مختلـف بـه تیمـار بتاآگونیست داشـته باشـند. تغییـر در فراوانـی mRNA گیرنـده‌هـای بتاآدرنرژیک در ماهیچه اسکلتی ممکن است یک دلیل مهمـی بـرای افزایش رشد ماهیچه با مصرف بتاآگونیسـت‌هـا باشـد (7). در مطالعـه میلر و همکاران (7) افزودن زیلپاترول به محیط کشت میوبلاست‌های در حال تکثیر منجربه کاهش در mRNA گیرنده‌های β2 آدرنرژیـک شد که باعث کاهش در غلظت این گیرنده‌ها در سطح سلول‌ها شد. در آزمایشی با تغذیه کلنبترول به موش‌هـای نـر بـه مـدت 10 روز یـک کاهش 35 درصدی درگیرنده‌های β2 آدرنرژیک در ماهیچه اسـکلتی مشاهده شد (5).

والکر و همکاران (12) نشان دادند که با افـزودن راکتوپـامین بـه خوراک گاوهای هلشتاین، بیان ژن‌ها β1 و β2 آدرنرژیک در ماهیچـه اسکلتی کاهش یافت که در این مطالعه تنظیم کاهشی و غیر حسـاس شدن گیرنده‌ها با مصرف طولانی مدت بتاآگونیست‌ها را دلیل کـاهش غلظت این گیرنده‌ها در سطح سلول‌ها بیان کردند. راتمن و همکـاران (8) تفاوت معنی‌داری در بیان ژن گیرنده‌های β1 و β2 آدرنرژیـک در گاوهای تغذیه شده با زیلپاترول گزارش نکردنـد. در مطالعـه دیگـر در خوک‌های دریافت کننده راکتوپامین، تعداد گیرنده‌های β2 آدرنرژیک در بافت چربی کاهش نشان داد. در حالی‌که ایـن بتاآگونیسـت تعـداد گیرنده‌های β2 در ماهیچه اسکلتی را تحت تـأثیر قـرار نـداد (11). در آزمایش وینترهولر وهمکاران (14) و گونزالز و همکاران (3)، تمایل به افزایش در بیان ژن گیرنده β2 آدرنرژیک در گاوهای تغذیـه شـده بـا راکتوپامین به مدت 28 روز قبل از کشتار مشاهده شـد. آنهـا گـزارش کردند که پاسخ‌ها در روزهای اول تغذیه به دلیل افـزایش گیرنـده‌هـا افزایش می‌یابد و در صورت ادامه مصرف بتاآگونیست‌هـا، کـاهش در بیان ژن گیرنده‌ها اتفاق می‌افتد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 5- اثرات اصلی مدت زمان مصرف و روش مصرف زیلپاترول هیدروکلراید بر بیان نسبی ژن β1 و β2 آدرنرژیک در ماهیچه

Table 5- main effect of feeding regimens and length of Zilpaterol Hydrochloride (ZH) supplementation on β1 and β2 adrenergic gene expression in muscle

اثرات اصلی Main effects	بیان نسبی ژن β1 آدرنرژیک β1 adrenergic gene expression	بیان نسبی ژن β2 آدرنرژیک β2 adrenergic gene expression
مدت زمان مصرف Supplementation length		
روز صفر 0 d	0.30	0.96
روز 21 21d	0.67	2.10
روز 42 42d	0.50	1.90
P-value	0.38	0.13
SEM	0.19	0.40
روش مصرف Feeding regimen		
روزانه Daily	0.51	1.33
1on 1off	0.54	2.00
2on 2off	0.41	1.63
P-value	0.86	0.51
SEM	0.19	0.40

جدول 6- اثرات متقابل مدت زمان مصرف و روش مصرف زیلپاترول هیدروکلراید بر بیان نسبی ژنβ1 و β2 آدرنرژیک در ماهیچه

Table 6- Interaction effect of feeding regimens and length of Zilpaterol Hydrochloride (ZH) supplementation on β1 and β2 adrenergic gene expression in muscle

صفت مورد مطالعه Items	روز صفر 0d			روز 21 21d			روز 42 42d			*P-value*
	2on 2off	1on 1off	روزانه daily	2on 2off	1on 1off	روزانه daily	2on 2off	1on 1off	روزانه daily	
بیان نسبی ژن β1 آدرنرژیک β1 adrenergic gene expression	0.24	0.44	1.44	1.40	2.19	2.05	0.16	1.04	2.44	0.49
خطای استاندارد Standard error	1.37	1.38	1.15	1.38	1.15	1.15	1.38	1.89	1.36	
بیان نسبی ژن β2 آدرنرژیک β2 adrenergic gene expression	0.60	0.61	0.68	0.79	0.87	1.50	0.86	1.20	0.45	0.80
خطای استاندارد Standard error	0.35	0.35	0.35	0.79	0.76	0.76	0.40	0.40	0.40	

همانطور که در جدول (6) مشاهده می‌شود، در این پژوهش نیز تغذیه برهها با زیلپاترول به مدت 21 روز به صورت متوالی باعث افزایش در بیان ژن گیرنده β2 شد، اما با ادامه مصرف این بتاآگونیست، کاهش در بیان این ژن مشاهده می‌شود به طوری که بیان ژن گیرنده β2 در روز 42 آزمایش نسبت به روز 21 در برههایی که به صورت متوالی این محرک را مصرف کردهاند کاهش یافته است، هر چند این تفاوتها از لحاظ آماری معنی‌دار نیستند. مصرف متناوب این محرک به مدت 42 روز نه تنها منجربه کاهش بلکه باعث افزایش در بیان ژن گیرنده β2 نیز شده است. در این تحقیق افزایش در عملکرد رشد و خصوصیات لاشه در تیمار 42 روز به صورت متناوب نسبت به تیمار متوالی را می‌توان به افزایش در بیان ژن گیرنده β2 در این تیمارها نسبت داد. در مطالعه میلر و همکاران (7) آنالیز وسترن بلات[1] نشان داد که غلظت پروتئین گیرنده β2 آدرنرژیک در محیط کشت تیمار شده با زیلپاترول در مقایسه با شاهد

1- Western Blot Analysis

Archive of SID

www.SID.ir

کاهش یافت، بنابراین کاهش در بیان پروتئین گیرنده در اثر تیمار با زیلپاترول ممکن است در پاسخ به اتفاقات بعد از رونویسی باشد. در مطالعه‌ای روی گاوهای نر، مصرف راکتوپامین به مدت 25 روز و زیلپاترول به مدت 20 روز در تیمارهای جداگانه بیان ژن گیرنده‌های بتا را تحت تأثیر قرار نداد. همچنین در این مطالعه این ترکیبات به صورت متناوب مورد استفاده قرار گرفت. به طوری که گاوها در یک تیمار ابتدا به مدت 25 روز راکتوپامین و بعد از آن 20 روز زیلپاترول دریافت کردند. مصرف زیلپاترول بعد از راکتوپامین منجربه افزایش در بیان ژن β2 شد. اما با وجود افزایش در بیان ژن در تیمار متناوب، تفاوت معنی‌داری در عملکرد رشد و خصوصیات لاشه گاوهای پرواری ایجاد نشد. با افزایش بیان ژن انتظار می‌رفت که تعداد گیرنده‌ها در سطح سلول‌ها افزایش یابد و پاسخ سلول‌ها افزایش یابد. اما تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بنابراین این محققین نتیجه گرفتند که با افزایش mRNA همیشه پروتئین مربوط به آن mRNA افزایش نمی‌یابد (13).

در چندین مطالعه روی گاو، تفاوتی در فراوانی mRNA گیرنده β1 در اثر مصرف بتاآگونیست‌ها مشاهده نشده است. محققین دلیل آن را فراوانی بسیار کم گیرنده β1 دانسته‌اند که منجربه افزایش واریانس نمونه‌ها می‌شود (1، 10 و 14). در مطالعه حاضر نیز به دلیل بالا بودن واریانس نمونه‌ها و خطای استاندارد در نمونه‌های بیوپسی شده از ماهیچه اسکلتی ما قادر به شناسایی تفاوت بین تیمارها در بیان ژن این گیرنده نبودیم. در تأئید نتایج بدست آمده از این پژوهش، در مطالعه ویبر و همکاران (13) نیز، تفاوت در فراوانی گیرنده‌های β1 و β3 آدرنرژیک در نمونه‌های بیوپسی شده از ماهیچه راسته در تیمارهای مختلف معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مدت زمان مصرف و روش مصرف زیلپاترول تأثیری بر روی بیان نسبی ژن گیرنده β1 وβ2 آدرنرژیک در بافت ماهیچه بره‌ها نداشت. اما بیان ژن به تنهایی غلظت گیرنده‌های بتا در سطح سلول را نشان نمی‌دهد و تغییر در بیان پروتئین گیرنده‌های بتا در اثر تیمار با زیلپاترول ممکن است در پاسخ به اتفاقات بعد از رونویسی و مربوط به مرحله ترجمه باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود اثر زیلپاترول روی بیان پروتئین گیرنده بتا با استفاده از روش وسترن بلات نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

منابع

1- Baxa, T. J., J. P. Hutcheson., M. F. Miller., J. C. Brooks., W. T. Nichols., M. N. Streeter., D. A. Yates., and B. J. Johnson. 2010. Additive effects of a steroidal implant and zilpaterol hydrochloride on feedlot performance, carcass characteristics, and skeletal muscle messenger ribonucleic acid abundance in finishing steers. Journal of Animal Science, 88: 330-337.

2- Elam, N. A., J. T. Vasconcelos., G. Hilton., D. L. VanOverbeke., T. E. Lawrence., T. H. Montgomery., W. T. Nichols., M. N. Streeter., J. P. Hutcheson., D. A. Yates., and M. L. Galyean. 2009. Effects of zilpaterol hydrochloride duration of feeding on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. Journal of Animal Science, 87: 2133-2141.

3- Gonzalez, J. M., R. D. Dijkhuis., D. D. Johnson., J. N. Carter., and S. E. Johnson. 2008. Differential response of cull cow muscles to the hypertrophic actions of ractopamine-hydrogen chloride. Journal of Animal Science, 86: 3568-3574

4- Hossner, K. L. 2005. Hormonal regulation of farm animal growth. CABI.

5- Huang, H., C. Gazzola., G. G. Pegg., and M. N. Sillence. 2000. Differential effects of dexamethasone and clenbuterol on rat growth on β2-adrenoceptors in lung and skeletal muscle. Journal of Animal Science, 78: 604-608.

6- Lopez-Carlos, M. A., R. G. Ramirez., J. I. Aguilera-Soto., A. Plascencia., H. Rodriguez., C. F. Arechiga., R. M. Rincon., C. A. Medina-Flores., and H. Gutierrez-Bañuelos. 2011. Effect of two beta adrenergic agonists and feeding duration on feedlot performance and carcass characteristics of finishing lambs. Livestock. Science, 138: 251-258.

7- Miller, E. K., K. Y. Chung., J. P. Hutcheson., D. A. Yates., S. B. Smith., and B. J. Johnson. 2012. Zilpaterol hydrochloride alters abundance of b-adrenergic receptors in bovine muscle cells but has little effect on de novo fatty acid biosynthesis in bovine subcutaneous adipose tissue explants. Journal of Animal Science, 90: 1317-1327.

8- Rathmann, R. J., J. M. Mehaffey., T. J. Baxa., W. T. Nichols., D. A. Yates., J. P. Hutcheson., J. C. Brooks., B. J. Johnson., and M. F. Miller. 2009. Effects of duration of zilpaterol hydrochloride and days on the finishing diet on carcass cutability, composition, tenderness, and skeletal muscle gene expression in feedlot steers. Journal of Animal Science, 87: 3686-3701.

9- Sillence, M. N., and M. L. Matthews. 1994. Classical and atypical binding-sites for beta-adrenoceptor ligands and activation of adenylyl-cyclase in bovine skeletal-muscle and adipose-tissue membranes. British journal of pharmacology, 111: 866-872.

10- Sissom, E. K., C. D. Reinhardt., J. P. Hutcheson., W. T. Nichols., D. A. Yates., R. S. Swingle., and B. J. Johnson. 2007. Response to ractopamine-HCl in heifers is altered by implant strategy across days on feed. Journal of Animal

Archive of SID

www.SID.ir

Science, 85: 2125-2132.
11- Spurlock, M. E., J.C. Cusamano., S. Q. Ji., D. B. Anderson., C. K. Smith., D. L. Hancock., and S. E. Mills. 1994. The effect of ractopamine on beta-adrenoceptor density and affinity in porcine adipose and skeletal muscle tissue. Journal of Animal Science, 72: 75-80.
12- Walker, D. K., E. C. Tigemeyer., E. K. Sissom., K. R. Brown., J. J. Higgins., G. A. Andrews., and B. J. Johnson. 2007. Effects of steroidal implantation and ractopamine-HCl on nitrogen retention, blood metabolites and skeletal muscle gene expression in Holstein steers. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, (Berl.) 91: 439-447.
13- Weber, J., M. E. Dikeman., J. A. Unruh., J. R. Jaeger., L. Murray., T. A. Houser., and B. J. Johnson. 2012. Effects of sequential feeding of b-adrenergic agonists on cull cow performance, carcass characteristics, and mRNA relative abundance. Journal of Animal Science, 90: 1628-1637
14- Winterholler, S. J., G. L. Parsons., C. D. Reinhardt., J. P. Hutcheson., W. T. Nichols., D. A. Yates., R. S. Swingle., and B. J. Johnson. 2007. Response to ractopamine-hydrogen chloride is similar in yearling steers across days on feed. Journal of Animal Science, 85: 413-419.

Archive of SID

www.SID.ir