Archive of SID

مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۴، ۳۹۳-۳۸۷
Original Article
Journal of Veterinary Research. 70,4: 387-393, 2015

تغییرات بیان ژنی برخی پروتئین‌های متابولیکی فعال در اپیتلیوم شکمبه بره‌های پرواری تغذیه شده با روغن و مونسین

حمیدرضا میرزایی الموتی* سعیده مرادی آرمان رزازیان محمدطاهر هرکی نژاد
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان- ایران

(دریافت مقاله: ۹ شهریور ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۳ آبان ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: نشخوارکنندگان تغذیه شده با جیره‌های غلاتی در معرض بروز ناهنجاری‌های گوارشی از جمله اسیدوز هستند که می‌تواند آثار زیان بار اقتصادی بالایی داشته باشد. **هدف:** در این پژوهش، اثر افزودن مونسین و مخلوط روغن‌های گیاهی و دریایی به جیره‌های غنی از غلات روی بیان ژنی آنزیم‌های درگیر در مسیرهای متابولیک تکثیر سلولی و کارکرد سلول‌های اپیتلیالی شکمبه مورد بررسی قرار گرفت. **روش‌کار:** ۲۲ رأس بره نر افشاری با میانگین وزنی (۸kg± ۴۵) در قالب طرح کاملاً تصادفی با جیره غلاتی حاوی ۸۰ ٪ کنسانتره و ۲۰ ٪ علوفه به مدت ۲۱ روز عادت دهی شدند. بعد از دوره عادت پذیری بره‌ها به ۳ گروه تقسیم‌بندی شدند که به مدت ۸ هفته جیره‌های آزمایشی شامل:۱)جیره غلاتی بدون مواد افزودنی، ۲) جیره غلاتی و ۳۰mg مونسین برای هر بره در روز و ۳)جیره غلاتی و مخلوط روغن‌های غیر اشباع (۴۰g روغن ماهی و۶۰g روغن آفتابگردان) برای هر بره در روز دریافت کردند. در پایان دوره پرواربندی تمام بره‌ها کشتار شده و نمونه‌های اپیتلیوم از قسمت شکمی شکمبه برای سنجش تغییرات در بیان mRNA ژنی گرفته و بررسی بیان ژنهای MCT۱، MCT۴، HMGCS۱ و HMGCS۲ توسط Real Time PCR؛ انجام شد. **نتایج:** بیان mRNA ژن‌های درگیر در سنتز پروتئین‌های ناقل اسیدهای چرب فرار (MCT۱ و MCT۴) در بافت اپیتلیوم بره‌های تغذیه شده با جیره غلاتی و مونسین در مقایسه با شاهد تنظیم افزایشی داشت و در بره‌های تغذیه شده با جیره غلاتی و روغن در مقایسه با شاهد تنظیم کاهشی داشت (p<۰/۰۰۱). اضافه کردن روغن و مونسین به جیره غلاتی به ترتیب سبب افزایش و کاهش بیان mRNA ایزوفرم سیتوزولی آنزیم هیدروکسی متیل گلوتاریل کوآنزیم آ سنتاز (HMGCS۱) شد (p<۰/۰۰۱). بیان mRNA ایزوفرم میتوکندریایی این آنزیم (HMGCS۲) در بافت اپیتلیوم شکمبه بره‌های تغذیه شده با جیره‌های مکمل شده با روغن و مونسین نسبت به شاهد به ترتیب بدون تغییر و افزایش نشان داد (p<۰/۰۰۱). **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج این پژوهش نشان داد افزودن مونسین و روغن به عنوان ابزاری تغذیه‌ای برای کاهش اسیدوز سبب تغییر در بیان mRNA پروتئین‌های انتقال دهنده اسیدهای چرب فرار و آنزیم‌های محدود کننده در سنتز کلسترول و اجسام کتونی در اپیتلیوم شکمبه شد.

واژه‌های کلیدی: اسیدوز، بیان ژن، مونسین، اپیتلیال شکمبه، روغن غیر اشباع

مقدمه

امروزه استفاده از جیره‌های غذایی نشخوار کنندگان به لحاظ دست‌یابی به بیشینه تولید با غلظت بالای مواد کنسانتره‌ای در جیره امری عادی به نظر می‌رسد. هنگامی که غلات در جیره غذایی نشخوار کنندگان افزایش یابد، نرخ تخمیر شکمبه‌ای اسیدهای چرب زنجیره کوتاه و سرعت جذب آنها از دیواره شکمبه افزایش‌یافته و این امر باعث کاهش سریع pH شکمبه و از دست دادن حالت بافری آن می‌شود. لذا نشخوار کنندگان را در معرض بروز ناهنجاری‌های گوارشی از جمله اسیدوز تحت حاد شکمبه‌ای قرار می‌دهد، که در مقایسه با اسیدوز حاد می‌تواند خطر اقتصادی بیشتری داشته باشد (۲۶). اسیدوز تحت حاد شکمبه‌ای سبب کاهش خوراک مصرفی، کاهش تولید شیر و گوشت، آبسه‌های کبدی، زخم شکمبه شده و در درازمدت مرگ‌های ناگهانی را به همراه دارد (۲۳). دست کاری‌های فیزیولوژیکی، جیره‌ای و میکروبی جهت کاهش اسیدوز در نشخوار کنندگان پیشنهاد شده است که از نقطه‌نظر میکروبی استفاده از مواد افزودنی به خصوص آنتی‌بیوتیک‌های یونوفر و روغن‌های گیاهی مورد توجه جدی قرار گرفته‌اند (۲۲). استفاده از این مواد مستلزم آگاهی از کارکرد شکمبه نشخوار کنندگان تغذیه شده با جیره‌های حاوی کنسانتره بالا است. اپیتلیوم شکمبه از نظر متابولیکی بسیار فعال بوده و بیشترین مصرف کننده انرژی در بافت احشایی است (۱۲)، که انرژی مصرفی را از اکسیداسیون اسیدهای چرب فرار به دست می‌آورد. با توجه به سطح دانش کنونی به نظر می‌رسد پروتئینی که در انتقال - SCFA ، لاکتات و کتون بادی‌ها در غشا پایه فعال است، مونوکربوکسیلات کوترنسپورتر۱(MCT۱) می‌باشد. این پروتئین می‌تواند نقش مهمی در خروج پروتون آپیکالی و-SCFA و ورود -HCO۳ به داخل سلول داشته باشد. افزایش عملکرد این پروتئین نقش مهمی در انتقال مواد مغذی از اپیتلیال شکمبه داشته و در تعدیلpH داخل سلولی نقشی مهم و اساسی دارد (۵،۱۷). پروتئین دیگری که می‌تواند نقش مهمی در خروج پروتون آپیکالی و - SCFA و احتمالاً ورود -HCO۳ داشته باشد مونوکربوکسیلات کوترنسپورتر۴ (MCT۴) می‌باشد (۱،۱۴). کتوژنز مسیر اصلی در اپیتلیوم شکمبه است. اسیدهای چرب زنجیر کوتاه پس از جذب به ۳-هیدروکسی-۳متیل گلوتاریل-کوآنزیم آ (HMG-COA)

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۴-۳۳۰۵۲۲۰۴ نمابر: ۰۲۴-۳۳۰۵۲۶۴۵ Email: alamoutih@znu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

توسط آنزیم HMG-COA سنتاز میتوکندریایی (HMGCS2) تبدیل شده و در نهایت به اجسام کتونی تبدیل می‌شوند (۲). به علاوه اینکه HMG-COA در سیتوپلاسم توسط HMG-COA سنتاز سیتوزولی (HMGCS1) و آنزیم‌های دیگر به کلسترول تبدیل می‌شود (۴). بنابراین وقتی جذب اسیدهای چرب فرار افزایش می‌یابد ممکن است ژن‌های درگیر در متابولیسم آنها برای حفظ هموستازی سلول و کل بدن تنظیم شوند. تاکنون تلاش‌ها برای درک مکانیسم مولکولی تغییرات در بافت اپیتلیوم شکمبه معطوف به بیان ژنی برخی از پروتئین‌ها در حیوان تغذیه شده با جیره‌های کنسانتره‌ای در مقایسه با علوفه‌ای بوده است تا مکانیسم‌های سازگاری با جیره‌های غلاتی مورد مطالعه قرار گیرد. عمده این مطالعات متناسب با کاربرد عملی آن در سطح حیوان در کوتاه مدت انجام شده است (۲۴،۳۱،۳۲) و در مواردی نیز برای درک سطوح مولکولی اسیدوز شکمبه‌ای مبادرت به القای آن در حیوان شده است (۳۱،۳۲). تغییرات در خوراک مصرفی روزانه یکی از شاخص‌های مهم اسیدوز تحت کلینیکی است (۳) و در نشخوارکنندگان تغذیه شده با سطوح بالای کربوهیدرات قابل تخمیر در شکمبه امری معمول است (۲۱). هدف از این پژوهش درک اثرات مونسین و روغن در جیره‌های غلاتی در بره‌های پرواری سازگار شده با سطوح بالای غلات روی مسیرهای متابولیک تکثیر سلولی و کارکرد سلول‌های اپیتلیالی شکمبه از طریق تعیین بیان ژنی برخی پروتئین‌ها و آنزیم‌های درگیر در این مسیرها می‌باشد.

مواد و روش کار

دام‌ها و جیره‌های آزمایشی: بیست و دو رأس بره نر افشاری با متوسط وزنی ۸kg ± ۴۵ و سن ۶ ماهگی از گله دانشگاه زنجان به طور تصادفی انتخاب شدند و در جایگاه‌های انفرادی با کف سیمانی به ابعاد ۱۷۱×۸۳ Cm مربع پوشیده شده با کود خشک و تراشه چوب مجهز به آخور و آبخوری انفرادی نگهداری شدند. آزمایش توسط کمیته حمایت از حیوانات دانشگاه زنجان تایید شد و تمام مراحل توسط شبکه دامپزشکی استان نظارت شد. این مطالعه بخش دوم از پژوهشی با هدف بهبود عملکرد و کیفیت گوشت بره‌های تغذیه شده با سطوح بالای کنسانتره اجرا شده در ایستگاه تحقیقاتی گروه علوم دامی می‌باشد. به طور خلاصه بره‌ها به جیره غلاتی حاوی ۸۰٪ کنسانتره و ۲۰ ٪ علوفه بود که بره‌ها به ۳ گروه تقسیم‌بندی شدند که به مدت ۸ هفته جیره‌های آزمایشی شامل:۱)جیره غلاتی بدون مواد افزودنی (۸ بره)، ۲) جیره غلاتی و ۳۰mg مونسین برای هر بره در روز (۸ بره) و ۳)جیره غلاتی و مخلوط روغن‌های غیر اشباع (۴۰g روغن ماهی و ۶۰g روغن آفتابگردان) برای هر بره در روز(۶ بره) دریافت کردند. ترکیب جیره به صورت۲۰٪ یونجه خرد شده، ۶۵ ٪ جو آسیاب شده، ۱۱٪ کنجاله سویا، ۱/۳۵٪ کربنات کلسیم، ۱/۳۳٪ بی کربنات سدیم، ۰/۶۶٪ مکمل معدنی و ویتامینی و ۰/۶۶٪ نمک بود. انرژی قابل متابولیسم جیره‌ها ۲/۷ Mcal/kg و پروتئین خام ۱۶٪ بود. بره‌ها به جیره غلاتی به مدت ۲۱ روز عادت دهی شدند و سپس به مدت ۵۶ روز جیره‌های آزمایشی را دریافت کردند. جیره‌ها به صورت مخلوط دستی علوفه و کنسانتره برای هر بره دو بار در روز در اختیار بره‌ها قرار گرفتند. در پایان دوره تمام بره‌ها در محل ایستگاه کشتار شدند. بلافاصله پس از کشتار هر بره از کیسه شکمی شکمبه نمونه اپیتلیوم برداشته شد و پس از شست و شو با محلول PBS در ۲۰°C- نگهداری شد و پس از ۳۰ دقیقه با جمع‌آوری ۵ تا ۶ نمونه به فریزر ۸۰°C - منتقل و نگهداری شدند (۱۹).

استخراج کل RNA و تولید cDNA: میزان بیان mRNA توسط Real-Time PCR تعیین کمیت شد. روش Real Time PCR برای بررسی کمی بیان ژن استفاده می‌گردد.

استخراج ریبونوکلئیک اسید: استخراج RNA با استفاده از (Qiagen, Hilden, Germany) QIAzol طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. عمل سنجش کمیت و کیفیت RNAهای استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودراپ از روی طول موج ۲۶۰nm و۲۸۰nm تعیین گردید. البته کیفیت RNA بر روی ژل آگارز نیز مورد بررسی قرار گرفت. RNA استخراج شده برای مراحل بعدی در دمای ۸۰- نگهداری گردید.

واکنش نسخه برداری معکوس: ۱۹ µL از RNA توسط کیت (BiONEER(Korea به همراه ۱ µL اولیگودیتی با الگوی دمایی ۳۰°C به مدت ۵ دقیقه، ۶۰°C به مدت ۶۰ دقیقه و ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه به cDNA تبدیل شد.

واکنش Real Time PCR: به طور خلاصه ۱۲/۵ µL (BiONEER) SYBR Green به همراه ۱ µL از هر کدام از پرایمرها با غلظت ۱۰mM و۰/۵ µL Dye که این محلول توسط nuclease-free water به حجم ۲۲µL رسانده می‌شد و در انتها ۳µL از cDNA ساخته شده در مرحله قبل به آن اضافه شد. پروفایل دمایی و شرایط معرف‌ها (شامل غلظت پرایمرها و غلظت کلرید منیزیم) برای تمام پرایمرها مورد آزمایش قرار گرفت. تمامی واکنش‌ها توسط کیت SYBR Green در دستگاه ABI Prism ۷۵۰۰ (Applied Biosystems) با سه تکرار برای هر نمونه تحت شرایط، یک مرحله pre denaturation جهت فعال شدن آنزیم Taq DNA polymerase به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵°C و در ادامه ۴۵ سیکل هر کدام با دو مرحله شامل: ۱۵ ثانیه دناتوراسیون با دمای ۹۵°C ، اتصال پرایمرها با دمای ۵۹°C به مدت ۱ دقیقه و مرحله رونوشت برداری با چهار مرحله شامل:۱۵ ثانیه با دمای ۹۵°C ، ۱ دقیقه با دمای ۶۰°C ، ۱۵ ثانیه با دمای ۹۵°C و ۱۵ ثانیه با ۶۰°C انجام گردید. . پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش در دانشگاه برلین طراحی شد.

نتایج واکنش با استفاده از روش Pfaffl (۲۵) با استفاده از راندمان پرایمر تصحیح شده، مورد بررسی قرار گرفتند. راندمان پرایمر هر یک از واکنش‌ها به طور اختصاصی و با استفاده از نرم افزار LinReg محاسبه و در

www.SID.ir

Archive of SID

معادله مورد استفاده قرار گرفت. همچنین در این مطالعه از ژن RPL۱۹ به عنوان ژن خانه دار استفاده شد. داده‌های حاصل از آزمایش با نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ با رویه MIXED آنالیز و سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. حداقل میانگین مربعات گزارش شد.

نتایج

تغییرات چند برابری نسبی بین جیره با کنسانتره بالا و جیره‌های مکمل شده با مونتسین و روغن‌های گیاهی و دریایی در جدول ۲ نشان داده شده است. بیان mRNA برای تمام ژن‌ها بین جیره‌های آزمایشی بجز HMGCS۲ بین جیره مکمل شده با روغن و شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۱$).

بیان mRNA ژن‌های MCT۱، MCT۴ و HMGCS۲ بافت شکمبه بره‌های دریافت کننده مونتسین در مقایسه با شاهد با افزایش و بیان mRNA ژن HMGCS۱ با کاهش همراه بود. اپیتلیوم شکمبه بره‌های دریافت کننده روغن کاهش بیان mRNA ژن‌های MCT۱ و MCT۴ را در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند. در صورتی که بیان mRNA ژن HMGCS۱ در بره‌های تغذیه شده با مکمل روغن در مقایسه با گروه شاهد با افزایش همراه بود. بیان mRNA ژن HMGCS۲ در اپیتلیوم شکمبه بره‌های تغذیه شده با روغن و شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت.

بحث

به دلیل انحرافات زیاد در مقادیر بیان ژنی پروتئین‌های فعال در انتقال اسیدهای چرب فرار از شکمبه (۲۴) و همچنین انحرافات زیاد بین حیوانی (۲۸)، شاید به دلیل کوتاه بودن دوره‌های آزمایشی و عادت پذیری در پژوهش‌ها، تغییرات بیان mRNA ژن‌ها قابل مشاهده نبوده است. هرچند بیان افزایشی یا کاهشی ژن‌ها ضرورتاً بیانگر افزایش یا کاهش پروتئین مورد نظر نیست اما می‌تواند نقطه شروع پاسخ‌های مولکولی باشد. یونوفرها با گرفتن یون هیدروژن باعث می‌شوند که یون هیدروژن از بیرون از دیواره سلولی به داخل آن نفوذ پیدا کند. در حقیقت یونوفرها باعث افزایش نفوذپذیری غشا به یون‌های هیدروژن می‌شوند (۲۷). چون MCT۱ انتقال‌دهنده هم‌زمان مونوکربوکسیلات/ پروتون بوده که در غشا پایه و به سمت خون فعالیت دارد (۱۷) و به حذف پروتون از اپیتلیوم شکمبه به گردش خون کمک می‌کند (۱۶)، افزایش عملکرد این ژن در انتقال مواد مغذی از اپیتلیال شکمبه داشته و در تعدیل pH داخل سلولی نقشی مهم و اساسی دارد (۸،۱۳،۱۷). افزایش بیان ژن MCT۱ نشان‌دهنده این است که سلول‌های اپیتلیوم نسبت به پروتون نفوذپذیری بیشتری پیدا کرده و این نفوذپذیری باعث افزایش ورود پروتون به داخل سلول شده است که این افزایش با افزایش بیان ژن MCT۱ برای حذف پروتون‌ها به داخل خون همراه بوده است. از طرف دیگر تغییر الگوی تخمیر در شکمبه ناشی از حضور مونتسین در جیره (۶) ممکن است مقدار اسید چرب جذب شده را افزایش داده باشد و با افزایش جذب متابولیسم بافت اپیتلیالی نیز افزایش یافته که تنظیم افزایشی بیان ژنی آنزیم HMGCS۲ در جیره مکمل شده با مونتسین بیانگر آن است. برعکس مونتسین، چربی‌ها با تأثیر منفی روی تخمیر کربوهیدرات‌ها در شکمبه (۲۲) منجر به کاهش اسیدهای چرب فرار می‌شوند. بنابراین کاهش یا کند شدن فرآیند تخمیر فرصتی را فراهم نموده است تا ظرفیت جذبی اپیتلیوم شکمبه بدون بالا رفتن فعالیت متابولیکی این بافت برای جذب و انتقال اسیدهای چرب و حفظ pH سلول کافی باشد. نقش تنظیم افزایشی MCT۴ به خوبی مشخص نیست چون محل پیشنهادی MCT۴ یک مکان تقریبی در غشا آپیکالی است (۱۴) که بیشتر در هنگام کاهش pH سیتوزولی در سلول‌های پوششی شکمبه فعالیت می‌کند. با این حال این عقیده وجود دارد که MCT۴ به صورت خاص در غشا پایه فعالیت می‌کند که به شرط فعالیت در غشا پایه به حذف پروتون از اپیتلیوم شکمبه به گردش خون می‌تواند کمک کند. کتوژنز مسیر اصلی در اپیتلیوم شکمبه است. اسیدهای چرب زنجیر کوتاه پس از جذب به ۳-هیدروکسی-۳متیل گلوتاریل-کوآنزیم‌آ (HMG-COA) توسط آنزیم HMG-COA سنتاز میتوکندریایی (HMGCS۲) تبدیل‌شده و در نهایت به اجسام کتونی تبدیل می‌شوند (۲). Hergardt در سال ۱۹۹۹ عنوان کرد که کتوژنز در کبد تا حد زیادی با ایزوفرم میتوکندریایی HMGCS۲ کنترل می‌شود. در پژوهشی با تغذیه جیره‌های غلاتی به گاوهای خشک و گاوهای شیرده بیان ژن‌های کلسترول ساز در بافت اپیتلیوم شکمبه تنظیم کاهشی داشتند (۲۹،۳۰). همچنین این محققین (۳۲) متابولیسم بافت اپیتلیوم شکمبه بره‌های تغذیه شده با علوفه و کنسانتره را مطالعه کردند. بره‌های تغذیه شده با کنسانتره غلظت بالایی از بتا هیدروکسی بوتیریک اسید در پلاسما داشتند و بیان ژن‌های کتوژنیک تغییر نکرد و عامل رونویسی کنترل کننده بیان ژنی این آنزیم نیز معنی‌دار نبوده است ولی بیان آنزیم HMGCS۱ تنظیم کاهشی داشت. در مطالعه دیگری (۱۰) نیز تغییری در تولید اجسام کتونی در اپیتلیوم شکمبه گاوهای تغذیه شده با سطح بالای کنسانتره نسبت به علوفه مشاهده نشد. هر چند در این پژوهش غلظت بتاهیدروکسی بوتیرات پلاسما اندازه گیری نشد، اما اضافه کردن مونتسین سبب تنظیم افزایشی HMGCS۲ شد که ممکن است ناشی از افزایش تولید اسیدهای چرب فرار باشد. افزایش بیان mRNA انتقال دهنده‌های منوکربوکسیلیک ۱ و ۲ می‌تواند بیانگر آن باشد. از آنجا که اسیدهای چرب فرار پیش ساز کلسترول در اپیتلیوم شکمبه هستند بنابراین انتظار می‌رود که بیان mRNA آنزیم کلسترول ساز نیز افزایش داشته باشد.اگرچه کلسترول جزء مهم غشای سلول‌های پستانداران است افزایش آن با نفوذپذیری، التهاب و افزایش تکثیر سلولی همراه است (۱۵) و به مقدار زیادی هموستاز می‌شود. بنابراین وقتی جذب اسیدهای چرب فرار افزایش می‌یابد ممکن است ژن‌های درگیر در متابولیسم آنها برای حفظ هموستازی سلول و کل

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱. فهرست مشخصات پرایمرهای مورد استفاده.

نام ژن‌ها	مشخصه ژن	توالی پرایمر	اندازه	راندمان پرایمر
Monocarboxylate transporter, isoform ۱ (MCT-۱)	XM_۰۰۴۰۰۲۳۳۵/۱	Sense:TCTGTAACACTGTGCAGGAACT Antisense:AAGCCGGATTTAAGTTGAAGG	۸۰	۹۳
Monocarboxylate transporter, isoform ۴ (MCT-۴)	XM_۰۰۴۰۱۳۰۵۳/۱	S: AAGTTCTCCAGCGCATTG A:TTACCCAGCACCAGCACAAG	۱۶۷	۸۱
۳-hydroxy-۳-methylglutaryl-CoA synthase ۱(cytosol) (HMGCS۱)	XM_۰۰۴۰۱۷۰۱۱/۱	S:ATCGGCGTGTTTTCTTACGG A:TCGGAGCTTCATGTTTTCAGC	۱۸۳	۹۶
۳-hydroxy-۳-methylglutaryl-CoA synthase۲ (mitochondrial) (HMGCS۲)	XM_۰۰۴۰۰۲۳۹۰/۱	S: TTTCACACGCCTTTCTGCAA A:TACGTGGAGAGGTAGAGGGA	۲۳۳	۸۵
RPL۱۹(Ribosomal ProteinL۱۹)(Housekeeping gene)	XM_۰۰۴۰۱۲۸۳۷/۱	S:TGACCGCCACATGTATCACAGCCTG A:GCCAGAAGCTTCTTGCGAGCC	۱۲۳	۱۰۰

جدول۲. میانگین حد اقل مربعات تغییرات چند برابری نسبی بیان ژن‌ها در بافت شکمبه بره‌های تغذیه شده با کنسانتره بالا و مونسین و مخلوط روغن نسبت به بره‌های تغذیه شده با کنسانتره بالا[۱]. جیره شاهد: بدون افزودنی، مونسین:۳۰mg مونسین به ازای هر بره در روز، روغن:۱۰۰g روغن (۴۰g روغن ماهی به اضافه ۶۰g روغن آفتابگردان) به ازای هر بره در روز. مقادیر بیان ژن برای جیره شاهد به طور جداگانه برای جیره‌های مونسین و روغن نسبت به ۱ با روش Pfaffl در سال ۲۰۰۱ نرمال سازی شده است (۲۵). (*) حروف متفاوت در هر ستون نشانه اختلاف معنی‌دار از لحاظ آماری است ($p<۰/۰۵$).

ژن‌ها	جیره‌های آزمایشی			SEM	p-Value
	شاهد	مونسین	روغن		
MCT۱	۱/۴۳ ^{b}	۱/۸ ^{a}	۰/۴۸ ^{c}	۰/۰۹	<۰/۰۰۰۱
MCT۴	۰/۸۹ ^{b}	۱/۲۳ ^{a}	۰/۲۰ ^{c}	۰/۰۶	<۰/۰۰۰۱
HMGCS۱	۱/۳۴ ^{b}	۱/۱۰ ^{c}	۱/۶۵ ^{a}	۰/۰۶۱	<۰/۰۰۰۱
HMGCS۲	۰/۷۸ ^{b}	۱/۲۰ ^{a}	۰/۶۹ ^{b}	۰/۰۶۳	<۰/۰۰۰۱

بدن تنظیم شوند. در این ارتباط به نظر می‌رسد هموستازی کلسترول یک بخش کلیدی توسعه بافت شکمبه‌ای در پس از شیرگیری نیز باشد (۲۰). تنظیم کاهشی آنزیم‌های کلسترول ساز با افزایش غلات در جیره گاوهای شیری توسط Steele و همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز گزارش شده است.

عدم تغییر در بیان mRNA آنزیم کتوژنیک در اپیتلیوم شکمبه بره‌های تغذیه شده با روغن به دلیل تأثیرات روغن‌های غیر اشباع روی تخمیر شکمبه‌ای (۳۴) قابل درک است. چربی‌ها سبب کاهش اسیدوز در شکمبه شده‌اند که بخشی از آن می‌تواند مربوط به کنترل سرعت و مقدار تخمیر کربوهیدرات در شکمبه باشد (۲۲). اگر فرض کنیم که روغن با تأثیر بر نرخ تخمیر در محیط شکمبه با توجه به تنظیم کاهشی پروتئین‌های انتقال دهنده پروتون داخل سلول سبب تعدیل pH سلول‌های اپیتلیالی شکمبه شده باشد و با توجه به این که اسیدهای چرب فرار پیش ماده برای تولید کلسترول در اپیتلیوم شکمبه نیز هستند انتظار می‌رود فعالیت آنزیم‌های کلیدی تولید کلسترول نیز کاهش یابد. اما در این مطالعه دو فرض برای افزایش بیان mRNA آنزیم HMGCS۱ وجود دارد. نخست اینکه به دلیل توانایی بالای سلول‌ها در حفظ هموستازی کلسترول احتمال دارد اسیدهای چرب فرار تغییر مسیر متابولیکی یافته و به جای تولید کتون‌ها به طرف تولید کلسترول تغییر مسیر داده باشند. دوم اینکه در فرآیند بیوهیدروژناسیون در شکمبه بخش زیادی از اسیدهای چرب غیر اشباع به اسیدهای چرب اشباع تبدیل شده و از روده جذب می‌شوند (۳۴). اسیدهای چرب اشباع پیش ساز کلسترول هستند (۱۸) افزایش بیش از ۲ برابری کلسترول خون بره‌های تغذیه شده با روغن و تنظیم افزایشی فاکتور رونویسی فعال کننده ژن‌های تولید کننده کلسترول در بافت آدیپوز (داده‌های منتشر نشده) در مقایسه با شاهد می‌تواند بیانگر افزایش کلسترول سلول‌های اپیتلیالی باشد. مطالعات تکمیلی این پژوهش (داده‌های منتشر نشده) کاهش التهاب و زخم و افزایش اندازه پرزهای شکمبه بره‌های تغذیه شده با روغن را نشان داد. همچنین از آنجا که مقدار روغن مصرفی روزانه هر بره بالا بوده است، علاوه بر بیوهیدروژناسیون شکمبه‌ای اسیدهای چرب، مقداری از اسیدهای چرب غیر اشباع از روده جذب شده و با وارد شدن به بافت‌های غیر کبدی می‌توانند التهاب سلولی را کاهش دهند. با افزایش ورود اسیدهای چرب غیر اشباع و افزایش سیالیت غشا سلول‌های اپیتلیالی بهبود در جذب و انتقال اسیدهای چرب فرار ممکن می‌شود و با افزایش ظرفیت جذب از تجمع پروتون در سلول جلوگیری می‌شود. کاهش بیان پروتئین‌های انتقال دهنده پروتون‌ها در اپیتلیوم بره‌های تغذیه شده با روغن نیز می‌تواند موید آن باشد.

نتیجه‌گیری کلی: با توجه به اثرات افزودن مونسین و روغن در جهت کاهش اسیدوز شکمبه‌ای که در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است، نتایج این پژوهش نشان داد تغییر در بیان ژنی پروتئین‌های فعال در مسیرهای متابولیک سلول‌های اپیتلیال شکمبه در پاسخ به جیره‌های حاوی مونسین و روغن غیر اشباع می‌تواند به عنوان بخشی از مکانیسم‌های پیشنهادی کاهش اسیدوز شکمبه‌ای در سطح سلول‌های اپیتلیوم شکمبه باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از رئیس پژوهشکده نانوبیوتکنولوژی پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی- ابن سینا (دکتر امیرحسن زرنانی) و مسئول آزمایشگاه Real time PCR پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی- ابن سینا (خانم عدالتخواه) و پروفسور

www.SID.ir

Archive of SID

Aschenbach از دانشــگاه برلین و معاونت پژوهش و فناوری دانشــگاه زنجان کــه نهایت همکاری را در به انجام رســیدن این پایان نامه مبذول فرمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Aschenbach, J.R., Bilk, S., Tadesse, G., Stumpff, F., Gabel. G. (2009) Bicarbonate - dependent and bicarbonate – independent mechanisms contribute to nondiffusive uptake of acetate in the ruminal epithelium of sheep. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 296: G1098-G1107.
2. Baldwin, R. L. (1998) Use of isolated ruminal epithelial cells in the study of rumen metabolism. J Nutr. 128: 293S–296S.
3. Bevans, D.W., Beauchemin, K.A., Schwartzkopf-Genswein, S.K., McKinnon, J.J., McAllister, T.A. (2005) Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. J Anim Sci. 83: 1116-1132.
4. Dempsey, M.E. (1974) Regulation of steroid biosynthesis. Ann Rev Biochem. 43: 967–990.
5. Dengler, F., Rackwitz, R., Benesch, F., Pfannkuche, H., Gäbel, G. (2013) Bicarbonate-dependent transport of acetate and butyrate across the basolateral membrane of sheep rumen epithelium. Acta Physiol. (Oxf.). doi: 10.1111/apha.12155.
6. Ellis, J.L., Dijkstra, J., Bannink, A., Kebreab, E., Hook, S.E., Archibeque, J. (2012) France high-grain-fed beef cattle Quantifying the effect of monensin dose on the rumen volatile fatty acid profile in high-grain-fed beef cattle. J Anim Sci. 90: 2717-2726.
7. Firth, S.M., Baxter, R.C. (2002) Cellular actions of the insulinlike growth factor binding proteins. Endocr Rev. 23: 824–854.
8. Gäbel, G., Aschenbach, J.R. (2006) Ruminal SCFA absorption: channelling acids without harm. In: Ruminant Physiology: Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress. Sejrsen, K., Hvelplund, T., Nielsen, M.O. (eds.). (1st ed.) Wageningen Academic Publishers. The Netherlands.
9. Gäbel, G., Aschenbach, J.R., Müller, F. (2002) Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. Anim Health Res Rev. 3: S. 15-30.
10. Harmon, D.L., Gross, K.L., Krehbiel, C.R., Kreikemeier, K.K., Bauer, M.L., Britton, R.A. (1991) Influence of dietary forage and energy intake on metabolism and acyl-CoA synthetase activity in bovine ruminal epithelial tissue. J Anim Sci. 69: 4117-4127.
11. Hegardt, F.G. (1999) Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. Biochem J. 15; 338. Pt 3: 569-82.
12. Huntington, G.B. (1990) Energy metabolism in the digestive tract and liver of cattle: Influence of physiological state and nutrition. Reprod Nutr Dev. 30: 35–47.
13. Kirat, D., Masuoka, J., Hayashi, H., Iwano, H., Yokota, H., Taniyama, H., Kato, S. (2006) Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short-chain fatty acids absorption in caprine rumen. J Physiol. 576.Pt. 2: 635-47.
14. Kirat, D., Matsuda, Y., Yamashiki, N., Hayashi, H., Kato, S. (2007) Expression, cellular localization, and functional role of monocarboxylate transporter 4 (MCT4) in the gastrointestinal tract of ruminants. Gene. 391: 140–149.
15. Liao, J.K., Laufs, U. (2005) Pleiotropic effects of statins. Ann Rev Pharmacol Toxicol. 45: 89–118.
16. Meredith, D., Christian, H.C. (2008) The SLC16 monocarboxylate transporter family. Xenobiotica. 38: 1072–1106.
17. Müller, F., Huber, K., Pfannkuche, H., Aschenbach, J., Breves, G., Gabel, G. (2002) Transport of ketone bodies and lactate in the sheep ruminal epithelium by monocarboxylate transporter 1. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 283: G1139–G1146.
18. Murray, K.R., Granner, K.D. (2003) Cholesterol synthesis, transport and excretion. In: Harper's Illustrated Biochemistry (26rd ed.). New York, USA. p. 219-231.
19. Mütter, G.L., Zahrieh, D., Liu, C., Neuberg, D., Finkelsrein, D., Baker, H.E., Warrington, J.A.

www.SID.ir

Archive of SID

(2004) Comparison of frozen and RNALater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays. BMC Genomics. 5: 88.

20. Naeem, A., Drackley, J.K., Stamey, J., Loor, J.J. (2012) Role of metabolic and cellular proliferation genes in ruminal development in response to enhanced plane of nutrition in neonatal Holstein calves. J Dairy Sci. 95: 1807–1820.
21. Nagaraja, T.G., Titgemeyer, E.C. (2007) Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. J Dairy Sci. 90: 17–38.
22. Nagaraja, T.G., Newbold, C.J., Van, C., Nevel, J., Demeyer, D.I. (1997) Manipulation of ruminal fermentation. In: The rumen microbial ecosystem. Hobson, P.N., Stewart, C.S. (ed.). (2nd ed.) P523. Kluwer academic publishers, Dordrecht. The Netherlands.
23. Nocek, J.E. (1997) Bovine acidosis. implication on laminitis. J Dairy Sci. 80: 1005-1028.
24. Penner, G.B., Aschenbach, J.R., Gabel, Rackwitz, G.R., Oba, M. (2009) Epithelial capacity for apical uptake of short chain fatty acids is a key determinant for intraruminal pH and the susceptibility to subacute ruminal acidosis in sheep. J Nutr. 120-1714: 39, 9.
25. Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Res. 1: e45.
26. Plazier, J. C., Krause, D. O., Gozho, G. N. and McBride, B. W. (2008) Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. The Vet. J. 176: 21-31.
27. Russell, J.B., Strobel, H.J. (1989) Effect of Ionophores on Ruminal Fermentation. Appl Environ Microbiol. 54: 872-877.
28. Schlau, N., Guan, L.L., Oba, M. (2013) The relationship between rumen acidosis resistance and expression of genes involved in regulation of intracellular pH and butyrate metabolism of ruminal epithelial cells in steers. J Dairy Sci. 95: 5866-5875
29. Steele, M.A., AlZahal, O., Walpole, M.E., McBride, B.W. (2012a) Short communication: Grain-induced subacute ruminal acidosis is associated with the differential expression of insulin-like growth factor-binding proteins in rumen papillae of lactating dairy cattle. J Dairy Sci. 95: 6072–6076.
30. Steele, M.A., Dionissopoulos, L., AlZahal, O., Doelman, J., McBrid, B.W. (2012b) Rumen epithelial adaptation to ruminal acidosis in lactating cattle involves the coordinated expression of insulin-like growth factor-binding proteins and a cholesterolgenic enzyme. J Dairy Sci. 95: 318–327.
31. Steele, M.A., Vandervoort, G., AlZahal, O., Hook, S.E., Matthews, J.C., McBride, B.W. (2011a) Rumen epithelial adaptation to high-grain diets involves the coordinated regulation of genes involved in cholesterol homeostasis. Physiol Genomics. 43: 308–316.
32. Steele, M.A., Greenwood, S.L., Croom, J., McBride, B.W. (2012c) An increase in dietary non-structural carbohydrates alters the structure and metabolism of the rumen epithelium in lambs. Can J Anim Sci. 92: 123-130.
33. Steele, M.A., Croom, J., Kahler, M., AlZahal, O., Hook, S.E., Plaizier, K., McBride, B.W. (2011b) Bovine rumen epithelium undergoes dramatic structural adaptations during grain-induced ruminal acidosis epithelial adaptation. Am J Physiol Integr Comp Physiol. 300: R1515–R1523.
34. Toral, P.G., Shingfield, K.J., Hervás, G., Toivonen, V., Frutos, P. (2010) Effect of fish oil and sunflower oil on rumen fermentation characteristics and fatty acid composition of digesta in ewes fed a high concentrate diet. J Dairy Sci. 93: 4804–4817.

www.SID.ir

Archive of SID

Changes in gene expression of metabolically active proteins in ruminal epithelium of lambs fed with oil and monensin

Mirzaei-Alamouti, H.R.*, Moradi, S., Razzazian, A., Harkinezhad, M.T.

Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

(Received 31 August 2015, Accepted 25 October 2015)

Abstract:

BACKGROUND: High grain diets in ruminants increases the risk of digestives disorders such as acidosis which may lead to high economic loss. **OBJECTIVES:** This experiment was conducted to determine the effects of an unsaturated and polyunsaturated fatty acid and monensin on gene expression of enzymes involved metabolic pathway of cell proliferation and rumen epithelial intracellular pH regulation. **METHODS:** Twenty two male Afshari lambs with live body weight of 45 ± 8 kg and six month age were used in a completely randomized design with 3 treatments replicates for 77days including 21 days adaptation period. Experimental diets were consisted of a basal high concentrate diet (16% CP and 2.75 Mcal/kg ME) and 1) no additive (control, C= 8 lambs), 2) 30 mg monensin/day/head during the whole experimental period (T1= 8 lambs), and 3) (polyunsaturated fatty acidduring the whole experimental period (T2 = 6 lambs). Lambs were killed after 77 days on the treatment diets. **RESULTS:** Compared with the C treatment, relative abundance of mRNA of monocarboxylate transporter isoforms MCT1, MCT4 and the ketogenic enzyme 3-hydroxy-3 methyl-glutaryl CoA-synthase (HMGCS2) were higher for the T1 treatment. The expression of cholesterolgenic enzyme HMGCS1 was down-regulated for the T1 treatment and that of HMGCS1 was up- regulated for the T2 treatment. The expression of MCT1 and MCT4 were down-regulated for the T2 treatment. Monensin had an additional impact on the mRNA abundance of epithelial SCFA- and acid-base transporters with concurrent changes in rumen epithelial thickness. **CONCLUSIONS:** The results suggest that adding monensin and oil as nutritional means to reduce acidosis cause changes in mRNA expression of VFA transferring proteins and limiting enzyme in the synthesis of cholesterol and Ketone bodies in the rumen epithelium.

Keyword: acidosis, gene expression, monensin, rumen epithelium, unsaturated fat

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Primers for quantitative real-time PCR.

Table 2. Least square means of relative fold change gene expression in the ruminal epithelium of finishing lambs fed to high concentrate diet containing monensin and a blend of oils. (1)Control diet: no additive, monensin diet: 30 mg monensin/day*lamb^{-1}, oil diet: 100 g oil/day*lamb^{-1}(40 g fish oil and 60 g sunflower oil).Amplification efficiency was used to calculate qPCR results according to the method of Pfaffl (2001).(a,b) Means in a column with different superscripts are significantly different ($p<0.05$).

***Corresponding author's email: alamoutih@znu.ac.ir, Tel: 024-33052645, Fax: 024-33052204**

www.SID.ir