دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

بررسی اثر تغذیه دانه گیاه شاهدانه بر بیان ژن نوروپپتید Y (*NPY*) در گوسفند بلوچی

محبوبه راشدی[۱]، علی اسمعیلی‌زاده[۲]، محمدرضا محمدآبادی[۳] و حامد خراتی کوپایی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲- استاد بخش علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، (نویسنده مسوول: aliesmaili@uk.ac.ir)
۳- استاد بخش علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۴- دانش‌آموخته دکترای تخصصی زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه شیراز
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۰
صفحه: ۱۶۴ تا ۱۷۱

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: گوسفند بلوچی یکی از بهترین نژادهای پشمی ایران به‌شمار می‌رود، این نژاد در برابر آب وهوای خشک وکمبود علوفه دارای قابلیت تحمل بالایی می‌باشد. در پژوهش حاضر اثر جیره حاوی دانه شاهدانه بر میزان بیان ژن نوروپپتید Y (*NPY*) در بافت‌های قلب، کبد، بیضه، عضله راسته و چربی‌پشت گوسفند نژاد بلوچی مورد بررسی قرار گرفت. *NPY* یکی از مهم‌ترین ژن‌های دخیل در تنظیم اشتها و تنظیم تعادل انرژی است و قابل‌توجه‌ترین اثر آن تحریک مصرف خوراک است.

مواد و روش‌ها: برای انجام این مطالعه ۱۲ رأس بره نر به شکل تصادفی به دو گروه مساوی تقسیم شدند، گروه اول با جیره شاهد (بدون شاهدانه) و گروه دوم با جیره حاوی ۱۰ درصد شاهدانه تغذیه شدند. پس از پایان دوره ۱۱۰ روزه پرواربندی و کشتار دام‌ها، RNA از بافت‌ها استخراج شد. پس از آزمون کیفیت و کمیت RNA استخراج شده و سنتز cDNA انجام گرفت. به منظور تأیید سنتز cDNA از واکنش PCR برای تکثیر قطعه‌ای از ژن کنترل *β-actin* به طول۱۱۲ جفت باز استفاده شد. در نهایت واکنش Real Time PCR جهت مقایسه میزان بیان ژن *NPY* بین گروه‌های مورد مطالعه انجام شد. میزان تغییرات بیان ژن در بافت‌های مورد مطالعه با نرم‌افزار REST آنالیز شدند.

یافته‌ها: نتایج بررسی آماری نشان داد که تغییرات بیان ژن *NPY* در بافتهای کبد و چربی پشت بین گروه‌های تیمار و شاهد در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. همچنین مشخص شد که بیان ژن *NPY* در کبد و قلب بره‌های گروه تیمار شاهدانه نسبت به گروه شاهد به‌ترتیب ۹/۸۲ و ۱/۰۳ برابر بیشتر بود. از طرف دیگر بیان ژن *NPY* در بافت‌های چربی، ماهیچه و بیضه بره‌های گروه تیمار شاهدانه نسبت به گروه شاهد به‌ترتیب ۶/۴۹ ، ۲/۷۳ و ۱/۱۸ برابر کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان اظهار کرد که افزودن دانه شاهدانه به جیره از راه افزایش فعالیت بافت کبد و تغییر فعالیت بافت چربی می‌تواند بر توان تولید حیوان اثر گذار باشد. با توجه به این‌که ژن *NPY* مرتبط با تنظیم اشتها و تعادل انرژی است اثرات شاهدانه می‌تواند بر توان تولیدی بره‌ها از طریق مکانیسم‌های مولکولی است در بافت کبد دارای نقش زیستی قابل توجهی باشد.

واژه‌های کلیدی: انتقال‌دهنده عصبی، بیان ژن، کبد، گوسفند بلوچی

مقدمه

پرورش دام یکی از مناسب‌ترین روش‌ها برای تولید پروتئین حیوانی می‌باشد. در این میان مطالعه عوامل مرتبط با تغذیه و ژنتیک می‌تواند به نحو قابل توجهی موجب افزایش عملکرد و سوددهی واحدهای پرورش دام گردد (۷). نوروپپتید Y (NPY) یک پپتید ۳۶ اسید آمینه‌ای است که در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی و هموستاتیکی در هر دو سیستم عصبی مرکزی و محیطی تأثیرگذار است، همچنین در مغز پستانداران یکی از فراوان‌ترین و گسترده‌ترین مواد انتقال دهنده عصبی است(۱۶). قابل توجه‌ترین اثر این ژن تحریک مصرف غذا است (۱۵، ۲۲، ۲۵). افزایش و کاهش بیان این ژن منجر به مصرف بیش از حد خوراک و کاهش مصرف خوراک می‌گردد. در حالت طبیعی میزان *NPY* در هیپوتالاموس تابعی از وضعیت تغذیه بدن است به صورتی که بیان آن طی گرسنگی افزایش می‌یابد و سبب افزایش اشتها می‌شود و پس از تغذیه نیز کاهش می‌یابد. طی تحقیقات انجام شده تزریق مزمن آن در نهایت منجر به چاقی می‌شود (۳). بیشتر پپتیدهای دخیل در تنظیم تعادل انرژی اثرات خود بر میزان دریافت غذا را از راه تغییرات میزان بیان *NPY* اعمال می‌کنند (۲۸،۱۹،۱۵). نتایج بررسی‌ها در حیوانات نشان دهنده این مطلب است که تزریق *NPY* باعث افزایش مصرف آب و خوراک می‌شود و نقش مهمی در کنترل رفتار مصرف خوراک به عنوان یک عامل تنظیم‌کننده می‌باشد. گوسفند بلوچی در زمره بهترین نژادهای پشمی ایران به‌شمار می‌رود، این نژاد در برابر آب وهوای خشک وکمبود علوفه دارای قابلیت تحمل بالایی می‌باشد. خاستگاه اصلی این نژاد استان سیستان و بلوچستان، قسمت‌های جنوبی استان خراسان و بخش‌هایی از استان کرمان و یزد است و از این رو به‌عنوان یکی از فراوان‌ترین نژادهای گوسفند در ایران به‌شمار می‌آید (۶). قابل ذکر است که چندقلوزائی نیز یکی از خصوصیات مطلوب گوسفند بلوچی است (۹،۱۰). نتایج حاصل از بررسی چندشکلی ژن *NPY* بر روی تولید شیر بزهای خلخالی نشان داد ارتباط معنی‌داری بین ژن *NPY3* و صفات میزان تولید شیر، درصد لاکتوز و چربی شیر وجود دارد. همچنین در خوک مشخص شده است که ژن *NPY* می‌تواند میزان مصرف خوراک و ترشح هورمون‌های LH و GH را تعدیل نماید و ممکن است به‌عنوان یک رابط عصبی بین مسیرهای متابولیکی و تولید مثل و رشد در خوک ایفای نقش نماید (۲۰،۱۳).

همچنین در موش صحرایی زوکر[1] (یک مدل حیوانی برای بررسی چاقی ژنتیکی است) گزارش شده است که ژن *NPY* نقش مهمی در تنظیم وزن بدن و مصرف خوراک دارد. در قوچ های اخته در حال رش د، افزایش مصرف خوراک موجب افزایش غلظت انسولین در پلاسما و کاهش بیان ژن *NPY* هیپوتالاموس گردید. همچنین افزودن چربی در رژیم غذایی

1- Zucker rat

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.17.4]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.164]

موجب کاهش غلظت انسولین و گلوکز پلاسما می گردد و در مقابل افزایش مقدار mRNA هیپوتالاموس برای *NPY* را به همراه داشت (۳). در پژوهشی چند شکلی جهش تک نوکلئوتیدی در ناحیه ۵`UTR ژن *NPY* و ارتباط آن با صفات تولید تخم‌مرغ و وزن بدن در مرغان بومی استان فارس، انجام گرفت. نتایج واکاوی آماری این پژوهش نشان داد که، بین چندریختی ژن *NPY* و صفات شمار تخم‌مرغ، اولین سن تخم‌گذاری، وزن تخم مرغ در ۸۴ هفتگی و وزن بدن در ۱۲ هفتگی) ارتباط معنی‌داری وجود ندارد از طرف دیگر مطالعات نشان داده‌اند که *NPY* در پرندگان به طور مشابه با پستانداران، خاصیت محرک مصرف خوراک دارد، به طوریکه بیان *NPY* در بافت مغز طیور در پاسخ به تغییرات وضعیت انرژی بدن ناشی از محدودیت غذایی و یا گرسنگی افزایش می‌یابد (۱۳). گیاه شاهدانه با نام علمی *Cannabis Sativa* در سراسر جهان پراکندگی دارد و در ایران در مناطق شمالی، اراک، کرمان و کاشان می‌روید (۸،۲). شاهدانه گیاهی یک ساله با برگ‌های قطره‌ای است. میوه این گیاه ریز و روغنی بوده و به دلیل اثرات آرامش بخشی که دارد از آن برای درمان بیماری‌ها مانند افسردگی نیز استفاده می‌شود. دانه شاهدانه به‌طور متوسط دارای ۲۵ تا ۳۵ درصد روغن، ۲۰ تا ۲۵ درصد پروتئین خام، ۲۰ تا ۳۰ درصد کربوهیدرات و ۱۰ تا ۱۵ درصد فیبر نامحلول می‌باشد (۱۳،۲۴). پروتئین عمده آن ادستین[1] است که مشابه آلبومین تخم‌مرغ با قابلیت هضم آسان است. دانه شاهدانه دارای هشت اسیدآمینه ضروری می‌باشد (۲۶،۲۴). علاوه بر پروتئین و چربی، شاهدانه محتوی مقدار کمی از کربوهیدرات‌های قابل هضم و ویتامین‌های گروه B، ویتامین C، ویتامین E و ویتامین D است (۲۶،۱۲). به دلیل خوش خوراکی بالای شاهدانه، می‌تواند به راحتی در جیره گوسفند مورد استفاده قرار گیرد و اثرات ناشی از آن را بررسی نمود. علی رغم مطالعات زیادی که بر روی ژن *NPY* انجام گرفته است هنوز پاسخ جامعی در ارتباط با مکانسیم عمل این هورمون وجو ندارد و نتایج متفاوتی در دسترس است (۲۵،۱). هدف این پژوهش بررسی مصرف شاهدانه بر میزان بیان ژن*NPY* در بره‌های نر نژاد بلوچی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

دوره پرورش

در این پژوهش به‌منظور بررسی اثر دانه شاهدانه بر بیان ژن *NPY*، ۱۲ رأس بره نر نژاد بلوچی با سن مشابه (۵ ماهگی) انتخاب شدند. دوره پرواربندی دام‌ها ۱۱۰ روز در نظر گرفته شد که ۹۰ روز بعنوان دوره اصلی پرواربندی، و ۲۰ روز ابتدایی بعنوان دوره عادت‌پذیری بود. بره‌ها به‌صورت تصادفی به دو گروه مساوی تقسیم شدند و به صورت انفرادی و آزاد تغذیه شدند. جیره شاهد برای گروه کنترل و جیره حاوی شاهدانه برای گروه هدف مورد استفاده قرار گرفت. قابل ذکر است که هر دو نوع جیره مورد استفاده دارای انرژی متابولیسمی و پروتئین خام یکسانی بودند. جیره تهیه شده به‌صورت کاملاً مخلوط دو بار در روز در ساعت‌های ۸ صبح و ۱۷ عصر در دسترس گروه‌های مورد مطالعه قرار می‌گرفت. جهت اطمینان از کافی بودن میزان جیره برای تغذیه بره‌ها، جیره بیش از نیاز حیوان استفاده گردید به نحوی که حدوداً پنج درصد جیره در پایان هر نوبت باقی می‌ماند. معیارهای وزن اولیه پروار، وزن پایانی پروار، ماده خشک مصرفی، افزایش وزن روزانه ، وزن لاشه سرد و گرم در طول دوره پرواربندی برای گروه‌های شاهد و تیمار ثبت گردید. برای بررسی آماری معیارهای ثبت شده بین گروه‌های شاهد و تیمار از طرح کاملاً تصادفی و نرم‌افزار SAS استفاده شد (۲۱). همچنین پیش از شروع دوره پرواربندی تمام بره‌ها پشم‌چینی شدند و در ابتدای دوره از داروی ضد انگل و واکسیناسیون آنتروتوکسمی نیز استفاده شد.

استخراج و ارزیابی RNA

پس از پایان دوره پرواربندی دام‌ها به‌ترتیب وزن شدند و کشتار (ذبح اسلامی) صورت گرفت. نمونه برداری از هر دام بلافاصله پس از ذبح انجام شد و نمونه‌های مورد نظر با ۶ تکرار از بافت‌های کبد، بیضه، قلب، چربی ناحیه پشت و عضله راسته بدون اتلاف وقت جمع‌آوری، و در نیتروژن مایع به منظور حفظ RNA نگهداری شدند. لازم به ذکر است که 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 با کیت استخراج RNA شرکت دنازیست آسیا و بر اساس دستور العمل شرکت سازنده انجام شد.کمیت و کیفیت RNA به‌دست آمده، با استفاده از نانودراپ و ژل الکتروفورز بررسی شد.

حذف DNA ژنومی و سنتز cDNA

آلودگی RNA استخراج شده با DNA ژنومی یکی از مواردی می باشد که می‌تواند در نتایج حاصل از اندازه گیری بیان ژن ایجاد اشکال نماید. بدین منظور برای حذف آلودگی DNA ژنومی از آنزیم DNase I برای RNA استخراج شده استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت Thermo آلمان و بر اساس دستور العمل کشور سازنده انجام شد. به منظور تأیید سنتز cDNA از واکنش PCR برای تکثیر قطعه‌ای از ژن کنترل *β-actin* به طول۱۱۲ جفت باز با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت F: 5'-GCACCACACCTTCTACAAC-3' و R: 5'-CATGATCTGGGTCATCTTCTC -3' انجام شد.

واکنش PCR ژن کنترل *β-actin* در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از واکنشگرهای استاندارد PCR شامل: آب مقطر اتوکلاو شده ۱۱ میکرولیتر، مسترمیکس ۷ میکرولیتر، غلطت هر آغازگر ۰/۶ پیکومول، ۲ میکرولیتر cDNA با غلظت ۱۰۰ نانوگرم. چرخه‌های گرمایی PCR به صورت Touchdown و طبق برنامه ذیل انجام شد. مرحله ابتدایی واسرشته‌سازی ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۰ چرخه دمایی شامل واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۱۰ چرخه دمای اتصال اولیه در دمای ۶۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۲۰ چرخه دمای اتصال ثانویه در دمای ۵۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه (در ۱۰ چرخه اولیه، در هر چرخه نیم درجه از دمای اتصال اولیه کم شد).

1- Edistin

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.17.4]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.164]

دمای سنتز نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. در پایان دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه برای سنتز نهایی استفاده شد. در نهایت تایید سنتز cDNA با روش الکتروفورز و ژل آگارز یک درصد مورد سنجش قرار گرفت.

طراحی پرایمر و اندازه‌گیری بیان ژن *NPY*

در این پژوهش طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار Primer quest و اطلاعات توالی ژن *NPY* در پایگاه اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی NM_001009452.1 انجام گرفت. پرایمرهای رفت و برگشت 5'-TGCGACACTACATCAATCTCATC-3' و 5'-TCCCGTGCTTTCTCTCATC-3' برای انجام واکنش Real time PCR بوسیله شرکت ماکروژن کشور کره‌ی جنوبی با طول قطعه تکثیری ۹۸ جفت باز سنتز گردید (شکل ۱). اندازه‌گیری بیان ژن بوسیله مستر میکس 5x Hot FIREPOL Eva Green شرکت Solisbiodine و دستگاه Rotor Gene 3000 انجام شد. حجم نهایی واکنش برابر با ۱۰ میکرولیتر شامل آب دوبار اتوکلاو ۶ میکرولیتر، پرایمرهای رفت و برگشت ۰/۵ میکرولیتر، مستر میکس ۲ میکرولیتر و cDNA بعنوان الگو یک میکرولیتر در نظر گرفته شد. قابل ذکر است که ژن *β-actin* بعنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. برنامه چرخه‌های Real time PCR در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- چرخه‌های واکنش Real time PCR برای ژن‌های *β-actin* و *NPY*

Table 1. Real time PCR cycles for NPY and *β- actin* genes

مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد چرخه
واسرشته‌سازی اولیه	۹۴	۱۲ دقیقه	۱
تکثیر	۹۴	۱ دقیقه	۴۰
	۵۷	۵۰ ثانیه	
	۷۲	۴۰ ثانیه	
سنتز نهایی	۷۲	۹۰ ثانیه	۱

نتایج به‌دست‌آمده از واکنش Real time PCR با استفاده از نرم‌افزار آماری REST[1] (http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/.) و روش ΔΔCt مورد بررسی قرار گرفتند و تغییرات بیان ژن *NPY* در بافت‌های (کبد، بیضه، قلب، چربی ناحیه پشت و عضله راسته) بین تیمار و شاهد ارزیابی شد.

```
  1 cccctagaag agcgcgccag actactgagc cctagccacc cagccacgcc cgccagccac
 61 ccagcccgcc accatgctgg gtagcaagcg actggggttg tccggactga ccctcgccct
121 gtccctgctc gtgtgcctgg gcgccctggc cgaggcgtac ccctccaagc ctgacaaccc
181 tggcgacgac gctccggcgg aggacttggc cagatactac tcagcgctgc gacactacat
241 caatctcatc accaggcaga gatacgggaa acgatctagc cccgagaccc tgatttcaga
301 cctcttgatg agagaaagca cgggaaacat tcccagaact aggctggaag acccttctat
361 gtggtgatgg gaaatgaaac ttgctctcca gtctctgcct ctttttcaac ccccatttca
421 tcctgtaaaa ctagagtctg ccagtcctcc ca
```

شکل ۱- نمای شماتیک از ناحیه ۹۸ جفت بازی تکثیر شده در واکنش Real time PCR. طراحی پرایمر بر اساس ناحیه کدینگ ژن *NPY* انجام گرفت که با رنگ قرمز مشخص شده است. ناحیه تکثیری ۹۸ جفت بازی در ناحیه کدینگ ژن با رنگ زرد های لایت شده است

Figure 1. Schematic view of 98 bp region amplified in Real time PCR reaction. The primer was designed based on the coding region of the NPY gene, which is highlighted in red color. The amplification region (98 bp) in the gene coding region is highlighted in yellow color

نتایج و بحث

اندازه‌گیری معیارهای مرتبط مصرف ماده خشک و وزن بره‌ها

در این پژوهش به منظور بررسی اثر شاهدانه بین گروه‌های مورد مطالعه معیارهای وزن اولیه پروار، وزن پایانی پروار، ماده خشک مصرفی، افزایش وزن روزانه، وزن لاشه سرد و گرم در طول دوره پرواربندی ثبت گردید. جدول ۲ نتایج واکاوی آماری معیارهای اندازه‌گیری شده را نشان می‌دهد. بدین ترتیب میانگین وزن پایانی پروار، میانگین افزایش وزن روزانه و میانگین ماده خشک مصرفی بین گروه شاهد و تیمار معنی‌دار گزارش گردید. نتایج مشابه نشان داده‌اند که استفاده ۱۰ درصدی از دانه شاهدانه در جیره حاوی ۱۴ درصد پروتئین خام از طریق بهبود قابلیت هضم ماده خشک و پروتئین خام می‌تواند موجب افزایش وزن روزانه و مصرف ماده خشک گردد (۱۴).

1- Relative expression software tool

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.17.4]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.164]

جدول ۲- نتایج ثبت معیارهای مرتبط با مصرف ماده خشک و وزن برهها
Table 2. Results of recording dry matter intake and weight of lambs

معیارها	شاهد	تیمار	معنی‌داری
میانگین وزن اولیه پروار (کیلوگرم)	۲۵/۷۱ ۱±/۴۳	۲۵/۸۵ ۱±/۸۹	N.S
میانگین وزن پایانی پروار (کیلوگرم)	۴۲/۰۳ ۱±/۸۹	۴۳/۶۴ ۱±/۹۵	*
میانگین ماده خشک مصرفی (کیلوگرم در روز)	۱/۳۳ ۰±/۰۲	۱/۱۵ ۰±/۰۲	**
میانگین افزایش وزن روزانه (گرم)	۱۹۴/۲۸ ۰±/۶۲	۲۱۱/۷۳ ۰±/۸۵	*
وزن لاشه گرم (کیلوگرم)	۲۰/۷۶ ۱±/۲۲	۲۱/۲۲ ۱±/۲۵	N.S
وزن لاشه سرد (کیلوگرم)	۱۹/۰۳ ۱±/۲۵	۲۰/۲۹ ۱±/۱۲	N.S

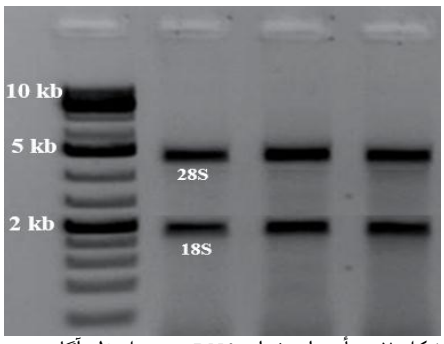
ns: غیرمعنی‌دار **: معنی‌داری در سطح یک درصد *: معنی‌داری در سطح پنج درصد

استخراج RNA

وجود دو باند شارپ 18S و 28S در نتایج الکتروفورز نشان از وجود RNA بود به نحوی که عدم وجود باندهای اضافی نشان‌دهنده کیفیت مطلوب RNA استخراج شده است (شکل ۲). علاوه بر این برای تأیید نمونه‌های RNA استخراج شده و همچنین تعیین مقدار لازم برای ساخت cDNA ارزیابی نمونه‌های استخراج شده بوسیله دستگاه نانودراپ نیز ارزیابی شد. نتایج خوانش‌ها در نسبت جذب‌های ۲۶۰/۲۳۰ و ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر کیفیت و کمیت مطلوب RNA بدست آمده را تأیید کرد. جدول ۳ خلاصه‌ای از نتایج سنجش دستگاه نانو دراپ را برای بافت‌های مختلف نشان می‌دهد.

تأیید سنتز cDNA

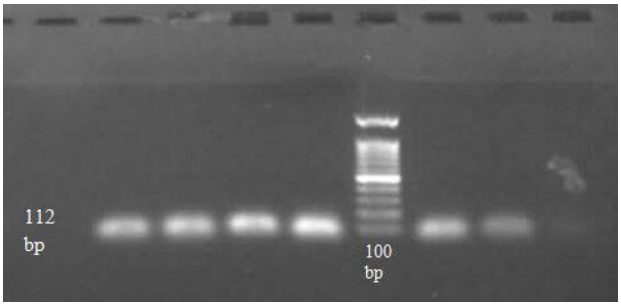
برای اطمینان از صحت سنتز cDNA بوسیله پرایمرهای ژن کنترل داخلی واکنش PCR انجام شد و محصول به‌دست آمده روی ژل آگارز بررسی شد. تکثیر قطعه ۱۱۲ جفت بازی سنتز cDNA را تأیید نمود (شکل ۳).



شکل ۲- تأیید استخراج RNA به وسیله ژل آگارز
Figure 2. Confirmation of RNA extraction by agarose gel

جدول ۳- نتایج نانودراپ نمونه‌های RNA استخراج شده در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر برای بافت های مختلف (برای هر بافت نتایج یک تکرار آورده شده است)
Table 3. Nanodrop results of extracted RNA samples at 260 and 280 nm for different tissues (one replication results is presented for each tissue)

بافت	غلظت (ng/µl)	۲۶۰/۲۸۰	۲۶۰/۲۳۰	جذب ۲۶۰ نانومتر	جذب ۲۸۰ نانومتر
کبد	۲۶۶۷/۷	۲/۱۱	۲/۱۳	۶۶/۶۹	۳۱/۶۷
قلب	۶۱۹/۴	۲/۰۸	۲/۱۷	۱۵/۴۹	۷/۴۵
بیضه	۳۰۱۶/۷	۲/۱۲	۲/۱۵	۷۵/۴۲	۳۵/۵۱
عضله	۱۰۸۷/۳	۲/۰۱	۰/۹۶	۲۷/۱۸	۱۳/۵۲
چربی پشت	۱۴۷/۲	۲/۰۷	۱/۳۷	۳/۶۸	۱/۷۷

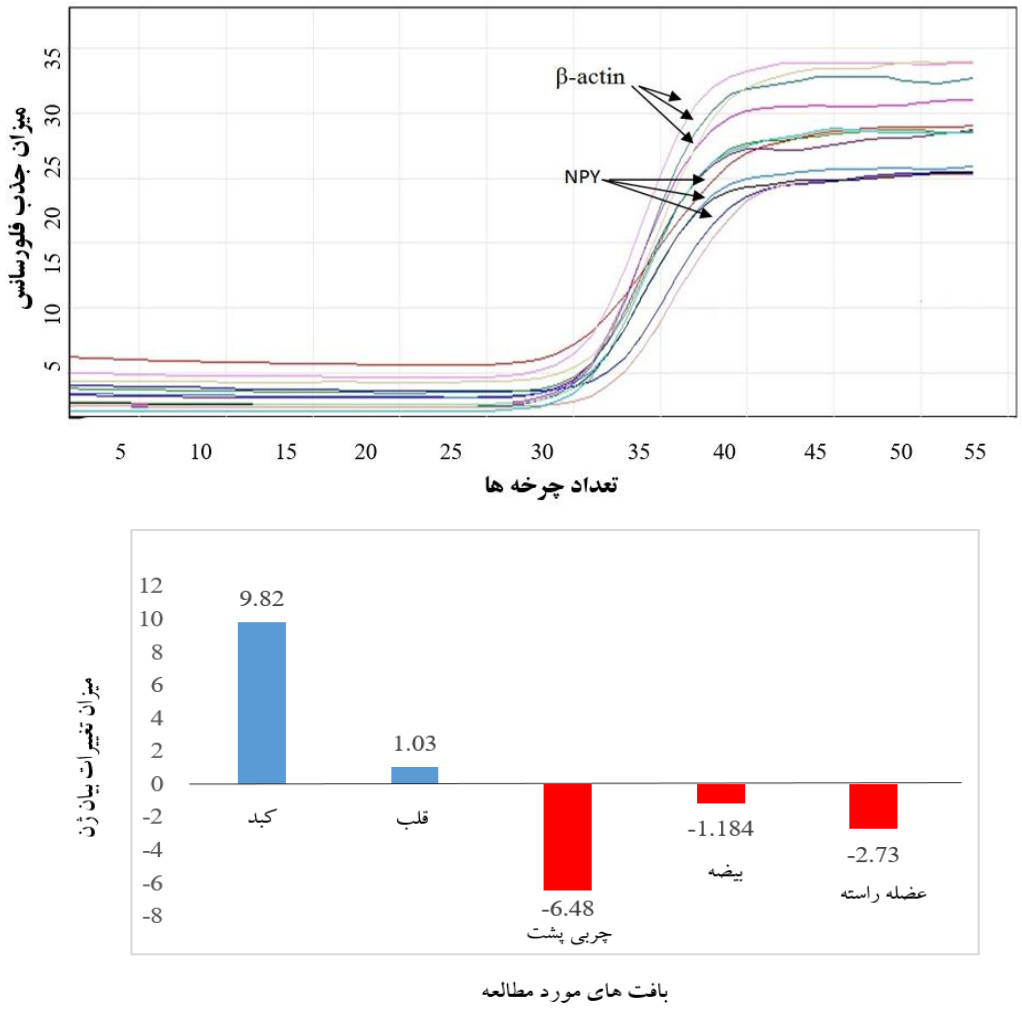


شکل ۳- تأیید cDNA سنتز شده به‌وسیله ژل آگارز
Figure 3. Confirmation of synthesized cDNA by agarose gel

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.17.4]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.164]

نتایج واکنش Real time PCR

به منظور تأیید تکثیر ژن‌های *NPY* و*β-actin* در واکنش Real time PCR از نتایج نمودار بازتاب فلورسنت در چرخه‌های واکنش استفاده گردید (شکل ۴). افزایش میزان Ct در حدود سیکل ۳۵ به بعد نشان دهنده صحت انجام واکنش می‌باشد. همچنین بررسی نتایج نمودار ذوب ژن هدف *NPY* و ژن کنترل *β-actin* بیان‌کننده این مطلب بود که در طول واکنش غیر از محصول مورد نظر هیچ محصول دیگری تکثیر انجام نشده است. به‌عبارت دیگر نتایج منحنی ذوب نشان‌دهنده تکثیر اختصاصی قطعات مربوط به ژن‌های مورد مطالعه بود. داده‌های Ct بدست آمده با روش ΔΔCt و نرم‌افزار REST آنالیز شدند. نتایج آنالیز آماری نشان داد که تغییر بیان ژن *NPY* بین گروه شاهد و گروه جیره غنی شده با شاهدانه در بافت کبد و چربی پشت در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. نسبت تغییرات بیان ژن *NPY* در گروه تیمار به شاهد در شکل ۵ خلاصه شده است. اعداد مثبت نشان‌دهنده افزایش بیان نسبت به شاهد و اعداد منفی نشان‌دهنده کاهش بیان نسبت به شاهد هستند. برای نمونه ژن *NPY* در کبد نمونه تیمار شده با شاهدانه ۹/۸۲ برابرافزایش بیان نسبت به گروه شاهد داشت (شکل ۵).



شکل ۵- میزان تغییرات بیان ژن *NPY* در بافت‌های مورد مطالعه بین گروه کنترل و تیمار
Figure 5. The fold change of *NPY* gene expression in the studied tissues between the control and treatment groups

دانه شاهدانه دارای مقادیر قابل توجهی چربی‌های غیراشباع با چند پیوند دوگانه (PUFA)[1] است (۵)، بسیار مغذی بوده و قابلیت هضم بالایی دارد (۱۷) و غلظت کل لیپیدهای سرم و لیپوپروتئین‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۴). از طرفی افزایش بیان ژن *NPY* در نهایت منجر به افزایش اشتها و کاهش بیان ژن *NPY* منجر به کاهش تمایل به مصرف خوراک می‌شود (۲۵،۸). در جوجه‌های گوشتی گزارش شده است که با افزودن شاهدانه به جیره، میزان لیپوپروتئین دارای چگالی بالا (HDL)[2] در سرم به‌طور معنی‌داری افزایش یافته و از میزان لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL)[3]، لیپوپروتئین با

1- Poly unsaturated fatty acid
2- High density lipoprotein
3- Low density lipoprotein

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.17.4]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.164]

چگالی خیلی پایین (VLDL)[1] و تری‌گلیسرید (TG)[2] به طور معنی‌داری کاسته می‌شود (۱۸). به دلیل اینکه HDL وظیفه دارد کلسترول را از سایر بافت‌ها برای دفع به کبد وکیسه صفرا منتقل کند و موجب افزایش فعالیت کبد گردد. بنابراین، می‌توان بیان کرد که در همین راستا فعالیت کبد افزایش یافته و بیان *NPY* به منظور افزایش دریافت خوراک، افزایش می‌یابد. کبد در حفظ تعادل و تنظیم هورمون‌های بدن نقش دارد. همچنین در ذخیره‌سازی و متابولیسم چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها و پروتئین نقش دارد. کبد محل ذخیره گلوکز (قند خون) است و گلوکز را به گلیکوژن تبدیل می‌کند و در خود ذخیره می‌کند در صورت نیاز گلیکوژن را دوباره تبدیل به گلوکز کرده و وارد جریان خون می‌کند. به همین ترتیب *NPY* مسئول تنظیم تعادل انرژی است، در پژوهشی که در همین رابطه گزارش شد بیان ژن *NPY* در موش صحرایی با رژیم کم‌کالری بیشتر از رژیم پر کالری بود (۲۷). همچنین مشخص شده است که عدم تعادل انرژی و تخلیه گلیکوژن کبد موجب بازسازی گلیکوژن و ترشح *NPY* بیشتر می‌گردد (۴).

در تأیید نتایج پژوهش حاضر، پژوهشی که بر روی جوجه‌های گوشتی تیمار شده با دانه شاهدانه صورت گرفت نشان داد که تفاوت معنی‌داری در اندازه کبد جوجه‌های تیمار شده با دانه شاهدانه در مقایسه با گروه شاهد وجود دارد. به شکلی که بزرگ‌ترین کبد مربوط به تیمار شاهد و کوچک‌ترین کبد مربوط به تیمارهای ۵ و ۵/۷ درصد دانه شاهدانه در جیره بود. وزن کبد به‌طور مستقیم متاثر از میزان فعالیت کبدی و انباشت چربی در آن می‌باشد (۱۱). بطور مشابه، در پژوهشی مشخص شد که که جوجه‌های گوشتی تیمار شده با شاهدانه (جیره حاوی ۷/۵ درصد شاهدانه) در مقایسه با گروه شاهد به دلیل کاهش کلسترول و اسیدهای چرب اشباع و افزایش میزان امگا ۶ و امگا ۳ در گوشت دارای کیفیت گوشت بالاتری هستند (۱۸). مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن *NPY* در بافت چربی تا شش برابر کاهش داشته است که این امر را می توان به‌دلیل وجود اسیدهای چرب غیراشباع موجود در شاهدانه که سعی در تصحیح نوع چربی بدن دارد را توجیه نمود. در همین راستا پژوهش‌ها نشان می‌دهند که افزودن شاهدانه به جیره به دلیل وجود اسیدهای چرب غیر اشباع اولئیک، لینولئیک و آلفالینولنیک می‌تواند چربی با چگالی پایین (LDL) را کاهش می‌دهد (۱۴،۲۳).

تغذیه بره‌ها با شاهدانه بیان ژن *NPY* را در کبد افزایش و در بافت چربی کاهش داد. با توجه به این‌که ژن *NPY* مرتبط با تنظیم اشتها و تنظیم تعادل انرژی است اثرات شاهدانه بر توان تولیدی بره‌ها از طریق مکانیسم‌های مولکولی است که در بافت کبد کنترل می‌شود. تغذیه با دانه شاهدانه که حاوی اسیدهای چرب غیراشباع است، فعالیت کبد و تجمع چربی در بدن را تا حدودی تحت تاثیر قرار می‌دهد (فعالیت کبد را بیشتر و تجمع چربی را کمتر می‌کند).

منابع

1. Allen, Y.S., T.E. Adrian, J.M. Allen, K. Tatemoto, T.J. Crow, S.R. Bloom and J.M. Polak. 1983. Neuropeptide Y distribution in the rat brain. Science, 221(4613): 877-879.
2. Bahmani, M., A. Zargaran, M. Rfieian-Kopaei. 2014. Identification of medicinal plants of Urmia for treatment of gastrointestinal disorders. Revista Brasilia de Farmacognosia, 24(4): 468-480.
3. Beck, B. 2006. Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. Biological Science, 361(1471): 1159-1185.
4. Barani, M., N. Afzali, S.J. Hosseini-Vashan. 2017. Effects of dietary inclusion of extruded hempseed (*Cannabis sativa* L.) on performance, carcass components, humoral immune response and plasma lipid profile of broiler chickens. Animal Production Research, 6(2): 39-49 (In Persian).
5. Callaway, J.C. 2004. Hempseed as a nutritional resource: An overview. Euphytica, 140(1-2): 65-72.
6. Daneshvar Amoli, A., S. Esmaelkhanian, M.R. Sanjabi and S.A. Mirhadi. 2019. Investigation of polymorphism of some microsatellite markers in Baluchi sheep population. Research on Animal Production, 10(25): 96-103 (In Persian).
7. Didarkhah, M. and E. Dirandeh. 2018. The effect of probiotic and prebiotic supplements on performance and health of Baluchi growing lambs. Research on Animal Production, 9(21): 36-45 (In Persian).
8. Fetterman, P.S., E.S. Keith, C.W. Waller, O. Guerrero, N.J. Doorenbos, et al. 1971. Mississippi-grown Cannabis sativa L.: preliminary observation on chemical definition of phenotype and variations in tetrahydrocannabinol content versus age, sex, and plant part. Journal of Pharmaceutical Science, 60(8): 1246-1249.
9. Gholizadeh, M., J. Fayazi, R. Valizadeh, H. Kharrati-Koopaee, G.R. Dashab. 2020. Polymorphism of some microsatellites of chromosome 3 and their association with wool production in Baluchi sheep. Animal Science Journal, 33(127): 31-42 (In Persian).
10. Gholizadeh, M. and M. Najafi. 2017. Association of genetic variation in exon 1 and 3 of FSHB gene with litter Size in Baluchi sheep. Research on Animal Production, 8(16): 177-182 (In Persian).
11. Gibson, G. and M. Roberfroid. 2008. Handbook of prebiotic. CRC Press. 65-112.
12. Hendriks, H., T.M. Malingré, S. Batterman and R. Bos. 1975. Mono-and sesqui-terpene hydrocarbons of the essential oil of Cannabis sativa. Phytochemistry, 14: 814-815.

1-Very low density lipoprotein
2-Triglyceride

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.17.4]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.164]

13. Jamalpour, M., M. Dadpasand, H. Atashi, A. Niazi and H. Kharrati-Koopaee. 2018. Bioinformatics and phylogenetic analysis for 5′ UTR region of neuropeptide Y gene and its association with body weight and egg production traits in Fars native chickens. Iranian Journal of Animal Science, 49(3): 453-458 (In Persian).
14. Karamshahi Amjazi, K., G.h. Jalilvand, O. Dayani and M.D. Banadak. 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).
15. Klok, M.D., S. Jakobsdottir and M.L. Drent. 2007. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. Obesity Reviews, 8(1): 21-34.
16. Inui, A. 2000. Transgenic approach to the study of body weight regulation. Pharmacological Reviews, 52(1): 35-62.
17. Leeson, S., J.D. Summers and L.J. Caston. 2001. Response of layers to low nutrient density diets. Journal of Applied Poultry Research, 10(1): 46-52.
18. Mahmoudi, M., P. Farhoomand and A. Azarfar. 2012. Effect of graded levels of hemp seed (Cannabis Sativa L.) on performance, organ, weight and serum cholesterol levels on broilers. Journal of Medical Plants, 11(9): 121-129 (In Persian).
19. McMinn, J.E., C.W. Wilkinson, P.J. Havel, S.C. Woods and M.W. Schwartz. 2000. Effect of intra-cerebro ventricular α-MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative Comparative Physiology, 279(2): R695-R703.
20. Richard Barb, C., R.R. Kraeling, G.B. Rampacek and G.J. Hausman. 2006. The role of neuropeptide Y and interaction with leptin in regulating feed intake and luteinizing hormone and growth hormone secretion in the pig. Reproduction Research, 6(131): 1127-1135.
21. SAS. 2005. SAS/STAT User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc, Cary, NC, USA.
22. Sato, I., H. Arima, N. Ozaki, M. Watanabe and M. Goto. 2005. Insulin inhibits neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus through GABAergic systems. Journal of Neurology, 25(38): 8657-8664.
23. Shahverdi, A., M. Ghracherlo and S.A. Hoseini. 2009. Evaluation of properties of extracted oil from cannabis seeds. Food Science and Nutrition, 2: 52-60 (In Persion).
24. Small, E. and A. Cronquist. 1976. A practical and natural taxonomy for Cannabis. Taxon, 405-435.
25. Thorsell, A., L. Caberlotto, R. Rimondini and M. Heilig. 2002. Leptin suppression of hypothalamic NPY expression and feeding, but not amygdala NPY expression and experimental anxiety. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 71(3): 425-30.
26. Wang, X.S., C.H. Tang, X.Q. Yang and W.R. Gao. 2008. Characterization, amino acid composition and in vitro digestibility of hemp (Cannabis sativa L.) proteins. Food Chemistry, 107(1): 11-18.
27. Wortley, K.E., K.D. Anderson, J. Yasenchak, A. Murphy and D. Valenzuela. 2005. Agouti-related protein-deficient mice display an age-related lean phenotype. Cell Metabolism, 2(6): 421-427.
28. Wren, A.M., C.J. Small, C.R. Abbott, W.S. Dhillo and L.J. Seal. 2001. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. Diabetes, 50(11): 2540-2547.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.17.4]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.164]

The Effect of Feeding Cannabis Seed on *NPY* Gene Expression in Baluchi Sheep

Mahboubeh Rashedi[1], Ali Esmailizadeh[2], Mohammad Reza Mohammadabadi[3] and Hamed Kharati Koopai[4]

1- Graduated M.SC. Student from Shahid Bahonar University, Kerman, with a Master's degree in Genetics and Animal Breeding
2- Professor of Animal Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, Kerman, Iran,
(Corresponding author: aliesmaili@uk.ac.ir)
3- Professor of Animal Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, Kerman, Iran
4- Graduated PhD in Biotechnology, Biotechnology Research Institute, Shiraz University
Received: July 17, 2021 Accepted: September 11, 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: Baluchi sheep is one of the best wool breeds in Iran, it is well-known as high tolerance breed against dry weather and lack of forage. In this study, the effects of supplementing diet with cannabis seed on *NPY* gene expression in heart, liver testis, back fat and longissimus muscle tissues in Baluchi sheep were investigated. *NPY* is one of the most important genes involved in regulating appetite and energy balance and its most notable effect is stimulating feed intake.

Material and Methods: 12 Baluchi male lambs were randomly divided into two groups. The first group was fed a control diet containing 14 percent crude protein and the second group was fed a diet containing 14 percent crude protein and supplemented with 10 percent Cannabis seed. At the end of the 110 days fattening period, the animals were slaughtered and tissue samples were collected and properly frozen for RNA extraction. Total RNA was extracted from tissues and cDNA was constructed following RNA quality and quantity control. In order to approve cDNA synthesis, PCR reaction was used to amplify a fragment of β-actin control gene with a length of 112 bp. Real Time PCR was performed to evaluate *NPY* gene expression. Gene expression data were analyzed by REST software.

Results: The outcomes of statistical analysis indicated that the fold change of *NPY* gene expression between control and treatment group was significant for liver and back fat tissues ($p<0.05$). Moreover, we found that *NPY* gene expression was 9.82 and 1.03 times higher in liver and heart of the lambs treated with Cannabis seed compared with the control group, respectively. In back fat, longissimus muscle and testis gene expression levels decreased 6.46, 2.73 and 1.18 times between treatment and control groups, respectively.

Conclusion: It may be concluded that addition of Cannabis seed to the diet affects the lamb fattening performance through the increased liver tissue activity and modifying fat tissue metabolism. Due to the fact that the *NPY* gene is associated with the regulation of appetite and energy balance, the effects of cannabis on the production capacity of lambs through molecular mechanisms can play a significant biological role in liver tissue.

Keywords: Baluchi sheep, Gene expression, Liver, Neurotransmitter

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.17.4]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.164]