

Effect of glutamine feeding on adipogenic genes expression in muscle of sheep under heat stress condition

ABSTRACT

One of the goals of the sheep industry is to maintain the quality of the meat and increase the muscle mass, as well as to create welfare for the livestock. In this research, in order to investigate the effect of glutamine and protein nutrition on the expression of adipogenic genes (PPARG, LPL, CEBP/B) in the muscle of Zel sheep under heat stress conditions. Sixteen Zel male lambs (average weight 31.5 ± 0.22 kg and age 4 ± 0.5 months) were randomly selected and subjected to four experimental treatments for forty-five days. Experimental treatments include: 1) Basic diet 2) Basic diet with glutamine (0.2 grams per kilogram of body weight) , 3) 10% more protein than needed, without glutamine And 4) 10% more protein with glutamine (0.2 g/kg body weight). A thigh biopsy was taken from the thigh muscle on day 42. The relative expression of genes was measured using Real Time-PCR and using specific primers of genes. The results showed that the relative expression of C/EBPB and PPARG genes increased significantly in all treatments compared to the control treatment. Also, the relative expression of LPL gene in treatment 4 (GP) was significantly decreased compared to the control treatment. Also, feeding glutamine and protein levels by changing the expression of adipogenic genes in the muscle of Zel sheep under heat stress conditions can probably have a positive effect on meat quality.

Keywords: heat stress, Zel sheep, glutamine, muscle, adipogenic genes

تأثیر تغذیه گلوتامین بر بیان ژن‌های آدیپوژنیک در ماهیچه گوسفند در شرایط تنش گرمایی

یکی از اهداف صنعت گوسفند حفظ کیفیت گوشت و افزایش توده عضلانی و همین‌طور ایجاد رفاه برای دام است. پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تأثیر تغذیه گلوتامین و پروتئین بر بیان ژن‌های آدیپوژنیک (PPARG، LPL، CEBP/B) در ماهیچه گوسفند زل در شرایط تنش گرمایی انجام شد. برای این منظور ۱۶ بره نر نژاد زل (میانگین وزن 31.5 ± 0.22 کیلوگرم و سن 4 ± 0.5 ماهگی) به‌طور تصادفی انتخاب و به مدت ۴۵ روز در چهار تیمار آزمایشی قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱) رژیم غذایی پایه ۲) رژیم غذایی پایه همراه با گلوتامین (0.2 گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)، ۳) 10% پروتئین بیشتر از احتیاجات، بدون گلوتامین و ۴) 10% درصد پروتئین بیشتر همراه با گلوتامین (0.2 گرم در کیلوگرم وزن بدن)، بود. بیوپسی ران در روز ۴۲ از ماهیچه ران اخذ شد. بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از Real Time-PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد بیان نسبی ژن C/EBPB و PPARG در همه تیمارها نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. ($P < 0.05$). همچنین بیان نسبی ژن LPL در تیمار ۴ (GP) نسبت به تیمار شاهد، کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). نتایج نشان داد تغذیه گلوتامین و سطوح پروتئین با تغییر بیان ژن‌های آدیپوژنیک در ماهیچه گوسفند زل در شرایط تنش گرمایی احتمالاً می‌تواند بر کیفیت گوشت تأثیر مثبت داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: تنش گرمایی، گوسفند زل، گلوتامین، عضله، ژن‌های آدیپوژنیک

مقدمه

در حال حاضر مهم‌ترین، دلیل پرورش گوسفند در ایران برای تولید گوشت می‌باشد. گوسفند زل یکی از نژادهای بومی ایران بوده که تنها گوسفند بی دنبه ایران است، این نژاد در مناطق شمالی ایران و عمدتاً در استان مازندران و به‌ندرت در استان گیلان پرورش داده می‌شود و هدف عمده پرورش این نژاد تولید گوشت می‌باشد (Mohammadi & Sadeghi, 2010). تنش گرمایی^۱ (HS) یک مشکل چند میلیارد دلاری برای صنعت دام است زیرا عملکرد حیوانات را در ماه‌های تابستان مختل می‌کند و منجر به ضررهای اقتصادی در سطح جهانی

^۱heat stress

می‌شود (Bernabucci *et al.*, 2010). تنش گرمایی راندمان رشد را کاهش می‌دهد و رفاه دام را به‌ویژه در حیوانات پروار به خطر می‌اندازد (Renaudeau *et al.*, 2012). منطقه ایده آل حرارتی برای گوسفندان در حدود ۱۲ تا ۳۲ درجه سانتی‌گراد است (Taylor & BOGART, 1992). افزایش متوسط شاخص دما-رطوبت^۲ (THI) می‌تواند مصرف خوراک را کاهش دهد و شاخص‌های تنش‌ش را در گاوهای پرواری افزایش دهد (Brown-Brandl *et al.*, 2017). یافته‌های مشابهی در خوک‌های تحت تنش گرمایی گزارش شد که متابولیسم اسید چرب ماهیچه‌های اسکلتی را نیز دچار اختلال کرده بود (Zhao *et al.*, 2018). عوامل التهابی تنظیم‌کننده رشد عضلات و متابولیسم هستند (Barnes *et al.*, 2019). گلوتامین در خون و بافت‌ها فراوان است، اما به‌سرعت نیز مصرف می‌شود. یکی از دلایل نرخ گردش بسیار بالای آن، مجموعه وسیعی از عملکردهای متابولیکی است که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم به گلوتامین بستگی دارد. مقدار کل انرژی سلولی حاصل از گلوتامین به مقدار اکسیداسیون و مقدار استفاده از گلوتامین بستگی دارد. این عوامل به‌نوبه خود تا حد زیادی به مقادیر مطلق و نسبت نسبی گلوتامین و گلوکز موجود و همچنین نوع و وضعیت تکثیر سلول بستگی دارد (Labow & Souba, 2000). گلوتامین، یک اسید آمینه چندوجهی است که به عنوان یک منبع انرژی برای اکثر سلول‌ها استفاده می‌شود. به عنوان یک ترکیب پروتئین و به عنوان یک متابولیت مرکزی برای انتقال اسید آمینه از راه آلفا-کتوگلوئارات و گلوتامات مهم است و نیتروژن را برای تعدادی از مسیرهای بیوسنتز فراهم می‌کند و به عنوان پیش ماده حلقه‌های پورین و پیریمیدین نوکلئیک و نوکلئوتیدها مانند آدنوزین تری فسفات (ATP) عمل می‌کند (Fathi, Tanha, & Daneshyar, 2014). گلوتامین در کنترل اسیدوز متابولیک نقش مهمی دارد. در شرایط تنش گرمایی و شرایط کاتابولیسم زیاد، استفاده از گلوتامین توسط سلول‌های ایمنی و بافت روده مسأوی و یا بالاتر از استفاده از گلوکز است (Shah, Wang, & Ma, 2020). چربی داخل ماهیچه‌ای^۳ (IMF) نسبتی از چربی در نمونه‌ای از عضله تعریف می‌شود که عاری از چربی‌های احاطه‌کننده عضلات (یعنی عاری از چربی‌های بین ماهیچه‌ای) باشد. این چربی عمدتاً^۴ از آدیپوسایت‌ها و میوسیت‌ها منشأ می‌گیرد. آدیپوسایت‌ها سلول‌های بسیار تخصص‌یافته‌ای هستند که کنش حیاتی ذخیره، متابولیسم و آزادسازی لیپیدها را بر عهده‌دارند. آدیپوسایت‌ها از سلول‌های بنیادی چندتوان از منشأ مزودرمی توسعه می‌یابند. سلول‌های اولیه مشتق شده از بافت چربی یا عضله اسکلتی می‌توانند زمانی که در گلوکز بالا کشت می‌شوند به سلول‌های چربی تمایز پیدا کنند تا بافت چربی زنده و عروقی را در هنگام کاشت در داخل بدن تشکیل دهند (Aguiari *et al.*, 2008). بنابراین، می‌توان با افزایش غلظت گلوکز پلاسما، تبدیل مستقیم میوبلاست‌ها به سلول‌های چربی را القا کرد. این امر تمایز چربی‌زایی داخل عضلانی سلول‌های ماهیچه‌های اسکلتی را افزایش می‌دهد (Guillet-Deniau *et al.*, 2004). ماهیچه‌های اسکلتی به‌طور هم‌زمان در متابولیسم چربی و گلوکز شرکت می‌کنند (Yu *et al.*, 2016). تحقیقات انجام‌شده نشان داد که متابولیسم گلوکز مخصوص ماهیچه‌های اسکلتی نیز در برهه‌هایی که در معرض تنش گرمایی مزمن قرار گرفته‌اند، مختل شده است (Barnes *et al.*, 2019). محتوای چربی عضلانی به یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای اندازه‌گیری کیفیت گوشت تبدیل شده است و سطوح چربی عضلانی تحت تأثیر ژن‌های مختلف قرار می‌گیرد (Han *et al.*, 2021). محتوای چربی عضلانی با طعم بره مرتبط است و تا حد زیادی بین افراد یک نژاد متفاوت است (Li *et al.*, 2022). ژن لیپوپروتئین لیپاز^۴ (LPL) روی کروموزوم ۸ قرار دارد و از ۱۰ آگزون تشکیل شده است. ژن LPL آنزیمی به نام لیپوپروتئین لیپاز را کد می‌کند که از ۴۷۵ اسیدآمینه تشکیل شده است (Johansen & Hegele, 2011). لیپوپروتئین لیپاز، آنزیمی که در سال ۱۹۴۳ کشف شد (De Graaf, Couture, & Sniderman, 2008). با هیدرولیز ذرات غنی از تری گلیسیرید در ماهیچه‌ها، بافت چربی و ماکروفاژها، نقش اصلی را در متابولیسم لیپید ایفا می‌کند و در نتیجه اسیدهای چرب آزاد و گلیسرول برای استفاده و ذخیره انرژی تولید می‌کند (Avis, Scheffer, Kastelein, Dallinga-Thie, & Wijburg, 2010). در سال‌های اخیر، پیوندی بین تنظیم‌کننده‌های رونویسی بیان ژن اختصاصی دودمان و کنترل تکثیر اجداد پدید آمده است. یکی از شاخص‌های اصلی این پدیده، خانواده پروتئین‌های ناحیه پایه زیپ لوسین CCAAT/پروتئین اتصال‌دهنده تقویت‌کننده^۵ (C/EBP) است. این فاکتورهای رونویسی تمایز طیفی از انواع سلول را کنترل می‌کنند و نقش کلیدی در تنظیم تکثیر سلولی از طریق تعامل با پروتئین‌های چرخه سلولی دارند. اخیراً، موقعیت آن‌ها در تقاطع بین تکثیر و تمایز، آن‌ها را به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های قوی تومورزایی تبدیل کرده است. پروتئین‌های

²Temperature-humidity index

³ Intramuscular fat

⁴ Lipoprotein lipase

⁵ CAAT/enhancer binding protein

اتصال دهنده CCAAT/افزایش دهنده (C/EBPs) خانواده‌ای از شش پروتئین هستند که به‌طور گسترده بیان شده و به‌خوبی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که از مهمترین آن‌ها ایزوفرم های $C/EBP-\alpha$, $C/EBP-\beta$ هستند (Nerlov, 2007). گیرنده فعال شده با تکثیر پراکسی زوم گاما⁶ (PPAR γ) کانون تحقیقات شدید بوده است زیرا لیگاندهای این گیرنده به‌عنوان حساس‌کننده‌های قوی انسولین مورد استفاده در درمان دیابت نوع ۲ ظاهر شده‌اند. پیشرفت‌های اخیر شامل کشف ژن‌های جدیدی است که توسط PPAR γ تنظیم می‌شوند که به توضیح چگونگی فعال‌سازی این فاکتور رونویسی غالب چربی در تنظیم گلوکز و هموستاز لیپید کمک می‌کند. افزایش سطح اسیدهای چرب آزاد در گردش و تجمع چربی در بافت غیر چربی در ایجاد مقاومت به انسولین نقش دارد. این وضعیت توسط لیگاندهای PPAR γ بهبود می‌یابد (Jiang, He, Fong, & Young, 2020).

بر این اساس در این پژوهش تأثیر تغذیه گلوتامین به عنوان ماده‌ای که مجموعه وسیعی از عملکردهای متابولیکی در بدن را به عهده دارد بر بیان ژن‌های آدیپوژنیک در ماهیچه گوسفند زل در شرایط تنش گرمایی که خسارات زیادی را به بار آورده است، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش

این پژوهش در فصل تابستان در استان مازندران و شهر ساری انجام پذیرفت. در این پژوهش ۱۶ بره نر سالم از نژاد زل (4 ± 0.5 ماهگی) و وزن متوسط 31.5 ± 0.22 کیلوگرم با وضعیت فیزیولوژیک مشابه به مدت ۴۵ روز انتخاب شد. قبل از انجام پژوهش، تمام حیوانات در برابر انگل‌های داخلی و خارجی با استفاده از آلبندازول ($7/5$ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و آیورمکتین انگل زدایی شدند. دام‌ها ۴ گروه آزمایشی و با ۴ تکرار قرار گرفتند. در این پژوهش چهار جیره آزمایشی به شرح زیر به‌عنوان تیمار آزمایشی مورد استفاده قرار گرفتند: (۱) جیره با سطح پروتئین پایه (برابر احتیاجات) و بدون افزودن گلوتامین (۲) جیره با سطح پروتئین پایه (برابر احتیاجات) و افزودن گلوتامین (0.2 گرم در هر کیلوگرم وزن بدن) (۳) جیره با 10 درصد پروتئین بالاتر از احتیاجات و بدون گلوتامین (۴) جیره حاوی 10 درصد پروتئین بالاتر از احتیاجات و با افزودن گلوتامین (0.2 گرم در هر کیلوگرم وزن بدن). کلیه جیره‌های آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار SRNS (نسخه ۱-۹-۵۵۶۶) تنظیم شدند. تنظیم جیره‌ها مطابق با توصیه‌های جدول احتیاجات غذایی گوسفندان (Council, 2007) و همچنین معادلات پیشنهادی Cannas و همکاران صورت پذیرفت (Cannas, Tedeschi, Fox, Pell, & Van Soest, 2004). برای عبوری سازی و محافظت گلوتامین، گلوتامین با فرمالدئید 1 درصد اسپری و به مدت 72 ساعت در دمای اتاق هوا خشک شد تا باقیمانده‌های فرمالدئید تبخیر شوند (Hassan, Al-Ani, Al Jassim, & Abdullah, 1990). آب به‌صورت آزاد عرضه شد. نرخ تنفس توسط شمارش حرکات پهلوی در دقیقه از فاصله 4 تا 5 متر بدون ایجاد مزاحمت در حیوان برای ارزیابی تأثیر تنش گرمایی اندازه گیری شد (Shaji Shilja et al., 2016). شدت تنش گرمایی براساس تعداد تنفس در دقیقه (تنش گرمایی کم: 40 تا 60 ، متوسط: 60 تا 80 ، بالا: 80 تا 120 و شدید: بیشتر از 120) برآورد شد (Silanikove, 2000). طی آزمایش شدت تنش گرمایی که حیوانات تجربه می‌کنند با شاخص دما و رطوبت (THI) که هم دمای محیط و هم رطوبت نسبی را شامل می‌شود برآورد شد. برای محاسبه شاخص THI، دمای محیط و رطوبت نسبی روزانه ثبت شد (جدول ۴)؛ و برای محاسبه شاخص دما-رطوبت با استفاده از معادله زیر استفاده شد (Mader, Davis, & Brown-Brandl, 2006):

$$THI = (0.8 \times \text{temperature}) + [(\% RH/100) \times (\text{temperature} - 14.4)] + 46.4$$

در این معادله، THI: شاخص حرارتی- رطوبتی، temperature: حداکثر درجه حرارت روزانه برحسب درجه سانتی‌گراد و RH: حداکثر رطوبت نسبی روزانه برحسب درصد است.

⁶ Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

جدول ۱. درصد مواد خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی بره‌های پرواری

مواد خوراکی (درصد ماده خشک)	جیره پایه با پروتئین در سطح احتیاجات	جیره با ۱۰ درصد پروتئین بیشتر از سطح احتیاجات
یونجه خشک	۲۲/۹۰	۲۲/۴۶
کاه گندم	۶/۰۰	۶/۲۹
دانه جو	۲۷/۰۰	۲۸/۹۴
دانه ذرت	۲۱/۰۰	۱۷/۹۵
کنجاله سویا	۴/۰۰	۵/۹۹
سوس گندم	۱۲/۰۰	۱۰/۴۸
کربنات کلسیم	۰/۷۰	۰/۸۰
مکمل معدنی و ویتامینی	۱/۰۰	۱/۰۰
تفاله چغندر قند	۵/۰۰	۵/۴۹
نمک	۰/۴۰	۰/۴۰
اوره	۰/۰۰	۰/۲۰
ترکیب شیمیایی (درصد)		
ماده خشک	۸۹/۲۰	۸۹/۳۲
پروتئین خام	۱۳/۴۰	۱۴/۵۰
چربی خام	۳/۹۳	۳/۷۸
خاکستر	۳/۰۷	۳/۴۰
الیاف نامحلول در شوینده خنثی	۳۶/۲۰	۳۵/۰۷
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی	۱۶/۱۷	۱۵/۹۰
کربوهیدرات غیر الیافی	۳۷/۳۳	۳۷/۲۰
انرژی قابل متابولیسم (مگا کالری بر کیلوگرم)	۲/۴۰	۲/۴۱

یک کیلوگرم مکمل معدنی دام شامل: ویتامین A (۵۰۰۰۰۰ واحد)، ویتامین D3 (۱۰۰۰۰۰ واحد)، ویتامین E (۱۰۰ میلی گرم)، کلسیم (۱۹۶۰۰۰ میلی گرم)، فسفر (۹۰۰۰۰ میلی گرم)، سدیم (۷۱۰۰۰ میلی گرم)، آهن (۳۰۰۰ میلی گرم)، منگنز (۲۰۰۰ میلی گرم)، منیزیم (۲۰۰۰ میلی گرم)، مس (۳۰۰ میلی گرم)، روی (۳۰۰۰ میلی گرم)، کبالت (۱۰۰ میلی گرم)، ید (۱۰۰ میلی گرم)، سلنیم (۱ میلی گرم) (شرکت داروسازی کیمیا رشد، گرگان)

جداسازی RNA و ساخت cDNA

استخراج RNA از نمونه بافتی با استفاده از کیت شرکت سینا کلون (EX6101) انجام شد. مراحل استخراج RNA طبق پروتکل توصیه‌های کیت اجرا شد و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت و تبدیل RNA به cDNA با استفاده از کیت DNase شرکت سینا کلون انجام شد و بعد درون PCR قرار داده شد و برنامه cDNA (که ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ دقیقه) اعمال شد. در ادامه این مرحله توسط کیت سنتز cDNA شرکت یکتا تجهیز انجام شد و پس از انجام مراحل و در نهایت انجام PCR^۷، نمونه‌ها از دستگاه خارج شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۲. اجزای تشکیل‌دهنده واکنش در Real Time PCR

اجزای واکنش	حجم (میکرو لیتر)
مستر میکس سایبر گرین	۷/۵ میکرو لیتر
cDNA	۱+۱ میکرو لیتر
جفت آغازگر اختصاصی	۱ میکرو لیتر
آب بدون RNA	۴/۵ میکرو لیتر

^۷ polymerase chain reaction

به منظور استفاده بهینه از کیت واکنش برای حجم ۱۵ میکرو لیتر تنظیم شد.

شماره دسترسی	توالی پرایمر	اندازه محصول	ژن
NM_001009394	F: AATGAAGAGATGAACGGAACG R: GCACTTTCCAACCAGGATGT	۱۱۹	LPL
AY137204	F: CTTGCTGTGGGGATGTCTC R: GGTCAGCAGACTCTGGGTTC	۱۲۱	PPARG
AY371068	F: GACAAGCACAGCGACGAGT R: GTGCTGCGTCTCCAGGTT	۱۰۲	C/EBPB
XR-006058999	F: CTGGTTGATCCTGCCAG R: ACCAGACTTGCCCTCC	۶۰۷	18S

جدول ۳. ویژگی آغازگرهای به کاررفته در این پژوهش

تجزیه تحلیل آماری داده‌های حاصل از این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده نرم افزار آماری SAS و رویه GLM انجام شد و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح احتمال معنی داری ۵ درصد صورت گرفت.

مدل آماری مورد استفاده: $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$

به طوری که: Y_{ij} = مقدار عددی تکرار j ام از تیمار i ام، μ = میانگین، T_i = اثر تیمار و e_{ij} = اثر خطای آزمایشی است.

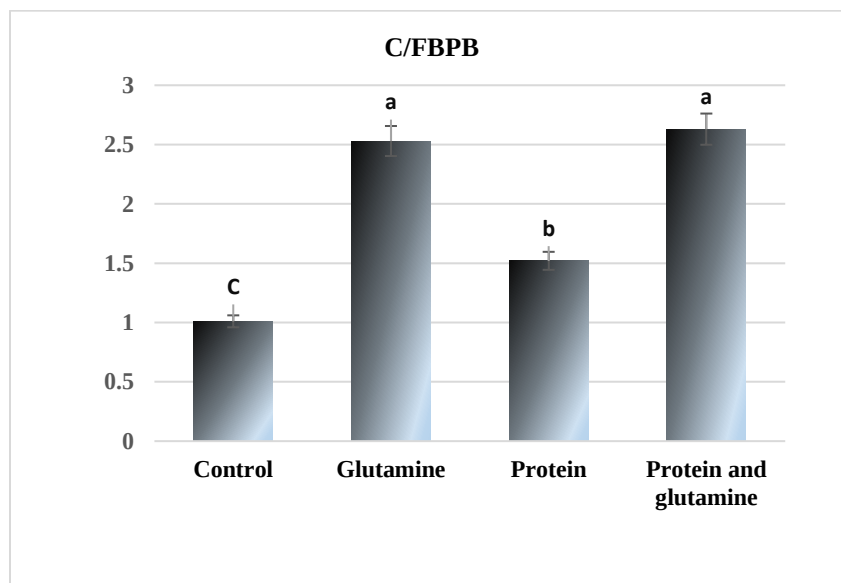
نتایج و بحث

نرخ تنفس در روز ۱۵ بین ۸۰ تا ۱۲۰ تنفس در دقیقه بود که نشانگر شدت بالای تنش گرمایی است. شاخص حرارتی- رطوبتی محیط در ماه‌های مرداد و شهریور بر اساس درجه حرارت و رطوبت نسبی محیط محاسبه شد. میانگین مقدار THI برابر ۸۲/۲۶ بود که نشان دهنده شرایط تنش گرمایی طی دوره‌های آزمایشی است (جدول ۴).

جدول ۴. درجه حرارت، رطوبت نسبی و شاخص حرارتی رطوبتی محیط در دوره پژوهش

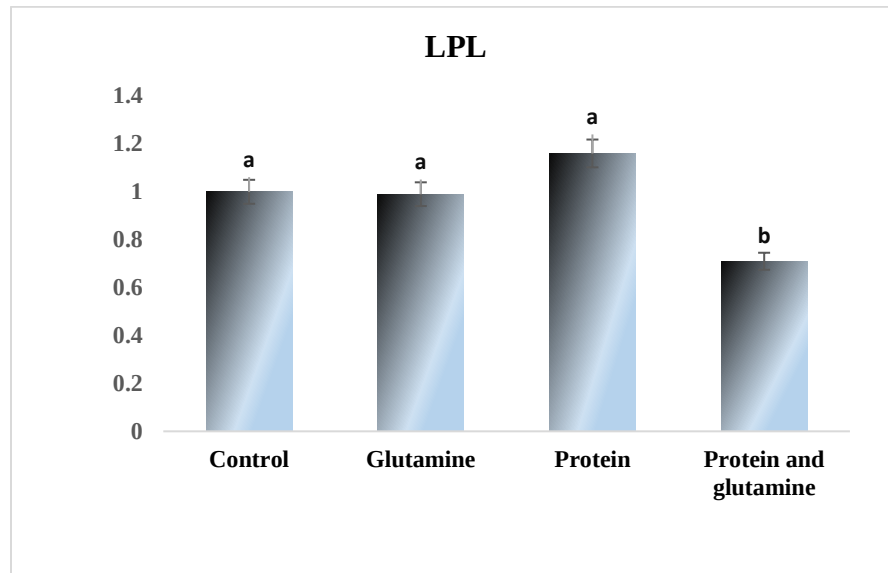
روزهای پروار	متوسط حرارت (°C)	متوسط رطوبت (درصد)	شاخص حرارتی- رطوبتی
۱ تا ۱۵	۳۱/۳±۲۶/۳۲	۷۲/۸±۶۶/۱۱	۸۳/۵±۶۱/۳۲
۱۶ تا ۳۰	۳۱/۴±۵۳/۱۸	۷۲/۱۰±۷۳/۰۰	۸۴/۶±۰۳/۰۷
۳۱ تا ۴۵	۲۸/۴±۰۶/۵۰	۷۶/۱۰±۴۶/۴۶	۷۹/۵±۱۶/۴۹

تأثیر تیمارها بر بیان ژن‌های مورد استفاده در پژوهش در شکل‌های ۱ تا ۳ نشان داده شده است. بیان نسبی ژن C/EBPB در تمامی تیمارها نسبت به نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($P\text{-value} < 0/05$). بیان نسبی ژن در تیمار شاهد، گلوتامین، پروتئین و گلوتامین+پروتئین به ترتیب $1/0 \pm 0/08$ ، $2/53 \pm 0/18$ ، $1/52 \pm 0/11$ ، $2/63 \pm 0/15$ بود و بیشترین مقدار مربوط به تیمار گلوتامین+پروتئین بود (شکل ۱).



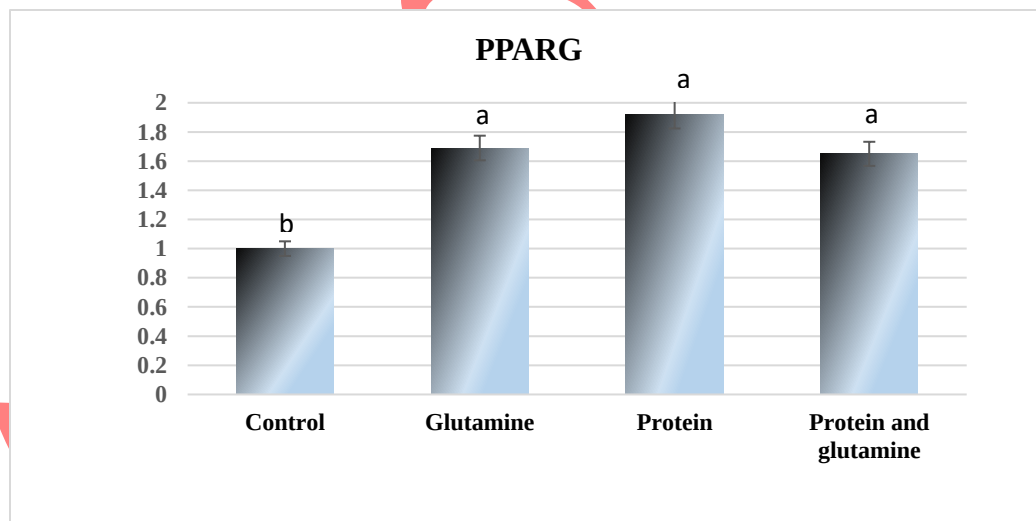
شکل ۱- تأثیر تیمارهای مختلف بر بیان نسبی ژن C/EBPB در عضله

بیان نسبی ژن LPL در تیمار گلوتامین+پروتئین نسبت به تیمار شاهد، کاهش معنی‌داری داشت ($P\text{-value} < 0/05$). بیان نسبی ژن در تیمار شاهد، گلوتامین، پروتئین و گلوتامین+پروتئین به ترتیب $1/00 \pm 0/03$ ، $0/99 \pm 0/17$ ، $1/16 \pm 0/14$ ، $0/71 \pm 0/10$ بود و کمترین مقدار مربوط به تیمار گلوتامین+پروتئین بود (شکل ۲).



شکل ۲. تأثیر تیمارهای مختلف بر بیان نسبی ژن LPL در عضله

بیان نسبی ژن PPARG در همه تیمارها، نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی داری داشت ($P < 0/05$). بیان نسبی ژن در تیمار شاهد، گلوتامین، پروتئین و گلوتامین+پروتئین به ترتیب $1/00 \pm 0/02$ ، $1/69 \pm 0/26$ ، $1/92 \pm 0/27$ ، $1/65 \pm 0/07$ بود و کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد و بیشترین مقدار مربوط به تیمار پروتئین بود (شکل ۳).



شکل ۳. تأثیر تیمارهای مختلف بر بیان نسبی ژن PPARG در عضله

محققان دریافتند که برخی از شاخص‌های متابولیسم ماهیچه‌های اسکلتی در گاو یا گوسفند هنگام مصرف رژیم‌های غذایی با سطوح مختلف پروتئین یا انرژی تغییر می‌کند (Jing et al., 2021; Lopes et al., 2020). میوفیبر اسکلتی نه تنها با فعال کردن یک سری رویدادهای سیگنال درون سلولی (اتوکیرین) بلکه با ارتباط متقابل با میوفیبرهای اطراف (پاراکیرین) یا سایر سلول‌ها به محرک گرسنگی پاسخ می‌دهد زیرا ثابت شده است که عضله اسکلتی به عنوان اتوکیرین، پاراکیرین و غدد درون ریز است (Giudice & Taylor, 2017). در حالت پس از غذا، گلوتامین تنها اسید آمینه‌ای است که از ماهیچه‌های اسکلتی آزاد می‌شود، حتی از اسیدهای آمینه ضروری برای سنتز

گلوتامین استفاده می‌کند (Roth, 2008). همین‌طور گلوتامین با فراهم آوردن ATP به عنوان یک منبع انرژی برای متابولیسم، گلوکز و اسیدهای چرب را برای استفاده در بافت‌های دیگر فراهم می‌کند (Moughan, Stevens, Stipanuk, & Caudill, 2012). آزمایشات روی حیوانات نشان داده‌اند گلوتامین نقش مهمی در تنظیم و تعدیل گلوکز از راه گلوکونئوز دارد و به عنوان انتقال‌دهنده‌ی کربن مشتق از پروتئین و نیتروژن عضلات به چرخه گلوکونئوز عمل می‌نماید (Brockman & Bergman, 1975). برخی از اعضای خانواده‌های فاکتور رونویسی PPAR α /C/EBP برای تعیین و تمایز آدیپوسیتی ضروری هستند آدیپوژن که تحت کنترل ظریف چندین فاکتور رونویسی کلیدی، از جمله ژن‌های اولیه C/EBP β و به دنبال آن ژن‌های پاسخ‌دهی بعدی مثل PPAR γ است. همان‌طور که به‌خوبی ثابت‌شده است که یک شبکه رونویسی در چربی‌زایی وجود دارد که شامل فعال‌سازی متوالی C/EBPs و PPAR γ در پاسخ به محرک‌های هورمونی است (Rosen, 2002; Walkey, Puigserver, & Spiegelman, 2000; Tang & Lane, 2012). استخوان را تنظیم می‌کند (Wang, Zhao, & Ma, 2022). گلوتامین با فراهم آوردن ATP به‌عنوان یک منبع انرژی برای متابولیسم، گلوکز و اسیدهای چرب را برای استفاده در بافت‌های دیگر فراهم می‌کند (Moughan *et al.*, 2012). تنظیم متابولیک یکی از پاسخ‌های اصلی عضله اسکلتی گوسفند تحت تنش تغذیه است. پاسخ باید مسئول کاهش وزن گوسفندان تحت تنش باشد (Qin *et al.*, 2021). بیان ژن LPL در طول HS در مقایسه با شرایط حرارتی نرمال افزایش می‌یابد، که نشان‌دهنده افزایش ظرفیت برای ذخیره تری‌گلیسیریدهای جیره و کبدی است (Sanders, Cole, Flann, Baumgard, & Rhoads, 2009). به‌طور کلی، فقدان بسیج بافت چربی یک تناقض است، زیرا تنش گرمایی نه تنها مصرف خوراک را کاهش می‌دهد، بلکه پاسخ تنش خوبی را نیز با افزایش پیام‌های لیپولیتیک آزاد شده (مثل کورتیزول و اپی‌نفرین در گردش خون) ایجاد می‌کند (Mullur, Liu, & Brent, 2014). بنابراین، بیان ژن LPL در یک بافت خاص (بافت چربی، ماهیچه‌های اسکلتی و قلب) در پاسخ به دریافت مواد مغذی و ذخایر انرژی بدن تنظیم می‌شود (Bonnet *et al.*, 2000). LPL توسط سلول‌های ماهیچه‌ای ترشح می‌شود و تجزیه شیلومیکرون و تری‌گلیسیریدهای حمل‌شده توسط لیپوپروتئین‌های با چگالی بسیار کم به گلیسرول و اسیدهای چرب را کاتالیز می‌کند (Jiang *et al.*, 2020; Mead, Irvine, & Ramji, 2002). و طبق نتایج در پژوهش حاضر باوجود گلوتامین و پروتئین بدن کمتر از ذخایر بدن استفاده می‌کند زیرا از لحاظ آماری بیان LPL در تیمار گلوتامین + پروتئین کمتر از تیمار شاهد (بدون گلوتامین و پروتئین) بود و نسبت به سایر تیمارها هم اختلاف معنی‌داری داشت. البته مدت‌زمان تنش و نوع حیوان و نژاد و نوع آزمایش و تغذیه همه عامل تعیین‌کننده در نتایج هستند و بطورمثال بیان mRNA ژن LPL در عضله گوسفند نیز پس از ۳ روز ناشتایی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (Qin *et al.*, 2021). زیرا منبع غذایی در دسترس برای تجزیه بسیار زیاد افت کرده بود و اگر این شرایط ادامه یابد، رفته‌رفته LPL از ذخایر بدن استفاده می‌کند تا اسیدهای چرب موردنیاز بدن را تأمین کند. برای پاسخ بیان LPL به تنش محرومیت از مواد مغذی که ممکن است به‌صورت پویا مانند فعالیت LPL طی دوره گرسنگی تغییر کند، پیچیده به نظر می‌رسد (Huang, Zhang, Cao, Xue, & Shen, 2018). زیرا طی گرسنگی طولانی‌مدت، حفظ هموستاز تری‌گلیسیرید ممکن است به کاهش mRNA ژن LPL در عضله نیاز داشته باشد و کاهش بیان LPL در عضله ممکن است منجر به کاهش هیدرولیز تری‌گلیسیرید شود (Spurlock *et al.*, 2001). افزایش سطح اسیدهای چرب آزاد در گردش و تجمع چربی در بافت غیر چربی در ایجاد مقاومت به انسولین نقش دارد. این وضعیت توسط لیگاندهای PPAR γ بهبود می‌یابد که ذخیره‌سازی اسیدهای چرب را در رسوبات چربی افزایش می‌دهد و بیان هورمون‌های ترشح‌شده از چربی را تنظیم می‌کند که بر هموستاز گلوکز تأثیر می‌گذارد (Janani & Kumari, 2015). همچنین ژن PPAR فعال‌شده می‌تواند اکسیداسیون اسیدهای چرب را افزایش داده و فرآیند بتا اکسیداسیون میتوکندری را تنظیم کند (Lu *et al.*, 2022). طبیعتاً بیان PPAR γ و C/EBP β که از فاکتورهای مهم رونویسی آدیپوژن هستند در سایر تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشتند و این‌چنین تجزیه و یا رسوب اسیدهای چرب را کنترل می‌کنند. در آزمایش ما هم با توجه به تأثیر پروتئین و نقش زیاد گلوتامین در بدن و بخصوص در ماهیچه اسکلتی همین انتظار را داشتیم. هنگامی که حیوانات در معرض سیستم‌های

مختلف تغذیه قرار می‌گیرند، تغییرات قابل توجهی در متابولیسم دارند. این‌ها ممکن است شامل تغییر عمده در سرعت سنتز اسیدهای چرب و رسوب چربی در بافت چربی باشد (Moibi, Christopherson, & Okine, 2000).

نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش دمای کره زمین و قرار گرفتن گوسفندان در معرض دمای محیط بالا باعث ایجاد یکسری تغییرات شدید در عملکردهای بیولوژیکی می‌شود که شامل کاهش کارایی و استفاده از خوراک، اختلال در تعادل آب، پروتئین، انرژی و مواد معدنی، واکنش‌های آنزیمی، ترشحات هورمونی است. یافته‌های به دست آمده از این پژوهش نشان داد که افزودن گلوتامین و پروتئین در جیره، تغییرات در سطح بیان ژن‌های مربوط به متابولیسم چربی در ماهیچه اسکلتی را دخیل می‌کند و مکمل‌سازی جیره با گلوتامین و پروتئین، سبب بهبود وضعیت گوسفند در شرایط تنش گرمایی می‌شود. تغذیه گلوتامین و سطوح پروتئین با تغییر بیان ژن‌های آدیپوژنیک در ماهیچه گوسفند زل در شرایط تنش گرمایی احتمالاً می‌تواند بر کیفیت گوشت و عملکرد دام تاثیر مثبت داشته باشد.

REFERENCES

- Aguiari, P., Leo, S., Zavan, B., Vindigni, V., Rimessi, A., Bianchi, K., . . . Vettor, R. (2008). High glucose induces adipogenic differentiation of muscle-derived stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(4), 1226-1231.
- Avis, H., Scheffer, H., Kastelein, J., Dallinga-Thie, G., & Wijburg, F. (2010). Pink-creamy whole blood in a 3-month-old infant with a homozygous deletion in the lipoprotein lipase gene. *Clinical genetics*, 77(5), 430-433.
- Barnes, T. L., Cadaret, C. N., Beede, K. A., Schmidt, T. B., Petersen, J. L., & Yates, D. T. (2019). Hypertrophic muscle growth and metabolic efficiency were impaired by chronic heat stress, improved by zilpaterol supplementation, and not affected by ractopamine supplementation in feedlot lambs. *Journal of animal science*, 97(10), 4101-4113.
- Bernabucci, U., Lacetera, N., Baumgard, L. H., Rhoads, R. P., Ronchi, B., & Nardone, A. (2010). Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal*, 4(7), 1167-1183.
- Bonnet, M., Leroux, C., Faulconnier, Y., Hocquette, J.-F., Bocquier, F., Martin, P., & Chilliard, Y. (2000). Lipoprotein lipase activity and mRNA are up-regulated by refeeding in adipose tissue and cardiac muscle of sheep. *The Journal of nutrition*, 130(4), 749-756.
- Brockman, R., & Bergman, E. (1975). Effect of glucagon on plasma alanine and glutamine metabolism and hepatic gluconeogenesis in sheep. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 228(6), 1627-1633.
- Brown-Brandl, T., Chitko-McKown, C., Eigenberg, R., Mayer, J., Welsh Jr, T., Davis, J., & Purswell, J. (2017). Physiological responses of feedlot heifers provided access to different levels of shade. *Animal*, 11(8), 1344-1353.
- Cannas, A., Tedeschi, L., Fox, D., Pell, A. N., & Van Soest, P. (2004). A mechanistic model for predicting the nutrient requirements and feed biological values for sheep. *Journal of animal science*, 82(1), 149-169.
- Council, N. R. (2007). *Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids*: National Academy Press.
- De Graaf, J., Couture, P., & Sniderman, A. (2008). A diagnostic algorithm for the atherogenic apolipoprotein B dyslipoproteinemias. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 4(11), 608-618.

- Fathi, M., Tanha, T., & Daneshyar, M. (2014). Effects of Glutamine Supplementation on Growth Performance and Antioxidant Status in Broilers with Pulmonary Hypertension Syndrome (PHS). *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 4(3).
- Giudice, J., & Taylor, J. M. (2017). Muscle as a paracrine and endocrine organ. *Current opinion in pharmacology*, 34, 49-55.
- Guillet-Deniau, I., Pichard, A.-L., Koné, A., Esnous, C., Nieruchalski, M., Girard, J., & Prip-Buus, C. (2004). Glucose induces de novo lipogenesis in rat muscle satellite cells through a sterol-regulatory-element-binding-protein-1c-dependent pathway. *Journal of cell science*, 117(10), 1937-1944.
- Han, F., Li, J., Zhao, R., Liu, L., Li, L., Li, Q., . . . Liu, N. (2021). Identification and co-expression analysis of long noncoding RNAs and mRNAs involved in the deposition of intramuscular fat in Aohan fine-wool sheep. *BMC genomics*, 22, 1-14.
- Hassan, S., Al-Ani, A., Al Jassim, R., & Abdullah, N. (1990). Effects of roughage to concentrate ratios and rumen undegradable protein supplementation on growth of lambs. *Small Ruminant Research*, 3(4), 317-324.
- Huang, H., Zhang, Y., Cao, M., Xue, L., & Shen, W. (2018). Effects of fasting on the activities and mRNA expression levels of lipoprotein lipase (LPL), hormone-sensitive lipase (HSL) and fatty acid synthetase (FAS) in spotted seabass *Lateolabrax maculatus*. *Fish physiology and biochemistry*, 44, 387-400.
- Janani, C., & Kumari, B. R. (2015). PPAR gamma gene—a review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 9(1), 46-50.
- Jiang, H., He, C., Fong, L. G., & Young, S. G. (2020). The fatty acids from LPL-mediated processing of triglyceride-rich lipoproteins are taken up rapidly by cardiomyocytes. *Journal of lipid research*, 61(6), 815.
- Jing, X., Wang, W., Degen, A., Guo, Y., Kang, J., Liu, P., . . . Long, R. (2021). Energy substrate metabolism in skeletal muscle and liver when consuming diets of different energy levels: comparison between Tibetan and Small-tailed Han sheep. *Animal*, 15(3), 100162.
- Johansen, C. T., & Hegele, R. A. (2011). Genetic bases of hypertriglyceridemic phenotypes. *Current opinion in lipidology*, 22(4), 247-253.
- Labow, B. I., & Souba, W. W. (2000). Glutamine. *World journal of surgery*, 24(12), 1503-1513.
- Li, J., Yang, Y., Tang, C., Yue, S., Zhao, Q., Li, F., & Zhang, J. (2022). Changes in lipids and aroma compounds in intramuscular fat from Hu sheep. *Food Chemistry*, 383, 132611.
- Lopes, R., Sampaio, C., Trece, A., Teixeira, P., Gionbelli, T., Santos, L., . . . Gionbelli, M. (2020). Impacts of protein supplementation during late gestation of beef cows on maternal skeletal muscle and liver tissues metabolism. *Animal*, 14(9), 1867-1875.
- Lu, Z., Yuan, C., Li, J., Guo, T., Yue, Y., Niu, C., . . . Yang, B. (2022). Comprehensive analysis of long non-coding RNA and mRNA transcriptomes related to hypoxia adaptation in Tibetan sheep. *Frontiers in Veterinary science*, 8, 801278.
- Mader, T. L., Davis, M., & Brown-Brandl, T. (2006). Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. *Journal of animal science*, 84(3), 712-719.
- Mead, J. R., Irvine, S. A., & Ramji, D. P. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of molecular medicine*, 80, 753-769.
- Mohammadi, H., & Sadeghi, M. (2010). Estimation of genetic parameters for growth and reproduction traits and genetic trends of growth traits in Zel sheep breed under rural production system. *Iranian Journal of Animal Science*, 41(3), 231-241.
- Moibi, J., Christopherson, R., & Okine, E. (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 tissues of sheep. *Canadian Journal of Animal Science*, 80(1), 69-77.
- Moughan, P., Stevens, B., Stipanuk, M., & Caudill, M. (2012). Digestion and absorption of protein. *Biochemical, physiological and molecular aspects of human nutrition*, 162-178.

- Mullur, R., Liu, Y.-Y., & Brent, G. A. (2014). Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological reviews*, 94(2), 355-382.
- Nerlov, C. (2007). The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends in cell biology*, 17(7), 318-324.
- Qin, J., Guo, L., Li, J., Zhang, F., Zhao, D., & Du, R. (2021). RNA-sequencing reveals the metabolism regulation mechanism of sheep skeletal muscle under nutrition deprivation stress. *Animal*, 15(7), 100254.
- Renaudeau, D., Collin, A., Yahav, S., De Basilio, V., Gourdine, J.-L., & Collier, R. (2012). Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal*, 6(5), 707-728.
- Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & development*, 14(11), 1293-1307.
- Roth, E. (2008). Nonnutritive effects of glutamine. *The Journal of nutrition*, 138(10), 2025S-2031S.
- Sanders, S. R., Cole, L. C., Flann, K. L., Baumgard, L. H., & Rhoads, R. P. (2009). Effects of acute heat stress on skeletal muscle gene expression associated with energy metabolism in rats. *The FASEB Journal*, 23, 598.597-598.597.
- Shah, A. M., Wang, Z., & Ma, J. (2020). RETRACTED: Glutamine Metabolism and Its Role in Immunity, a Comprehensive Review. *Animals*, 10(2), 326.
- Shaji Shilja, S. S., Sejian, V., Bagath, M., Mech, A., David, C., Kurien, E., . . . Raghavendra Bhatta, R. B. (2016). Adaptive capability as indicated by behavioral and physiological responses, plasma HSP70 level, and PBMC HSP70 mRNA expression in Osmanabadi goats subjected to combined (heat and nutritional) stressors.
- Silanikove, N. (2000). Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livestock production science*, 67(1-2), 1-18.
- Spurlock, M. E., Ji, S. Q., Godat, R. L., Kuske, J. L., Willis, G. M., Frank, G. R., & Cornelius, S. G. (2001). Changes in the expression of uncoupling proteins and lipases in porcine adipose tissue and skeletal muscle during feed deprivation☆. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12(2), 81-87.
- Tang, Q. Q., & Lane, M. D. (2012). Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annual review of biochemistry*, 81(1), 715-736.
- Taylor, R., & BOGART, R. (1992). Adaptation to the environment. *Scientific farm animal production*, 455, 326-332.
- Wang, X., Zhao, T., & Ma, A. (2022). Genetic mechanism of tissue-specific expression of PPAR genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) at different temperatures. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12205.
- Yu, J., Zheng, J., Liu, X., Feng, Z., Zhang, X., Cao, L., & Zhou, Z. (2016). Exercise improved lipid metabolism and insulin sensitivity in rats fed a high-fat diet by regulating glucose transporter 4 (GLUT4) and musclin expression. *Brazilian journal of medical and biological research*, 49(5), e5129.
- Zhao, L., McMillan, R. P., Xie, G., Giridhar, S. G., Baumgard, L. H., El-Kadi, S., . . . Hulver, M. W. (2018). Heat stress decreases metabolic flexibility in skeletal muscle of growing pigs. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 315(6), R1096-R1106.

Extended abstract:

Introduction

Currently, the most important reason for raising sheep in Iran is to produce meat. Zel sheep is one of the native breeds of Iran, which is the only tailless sheep in Iran. This breed is predominantly raised in the northern regions of Iran, mainly in Mazandaran province and rarely in Gilan province, and the main purpose of breeding this breed is to produce meat. Heat stress is a multibillion-dollar

problem for the livestock industry because it impairs animal performance in the summer months and leads to global economic losses.

Inflammatory factors regulate muscle growth and metabolism. Glutamine is abundant in blood and tissues, but it is consumed quickly. Its high turnover rate is due to its wide range of metabolic functions that depend directly or indirectly on glutamine. The total amount of cellular energy derived from glutamine depends on the amount of oxidation and the amount of glutamine utilization. These factors depend largely on the absolute amounts and relative ratio of glutamine and glucose available, as well as the type and state of cell proliferation.

Skeletal muscles simultaneously participate in fat and glucose metabolism. Research has shown that glucose metabolism specific to skeletal muscles is impaired in lambs exposed to chronic heat stress. Muscle fat content, a critical indicator of meat quality, is influenced by various genes and varies significantly between individuals of the same breed. Muscle fat content also contributes to lamb flavor.

Based on this, in this research, the effect of feeding glutamine as a key metabolite responsible for a wide range of metabolic functions in the body was studied in relation to the expression of adipogenic genes (LPL, C/EBP- β , PPAR γ) in the muscles of Zel sheep under heat stress conditions.

Materials and methods

In this research, 16 healthy male lambs of Zel breed (4 ± 0.5 months old) and an average weight of 31.5 ± 0.22 kg with similar physiological conditions were selected for 45 days. The animals were divided into 4 experimental groups with 4 repetitions. Experimental diets were formulated using SRNS software (version 1-9-5566). The rations were adjusted according to the recommendations of the Nutrient Requirements of Sheep (NRC, 2007) as well as the equations proposed by Cannas et al.

In order to protect glutamine, it was sprayed with 1% formaldehyde and dried at room temperature for 72 hours to evaporate any residual formaldehyde. Water was provided ad libitum.

RNA extraction from muscle tissue samples was performed using the Sinaclone commercial kit according to the manufacturer's protocol. The RNA quality was checked using electrophoresis on a 1% agarose gel, and RNA was converted to cDNA. The clone was synthesized and then put into PCR using the cDNA program (22°C for 14 minutes). In the continuation of this step, the cDNA synthesis kit of Yektatajhiz was used, and after completing the steps, the samples were stored at -80°C .

Common thermal cycling parameters (3 min at 95°C and 40 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C) were used to amplify each transcript. Samples were run in duplicate, and mRNA abundance was expressed relative to GAPDH as the housekeeping gene, which is stable under laboratory conditions. Data were normalized to a calibrator sample using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method with amplification efficiency correction.

Statistical analysis was conducted as a completely randomized design using SAS statistical software (GLM procedure). Mean comparisons were performed using Duncan's method at a 5% significance level.

Results and discussion

The average temperature-humidity index (THI) was equal to 26.82, which indicates heat stress conditions during the experimental period. Expression levels of PPAR γ and C/EBP β , which are key transcription factors in adipogenesis, showed significant increases in experimental treatments compared to the control group. These factors regulate fatty acid deposition and decomposition.

The study demonstrated that despite glutamine and protein supplementation, the body relies less on its reserves. Statistical analysis showed that LPL expression in the glutamine + protein treatment was significantly lower than in the control group (without glutamine and protein).

Conclusion

The findings of this research showed that dietary supplementation with glutamine and protein influences the expression of genes related to fat metabolism in skeletal muscle. Glutamine and protein supplementation improved the performance and meat quality of Zel sheep under heat stress conditions. Nutrition of glutamine and protein levels by changing the expression of adipogenic genes in the muscle of Zel sheep under heat stress conditions can probably have a positive effect on meat quality and livestock performance.