نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۷ شماره ۳/ سال۱۳۹۶/ صفحات ۱۶۱ تا ۱۷۴

اثر مونسین و عصاره گیاهی بر متابولیت‌های خون و شکمبه و بیان ژن ناقل اوره در اپیتلیوم شکمبه بره‌های پرواری

حمیدرضا میرزایی الموتی[1*]، مریم رضویان[2]، رضا معصومی[3] و وحید سلمانی زاویه[4]

تاریخ دریافت : ۹۵/۷/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۴

[1] دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه زنجان

[2] دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشگاه زنجان

[3] استادیار گروه علوم دامی دانشگاه زنجان

[4] مربی پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه زنجان

*مسئول مکاتبه: Email: alamoutih@znu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: مونسین و عصاره گیاهی می‌تواند با تغییر در متابولیت‌های شکمبه و خون بر بیان ژن ناقل اوره در اپیتلیوم شکمبه اثر گذارد. **هدف**: این آزمایش به‌منظور تعیین روابط بین بیان ژن ناقل اوره با متغیرهای شکمبه‌ای و خونی در بره‌های تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی مونسین و عصاره گیاهی انجام گرفت. **روش کار**: در این طرح از ۱۶ رأس بره نر نژاد افشاری (میانگین وزنی ۵/۶±۴۱ کیلوگرم و سن ۶ ماه) استفاده شد. بره‌ها به‌طور تصادفی به چهار جیره آزمایشی اختصاص داده شدند که شامل: جیره پایه، جیره پایه به‌اضافه ۳۰ میلی‌گرم مونسین در روز، جیره پایه به‌اضافه ۳۰ میلی‌گرم مونسین به‌صورت ۲ هفته در میان و جیره پایه به‌اضافه ۲ گرم عصاره گیاهی در روز برای هر رأس بود. نمونه‌های خون و نمونه‌های مایع شکمبه پیش از کشتار و نمونه‌های بافت شکمبه از قسمت شکمی شکمبه گرفته شدند. اسیدهای چرب فرار، نیتروژن اوره‌ای پلاسما و نیتروژن آمونیاکی شکمبه اندازه‌گیری شدند. میزان بیان نسبی ژن انتقال‌دهنده نوع B اوره (UT-B) با استفاده از تکنیک Real-time PCR بررسی شد. **نتایج**: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که میزان بیان نسبی ژن ناقل اوره در بره‌های تغذیه‌شده با مونسین به‌صورت دوره‌ای کاهش یافت ($P<0/05$) و غلظت نیتروژن آمونیاکی، نسبت مولی اسید بوتیریک و اسید والریک نیز در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت ($P<0/05$). **نتیجه‌گیری کلی**: درمجموع بین متغیرهای مهم، همبستگی عکس و متوسطی بین ناقل اوره با نیتروژن آمونیاکی، اسید بوتیریک و اسید والریک و همبستگی مثبت با اسیدهای چرب فرار مشاهده شد.

واژگان کلیدی: اپیتلیوم شکمبه، ژن ناقل اوره، گوسفند، تخمیر شکمبه‌ای

مقدمه

اوره به‌عنوان محصول نهایی متابولیسم نیتروژن، نقش مهمی در بازدهی اقتصادی نیتروژن نشخوارکنندگان دارد (مارینی و همکاران ۲۰۰۳). حیوانات نشخوارکننده قادرند که مقدار قابل‌توجهی از اوره را به‌جای دفع از طریق ادرار به دستگاه گوارش برگردانند. اوره‌ی برگشت داده‌شده به دستگاه گوارش بعد از هیدرولیز به دی‌اکسید کربن و آمونیاک برای سنتز پروتئین میکروبی در شکمبه

مورداستفاده قرار می‌گیرد (هارمییر و مارتنز ۱۹۸۰). اولین بار اشمیت-نیئلسن و همکاران (۱۹۵۸) نشان دادند که جیره‌های با سطوح پایین پروتئین باعث افزایش بازجذب اوره در کلیه می‌شوند و در مقابل آن جیره‌هایی که غنی از پروتئین هستند باعث افزایش دفع اوره از طریق کلیه به ادرار می‌شوند. درنتیجه، تقویت انتقال اوره به دستگاه گوارش نه تنها باعث استفاده بهینه از نیتروژن جیره می‌گردد، بلکه آلودگی‌های زیست‌محیطی حاصل از آن نیز کاهش می‌یابد. چرخش مجدد اوره با فرآورده‌های غیر پروتئینی ازجمله آمونیاک شکمبه، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و دی‌اکسید کربن تنظیم می‌شود. آمونیاک مهارکننده و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و دی‌اکسید کربن تحریک‌کننده چرخش اوره هستند (لو و همکاران ۲۰۱٤). غلظت آمونیاک شکمبه‌ای (کم‌تر از ۱ میلی‌مول بر لیتر) جریان ورود اوره خون را به شکمبه افزایش می‌دهد اما اثر غلظت اوره خون در انتقال آن به شکمبه (افزایش یا کاهش) واضح نیست و ممکن است تحت تأثیر pH سلول اپیتلیالی باشد. کاهش گام‌به‌گام pH مایع شکمبه در محیط آزمایشگاهی در حضور اسیدهای چرب کوتاه زنجیر یا دی‌اکسید کربن از ۷/٤ به ٥/٤ منجر به تغییرات غیرخطی (نمودار زنگوله‌ای شکل) انتقال اوره، با یک اوج در pH ٦/۲ شد. کاهش pH در غیاب اسیدهای چرب کوتاه زنجیر یا دی‌اکسید کربن بی‌تأثیر است (عبدون و همکاران ۲۰۱۰). بنابراین مکانیسم اثر pH بر انتقال اوره هنوز ناشناخته است. امروزه از افزودنی‌هایی مانند مونسین و عصاره‌های گیاهی جهت بهینه کردن تخمیر در شکمبه استفاده می‌شود. مونسین یک آنتی‌بیوتیک آیونوفر است که باعث تغییر در نسبت اسیدهای چرب فرار، تولید بیشتر اسید پروپیونیک و کاهش تولید متان می‌شود (دفیلد و بگ ۲۰۰۰) که این اسید پروپیونیک ممکن است در گلوکونئوژنز مورداستفاده قرار گیرد و درنتیجه در مصرف اسیدآمینه‌هایی که برای تولید گلوکز دآمینه می‌شوند صرفه‌جویی می‌گردد (برادریک ۲۰۰٤). عصاره‌های گیاهی ترکیبات ثانویه هستند که از بخش فرار گیاه حاصل از تقطیر می‌باشند. این ترکیبات دآمیناسیون و متانوژنز را مهار کرده و یون آمونیوم، متان و استات را کاهش و غلظت پروپیونات و بوتیرات را افزایش می‌دهند (هافمن و همکاران ۲۰۰۳). بنابراین فرض شده است که این مواد افزودنی، ممکن است با افزایش چرخش مجدد اوره خون به شکمبه سبب بهبود مورداستفاده قرار گرفتن نیتروژن شوند. هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثر مونسین و عصاره گیاهی به‌عنوان افزودنی‌های خوراکی بر میزان بیان ژن انتقال‌دهنده نوع B اوره در اپیتلیوم شکمبه و فراسنجه‌های شکمبه‌ای از قبیل نیتروژن آمونیاکی، اسیدهای چرب فرار، pH و نیتروژن اوره‌ای خون در بره‌های پرواری بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات و جیره‌های مورداستفاده: برای مطالعه اثرات مونسین و عصاره گیاهی بر چرخش مجدد اوره خون به شکمبه، پژوهشی در مزرعه آموزشی و پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان انجام شد. تعداد ١٦ رأس بره نر افشاری با میانگین وزنی ٥/٦±٤١ کیلوگرم و سن ٦ ماه انتخاب شدند. جیره‌ها با نرم‌افزار CNCPS تنظیم شدند که ترکیب جیره آزمایشی و مواد مغذی تشکیل‌دهنده جیره در جدول ۱ نشان داده‌شده است. بره‌ها به‌طور تصادفی به چهار جیره آزمایشی اختصاص داده شدند. جیره‌ها شامل: ۱) جیره پایه (جیره شاهد)، ۲) جیره پایه به‌اضافه ۳۰ میلی‌گرم مونسین برای هر رأس بره در روز، ۳) جیره پایه به‌اضافه ۳۰ میلی‌گرم مونسین به‌صورت ۲ هفته در میان برای هر رأس بره و ٤) جیره پایه به‌اضافه ۲ گرم عصاره گیاهی (٤٠ درصد بارهنگ، ٥ درصد نعناع، ٥ درصد صمغ کتیرا و ٥٠ درصد شکر و پکتین (نام تجاری: PLANTAGEL, Dineh Iran Pvt. Ltd) بودند. در طول دوره آزمایش بره‌ها در جایگاه‌های انفرادی نگهداری شده و دسترسی آزاد به خوراک و آب داشتند. مدت آزمایش شامل ۳ هفته عادت‌پذیری به جیره‌های آزمایشی و جایگاه انفرادی و ۸ هفته برای انجام

آزمایش بود. نسبت علوفه به کنسانتره در جیره‌های مصرفی در تمام طول دوره ۲۰ به ۸۰ درصد بود که با دست کاملاً مخلوط شده و دو بار در روز در ساعت ۹ صبح و ٤ بعدازظهر در اختیار بره‌ها قرار گرفت.

جدول ۱ - ترکیب جیره آزمایشی و مواد تشکیل‌دهنده

Table 1- Ingredients and chemical composition of experimental diet

Items	%
Alfalfa hay یونجه خشک	20.00
Ground barley grain جو آسیاب شده	65.15
Soya bean meal کنجاله سویا	10.87
Salt (NaCl) نمک	0.66
Calcium bicarbonate کربنات کلسیم	1.33
Sodium bicarbonate بی‌کربنات سدیم	1.33
Mineral and vitamin premix مخلوط مواد معدنی و ویتامین‌ها	0.66
CP پروتئین خام	16.0 ± 0.23
ME (MJ/kg DM) انرژی قابل متابولیسم (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک)	11.5

The mineral and vitamin premix contained (per kg DM): 500,000 IU Vitamin A, 100,000 IU Vitamin D, 1 g Vitamin E, 180 g Ca, 90 g P, 20 g Mg, 60 g Na, 2 g Mn, 3 g Fe, 0.3 g Cu, 3 g Zn, 0.1 g Co, 0.1 g I, 0.001 g Se and 3 g commercial antioxidant (Globatiox; containing as active ingredients ethoxyquin, propyl gallate and citric acid).

۱- مکمل‌های معدنی و ویتامینی شامل: ۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D، ۰/۱ میلی‌گرم ویتامین E، ۱۸۰ گرم کلسیم، ۹۰ گرم فسفر، ۲۰ گرم منیزیم، ٦۰ گرم سدیم، ۲ گرم منگنز، ۳ گرم آهن، ۰/۳ گرم مس، ۳ گرم روی، ۰/۱ گرم کبالت، ۰/۱ گرم ید، ۰/۰۰۱ گرم سلنیوم، ۳ گرم مواد آنتی-اکسیدان.

نمونه‌گیری

نمونه‌گیری از مایع شکمبه هر ١٤روز یک‌بار دو ساعت پس از خوراک‌دهی صبح با یک پمپ خلاء الکتریکی و شلنگ مخصوص دهانی انجام شد. هم‌چنین، بلافاصله پس از کشتار بره‌ها و پیش از پوست‌کنی، با باز کردن شکم و تخلیه امعاء و احشا در یک سطل بزرگ، مایع شکمبه از مخلوط محتویات شکمبه‌ای برداشت شد و بلافاصله pH آن اندازه‌گیری شد. برای جداسازی مواد جامد مایع شکمبه از پارچه متقالی استفاده شد. دو نمونه از مایع شکمبه صاف‌شده گرفته شد. ۸ سی‌سی از نمونه اول با ۲ سی‌سی اسیدسولفوریک ۲۵ درصد برای اندازه-گیری نیتروژن آمونیاکی و ۸ سی‌سی از نمونه دوم با ۲ سی‌سی اسید متافسفریک ۲۵ درصد برای اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار در لوله‌های آزمایش ریخته شد و نمونه‌ها در فریزر ۲۰- درجه منجمد شدند. با توجه به اینکه یکی از اهداف این آزمایش تعیین روابط بین فراسنجه‌های شکمبه‌ای با بیان نسبی ژن انتقال‌دهنده اوره بود فقط از نمونه‌های مایع شکمبه دوره آخر استفاده شد. نمونه‌های مایع شکمبه بعد از ذوب شدن، به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس مایع رویی آن جدا گردید و برای اندازه-گیری اسیدهای چرب فرار و آمونیاک استفاده شد.

غلظت اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی

غلظت اسیدهای چرب فرار و پروفایل آن با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی با تنظیم دمای ستون ١٤۰ درجه سانتی‌گراد، دمای انژکتور ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد و دمای آشکارساز ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد، و با تزریق ۰/۵ میکرولیتر از نمونه به دستگاه اندازه‌گیری شد. نیتروژن آمونیاکی شکمبه نیز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و طبق پروتکل ایندوفنول (برادریک و کنگ ۱۹۸۰) باکمی تغییر در آن که به جای کاتالیزور نیتروسدیم پروساید از سولفات منگنز استفاده شد، اندازه‌گیری گردید.

غلظت نیتروژن اوره‌ای پلاسما

نمونه‌های خون در ابتدا و هردو هفته یک‌بار در دو ساعت پس از خوراک‌دهی صبح از ورید وداج (۵ میلی-لیتر) با لوله‌های هپارین‌دار گرفته شد. در آزمایشگاه، نمونه‌ها در دستگاه سانتریفیوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و پلاسمای حاصله برای

اندازه‌گیری غلظت نیتروژن اوره‌ای پلاسما در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت نیتروژن اوره‌ای پلاسما با استفاده از کیت تجاری (پارس آزمون، ایران) و با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

تغییرات نسبی بیان ژن

بره‌ها پس از ٥٦ روز تغذیه با جیره‌های آزمایشی، کشتار شدند و بلافاصله از قسمت شکمی شکمبه آن‌ها نمونه‌برداری انجام شد. بافت‌ها با محلول بافری PBS، به علت هم غلظت و هم نوع بودن با مواد بیولوژیکی بدن، شستشو داده شدند و هر نمونه به چند تکه برش داده شد و در ظرف‌های مخصوص حاوی یخ، در کمتر از پنج دقیقه به آزمایشگاه انتقال داده‌شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای بررسی بیان نسبی ژن، از هر بره دو نمونه برداشت شد و استخراج RNA با استفاده از کیت شرکت Jena Bioscience (ساخت کشور آلمان) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از نانودراپ (Thermo scientific®,UK) تأیید شد. با توجه به کمیت و کیفیت RNA به‌دست‌آمده (نسبت جذب ٢٦٠ به ٢٨٠ برابر ١/٩٤) cDNA تمام نمونه‌ها با استفاده از کیت RT PreMix ساخت شرکت BIONEER طبق دستورالعمل ساخته شد.

برای طراحی پرایمرهای اختصاصی ژن UT-B (انتقال‌دهنده نوع B اوره) و ژن مرجع GAPDH (گلیسرآلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز) ابتدا توالی کامل DNA مربوط به این دو ژن از پایگاه اطلاعات بیولوژیکی NCBI گرفته شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Allele ID نسخه ۷/۵ پرایمرهای اختصاصی طراحی گردید (جدول ۲). جهت افزایش دقت و به حداقل رساندن آلودگی DNA یکی از پرایمرهای پیشرو و پیرو در نواحی مرز اگزون – اگزون واقع گشتند. برای انجام واکنش‌های Real Time PCR از دستگاه Rotor- Gene (Corbett research-RG300) و Syber green master mix (Jena Bioscience) استفاده شد. طبق دستورالعمل کیت مربوطه، تهیه مخلوط واکنش با استفاده از مسترمیکس Syber green، پرایمرهای پیشرو و پیرو، cDNA و آب عاری از RNA در حجم ۲۵ میکرو لیتر صورت گرفت. هم‌چنین الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد صورت گرفت که تکثیر اختصاصی قطعات موردنظر را تأیید کرد. نتایج منحنی ذوب نشان داد که واکنش Real Time PCR تکثیر غیراختصاصی و پرایمر دایمر ندارد (شکل‌های پیوست ۱، ۲ و ۳). نتایج واکنش با استفاده از روش پی‌فافل (پی‌فافل ۲۰۰۱) و نرم‌افزار REST موردبررسی قرار گرفت.

جدول ۲ - فهرست پرایمرهای استفاده‌شده برای Quantitative real-time PCR

Table 2- Primers for quantitative real-time PCR

Gene	Primer	Accession No.	Product size (bp)	Tm (°C)
UT-B انتقال‌دهنده اوره نوع ب	F:CAAGTCTGGCTCAAGGTGTA R: AGATCTTYGTAAAGCGAATG	NC_019480	158	53.8
GAPDH گلیسرآلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز	F: AGCATTTTCAGAATACACAC R: ATCAGAAGAGCAATACCAGA	NC_019460	137	58

UT-B: انتقال‌دهنده نوع B اوره، GAPDH: گلیسرآلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز

UT-B: Urea transporter B, GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

تجزیه و تحلیل آماری

: نتایج آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ با رویه MIXED آنالیز گردید. مدل آماری طرح به‌صورت زیر می‌باشد.

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

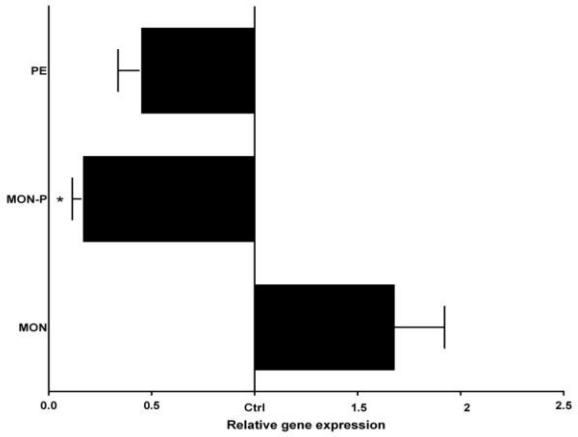
که در این مدل، Y_{ij} ؛ متغیر وابسته، μ؛ میانگین کل، T_i؛ اثر ثابت تیمار، $Lamb_j (T_i)$؛ اثر تصادفی بره داخل تیمار و e_{ij}

خطای آزمایشی می‌باشد. سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد و حداقل میانگین مربعات گزارش شد.

تحلیل عاملی یا تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (Principal Components Analysis) یک روش خوشه کننده است که می‌تواند تنوع ذاتی را در مجموعه داده‌ها بررسی کند و پیچیدگی داده را کاهش دهد. برای استخراج عامل‌ها از روش PCA استفاده شد. در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به تعداد متغیرها مؤلفه وجود دارد ولی عامل هایی استخراج می شوند که بیش‌ترین مقدار واریانس را تبیین کنند. نمودار دوبعدی یا اسکور پلات (Score plot) برای نشان دادن شباهت‌ها و اختلافات میان مجموع داده‌ها استفاده می شود. در اسکور پلات متغیرهای ارائه‌دهنده شباهت‌های متابولیکی نزدیک به هم خوشه‌بندی شده‌اند درحالی‌که متغیرهایی که ازنظر متابولیکی یا شیمیایی اختلاف دارند بیش‌تر از هم فاصله می‌گیرند. معمولاً دو عامل اول بیش‌ترین تنوع ذاتی در داده ها را نشان می‌دهند. برای تحلیل عاملی و همبستگی بین متغیرها از نرم‌افزار SPSS استفاده شد و برای رگرسیون بین متغیرها نرم‌افزار Excel به کار رفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های شکمبه‌ای و خونی در جدول ۳ و مطالعه بیان نسبی ژن UT-B در شکل ۱ نشان داده‌شده است. بیان نسبی ژن انتقال‌دهنده اوره در بره‌های تغذیه‌شده با مونسین دوره‌ای نسبت به گروه شاهد ۰/۱۶۷ می‌باشد. با توجه به این‌که در روش پی‌فافل بیان ژن در گروه شاهد یک در نظر گرفته می‌شود درنتیجه بیان ژن انتقال‌دهنده اوره در گروه مونسین دوره‌ای کاهش نشان داده است (P<۰/۰۵). هم‌چنین در گروه مونسین، افزایش بیان و در گروه عصاره گیاهی کاهش بیان مشاهده گردید ولی از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. غلظت نیتروژن آمونیاکی در گروه تغذیه‌شده با مونسین دوره‌ای نسبت به گروه شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۵).



شکل ۱ - بیان ژن UT-B در اپیتلیوم شکمبه بره‌های تغذیه‌شده با مونسین(MON)، مونسین دوره‌ای (MON-P) و عصاره گیاهی (PE) در مقایسه با شاهد (Ctrl)

Figure 1- Gene expression of UT-B in rumen epithelial cells in lambs fed monensin (MON), periodical inclusion of monensin (MON-P), and plant extract (PE) compared with control diet (Ctrl)

مطالعات پیشین (رایت و هانگیت ۱۹۶۷ و کندی ۱۹۸۰) و نتایج حاصل از آزمایش‌های برون‌تنی اخیر نشان داده است که غلظت آمونیاک اثر مهارکنندگی بر جریان اوره دارد (لو و همکاران ۲۰۱٤) و هم‌چنین مشخص شد که جریان اوره از طریق میان سلولی اتفاق می‌افتد (عبدون و همکاران ۲۰۱۰) و مسیر میان سلولی شامل جریان اوره از میان لایه‌های مختلف سلولی اپیتلیوم شکمبه است و انتقال‌دهنده نوع B اوره مسیر عمده‌ای برای ورود اوره به دستگاه گوارش می‌باشد (گابل و همکاران ۱۹۹۱ و دیئنیز و همکاران ۱۹۹٤) که در تمام لایه‌های سلولی اپیتلیوم شکمبه موجود است (سیمنز و همکاران ۲۰۰۹). در این مطالعه با مشاهده افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی و کاهش بیان ناقل اوره اثر احتمالی مهارکنندگی آمونیاک بر ناقل اوره مشخص شد. در جیره حاوی عصاره گیاهی بیان نسبی ژن ناقل اوره با گروه شاهد تغییری نشان نداد.

جدول ۳- اثر عصاره گیاهی یا مونسین بر غلظت نیتروژن آمونیاکی، نیتروژن اوره‌ای پلاسما، انتقال‌دهنده اوره نوع B، غلظت اسیدهای چرب و نسبت مولی اسیدهای چرب و pH در بره‌های پرواری

Table 3- Effect of feeding plant extract or Monensin on ruminal ammonia, plasma urea nitrogen, urea transporter B, pH, total VFA and the molar proportions of individual VFA in the ruminal content of finishing lambs

Item	Treatment تیمار				SEM انحراف معیار میانگین‌ها	*P*-value سطح معنی‌داری
	CON شاهد	MON مونسین	MON-p مونسین دوره‌ای	PE عصاره گیاهی		
NH3-N, mg/dL نیتروژن آمونیاکی	12.17[bc]	9.98[c]	16.12[ab]	16.99[a]	1.42	0.013
PUN, mg/dL نیتروژن اوره‌ای پلاسما	19.09	20.99	18.06	17.28	1.85	0.54
UT-B انتقال‌دهنده اوره نوع ب	1.81[a]	1.69[a]	1.05[b]	1.725[a]	0.07	0.0001
Total VFA, mM کل اسید چرب فرار	104.98	99.92	87.30	94.45	7.85	0.45
Acetic Acid, mol% اسید استیک	49.44	50.77	50.95	49.80	3.55	0.98
Propionic Acid, mol% اسید پروپیونیک	41.65	41.40	32.99	38.50	4.76	0.56
Butyric Acid, mol% اسید بوتریک	6.82[a]	5.13[a]	12.67[b]	9.46[ab]	1.63	0.03
Isovaleric Acid, mol% اسید ایزو والریک	0.57	0.78	1.07	0.80	0.21	0.46
Valeric Acid, mol% اسید والریک	1.52[a]	1.92[ab]	2.31[b]	1.43[a]	0.21	0.04
pH	6.37[ab]	5.56[a]	6.86[b]	5.98[ab]	0.33	0.09

غلظت نیتروژن آمونیاکی در گروه عصاره گیاهی نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داد. افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی می‌تواند ناشی از تجزیه و چرخش بالاتر آمونیاک ناشی از افزایش تعداد پروتوزوآ در مایع شکمبه این گروه باشد (رحیمی ۱۳۹۲). از طرف دیگر میانگین pH مایع شکمبه بین جیره‌های حاوی مونسین دوره‌ای و عصاره گیاهی با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. PH مایع شکمبه در جیره حاوی مونسین دوره‌ای نسبت به بقیه جیره‌ها بالاتر بود. شدت اثرات وابسته به pH بر روی ناقل‌های اوره در پستانداران گزارش نشده است هر چند تعدادی از این قبیل ناقل‌ها در باکتری و یا مخمرها شناخته‌شده است (بگناسکو ۲۰۰۵). تغییر غلظت پروتون‌های سیتوزولی همان‌طوری که پاسخی فوری در برابر افزایش تخمیر شکمبه‌ای است، یک رویداد پیام‌دهی مرکزی است که نفوذپذیری شکمبه به اوره را از طریق انتقال‌دهنده‌ی نوع B اوره یا پروتئین‌های دیگر نفوذپذیر ناقل اوره تنظیم می‌کند (عبدون و همکاران ۲۰۱۰). در ساده‌ترین مورد، همان‌طور که برای ناقل‌های اوره در باکتری گزارش شد، ناقل ممکن است توسط پروتون‌های داخل سلولی (به‌واسطه تشکیل پیوندهای هیدروژنی که تغییرات کنفورماسیونی را القاء می‌کنند) فعال‌شده باشد (بگناسکو ۲۰۰۵). PH بهینه ممکن است لازم باشد تا محل‌های اتصال به پروتون در منافذ ناقل پروتون‌دار شود و تغییر شکل ناقل برای عبور مولکول اوره ایجاد شود (عبدون و همکاران ۲۰۱۰). PH بهینه برای عملکرد پروتئین ناقل اوره از اپیتلیوم شکمبه در گوسفند ۶/۲ است که در آن pH اوره بیش‌ترین میزان انتقال را دارد (لو و همکاران ۲۰۱٤). در این آزمایش رگرسیون بین

متغیرها نشان داد که انتقال‌دهنده نوع B اوره بیشترین رابطه را با pH داشته که یک رابطه از نوع درجه دو با R^2= ۰/۳۱ می‌باشد (شکل ۳). pH مایع شکمبه بره‌ها در جیره‌های حاوی مونسین دوره‌ای اختلاف بیشتری با pH بهینه دارد و در جیره حاوی عصاره گیاهی این اختلاف کمتر است و بر اثر مهارکنندگی آمونیاک غلبه کرده است. غلظت نیتروژن آمونیاکی در بره‌های تغذیه‌شده با مونسین کاهش یافت که همسو با مطالعات پیشین است (یانگ و راسل ۱۹۹۳). به همین دلیل، مونسین فعالیت باکتری‌های شکمبه‌ای تخمیرکننده آمینواسیدها را مهار کرده و دآمیناسیون و تولید نیتروژن آمونیاکی را کاهش داده است. مطالعه رحیمی (۱۳۹۲) نشان داد که مونسین تنوع میکروبی شکمبه را کاهش داده است.

میانگین غلظت کل اسیدهای چرب فرار که انتقال اوره از اپیتلیوم شکمبه را تحریک می‌کند (عبدون و همکاران ۲۰۱۰ و لو و همکاران ۲۰۱٤) در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان نداد. اسید بوتیریک و اسید والریک در گروه تغذیه‌شده با مونسین دوره‌ای سهم بالاتری را در مقایسه با جیره‌های دیگر داشتند. در پژوهش دیگری (سیمنز و همکاران ۲۰۰۹) نشان داده شد که بیان mRNA پروتئین ناقل اوره در اپیتلیوم شکمبه و نسبت مولی اسید بوتیریک گوساله‌های تغذیه‌شده با کنسانتره در مقایسه با گوساله‌های تغذیه‌شده با علوفه بیشتر بود. نشان داده‌شده است که تزریق بوتیرات از طریق رشد اپیتلیوم شکمبه جریان اوره را مجدداً به شکمبه برمی‌گرداند اما در ذخیره نیتروژن بدن تغییری صورت نگرفته است (اگاول و همکاران ۲۰۱۳) که این همسو با یافته‌های دیگر محققین (نورتن و همکاران ۱۹۸۲) می‌باشد که گزارش کردند اسید بوتیریک شکمبه کارآیی استفاده از نیتروژن را دارد گوسفند تحت تأثیر قرار نمی‌دهد. مشاهده نتایج حاضر و پژوهش‌های پیشین، نشان می‌دهد نقش اسید بوتیریک و مکانیسم عمل آن بر ناقل اوره پیچیده می‌باشد و به دلیل کمبود پژوهش‌ها درباره تأثیر اسید بوتیریک بر ناقل اوره اظهارنظر درباره آن مشکل می‌باشد. از طرف دیگر، گروه تغذیه‌شده با مونسین دوره‌ای ازلحاظ بافت‌شناسی ریزش کمتر در لایه کورنئوم (مرادی ۱۳۹۲)، ضخامت لایه ماهیچه‌ای کمتر، ضخامت لایه کراتینزه کمتر و طول پرزهای کمتری نسبت به تیمارهای دیگر داشتند (میرزایی الموتی و همکاران ۲۰۱٦) که می‌تواند بر جذب اسید بوتیریک اثر منفی داشته باشد.

همبستگی بین ناقل اوره با شاخص‌های شکمبه‌ای و خونی در جدول ٤ نشان داده‌شده است. انتقال‌دهنده نوع B اوره بیشترین همبستگی منفی و در حد متوسطی را با نیتروژن آمونیاکی (۰/٤٤٦-)، اسید بوتیریک (۰/٥۰٤-)، اسید والریک (۰/٥۲۱-) نشان داده است که به‌احتمال زیاد بستگی به شرایط جیره و هماهنگ با pH می‌تواند باشد. این همبستگی نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی بیان نسبی ژن ناقل اوره کاهش می‌یابد. با افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی، انتقال اوره از سمت سروزی به سمت موکوزی کاهش می‌یابد (لو و همکاران ۲۰۱٤). همبستگی مثبت بین انتقال‌دهنده اوره با اسیدهای چرب (۰/۳۸) نشان می‌دهد که با افزایش غلظت اسیدهای چرب، بیان ژن ناقل اوره نیز افزایش می‌یابد. هم‌چنین گزارش شده است که افزایش غلظت اسیدهای چرب، باعث افزایش انتقال اوره از سمت سروزی به سمت موکوزی می‌شود (لو ۲۰۱۳).

جدول۴- همبستگی بین انتقال‌دهنده نوع B اوره، نیتروژن آمونیاکی ، pH و اسیدهای چرب فرار شکمبه‌ای و نیتروژن اوره‌ای پلاسما

Table 4- The correlation between ammonia, plasma urea nitrogen, urea transporter B, pH and volatile fatty acids

Items	Ammonia آمونیاک	PUN نیتروژن اوره‌ای پلاسما	UTB انتقال‌دهنده اوره نوع ب	VFA اسید چرب فرار	AcA اسید استیک	PrA اسید پروپیونیک	BuA اسید بوتریک	iVaA اسید ایزو والریک	VaA اسید والریک	pH پی اچ
Ammonia آمونیاک	1									
PUN نیتروژن اوره‌ای پلاسما	-0.06	1								
UTB انتقال‌دهنده اوره نوع ب	-0.45	0.05	1							
VFA اسید چرب فرار	-0.46	-0.24	0.38	1						
AcA اسید استیک	-0.05	0.24	-0.05	-0.11	1					
PrA اسید پروپیونیک	-0.18	-0.16	0.29	0.27	-0.89	1				
BuA اسید بوتریک	0.44	-0.02	-0.50	-0.33	0.43	-0.77	1			
iVaA اسید ایزو والریک	0.13	-0.19	-0.21	-0.39	0.47	-0.64	0.543	1		
VaA اسید واریک	0.28	0.20	-0.52	-0.54	0.09	0.34	0.438	0.66	1	
pH	0.14	-0.30	-0.36	0.05	-0.04	-0.24	0.547	0.39	0.29	1

جدول ۵- عوامل استخراج‌شده به همراه مقدار ویژه، درصد واریانس ویژه و تجمعی

Table 5- Extracted factors with eigen values, special and cumulative variance percentage

Components اجزا	Eigen values مقادیر ویژه	%Variance واریانس	%Cumulative تجمعی
1	2.42	30.23	30.23
2	1.99	24.82	55.05
3	1.48	18.53	73.59

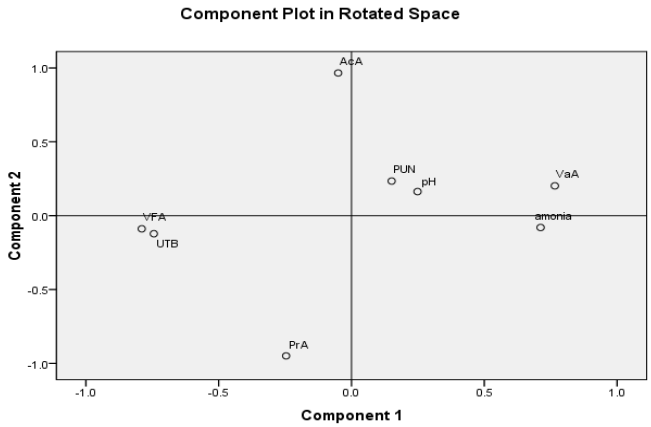
همبستگی بین ناقل اوره و نیتروژن اوره‌ای پلاسما بسیار پایین بود. برای درک بهتر روابط بین متغیرهای مورد-آزمایش از تحلیل عاملی و از روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بهره گرفته شد. نیتروژن آمونیاکی، اسیدهای چرب فرار، اسید والریک و انتقال‌دهنده اوره از اجزای تشکیل-دهنده عامل ۱، اسید استیک، اسید پروپیونیک از اجزای تشکیل‌دهنده عامل ۲ و نیتروژن اوره‌ای پلاسما و pH تشکیل‌دهنده عامل سوم بودند. مقدار ویژه، بیان‌گر سهم هر عامل از کل واریانس متغیرها می‌باشد و هر چه مقدار آن بزرگ‌تر باشد نشان‌دهنده اهمیت و نقش بیش‌تر آن عامل است. همان‌طور که داده‌های جدول ۵ نشان می‌دهد

درمجموع ۳ عامل حدود ۷۳/۵۹ درصد از واریانس کل را تبیین می‌کنند.

هم‌چنین نتایج تحلیل عاملی نشان می‌دهد که عامل اول، بیش‌ترین واریانس را تشکیل می‌دهد و در این عامل ناقل اوره و کل اسیدهای چرب در یک راستا و تغییرات آن‌ها نیز در یک‌جهت و موافق باهم بوده است (شکل ۲). نیتروژن آمونیاکی در جهت مخالف این دو متغیر قرارگرفته و نشان‌دهنده اثر مهارکنندگی آمونیاک بر ناقل اوره می‌باشد. اسید استیک و اسید پروپیونیک در خلاف جهت هم قرارگرفته‌اند (شکل ۲). این نتایج نیز تأییدکننده نتایج قبلی می‌باشند. طبق پژوهش اخیر (لو و همکاران ۲۰۱٤) اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFA) و pH فاکتور کلیدی و غالب در تنظیم بیان ژن ناقل اوره بودند و رابطه اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با انتقال‌دهنده نوع B اوره مثبت و بیش‌تر از تغییرات اوره پلاسما گزارش شده است. رگرسیون بین متغیرها (شکل ۳) نشان داد که علاوه بر رابطه بین انتقال‌دهنده نوع B اوره و pH که قبلاً شرح داده شد، رابطه بین ناقل اوره و آمونیاک رابطه منفی و ضعیفی است که نتایج به‌دست‌آمده قبلی را در شرایط برون‌تنی تأیید می‌کند. رابطه‌ای بین ناقل اوره و نیتروژن اوره‌ای پلاسما دیده نشد.

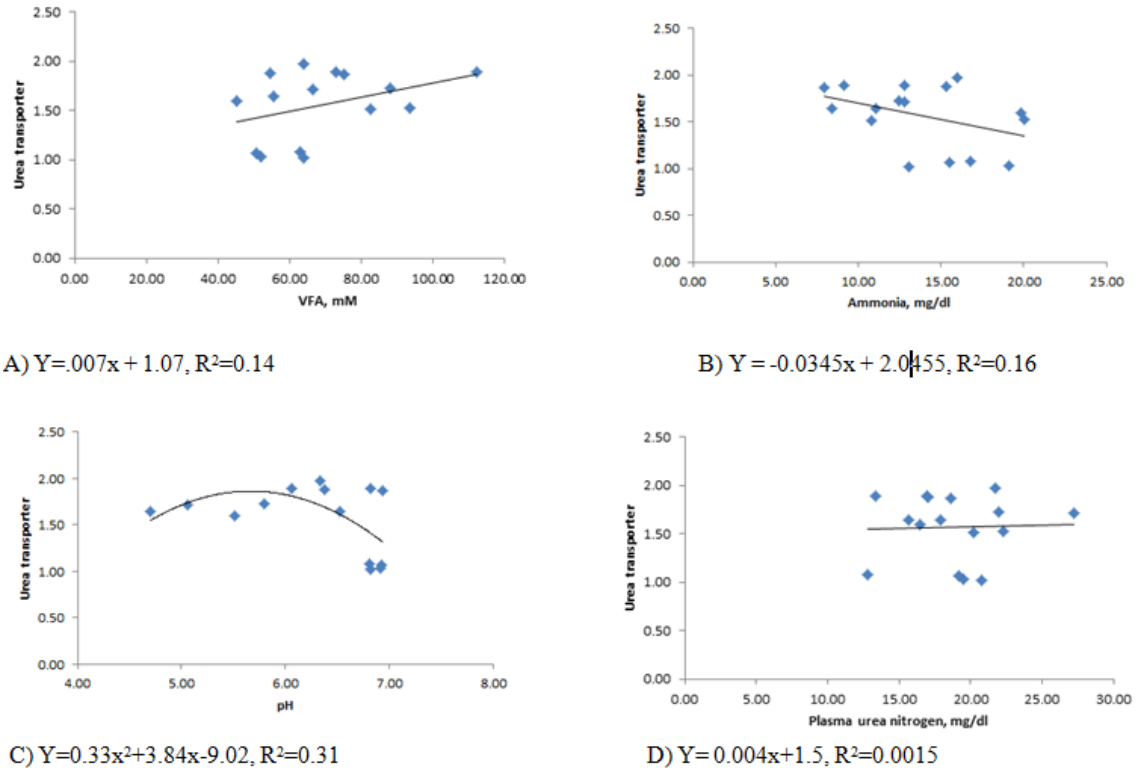
نتیجه‌گیری کلی

مصرف دوره‌ای مونسین علاوه بر تغییر در تخمیر شکمبه ممکن است بیان ژن انتقال‌دهنده نوع B اوره را کاهش دهد. در مقابل، استفاده مداوم مونسین در جیره علاوه بر بهبود در تخمیر شکمبه می‌تواند بیان پروتئین انتقال‌دهنده نوع B اوره را افزایش دهد. عصاره گیاهی مورداستفاده ممکن است تغییراتی در تخمیر شکمبه‌ای ایجاد کند ولی بر فعالیت سلول‌های اپیتلیالی در انتقال اوره بی‌تأثیر است. در این پژوهش متغیرهای شکمبه‌ای نسبت به متغیرهای خونی، در انتقال اوره به شکمبه تأثیرگذاری بیش‌تری داشتند.



شکل ۲- نمودار دوبعدی روابط بین برخی از پاسخ‌ها

Figure 2- Score Plat of the responses



شکل ۳- رابطه بین UT-B و اسیدهای چرب فرار (A) ، آمونیاک (B)، pH (C) و نیتروژن اوره‌ای پلاسما (D)

Figure 3– Regression of Urea transporter on rumen VFA (A), Ammonia (B), pH (C), and Plasma urea nitrogen (D)

منابع مورداستفاده

Abdoun K, Stumpff F, Rabbani I and Martens H, 2010. Modulation of urea transport across sheep rumen epithelium in vitro by SCFA and CO_2. American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology 298(2): G190–202.

Agarwal U, Hu Q, Baldwin VIRL, and Bequette BJ, 2014. Role of rumen butyrate in regulation of nitrogen utilization and urea nitrogen kinetics in growing sheep. Journal of Animal Science 93(5): 2382–2390.

Bagnasco SM, 2005. Role and regulation of urea transporters. Pflügers Archiv: European Journal of Physiology 450(4): 217-226.

Broderick GA, 2004. Effect of low-level Monensin supplementation on the production of dairy cows fed alfalfa silage. Journal of Animal Science 87(2):359-368.

Broderick GA, and Kang JH, 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. Journal of Dairy Science 63(1): 64-75

Diernaes L, Sehested J, Moller PD, and Skadhauge E, 1994. Sodium and chloride transport across the rumen epithelium of cattle in vitro: effect of short-chain fatty acids and amiloride. Experiment Physiology 79(5): 755-762.

Duffield TF, and Bagg RN, 2000. Use of ionophores in lactating dairy cattle. A review. Canadian Veterinary Journal 41(5):388-394.

Gabel G, Vogler S, and Martens H, 1991. Short-chain fatty acids and CO_2 as regulators of Na+ and Cl- absorption in isolated sheep rumen mucosa. Journal of Comparative Physiology 161(4): 419-426.

Harmeyer J, and Martens H, 1980. Aspects of urea metabolism in ruminants with reference to the goat. Journal of Dairy Science 63(10): 1707-1728.

Hofmann EM, Muetzel S, and Becker K, 2003. Effects of Moringa oleifera seed extract on rumen fermentation in vitro. Archive of Animal Nutrition 57(1): 65-81.

Kennedy PM, 1980. The effects of dietary sucrose and the concentration of plasma urea and rumen ammonia on the degradation of urea in the gastrointestinal tract of cattle. The British Journal of Nutrition 43(1): 125-140.

Lu Z, 2013. Urea transport in sheep rumen epithelium in vitro: Modulation by luminal ammonia and pH. PhD Thesis, The University of Berlin.

Lu Z, Stumpff F, Deiner C, Rosendahl J, Braun H, Abdoun K, Aschenbach JR, and Martens H, 2014. Modulation of sheep ruminal urea transport by ammonia and pH. American Journal Physiology 307(5): R558-R570.

Marini JC and Van Amburgh ME, 2003. Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers. Journal of Animal Science 81(2): 545-552.

Mirzaei-Alamouti H, Moradi S, Shahalizadeh Z, Razavian M, Amanlou H, Harakinejad T, Jafari-Anarkooli I, Deiner C, and Aschenbach JR, 2016. Both Monensin and plant extract alter ruminal fermentation in sheep but only Monensin affects the expression of genes involved in acid-base transport of the ruminal epithelium. Animal Feed Science and Technology 219: 132-143.

Moradi S, 2013. Morphologic and physiologic changes in rumen epithelium of lambs fed diet with Monensin and plant extract. MS thesis, University of Zanjan.

Norton BW, Janes AN and Armstrong DG, 1982. The effects of intra ruminal infusions of sodium bicarbonate, ammonium chloride and sodium butyrate on urea metabolism in sheep. The British Journal of Nutrition 48(2): 265-274.

Pfaffl MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Research 1; 29(9): e45.

Rahimi H, 2013. Rumen microbial diversity in lambs fed high concentrate diet contained monensin, plant extract and polyunsaturated fatty acids using QRT-PCR. MS thesis, University of Zanjan.

Simmons NL, Chaudhry AS, Graham C, Scriven ES, Thistlethwaite A, Smith CP and Stewart GS, 2009. Dietary regulation of ruminal bovine UT-B urea transporter expression and localization. Journal of Animal Science 87(10): 3288-3299.

Schmidt-Nielsen B and Osaki H, 1958. Renal response to changes in nitrogen metabolism in sheep. Animal Journal of Physiology 193(3): 657-661

Wright DE and Hungate RE, 1967. Amino acid concentrations in rumen fluid. Applied Microbiology 15(1): 148-151.

Yang CM and Russell JB, 1993. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation in vivo and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. Journal of Animal Science 71(12): 3470-3476.

Effect of Monensin and plant extract on rumen and blood metabolites and gene expression of the urea transporter gene in the rumen epithelium of fattening lambs

H Mirzaei-Alamouti[1*], M Razavian[2], R Masoumi[3] and V Salmani Zavieh[4]

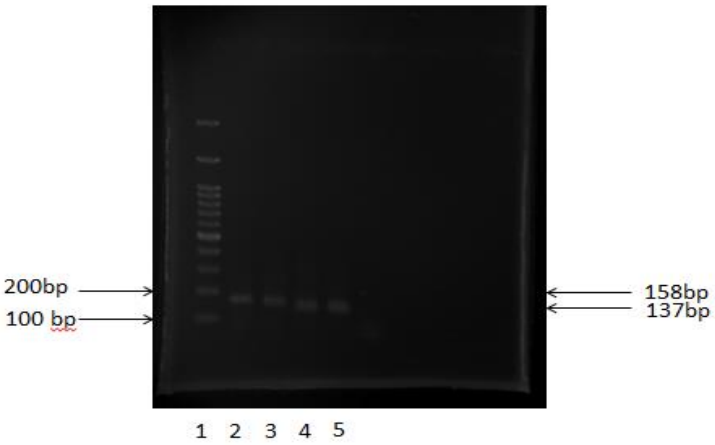
Received: October 17, 2016 Accepted: March 4, 2017
[1]Associate Professor, Department of Animal Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran
[2]Former MS Student, Department of Animal Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran
[4]Researcher, Biotechnology Research Center, University of Zanjan, Zanjan, Iran
[*]Corresponding author: Email: alamoutih@znu.ac.ir

Introduction: Urea as the final product of nitrogen metabolism plays a pivotal role in ruminants' nitrogen economic efficiency (Marini and Van Amburgh, 2003). Ruminants are capable to recycle and return a tremendous amount of urea to rumen rather than excretion to urine; the recycled urea is hydrolyzed to CO2 and ammonia and thereafter is used for the synthesis of microbial protein (Harmeyer and Martens, 1980). By changing ruminal and blood metabolites, Monensin and herbal extracts can change and modify the expression of urea transporter gene in rumen epithelium. Monensin is an ionophore antibiotic which changes the ratio of VFAs in the rumen in favor of propionic acid and decreases the production of methane (Duffield and Bagg, 2000). The aim of present study was to investigate the effects of Monensin and herbal extracts as feed additives on type B urea transporter gene in rumen epithelium and also on ruminal ammonia, VFAs, pH and blood ammonia in fattening lambs.

Material and methods: In this experiment 16 Afshari ram lambs with initial BW of 41±5.6 kg and 6 months of age were used. The lams were randomly assigned to four experimental dietary treatments in a completely randomized design; 1) no additive (control), 2) 30 mg monensin.d-1 per lamb, 3) periodical inclusion of 30 mg monensin.d-1 per lamb, and 4) 2 g of a commercial blend of plant extract.d-1 per lamb. During the experiment, lambs were kept in individual boxes and the diets and fresh drinking water were offered *ad libitum*. 3 weeks were considered as an adaptation to diets and 8 weeks were considered as an experimental period in which treatments and samplings were conducted. The forage: concentrate ratio was set to 20:80 and the rations were prepared daily, mixed by hand and were offered two times at 09:00 and 16:00. Two hours after morning feeding rumen samples were collected every other 2 weeks by using a special tube and electrical vacuum pump. Also, immediately after slaughtering and before skinning 2 rumen samples were collected, filtered and the pH was determined. 8 ml of the first sample was mixed with 2 ml of % 25 sulfuric acid for measurement of ammonia and 8 ml of the second sample was mixed with %25 meta-phosphoric acid for measurement of VFAs. The mixed samples were kept in -20ºC until assays. After thawing, rumen samples were centrifuged for 10 to 15 min and then the supernatant was separated and stored for FAs and ammonia measurements. Blood and rumen samples were collected before slaughtering and rumen tissue samples were taken from ventral part of the rumen. VFA in rumen samples was measured by using Gas chromatograph (Mirzaei-Alamouti et al. 2016). The ammonia nitrogen was measured by using a spectrophotometer. Blood samples were taken at the beginning of the experiment and then every 2 weeks after the morning feeding into heparinized tubes. Blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 15 min and plasma samples were stored at -20º C for plasma urea nitrogen. Blood urea nitrogen was measured with commercial kits using a spectrophotometer. The lambs were slaughtered 56 days after feeding with experimental diets and the tissue samples were taken from ventral part of the rumen. Relative gene expression of UT-B was determined by Real-time PCR technique

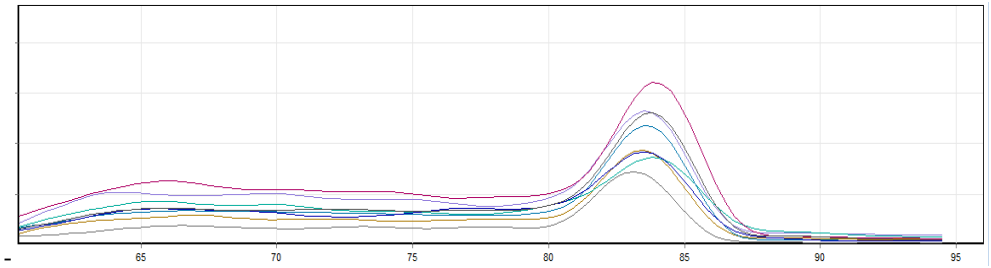
(Mirzaei_Alamouti et al, 2016). Experimental data were subjected to analysis of variance by the mixed procedure of SAS (9.1).
Results and discussion: The relative expression of urea transporter gene in lambs fed with periodical Monensin was 0.167 in comparison to control group. In Pfaffl's (2001) method, the gene expression in control group is considered 1; thus, the expression of urea transporter gene in periodical Monensin group has been reduced (P< 0.05). In addition to this, expression of urea transporter gene in Monensin group tended to increase and in herbal extract group tended to decrease. The ammonia nitrogen levels in periodical Monensin group increased in comparison to control group (P<0.05). In herbal extract group, the relative expression of urea transporter gene was not affected in comparison to control group (P<0.05). The levels of ammonia nitrogen in herbal extract group were increased in comparison to control group. Rumen pH was not affected by diets containing Monensin, herbal extract or control group (P<0.05). Rumen pH was higher in periodical Monensin group in compare to other groups (P<0.05). The concentration of total free fatty acids which stimulate the absorption of urea from rumen epithelium did not show any significant difference (P<0.05). Conclusion: all in all, the results of this study showed an inverse or average relationship between urea transporter gene expression with ammonia nitrogen, butric acid and valeric acid and a positive relationship with VFAs. The periodical inclusion of Monensin to the diets may change the rumen fermentation and reduce the expression of urea type B transporter. In comparison to this, the continued inclusion of Monensin to the diets would improve rumen fermentation and increase the expression of the urea-type B transporter gene. The herbal extract used in this study may change the rumen fermentation but is not possibly effective on epithelial cells which are involved in urea transportation. In this study, the rumen variables were more effective in urea transportation in compare to blood variables.

Keywords: Rumen epithelia, Rumen fermentation, Sheep, UT-B gene



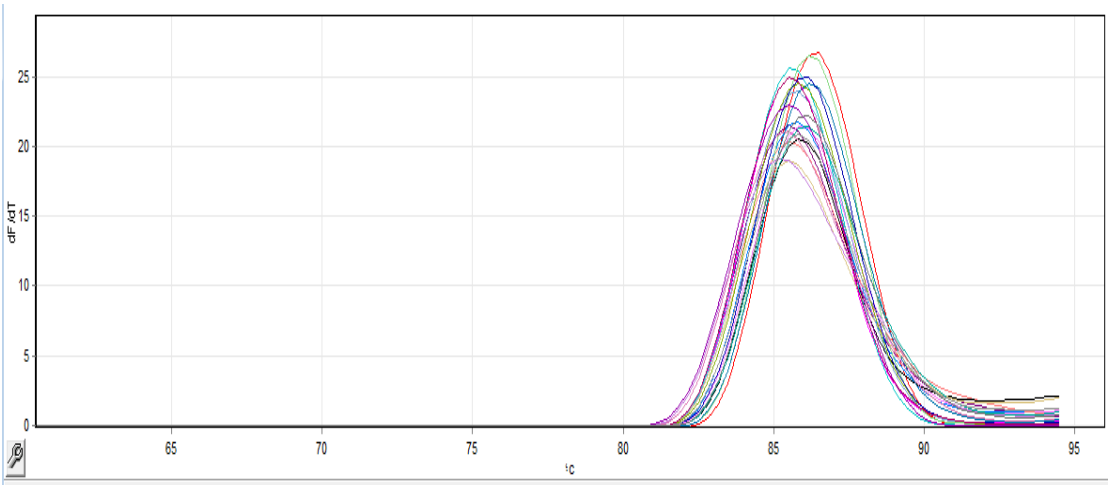
شکل ۱ (پیوست)- نتایج انجام Real-Time PCR روی ژل آگارز، ۱) نشانگر ۲ و ۳) باند مربوط به UTB ۴ و ۵) باند مربوط به GAPDH

Figure 1 (Supplement)- The results of Real-Time PCR on agarose gel, 1) Marker, 2 and 3) UT-B gene, 4 and 5) GAPDH gene



شکل ۲ (پیوست)- منحنی ذوب ژن UT-B

Figure2 (Supplement)- The melting curve of UT-B gene



شکل ۳- (پیوست)- منحنی ذوب ژن GAPDH

Figure 3 (Supplement)- The melting curve of GAPDH gene