Animal Production Research

Vol. 12, No. 4, 2023 (51-62)
doi: 10.22124/AR.2024.24349.1762
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872

University of Guilan

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Effect of source and duration of feeding omega-3 and omega-9 protected fatty acids on the expression of some genes involved in fat metabolism in fattening lambs

A. Mirshamsollahi[1*], M. Ganjkhanlou[2], F. Fatehi[3]

1. Assistant Professor, Agriculture and Natural Resources Research Center of Markazi province, Arak, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: 29-04-2023 – Revised: 27-10-2023 – Accepted: 31-10-2023)

Introduction: Based on current knowledge, it has been proven that many edible ingredients in addition to meeting the needs of creatures, in terms of energy and protein, contain compounds that affect cellular actions and intracellular signaling pathways and can temporarily or permanently change the function of the cell. The use of molecular biology tools and genetic research defines the mechanisms through which gene expression is affected by food, and conversely, these genes also affect the absorption of food, metabolism, and excretion. From the point of view of nutrigenomics, dietary nutrients are signals that are received by sensitive cell systems and can affect the expression of genes and proteins and the production of metabolites. Nutritional manipulations and strategies are key tools to influence ruminant production. Fatty acids act on the nucleus by binding to and regulating the activity of specific nuclear receptors or transcription factors, thus playing a central role in regulating the expression of genes involved in fatty acid uptake by muscle cells. Interactions between diet nutrients and the expression of genes involved in lipid metabolism have many possibilities regarding the deposition of fatty acids in the tissue. The study of gene expression has enabled clarification of the mode of fatty acid metabolism in muscle and the accumulation of intramuscular fat or marbling and the role of the genes that promote fatty acid oxidation and mitochondrial respiration in the liver muscle and adipose tissue. Polyunsaturated fatty acids with multiple double bonds (PUFA) and monounsaturated fatty acids with one double bond (MUFA) have received much attention in the last decade, and their health benefits are increasingly evident. Therefore, this study investigated the effect of using calcium salts of fish oil, olive oil, and saturated fat on the expression of some genes related to fat metabolism in Lori Bakhtiari×Romanov fattening lambs.

Materials and methods: This study was carried out at the educational research station of the Department of Animal Science of the College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran. 49 male lambs aged four to five months with an average initial weight of 29.97 ± 0.88 kg were divided into seven groups of seven lambs in a completely randomized design. The experiment consisted of seven treatments with a basic diet as follows: 1) Basic diet without fat powder (control), 2 and 3) Basic diet with calcium salt of fish oil (rich in omega-3 fatty acids) in the amount of 2% dry matter of the diet for 90 and 45 days, respectively, 4 and 5) Basic diet with calcium salt of olive oil (rich in omega-9 fatty acids) at the rate of 2% dry matter of the diet for 90 and 45 days, respectively, 6 and 7) Basic diet with saturated fat powder in the amount of 2% dry matter of the diet for 90 and 45 days, respectively. Rations were adjusted based on the NRC Sheep and Goat and using the fifth version of CNCPS (The Cornell Net Carbohydrate and Protein System) software so that they are the same in terms of energy and protein. Twenty-eight lambs were slaughtered and a liver sample was taken for nutrigenomics studies. Total RNA was extracted from liver tissue samples using the RNA extraction kit produced by Dena Bio Asia Company

[*] Corresponding author: Iranmirshams@yahoo.com

(Mashhad) and according to the protocol provided with the kit. The expression of four main genes involved in lipid metabolism in liver tissue was investigated to provide comprehensive information on the effects of omega-3, omega-9 fatty acids, and saturated fat at the molecular level.
Results and discussion: The results showed that feeding with calcium salts of fish oil, olive oil, and saturated fat, both in the whole 90 days or the last 45 days of the fattening period, had no significant effect on the expression of *FADS1* and *FADS2* genes in liver tissue compared to the control group. However, the use of calcium salts of fish and olive oils in periods of 90 and 45 days significantly increased the hepatic mRNA expression of the *CPT1* gene (P=0.001) and *ACOX1* gene mRNA expression in liver tissue compared to control and saturated fat treatments (P=0.002). The *CPT1* enzyme is responsible for a mitochondrial transport system and plays a key role in controlling the oxidation of long-chain fatty acids and stimulating mitochondrial β-oxidation.
Conclusions: The results of this study showed that diet supplementation with calcium salts of fish and olive unsaturated fatty acids, regardless of the period of consumption, increased the expression of genes involved in the lipolysis of liver tissue fats of lambs.
Keywords: Unsaturated fatty acid, Fattening lamb, Gene expression, Metabolism
Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.
Funding: The authors received no specific funding for this work.

How to cite this article:

Mirshamsollahi, A., Ganjkhanlou, M., & Fatehi, F. (2023). Effect of source and duration of feeding omega-3 and omega-9 protected fatty acids on the expression of some genes involved in fat metabolism in fattening lambs. *Animal Production Research*, *12*(4), 51-62. doi: 10.22124/AR.2024.24349.1762

تحقیقات تولیدات دامی

سال دوازدهم/شماره چهارم/زمستان ۱۴۰۲ (۶۲-۵۱)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

مقاله پژوهشی

اثر منبع و مدت زمان تغذیه اسید چرب امگا-۳ و امگا-۹ محافظت شده بر بیان برخی از ژن‌های دخیل در سوخت و ساز چربی در بره‌های پرواری

آزاده میرشمس الهی[1*]، مهدی گنج خانلو[2]، فرهنگ فاتحی[3]

۱- استادیار پژوهشی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی، اراک، ایران

۲ – دانشیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۳- استادیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۰۹ – تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۸/۰۵ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۹)

چکیده

هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر استفاده از نمک‌های کلسیمی روغن ماهی، زیتون و چربی اشباع بر بیان برخی از ژن‌های مرتبط با سوخت و ساز چربی در بره‌های پرواری آمیخته لری بختیاری×رومانف بود. تعداد ۴۹ رأس بره نر چهار تا پنج ماهه با میانگین وزن اولیه ۰/۸۸±۲۹/۹۷ کیلوگرم، در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به هفت گروه هفت رأسی تقسیم شدند. تیمارهای مورد بررسی شامل: جیره شاهد (بدون چربی) و جیره پایه به همراه نمک‌های کلسیمی روغن ماهی، روغن زیتون و چربی اشباع (به میزان دو درصد ماده خشک جیره) برای دوره‌های زمانی ۴۵ و ۹۰ روزه مصرف بودند. در انتهای آزمایش، تعداد ۲۸ رأس بره ذبح شده و یک نمونه از کبد بره‌ها گرفته شد تا به وسیله آن، مطالعات نوتری‌ژنومیک انجام شود. نتایج نشان داد که استفاده از نمک‌های کلسیمی روغن ماهی، روغن زیتون و چربی اشباع، تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن‌های *FADS1* و *FADS2* در بافت کبد نسبت به گروه شاهد نداشت. با این حال، استفاده از نمک‌های کلسیمی روغن ماهی و روغن زیتون در دوره‌های زمانی ۹۰ و ۴۵ روزه مصرف باعث افزایش معنی‌دار بیان mRNA کبدی ژن‌های CPT_1 (P=۰/۰۰۱) و $ACOX_1$ (P=۰/۰۰۲) در بافت کبد نسبت به تیمارهای چربی اشباع و شاهد شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مکمل‌سازی جیره با نمک‌های کلسیمی اسیدهای چرب غیراشباع ماهی و زیتون صرف‌نظر از دوره زمانی مصرف، باعث افزایش بیان ژن‌های درگیر در لیپولیز چربی‌های بافت کبد بره‌ها شد.

واژه‌های کلیدی: اسید چرب غیراشباع، بره پرواری، بیان ژن، سوخت و ساز

* نویسندهٔ مسئول: Iranmirshams@yahoo.com

doi: 10.22124/AR.2024.24349.1762

مقدمه

اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه (PUFA) و اسیدهای چرب غیراشباع با یک پیوند دوگانه (MUFA) در دهه گذشته مورد توجه بسیاری قرار گرفته‌اند و فواید سلامتی بخشی آنها به‌طور فزاینده‌ای مشهود است (Vassiliou et al., 2009). اسیدهای چرب امگا-۹ به نام اسیدهای چرب MUFA شناخته شده که بیشترین ترکیب آن، اسید اولئیک (C18: 1) است که در روغن زیتون به وفور یافت می‌شود (Arana *et al.*, 2006). مشخص شده است که مکمل‌سازی جیره غذایی نشخوارکنندگان با دانه‌های کتان غنی از لینولنیک اسید و منابع دریایی مانند روغن ماهی غنی از ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA)، میزان اسیدهای چرب امگا-۳ و اسید لینولئیک کونژوگه را در شیر و گوشت دام‌ها افزایش می‌دهد (Fekri and Ganj Khanlu, 2021). مواد خوراکی متعدد علاوه بر تأمین احتیاجات انرژی و پروتئین موجودات، حاوی ترکیباتی هستند که بر کنش‌های سلولی و مسیرهای سیگنالینگ درون سلولی تأثیر گذاشته و قادر هستند عملکرد سلول را به‌طور موقت و یا پایدار تغییر دهند. استفاده از ابزارهای زیست‌شناسی مولکولی و تحقیقات ژنتیکی، ساز و کارهایی را تعریف می‌کند که طی آن‌ها، بیان ژن تحت تأثیر مواد غذایی قرار گرفته و متقابلاً این ژن‌ها نیز روی جذب مواد غذایی، سوخت و ساز و دفع آن‌ها تأثیر می‌گذارند (Abrahams, 2017).

اسیدهای چرب با اتصال به هسته و تنظیم فعالیت برخی از گیرنده‌های هسته‌ای و یا فاکتورهای رونویسی، روی هسته تأثیر می‌گذارند، بنابراین نقش کلیدی و مهمی در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در جذب اسیدهای چرب به وسیله سلول‌های عضلانی ایفا می‌نمایند. آثار متقابل بین مواد مغذی جیره غذایی و بیان ژن‌های دخیل در سوخت و ساز لیپیدها، نقش زیادی بر نحوه ذخیره اسیدهای چرب در بافت‌های مختلف دارد (Ladeira *et al.*, 2018). مطالعه بیان ژن باعث روشن شدن نحوه سوخت و ساز اسیدهای چرب در عضلات و تجمع فاکتور ماربلینگ درون عضلانی و نقش ژن‌هایی که اکسیداسیون اسیدهای چرب و تنفس میتوکندریایی در کبد، ماهیچه و بافت چربی را افزایش می‌دهند، می‌شود (Jager *et al.*, 2013).

غیراشباع شدن اسیدهای چرب PUFA در پستانداران به وسیله ژن‌های غیراشباع‌ساز اسید چرب (*FADS*) رمزگذاری می‌شود. برای مثال، غیراشباع شدن ایکوزاتترانوئیک اسید (ETA, 20:4n-3)، به ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) به وسیله آنزیم غیراشباع‌ساز دلتا-۵، که به وسیله ژن $FADS_1$ کدگذاری می‌شود، کاتالیز می‌شود، در حالی‌که غیراشباع شدن آلفا لینولنیک اسید به استیریدونیک اسید (SDA,18:4n-3)، و لینولئیک اسید (LA,18:2n-6) به گاما لینولنیک اسید (GLA,18:3n-6) به وسیله آنزیم غیراشباع-ساز دلتا-۶ کاتالیز می‌شود که به وسیله ژن $FADS_2$ رمزگذاری می‌شود (Matsumoto *et al.*, 2014).

ایکوزاپنتانوئیک اسید و دکوزاهگزانوئیک اسید به عنوان مولکول‌های فعال عمل می‌کنند و می‌توانند گیرنده‌های آلفا فعال‌کننده تکثیر پروکسی زوم (*PPARα*) را فعال کنند. این فعال‌سازی، رونویسی از ژن‌های لیپولیتیک را افزایش و رونویسی ژن‌های لیپوژنیک را کاهش می‌دهد (Clarke, 2001). *PPARα* و *PPARγ* گیرنده‌های هورمونی هستند که در غشای هسته قرار دارند و نقش مهمی در سوخت و ساز لیپید و گلوکز دارند. آنها به عنوان یک فاکتور رونویسی، سوخت و ساز و انتقال اسیدهای چرب را با کنترل بتا اکسیداسیون میتوکندریایی، افزایش بتا اکسیداسیون پراکسیزومی و بیان ژن‌های هدف بالادستی مانند ژن‌های آسیل کوآنزیم-آ اکسیداز (*ACOX*)، پروتئین اتصال‌دهنده به اسید چرب (*FABP*) و ژن‌های کارنیتین پالمیتویل ترانسفراز-۱ (*CPT1*) تنظیم می‌کنند (Belal *et al.*, 2018). بررسی تأثیر سیستم تغذیه بر بیان ژن‌های دخیل در سوخت و ساز چربی نشان داد که ژن‌های مربوط به چربی-زایی شامل *LPL*، *ACACA*، *FASN*، *FABP4* و *SCD* در دام‌های با تغذیه فشرده (تغذیه در جایگاه) بیشتر بیان می-شوند و در دام‌های در حال چرا، ژن CPT_{1B}، مربوط به فرآیند بتا اکسیداسیون چربی‌ها، بیشتر بیان می‌شود. به عبارت دیگر، راهبرد تغذیه، ابزار مهمی برای دست‌کاری پروفایل اسیدهای چرب داخل عضلانی در گوشت از راه تغییر بیان ژن آنزیم‌های مرتبط با سوخت و ساز چربی است (Dervishi *et al.*, 2011).

اسید اولئیک ممکن است به عنوان یک سیگنال برای ایجاد یک حلقه بازخورد منفی برای مقابله با اسیدهای چرب اضافی و حفظ هموستاز لیپید عمل کند. کنترل تنظیم نرخ اکسیداسیون اسیدهای چرب در سطوح مختلف شامل

اجزای رونویسی و غیررونویسی رخ می‌دهد. به عنوان مثال، در میان ساز و کارهای غیررونویسی، افزایش مالونیل کوآنزیم-آ داخل سلولی (محصول آنزیم ساخت اسیدهای چرب، استیل-کوآ کربوکسیلاز) با مهار ناقل اسید چرب میتوکندری، کارنیتین- پالمیتوئیل ترانسفراز-۱، به شدت اکسیداسیون اسیدهای چرب را سرکوب می‌کند. اسید اولئیک از راه ساز و کارهای سیگنالینگ/رونویسی، اکسیداسیون اسیدهای چرب را تقویت می‌کند و یک حلقه بازخورد (فیدبک) منفی ارائه می‌کند که ممکن است حداقل تا حدی، برخی از آثار محافظتی این اسید چرب را در برابر التهاب، چربی پریشی و مقاومت به انسولین توضیح دهد (Lim *et al*., 2013).

گزارش‌هایی وجود دارد مبنی بر اینکه تغذیه میش حول و حوش زمان لقاح و تغذیه نتاج پس از شیرگیری، می‌تواند بر تغییر سوخت و ساز چربی و تجمع اسیدهای چرب بلند زنجیر PUFA تاثیر بگذارد. DHA جیره غذایی نه تنها غلظت DHA بافتی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، بلکه بیان ژن‌های مرتبط با سوخت و ساز اسید چرب را نیز تغییر می‌دهد. گزارش‌های اندکی در مورد بیان ژن‌های مسئول انباشت تجمع اسیدهای چرب بلند زنجیر غیر اشباع با چند پیوند دوگانه در گوسفند وجود دارد (Costa Alvarenga *et al*., 2016). بنابراین، این پژوهش به منظور بررسی تأثیر استفاده از نمک‌های کلسیمی روغن ماهی، زیتون و چربی اشباع بر بیان برخی از ژن‌های مرتبط با سوخت و ساز چربی (چربی کبدی) در بره‌های پرواری انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در ایستگاه آموزشی-پژوهشی گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام گرفت. در این آزمایش تعداد ۴۹ رأس بره نر آمیخته لری بختیاری×رومانف چهار تا پنج ماهه و با میانگین وزن اولیه (± انحراف معیار) ۰/۸۸ ± ۲۹/۹۷ کیلوگرم، به‌طور تصادفی در جایگاه‌های انفرادی که به‌طور آزاد به آب و خوراک دسترسی داشتند، نگهداری شدند. آزمایش شامل هفت تیمار (هفت بره در هر تیمار) با یک جیره پایه بود: تیمار ۱- جیره پایه بدون پودر چربی (شاهد)، تیمارهای ۲ و ۳- جیره پایه به همراه نمک کلسیمی روغن ماهی (غنی از اسیدهای چرب امگا-۳) به میزان دو درصد ماده خشک جیره به ترتیب برای مدت ۹۰ و ۴۵ روز، تیمارهای ۴ و ۵- جیره پایه به همراه نمک کلسیمی روغن زیتون (غنی از اسیدهای چرب امگا-۹) به میزان دو درصد ماده خشک جیره به ترتیب برای مدت ۹۰ و ۴۵ روز، تیمارهای ۶ و ۷- جیره پایه به همراه پودر چربی اشباع به میزان دو درصد ماده خشک جیره به ترتیب برای مدت ۹۰ و ۴۵ روز. جیره‌های غذایی بر اساس توصیه‌های NRC Sheep and Goat (2007) و با استفاده از نسخه پنجم نرم افزار CNCPS (The Cornell Net Carbohydrate and Protein System) به‌گونه‌ای تنظیم شدند که از نظر انرژی و پروتئین یکسان باشند. اجزاء و ترکیبات جیره‌های آزمایشی در جدول ۱ ذکر شده‌اند. خوراک به‌صورت کاملاً مخلوط (TMR) و در حد اشتها در دو نوبت (ساعت ۸ صبح و ۴ عصر) در اختیار بره‌ها قرار گرفت. نمک‌های کلسیمی روغن ماهی و زیتون حاوی ۸۵ درصد چربی و نه درصد کلسیم بودند.

پس از اتمام آزمایش و کشتار ۲۸ راس از بره‌ها، ظرف مدت زمان ۳۰ دقیقه پس از کشتار، یک نمونه دو گرمی از لوب راست کبد گرفته شد و بلافاصله در نیتروژن مایع (تانک ازت)، منجمد شد. نمونه‌های بافت کبد سپس در فریزر با برودت ۸۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمایشات بیان ژن نگهداری شدند.

اندازه‌گیری بیان ژن: استخراج RNA کل و ساخت DNA مکمل (cDNA): RNA کل با استفاده از کیت استخراج RNA تولید شرکت دنا زیست آسیا (مشهد) و طبق پروتکل ارائه شده همراه با کیت از نمونه‌های بافت کبد استخراج شد. RNA استخراج شده سپس با DNase I عاری از RNase تیمار شد تا DNA ژنومی باقیمانده از نمونه‌ها حذف شود. غلظت RNA با دستگاه نانودراپ ND-2000 و در طول موج ۲۶۰ nm برآورد شد و خلوص آن با تعیین نسبت‌های جذب در ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر محاسبه شد. کیفیت RNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد ارزیابی شد. cDNA با استفاده از ۱۰۰ نانوگرم از RNA کل و با استفاده از کیت ساخت cDNA شرکت پارس طوس زیست فن‌آور طبق دستورالعمل تولیدکننده تولید شد.

فرآیند ساخت cDNA با اتصال پرایمرها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه آغاز شد و پس از آن با ساخت cDNA در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه ادامه یافت و با غیرفعال‌سازی آنزیم ترانس کریپتاز در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه به پایان رسید.

طراحی پرایمر: توالی نوکلئوتیدی ژن‌های کاندید برای ژن مرجع و ژن‌های هدف از پایگاه داده‌های عمومی (GenBank, National Center for Biotechnology Information) گرفته شد. جفت پرایمرها بر اساس این توالی‌ها (درجه حرارت بهینه ۶۱ درجه سلسیوس و GC بین ۴۵ تا ۵۰٪) و با استفاده از برنامه نرم افزاری برخط primer3 Plus طراحی شدند (Untergasser *et al*., 2007). اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده نیز با استفاده از نرم افزار Primer BLAST از پایگاه داده‌های NCBI مورد بررسی قرار گرفت (Ye *et al*., 2012). سپس، پرایمرهای طراحی شده به وسیله شرکت سیناکلون ساخته شد. توالی پرایمرهای طراحی شده در جدول ۲ ارائه شده است.

به منظور کنترل داخلی و حذف خطاهای احتمالی در اندازه‌گیری بیان ژن، ژن خانه‌دار گلیسر آلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن مرجع در بافت کبد مورد استفاده قرار گرفت. بیان چهار ژن اصلی دخیل در سوخت و ساز لیپید در بافت کبد بررسی شد تا اطلاعات جامعی از آثار اسیدهای چرب امگا- ۳، امگا-۹ و چربی اشباع در سطح مولکولی ارائه شود. ژن‌های هدف مورد بررسی در بافت کبد شامل غیراشباع‌ساز دلتا-۵ (*FADS1*)، غیراشباع-ساز دلتا-۶ (*FADS2*)، کارنیتین پالمیتوئیل ترانسفراز-۱ (CPT_{1A}) و آسیل کوآنزیم A اکسیداز-۱ ($ACOX_1$) بودند.

جدول ۱- ترکیبات غذایی و تجزیه ترکیبات شیمیایی جیره‌های آزمایشی (بر اساس ۱۰۰ درصد ماده خشک جیره)

Table1. Feed ingredients and chemical composition of experimental diets (based on 100% of ration dry matter)

Feed ingredients	Fish oil	Olive oil	Saturated fat	Without fat (control)
Alfalfa hay	18.33	18.33	18.33	18.33
Corn silage	8.33	8.33	8.33	8.33
Wheat straw	3.33	3.33	3.33	3.33
Barley grain	28.33	28.33	28.33	30
Corn grain	16.67	16.67	16.67	19.33
Soybean meal	7.92	7.92	7.92	7.92
Rice bran	5.83	5.83	5.83	5
Wheat bran	7.5	7.5	7.5	5.83
Calcium carbonate	0.33	0.33	0.5	0.5
Magnesium oxide	0.17	0.17	0.17	0.17
Mineral and vitamin mix[1]	0.5	0.5	0.5	0.5
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25
Sodium bicarbonate	0.5	0.5	0.5	0.5
Fat powder	2	2	1.83	-
Chemical composition, % of DM				
ME (Mcal/kg DM)	2.73	2.73	2.73	2.64
Crude protein (%)	13.5	13.5	13.5	13.5
Neutral detergent fiber (%)	27.6	27.6	27.6	27
Non-fibrous carbohydrate (%)	51.7	51.7	51.7	52.3
Ash (%)	6.6	6.6	6.8	6.6
Ether extract (%)	5.1	5.1	5.1	3.4
Concentrate percent	70	70	70	70

1. Composition: 600,000 IU/kg of vitamin A, 200,000 IU/kg of vitamin D, 200 mg/kg of vitamin E, 2500 mg/kg antioxidant, 195 g/kg of Ca, 80 g/kg of P, 21000 mg/kg Mg, 2200 mg/kg of Mn, 3000 mg/kg of Fe, 300 mg/kg of Zn, 300 mg/kg of Cu, 100 mg/kg of Co, 120 mg/kg of I and 1/1 mg/kg of Se.

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده برای اندازه‌گیری بیان ژن‌های درگیر در سوخت و ساز کبدی اسیدهای چرب

Table 2. The primers used to measure the expression of genes involved in the liver metabolism of fatty acids

Gene	Forward and reverse sequences
ACOX1	(fwd) TGGAGAGCCCTCAGCTATGG
	(rev) CGTTTCACCGCCTCGTAAG
CPT1A	(fwd) CTGTATCGTCGCACATTAGACCGT
	(rev) CAGACCTTGAAGTACCGCCCTCT
FADS1	(fwd) AGGAACAGTGTGACCCCTTG
	(rev) AAAAACAGCTTCTCCCAGCA
FADS2	(fwd) ATCTGCCCTACAACCACCAG
	(rev) TGTGACCCACACAAACCAGT

Real-time PCR: Real-time PCR با استفاده از مخلوط سایبر گرین (SYBR GREEN) روی سیستم iQ5 (BioRad, USA) انجام شد. واکنش‌ها شامل ۱۰ میکرولیتر از مخلوط اصلی PCR سایبرگرین (NO ROX ampliqon) شرکت ژن گستر ماندگار، به میزان ۱۰ پیکومول (یک میکرولیتر) از هر کدام از پرایمرهای اختصاصی رفت و برگشت، سه میکرولیتر از cDNA، پنج میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بود. RT-qPCR برای نمونه‌ها با شش تکرار زیستی و سه تکرار تکنیکی انجام شد. برنامه دمایی PCR شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه و پس از آن ۴۰ چرخه در دماهای ۹۵ درجه سلسیوس (واسرشته‌سازی به مدت ۱۵ ثانیه)، ۵۲ درجه سلسیوس (اتصال پرایمر به مدت ۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سلسیوس (طویل سازی به مدت ۳۰ ثانیه) و در مرحله آخر، گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه بود. DNA تکثیر شده در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد و ۵/۵ میکرولیتر از آن با استفاده از الکتروفورز افقی در ژل آگارز ۲۰ درصد خالص‌سازی شد و با اتیدیوم بروماید برای اطمینان از اختصاصی بودن قطعه تکثیر شده مشاهده شد. بازده RT-PCR برای هر یک از ژن‌ها به وسیله شیب یک مدل تابعیت خطی مورد بررسی قرار گرفت. cDNA مربوط به هر نمونه به عنوان یک الگوی PCR به منظور ایجاد نمودار چرخه آستانه (Threshold cycle (Ct)) با استفاده از رقیق‌سازی سریالی مورد استفاده قرار گرفت. بازده RT-PCR با استفاده از شیب منحنی استاندارد و بر اساس معادله (E = 10 - 1/slope - 1) محاسبه شد (Radonić *et al*., 2004). یک تجزیه منحنی ذوب برای هر تکثیر بین دمای ۵۵ تا ۹۵ درجه سلسیوس به منظور حذف محصولات غیراختصاصی مانند پرایمر دایمر، انجام پذیرفت. تجزیه داده‌های RT-PCR بر اساس روش Livak and Schemittgen (2001) انجام شد (Hashemzadeh *et al*., 2023). جهت نرمال کردن داده‌ها و نیز حذف اثر خطای احتمالی از ژن‌های خانه‌دار استفاده شد. میانگین هندسی ژن‌های مرجع برای محاسبه Ct اولیه مورد استفاده قرار گرفت و ΔCt با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\Delta Ct = Ct\ (Target\ gene) - Ct\ (Reference\ gene)$$

پس از محاسبه ΔCt برای همه نمونه‌ها، میزان بیان ژن‌های هدف نسبت به میانگین ژن‌های مرجع با استفاده از فرمول زیر اندازه‌گیری شد:

$$RE = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct\ (target\ gene)-\Delta Ct\ (Reference\ gene)}$$

داده‌ها با استفاده از روش تجزیه واریانس با بسته آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از طرح کاملاً تصادفی و مقایسات میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از نمک‌های کلسیمی روغن ماهی (امگا-۳)، روغن زیتون (امگا-۹) و چربی اشباع در دوره زمانی ۴۵ و ۹۰ روزه مصرف، تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن‌های $FADS_1$ و $FADS_2$ در بافت کبد نسبت به گروه شاهد نداشته است (جدول ۳).

یافته‌های تحقیقات قبلی نشان می‌دهند که آثار آلفا-لینولنیک اسید (ALA) و دکوزاهگزانوئیک اسید در جیره غذایی بر بیان mRNA ژن‌های $FADS_1$، $FADS_2$، $ACOX_1$، $PPAR\gamma$ و CPT_1 به نوع اسیدهای چرب یا روغن-های مورد استفاده در جیره غذایی آزمایشی، میزان افزودن آنها به جیره غذایی، نوع مواد غذایی مورد استفاده در جیره غذایی پایه و مدت زمان تغذیه جیره غذایی به دام‌ها وابسته است. همچنین، میزان بیان $FADS_1$، $FADS_2$ و $ACOX_1$ به وسیله DHA جیره غذایی می‌تواند تحت تأثیر نسبت DHA به سایر اسیدهای چرب موجود در جیره غذایی آزمایشی قرار گیرد (Gregory *et al*., 2011; Cherfaoui *et al*., 2013). تبدیل اسید لینولئیک به اسید آراشیدونیک و اسید آلفا- لینولنیک به EPA و DHA از راه آنزیم‌های غیراشباع-ساز دلتا-۵ (ژن $FASD_1$) و غیراشباع‌ساز دلتا-۶ دسچوراز (ژن $FASD_2$) انجام می‌شود (Glaser *et al*., 2010; Haug *et al*., 2014).

Mirshamsollahi *et al.* (2022) با بررسی آثار مکمل‌سازی جیره‌های غذایی بره‌های پرواری با نمک‌های کلسیمی روغن ماهی و روغن زیتون در دوره‌های زمانی ۹۰ و ۴۵ روزه مصرف، گزارش کردند که بره‌های تغذیه شده با این منابع چربی دارای افزایش وزن روزانه بالاتر و ضرایب تبدیل غذایی پایین‌تری نسبت به گروه شاهد بودند. استفاده از این منابع چربی بر میزان ماده خشک مصرفی بره‌ها تاثیر معنی-داری نداشت. بره‌های مصرف‌کننده پودر چربی نسبت به

گروه شاهد، بازده لاشه بالاتری داشتند. همچنین تغذیه با نمک‌های کلسیمی روغن ماهی و زیتون سبب کاهش چربی شکمی و چربی دور کلیه بره‌ها شد. به عبارت دیگر، مکمل-سازی جیره‌های غذایی با لیپید می‌تواند با افزایش انرژی موجود در جیره غذایی برای تقسیم به اجزای بدن باعث افزایش عملکرد لاشه شود.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از نمک‌های کلسیمی روغن ماهی (امگا-۳) و روغن زیتون (امگا-۹) در دوره‌های زمانی ۹۰ و ۴۵ روزه مصرف، باعث افزایش معنی-دار بیان mRNA کبدی ژن‌های CPT_1 و $ACOX_1$ در تیمارهای استفاده از چربی غیراشباع نسبت به تیمارهای چربی اشباع و شاهد شد (جدول ۳). آنزیم CPT_1 مسئول یک سیستم حمل و نقل میتوکندریایی است و نقش کلیدی در کنترل اکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره بلند و تحریک بتا-اکسیداسیون میتوکندریایی دارد. این ماده، آسیل کوآنزیم-آ با زنجیره بلند را به آسیل کارنیتین با زنجیر بلند تبدیل می‌کند و به این ترتیب اجازه می‌دهد بخشی از اسیدهای چرب از راه جابجایی کارنیتین، که مبادله آسیل کارنیتین‌های با زنجیره طولانی را با کارنیتین انجام می‌دهد، از مسیر غشای داخلی میتوکندری منتقل شود (Costa Alvarenga *et al*., 2015). محققین با بررسی اثر استفاده از آلفا- لینولنیک اسید (مکمل دانه کتان) و دکوزاهگزانوئیک اسید (مکمل جلبک) در یک دوره ۵۶ روزه بر بیان mRNA کبدی بره‌ها گزارش کردند که بیان کبدی ژن $FADS_2$ با مصرف مکمل DHA در مقایسه با گروه شاهد بیشتر بود و بیان CPT_{1A} کمتر بود. هنگامی که دانه کتان و مکمل جلبک (DHA) به‌طور همزمان تغذیه شدند، یک اثر افزایشی مشاهده شد به‌طوری که بیان ژن $FADS_1$ و $ACOX_1$ بالاتر از تیمار کتان یا جلبک به تنهایی بود. این مطالعه نشان داد که ارتباط بین بیان کبدی (اندام اصلی مسئول سوخت و ساز اسیدهای چرب) ژن $FADS_2$ و غلظت DHAعضله در حیواناتی که از جیره‌های غذایی جلبک و کتان×جلبک استفاده می‌کردند، وجود دارد (Ponnampalam *et al.,* 2015). این محققین بیان کردند که بیان کمتر mRNA کبدی CPT_{1A} در بره‌های تغذیه شده با DHA، نشانگر بتا اکسیداسیون کمتر اسید چرب است، زیرا این حیوانات ممکن است از گلیکوژن به عنوان منبع انرژی در کبد استفاده کنند (Bonnefont *et al.*, 2004). از طرف دیگر، کاهش مسیر بتااکسیداسیون اسید چرب هنگامی که با سطوح بالایی از DHA در عضله همراه باشد، ممکن است نشان دهد که این اسید چرب زنجیره بلند (DHA)ممکن است به‌جای استفاده از بتا اکسیداسیون از یک مسیر جایگزین (فعالیت غیر اشباع‌ساز دلتا-۴) تولید شود (Ponnampalam *et al.,* 2015). در تأیید نتایج پژوهش حاضر، گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهند تغذیه با جیره‌های غذایی غنی از روغن ماهی باعث افزایش اسید چرب امگا-۳ در بافتهای عضلانی می‌شود و در نتیجه، تنظیم بیان ژن‌های کاتابولیسم لیپیدها (از جمله CPT_1 و $ACOX_1$) به وجود می‌آید (Kopecky *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2002). Clarke *et al.* (2000) نیز گزارش کردند که اسیدهای چرب بلند زنجیر امگا-۳ با تنظیم بیان ژن‌های رمزگذار پروتئین‌های درگیر در اکسیداسیون اسیدهای چرب (به عنوان مثال CPT_1 و $ACOX_1$)، آثار خود را بر سوخت و ساز لیپیدها و ترموژنز اعمال می‌کنند، در حالی‌که به‌طور همزمان تنظیم رونویسی ژن‌های رمزگذار پروتئین‌های درگیر در ساخت چربی (به عنوان مثال اسید چرب سنتاز) را انجام می‌دهند. آثار مکمل‌سازی جیره غذایی گوسفندان با جلبک (به‌عنوان منبعی از EPA و DHA) بر بیان ژن‌هایی که انباشت اسیدهای چرب غیراشباع امگا-۳ را هدایت می‌کنند، بررسی و سطوح mRNA ژن‌های $FADS_1$، $FADS_2$، CPT_1، SCD و ACC در mRNA چربی‌های کبدی، ماهیچه‌ای و چربی زیر پوستی بره‌های تغذیه شده با جیره غذایی شاهد یا جیره شاهد به همراه جلبک (۱/۹۲ درصد ماده خشک جیره) اندازه‌گیری شد. بیان $FADS_1$ در بافت کبدی تحت تأثیر اثر متقابل بین تغذیه دام و مکمل جلبک قرار نگرفت، اما زمانی که بره‌ها در مقایسه با جیره شاهد، جیره حاوی جلبک مصرف کردند، بالاتر بود. بیان $FADS_1$ در عضله با غلظت 20:4n-6، 20:5n-3 و 22:4n-6 همبستگی منفی داشت (Costa Alvarenga *et al.,* 2016).

اسید اولئیک فراوان‌ترین اسید چرب در بافت چربی گاو و گوسفند است. از آنجایی که بیشتر چربی موجود در ماهیچه دام به وسیله سلول‌های چربی داخل عضلانی تامین می-شود، اسید اولئیک نیز اسید چرب غالب در گوشت دام‌ها است. در بسیاری از گونه‌ها، غلظت اسید اولئیک در بافت چربی به وسیله میانگین غلظت اسید اولئیک در جیره تعیین می‌شود، اما در گونه‌های نشخوارکننده مانند گاو گوشتی، اسید اولئیک از راه غیراشباع شدن اسید استئاریک

جدول ۳- اثر استفاده از اسیدهای چرب امگا-۳، امگا-۹ و اشباع بر بیان ژن‌های مورد بررسی در بافت کبدی

Table 3. Effect of omega-3, omega-9, and saturated fatty acids on the expression of studied genes in liver tissue

The studied genes	Rations							SEM	*P*-value
	1	2	3	4	5	6	7		
FADS1	1.48	1.64	1.55	1.22	1.63	1.43	1.32	0.18	0.67
FADS2	1.09	1.03	1.15	1.26	1.32	1.25	1.21	0.099	0.69
CPT1	0.8 ^{b}	1.84 ^{a}	1.79 ^{a}	1.87 ^{a}	1.85 ^{a}	0.84 ^{b}	0.73 ^{b}	0.091	0.01
ACOX1	0.83 ^{c}	1.32 ^{ab}	1.66 ^{a}	1.25 ^{ab}	1.18 ^{ab}	0.85 ^{c}	0.95 ^{c}	0.063	0.02

Treatments: 1) control, 2) using fish oil for 90 days, 3) using fish oil for 45 days, 4) using olive oil for 90 days, 5) using olive oil for 45 days, 6) using saturated fat for 90 days, 7) using saturated fat for 45 days.

$^{a-c}$ Different letters in each row indicate significant differences between treatments (P<0.05).

ناشی از بیوهیدروژناسیون اسیدهای لینولئیک و لینولنیک در شکمبه، از راه فعالیت *SCD*، تولید می‌شود. در این گونه‌ها، غلظت اسید اولئیک در بافت چربی وابسته به فعالیت غیراشباع‌ساز دلتا-۹ است که به وسیله ژن غیراشباع‌ساز استیروئیل کوآنزیم-آ (*SCD*) کدگذاری می‌شود (Smith *et al*., 2006; Iommelli *et al.*, 2021).

اسیدهای چرب بلند زنجیر PUFA، بیان *SCD* و همچنین سایر ژن‌های لیپوژنیک را با کاهش بیان ژن و بلوغ پروتئین اتصال‌دهنده عامل تنظیم استرول (*SREBP1*) سرکوب می‌کنند. *SREBP*ها به عنوان فاکتورهای رونویسی ساخت لیپید برای تولید کلسترول و اسیدهای چرب، فعال‌کننده ژن‌های مورد نیاز برای ساخت و ادغام اسیدهای چرب به تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها و فسفولیپیدها، از جمله ژن *SCD*، ایجاد شده‌اند. اسیدهای چرب بلند زنجیر امگا-۶ و امگا-۳ جیره غذایی، بیان ژن *SCD* و *SREBP* را کاهش می‌دهند، در حالی‌که PUFAها به عنوان فعال‌کننده فاکتورهای رونویسی هسته‌ای مانند *PPAR* شناخته می‌شوند. SCD به عنوان یک آنزیم کلیدی لیپوژنیک به دلیل نقش آن در تبدیل اسیدهای چرب اشباع به اسیدهای چرب MUFA با قرار دادن یک پیوند دوگانه در موقعیت امگا-۹ در نظر گرفته می‌شود (Dervishi *et al*., 2010).

در پژوهشی که به وسیله Belal *et al.* (2018) انجام شد، بیان ژن *PPARα* و بیان ژن‌های دخیل در سوخت و ساز لیپید مانند *ACOX* و لیپوپروتئین لیپاز (LPL) در گاوهای تغذیه شده با اسید لینولئیک، اسید اولئیک و ترکیب این دو نسبت به گروه شاهد به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. در مقایسه با گروه شاهد، لینولئات و اولئات بیان ژن *CPT1* را افزایش دادند که بیانگر افزایش بتااکسیداسیون اسیدهای چرب است. اسیدهای چرب غیراشباع با چند باند دوگانه بیان ژن‌های مسئول ساخت اسیدهای چرب و تری‌گلیسیرید را کاهش می‌دهند، در حالی‌که بیان ژن‌های دخیل در اکسیداسیون اسید چرب را تحریک می‌کنند.

اسید اولئیک ممکن است به عنوان یک سیگنال برای ایجاد یک حلقه بازخورد منفی برای مقابله با اسیدهای چرب اضافی و حفظ هموستاز لیپید عمل کند. کنترل تنظیم نرخ اکسیداسیون اسیدهای چرب در سطوح مختلف شامل اجزای رونویسی و غیررونویسی رخ می‌دهد. به عنوان مثال، در میان ساز و کارهای غیررونویسی، افزایش مالونیل کوآنزیم-آ داخل سلولی (محصول آنزیم ساخت اسیدهای چرب، استیل-کوآ کربوکسیلاز) با مهار ناقل اسید چرب میتوکندری، *CPT1*، به شدت اکسیداسیون اسیدهای چرب را سرکوب می‌کند. اسید اولئیک از راه ساز و کارهای سیگنالینگ/رونویسی، اکسیداسیون اسیدهای چرب را تقویت می‌کند و یک بازخورد (فیدبک) منفی ارائه می‌کند که ممکن است حداقل تا حدی، برخی از آثار محافظتی این اسید چرب را در برابر التهاب، چربی پریشی و مقاومت به انسولین توضیح دهد. در سلول‌های ماهیچه‌ای اسکلتی، تیمار با اسید اولئیک، سطوح داخل سلولی آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cAMP) را افزایش داد که فعالیت پروتئین کیناز A را فعال کرد. در نتیجه، اسید اولئیک به شدت سرعت اکسیداسیون کامل اسیدهای چرب را در سلول‌های ماهیچه‌ای اسکلتی افزایش می‌دهد (Lim *et al.*, 2013).

محققین با ارزیابی تأثیر استفاده از نمک‌های کلسیمی EPA و DHA روی بیان ژن‌های وابسته به سوخت و ساز چربی در بافت کبد و بافت چربی زیر پوستی بره‌های پرواری گزارش کردند که فراوانی mRNA کبدی لیپاز حساس به هورمون (HSL) در بره‌های متولد شده از میش‌های گروه EPA + DHA در مقابل بره‌های گروه نمک‌های کلسیمی چربی اسید پالمیتیک و اسید اولئیک بیشتر بود.

بیان mRNA کبدی غیراشباع‌ساز استیروئیل کوآنزیم-آ (*SCD*)، اسید چرب سنتاز (*FAS*)، $FADS_1$ و $FADS_2$ در بره‌های تیمار EPA + DHA کاهش یافت. در مجموع، تغییرات بیان mRNA نشان می‌دهد که در بره‌های گروه EPA + DHA، لیپوژنز در کبد بره‌ها کاهش یافته و لیپولیز در کبد بره‌ها در مقابل گروه چربی اشباع، در طول دوره پرواز افزایش یافته است. آنزیم *SCD* یک پیوند دوگانه در کربن نهم از انتهای کربوکسیل اسید چرب با ۱۲ تا ۱۹ کربن معرفی می‌کند، در حالی‌که $FADS_1$ و $FADS_2$ به ترتیب پیوندهای دوگانه در کربن‌های پنجم و ششم اضافه می‌کنند. بنابراین، کاهش بیان *FAS*، *SCD*، $FADS_1$ و $FADS_2$ در بافت کبد در تیمار EPA + DHA نشان می‌دهد که ساخت اسید چرب به‌طور بالقوه در مقایسه با تیمار چربی اشباع کاهش یافته است (Coleman *et al.*, 2019).

در مطالعه دیگری روی گاوهای شیری، مکمل روغن ماهی یا ریز جلبک باعث کاهش بیان *FAS*، *SCD*، $FADS_1$ و $FADS_2$ در بافت کبد در مقایسه با جیره بدون مکمل چربی شد (Vahmani *et al.*, 2014). در بزهای شیری، مصرف مکمل روغن آفتابگردان و روغن ماهی با هم سبب کاهش بیان *SCD* و $FADS_2$ در بافت کبد در مقایسه با روغن آفتابگردان به تنهایی شد (Toral *et al*., 2013).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از نمک کلسیمی روغن ماهی و روغن زیتون باعث افزایش بیان ژن‌های درگیر در لیپولیز چربی‌های بافت کبد بره‌ها می‌شود. به منظور بررسی تأثیر استفاده از منابع مختلف چربی بر بیان سایر ژن‌های درگیر در سوخت و ساز چربی، پیشنهاد می‌شود مطالعات دیگری روی ژن‌های *SREBP*، *PPARγ* و *SCD* در چربی‌های قسمت‌های مختلف بدن از جمله چربی‌های زیر جلدی و احشایی بره‌های پرواری نیز انجام شود.

فهرست منابع

Abrahams, V. (2017). Novel mechanisms of placental inflammation in obstetric antiphospholipid syndrome. *Placenta*, *57*, 243.

Arana, A., Mendizabal, J. A., Alz´on, M., Eguinoa, P., Beriain, M. J., & Purroy, A. (2006). Effect of feeding lambs oleic acid calcium soaps on growth, adipose tissue development and composition. *Small Ruminant Research*, *63*, 75-83. doi:10.1016/j.smallrumres.2005.02.006

Belal, S. A., Subramaniyan Sivakumar, A., Kang, D. R., Cho, S., Choe, H. S., & Shim, K. S. (2018). Modulatory effect of linoleic and oleic acid on cell proliferation and lipid metabolism gene expressions in primary bovine satellite cells. *Animal Cells and Systems*, *22*(5), 324–333. doi: 10.1080/19768354.2018.1517824

Bonnefont, J. P., Djouadi, F., Prip-Buus, C., Gobin, S., Munnich, A., & Mol, B. J. (2004). Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Molecular Aspects of Medicine*, *25*, 495–520. doi: 10.1016/j.mam.2004.06.004

Cherfaoui, M., Durand, D., Bonnet, M., Bernard, L., Bauchart, D., Ortigues-Marty, I., & Gruffat, D. (2013). A grass-based diet favours muscle n-3 long-chain PUFA deposition without modifying gene expression of proteins involved in their synthesis or uptake in Charolais steers. *Animal*, *7*, 1833-1840. doi: 10.1017/S1751731113001432

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, *1*, 581–585. doi: 10.1038/nprot.2006.83

Clarke, S. (2000). Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *British Journal of Nutrition*, *83*, S59-S66. doi: 10.1017/s0007114500000969

Clarke, S. D. (2001). Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. I. Molecular mechanism for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *American Journal of Physiology*, *281*, 865-869. doi: 10.1152/ajpgi.2001.281.4. G865

Coleman, D. N., Carranza Martin, A. C., Jin, Y., Lee, K., & Relling, A. E. (2019). Prepartum fatty acid supplementation in sheep. IV. Effect of calcium salts with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in the maternal and finishing diet on lamb liver and adipose tissue during the lamb finishing period. *Journal of Animal Science*, *97*(7), 3071-3088. doi: 10.1093/jas/skz154

Costa Alvarenga, T. I. R., Chen, Y., Furusho-Garcia, I. F., Olalquiaga Perez, J. R., & Hopkins, D. L. (2015). Manipulation of Omega-3 PUFAs in Lamb: Phenotypic and Genotypic Views. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *14*, 189-204. doi: 10.1111/1541-4337.12131

Costa Alvarenga, T. I. R., Chen, Y., Lewandowski, P., Ponnampalam, E. N., Sediq, S., Clayton, E. H., van de Ven, R. J., Olalquiaga Perez, J. R., & Hopkins, D. L. (2016). The expression of genes encoding enzymes regulating fat metabolism is affected by maternal nutrition when lambs are fed algae high in omega-3. *Livestock Science*, *187*, 53-60. doi: 10.1016/j.livsci.2016.02.013

Dervishi, E., Serrano, C., Joy, M., Serrano, M., Rodellar, C., & Calvo, J. H. (2010). Effect of the feeding system on the fatty acid composition, expression of the Δ9-desaturase, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha, Gamma, and Sterol Regulatory Element Binding Protein 1 genes in the semitendinous muscle of light lambs of the Rasa Aragonesa breed. *BMC Veterinary Research*, *6*, 40-51. doi:10.1186/1746-6148-6-40

Dervishi, E., Serrano, C., Joy, M., Serrano, M., Rodellar, C., & Calvo, J. H. (2011). The effect of the feeding system in the expression of genes related with fat metabolism in semitendinous muscle in sheep. *Meat Science*, *89*, 91-97. doi: 10.1016/j.meatsci.2011.04.003

Fekri, A., & Ganj Khanlu, M. (2021). Effects of supplemental omega-3 protected sources of fish oil and flaxseed oil on ruminant performance. *Domestic Journal*, *20* (18), 48-53. doi: 10.22059/domesticsj.2021.312293.1053 [In Persian]

Gregory, M. K., Gibson, R. A., Cook-Johnson, R. J., Cleland, L. G., & James, M. J. (2011). Elongase reactions as control points in long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis. *PLoS One*, *6*(12), e29662. doi: 10.1371/journal.pone.0029662

Hashemzadeh, F., Rafeie, F., Hadipour, A., & Rezadoust, M. H. (2023). Effect of adding a phytogenic-rich herbal mixture to diet on the expression pattern of some insulin hormone metabolism-related candidate genes of heat-stressed fattening Afshari-Shal lambs. *Animal Production Research*, *12*(1), 25-37. doi: 10.22124/AR.2023.21822.1690 [In Persian]

Haug, A., Nyquist, N. F., Thomassen, M., Høstmark, A. T., & Østbye, T. K. (2014). N-3 fatty acid intake altered fat content and fatty acid distribution in chicken breast muscle, but did not influence mRNA expression of lipid-related enzymes. *Lipids in Health and Disease*, *13*, 92. doi: 10.1186/1476-511X-13-92

Iommelli, P., Infascelli, F., Musco, N., Grossi, M., Ferrara, M., Sarubbi, F., D'Aniello, B., Lombardi, P., & Tudisco, R. (2021). Stearoyl-CoA desaturase activity and gene expression in the adipose tissue of buffalo bulls was unaffected by diets with different fat content and fatty acid profile. *Agriculture*, *11*, 1209-1221. doi: 10.3390/agriculture11121209

Jager, N., Hudson, N. J., Reverter, A., Barnard, R., Café, L. M., Greenwood, P. L, & Dalrymple, B. P. (2013). Gene expression phenotypes for lipid metabolism and intramuscular fat in skeletal muscle of cattle. *Journal of Animal Science*, *91*, 1112-1128. doi: 10.2527/jas.2012-5409

Kopecky, J., Rossmeisl, M., Flachs, P., Kuda, O., Brauner, P., Jilkova, Z., Stankova, B., Tvrzicka, E., & Bryhn, M. (2009). Symposium on 'Frontiers in adipose tissue biology' n-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function. *Proceedings of the Nutrition Society*, *68*, 361-369. doi: 10.1017/S0029665109990231

Ladeira, M. M., Schoonmaker, J. P., Swanson, K. C., Duckett, S. K., Gionbelli, M. P., Rodrigues, L. M., & Teixeira, P. D. (2018). Review: Nutrigenomics of marbling and fatty acid profile in ruminant meat. *Animal*, *12*(2), 282-294. doi:10.1017/S1751731118001933

Lim, J. H., Gerhart-Hines, Z., Dominy, J. E., Lee, Y., Kim, S., Tabata, M., Xiang, Y. K., & Puigserver, P. (2013). Oleic acid stimulates complete oxidation of fatty acids through protein kinase a-dependent activation of SIRT1-PGC1α complex. *The Jourrnal of Biological Chemistry*, *288*(10), 7117-7126. doi: 10.1074/jbc.M112.415729

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2−ΔΔCT method. *Methods*, *25*(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

Matsumoto, H., Nogi, T., Tabuchi, I., Oyama, K., Mannen, H., & Sasazaki, S. (2014). The SNPs in the promoter regions of the bovine FADS2 and FABP4 genes are associated with beef quality traits. *Livestock Science*, *163*, 34-40. doi: 10.1016/j.livsci.2014.02.016

Mirshamsollahi, A. Ganjkhanlou, M., Fatehi, F., Zali, A., & Sadeghi, M. (2022). Effect of source and duration of protected fatty acids feeding, on production performance, carcass characteristics and blood metabolites in fattening lambs. *Research on Animal Production*, *13*(36), 47-56. doi:10.52547/rap.13.36.47 [In Persian]

NRC. (2007). Nutrient Requirments of Small ruminant (7th ed.). National Academy Press, Washington, DC.

Ponnampalam, E. N., Lewandowski, P. A., Fahri, T., Fahri, V. F., Burnett, F. R., Dunshea, T. Plozza, J., & Jacobs, L. (2015). Forms of n-3 (ALA, C18:3n-3 or DHA, C22:6n-3) fatty acids affect carcass yield, blood lipids, muscle n-3 fatty acids and liver gene expression in lambs. *Lipids*, *50*(11), 1133-1143. doi: 10.1007/s11745-015-4070-4

Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W., & Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *313*, 856-862. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.177

Smith, S. B., Lunt, D. K., Chung, K. Y., Choi, C. B., Tume, R. K., & Zembayashi, M. (2006). Adiposity, fatty acid composition, and delta-9 desaturase activity during growth in beef cattle. *Animal Science Journal*, *77*, 478-486. doi: 10.1111/j.1740-0929.2006.00375x

Toral, P. G., Bernard, L., Delavaud, C., Gruffat, D., Leroux, C., & Chilliard, Y. (2013). Effects of fish oil and additional starch on tissue fatty acid profile and lipogenic gene mRNA abundance in lactating goats fed a diet containing sunflower-seed oil. *Animal*, *7*, 948–956. doi: 10.1017/S1751731113000049

Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Rene´Geurts, R., & Leunissen, A. M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, *35*, 71-74. doi: 10.1093/nar/gkm306

Vahmani, P., Glover, K. E., & Fredeen, A. H. (2014). Effects of pasture versus confinement and marine oil supplementation on the expression of genes involved in lipid metabolism in mammary, liver, and adipose tissues of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *97*, 4174-4183. doi: 10.3168/jds.2013-7290

Vassiliou, E. K., Gonzalez, A., Garcia, C., Tadros, J. H., Chakraborty, G., & Toney, J. H. (2009). *Lipids in Health and Disease*, *8*, 25. doi: 10.1186/1476-511X-8-25

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, *13*, 134-145. doi:10.1186/1471-2105-13-13