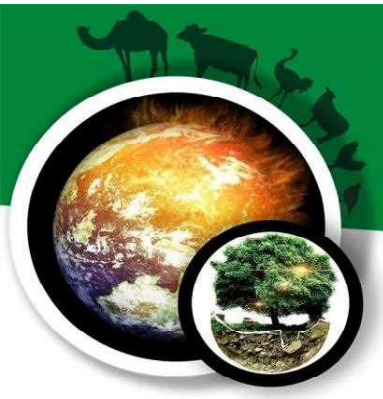


بسم الله الرحمن الرحیم

چهارمین همایش ملی

پژوهش‌های نوین در علوم دامی

با محوریت تنش‌های محیطی

دبیر همایش: دکتر **سیدجواد حسینی واشان**

دبیر علمی همایش: دکتر **محمدرضا اکبری**

دبیر اجرایی همایش: دکتر **حسین نعیمی پور یونسی**

برگزار کننده:

دانشگاه بیرجند

با همکاری:

موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

انجمن علوم دامی ایران

با حمایت:

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

دانشگاه فردوسی مشهد و دانشگاه شهید باهنرکرمان

سازمان جهاد کشاورزی استان خراسان جنوبی،

اداره کل دامپزشکی استان خراسان جنوبی

اداره کل امور عشایر استان خراسان جنوبی

سازمان نظام دامپزشکی استان خراسان جنوبی

کشت و صنعت بیدمشک، مرغ مادر جنوب خراسان، شرکت خوراک دام ستاره کیان، شرکت دان و علوفه شرق، شرکت خوراک دام دان و علوفه خوشینه، زنجیره تولیدی فروزان، شرکت تعاونی مرغداران مودت قائن، شرکت پهن دشت، بانک تجارت، صندوق حمایت از توسعه بخش کشاورزی استان خراسان جنوبی، شرکت پودر کیمیایی زنوک،

آدرس: بیرجند- دانشگاه بیرجند- پردیس امیرآباد- دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی

تلفن ۰۵۶۳۱۰۲۷۶۳۹؛ دورنگار : ۰۵۶۳۲۲۰۴۰۵۰؛ وبسایت: www.conf.birjand.ac.ir/ncaras4 ایمیل: ncaras@birjand.ac.ir

اثر نوع تزریق در مهار بیان ژن میوستاتین در مدل‌های موش و موش صحرایی

علی جوادمنش*، میترا ریاسی، الناز کرباسچیان
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد،
*ایمیل نویسنده مسئول: javadmanesh@um.ac.ir

چکیده

مقدمه: میوستاتین (MSTN)، فاکتور تمایز و رشد ۸ (GDF8) یکی از اعضای خانواده ی بزرگ فاکتورهای رشد ترشحی TGF-β است که مهار این پروتئین تاثیر چشمگیری بر رشد عضلانی دارد. DNAi یک فناوری پیشرفته و نوین جهت تنظیم بیان ژن است. هدف از مطالعه¬ی حاضر مهار بیان ژن MSTN در بافت عضله با استفاده از تزریق درون صفاقی DNAi مهار کننده بیان ژن MSTN در موش صحرائی و تزریق عضلانی همین مولکول در موش می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه در آزمایش اول از ۱۲ موش نر و در آزمایش دیگر ۱۲ موش صحرائی ویستار نر در قالب طرح کاملا تصادفی با ۲ تیمار و ۶ تکرار استفاده شد. گروه ها شامل: گروه تزریق به مقدار $\mu g/kg$ ۱۰ وزن بدن سه بار در هفته و گروه شاهد بدون تزریق. آزمایش به مدت ۴ هفته به طول انجامید و وزن حیوانات هر هفته اندازه گیری شد. سپس، اثر تزریق مولکول DNAi بر وزن های قلب و پا در حیوانات بررسی شد. اسلایدهای بافت‌شناسی از عضله دوقلو پا جهت بررسی بافت شناسی تهیه شدند. در نهایت، داده‌های جمع‌آوری‌شده با استفاده از آزمون T و در نرم افزار JMP PRO نسخه ۱۷/۰ آنالیز شدند.

نتایج و بحث: نتایج نشان داد وزن پا به طور معنی داری افزایش یافت اما تزریق DNAi اثر معنی داری روی افزایش وزن نهایی و همچنین وزن قلب نداشت ($P>0.05$). همچنین بررسی هیستولوژی حاکی از بروز هایپرتروفی در بافت عضله پا در موش ها بود که خود دلیلی بر کاهش تراکم عضله در واحد سطح و افزایش در توده بافت عضله است که در موش های صحرایی دیده نشد. با توجه به اثر کاهش بیان ژن MSTN روی بافت چربی، عدم افزایش معنی دار در وزن بدن و قلب ممکن است بدلیل از دست دادن چربی بین بافتی در عضلات و یا قلب باشد. مقایسه نتایج تزریق درون صفاقی و عضلانی نیز نشان دهنده موثرتر بودن روش تزریق عضلانی بود. این ممکن است بعلت این باشد که تزریق مولکول در بافت هدف صورت گرفته است.

نتیجه گیری کلی: روش مهار بیان ژن مبتنی بر DNAi روشی جدید بوده که هنوز به طور گسترده مورد استفاده قرار نگرفته است. نتایج این پژوهش نشان داد که تزریق مولکول DNAi می تواند باعث مهار رونویسی ژن MSTN شود. این نتایج می تواند توسط اندازه گیری بیان ژن و نیز فراسنجه های خونی مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

واژگان کلیدی: DNAi، مایوستاتین، موش، عضله دوقلو، قلب

مقدّمه

مایوستاتین(MSTN) یک سرکوب گر قدرتمند رشد و نمو بافت عضله است. این ژن در هیپرپلازی سلول¬های عضلانی قبل از تولد تأثیر می¬گذارد و باعث تنظیم تعداد میوبلاست¬های موجود برای تشکیل عضله می¬شود. همچنین، MSTN تمایز میوبلاست را مهار می¬کند و امکان فیوژن میوبلاست را به داخل میوتیوب کاهش می¬دهد (۲). MSTN در بسیاری از بافت‌ها از جمله بافت چربی بیان می‌شود، اما بیشترین میزان بیان آن در عضلات اسکلتی است (۱۰). ژن MSTN در پستانداران بشدت محافظت شده است و در تمامی گونه‌ها دارای ۳ اگزون و ۲ اینترون است. مطالعات نشان داده¬اند که جهش طبیعی از دست دادن عملکرد (LOF) در گاو منجر به افزایش رشد عضلانی و

بهبود ضریب تبدیل خوراک می¬شود. درواقع، جهش‌های LOF در MSTN باعث ایجاد فنوتیپ «عضله مضاعف» در گونه‌های مختلف ازجمله گاو، گوسفند، موش، انسان و سگ می‌شود (۲).

تغییرات در بیان این پروتئین می‌تواند تأثیرات عمیقی بر توده عضلانی، تنظیم متابولیک، و فیزیولوژی کلی بدن داشته باشد. تحقیقات نشان داده‌اند که مهار MSTN نه تنها به افزایش توده عضلانی منجر می‌شود، بلکه بهبودهای قابل توجهی در سلامت متابولیک ایجاد می‌کند. این موضوع نشان‌دهنده اهمیت MSTN به عنوان یک هدف بالقوه درمانی برای بیماری‌هایی است که با تحلیل رفتن عضلات یا اختلالات متابولیک همراه هستند.

علاوه بر نقش آن در رشد عضلات، MSTN بر تجمع چربی نیز تأثیر می‌گذارد. مطالعات در موش‌های فاقد MSTN نشان داده است که حتی در شرایط رژیم غذایی معمولی، کاهش قابل‌توجهی در تجمع چربی با افزایش سن وجود دارد. این امر نشان می‌دهد که مهار MSTN می تواند با افزایش رشد عضلات و کاهش رسوب چربی، استراتژی مؤثری برای پیشگیری از چاقی و دیابت نوع ۲ باشد (۶).

خاموش کردن ژن از طریق قطعات RNA و DNA یک راه آسان و سریع برای شناسایی عملکرد ژن در مقایسه با روش¬های دستورزی ژن از قبیل حذف ژن یا جهش ژن است. از روش¬های مختلفی نظیر RNAi و DNAi جهت خاموش کردن موقت ژن¬ها استفاده می¬شود (۷). نقطه عطفی در این زمینه، مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۴ بود که در آن کاوای-تویوکا و همکارانش از روش DNAi درون‌تنی برای مهار ژن AcPHOT2 در سرخس استفاده کردند (۵). کارایی چشمگیر این روش در سرکوب بیان ژن در سرخس، دریچه‌ای نو به‌سوی تحقیقات گسترده‌تر در این حوزه گشود. در طراحی مولکول‌های DNAi، توجه به بخش‌های خاصی از DNA که می‌توانند منجر به خاموش‌سازی مؤثر ژن شوند، حائز اهمیت است. ناحیه‌ای که به‌طورمعمول برای این منظور در نظر گرفته می‌شود، توالی غیر کدکننده بالادست محل رونویسی ژن است. پروموتور، به‌عنوان بخش کنترل‌کننده رونویسی ژن، نقشی کلیدی در تنظیم بیان ژن ایفا می‌کند. مولکول‌های DNAi با اتصال به پروموتور، می‌توانند این ناحیه را برای اتصال عوامل رونویسی مسدود و غیرفعال کنند. درنتیجه، رونویسی از ژن هدف متوقف‌شده و بیان ژن به‌طور مؤثر خاموش می‌شود (۸). هدف از مطالعه¬ی حاضر مهار بیان ژن MSTN در بافت عضله با تزریق درون صفاقی DNAi اختصاصی مهار کننده بیان ژن MSTN در موش صحرائی و تزریق عضلانی همین مولکول در عضله پای موش می باشد.

مواد و روش ها

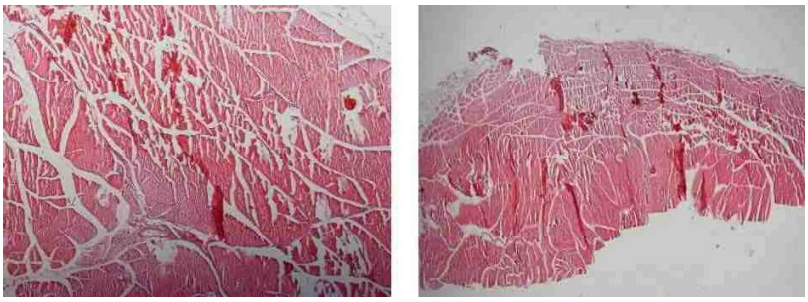
توالی های DNAi اختصاصی مهار کننده بیان ژن MSTN موش و موش صحرایی، از مطالعه های قبلی اخذ شد (۴ و ۸). در این مطالعه در آزمایش اول از ۱۲ موش نر هم وزن و هم سن و در آزمایش دیگر ۱۲ موش صحرائی ویستار نر در قالب طرح کاملا تصادفی با ۲ تیمار و ۶ تکرار استفاده شد. گروه ها شامل: گروه تزریق به مقدار 10 $\mu g/kg$ وزن بدن سه بار در هفته و گروه شاهد بدون تزریق. طبق پروتکل رفتار با حیوانات براساس اصول بیانیه هلسینکی، موش ها در گروههای دو الی سه تایی درون قفسهایی از جنس پلیکربنات، در دمای۲۲ تا ۲۴ درجه سانتیگراد و چرخه روشنایی-تاریکی۱۲ساعته، با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند (۹). آزمایش به مدت ۴ هفته به طول انجامید و وزن حیوانات هر هفته اندازه گیری شد. سپس، اثر تزریق مولکول DNAi بر وزن قلب و عضله پا در حیوانات بررسی شد. اسلایدهای بافت‌شناسی از عضله کف پا جهت بررسی بافت شناسی تهیه شدند. در نهایت، داده‌های جمع‌آوری‌شده با استفاده از آزمون T-student و در نرم افزار JMP PRO نسخه ۱۷/۰ آنالیز شدند.

نتایج و بحث

داده های مربوط به وزن موش ها و موش های صحرائی در هفته اول و آخر دوره در جدول های ۱ و ۲ ارائه شده است. بررسی مقایسه میانگین وزن موش¬ها در هفته اول نشان داد که توزیع موش¬ها و موش های صحرایی در گروه¬ها به¬صورت تصادفی بوده است و هیچ اختلاف معنی داری بین ان¬ها دیده نشد. وزن پا در موش ها به طور معنی داری افزایش یافت اما تزریق درون صفاقی DNAi اثر معنی داری روی افزایش وزن نهایی و همچنین وزن قلب در موش های صحرایی نداشت ($P>0.05$). در مورد استفاده از روش DNAi در خاموشی ژن MSTN تحقیقات بسیار اندکی انجام شده است اما نتایج تحقیق حاضر با نتایج Eilers و همکاران (۲۰۲۱) مطابقت داشت (۳). آنها نیز

آدرس: بیرجند- دانشگاه بیرجند- پردیس امیرآباد- دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی
تلفن ۰۵۶۳۱۰۲۷۶۳۹؛ دورنگار : ۰۵۶۳۲۲۰۴۰۵۰؛ وبسایت: www.conf.birjand.ac.ir/ncaras4 ایمیل: ncaras@birjand.ac.ir

تزریق عضلانی را موثر تر از تزریق درون صفاقی و حتی تزریق وریدی تشخیص دادند. نتیجه بخش بودن تزریق عضلانی نشان دهنده کافی بودن مدت زمان آزمایش بود که با نتایج سایر محققین نیز مطابقت داشت (۳). مدت زمان آزمایش همچنین بررسی هیستولوژی حاکی از بروز هایپرتروفی در بافت عضله پا در موش ها بود که خود دلیلی بر کاهش تراکم عضله در واحد سطح و افزایش در توده بافت عضله است که در موش های صحرایی دیده نشد (شکل ۱). آکوستا و همکاران (۲۰۰۵) ادعا کردند با تزریق dsRNA مهارکننده¬ی ژن MSTN منجر به افزایش توده بدنی در ماهی های تیمار شده بود. تزریق dsRNA در مراحل اولیه رشد در گورخرماهی باعث هیپرپلازی یا هیپرتروفی شد (۱). ممکن است سن تزریق روی نتایج تاثیر گذار باشد و در سن کمتر اثر مهارکنندگی بالاتری مشاهده شود.



شکل ۱. بافت شناسی عضله کف پا در موش های تزریق شده با DNAi (سمت راست) و موش های کنترل (چپ)

Figure 1. Soleus muscle histology of mice injacted with DNAi (Right) and control mice (Left)

جدول۱. نتایج وزن بدن و اندام در دو گروه آزمایشی در موش صحرایی. (i) گروه تزریق DNAi به اندازه 10 mg/kg وزن بدن (ii) گروه تزریق سالین.

Table 1. The results of body and organ weights in the two experimental groups in rats. (i) DNAi group received 10 mg/kg of body weight of DNAi (ii) Saline injection group.

معنی داری P-value	تزریق DNAi DNAi injection	شاهد Control	متغییرها Variables
0.62	209.50 ± 7.40	204.67 ± 9.56	وزن روز اول (گرم) Weight Day-1 (g)
0.58	267.13 ± 10.82	278.35 ± 9.37	وزن نهایی (گرم) Final weight (g)
0.18	16.26±0.97	16.54±0.07	وزن پا (گرم) Leg weight (g)
0.79	0.89 ± 0.3	0.88 ± 0.3	وزن قلب (گرم) Hear weight (g)

آدرس: بیرجند- دانشگاه بیرجند- پردیس امیرآباد- دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی
تلفن ۰۵۶۳۱۰۲۷۶۳۹؛ دورنگار : ۰۵۶۳۲۲۰۴۰۵۰؛ وبسایت: www.conf.birjand.ac.ir/ncaras4 ایمیل: ncaras@birjand.ac.ir

جدول۲. نتایج وزن بدن و اندام در دو گروه آزمایشی در موش. (i) گروه تزریق DNAi به اندازه 10 mg/kg وزن بدن (ii) گروه تزریق سالین. حروف مختلف تفاوت معنی داری را نشان داد (P < ۰/۰۵).

Table 1. The results of body and organ weights in the two experimental groups in mouse. (i) DNAi group received 10 mg/kg of body weight of DNAi (ii) Saline injection group. Different letter indicated a significant difference (P < 0.05).

معنی داری P-value	تزریق DNAi DNAi injection	شاهد Control	متغییرها Variables
0.72	12.81 ± 1.20	13.54 ± 1.56	وزن روز اول Weight Day-1
0.61	27.44 ± 2.80	29.28 ± 2.33	وزن نهایی Final weight (g)
0.03	1.25^{a} ± 0.15	0.98^{b} ± 0.1	وزن عضله پا Leg weight
0.45	0.45±0.1	0.4±0.08	وزن قلب (گرم) Heart weight (g)

نتیجه‌گیری کلی

روش مهار بیان ژن مبتنی بر DNAi روشی جدید بوده که هنوز به طور گسترده مورد استفاده قرار نگرفته است. نتایج این پژوهش می تواند توسط اندازه گیری بیان ژن و نیز فراسنجه های خونی مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

قدردانی

این پژوهش با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد صورت گرفت.

منابع

1-Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., González, O., & Estrada, M. P. (2005). Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. Journal of Biotechnology, 119(4), 324-331.

2-Dilger, A. C., Chen, X., Honegger, L. T., Marron, B. M., & Beever, J. E. (2022). The potential for gene-editing to increase muscle growth in pigs: experiences with editing myostatin. CABI Agriculture and Bioscience, 3(1), 36.

3-Eilers, W., Cleasby, M., & Foster, K. (2021). Development of antisense-mediated myostatin knockdown for the treatment of insulin resistance. Scientific reports, 11(1), 1604.

آدرس: بیرجند- دانشگاه بیرجند- پردیس امیرآباد- دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی
تلفن ۰۵۶۳۱۰۲۷۶۳۹؛ دورنگار : ۰۵۶۳۲۲۰۴۰۵۰؛ وبسایت: www.conf.birjand.ac.ir/ncaras4 ایمیل: ncaras@birjand.ac.ir

4-Javadmanesh, A., Rashidlamir, A., Riasi, M., Khayami, H, Khayami, K. & Movahed Nasab, M. (2019). Effects of MSTN silencing on abdominal fat and leg muscle relative weights in male Wistar rats. Proceedings of the 5th international and 17th Iranian Genetic Congress, Tehran, Iran.

5-Kawai-Toyooka, H., Kuramoto, C., Orui, K., Motoyama, K., Kikuchi, K., Kanegae, T., & Wada, M. (2004). DNA interference: a simple and efficient gene-silencing system for high-throughput functional analysis in the fern Adiantum. Plant and Cell Physiology, 45(11), 1648-1657.

6-McPherron, A. C., & Lee, S. J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(23), 12457-12461.

7-Riasi, M., Karbaschian, E., & Javadmanesh, A. (2023). Gene silencing method based on DNA. Journal of Cell and Molecular Research, 15(1), 7-18.

8-Riasi, M., Mozaffari-Jovin, S., & Javadmanesh, A. (2023). The effect of modification of DNA interference on myostatin gene expression in mice. Journal of Genetics, 103(1), 2.

9-Roozbeh, B., Moazami, M., Rashidlamir, A., Moosavi, Z., & Javadmanesh, A. (2019). The Eff ect of resistance training and growth hormone injection on circulating IGF-1 and IGFBP-3 levels in a rat model. J Iranian Journal of Veterinary Science Technology, 11(1), 13-18.

10-Soleimani, S., Sekhavati, M. H., Javadmanesh, A. (2019). Sequencing and Bioinformatic Investigation of Introducing a Repressive Micro-RNA Target Sites in the 3'UTR of Myostatin Gene in some Indigenous Sheep Breeds of Iran. Iranian Journal of Animal Science Research, 11(1), 111-119.

آدرس: بیرجند- دانشگاه بیرجند- پردیس امیرآباد- دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی
تلفن ۰۵۶۳۱۰۲۷۶۳۹؛ دورنگار : ۰۵۶۳۲۲۰۴۰۵۰؛ وبسایت: www.conf.birjand.ac.ir/ncaras4 ایمیل: ncaras@birjand.ac.ir

Effect of injection type in inhibition of Myostatin transcription by DNAi in mouse and rat models

Ali Javadmanesh*, Mitra Riasi, Elnaz Karbaschian
Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
*Corresponding author's email: javadmanesh@um.ac.ir

Abstract

Introduction: Myostatin (MSTN), growth and differentiation factor 8 (GDF8), is a member of the large family of secretory growth factors TGF-β, and inhibition of this protein has a significant effect on muscle growth. DNAi is an advanced and novel technology for regulating gene expression. The aim of the present study was to inhibit MSTN gene expression in muscle tissue using intraperitoneal injection of DNAi, an inhibitor of MSTN gene expression, in rats and intramuscular injection of the same molecule in mice.

Materials and Methods: In this study, 12 mice were used in the first experiment and 12 male Wistar rats in the second experiment in a completely randomized design with 2 treatments and 6 replications. The groups included: the injection group at a dose of 10 $\mu g/kg$ body weight three times a week and the control group without injection. The experiment lasted for 5 weeks and the weight of the animals was measured every week. Then, the effect of DNAi molecules on the weight of the heart and leg muscle was examined. Histological slides were prepared from the gastrocnemius muscle for histological examination. Finally, the collected data were analyzed using the one-way analysis of variance and JMP PRO software version 17.0.

Results and discussion: The results showed that the weight of the calf muscle increased significantly, but DNAi injection had no significant effect on weekly weight gain or heart weight ($P>0.05$). Also, histological examination indicated the occurrence of hypertrophy in the leg muscle tissue in mice, which is evidence of a decrease in muscle density per unit area and an increase in muscle tissue mass, which was not seen in rats. Considering the effect of reducing MSTN gene expression on adipose tissue, the lack of a significant increase in body and heart weight may be due to the loss of interstitial fat in the muscles or heart. Comparing the results of intraperitoneal and intramuscular injection also indicated that the intramuscular injection method was more effective. This may be because the molecule was injected into the target tissue.

Conclusion: DNAi-based gene expression inhibition is a new method that has not yet been widely used. The results of current study showed that injection of DNAi molecules can inhibit MSTN gene transcription. The results of this study could be further investigated by measuring gene expression as well as blood parameters.

Keywords: DNAi, Myostatin, mouse, twin muscle, heart