Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

# Effect of heat stress on 7-day-old chick diencephalic BDNF gene expression and blood corticostrone level

**Yadollah Badakhshan**

*Corresponding author. Assistant Professor ,Department of Animal science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran. Email: Y.Badakhshan@ujiroft.ac.ir

Ph.D.graduated Student in Physiology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

**Ladan Emadi**

Associated Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail: emadil@uk.ac.ir

**Saeed Esmaeili Mahani**

Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Email: Semahani@uk.ac.ir

## *Abstract*

### Objective

Temperature is a critical variable in health and disease. Thermal stressors such as heat stress elicit neuroendocrine responses including activation of the HPA axis .Heat stress is a challenge for animal and human society. It has been shown that brain monoaminergic system is changed during acute and chronic heat stress condition. Commercial and domestic poultry are very susceptible animals to the heat stress. High environmental temperature led to heat stress condition and had negative effect on physiological performance. One effect of heat stress is changed molecular and cellular mechanisms. These changes in diencephalon, as an awaking center (thalamus) and autonomic mechanisms center (hypothalamus), have profound physiological performance results. However the goal of experiment was to investigate effect of heat stress on diencephalic BDNF gene expression and blood corticostrone level.

**Materials and Methods**

In this experiment, 20 seven-day-old male chicks divided in 1- heat stress group (10 chicks) and 2- control group (10 chicks in normal temperature condition). Heat stress induced by 39 C◦ and continued to 5 hours. Control group temperature was 30 C◦. At the end of 5 hours duration, chicks was anesthetized with Isofluran gas and killed. Blood gathered from jugular vein. Brain dissected and diencephalon was frozen in liquid nitrogen immediately. Blood corticosterone level was measured by ELIZA method, BDNF gene expression assayed by quantitative real time PCR technique with the SYBR green method.

**Results**

In this experiment, heat stress significantly reduced diencephalic BDNF gene expression. However, corticosterone level significantly elevated in heat stress exposed chicks. It would be able to say that there is a relation between BDNF gene expression and blood corticosterone concentration.

**Conclusions**

These results showed changes in BDNF gene expression during heat stress condition is associated to blood corticosterone level elevation. Taken together, the results showed that a significant relationship between Hypothalamus-Hypophysis- Adernal cortex activity during acute heat stress condition and diencephalic BDNF gene expression as a neuroprotective agent of brain.

**Keywords:** Broiler chick, Brain derived neurotrophic factor (BDNF), Corticosterone, Heat stress

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Badakhshan Y, Emadi L, Esmaeili Mahani S (2021) Effect of heat stress on 7-day-old chick diencephalic BDNF gene expression and blood corticostrone level. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (1), 183-196.

*Agricultural Biotechnology Journal* 13 (1), 183-196. DOI: 10.22103/jab.2021.17246.1299

Received: March 15, 2021. Accepted: April 3, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

# تاثیر استرس گرمایی بر سطح کورتیکواسترون خون و بیان ژن فاکتور رشد عصبی مشتق از مغز ناحیه دیانسفال جوجه ۷ روزه نژاد گوشتی

**یدالله بدخشان**

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران. رایانامه: Y.Badakhshan@ujiroft.ac.ir- دانش آموخته دکتری تخصصی گرایش فیزیولوژی گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

**لادن عمادی**

دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: emadil@uk.ac.ir

**سعید اسماعیلی ماهانی**

استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: Semahani@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۱۴

## چکیده

**هدف:** استرس گرمایی یکی از چالش‌های جدی در جوامع بشری و حیوانات می‌باشد. استرس‌ها با تغییر مکانیسم‌های بدن سبب و زمینه ساز ایجاد بیماری‌ها می‌با شند. درجه حرارت بالای محیط، سبب ایجاد ا سترس حرارتی می شود که اثرات منفی بر عملکرد فیزیولوژیک دارد. یکی از آثار نهان ا سترس، تغییر در مکانیسم‌های سلولی و ملکولی می‌با شد. این تغییرات در دیان سفال به دلیل اهمیت این ناحیه در کنترل اطلاعات حسی ورودی به مغز (تالاموس) و مکانیسم‌های خودکار بدن (هیپوتالاموس) نتایج عمیقی در عملکرد حیوان دارد. از این رو هدف آزمایش بررسی تاثیر استرس گرمایی حاد بر بیان ژن BDNF[1] و سطح کورتیکواسترون خون بود.

[1] Brain derived neurotrophic factor

**مواد و روش‌ها:** در این آزمایش تعداد ۲۰ جوجه ۷ روزه سن نر نژاد راس ۳۰۸ به دو دسته تحت استرس گرمایی ۳۹ درجه و دمای نرمال ۳۰ درجه تقسیم و به مدت ۵ ساعت تحت استرس گرمایی قرار گرفتند. در پایان جوجه ها با گاز ایزوفلوران بیهوش، خونگیری از سیاهرگ وداج انجام و کشتار شده و ناحیه دیانسفال آن ها برداشته شد و برای آنالیز بیشتر در یخچال منفی ۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. میزان بیان ژن BDNF به روش ریل تایم کمّی و سایبر گرین اندازه گیری شد. سطح کورتیکواسترون خون با روش الایزا مورد سنجش قرار گرفت.

**نتایج:** در این آزمایش استرس گرمایی به طور معنی‌داری بیان ژن BDNF ناحیه دیانسفال را کاهش داد. اما سطح کورتیکواسترون خون جوجه های تحت استرس گرمایی به طور معنی‌داری افزایش نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** این نتایج نشان می‌دهد که بین سطح کورتیکواسترون خون و بیان ژن BDNF رابطه معکوس وجود دارد. با توجه به این می‌توان رابطه مهمی میان استرس گرمایی و فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-قشر آدرنال مشاهده کرد که با تاثیر بر بیان ژن فاکتور عصبی مشتق از مغز سبب اختلال در نقش حفاظت نورونی این پروتئین در مغز می‌گردد.

**کلیدواژه‌ها:** جوجه گوشتی- فاکتور رشد عصبی مشتق از مغز- کورتیکواسترون- استرس گرمایی

**نوع مقاله:** پژوهشی.

استناد: بدخشان یدالله، عمادی لادن، اسماعیلی ماهانی سعید (۱۴۰۰) تاثیر استرس گرمایی بر سطح کورتیکواسترون خون و بیان ژن فاکتور رشد عصبی مشتق از مغز ناحیه دیانسفال جوجه ۷ روزه نژاد گوشتی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۱)، ۱۸۳-۱۹۶.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

## مقدمه

پرورش ماکیان در ایران و انتشار آن از طریق این کشور تاریخچه‌ای بسیار کهن دارد. ایران (پرشیا) یک امپراطوری بزرگ از قرن ۵ قبل از میلاد تا تقریبا قرن ۷ میلادی بود و از هند (دهلی) تا دریاهای سیاه و مدیترانه گسترده بود (Moazeni et al. 2016a; Mohammadifar and Mohammadabadi 2017). در آن زمان و بعد از آن، در قرون وسطی ایران در محل تقاطع راه‌ها برای حمل و نقل محصولات، از قبیل ماکیان از شرق به غرب، هم از طریق خشکی و هم از طریق دریا قرار داشت. جنگ های زیادی در حوالی ایران و کشورهای همسایه در طی این دوره‌ها نیز توسعه و گسترش جمعیت‌های ماکیان را تسهیل کرد. حفاری‌های باستان شناسی حضور ماکیان را در ایران در زمان‌های باستان تأیید کرده است (Mohammadabadi et al., 2010;

Moazeni et al. 2016b). بر اساس تحقیقات West and Zhou استخوان‌های یافت شده در ایران در سه منطقه وجود داشته‌اند: دو کشف در تپه یحیی (Tepe Yahya) (جنوب شرقی ایران) به ترتیب متعلق به ۳۸۰۰ تا ۳۹۰۰ قبل از میلاد و ۱۰۰۰ قبل از میلاد و دیگری در تخت سلیمان (شمال غربی ایران) متعلق به ۱۰۰۰ قبل از میلاد ( Mohammadifar et al. 2014; Mohammadifar and Mohammadabadi 2018). از طرفی پروتئین BDNF یک پروتئین دیمریک پایه است و از نظر ساختاری مرتبط با فاکتور رشد عصبی (NGF) است. این پروتئین عضو مهمی از خانواده نوروتروفین‌ها است و اثرات زیادی بر روی سیستم عصبی دارد مانند، رشد عصبی، تمایز و ترمیم. TrkB، گیرنده اصلی انتقال سیگنال BDNF است ( Castrén and Rantamäki 2010).

بیماران افسرده دارای تغییرات پاتولوژیک در نواحی خاص مغز، از جمله لیمبیک (هیپوکمپ و آمیگدال) و مناطق قشری مغز هستند. BDNF عامل نوروپاتی مرکزی نورون‌ها و نوروگلیوسیت‌ها است و نقش مهمی در پیری هیپوکمپ دارد. شواهد در حال افزایش نشان می‌دهد که BDNF می‌تواند نقش مهمی در اختلالات روانی مانند اختلال افسردگی اصلی داشته باشد. در واقع، بیان BDNF در پیری طبیعی هیپوکمپ و در هیپوکمپ بیمار مبتلا به آلزایمرکاهش یافته است، در حالی که بیان آن به طور معنی داری در هنگام وقایع وابسته به یادگیری افزایش می‌یابد (Jiang et al. 2019).

مطالعات حیوانی در زمینه افسردگی و استرس سطوح پایین تر mRNA BDNF را نشان می‌دهند. به طور مشابه سطوح پایین BDNF نیز در بیماران مبتلا به اختلال افسردگی اصلی که از داروهای ضد افسردگی استفاده نمی‌کردند نشان داده شده است. علاوه بر این، سطوح BDNF با درمان مزمن با داورهای ضد افسردگی افزایش می‌یابد. همچنین در یک مطالعه پس از مرگ، Chen et al.مشاهده کردند که واکنش پذیری ایمنی BDNF در هیپوکمپ افرادی که تحت داروهای ضد افسردگی بوده اند افزایش می‌یابد. به علاوه، یک رابطه منفی بین شدت افسردگی و سطح BDNF سرم مشاهده شده است. مطالعات حیوانی in vivo و in vitro نشان داده است که سطح BDNF در ساختارهای لیمبیک و سرم در پاسخ به مصرف مزمن داروهای ضد افسردگی افزایش می‌یابد (Chen et al. 2017). همچنین Siuciak کشف کردند که تزریق BDNF به مغز میانی باعث اثرات ضد افسردگی می‌شود. داده های مربوط به سطوح BDNF در بیماران افسرده و پاسخ آن ها به درمان ضد افسردگی هنوز محدود است (Siuciak et al. 1997). تاکنون مطالعاتی درباره بیان BDNF در هیپوکمپ جوجه مرغ تحت تاثیر آلودگی صوتی از قبل تا بعد از تفریخ انجام شده است. این افزایش از روز ۱۲ جنینی تا روز اول پس از تفریخ در mRNA گزارش شده است. این نشان می‌دهد که افزایش BDNF تحت تاثیر مواجه با عوامل مخرب بافت های عصبی رخ داده و سبب بهبود انعطاف پذیری و تقویت سیناپسی در مغز می‌شود (Chaudhury and Wadhwa 2009) .

در یک مطالعه عنصر بور در آب آشامیدنی جوجه شترمرغ های چند روزه در دوز پایین تر از ۱۶۰ میلیگرم در لیتر سبب افزایش BDNF و تکامل بهتر مغز شده است. اما دوزهای بالاتر، علاوه بر کاهش بیان BDNF در مغز سبب افزایش آپوپتوزیز شدند. این نشان می‌دهد که BDNF در جلوگیری از آپوپتوزیز نقش داشته و همچنین عنصر ضروری بور بواسطه BDNF بر مغز

تاثیر می گذارد (Tang et al. 2016) . در مقایسه بین سویه سنگین وزن (متوسط وزن ۵۶ روزگی ۲ کیلوگرم) و سبک وزن (متوسط وزن ۱۲۰۰ گرم در ۵۶ روزگی)از نژاد پلیموت راک سفید که پس از ۴۹ نسل انتخاب بدست آمده بودند. بیان ژن BDNF را بطور معنی داری بین دو جنس و دو سویه متفاوت نشان می‌دهد. بیان این ژن در سویه سبک وزن بیشتر بوده است (Ka et al. 2009) . استرس گرمایی در صنعت مرغداری سبب افت تولید و افزایش تلفات و درنتیجه ضرر و زیان می‌شود. از طرفی برای مقابله با استرس گرمایی پرنده به فرایند له له زدن و کاهش مصرف غذا روی می‌آورد. تغییرات متابولیکی و هورمونی و مورفولوژیکی–حرکتی روده در پرنده به هنگام مواجه با استرس گرمایی رخ می‌دهد که همگی اساس بی‌اشتهایی می‌باشند. علاوه براین طیور به دلیل نداشتن غدد عرق، زودتر در استرس گرمایی به مرز بحران تعدیل دمای بدن رسیده و به همین منظور همه فعالیت‌های متابولیکی را تاحد ممکن پایین می‌آورند. یکی از این تغییرات شامل افزایش ترشح CRH و متقابلاً افزایش کورتیکواسترون خون می‌باشد که زمینه ساز تغییرات مکانیسم‌های ملکولی در طول استرس است. به‌علاوه، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی[۲] یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می باشد که هیچ گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Tohidi nezhad et al. 2015). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند ( Mohammadabadi 2020). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری E.coli کشف شد (Ahsani et al. 2019a). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Ahsani et al. 2019b). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi 2021). یکی از اقدامات اساسی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari Darehdor et al. 2016). از این رو هدف تحقیق حاضر بررسی تاثیر استرس گرمایی حاد بر کورتیکواسترون خون و بیان ژن BDNF در ناحیه دیانسفال جوجه گوشتی ۷ روز سن بود.

[2] **DNA**

## مواد و روش‌ها

تعداد ۲۰ قطعه جوجه گوشتی نر از کارخانه جوجه‌کشی مرغ ماهان خریداری و به آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان منتقل شد. در تمام طول دوره آزمایش جوجه‌ها دسترسی آزاد به آب و جیره تجاری ۳۰۵۰ کیلوکالری انرژی و ۲۳٪ پروتئین داشتند. جوجه ها در اتاقک ساخته شده از پلکسی گلاس طول*عرض* ارتفاع ۲۲۰*۵۰*۸۰ سانتیمتر دارای کنترل دما و رطوبت قرار داشتند. در ۷ روزگی سن جوجه‌ها به اتاقکی با دمای ۳۹ درجه و ۵۰٪ رطوبت منتقل شدند و به مدت ۵ ساعت تحت استرس گرمایی قرار گرفتند. جوجه‌ها در ظرف ده دقیقه شروع به بروز علائم استرس گرمایی مانند له له زدن، افتادگی بال‌ها و گردن شدند. در پایان ۵ ساعت جوجه ها با گاز ایزوفلوران بیهوش و سیاهرگ وداج آنها برای جمع‌آوری خون توسط اسکالپل برش داده شد. پس از خونگیری بلافاصله سر قطع شده و مغز بروی ظرف محتوی یخ قرار داده شد. با برش دادن مرز مخچه از عقب و تلنسفال از جلو و قطعه تکتوم بینایی از جوانب، ناحیه باقیمانده شامل دیانسفال بود که در ازت مایع قرار داده شد. نمونه‌های خون در سانتریفیوژ ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. سپس با سرنگ سرم جمع شده در روی میکروتیوپ‌ها جمع آوری و به میکروتیوپ دیگری منتقل و به آزمایشگاه جهت اندازه گیری سطح کورتیکواسترون منتقل گردید.

**هموژیناسیون بافت دیانسفال، استخراج mRNA و سنتز DNAهای مکمل:** تعداد ۵ نمونه دیانسفال از هر کدام از گروه‌های آزمایشی برداشت و جهت استخراج mRNA مورد استفاده قرار گرفت. هموژیناسیون بافت مغز به وسیله سرنگ انسولین و و با استفاده از RNXTM-PLUS کلیه مراحل استخراج توسط پروتکل دستی سینا کلون انجام‌گرفت و نمونه‌های به‌دست‌آمده در ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از استخراج RNA، مقدار و کیفیت نمونه‌ی حاصل با استفاده از نانو دراپ بررسی می‌گردید. جذب نوری در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده می‌شود. DNA و RNA در طول‌موج ۲۶۰nm و پروتئین در طول‌موج ۲۸۰ و پپتیدها و دترجنت‌ها، کربوهیدراتها، کلروفرم، فنل و .... در طول‌موج ۲۳۰ جذب دارند. بنابراین از نسبت جذب نمونه در ۲۶۰nm تقسیم‌بر جذب در ۲۸۰nm می‌توان به وجود ناخالصی‌های پروتئینی پی برد. این نسبت بایستی ۱/۸ یا بالاتر از آن باشد. از نسبت ۲۶۰ به ۲۳۰ نیز برای بررسی وجود پپتیدها و دترجنت‌ها و... استفاده می‌شود. نسبت مطلوب ۲/۲ یا بیشتر از آن می‌باشد. نمونه‌های حاصل کیفیت ۱/۹ به بالا را داشتند که مورد قبول بود. DNAهای مکمل[3] با استفاده از کیت نسخه بردار معکوس ترموفیشر انجام شد. به طور مختصر، ۱ میکرلیتر mRNA به همراه ۱ میکرولیتر اولیگو نوکلئوتید یکتا تجهیز آزما و ۱۱ میکرولیتر آب دیونیزه در دمای ۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، سپس ۵ دقیقه روی یخ و در مرحله دوم ۴ میکرولیتر بافر آنزیم ریورسترانسکیپتاز، ۲ میکرو dNTP و ۱میکرو آنزیم نسخه بردار معکوس[4] مخلوط و به ترموسایکلر با تنظیمات ۴۳ درجه به مدت ۶۰ دقیقه و سپس ۷۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه برای هر چرخه و ۴۵ چرخه تنظیم گردید. پس از آن میکروتیوپ ها به یخچال منفی ۲۰ منتقل گردید.

[3] Complementary DNA cDNA
[4] Reverse transcriptase enzyme



Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

**روش quntative real time PCR:** در این مرحله از مستر میکس سایبر گرین 2X بدون ROX شرکت AMPLIQON استفاده شد. مختصراً در میکرو تیوپ ۱۰۰ میکرولیتر مخصوص ترموسایکلر ریل تایم ابتدائاً ۱۰ میکرولیتر سایبر گرین، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت و برگشت (جدول ۱) و ۷ میکرو لیتر آب DEPC مخلوط گردیده و در دستگاه LightCycler® 96 قرار داده شد. دستگاه در ۴۰ چرخه با مشخصات دمای ۹۵°C به مدت ۵ min دمای۹۴°C به مدت ۱ min دمای۶۲°C به مدت ۱min دمای ۷۲°C به مدت ۱min تنظیم و اجرا گردید. مقادیر CT هم در نمونه‌ی مورد آزمایش و هم در بافت نرمال نسبت به ژن استاندارد (رفرنس) با استفاده از مدل (Khan-Malek and Wang 2017). نرمال و کمی‌سازی گردید.

$$R = \frac{\Delta \text{ct target}(\text{control} - \text{sampel})}{\frac{(\text{E target})}{\Delta \text{ct standard}(\text{control} - \text{sampel})}}{(\text{E standard})}$$

E راندمان تکثیر را نشان می‌دهد.

**روش آماری:** برای آنالیز آماری داده ها از نرم افزار آماری SAS استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون t و سطح معنی‌دار (P<۰/۰۱) استفاده گردید (SAS/STAT user's guide).

استرس گرمایی به طورمعنی‌داری بیان ژن BDNF، را کاهش داد (شکل ۱)(P<۰/۰۱). استرس گرمایی نتایج تصحیح چند برابری بیان ژن BDNF نسبت به گروه شاهد را به سطح ۰/۲ کاهش داد. این نشان می‌دهد که استرس گرمایی با این تغییر در BDNF در مغز زمینه ساز اختلال در عملکرد مغز می‌گردد. سازمان دهی پاسخ به گرما و ایجاد پاسخ‌های ظاهری مانند تعریق، ضربان قلب و افزایش نرخ تنفس به استرس گرمایی در هیپوتالاموس قدامی صورت می‌پذیرد. تخریب این ناحیه سبب از دست رفتن تمام مکانیسم‌های ذکر شده در تنظیم گرما می‌گردد. فعال شدن نورون های حساس به گرما در این ناحیه همراه با افزایش بیان BDNF در این نورون ها ثابت شده است (Tan et al. 2016).

## نتایج و بحث

استرس یکی از عوامل به هم زننده هموستازی بدن محسوب می‌شود و تاثیر BDNF در جلوگیری از این آثار می‌باشد. بطوریکه BDNF عامل سلامت مغز معرفی می‌شود و نورون ها را در برابر عوامل بیماری محافظت می‌کند. BDNF حساسیت به انسولین را افزایش داده و تون پاراسمپاتیک را افزایش می‌دهد (Marosi and Mattson 2014). بررسی مغز موش در سه دمای ۳۳، ۳۷ و ۳۹ درجه محیط کاهش BDNF مغز در دمای محیطی بالا و افزایش کاسپاز ۳ در مغز را نشان می‌دهد. همچنین در شرایط استرسی مانند آنوکسی مقدار BDNF مغز موش ها افزایش یافته است و این افزایش در دمای ۳۳ و ۳۷ بطورمعنی داری بالاتر از دمای ۳۹ درجه بوده است (Kletkiewicz and Rogalska 2019). در تحقیقات BDNF را به عنوان یکی از عوامل

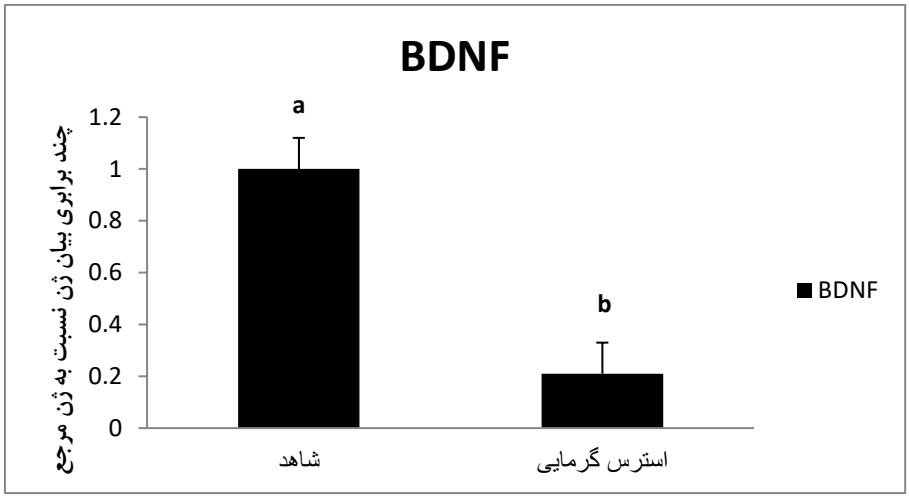
مهم در رشد و نمو مغز معرفی کرده اند. در همین رابطه عواملی که سبب افزایش بیان BDNF در مغز شوند را به عامل مثبت معرفی می‌کنند. به همین دلیل در جوجه شترمرغ های یک روزه عنصر بور به میزان ۱۶۰ میلیگرم در لیتر سبب افزایش بیان BDNF و کاهش کاسپاز ۳ در مغز شده است. اما دوزهای بالاتر مانند ۳۲۰ و ۶۴۰ میلیگرم نتایج معکوسی داشته‌اند. به همین منظور دوز ۱۶۰ میلیگرم عامل مثبتی برای افزایش BDNF مغز می‌باشد (Tang et al. 2016).

**جدول ۱. توالی پرایمرها**

**Table 1. Primer sequences**

| Primer name | length | sequence | NCBI code |
|---|---|---|---|
| **BDNF** | **109** | **F:**GAAGGCTGCAGGGGCATAGA<br>**R:**ACCGCCAGCCAACTCTCTTT | NM_001031616.1 |
| **GAPDH** | **162** | **F:**TGACCACTGTCCATGCCATC<br>**R:**TAAGCTTCCCATTCAGCTCAGG | NM_204305.1 |

سازمان دهی پاسخ به گرما و ایجاد پاسخ های ظاهری مانند تعریق، ضربان قلب و افزایش میزان تنفس به استرس گرمایی در هیپوتالاموس قدامی صورت می‌پذیرد. تخریب این ناحیه سبب از دست رفتن تمام مکانیسم‌های ذکر شده در تنظیم گرما می گردد. فعال شدن نورون های حساس به گرما در این ناحیه همراه با افزایش بیان BDNF در این نورون‌ها ثابت شده است ( Tan et al. 2016). استرس گرمایی در طیور یکی از عوامل برهم زننده هموستازی BDNF گزارش شده است. در ۳۵ هفتگی به مدت یک هفته جوجه ها در معرض ۳۶ درجه قرار داده شدند. همزمان در آب آشامیدنی غلظت‌های مختلف از ۲۵۰، ۷۵۰ و ۱۰۰ میلیلیتر در ۱۰۰۰ لیتر آب آشامیدنی از اسانس روغن‌های ضروری استفاده شده بود. بطور کلی استرس گرمایی و دوزهای بالای اسانس سطح پلاسمایی BDNF را کاهش داده بودند اما سطح پایین اسانس سبب افزایش BDNF پلاسما شده بود ( Bayraktar et al. 2020). در این آزمایش استرس گرمایی سبب افزایش معنی‌دار سطح کورتیکواسترون خون نسبت به گروه شاهد شد. (شکل ۲)($P<۰/۰۱$). گزارشات متفاوتی درباره فعال شدن محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–آدرنال در طول استرس گرمایی وجود دارد. برای مثال هیپرترمی ایجاد شده به واسطه قرار گیری جوجه های ۱۴ روزه در معرض ۱ یا ۴۸ ساعت استرس گرمایی ۳۵ درجه سانتی گراد سبب تغییر دز سطح کورتیکواسترون خون آنها در مقایسه با گروه شاهد نشده است (Chowdhury et al. 2012). مشابهاً استرس گرمایی چرخه ای در یک هفته پایانی دوره پرورش تاثیری بر سطح کورتیکواسترون خون نداشته است (Sun et al. 2015). برعکس آن در جوجه های ۱۴ روزه که در معرض ۲ یا ۵ ساعت استرس گرمایی قرار گرفتند، تنها در ۵ ساعت استرس گرمایی افزایش معنی‌دار سطح کورتیکواسترون نشان داده شد (Ito et al. 2015).

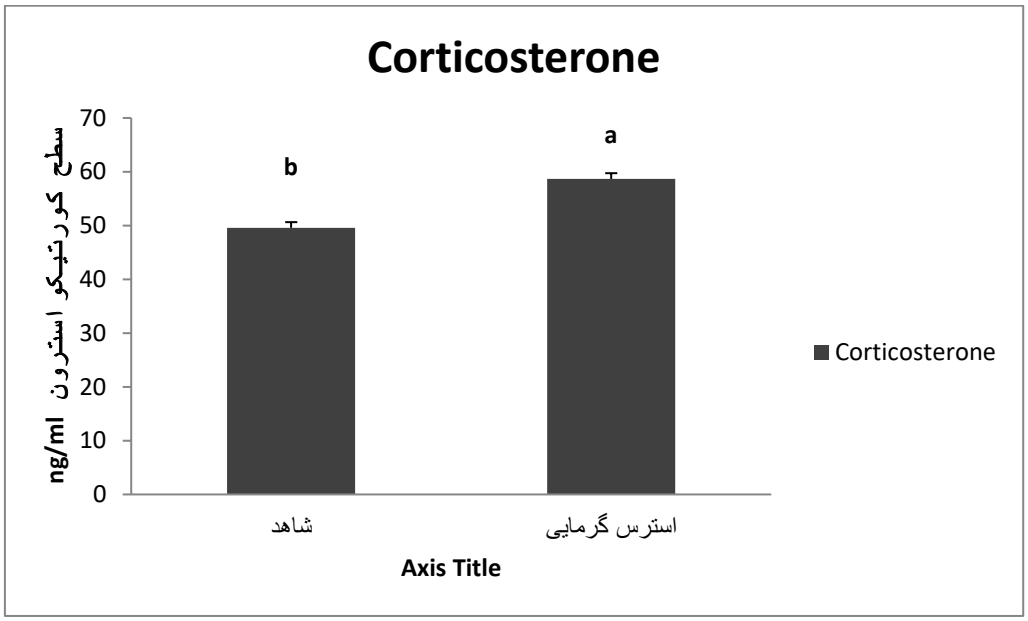



**شکل ۱. بیان ژن BDNF دیانسفال تحت تاثیر استرس گرمایی حاد در جوجه گوشتی ۷ روز سن. حروف متفاوت در ستون‌ها دارای اختلاف آماری در سطح معنی‌دار (P<۰/۰۱) است.**

**Figure 1. Effect of heat stress on diencephalic BDNF mRNA gene expression of 7-day-old chick. Columns with different letters are significantly different P< 0.01.**

براساس تفاوت ها در سطح کورتیکواسترون در طول استرس گرمایی مقالات مختلف، شاید بتوان گفت که تغییرات کورتیکواسترون خون در محدوده‌های زمانی کوتاهی رخ می‌دهد و از آنجا که ترشح آن ریتم اپیزودیک دارد احتمالاً تصحیح غلظت آن در خون فوراً یا طولانی مدت بسته به شرایط سنی، طول دوره استرس گرمایی، نژاد و جنس و شرایط آزمایشگاهی انجام می‌پذیرد. علاوه براین ترشح گلوکوکورتیکوئیدها با ریتم شبانه روزی رخ می‌دهد که بسته به شرایط فردی نیز متفاوت است. بااین حال نتایج تحقیق ما، افزایش معنی‌دار کورتیکواسترون خون در مواجه با استرس گرمایی حاد را نشان داد. کورتیکواسترون یکی از عوامل ایجاد کننده رفتارهای استرسی می‌باشد که منجر به افسردگی در موجود زنده می‌گردد. در مدل ایجاد افسردگی در موش به واسطه تزریق مکرر کورتیکواسترون، کاهش بیان BDNF در قشر لوب پیشانی آنها رخ داده است که به واسطه تجویز داروهای ضد افسردگی سطح BDNF در لوب پیشانی موش ها افزایش و مشکل آنها برطرف گردیده است (Filho et al. 2014). در حالت استیصال آموخته شده نیز تزریق BDNF سبب افزایش رفتارهای و انگیزه برای تلاش بیشتر و کاهش تعداد شکست در موش‌ها می‌شود (Shirayama et al. 2002, Sirianni et al. 2010). در مهره داران پست تر مانند ماهی، استرس حاد سبب افزایش بیان proBDNF در مغز و کاهش BDNF بالغ در آنها شده است. این نشانگر اثر مخرب استرس در فرایند و پردازش شدن پیش پروتئین BDNF به پروئین بالغ و فعال می‌باشد (Tognoli et al. 2010). در یک تحقیق بروی موش صحرایی نر استرس حاصل از نگه داشتن حیوان به مدت ۱، ۳ و ۵ ساعت و یا دو ساعت در روزانه تا یک هفته، سبب افزایش معنی‌دار کورتیکواسترون در ۵

ساعت و استرس هفتگی و کاهش بیان ژن BDNF در هیپوکمپ آن‌ها شده است. اگرچه در سه ساعت و یک ساعت بیان آن افزایش داشته است . همچنین با کاهش بیان حافظه موش‌ها نیز مختل گردیده است (Nooshinfar et al. 2011).




**شکل ۲.سطح کورتیکواسترون خون تحت تاثیر استرس گرمایی حاد در جوجه گوشتی ۷ روز سن. حروف متفاوت در ستون‌ها دارای اختلاف آماری در سطح معنی‌دار (P<۰/۰۱) است.**

**Figure 1. Effect of heat stress on blood corticosterone level of 7-day-old chick. Columns with different letters are significantly different P< 0.01.**

**نتیجه‌گیری:** بر اساس، نتایج حاصله می‌توان نتیجه گیری کرد که استرس گرمایی حاد در جوجه ۷ روزه قادر به ایجاد اختلال در سیستم هیپوتالاموس–هیپوفیز– غده آدرنال، به وا سطه کاهش بیان BDNF می‌با شد. با این و صف احتمالاً رابطه دو طرفه ای بین سطح کورتیکوا سترون خون و بیان ژن BDNF شکل می‌گیرد که منجر به کاهش توانایی یا توقف مکانیسم‌های جبرانی در طول استرس گرمایی در جوجه می‌گردد. از این رو پیشنهاد می‌گردد تا بیان ژن‌های مربوط به محور هیپوتالاموس– هیپوفیز– غده آدرنال و روش تزریق مرکزی BDNF در جوجه تحت استرس گرمایی حاد و مزمن مورد بررسی قرار گیرد.

**سپا سگزاری:** از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان به خاطر حمایت مالی در اجرای پژوهش حا ضر سپاسگزاری می‌شود.

## منابع

احسنی محمدرضا ، محمدآبادی محمدرضا ، اسدی فوزی و همکاران (۱۳۹۸) بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلشتاین با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۱)، ۱۵۰-۱۳۵.

توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶(۴)، ۵۰-۳۵.

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن ESR1 در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۱)، ۱۹۲-۱۷۷.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۸۱-۱۶۷.

محمدی فر آمنه، فقیه ایمانی سید علی، محمدآبادی محمد رضا، سفلایی محمد (۱۳۹۲) تأثیر ژن ۳TGFβ بر ارزش های فنوتیپی و ارثی صفات وزن بدن در مرغ بومی استان فارس. مجله بیو تکنولوژی کشاورزی ۵(۴)، ۱۳۶-۱۲۵.

## References

Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019a) Effect of Roasted Soybean and Canola Seeds on Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma (PPARG) Gene Expression and Cattle Milk Characteristics. Iran J Appl Anim Sci 9, 635-642.

Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019b) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 11, 135-150 (In Persian).

Bayraktar B,Tekce E,Aksakal V, et al. (2020). Effect of the addition of essential fatty acid mixture to the drinking water of the heat stress broilers on adipokine (Apelin, BDNF) response, histopathologic findings in liver and intestines, and some blood parameters. Ital J Anim Sci 19(1), 656-666.

Castrén E , Rantamäki T (2010). The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: reactivation of developmental plasticity. Dev Neurobiol 70(5), 289-297.

Chaudhury S , Wadhwa S (2009). Prenatal auditory stimulation alters the levels of CREB mRNA, p-CREB and BDNF expression in chick hippocampus. Int J Dev Neurosci 27(6), 583-590.

Chen Y,Xu H,Zhu M, et al. (2017). Stress inhibits tryptophan hydroxylase expression in a rat model of depression. Oncotarget 8(38), 632-647.

Chowdhury VS,Tomonaga S,Nishimura S, et al. (2012). Hypothalamic gonadotropin-inhibitory hormone precursor mRNA is increased during depressed food intake in heat-exposed chicks. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 162(3), 227-233.

Filho MR,De Sousa C,Meneses L, et al. (2014). Antidepressant effect of alpha-lipoic acid: Brain-derived Neurotrophic Factor such as a new target for resistant depression. Eur Neuropsychopharmacol 24(2), S251.

Jafari Darehdor A,Mohammadabadi M,Esmailizadeh A, et al. (2016). Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. J Rumin Res 4, 119-132. (In Persian).

Ito K, Bahry MA, Hui Y, et al. (2015). Acute heat stress up-regulates neuropeptide Y precursor mRNA expression and alters brain and plasma concentrations of free amino acids in chicks. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 187, 13-19.

Jiang C,Lin W-J , Salton SR (2019). Role of a VGF/BDNF/TrkB autoregulatory feedback loop in rapid-acting antidepressant efficacy. J Mol Neurosci 68(3), 504-509.

Ka S,Lindberg J,Strömstedt L, et al. (2009). Extremely different behaviours in high and low body weight lines of chicken are associated with differential expression of genes involved in neuronal plasticity. Journal of neuroendocrinology 21(3), 208-216.

Khan-Malek R, Wang Y (2017). Statistical analysis of quantitative RT-PCR results. Drug Safety Evaluation, Springer**,** 281-296.

Kletkiewicz H, Rogalska J (2019). Decreased body temperature during anoxia affects the endogenous BDNF level in tertiary phase of injury. Neurosci Lett 711, 134–143.

Marosi K, Mattson MP (2014). BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. Trends Endocrinol Metab 25(2), 89-98.

Mohammadabadi M (2020). Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 12(1), 177-192. (In Persian).

Mohammadabadi M (2021). Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. Agric Biotechnol J 12(4), 167-181. (In Persian).

Mohammadi Far A, Faqih Imani SA, Mohammad Abadi MR, et al. (2014). The effect of TGF 3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. Agric Biotechnol J 5(4), 125-136. (In Persian).

Nooshinfar E,Akbarzadeh-Baghban A , Meisami E (2011). Effects of increasing durations of immobilization stress on plasma corticosterone level, learning and memory and hippocampal BDNF gene expression in rats. Neurosci Lett 500(1), 63-66.

SAS Institute S (1990). SAS/STAT user's guide: version 6, SAS institute Incorporated.30-45.

Shirayama Y,Chen AC-H, Nakagawa S, et al. (2002). Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. J Neurosci 22(8), 3251-3261.

Sirianni RW, Olausson P, Chiu AS, et al. (2010). The behavioral and biochemical effects of BDNF containing polymers implanted in the hippocampus of rats. Brain Re 1321, 40-50.

Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, et al. (1997). Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Pharmacol Biochem Behav 56(1), 131-137.

Sun X, Zhang H, Sheikhahmadi A, et al. (2015). Effects of heat stress on the gene expression of nutrient transporters in the jejunum of broiler chickens (*Gallus gallus* domesticus.Int. J Biometeorol 59(2), 127-135.

Tan CL, Cooke EK, Leib DE, et al. (2016). Warm-sensitive neurons that control body temperature. Cell 167(1), 47-59. e15.

Tang J, Zheng X-t, Xiao K, et al. (2016). Effect of boric acid supplementation on the expression of BDNF in African ostrich chick brain. Biol Trace Elem Res 170(1), 208-215.

Tognoli C, Rossi F, Di Cola F, et al. (2010). Acute stress alters transcript expression pattern and reduces processing of proBDNF to mature BDNF in Dicentrarchus labrax. BMC Neurosci 11(1), 4.

Tohidi Nezhad F, Mohammad Abadi MR, Esmaeili Zadeh A, et al. (2015). Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. Agric Biotechnol J 6(4), 37-50. (In Persian).