DOR: 20.1001.1.23832614.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی

اثر تزریق صفاقی اسید آمینه تریپتوفان بر بیان ژن CRF و NPY دیانسفالیک در جوجه گوشتی تحت استرس گرمایی حاد

لادن عمادی[1*]، بلال صادقی[2]، نصرت صالحی نژاد[1] و کیوان نژاد بخش[1]

[1] ایران، کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه، بخش فیزیولوژی

[2] ایران، کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی و بهداشت عمومی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۲

چکیده

درجه حرارت بالای محیط و استرس حرارتی اثر منفی بر عملکرد فیزیولوژیک دارد. تریپتوفان، پیش ساز مسیرهای سروتونرژیک و کینورنین، دارای اثر آرام بخشی در زمان استرس میباشد. مطالعه حاضر جهت بررسی تجویز درون صفاقی ال-تریپتوفان (۵۰ میلیگرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن)در طی درجه حرارت بالا (۳۹ درجه سانتیگراد) یا نرمال(۳۱ درجه سانتیگراد) به مدت ۵ ساعت، بر میزان اخذ غذای تجمعی در ساعات ۱، ۲، ۳ و ۴ و بیان ژن NPY و CRF به روش Real time qPCR در ساعت ۵ پس از تجویز تریپتوفان می باشد. استرس گرمایی، سبب افزایش معنادار بیان ژن NPY در دیانسفال در گروههای استرس حرارتی در مقایسه با گروههای درجه حرارت نرمال شد. میزان اخذ غذای تجمعی با تزریق تریپتوفان در استرس حرارتی افزایش یافت. نتایج نشان می دهد که NPY برای جبران اخذ غذای کاهش یافته به عنوان فاکتور ضد استرس،افزایش می یابد و احتمالا تریپتوفان در بهبود این اثر نقش دارد. افزایش معنادار بیان ژن CRH در دیانسفال مشاهده شد که تجویز تریپتوفان بطور معنادار بیان ژن مذکور را کاهش داد. تریپتوفان در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال، با تغییر در بیان ژن CRF مداخله کرده و نقش بافرکنندگی در استرس ها دارد.

واژه های کلیدی: استرس گرمایی،ال تریپتوفان،جوجه گوشتی،NPY و CRF دینسفالیک

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۳۱۳۲۲۹۴۲ ، پست الکترونیکی: emadil@uk.ac.ir

مقدمه

استرس بصورت پاسخ بیولوژیک یک حیوان، به هنگام مواجه با تهدید و به هم خوردن هموستاز، تعریف می شود. هنگامیکه استرس رفاه حیوان را تهدید می کند به آن تنش (distress) گفته می شود (۱۹). در زمان استرس سیستم عصبی خودمختار، سیستم های بیولوژیک متعددی شامل سیستم قلبی-عروقی، سیستم گوارشی ، غدد برون ریز و مدولای غده آدرنال را تحت تاثیر قرار می دهد که نتیجه آن تغییر در ضربان قلب، فشار خون، فعالیت گوارشی و دیگر فعالیت ها می باشد. استرس حرارتی بصورت افزایش یا کاهش دمای محیط بر مکانیسم های فیزیولوژیک بدن تاثیر گذار می باشد. کاهش دمای محیط به کمتر از حداقل مقدار ناحیه تعادل گرمایی (محدوده‌ای از دمای محیط که در آن، میزان انرژی گرمایی تولید شده در بدن با میزان گرمای خارج شده از بدنبرابر است و دمای طبیعی بدن پرنده ثابت می ماند)، سبب واکنش رفتاری و فیزیولوژیک پرنده مانند پف کردن پرها، کاهش جریان خون مویرگ‌های سطحی، لرزش بدن، جمع شدن بال‌ها، کز کردن پرنده و جمع شدن آنها به دور هم می‌شود.هنگامی که دمای محیط از مقدار بیشینه محدوده حداقل تلاش تنظیم حرارتی (حداقل تلاش برای تنظیم

DOR: 20.1001.1.23832614.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی

دمای بدن) فراتر رود، پرنده سعی می‌کند با واکنش‌های رفتاری و فیزیولوژیک میزان تولید حرارت را در بدن کم کند و میزان دفع حرارت را از بدن افزایش دهد. کاهش مصرف خوراک و کاهش حرکت، افزایش خون مویرگ‌های سطحی بدن، باز نگه داشتن بال‌ها و قرار گرفتن در سایه و لهله زدن برای افزایش دفع حرارت تبخیری از واکنش‌های پرنده برای ثابت نگه داشتن دمای بدن است. با افزایش دمای محیط، چنانچه دما به حدی برسد که پرنده نتواند دمای اضافی را دفع کند، دمای بدن شروع به افزایش می‌کند (۷).

تریپتوفان از جمله اسیدهای آمینه ضروری است که بدن انسان و ماکیان قادر به سنتز آن نمی باشد و باید از طریق مواد غذایی تامین گردد. این اسیدآمینه در دو مسیر متابولیکی پیش می رود. مسیر تولید سروتونین–ملاتونین بواسطه آنزیم محدودکننده تریپتوفان هیدروکسیلاز و مسیر تولید کینورنین بواسطه آنزیم های IDO و TDO (۴). اسید آمینه تریپتوفان پیشساز دو هورمون سروتونین و ملاتونین است که موجب بهبود مصرف خوراک و افزایش غلظت تریپتوفان پلاسما می شود (۱۱). ســـروتونین می تواند مصرف خوراک را تنظیم کند و تریپتوفان نیز متابولیسم پروتئین و چربی را تنظیم کرده و مصرف خوراک را تحت تأثیر قرار می دهد (۲۱).

مطالعات نشان داده اند که استرس میزان مصرف غذا را به صورت دو طرفه تغییر می دهد. به طوریکه افزایش و همچنین کاهش تغذیه در استرس مشاهده شده است (۲۴). جهت تغییرات به عوامل زیادی بستگی دارد. عواملی مانند شدت استرس و میزان هورمون های استرس (گلوکوکورتیکوئیدها ، CRH و اوروکورتین)، هورمون های مرتبط با متابولیسم (لپتین ، انسولین و گرلین) و نوروپپتیدهای مرتبط با تغذیه (هورمون محرک ملانوسیت آلفا، پروتئین مربوط به آگوتی ، ملانوکورتین ها و NPY)(۶). اثرات آرامبخشی تریپتوفان و مشتقات آن به خوبی اثبات شده است. بطوریکه ملاتونین سبب کاهش کورتیکواسترون در جوجه های تخم گذار شده است (۶).

محور هیپوتالاموس–هیپوفیز قدامی– آدرنال در مواجه با استرس فعال شده و ترشح هورمون های استروئیدی کورتیزول و کورتیکواسترون غده آدرنال را سبب می شود. در ادامه هورمون های استروئیدی بر مدولای غده آدرنال اثر کرده و ترشح هورمون اپی نفرین را افزایش می دهند. سیستم سمپاتیک مغز نیز مستقیماً بر مدولای غده آدرنال تاثیر گذاشته و ترشحات آن را افزایش می دهند. حاصل این اعمال، افزایش فرایندهای گلوکونئوژنز، لیپولیز و نهایتاً پروتئولیز در بافت های بدن می باشد (۶).

گزارش ها نشان می دهد که NPY برای فرایند سازگاری استرس ، علاوه بر سایر مسیرهای اصلی بیولوژیکی مانند محور هیپوتالاموس– هیپوفیز– آدرنال (HPA) و سیستم عصبی خودمختار بسیار مهم است.NPY در خاتمه پاسخ تنش و برهم کنش آن با محور HPA دخالت دارد.در سطح رفتاری، بیان CRH ناشی از استرس ، بیان بیش از حد CRH و همچنین تجویز مرکزی CRH باعث ایجاد اضطراب در جوندگان می شود.در مقابل ، NPY ، عمل کننده مقابل CRH ، دارای اثرات ضد اضطرابی است. تزریق NPY در آمیگدال یا هیپوکمپ نشان می دهد که این مناطق کلیدی در اثر ضد اضطراب پپتید نقش دارند(۸). جمعیتهای مختلف نورونهای NPY در ARC وجود دارند که عملکردهای متفاوتی را در کنترل هموئوستاز انرژی انجام می دهند. نورونهای بیان کننده NPY/AgRP/ GABA و نورونهای بیان کننده POMC/CART در ARC به دلیل وجود سد خونی مغزی نیمه تراوا ، دسترسی مستقیم دارند و به سرعت به سیگنال های محیطی مانند لپتین، انسولین، گرلین و عوامل سیری مانند PYY و PP پاسخ می دهند. از آنجا، سیگنال ها را به سایر مناطق مغز از جمله VMH ، DMH ، PVN و LHA منتقل می کنند تا هموئوستاز انرژی را تعدیل کنند(۹). لپتین و انسولین به ترتیب توسط بافت

DOR: 20.1001.1.23832614.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی

چربی و سلولهای β پانکراس تولید می شوند و متناسب با میزان چربی در گردش هستند (۱۳). لپتین و انسولین فعالیت نورونهایNPY/AgRP را مهار می کنند در حالی که فعالیت نورونهایPOMC/CART را برای مهار مصرف غذا تحریک می کنند (۱۷). در مقابل، گرلین، که توسط معده و اثنی عشر ترشح می شود، قویاً نورونهای ARC NPY/AgRP را در پستاندارانبرای افزایش مصرف غذا فعال می کند(۲۲). سیگنالهای اشتها آور و بی اشتها کننده توسط نورونهای NPY/AgRP و POMC/CART تولید می شوند، سپس برای هماهنگی به نورونهای پایین دست مرتبه دوم در نواحی مغز مانند PVN یا DMH که ورودی های نورونهای سایر مناطق مغز را نیز دریافت می کنند، ارسال می شوند، تا تعادل کلی بین مصرف غذا و مصرف انرژی برقرار شود (۱۵). به طور فیزیولوژیک، میزان NPY در ARC تحت پرهیز غذایی افزایش می یابد. که با افزایش اخذا غذا، بالانس منفی انرژی را به حالت هموئوستاز تصحیح و تثبیت کند. مطابق این نکات،افزایش میزان NPY مرکزی توسط تجویز درون بطن مغزی (ICV) در جوندگان سبب هیپرفاژی و پیشرفت چاقی مرضی می شود (۱۶) که می‌تواند تائید کننده نقش اشتها آوری NPY در ARC باشد. با توجه نقش ژنهای NPY و CRF در اخذ غذا و استرس، تاثیر تریپتوفان بر تغییرات بیان ژنهای مذکور در جوجه های گوشتی تحت استرس حاد حرارتی در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

حیوان و شرایط نگهداری: ۴۰قطعه جوجه یک روزه نژاد راس پس از خریداری تا ۵ روزگی به صورت دسته جمعی نگهداری گردید. جوجه ها از ۴۸ ساعت قبل از آزمایش به قفس های انفرادی ساخته شده از پلکسی منتقل شدند که آبخوری و دان خوری مجزا داشته و جوجه ها قادر به دیدن و شنیدن صدای همدیگر بودند. در ۷ روزگی جوجه ها به ۴ گروه ۱۰ قطعه ای تقسیم شدند. چهار گروه شامل: ۱- گروه با درجه حرارت محیطی ۳۰ درجه سانتیگراد (دمای کنترل) و تزریق سرم فیزیولوژی (NT-NS)۲- گروه با درجه حرارت محیطی ۳۰ درجه سانتیگراد و تزریق تریپتوفان با دوز ۵۰ میلیگرم به ازاءکیلوگرم وزن بدن (NT-Tryp) ۳- گروه با درجه حرارت محیطی ۳۹ درجه سانتیگراد (استرس حرارتی)و تزریق سرم فیزیولوژی (HT-NS) ۴- گروه با درجه حرارت محیطی ۳۹ درجه سانتیگراد و تزریق تریپتوفان با دوز ۵۰ میلیگرم به ازاءکیلوگرم وزن بدن (HT-Tryp). طول دوره استرس گرمایی حاد ۵ ساعت و تزریق درون صفاقی تریپتوفان و سرم فیزیولوژی در ساعت صفر، همزمان با القای استرس گرمایی اعمال می‌شد.در طول آزمایش دسترسی جوجه ها به آب و غذا آزاد بود.

نحوه ایجاد استرس گرمایی و آماده سازی تریپتوفان: تریپتوفان (پودر کریستاله) از شرکت بیوبیسیک کانادا، خریداری گردید. آماده سازی تریپتوفان با غلظت ۵۰ میلیگرم به ازاء هرکیلوگرم وزن بدن در حجم ۰/۲۵ میلی لیتر در محلول سرم فیزیولوژی و اسید هیدروکلریک ۰/۱ نرمال یک ساعت قبل از تزریق برای تزریق داخل صفاقی انجام شد.

برای گروههای استرس حرارتی،القاء استرس گرمایی با تنظیم دمای اتاقکها در دمای ۳۹ درجه سانتی گراد و ۵۰٪ رطوبت نسبی ایجاد شد (۳). به طوریکه جوجه ها پس از ۱۰ دقیقه علائم استرس گرمایی شامل له له زدن و افتادگی بالها و چرت زدن و عدم مصرف غذا را نشان دادند.

اندازه گیری میزان اخذ غذای تجمعی: میزان اخذ غذای تجمعی به نسبت وزن بدن بر حسب درصد با تفاضل وزن اولیه دانخوریها از وزن آنها در زمانهای یک، دو، سه و چهار ساعت پس از تزریق صفاقی تریپتوفان محاسبه گردید.

جمع آوری دیانسفال مغز: پس از ۵ ساعت استرس گرمایی، جوجه ها به ظرف پلاستیکی حاوی گاز

DOR: 20.1001.1.23832614.1402.36.1.2.3

ایزوفلوران جهت بیهوشی منتقل شدند. سپس سر جوجه قطع شده و مغز آن خارج می شد. با وارونه کردن مغز در یک ظرف شیشه ای مقداری ازت مایع روی آن ریخته می‌شد تا قوام و استحکام یابد. سپس مرز تلنسفال از جلو و مخچه از عقب و تکتوم مزنسفال از جوانب با قیچی جراحی برش داده می شد، که بخش باقی مانده شامل دیانسفال بود که فوراً به میکروتیوب و سپس به ازت مایع وارد می شد. پس از جمع اوری کل دینسفال ها به فریزر منفی ۸۰ درجه منتقل می شدند تا مراحل استخراج RNA انجام گیرد.

استخراج RNA و سنتز cDNA : برای استخراج RNA لازم است که ابتدا نمونه‌ها را هموژن نماییم. بدین منظور مقداری از بافت مورد نظر را خرد کرده در هاون می‌ریزیم و با کمک نیتروژن مایع پودر یکنواختی از آن تهیه می‌کنیم. به منظور استخراج RNA از نمونه‌های بیولوژیک از کیت استخراج Trizol RNA Prep 100 استفاده شد. RNA استخراج شده بلافاصله برای انجام مرحله نسخه‌برداری معکوس و سنتز cDNA توسط کیت Gene Pak RT Universal مورد استفاده قرارگرفت.

طراحی آغازگرها اختصاصی ژن‌های NPY, CRF , beta-Actin, GAPDH : ابتدا ژنوتیپ‌ها و توالی‌های مربوط به ژن‌های بطور جداگانه از بانک اطلاعات ژنی (NCBI) جمع آوری شدند. با استفاده از نرم‌افزار primer premier-5 نسبت به طراحی آغازگرهای اختصاصی اقدام شد. سپس با استفاده از ابزار Blast از یکتا بودن محل اتصال جفت آغازگرها اطمینان حاصل شد. سنتز آغازگرها توسط شرکت MWG انجام شد.

جدول۱- مقادیر مورد نیاز در واکنش Real time PCR

مواد واکنش		حجم یک نمونه
QPCR		۱۰ میکرولیتر
آغازگر رفت/ برگشت		۳ میکرولیتر
نمونه DNA	۳	میکرو لیتر
آب دو بار تقطیر	۴	میکرو لیتر
حجم کل		۲۰ میکرولیتر

جدول۲- برنامه دمایی دستگاه Real time PCR

(C°) Ramp rate	درجه (C°/Sec)	حرارت/زمان	تعداد/سیکل/مرحله
۴,۴	۹۵/۳۰۰		۱/پیش انکوباسیون
۴,۴	۹۵/۴۵		
۲,۲	۵۰/۴۵		۳۵/تکثیر
۴,۴	۷۲/۴۵		
۴,۴	۹۵/۱		
۲,۲	۶۵/۶۰		۱/ذوب
۰,۲	۹۷/۱		

جدول ۳- توالی پرایمر ها

ژن	توالی پرایمر (رفت)	توالی پرایمر (برگشت)	اندازه محصول (جفت باز)
NPY	5′-CCTCATCACCAGGCAGAGAT-3′	5′-CACTGGGAATGACGCTATGA-3′	۲۱۲
GAPDH	5′-CCTCTCTGGCAAAGTCCAAG-3′	5′-CATCTGCCCATTTGATGTT-3′	۲۰۰
CRH	5′-TCAGCACCAGAGCCATCACA-3′	5′-GCTCTATAAAAATAAAGAGGTGACATCAGA-3′	۷۴
B-Actin	5′-CTCTGACTGACCGCGTTACT-3′	5′-TACCAACCATCACACCCTGAT-3′	۱۷۲

DOR: 20.1001.1.23832614.1402.36.1.2.3

واکنش Real time PCR : به منظور انجام واکنش Real time PCR از کیت Jena Bioscience (http:// www.Jenabioscience.com) استفاده شد. حجم انجام واکنش مورد نظر ۲۰ ماکرولیتر براساس میزان نشان داده شده در پروتکل مسترمیکس در نظرگرفته شد.

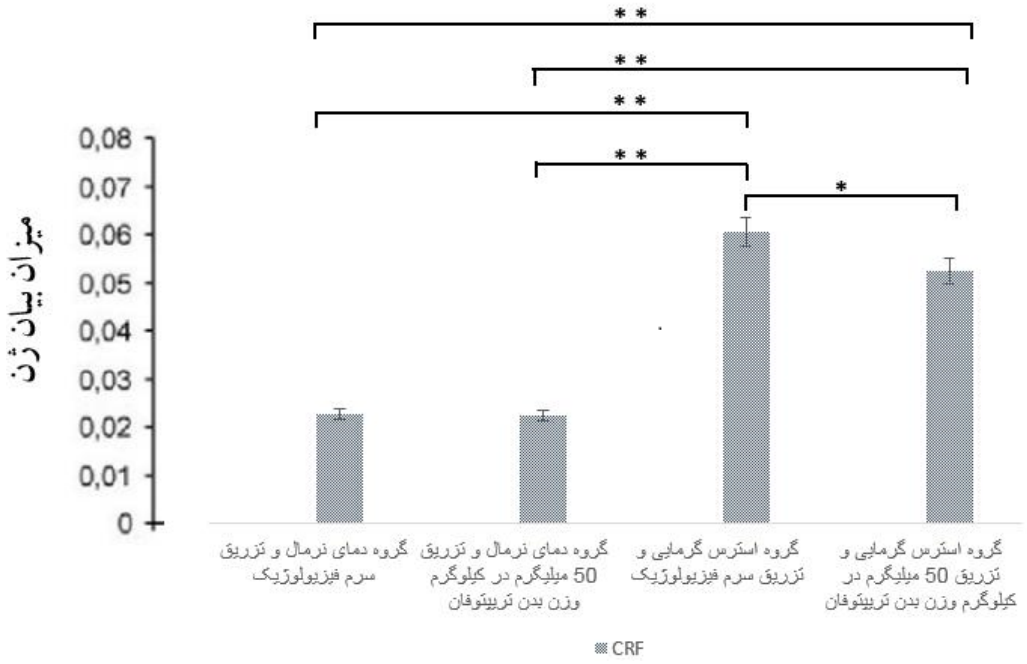
واکنش Real time PCR کمی نسبی: بعد از بهینه‌سازی دمای اتصال آغازگرها و بهینه سازی غلظت آغازگرها و سایر اجزاء واکنش نسبت به تکثیر قطعات اختصاصی ژن-های مورد تحقیق اقدام شد.

کمی نمودن بیان ژن‌ها: با پایان انجام واکنش PCR، داده - های اولیه توسط نرم افزار Excel تحت تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.برای تعیین میزان بیان ژن‌ها از روش پفافل استفاده شد. در این روش فرض بر این است که بازده نمونه و کنترل داخلی برابر و ۱۰۰ درصد است و از فرمول $۲^{-\triangle\triangle CT}$ به منظور تعیین بیان ژن استفاده شد.

آنالیز داده و روش آماری: برای مقایسه داده های بدست آمده از بررسی میزان اخذ غذای تجمعی به نسبت وزن بدن بر حسب درصدگروهها در طول زمان از نرم افزار SPSS و روش آماری Repeated Measurement و تست تکمیلی Tukey استفاده شد. برای مقایسه داده های بدست آمده از بررسی میزان اخذ غذای تجمعی به نسبت وزن بدن بر حسب درصد، در هر زمان بین گروهها با نرم افزار SPSS و روش آماری ONEWAYANOVA و تست تکمیلی LSD استفاده شد. سطح معنی داری P≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

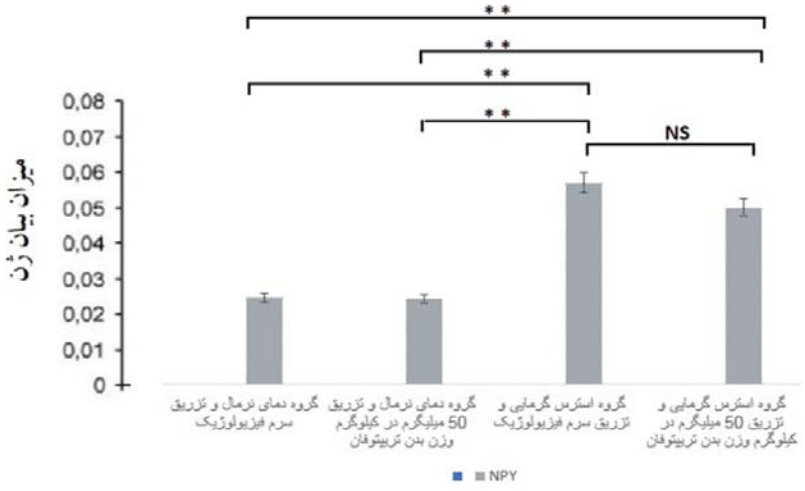
نتایج

نتایج بررسی میزان بیان ژن CRF: نتایج نشان داد که میزان بیان ژن CRF در گروه استرس گرمایی با گروه درجه حرارتنرمال تفاوت معنی‌داریدر سطح ۱ درصد وجود دارد ($P< 0.01$) ومیزان بیان ژن CRF در گروه استرس حرارتی بالاتر است. بین دو گروه نرمال تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P< 0.05$). اما بین دو گروه استرس گرمایی تفاوت معنی دار وجود داشت و میزان بیان ژن CRF در گروه استرس حرارتی که تریپتوفان دریافت کرده بودند کاهش چشمگیر مشاهده شد($P< 0.05$). (نمودار ۱)



نمودار ۱- میزان بیان ژن CRF در گروههای مختلف مورد مطالعه

DOR: 20.1001.1.23832614.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی



نمودار ۲- میزان بیان ژن NPY در گروههای مختلف مورد مطالعه

جدول ۴- میزان اخذ غذای تجمعی (میانگین ± خطایاستاندارد) به نسبت وزن بدن بر حسب درصد، در گروههای مختلف مورد مطالعه، در زمانهای ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت، (روش آماری ONE WAY ANOVA و تست تکمیلی LSD برای مقایسه داده ها در هر زمان بین گروهها)

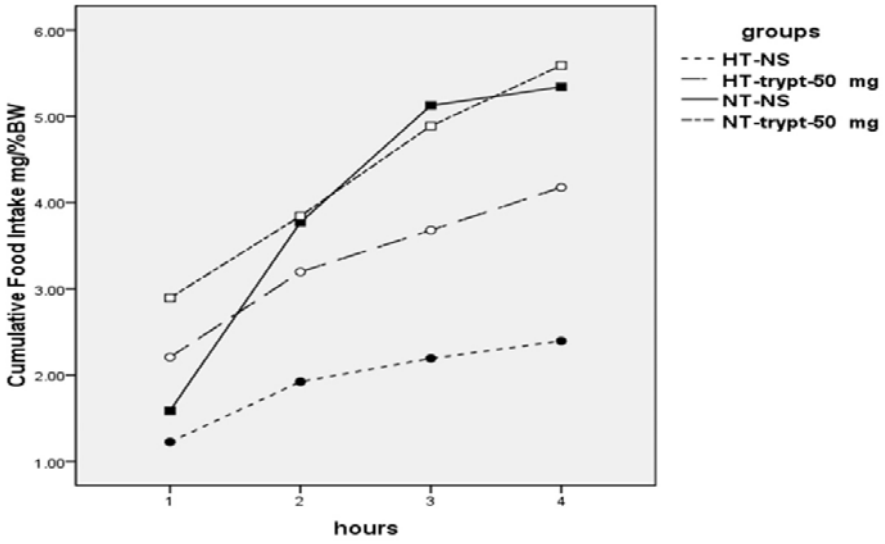
زمان / گروه ها	ساعت اول	ساعت دوم	ساعت سوم	ساعت چهارم
NT-NS	۱/۵۹ ± ۰/۱۸	۳/۷۷ ± ۰/۸۴	۵/۱۲ *± ۰/۱	۵/۳۴ *± ۰/۸۸
NT-Tryp	۲/۸۹ *± ۰/۳۵	۳/۸۴ *± ۰/۳۹	۴/۸۹ a± ۰/۵۲	۵/۵۹ a± ۰/۶
HT-NS	۱/۲۲ *± ۰/۳۴	۱/۹۲ *± ۰/۴	۲/۱۹ *a± ۰/۴۶	۲/۳۹ *a± ۰/۵۲
HT-Tryp	۲/۲۱ ± ۰/۸۲	۳/۲ ± ۰/۸۹	۳/۶۸ ± ۰/۹۵	۴/۱۸ ± ۰/۹۹

*،a دارای تفاوت معنادار بین گروهها در هر ساعت

نتایج بررسی میزان بیان ژنNPY: نتایج نشان داد که بین میزان بیان ژن NPY در گروه های استرس گرمایی با گروههای با درجه حرارت نرمال تفاوت معنی داری در سطح ۱ درصد وجود دارد (P<۰/۰۱)، ومیزان بیان این ژن در گروه استرس حرارتی بالاتر است. در بین دو گروه نرمال تفاوت معنی داری مشاهده نشد(P≤۰/ ۰۵). همچنین بین دو گروه استرس گرمایی تفاوت معنی داری در بیان ژن NPY وجود ندارد و میزان بیان ژن NPY با تجویز تریپتوفان در طی استرس حرارتی افزایش یافته و تفاوت چندانی با گروه استرس حرارتی که تریپتوفان دریافت نکرده است وجود ندارد (نمودار ۲).

نتایج بررسی تغییرات میزان اخذ غذای تجمعی: پس از تجزیه و تحلیل داده های حاصل از اخذ غذای تجمعی در طول زمان، مشاهده شد که میزان اخذ غذا در گروهی که درجه حرارت محیطی بالا داشتند و سرم فیزیولوژی دریافت کرده بودند، در مقایسه با دو گروه با درجه حرارت نرمال تفاوت معنادار داشتند .به طوریکه در گروه درجه حرارت محیطی بالا و سرم فیزیولوژی(HT-NS)کمترین میزان اخذ غذا در طول زمان داشتند. در حالیکه گروههای درجه حرارت نرمال و سرم فیزیولوژی(NT-NS) در طول زمان اخذ غذای بیشتری داشته که در ساعت چهارم میزان اخذ غذا در گروه درجه حرارت نرمال و تریپتوفان (NT-Tryp) افزایش بیشتری نیز داشته است. حتی در این گروه در ساعت اول میزان اخذ غذا بالا تر از سایر گروه ها بوده است. در گروه درجه حرارت محیطی بالا و تجویز تریپتوفان (HT-Tryp) میزان اخذ غذای تجمعی در مقایسه با گروه درجه حرارت محیطی بالا با تجویز سرم فیزیولوژی (HT-NS) افزایش یافته و به گروههای با درجه حرارت نرمال نزدیک شده به طوریکه بااین دو گروه تفاوت معنا دار مشاهده نمی شود (نمودار۳ و جدول ۴).

DOR: 20.1001.1.23832614.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی



نمودار ۳- تغییرات میزان اخذ غذای تجمعی به نسبت وزن بدن بر حسب درصد ،در گروههای مختلف مورد مطالعه در طول زمان (روش آماری Repeated Measurement و تست تکمیلی Tukey برای مقایسه گروهها در طول زمان)

بحث

در شرایط گرما، تهویه ریوی در پرندگان افزایش می یابد و منجر به عدم تعادل اسید و باز خون می شود به همین دلیل اکثر مسیرهای متابولیسمی نمی توانند مانند شرایط طبیعی عمل کنند و به جای اینکه در مسیر رشد عمل کنند بیشتر به تنظیم حفظ ثبات داخلی بدن می پردازند که خود منجر به کاهش رشد می شود. مطالعات متعددی در ارتباط با تاثیر استرس و استفاده از ترکیبات مقابله کننده با اثرات سوء آن در حیوانات مختلف صورت گرفته است. بطوریکه عصاره آبی آویشن با دوز 400 میلیگرم بر کیلوگرم، باعث کاهش میزان کلسترول و LDL سرم خون و حفاظت بافت کبدی در برابر اثرات مخرب ناشی از استرس بی حرکتی می‌شود (۱). همچنین درمان موشهای تحت تنش حرارتی 43 درجه سانتیگراد به مدت 45 روز توسط پپتید زیست فعال با دوز 20 میلیگرم باعث بهبود آسیب بافت بیضه ناشی از تنش حرارتی می شود که این اثرات مثبت به دلیل خواص آنتی اکسیدانی پپتید زیست فعال و توانایی این ماده در از بین بردن رادیکالهای آزاد تشکیل شده به دنبال ایجاد تنش اکسیداتیو می باشد (۲).

تحقیقات زیادی بروی نقش ضد اضطرابی ایندول امین هایی مانند تریپتوفان، سروتونین در شرایط ایزوله کردن جوجه های نوزاد وجود دارد. تزریق مرکزی آنها قبل از ایزوله کردن جوجه ها سبب کاهش معنی دار جیک جیک کردن جوجه ها و کاهش سطح کورتیزول خون می شود. تزریق مرکزی این اسیدآمینه ها بویژه تریپتوفان به همراه CRF به طورمعنی داری اثرات استرس زایی CRF را سرکوب کرده و تاثیر آرام کنندگی بالایی در جوجه ها داشته است (۱۱). مشاهده شده که اسیدهای آمینه تزریق شده به مغز و همچنین تجویز خوراکی و صفاقی آنها تاثیر آرامبخش و ضد اضطراب دارند. بطوریکه تزریق مرکزی تریپتوفان و متابولیت های آن (کینورنیک اسید) در کاهش استرس القا شده با تزریق CRH، که بصورت جیک جیک حاصل از ایزوله شدن ارزیابی شد. همچنین عدم افزایش کورتیکواسترون اثر معنی داری داشته است (۱۹). این یافته‌ها بر تاثیر بافرینگ تریپتوفان بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال تاکید دارد.

تغییرات در سطح بیان ژن CRH در مطالعه حاضر تائید کننده القا استرس حرارتی می باشد. بطوریکه استرس

DOR: 20.1001.1.23832614.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی

حرارتی به مدت ۵ ساعت در جوجه های ۷ روزه، سبب افزایش بیان ژن CRH در ناحیه دیانسفال شده و تزریق صفاقی تریپتوفان سبب کاهش معنی دار بیان ژن CRH شده است. در دیگر مطالعات، استرس گرمایی حاد ۲ تا ۵ ساعت در جوجه های ۱۴ روزه، سبب تغییر در بیان ژن CRH مغز آنها نشده اما کورتیکواسترون را افزایش معنی داری داده و تغییرات اسید آمینه ها، بخصوص افزایش تریپتوفان، ایزولوسین، لوسین و والین در دیانسفال در اثر استرس گرمایی مشاهده شده است (۵). دیده شده که استرس گرمایی چرخه ای در یک هفته پایانی دوره پرورش تاثیری بر سطح کورتیکواسترون خون نداشته است (۱۴). به عکس، در جوجه های ۱۴ روزه که در معرض ۲ یا ۵ ساعت استرس گرمایی قرار گرفتند، تنها در ۵ ساعت استرس گرمایی افزایش معنی دار سطح کورتیکواسترون نشان داده شد (۱۰). براساس تفاوت ها در سطح کورتیکواسترون در طول استرس گرمایی مقالات مختلف، شاید بتوان گفت که تغییرات کورتیکواسترون خون در محدوده های زمانی کوتاهی رخ می دهد 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 می پذیرد. علاوه براین ترشح گلوکوکورتیکوئیدها با ریتم شبانه روزی رخ می دهد که بسته به شرایط فردی نیز متفاوت است.

NPY باعث تعادل مثبت انرژی از طریق افزایش دریافت غذا می شود و هم چنین باعث کاهش هزینه انرژی از طریق کاهش گرمازایی در بافت قهوه ای چربی و همچنین تسهیل ذخیره چربی در بافت سفید چربی از طریق افزایش فعالیت انسولین می شود. همانطور که در نتایج مطالعه حاضر نیز مشاهده می شود، استرس گرمایی افزایش بیان ژن NPY و در نتیجه افزایش تولید نوروپپتید y را سبب می شود. در جوجه هایی که تحت استرس گرمایی قرار گرفتند بیان mRNA مربوط به ژن NPY در دیانسفال آنها نسبت به جوجه های کنترل بیشتر می شود. افزایش میزان آمینو اسیدها در سطح مغز جوجه ها در زمان استرس گرمایی نشان می دهد که احتمالا متابولیسم آمینو اسید ها موجب تنظیم اشتها در زمان استرس گرمایی می شود (۱۸). بنابراین تجویز صفاقی تریپتوفان همانطور که نتایج مطالعه حاضر نشان داده، می تواند عاملی در جهت بهبود استرس و میزان اخذ غذا باشد.

اثرات آرامبخشی و ضد استرسی از تزریق کینورنیک اسید در جوجه های نوزاد نیز مشاهده شده است که در ظرف ۱۰ دقیقه سبب کاهش رفتارهای استرسی حاصل از CRH شده است (۲۳). در سیستم عصبی مرکزی، تعامل بین استرس و مصرف غذا توسط مسیرهای نورآناتومی در هیپوتالاموس تنظیم می شود، که در آن NPY نقش کلیدی دارد. NPY درهسته ARC هیپوتالاموس توسط عوامل مختلف استرس زا تغییر می کند و پیشروی نورون های NPY از ARC به PVH امکان ارتباط متقابل سیستم NPY با محور HPA در جریان تنش را فراهم می کند.NPY خود یک پپتید اشتها آور قوی است و افزایش NPY ناشی از استرس منجر به افزایش مصرف غذای ناشی از استرس می‌شود (۸). در این راستا گزارش شده است که مصرف کالری و بیان NPY هیپوتالاموس در موش های صحرایی نر تحت استرس انزوا افزایش می یابد. علاوه بر این، پس از یک دوره استرس محدود کننده ۳۰ دقیقه ای، مصرف غذا در موش های ماده فاقد ژن NPY در مقایسه با موش های ماده طبیعی کمتر است، که نشان می دهد مصرف غذای ناشی از استرس بستگی به NPY دارد (۲۰). نتایج مطالعه حاضر را می‌توان بر مبنای اثر تریپتوفان بر افزایش بیان ژن NPY به عنوان یک پپتید افزایش دهنده اخذ غذا، تفسیر کرد. از طرفی NPY خود به عنوان عامل مقابله کننده با استرس و عملکرد CRF و در کنار آن تاثیر مثبت تریپتوفان بر بیان NPY، سبب افزایش اخذ غذا در زمان استرس حرارتی شده است.

DOR: 20.1001.1.23832614.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی

در انسان افزایش مزمن ناشی از استرس در مصرف غذا می‌تواند مضر باشد زیرا ممکن است توسعه بیماری های پاتولوژیک مانند چاقی را تسهیل کند. شواهد پیش بالینی نشان می دهد که NPY از طریق اثرات متعدد عمل می کند. به طور خاص، NPY آزاد شده از اعصاب سمپاتیک در طول استرس، گیرنده های Y2 را بر روی بافت چربی سفید احشایی فعال می کند، که منجر به افزایش رشد چربی شکمی می‌شود .علاوه بر این، انتشار گلوکوکورتیکوئیدهای ناشی از استرس، بیان NPY هیپوتالاموس و مصرف غذا را افزایش می دهد، که ممکن است اساس مکانیسم مرکزی برای شروع چاقی توسط NPY باشد (۱۲).

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، نتایج بیانگر القا استرس گرمایی در طی ۵ ساعت شده است بطوریکه میزان اخذ غذا کاهش یافته و با افزایش میزان بیان ژن CRF و NPY همراه بوده است. تجویز درون صفاقی تریپتوفان، بیان ژن CRF را بطور معنادار در گروه استرس گرمایی کاهش داده است. که می‌توان گفت تا حدودی بر تعدیل استرس تاثیر گذار بوده است. بیان ژن NPY به عنوان عامل مقابله کننده با استرس در گروه های استرس حرارتی افزایش یافته است که احتمالا تریپتوفان در این افزایش نقش دارد. بنابراین تجویز تریپتوفان در شرایط استرس حرارتی می تواند بر بهبود عملکرد متقابل CRF و NPY، همچنین افزایش میزان اخذ غذا موثر واقع شود.

سپاسگزاری: نویسندگان مطالعه حاضر از دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان کمال تشکر و قدردانی دارد.

تعارض در منافع:"نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند."

نقش نویسندگان: ل.ع: طراحی مطالعه و نظارت بر اجرای پژوهش ؛ ب.ص، ل.ع: انجام مطالعه و آنالیز دادهها؛ نگارش مقاله: ل.ع

منابع

۱. بینا، ر.،حیدری، ر.، محمدزاده، م و ایلخانی پور، م.، ۱۳۹۸. تأثیرعصاره آبی گیاه آویشن (Thymus vulgaris L.) بر روی پارامترهای بیوشیمیایی خون وبافت کبدی در موشهای صحرایی ماده تحت استرس بی حرکتی، مجله پژوهشهای جانوری (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۳۲، شماره ۱، صفحات ۱-۱۰.

۲. ولی زاده، م.، نجاتی، و.، شالیزار جلالی، ع.، نجدگرامی، ا. ح و نجفی، غ.، ۱۴۰۰. اثر پپتید زیست فعال مشتق از ماهی ساردین بر لوله های اسپرم ساز متعاقب القاء تنش حرارتی در موش صحرایی نر بالغ، مجله پژوهشهای جانوری (مجله زیست شناسی ایران)، جلد 34 ،شماره ۲، صفحات ۱۵۰-۱۶۲.

3. Bahry MA, Chowdhury VS, Yang H, Tran PV, Do PH, Han G, et al. Central administration of neuropeptide Y differentially regulates monoamines and corticosterone in heat-exposed fed and fasted chicks. Neuropeptides. 2017;62:93-100.

4. Chang Y, Wang XJ, Feng JH, Zhang MH, Diao HJ, Zhang SS, et al. Real-time variations in body temperature of laying hens with increasing ambient temperature at different relative humidity levels. Poult Sci. 2018;97(9):3119–25.

5. Dozier 3rd WA, Lott BD, Branton SL. Growth responses of male broilers subjected to increasing air velocities at high ambient temperatures and a high dew point. Poult Sci. 2005;84(6):962–6.

6. Furuse M. Screening of central functions of amino acids and their metabolites for sedative and hypnotic effects using chick models. Eur J Pharmacol. 2015;762:382–93.

7. Haleem DJ. Improving therapeutics in anorexia nervosa with tryptophan. Life Sci. 2017;178:87–93.

8. Hamon M, Blier P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry. 2013;45:54–63.

DOR: 20.1001.1.23832614.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی

9. Kas MJH, Bruijnzeel AW, Haanstra JR, Wiegant VM, Adan RAH. Differential regulation of agouti-related protein and neuropeptide Y in hypothalamic neurons following a stressful event. J Mol Endocrinol. 2005;35(1):159–64.
10. Kujundžić RN, Lowenthal JW. The role of tryptophan metabolism in iNOS transcription and nitric oxide production by chicken macrophage cells upon treatment with interferon gamma. Immunol Lett. 2008;115(2):153–9.
11. Kurata K, Shigemi K, Tomonaga S, Aoki M, Morishita K, Denbow DM, et al. L-ornithine attenuates corticotropin-releasing factor-induced stress responses acting at GABAA receptors in neonatal chicks. Neuroscience. 2011;172:226–31.
12. Liu Y, Yuan JM, Zhang LS, Zhang YR, Cai SM, Yu JH, et al. Effects of tryptophan supplementation on growth performance, antioxidative activity, and meat quality of ducks under high stocking density. Poult Sci. 2015;94(8):1894–901.
13. McDougall SJ, Widdop RE, Lawrence AJ. Differential gene expression in WKY and SHR brain following acute and chronic air-puff stress. Mol Brain Res. 2005;133(2):329–36.
14. Merchán A, Navarro S V, Klein AB, Aznar S, Campa L, Suñol C, et al. Tryptophan depletion affects compulsive behaviour in rats: strain dependent effects and associated neuromechanisms. Psychopharmacology (Berl). 2017;234(8):1223–36.
15. Pereira DF, Nääs I de A. Estimating the thermoneutral zone for broiler breeders using behavioral analysis. Comput Electron Agric. 2008;62(1):2–7.
16. Prinzinger R, Preßmar A, Schleucher E. Body temperature in birds. Comp Biochem Physiol Part A Physiol. 1991;99(4):499–506.
17. Reichmann F, Hassan AM, Farzi A, Jain P, Schuligoi R, Holzer P. Dextran sulfate sodium-induced colitis alters stress-associated behaviour and neuropeptide gene expression in the amygdala-hippocampus network of mice. Sci Rep. 2015;5(1):1–13.
18. Romero LM, Platts SH, Schoech SJ, Wada H, Crespi E, Martin LB, et al. Understanding stress in the healthy animal–potential paths for progress. Stress. 2015;18(5):491–7.
19. Sahin K, Sahin N, Kucuk O, Hayirli A, Prasad AS Role of dietary zinc in heat-stressed poultry. A review. Poult Sci. 2009., 88(10):2176–83.
20. Steenbergen L, Jongkees BJ, Sellaro R, Colzato LS. Tryptophan supplementation modulates social behavior: a review. Neurosci Biobehav Rev. 2016;64:346–58.
21. Tachibana T, Saito E-S, Saito S, Tomonaga S, Denbow DM, Furuse M. Comparison of brain arginine-vasotocin and corticotrophin-releasing factor for physiological responses in chicks. Neurosci Lett. 2004;360(3):165–9.
22. Thorsell A, Michalkiewicz M, Dumont Y, Quirion R, Caberlotto L, Rimondini R, et al. Behavioral insensitivity to restraint stress, absent fear suppression of behavior and impaired spatial learning in transgenic rats with hippocampal neuropeptide Y overexpression. Proc Natl Acad Sci. 2000;97(23):12852–7.
23. Yoshida J, Shigemura A, Ogino Y, Denbow DM, Furuse M. Two receptors are involved in the central functions of kynurenic acid under an acute stress in neonatal chicks. Neuroscience. 2013;248:194–200.
24. Yoshida J, Erwan E, Chowdhury VS, Ogino Y, Shigemura A, Denbow DM, et al. Comparison of centrally injected tryptophan-related substances inducing sedation in acute isolation stress-induced neonatal chicks. Pharmacol Biochem Behav. 2015;129:1–6.

Abbreviations:
TDO: Tryptophan 2,3-dioxygenase
IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase
CRH: Corticotropin Releasing hormone
NPY: Neuropeptide Y
HPA: Hypothalamus Pituitary Axis
ICV: Intracerebroventricular
ARC: Arcuate Nucleus
CART: Cocaine- and amphetamine-regulated transcript
POMC: Preopiomanocortin
VMH: Ventromedian Hypothalamus
DMH: Dorsomedian Hypothalamus
PVN: Paraventricular Nucleus
LHA: lateral Hypothalamic Area
PYY: Peptide YY
AgRP: Agoti Related Peptide

مقاله پژوهشی
DOR: 20.1001.1.23832614.1402.36.1.2.3

Effect of intraperitoneal tryptophan injection on diencephalic CRF and NPY gene expression in acute heat stressed- neonate broiler chicks

Emadi L.[1], Sadeghi B.[2], Salehinezhad N.[1] and Nezhadbakhsh K.[1]

[1] Dept. of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. of Iran

[2] Dept of Health Food and Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. of Iran

Abstract

High ambient temperature (HT) and heat stress has negative impact on physiological functions. L-tryptophan, serotonergic and kynurenine pathways, has calmative effect during different stress status. This Study was designed to investigate intraperitoneal administration of L-tryptophan (50 mg/kg body weight) during either HT (39 °C) or normal temperature (NT; 31 °C) for 5 hours on cumulative food intake at 1, 2, 3 and 4 hours and diencephalic NPY and CRF gene expression with qPCR method at 5 hours after tryptophan administration.In both two heat stress groups, NPY gene expression significantly was increased in compare with normal temperature groups. Cumulative food intake was increased in heat stress group by tryptophan injection.These results showed that NPY increased to compensate reduced food intake, as anti-stress factor, in heat stress condition and tryptophan maybe involve to improve this effect. Heat stress significantly increased CRH gene expression but tryptophan administration significantly reduced it during heat stress. These results showed, tryptophan modulated Hypothalamus-Hypophysis-Adernal axis by changing in CRH gene expression and tryptophan has buffering effect on stressful states.

Key words: broiler chicks, diencephalic NPY and CRF, heat stress, L-tryptophan,