

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

لادن عمادی^{۱*}، بلال صادقی^۲، نصرت صالحی نژاد^۱ و کیوان نژاد بخش^۱

^۱ ایران، کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه، بخش فیزیولوژی

^۲ 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، پیش‌ساز مسیره‌های سروتونرژیک و کینورین، 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 ساعات ۵ پس از تجویز تریپتوفان می‌باشد. 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 می‌دهد که NPY برای جبران اخذ غذای کاهش یافته به عنوان فاکتور ضد استرس، افزایش می‌یابد و احتمالاً 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 استرس‌ها دارد.

واژه‌های کلیدی: استرس گرمایی، ال تریپتوفان، جوجه گوشتی، NPY و CRF دیانسفالیک

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

مقدمه

فیزیولوژیک بدن تاثیر گذار می‌باشد. 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 بدن برابر است و دمای طبیعی بدن پرنده ثابت می‌ماند)، 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

استرس بصورت پاسخ بیولوژیک یک حیوان، به هنگام مواجه با تهدید و به هم خوردن هموستاز، تعریف می‌شود. هنگامیکه استرس رفاه حیوان را تهدید می‌کند به آن تنش (distress) گفته می‌شود (۱۹). در زمان استرس سیستم عصبی خودمختار، سیستم‌های بیولوژیک متعددی شامل سیستم قلبی-عروقی، سیستم گوارشی، غدد برون ریز و مدولای غده آدرنال را تحت تاثیر قرار می‌دهد که نتیجه آن تغییر در ضربان قلب، فشار خون، فعالیت گوارشی و دیگر فعالیت‌ها می‌باشد. استرس حرارتی بصورت افزایش یا کاهش دمای محیط بر مکانیسم‌های

خوبی اثبات شده است. بطوریکه ملاتونین سبب کاهش کورتیکواسترون در جوجه های تخم گذار شده است (۶).

محور هیپوتالاموس-هیپوفیز قدامی- آدرنال در مواجهه 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 گلوکوکورتیزول، 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). جمعیت های مختلف نورونهای NPY در ARC وجود دارند که عملکردهای متفاوتی را در کنترل هموستاز 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 هموستاز انرژی را تعدیل کنند (۹). لپتین و انسولین به ترتیب توسط بافت

دمای بدن) فراتر رود، پرنده سعی می کند با واکنش های 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 مویرگ های سطحی بدن، باز نگه داشتن بال ها و قرار گرفتن در سایه و لهله زدن برای افزایش دفع حرارت تبخیری از واکنش های 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 می کند (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 اسید آمینه در دو مسیر متابولیکی پیش می رود. مسیر تولید سروتونین-ملاتونین بواسطه آنزیم محدودکننده تریپتوفان هیدروکسیلاز و مسیر تولید کینورنن 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 پلازما می شود (۱۱). سروتونین 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

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 ازاء کیلوگرم 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 ازاء کیلوگرم 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 جوجه‌ها به آب و غذا آزاد بود.

نحوه ایجاد استرس گرمایی و آماده‌سازی تریپتوفان:

تریپتوفان (پودر کریستاله) از شرکت بیوبیسیک کانادا، خریداری گردید. آماده‌سازی 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 اتاق‌ها در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و ۵۰٪ رطوبت نسبی ایجاد شد (۳). به طوری‌که جوجه‌ها پس از ۱۰ دقیقه علائم استرس گرمایی شامل له له زدن و افتادگی بالها و چرت زدن و عدم مصرف غذا را نشان دادند.

اندازه‌گیری میزان اخذ غذای تجمعی: میزان اخذ غذای

تجمعی به نسبت وزن بدن بر حسب درصد با تفاضل وزن اولیه دانخورها از وزن آنها در زمانهای یک، دو، سه و چهار ساعت پس از تزریق صفاقی تریپتوفان محاسبه گردید.

جمع‌آوری دیانسفال مغز: پس از ۵ ساعت استرس

گرمایی، جوجه‌ها به طرف پلاستیکی حاوی گاز ایزوفلوران جهت بیهوشی منتقل شدند. سپس سر جوجه

چربی و سلولهای β پانکراس تولید می‌شوند و متناسب با میزان چربی در گردش هستند (۱۳). لپتین و انسولین فعالیت نورونهای NPY/AgRP را مهار می‌کنند در حالی که فعالیت نورونهای POMC/CART را برای مهار مصرف غذا تحریک می‌کنند (۱۷). در مقابل، گرلین، که توسط معده و اثنی عشر ترشح می‌شود، قویاً نورونهای ARC NPY/AgRP را در پستانداران برای افزایش مصرف غذا فعال می‌کند (۲۲). سیگنالهای اشتها آور و بی اشتها کننده توسط نورونهای NPY/AgRP و POMC/CART تولید می‌شوند، سپس برای هماهنگی به نورونهای پایین دست مرتبه دوم در نواحی مغز مانند PVN یا DMH که ورودی‌های نورونهای سایر مناطق مغز را نیز دریافت می‌کنند، ارسال می‌شوند، تا تعادل کلی بین مصرف غذا و مصرف انرژی برقرار شود (۱۵). به طور فیزیولوژیک، میزان NPY در ARC تحت پرهیز غذایی افزایش می‌یابد. که با افزایش اخذ غذا، بالانس منفی انرژی را به حالت هموستاز 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 می‌شود (۱۶) که می‌تواند تأیید 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 جوجه‌های گوشتی تحت استرس حاد حرارتی در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

حیوان و شرایط نگهداری: ۴۰ قطعه جوجه یک روزه نژاد

راس پس از خریداری تا ۵ روزگی به صورت دسته جمعی نگهداری گردید. جوجه‌ها از ۴۸ ساعت قبل از آزمایش به قفس‌های انفرادی ساخته شده از پلکسی منتقل شدند که آب‌خوری و دان‌خوری مجزا داشته و جوجه‌ها قادر به دیدن و شنیدن صدای همدیگر بودند. در ۷ روزگی جوجه‌ها به ۴ گروه ۱۰ قطعه‌ای تقسیم شدند. چهار گروه شامل:

استفاده از ابزار Blast از یکتا بودن محل اتصال جفت آغازگرها اطمینان حاصل شد. سنتز آغازگرها توسط شرکت MWG انجام شد.

جدول ۱- 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 میکرو لیتر

جدول ۲- برنامه دمایی دستگاه Real time PCR

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

قطع شده و مغز آن خارج می‌شد. با وارونه کردن مغز در یک ظرف شیشه‌ای 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 می‌شد، که بخش باقی مانده شامل دیانسفال بود که فوراً به میکروتیوب و سپس به ازت مایع وارد می‌شد. پس از جمع‌آوری کل دیانسفال‌ها به فریزر منفی ۸۰ درجه منتقل می‌شدند تا مراحل استخراج RNA انجام گیرد.

استخراج RNA و سنتز cDNA: برای استخراج RNA لازم است که ابتدا نمونه‌ها را هموزن 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 قرار گرفت.

طراحی آغازگرها اختصاصی ژن‌های β -CRF, NPY,

Actin, GAPDH: ابتدا ژنوتیپ‌ها و توالی‌های مربوط به ژن‌های بطور جداگانه از بانک اطلاعات ژنی (NCBI) جمع‌آوری شدند. با استفاده از نرم‌افزار primer premier-5 نسبت به طراحی آغازگرهای اختصاصی اقدام شد. سپس با

جدول ۳- توالی پرایمرها

اندازه محصول (جفت باز)	توالی پرایمر (برگشت)	توالی پرایمر (رفت)	ژن
۲۱۲	5'-CACTGGAATGACGCTATGA-3'	5'-CCTCATCACCAGGCAGAGAT-3'	NPY
۲۰۰	5'-CATCTGCCCATTGTGATGT-3'	5'-CCTCTCTGGCAAAGTCCAAG-3'	GAPDH
۷۴	5'-GCTCTATAAAAATAAGAGGTGACATCAGA-3'	5'-TCAGCACCAGAGCCATCACA-3'	CRH
۱۷۲	5'-TACCAACCATCACACCTGAT-3'	5'-CTCTGACTGACCGGTTACT-3'	B-Actin

بر حسب درصد گروهها 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 $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

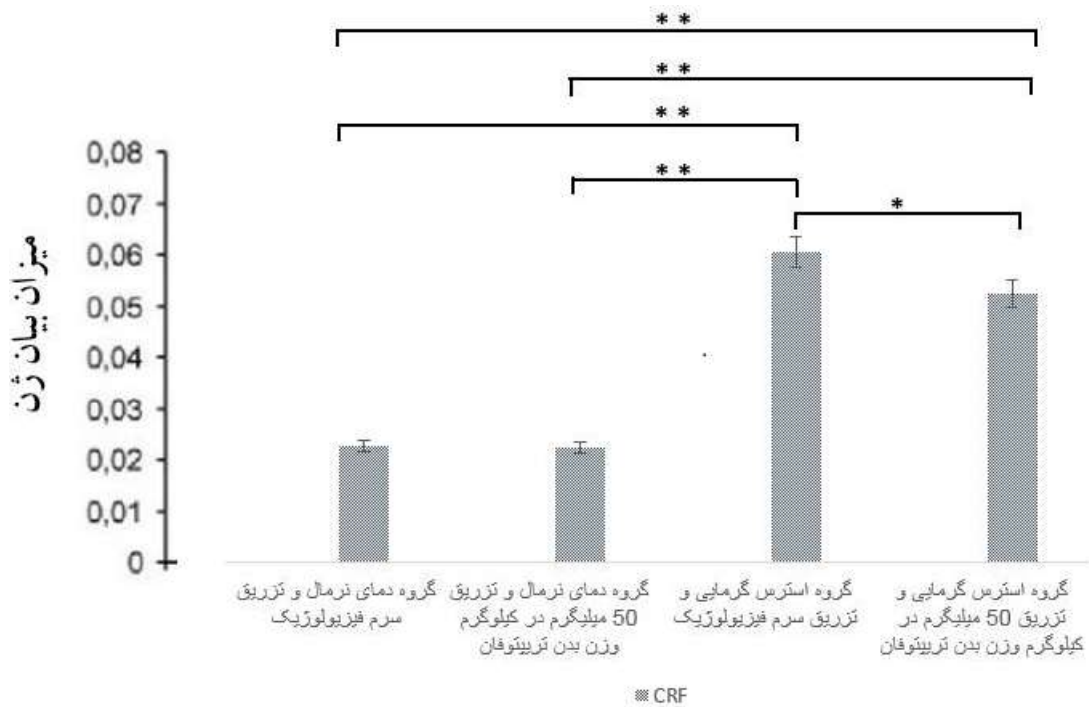
نتایج بررسی میزان بیان ژن CRF: نتایج نشان داد که میزان بیان ژن CRF در گروه استرس گرمایی با گروه درجه حرارت نرمال تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد وجود دارد ($P < 0.01$) و میزان بیان ژن CRF در گروه استرس حرارتی بالاتر است. بین دو گروه نرمال تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P < 0.05$). اما بین دو گروه استرس گرمایی 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)

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 نظر گرفته شد.

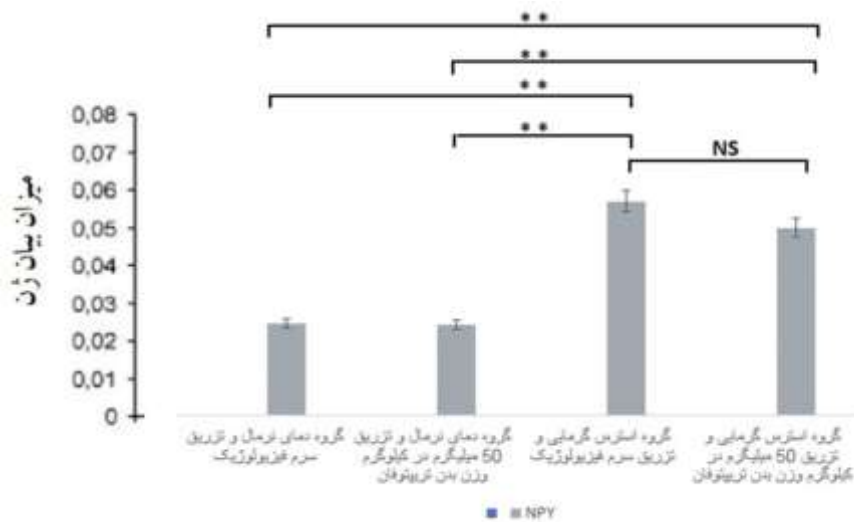
واکنش Real time PCR کمی نسبی: بعد از بهینه‌سازی دمای اتصال آغازگرها و بهینه سازی غلظت آغازگرها و سایر اجزاء واکنش نسبت به تکثیر قطعات اختصاصی ژن‌های مورد تحقیق اقدام شد.

کمی نمودن بیان ژن‌ها: با پایان انجام واکنش PCR، داده‌های اولیه توسط نرم افزار Excel تحت تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای تعیین میزان بیان ژن‌ها از روش پفاصل استفاده شد. در این روش فرض بر این است که بازده نمونه و کنترل داخلی برابر و ۱۰۰ درصد است و از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ 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



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



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

جدول ۴- میزان اخذ غذای تجمعی (میانگین \pm خطایاستاندارد) به نسبت وزن بدن بر حسب درصد، در گروه‌های مختلف مورد مطالعه، در زمانهای

۱، ۲، ۳، ۴ ساعت، (روش آماری ONE WAY ANOVA و تست تکمیلی LSD برای مقایسه داده‌ها در هر زمان بین گروه‌ها)

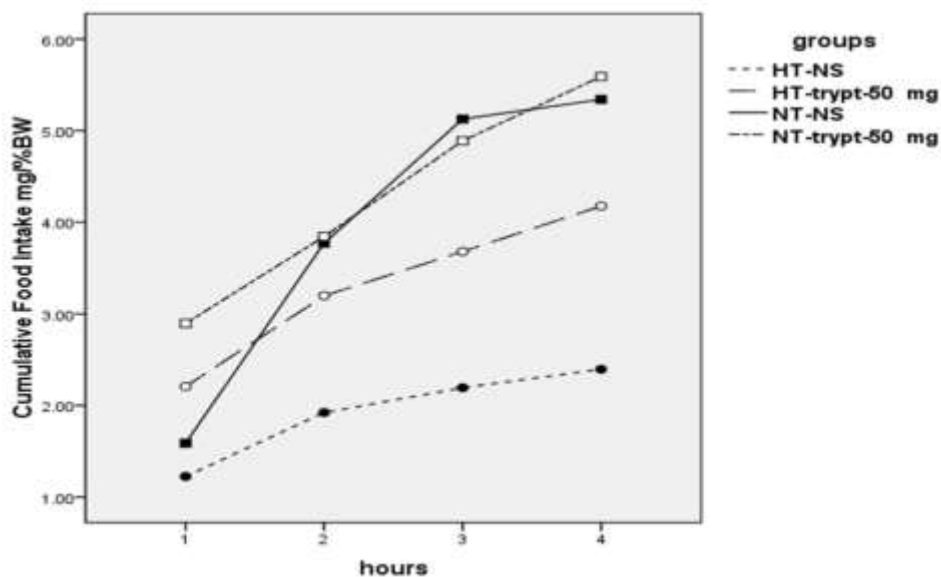
گروه‌ها	زمان	ساعت اول	ساعت دوم	ساعت سوم	ساعت چهارم
NT-NS		1/59 \pm 0/18	3/77 \pm 0/84	5/12 \pm 0/1	5/34 \pm 0/18
NT-Tryp		2/89 \pm 0/35	3/84 \pm 0/39	4/89 \pm 0/52	5/59 \pm 0/6
HT-NS		1/22 \pm 0/34	1/92 \pm 0/4	2/19 \pm 0/46	2/39 \pm 0/52
HT-Tryp		2/21 \pm 0/82	3/2 \pm 0/89	3/68 \pm 0/95	4/18 \pm 0/99

a.* دارای تفاوت معنادار بین گروه‌ها در هر ساعت

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 با این دو گروه تفاوت معنا دار مشاهده نمی شود (نمودار ۳ و جدول ۴).

نتایج بررسی میزان بیان ژن NPY: 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 ($P < 0.01$)، و میزان بیان این ژن در گروه استرس حرارتی بالاتر است. در بین دو گروه نرمال تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P \leq 0.05$). 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



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)

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 متابولیکی نمی توانند مانند شرایط

بحث

تغییرات در سطح بیان ژن CRH در مطالعه حاضر تأیید کننده القا استرس حرارتی می باشد. بطوریکه استرس 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 تأثیری 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 گرمایی 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 را سبب می

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 تأثیر 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 می شود (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 اسید آمینه ها بویژه تریپتوفان به همراه CRF به طور معنی داری اثرات استرس زایی CRF را سرکوب کرده و تأثیر 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 تأثیر 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 یافته ها بر تأثیر بافرینگ تریپتوفان بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال تأکید دارد.

بر بیان NPY، سبب افزایش اخذ غذا در زمان استرس حرارتی شده است.

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

نتیجه‌گیری

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 مقابله‌کننده با استرس در گروه‌های استرس حرارتی افزایش یافته است که احتمالاً تریپتوفان در این افزایش نقش دارد. بنابراین تجویز تریپتوفان در شرایط استرس حرارتی می‌تواند 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.

شود. در جوجه‌هایی که تحت استرس گرمایی قرار گرفتند بیان mRNA مربوط به ژن NPY در دیانسفال آنها نسبت به جوجه‌های کنترل بیشتر می‌شود. افزایش میزان آمینو اسیدها در سطح مغز جوجه‌ها در زمان استرس گرمایی نشان می‌دهد که احتمالاً متابولیسم آمینو اسیدها موجب تنظیم اشتها در زمان استرس گرمایی می‌شود (۱۸). بنابراین تجویز صفاقی تریپتوفان همانطور که نتایج مطالعه حاضر نشان داده، می‌تواند عاملی در جهت بهبود استرس و میزان اخذ غذا باشد.

اثرات آرامبخشی و ضد استرسی از تزریق کینورینیک اسید در جوجه‌های 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 می‌شود، که در آن NPY نقش کلیدی دارد. NPY در هسته ARC هیپوتالاموس توسط عوامل مختلف استرس زا تغییر می‌کند و پیشروی نوروهای NPY از ARC به امکان ارتباط متقابل سیستم NPY با محور HPA در جریان تنش را فراهم می‌کند. 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 موش‌های صحرایی‌نر تحت استرس انزوا افزایش می‌یابد. علاوه بر این، پس از یک دوره استرس محدود کننده ۳۰ دقیقه‌ای، مصرف غذا در موش‌های ماده فاقد ژن NPY در مقایسه با موش‌های ماده طبیعی کمتر است، که نشان می‌دهد 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 افزایش‌دهنده اخذ غذا، تفسیر کرد. از طرفی NPY خود به عنوان عامل مقابله‌کننده با استرس و عملکرد CRF و در کنار آن تاثیر مثبت تریپتوفان

نگارش مقاله: ل.ع

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

منابع

۱. بینا، ر.، حیدری، ر.، محمدزاده، م و ایلخانی پور، م.، ۱۳۹۸. تأثیر عصاره آبی گیاه آویشن (*Thymus vulgaris L.*) بر روی پارامترهای بیوشیمیایی خون و بافت کبدی در موش‌های صحرایی ماده تحت استرس بی حرکتی، مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۳۲، شماره ۱، صفحات ۱-۱۰.
۲. ولی زاده، م.، نجاتی، و.، شالیزار جلالی، ع.، نجدگرمی، ا. ح و نجفی، غ.، ۱۴۰۰. اثر پپتید زیست فعال مشتق از ماهی ساردین بر لوله‌های اسپرم ساز متعاقب القاء تنش حرارتی در موش صحرایی نر بالغ، مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۳۴، 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.
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: Agouti Related Peptide

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,