

بررسی بیان ژن‌های *HSPA2* و *HSPB1* در کبد مرغان بومی خراسان تحت تنش گرمایی حاد

- **رضا توحیدی** (نویسنده مسئول)
استادیار- مجتمع آموزش عالی تربت جام - دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی.
- **محمد رضا نصیری**
استاد- دانشگاه فردوسی مشهد- دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی.
- **علی جوادمنش**
استادیار- دانشگاه فردوسی مشهد- دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی.

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۹

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۵۱۵۲۵۴۷۰۴۱

Email: r.tohidi@tjamcaas.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2020.126865.1948

چکیده

دمای بالا یک فاکتور محیطی مهم در کاهش سود اقتصادی واحدهای پرورش طیور است، زیرا تاثیر منفی بر میزان رشد و تولید در پرند دارد. پروتئین‌های شوک گرمایی (HSPs) نقش کلیدی در مکانیسم دفاعی سلولی علیه گرمای محیط دارند. به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های *HSPA2* و *HSPB1* در کبد مرغان بومی خراسان تحت تنش گرمایی حاد، تعداد ۱۶ قطعه جوجه در سن ۴۲ روزگی به دو گروه شاهد (دمای °C ۲۵ و رطوبت ۵۰٪) و تیماری (دمای °C ۴۰ و ۴۲ و رطوبت ۵۰٪ به مدت ۲۴ ساعت) تقسیم شده و پس از کشتار از کبد آن‌ها نمونه برداری به عمل آمد. سپس میزان بیان ژن‌های *HSPA2* و *HSPB1* با روش RT-qPCR مورد ارزیابی قرار گرفت که فقط بیان ژن *HSPA2* نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$). آنالیز شبکه پروتئینی وجود برهم‌کنش پروتئینی بین *HSPA2* و *HSPB1* نشان‌دهنده وابستگی بر اساس آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های مذکور، چهار مسیر فرایند پروتئینی در شبکه آندوپلاسمی، بلوغ اووسیت وابسته به پروژسترون، مسیرهای پیام‌رسانی MAPK و VEGF بیشترین معنی‌داری را داشتند. نتایج آنالیز بیان ژن نشان داد که مرغان بومی خراسان توانایی مقاومت در برابر تنش گرمایی را دارند و نسبت به تنش گرمایی حاد واکنش ژنی نشان می‌دهند، و از طرفی ژن *HSPA2* توانایی بیان در این شرایط محیطی را به جهت حفظ ساختار پروتئینی درون سلولی دارد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین شوک گرمایی، تنش گرمایی، کبد، مرغ بومی خراسان.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 130 pp: 53-62

A study on the expression of HASPA2 and HSPB1 genes in the liver of Khorasan native chickens under acute heat stressBy: Reza Tohidi^{1*}, Mohammadreza Nasiri², Ali Javadmanesh³

1- Assistant professor- University of Torbat-e Jam- Faculty of Agriculture- Dept. of Animal Science

2- Professor, Ferdowsi University of Mashhad- Faculty of Agriculture- Dept. of Animal Science

3- Assistant professor, Ferdowsi University of Mashhad- Faculty of Agriculture- Dept. of Animal Science

Received: August 2019**Accepted: April 2020**

Heat stress is one of the main environmental factors causing economic losses to the poultry industry, as it reduces growth and production performance of chickens. The heat shock proteins (HSPs) involved in the key cellular defense mechanisms during exposure in hot environmental conditions. Elevated level of expression of HSPs helps to overcome the stress caused by high temperatures. The aim of this study was to evaluate the expression level of *HSPA2* and *HSPB1* transcripts in the liver of Khorasan native chickens under acute heat stress. Sixteen 42days old chickens were divided into two groups of control (25 °C and 50% humidity) and heat treated (40 and 42 °C, 50% humidity for 24h), and then the liver was sampled after killing. The transcription level of *HSPA2* and *HSPB1* was evaluated using RT-qPCR method. The *HSPA2* expression was significantly induced ($P<0.05$). However, the expression of *HSPB1* did not show any change. The analysis of protein-protein interaction revealed that *HSPA2* and *HSPB1* had no interaction, however, four pathways in gene ontology including Protein processing in endoplasmic reticulum, Progesterone-mediated oocyte maturation, MAPK signaling pathway and VEGF signaling pathway had the highest significancy. The results indicated that Khorasan native chickens have suitable genetic reaction to acute heat stress and *HSPA2* has the ability to express under high ambient temperature to protect the structure of cellular proteins.

Key words: heat stress, heat shock protein, Khorasan native chicken, liver.**مقدمه**

Duangjinda و همکاران، (۲۰۱۷)، مرغان بومی هرچند که از سطح تولید پایینی برخوردارند اما به عنوان یک سرمایه ملی و محصول استراتژیک جهت بهبود اقتصاد خانوارهای روستایی مطرح هستند (نصیری و رودباری، ۱۳۹۳). هنگامی که دمای محیط از دامنه مطلوب فراتر می‌رود، علائم تنش گرمایی شامل افزایش دمای بدن، کاهش مصرف خوراک، کاهش عملکرد رشد و تولید مثل، کاهش توانایی ایمنی و افزایش مرگ مشاهده می‌گردد (Sun و همکاران، ۲۰۱۵). نتایج برخی از مطالعات آسیب‌های بافتی قلب، کبد، و مغز در مرغان و موش‌های تحت تنش گرمایی حاد را نشان داده‌اند (Zhang و همکاران، ۲۰۱۴؛ Quinn و همکاران، ۲۰۱۵). همچنین، تنش گرمایی حاد باعث افزایش بیان ژن‌های پروتئین شوک گرمایی (HSPs) و TLRs

پرورش طیور یکی از مهمترین بخش‌های کشاورزی در دنیاست و سالانه هزاران تن گوشت در این بخش تولید می‌گردد که در نتیجه، توجه به آن از اهمیت اقتصادی برخوردار است. هرچند محیط‌هایی با دمای بالا اثرات منفی روی فیزیولوژی و تولید پرندگان داشته و در نهایت باعث کاهش تولید اقتصادی می‌گردد (Temim و همکاران، ۲۰۰۰؛ Xie و همکاران، ۲۰۱۴). مرغان تجاری سریع رشد می‌کنند و تولید بالایی دارند، ولی به دلیل متابولیسم سریع، پوشش پر و عدم وجود غدد عرق توانایی تنظیم گرمایی آن‌ها پایین است که باعث می‌شود نتوانند به خوبی به دمای بالا سازگار شوند (Huang, 2017). برعکس، مرغان بومی به محیطی که در آن زندگی می‌کنند سازگارند و به افزایش دما بیشتر مقاوم هستند (Soleimani و همکاران، ۲۰۱۱؛

هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان بیان ژن های HSPA2 و HSPB1 در مرغان بومی خراسان تحت تنش گرمایی حاد و ارزیابی توانایی سازگاری این نژاد به افزایش گرما است.

مواد و روش ها طراحی آزمایش

برای انجام این آزمایش، تعداد ۸۰ جوجه یک روزه از مرکز اصلاح نژاد مرغ بومی خراسان تهیه شد. جوجه ها در یک اتاق کنترل شده نگهداری شدند. دما ابتدا 29°C با رطوبت ۵۰ درصد بود و به تدریج از دما کاسته شد تا روز آزمایش که دما در 25°C و رطوبت ۵۰ درصد ثابت نگهداری شد. تعداد ۳۰ جوجه ماده در سن ۳۱ روزگی به اتاق های جداگانه ای با امکان کنترل دما و رطوبت منتقل شدند و برای پنج روز به محیط جدید عادت داده شدند (Lan و همکاران، ۲۰۱۶). از روز ۳۶ تا ۴۲ روزگی دمای محیط برای گروه تنش گرمایی هر روز 2°C افزایش یافت و در نهایت در روز ۴۲ برای ۱۲ ساعت در دمای 40°C و رطوبت ۵۰ درصد و ۱۲ ساعت نیز در دمای 42°C تنظیم شد. دما برای گروه شاهد 25°C و رطوبت ۵۰ درصد ثابت ماند. طی دوره نگهداری، در طول روز دو ساعت خاموشی برای هر گروه اعمال شد و دسترسی به آب و غذا اختیاری بود. محتوای انرژی و پروتئین جیره برای هر دو گروه شاهد و تیمار ثابت و برای جیره استارتر شامل ۲۲/۵ درصد پروتئین خام و ۳۰۰۰ کیلو کالری انرژی قابل متابولیسم تا دو هفته و برای جیره پیش دان شامل ۲۱ درصد پروتئین خام و ۲۹۶۰ کیلو کالری انرژی قابل متابولیسم تا پایان آزمایش بود (جدول ۱). سپس تعداد هشت قطعه جوجه از هر گروه برای برداشتن نمونه کبد با روش قطع سر کشته، و نمونه برداری شدند. نمونه های کبد فوراً در ازت مایع منجمد شدند و تا استخراج RNA در فریزر 80°C - نگهداری شدند.

می گردد (Ju و همکاران، ۲۰۱۴؛ Richter و همکاران، ۲۰۱۵). مکانیسم سازگاری به تنش گرمایی تحت تاثیر عوامل مختلفی است. توانایی در ایجاد هومئوستازی با تغییر بیان ژن باعث جبران آسیب های برون سلولی شده و می تواند شرایط فیزیولوژیکی بدن را پس از بازگشت به ناحیه دمایی مناسب، متعادل سازد (Causton و همکاران، ۲۰۰۱؛ Xie و همکاران، ۲۰۱۴). نتایج مطالعات روی مخمر نشان داده اند که بیش از ۵۰۰ ژن در اولین ۱۰ دقیقه مواجهه با گرما فعال می شوند (Capaldi و همکاران، ۲۰۰۸؛ Miller و همکاران، ۲۰۱۱). در این میان، پروتئین های شوک گرمایی بخش اصلی دفاعی علیه تنش گرمایی هستند (Gasch و همکاران، ۲۰۰۰). این پروتئین ها گروهی از پروتئین های تنظیمی هستند که توسط بسیاری از ارگانیسم ها در پاسخ به تنش گرمایی تولید می شوند. افزایش بیان HSP ها، نوعی سیستم حمایتی پروتئینی از ارگانیسم در برابر اثرات مضر گرماست (Staub و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین، بسیاری از HSP ها نقش حفاظتی درون سلولی برای سایر پروتئین ها دارند و موجب اصلاح ساختار پروتئین های آسیب دیده می شوند (Rimoldi و همکاران، ۲۰۱۵). بیان پروتئین HSPA2 با وزن مولکولی ۷۰ کیلو دالتون (HSP70-2) در مرغان گوشتی تحت تنش گرمایی به سرعت افزایش یافت (Xu و همکاران، ۲۰۱۸). گروهی از HSP ها با وزن مولکولی ۱۲ تا ۴۲ کیلو دالتون تحت عنوان HSP های کوچک نام گذاری شده اند که بر خلاف سایر مولکول های HSP می توانند نقش مراقبتی خود در ترمیم پروتئین ها را بدون وجود ATP انجام دهند. فعالیت این نوع HSP ها در شرایط وجود تنش و همچنین رشد و توسعه بافتی افزایش می یابد (Saretzki و همکاران، ۲۰۰۸). مطالعات زیادی در زمینه بیان ژن ها در پستانداران و مرغان گوشتی تحت تنش گرمایی انجام گرفته است (Cedraz و همکاران، ۲۰۱۷). بنابراین،

جدول ۱- محتوای جیره مورد استفاده در طول آزمایش

ترکیب جیره	استارتر	پیشدان
انرژی قابل متابولیسم (Kcal/Kg)	۳۰۰۰	۲۹۶۰
پروتئین (%)	۲۲/۵	۲۱
کلسیم (%)	۱	۱
فسفر (%)	۰/۵۵	۰/۵۰
لیزین (%)	۱/۳	۱/۲
متیونین (%)	۰/۵۵	۰/۵۲

استخراج RNA و کنترل کمیت و کیفیت آن

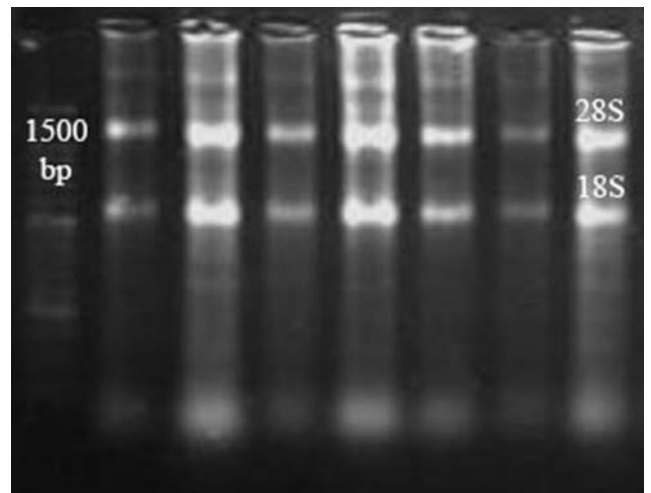
برای استخراج RNA کل از تعداد ۱۶ نمونه بافت کبد، از کیت استخراج RNA (SIGMA) Trizol استفاده شد و استخراج بر اساس پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. سپس غلظت و کیفیت RNA با طیف سنج (Microplate reader, Epoch, USA) با سنجش جذب نوری در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر انجام گرفت. به علاوه، شکستگی RNA با مشاهده باندهای ۲۸S و ۱۸S ریبوزومی روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد رنگ آمیزی شده توسط ژلرد (GelRed) بررسی شد (شکل ۱).

نسخه برداری معکوس RNA

برای تولید cDNA از RNA استخراج شده، از کیت تجاری (ThermoFisher, USA) استفاده شد. ۵ میکروگرم از RNA کل با یک میکرولیتر پرایمر Oligo (dT) مخلوط شد و به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفت. سپس ۴ میکرولیتر بافر ۵X، ۳/۲ میکرولیتر MgCl₂، یک میکرولیتر dNTP، یک میکرولیتر آنزیم ترنسکریپتاز معکوس به مخلوط اضافه شد و حجم واکنش با آب خالص به حجم ۲۰ میکرولیتر رسید. ابتدا همگرایی در دمای ۲۵°C به مدت پنج دقیقه انجام شد و سپس مرحله گسترش در دمای ۴۲°C به مدت یک ساعت و در نهایت غیر فعال شدن آنزیم در دمای ۷۰°C به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. محصول cDNA حاصل برای مرحله بعدی در دمای ۲۰°C- نگه‌داری شد.

RT-qPCR

برای انجام واکنش RT-qPCR از محلول سایبرگرین (ThermoFisher, USA) و دستگاه ABI (7300) استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. هر واکنش در دو تکرار انجام گرفت و برای تعیین راندمان واکنش، منحنی استاندارد با توجه به انجام واکنش در غلظت‌های مختلف رسم شد. همچنین کنترل منفی برای واکنش‌ها در نظر گرفته شد. شرایط واکنش به شرح زیر بود: واسرشت اولیه در ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۴۰ چرخه با دمای ۹۵°C در مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشت، اتصال در دمای ۶۲°C برای ۳۰ ثانیه



شکل ۱- باندهای RNA ریبوزومی روی ژل آگاروز ۱/۵٪

اختصاصی با ایجاد منحنی ذوب (Dissociation curve) مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۲). میزان بیان ژن های HSPA2 و HSPB1 در این مطالعه در محدوده بین ۱۶ تا ۲۷ سیکل مطابق گزارش Cedraz و همکاران (۲۰۱۷) بود. متوسط میزان بیان این ژن ها در گروه تحت تنش گرمایی نسبت به گروه شاهد به ترتیب ۶/۰۵ و ۲/۷۶ برابر برآورد شد که نشان می دهد HSPA2 از میزان بیان نسبتاً بالایی در شرایط تنش گرمایی حاد برخوردار است. مقایسه مقادیر بیان ژن های HSPA2 و HSPB1 بین دو گروه شاهد و تحت تنش گرمایی نشان داد که بیان HSPA2 تحت شرایط تنش گرمایی به طور معنی داری ($P < 0.05$) افزایش یافت (شکل ۳ و ۴). دمای بالای محیط می تواند موجب آسیب های متعددی به تولید دام های اهلی، به ویژه طیور شود. فاکتورهای فیزیولوژیکی متعددی وجود دارند که علاوه بر روش های تکنولوژیکی می توانند باعث کاهش اثر گرما بر حیوان شوند. افزایش دمای محیط باعث افزایش بیان ژن های مرتبط با همئوستازی مانند فاکتورهای شوک گرمایی و پروتئین های شوک گرمایی و کاهش بیان ژن های کمتر ضروری می شود (De Nadal و همکاران، ۲۰۱۱). پروتئین های شوک گرمایی در پاسخ به افزایش دما و بعضی عوامل دیگر مانند عفونت میکروبی، سرطان ها و آسیب های ژنتیکی تولید می شوند (Ali و همکاران، ۱۹۹۱). اگرچه در این مطالعه میزان بیان HSPA2 نسبت به HSPB1 تحت تنش گرمایی بیشتر بود ولی اختلاف آن ها معنی دار نشد (شکل ۵). پروتئین های شوک گرمایی توسط عوامل تنش زا به خصوص گرما، بیان می شوند. نتایج مطالعات مختلف وجود تفاوت بیان این ژن ها را بین گروه های تحت تنش گرمایی و شاهد نشان داده است. ژن های HSP90 α ، HSP60 و HSP70 در کبد مرغان گوشتی رنگی تحت تنش گرمایی مزمین افزایش بیان نشان دادند (Vinoth و همکاران، ۲۰۱۵). هرچند، ژن های HSP70، HSP60 و HSP40 در مطالعه Kang و همکاران (۲۰۱۹) روی کبد مرغان گوشتی راس تحت تنش گرمایی مزمین، کاهش بیان داشتند. همچنین، بیان ژن های HSP70 و HSP90 در مرغان بومی نسبت به نژاد تجاری کاب تحت تنش گرمایی

و گسترش در دمای ۷۲°C برای ۳۰ ثانیه انجام شد. همچنین، رسم منحنی ذوب مطابق پروتکل نرم افزار دستگاه ABI (7300) صورت پذیرفت. مقدار Ct واکنش با استفاده از رابطه زیر برای آنالیز آماری تصحیح شد (Coble و همکاران، ۲۰۱۴):

$$40 - [(sample\ mean\ Ct) + (median\ GAPDH\ Ct - mean\ GAPDH\ Ct) \times (sample\ gene\ slope / GAPDH\ slope)]$$

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از RT-qPCR از نرم افزار SAS[®] 9.0 استفاده شد. با توجه به آن که یک گروه تیمار و یک گروه شاهد وجود داشت، C_T خروجی دستگاه به 2^{-C_T} تبدیل شد (Livak and Schmittgen, 2001) و سپس میانگین دو گروه شاهد و تیمار با آزمون t استیودنت مورد مقایسه قرار گرفت. همچنین، میزان بیان دو ژن هدف به صورت 2^{- $\Delta\Delta C_T$} مورد مقایسه قرار گرفت (Livak and Schmittgen, 2001).

آنالیز هستی شناسی ژن ها

برای بررسی هستی شناسی ژن ها از پایگاه داده STRING (www.string-db.org) استفاده شد. پس از ورود ژن ها به این بانک داده، اطلاعات مربوط به فعالیت های بیولوژیکی ژن ها مورد پردازش قرار گرفت. این پایگاه با اتصال به پایگاه های دیگر مانند GO و KEGG به بررسی عملکردی و مسیرهای متابولیکی ژن ها می پردازد. مسیرهای با مقدار $P < 0.05$ که با روش FDR خطای چند تستی تصحیح شده بودند، به عنوان معنی داری آزمون در نظر گرفته شدند.

نتایج و بحث

قبل از انجام بررسی بیان ژن، راندمان واکنش PCR بررسی شد. دمای مطلوب اتصال برای همه پرایمرها ۶۲°C تعیین شد. شیب منحنی استاندارد بین ۳/۱- تا ۳/۲- با ضریب تعیین (R²) ۹۸ درصد بود. اختصاصی بودن پرایمرها و عدم تشکیل باندهای غیر

مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با تنظیم سلولی و پروتئینی در شرایط تنش گرمایی فعال می‌شوند (جدول ۳). در بین مسیرهای بیولوژیکی KEGG، سه مسیر از اهمیت بالایی برخوردار بودند. مسیر Protein processing in endoplasmic reticulum در تنظیم ساخت پروتئین‌های سالم و حذف پروتئین‌های با ساختار نادرست دخالت دارد. پروتئین‌هایی که در شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار ساخته می‌شوند توسط پروتئین‌های کمکی BiP درون شبکه که عضوی از خانواده HSP70 هستند، دارای ساختار تاخورد شده و آماده انتقال به دستگاه گلژی می‌شوند. پروتئین‌هایی که ساختار صحیحی نداشته باشند درون شبکه آندوپلاسمی باقی مانده و توسط پروتئین‌های BiP به سمت تجزیه از طریق پروتئوزوم طی فرایندی به نام "تجزیه به کمک شبکه آندوپلاسمی" هدایت می‌شوند (Whiteley و Betenbaugh، ۲۰۰۳). تجمع پروتئین‌های آسیب دیده در شبکه آندوپلاسمی (ER) باعث ایجاد تنش سلولی می‌گردد و با فعال شدن سیستم پاسخ شوک گرمایی (HSR) بار تنش کم می‌شود (Liu و Chang، ۲۰۰۸). اگر شرایط حادثر باشد و سیستم حفاظتی قادر به حفظ شبکه آندوپلاسمی نباشد، سلول طی فرایند آپوپتوزیز می‌میرد (Whiteley و Betenbaugh، ۲۰۰۳). در فرایند تجزیه پروتئین، پروتئین‌های HSP40، HSP70 و HSP90 نقش دارند (شکل ۶). HSP‌های با وزن مولکولی پایین مانند HSPB1 در این مسیر بیولوژیکی حضور ندارند. پروتئین HSPB1 در دو مسیر MAPK signaling pathway و VEGF signaling pathway حضور فعالی دارد که هر دو مسیر به طور آبشاری بسیاری از فعالیت‌های سلولی مانند تکثیر، تمایز و انتقال سلولی را کنترل می‌کنند (شکل ۷ و ۸). مسیر پیام‌رسان VEGF برای عملکرد سلول‌های اندوتلیال ضروری است و باعث تکثیر، مهاجرت و ادامه حیات سلولی و تشکیل رگ‌های خونی جدید می‌شود (Abhinand و همکاران، ۲۰۱۶). فعال شدن مسیر پیام‌رسان MAPK و وجود HSP27 برای تغییر ساختاری اکتین و مهاجرت سلولی ضروری است (Golan و همکاران، ۲۰۱۴).

افزایش نشان داده است (Cedraz و همکاران، ۲۰۱۷). نژاد کاب نسبت به نژاد بومی حساسیت بیشتری به گرما نشان داده است. نژادهای تجاری برای صفات تولیدی انتخاب شده‌اند و به آب و هوای گرم سازگاری ندارند. در مقابل، نژادهای بومی به شرایط محیطی اطراف خود بیشتر سازگارند و توانایی تحمل گرمایی بیشتری دارند (Cedraz و همکاران، ۲۰۱۷). تفاوت نتایج مطالعات مختلف می‌تواند به علت شرایط متفاوت آزمایش، محیط، گونه و نژادهای مختلف باشد (Kang و همکاران، ۲۰۱۹). افزایش بیان دو ژن *HSPA2* و *HSPB1* در مرغان بومی خراسان تحت تنش گرمایی می‌تواند دلیلی بر توانایی مناسب این نژاد در تحمل گرما باشد. به علاوه آن که تلفاتی در اثر گرما مشاهده نشد. بیان ژن *HSP70* تحت تنش‌های فیزیولوژیکی، بیماری و محیطی افزایش یافته است (Figueiredo و همکاران، ۲۰۰۷)، و می‌تواند توسط هورمون‌ها نیز تنظیم شود (Ogata و همکاران، ۲۰۰۵). هر چند، تنظیم بیان *HSP70* به نوع بافت نیز ارتباط دارد. تزریق لپتین موجب کاهش بیان *HSP70* در کبد و هیپوتالاموس جوجه‌های گوشتی شد ولی تأثیری بر بیان ژن در عضله آن‌ها نداشت (Figueiredo و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین، پروتئین *HSP70* می‌تواند روی گیرنده‌های هورمونی اثر داشته باشد. افزایش بیان *HSP70* در کبد موش‌های تحت تنش گرمایی باعث افزایش گیرنده‌های هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی شد (Cvoro و همکاران، ۱۹۹۸). پروتئین شوک گرمایی ۷۰ مانند یک سنسور گرمایی سلولی عمل می‌کند و ممکن است تنها به افزایش دما و تخریب پروتئین‌ها پاسخ دهد (Figueiredo و همکاران، ۲۰۰۷). خانواده پروتئین‌های کوچک شوک گرمایی (HSPs) مانند *HSP25* در شرایط تنش گرمایی و تنش‌های شیمیایی بیان می‌شوند. حتی در مراحل اولیه بلاستودرم جنین طیور، بیان *HSP25* و *HSP30CL* گزارش شده است (Hwang و همکاران، ۲۰۱۶). همچنین کاهش بیان *HSP25* در بلاستودرم باعث کاهش توانایی تمایز سلولی می‌گردد و مرگ سلولی افزایش می‌یابد (Hwang و همکاران، ۲۰۱۶). بررسی مسیرهای بیولوژیکی در STRING نشان داد که اغلب

عملکردهای مولکولی از هستی‌شناسی ژن که در این مطالعه مشاهده شد توسط Sun و همکاران (۲۰۱۵) نیز گزارش شده بود. ایجاد شبکه ژنی برای ژن‌های با بیان بالا در مرغان گوشتی تحت تأثیر تنش گرمایی شدید، وجود برهم‌کنش بین ژن‌های HSP و ژن‌های ایمنی را نشان داد، در حالی که بیشتر ژن‌های HSP و ایمنی افزایش بیان داشتند (Lan و همکاران، ۲۰۱۶). هر دو ژن مورد بررسی در مطالعه حاضر تحت تنش گرمایی افزایش بیان نشان دادند هرچند، افزایش بیان ژن HSPB1 معنی‌دار نبود و بیان ژن HSPA2 در سطح اطمینان ۰/۰۵ معنی‌دار شد که می‌تواند نشان دهد پاسخ این ژن‌ها در تنش گرمایی حاد شدید نیست، ولی ممکن است در تنش گرمایی بلند مدت افزایش بیان شدید داشته باشند، ضمن آن که طیور بومی به تغییرات دمایی مقاومت بیشتری نشان می‌دهند (Cedraz و همکاران، ۲۰۱۷). لاین‌های سلولی و بافت‌های مختلف پاسخ‌های متفاوتی به گرما می‌دهند. مجموعه این پاسخ‌ها بستگی به ترکیب عوامل متعددی شامل ترکیب ژنتیکی گونه هدف، تغییرات ژنومی ناشی از تنش‌های محیطی گذشته و وضعیت تنش گرمایی فعلی دارد (Sonna و همکاران، ۲۰۰۲).

در بخش فرایندهای بیولوژیکی هستی‌شناسی ژنی، پنج فرایند برای ژن HSPA2 و فرایند Protein kinase binding برای ژن HSPB1 دارای $FDR < 0.01$ بودند (جدول ۴). همان‌طور که مشاهده می‌گردد ژن HSPA2 در بیشتر فرایندهای برهم‌کنشی با ترکیبات حلقوی مانند اسیدهای نوکلئیک، ویتامین‌ها، ATP و پروتئین‌های آسیب دیده دخالت دارد. در مقابل ژن HSPB1 تنها در یک مسیر مربوط به برهم‌کنش با آنزیم‌های انتقال‌دهنده یک گروه فسفات از معمولاً ATP به یک پروتئین دخالت دارد. از آنجا که HSPA2 در گروه پروتئین‌های شوک گرمایی با وزن مولکولی بالا و HSPB1 در گروه پروتئین‌های با وزن مولکولی پایین (HSP20) است، این می‌تواند دلیلی بر عدم دخالت این دو پروتئین در فعالیت‌های بیولوژیکی یکدیگر باشد. در مطالعه Lan و همکاران (۲۰۱۶) پروتئین‌های شوک گرمایی با وزن مولکولی بالای ۷۰ در شبکه پروتئینی ناشی از ایجاد تنش گرمایی بر بیان ژن‌های کبد جوجه‌های گوشتی حضور داشتند. در حالی که تفاوت بیان ژن‌های HSP در مطالعه Coble و همکاران (۲۰۱۴) مشاهده نشد. دلیل این تفاوت بیان ژن‌ها و حضور فعال ژن‌های مختلف مربوط به تفاوت در نحوه ایجاد تنش گرمایی و تفاوت نژاد در مطالعات مختلف است (Sun و همکاران، ۲۰۱۵).

جدول ۲- توالی آغازگر برای واکنش RT-qPCR

نام ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگر	طول قطعه
HSPA2	NM_001006685.1	F: CAAGAACCAAGTGGCAATGAA R: CATACTTGCGCCGATGAGA	72
HSPB1	NM_205290.1	F: CGATGGGATGCTGACAGTG R: TACTTCTTGGCTGGTTCTTCC	114
GAPDH	NM_204305.1	F: CATCACAGCCACACAGAAGA R: TGACTTTCACAGCCTTA	124

جدول ۳- مسیرهای بیولوژیکی معنی دار (FDR < 0.01) در پایگاه داده KEGG

مسیر	نام	ژن	FDR
gga04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	HSPA2	2.21e-07
gga04914	Progesterone-mediated oocyte maturation	HSPA2	0.0055
gga03040	Spliceosome	HSPA2	0.0074
gga05164	Influenza A	HSPA2	0.0075
gga04144	Endocytosis	HSPA2	0.0187
gga04010	MAPK signaling pathway	HSPB1	1.06e-09
gga04370	VEGF signaling pathway	HSPB1	2.20e-09
gga05164	Influenza A	HSPB1	0.00044
gga04218	Cellular senescence	HSPB1	0.00044
gga04622	RIG-I-like receptor signaling pathway	HSPB1	0.0019

جدول ۴- مسیرهای معنی دار (FDR < 0.01) در بخش عملکرد مولکولی (MF) هستی‌شناسی ژن (GO)

کد هستی‌شناسی	نام مسیر	ژن	FDR
GO:1901363	heterocyclic compound binding	HSPA2	0.00059
GO:0097159	organic cyclic compound binding	HSPA2	0.00059
GO:0051082	unfolded protein binding	HSPA2	0.00059
GO:0043167	ion binding	HSPA2	0.00059
GO:0005524	ATP binding	HSPA2	0.00059
GO:0019901	Protein kinase binding	HSPB1	0.0142

نتیجه‌گیری

در این تحقیق نشان داده شد که کبد مرغان بومی خراسان در بیان ژن‌های شوک گرمایی توانایی مناسبی دارد. با توجه به نقش حیاتی این پروتئین‌ها در حفظ ثبات پروتئین‌های سلولی و همچنین عدم وجود تلفات چنین نتیجه‌گیری می‌گردد که مرغان بومی خراسان توانایی لازم برای تحمل شرایط گرمایی حاد را دارند. از این توانایی می‌توان در بالا بردن ظرفیت سازگاری دمایی مرغان تجاری و همچنین توسعه لاین‌های بومی مقاوم استفاده کرد. هر چند تجزیه و تحلیل RNA-seq اطلاعات زیادی در خصوص نحوه عملکرد ژن‌های مختلف، برهم‌کنش آن‌ها و سیستم‌های بیولوژیک مختلف به دست می‌دهد که بر اساس این اطلاعات می‌توان تصمیم‌گیری‌های بهتری برای برنامه‌های انتخاب ژنتیکی انجام داد. بنابراین، انجام مطالعات تکمیلی با استفاده از فن‌آوری‌های با خروجی زیاد و همچنین مطالعه فاکتورهای فیزیولوژیکی و مقایسه بیان تفریقی ژن‌ها در نژادهای بومی و

تجاری تحت تنش گرمایی بلند مدت ضروری است.

سپاسگزاری

این طرح به شماره مصوب TP13947 با حمایت مالی مجتمع آموزش عالی تربت جام انجام پذیرفت. همچنین، از گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد جهت فراهم نمودن امکانات فنی اجرای طرح کمال تشکر و قدردانی انجام می‌پذیرد.

منابع

- نصیری، م.ر. و رودباری، ز. (۱۳۹۳). تجزیه و تحلیل ژنتیکی ناحیه سیتوکروم b در مرغ بومی خراسان. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*. ۶: ۱۹۸-۱۸۹.
- Abhinand, C.S., Raju, R., Soumya, S.J., Arya, P.S., Sudhakaran, P.R. (2016). VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *Journal of cell communication and signaling*. 10: 347-354.

- Ali, N. and Banu, N. (1991). Heat Shock Proteins: Molecular Chaperones. *Biochemical Education*. 19: 166-172.
- Capaldi, A.P., Kaplan, T., Liu, Y., Habib, N., Regev, A., Friedman, N., et al. (2008). Structure and function of a transcriptional network activated by the MAPK Hog1. *Nature Genetics*. 40:1300-6.
- Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T., Kanin, E., Jennings, E.G., et al. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*. 12: 323-337.
- Cedraz, H., Gromboni, J.G.G., Garcia, A.A.P.J., Farias Filho, R.V., Souza, T.M., et al. (2017). Heat stress induces expression of HSP genes in genetically divergent chickens. *PLOS ONE* 12: e0186083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186083>.
- Coble, D.J., Fleming, D., Persia, M.E., Ashwell, C.M., Rothschild, M.F., Schmidt, C.J., Lamont, S.J. (2014). RNA-seq analysis of broiler liver transcriptome reveals novel responses to high ambient temperature. *BMC Genomics*. 15:1084.
- Cvoro, A., Dundjerski, J., Trajkovic, D., Matic, G. (1998). Heat stress affects the glucocorticoid receptor interaction with heat shock protein Hsp70 in the rat liver. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 46: 63-70.
- De Nadal, E., Ammerer, G., Posas, F. (2011). Controlling gene expression in response to stress. *Nature Reviews Genetics*. 12: 833-45.
- Duangjinda, M., Tunim, S., Duangdaen, C., Boonkum, W. (2017). Hsp70 genotypes and heat tolerance of commercial and native chickens reared in hot and humid conditions. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 19: 7-18.
- Figueiredo, D., Gertler, A., Cabello, G., Decuyper, E., Buyse, J., Dridi, S. (2007). Leptin downregulates heat shock protein-70 (HSP-70) gene expression in chicken liver and hypothalamus. *Cell Tissue Research*. 329: 91-101.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., et al. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*. 11: 4241-57.
- Golan, S., Entin-Meer, M., Semo, Y., Maysel-Auslender, S., Mezaad-Koursh, D., Keren, G., et al. (2014). Gene profiling of human VEGF signaling pathways in human endothelial and retinal pigment epithelial cells after anti VEGF treatment. *BMC research notes*. 7: 617.
- Huang, S. (2017). Upregulation of TLR4 mRNA expression levels in broiler chickens under acute heat stress. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 19: 87-94.
- Hwang, Y.S., Ko, M.H., Kim, Y.M., Park, Y.H., Ono, T., Han, J.Y. (2016). The avian-specific small heat shock protein HSP25 is a constitutive protector against environmental stresses during blastoderm dormancy. *Scientific Reports*. 6: 36704.
- Ju, X.H., Xu, H.J., Yong, Y.H., An, L.L., Jiao, P.R., Liao, M. (2014). Heat stress upregulation of toll-like receptors 2/4 and acute inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of bama miniature pigs: an in vivo and in vitro study. *Animal*. 8: 1462-1468.
- Kang, D., Park, J., Shim, K. (2019). Heat Treatment at an Early Age Has Effects on the Resistance to Chronic Heat Stress on Broilers. *Animals (Basel)*, 9(12).
- Lan, X., Hsieh, J.C.F., Schmidt, C.J., Zhu, Q., Lamont, S.J. (2016). Liver transcriptome response to hyperthermic stress in three distinct chicken lines. *BMC Genomics*. 17: 955.
- Liu, Y., and Chang, A. (2008). Heat shock response relieves ER stress. *The EMBO journal*. 27: 1049-1059.
- Miller, C., Schwalb, B., Maier, K., Schulz, D., Du'mcke, S., Zacher, B., et al. (2011). Dynamic transcriptome analysis measures rates of mRNA synthesis and decay in yeast. *Molecular Systems Biology*. 7:458.
- Ogata, T., Oishi, Y., Roy, R.R., Ohmori, H. (2005). Effects of T3 treatment on HSP72 and calcineurin content of functionally overloaded rat plantaris muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 331: 1317-1323.

- Quinn, C.M., Audet, G.N., Charkoudian, N., Leon, L.R. (2015). Cardiovascular and thermoregulatory dysregulation over 24 h following acute heat stress in rats. *American Journal of Physiology Heart & Circulatory Physiology*. 309: 91-95.
- Richter, C., Viergutz, T., Schwerin, M., Weitzel, J.M. (2015). Prostaglandine synthase interacts with inducible heat shock protein 70 after heat stress in bovine primary dermal fibroblast cells. *Cytometry Part A*. 87: 61-67.
- Rimoldi, S., Lasagna, E., Sarti, F.M., Marelli, S.P., Cozzi, M.C., Bernardini, G., and Terova, G. (2015). Expression profile of six stress-related genes and productive performances of fast and slow growing broiler strains reared under heat stress conditions, *Meta Gene*. 6: 17-25.
- Roushdy, E.M., Zagloul, A.W., El-Tarabany, M.S. (2018). Effects of chronic thermal stress on growth performance, carcass traits, antioxidant indices and the expression of HSP70, growth hormone and superoxide dismutase genes in two broiler strains. *Journal of Thermal Biology*. 74: 337-343.
- Sonna, L.A., Fujita, J., Gaffin, S.L., Lilly, C.M. (2002). Invited review: effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *The Journal of Applied Physiology*. 92: 1725-1742.
- Saretzki, G., Walter, T., Atkinson, S., Passos, J.F., Bareth, B., Keith, W.N., Stewart, R., Hoare, S., Stojkovic, M., Armstrong, L., von Zglinicki, T., Lako, M. (2008). Downregulation of multiple stress defense mechanisms during differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 26: 455-464.
- Soleimani, A.F., Zulkifli, I., Omar, A.R., Raha, A.R. (2011). Physiological responses of 3 chicken breeds to acute heat stress. *Poultry Science*. 90: 1435-40.
- Staib, J.L., Quindry, J.C., French, J.P., Criswell, D.S., Powers, S.K. (2007). Increased temperature, not cardiac load, activates heat shock transcription factor 1 and heat shock protein 72 expression in the heart. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 292: 432-439.
- Sun, L., Lamont, S.J., Cooksey, A.M., McCarthy, F., Tudor, C.O., Vijay-Shanker, K., et al. (2015). Transcriptome response to heat stress in a chicken hepatocellular carcinoma cell line. *Cell Stress & Chaperones*. 20: 1-12.
- Temim, S., Chagneau, M., Peresson, R., Tesseraud, S. (2000). Chronic heat exposure alters protein turnover of three different skeletal muscles in finishing broiler chickens fed 20 or 25% protein diets. *The Journal of Nutrition*. 130: 813-9.
- Vinoth, A., Thirunalasundari, T., Tharian, J.A., Shanmugam, M., Rajkumar, U. (2015). Effect of thermal manipulation during embryogenesis on liver heat shock protein expression in chronic heat stressed colored broiler chickens. *Journal of Thermal Biology*. 53: 162-171.
- Whiteley, E.M. and Betenbaugh, M.J. (2003). Protein processing, processing in the Endoplasmic Reticulum and Golgi network. In *Encyclopedia of Cell Technology*, R.E. Spier (Ed.). doi:10.1002/0471250570.spi095.
- Xie, J., Tang, L., Lu, L., Zhang, L., Xi, L., Liu, H.C., Odle, J., Luo, X. (2014). Differential Expression of Heat Shock Transcription Factors and Heat Shock Proteins after Acute and Chronic Heat Stress in Laying Chickens (*Gallus gallus*). *PLoS One*. 29: 9:e102204. doi: 10.1371/journal.pone.0102204. eCollection.
- Xu, Y., Lai, X., Li, Z., Zhang, X., Luo, Q. (2018). Effect of chronic heat stress on some physiological and immunological parameters in different breed of broilers. *Poultry Science*. 97: 4073-4082.
- Zhang, W.W., Kong, L.N., Zhang, X.Q., Luo, Q.B. (2014). Alteration of HSF3 and HSP70 mRNA expression in the tissues of two chicken breeds during acute heat stress. *Genetics and Molecular Research*. 13: 9787-9794.