

Research Paper

Analyzing the Transcript Response of Broiler Hypothalami under Thermal Stress and Investigating the Protein Network and Signaling Pathways

Zahra Roudbari¹ , Saideh Eskandari Nesab², Mohammadreza Mohammadabadi³ and Morteza Mokhtari¹

1- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Jiroft University, Jiroft, Iran,
(Corresponding author: Roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir)

2- Ph.D. student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran

3- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Received: 5 May, 2023

Accepted: 25 December, 2023

Extended Abstract

Background: Using genetic enhancement techniques has led to the development of poultry capable of fulfilling significant portions of human dietary requirements through meat and egg production. Maximizing genetic potential necessitates the provision of conducive environmental conditions. Heat stress poses a substantial challenge within the poultry sector, detrimentally impacting poultry production and growth, thereby diminishing breeders' economic returns. Adaptation to heat stress is contingent upon a multitude of factors. The capacity to establish homeostasis through alterations in gene expression serves to mitigate extracellular damage and restore physiological equilibrium upon reversion to favorable temperature ranges. Domestic birds thrive within a temperature spectrum of 18-24 °C, with any deviation beyond this range precipitating elevated mortality rates. Elevated mortality is attributed to heat-induced suppression of the immune system and compromised resilience. Moreover, heat stress amplifies the secretion of the corticotropin-releasing hormone, subsequently elevating blood corticosterone levels, thereby instigating molecular alterations under stress conditions. Hence, a comprehensive examination of this challenge from diverse perspectives holds significant promise. Consequently, the present study endeavors to delineate protein complexes and pivotal signaling pathways regulated by distinct genes expressed in response to heat stress within the hypothalamus of broiler chickens.

Methods: The systemic response of chickens' hypothalamus transcripts to heat stress was comprehensively examined in this investigation. Transcript expression profiles from eight chicken hypothalamus tissues, including four subjected to thermal stress and four under non-stress conditions, were retrieved from the GEO database (accession number GSE37400). The raw microarray data underwent rigorous quality control measures and normalization using GEO2R software to ensure reliability and consistency. Genes with discernible expression changes were identified based on a stringent criterion of P-value > 0.05 and (LogFC < 0.5-0.5). Subsequently, a gene expression regulatory network was constructed to elucidate the interplay among genes implicated in broiler heat stress, employing Cytoscape software in conjunction with the STRING database. The network visualization facilitated the identification of protein clusters, representing areas of high density, which were further analyzed using the CytoCluster plugin renowned for its efficacy in detecting such densely interconnected regions. Following the delineation and characterization of genes within these clusters, the DAVID database was utilized to elucidate the relevant biological pathways associated with the identified genes. This comprehensive approach enabled a detailed exploration of the molecular mechanisms underlying the hypothalamic response to heat stress in chickens.

Results: The analysis of microarray data unveiled a comprehensive portrait of the molecular response to heat stress in chickens. Among the 43,607 initially examined probes, 593 differentially expressed genes were identified after rigorous curation involving the elimination of duplicate genes and application of a significance threshold. A network encompassing 149 genes with a minimum interaction score of 0.4 was constructed utilizing the STRING software, shedding light on the intricate interplay among these genes. Subsequent investigations honed in on genes exerting significant regulatory effects in response to heat stress, elucidating their pivotal roles in

orchestrating physiological processes. Functional assessment of the networked genes revealed their involvement in diverse biological activities, including the positive regulation of T cell-mediated immunity, WNT and MAPK signaling pathways, as well as phagocytosis and natural killer (NK) cell activity. Particularly noteworthy was the observation of suppressed NK cell activity in broilers under heat stress, likely influenced by heightened corticosterone levels and subsequent inhibition of thyroid hormone secretion, thereby impacting temperature regulation and metabolism. Moreover, the elevation in blood glucose levels observed in stressed chicks may contribute to their adaptive survival response. Importantly, heat stress was observed to disrupt cellular homeostasis and molecular pathways, manifesting in alterations in biological processes such as the cell cycle. This disruption in the cell cycle may signify a novel mechanism of stress resistance in vertebrates, further underscoring the complexity of the physiological response to thermal stress in chickens.

Conclusion: The analysis of gene functionality within the network underscores the intricate nature of the innate immune response and cellular demise elicited by heat stress. Notably, certain genes identified in this analysis participate in positively regulating T cell-mediated immunity, vascular endothelial growth factor (VEGF), WNT signaling, and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways. Introducing a biomarker panel comprising genes, such as MAPK14, NT3, SOX2, YAP1, FGF2, LRRK1, LEF1, and TLE1, holds promise for advancing our understanding of the underlying molecular mechanisms governing stress responses in poultry. Furthermore, this approach may facilitate the discovery of novel genes whose modulation could mitigate the effects of thermal stress.

Keywords: Heat stress, Hypothalamus transcriptome, Hub gene, Meat Chickens, Profile analysis

How to Cite This Article: Roudbari, Z., Eskandari Nesab, S., Mohammadabadi, M., & Mokhtari, M. (2024). Analyzing the Transcript Response of Broiler Hypothalami under Thermal Stress and Investigating the Protein Network and Signaling Pathways. *Res Anim Prod*, 15(2), 11-20. DOI: [10.61186/rap.15.2.11](https://doi.org/10.61186/rap.15.2.11)

مقاله پژوهشی

واکاوی پاسخ رونوشت هیپوتالاموس مرغ گوشتی تحت تنش حرارتی و بررسی شبکه‌های پروتئینی و مسیرهای سیگنال‌دهی

زهرا رودباری^۱، سعیده اسکندری نسب^۲، محمدرضا محمدآبادی^۳ و مرتضی مختاری^۱

۱- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران، (نویسنده مسئول: Roudbari.zahra@ujroft.ac.ir)

۲- دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایرانتاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۲/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۴
صفحه: ۱۱ تا ۲۰

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: استفاده از روش‌های بهبود ژنتیکی پرندگانی را ایجاد کرده است که می‌توانند با تولید گوشت و تخم‌مرغ بخش مهمی از نیازهای غذایی انسان را تأمین کنند. دستیابی به بیشترین ظرفیت ژنتیکی نیازمند فراهم نمودن محیطی مناسب است. در صنعت پرورش طیور، تنش گرمایی چالش بزرگی است، زیرا بر میزان تولید و رشد طیور تأثیر منفی داشته و در نتیجه سود اقتصادی پرورش دهندگان را کاهش می‌دهد. سازگاری به تنش گرمایی تحت تأثیر عوامل مختلفی است. توانایی در ایجاد هموستازی با تغییر بیان ژن باعث جبران آسیب‌های برون سلولی شده و می‌تواند شرایط فیزیولوژیکی بدن را پس از بازگشت به ناحیه دمایی مناسب متعادل سازد. پرندگان اهلی فقط در دامنه دمایی بین ۲۴-۱۸ درجه سانتی‌گراد قادر به زندگی سالم خود می‌باشند و هرگونه افزایش دمای بالاتر از این دامنه سبب افزایش مرگ و میر در جوجه‌ها می‌شود. علت افزایش مرگ و میر به دلیل نقش سرکوب‌کنندگی گرما بر سیستم ایمنی و تضعیف مقاومت حیوان گزارش شده است. علاوه بر این تنش گرمایی باعث افزایش ترشح هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین و متقابلاً افزایش کورتیکواسترون خون می‌باشد، که زمینه‌ساز تغییرات سازوکارهای ملکولی طی تنش است. لذا، مطالعه این چالش از جنبه‌های مختلف می‌تواند بسیار سودمند باشد. بدین منظور پژوهش کنونی با هدف شناسایی کمپلکس‌های پروتئینی و مسیرهای سیگنال‌دهی مهم تنظیم شونده توسط ژن‌های متفاوت بیان در شرایط تنش گرمایی در هیپوتالاموس جوجه‌های گوشتی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر برای واکاوی پاسخ سیستماتیک رونوشت هیپوتالاموس مرغ به تنش حرارتی داده‌های پروفایل بیانی ۸ بافت هیپوتالاموس مرغ (۴ مرغ تحت تنش گرمایی و ۴ مرغ در شرایط بدون تنش) با شماره دسترسی GSE37400 از پایگاه داده GEO استخراج شدند. داده‌های ریزآرایه موجود شامل داده‌های خام پردازش نشده بودند که با استفاده از نرم‌افزار GEO2R کنترل کیفیت و نرمال‌سازی انجام شدند. معیار انتخاب ژن‌های متفاوت بیان، $P\text{-value} < 0.05$ و $-\log_{10}(P\text{-value}) > 1.3$ در نظر گرفته شد. در پژوهش کنونی ساخت شبکه تنظیم بیان ژن و مطالعه روابط بین ژن‌های دخیل در تنش گرمایی جوجه‌های گوشتی با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape و منبع STRING انجام شد. پس از ترسیم شبکه محل‌های مترابست شبکه، که به خوشه‌های پروتئینی موسوم‌اند، با استفاده از افزونه CytoCluster قابلیت مشخص کردن محل‌های پرتراکم را دارد، تعیین و بررسی شدند. پس از شناسایی و مشخص شدن ژن‌هایی با تراکم بالا، برای شناسایی مسیرهای زیستی از پایگاه داده‌های DAVID استفاده شد.

یافته‌ها: واکاوی داده‌های ریزآرایه نشان داد از تعداد ۴۳۶۰۷ پروتئین استخراج شده، پس از حذف ژن‌های تکراری و خارج از سطح معنی‌داری، ۵۹۳ ژن متفاوت بیان شناسایی شد و فهرست ژن‌ها تهیه گردید. سپس همه ژن‌های انتخاب شده به نرم‌افزار STRING معرفی شدند و شبکه ژنی آن‌ها با حداقل امتیاز تعامل مورد نیاز ۰/۴ در نظر گرفته شد و ۱۴۹ ژن تشکیل شبکه دادند. بررسی بیشتر ژن‌های دارای اثر تنظیم شونده بالاتر و معنی‌دار مرتبط با تنش گرمایی منجر به شناسایی ژن‌هایی تأثیرگذار بر فرایند مذکور گردید. واکاوی فعالیت عملکردی ژن‌های تشکیل دهنده شبکه نشان داد، برخی از ژن‌های شناسایی شده در تنظیم مثبت ایمنی با واسطه سلول T، مسیر سیگنال‌دهی WNT و MAPK و برخی دیگر نیز در فاگوسیتوز و فعالیت سلول‌های NK (سلول‌های کشنده طبیعی) نقش دارند. تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی باعث کاهش فعالیت سلول‌های NK می‌شود که نشان‌دهنده افزایش سطح هورمون کورتیکواسترون است. کورتیکواسترون‌ها باعث کاهش ترشح هورمون‌های تیروئید (T3 و T4) می‌شوند که این هورمون‌ها مسئول کنترل دما و متابولیسم بدن هستند و در نتیجه حساسیت جوجه گوشتی به تنش گرمایی را افزایش می‌دهند و همچنین برخی دیگر نیز در هموستازی گلوکز نقش دارند. افزایش گلوکز خون ممکن است بخشی از پاسخ جنگ یا گریز باشد که به بقای جوجه‌ها کمک می‌کند، پرندگانی که از یک عامل تنش‌زا جان سالم به در می‌برند سطوح بالاتری از گلوکز در گردش دارند. تنش گرمایی مسیرهای ملکولی را در سلول در پاسخ به شرایط تنش تنظیم می‌کند و هموستازی سلول و بافت‌ها را تغییر می‌دهد. این تغییرات بر فیزیولوژی بافت و در نتیجه توانایی تولید جوجه تأثیر می‌گذارد. اطلاعات به‌دست آمده از واکاوی مسیرهای بیولوژیکی کمپلکس‌های پروتئینی نشان داد بعضی از ژن‌های دخیل در کمپلکس پروتئینی بر روی چرخه سلولی تأثیرگذار هستند. چرخه سلولی مجموعه‌ای از فرایندهای بسیار منظم است که منجر به تولید سلول می‌شود. تنش گرمایی باعث توقف چرخه سلولی در مهره‌داران و ساز و کار جدیدی از مقاومت در برابر تنش می‌شود.

نتیجه‌گیری: واکاوی فعالیت عملکردی ژن‌های وارد شده به شبکه نشان داد که پاسخ ایمنی ذاتی و مرگ سلولی ناشی از تنش گرمایی پیچیده است، برخی از ژن‌های شناسایی شده در تنظیم مثبت ایمنی با واسطه سلول T، مسیرهای سیگنال‌دهی WNT، VEGF و MAPK می‌باشند. پژوهش کنونی با معرفی پانل بیومارکری که شامل ژن‌های TLE1، LRRK1، FGF2، YAP1، SOX2، NT3، MAPK14، LEF1 می‌باشد، می‌تواند در درک ساز و کارهای مولکولی زیربنایی پاسخ به تنش در طیور و کشف ژن‌های جدیدی مؤثر باشد که به شیوه‌ای خاص تحت تنش حرارتی تنظیم می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: آنالیز پروفایل، استرس گرمایی، ترانسکریپتوم هیپوتالاموس، ژن کاندیدا، طیور گوشتی

مقدمه

شده است که از نظر تولید گوشت و تخم می‌تواند بخش مهمی از نیازهای غذایی انسان را تأمین کنند. دستیابی به بیشترین ظرفیت ژنتیکی نیازمند فراهم نمودن محیطی مناسب است و در صنعت پرورش طیور تنش گرمایی یکی از مشکلات اساسی و اثرات اقتصادی زیان باری بر تولیدکنندگان تحمیل می‌کند (Sinaki et al., 2020). پرندگان اهلی فقط در دامنه دمایی

کشور ایران جزو مناطق گرم و خشک دنیا است، این امر باعث شده است تا پرورش‌دهندگان طیور به‌خصوص جوجه‌های گوشتی با چالش تنش گرمایی در فصول گرم سال و به‌دنبال آن با هزینه‌های گزافی برای مقابله با این چالش مواجه شوند (Sinaki et al., 2020). اصلاح نژاد به تولید پرندگانی منجر

می‌گیرند، بیان رونوشت هیپوتالاموس مرغ در مقایسه با شرایط طبیعی می‌تواند به‌طور گسترده‌ی تغییر کند (Sun *et al.*, 2015). در ادامه مطالعه حاضر با هدف شناسایی کمپلکس‌های پروتئینی و مسیرهای سیگنالدهی مهم تنظیم شونده توسط ژن‌های متفاوت بیان در شرایط تنش گرمایی در هیپوتالاموس جوجه‌های گوشتی انجام شد. مطالعات و بررسی‌های بدست آمده نشان می‌دهد که سازوکارهای ملکولی در زمره فرایندهای ملکولی هستند. ماده ژنتیکی یک سلول تعداد زیادی ژن دارد که هیچ‌گاه به‌طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آن‌ها بیان شده و پروتئین و آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نماید. نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به‌صورت خاموش غیرفعال می‌باشد (2020 Mohammadabadi *et al.*). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چند بعدی می‌باشد. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود. مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده و سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود. بنابراین پاسخ‌های تنظیمی به شدت تحت تأثیر ژنتیک حیوان و محیط قرار دارد (Tohidi Nezhad *et al.*, 2015). همچنین سازوکار سازگاری به تنش گرمایی تحت تأثیر عوامل مختلفی است. توانایی در ایجاد هم‌مؤسزایی با تغییر بیان ژن باعث جبران آسیب‌های برون سلولی شده و می‌تواند شرایط فیزیولوژیکی بدن را پس از بازگشت به ناحیه دمایی مناسب متعادل سازد (Tohidi Nezhad *et al.*, 2015). در چند سال گذشته، ابزارهای مولکولی جدیدی برای بررسی رونوشت‌ها مانند ریزآرایه توسعه یافته‌اند. بر اساس این ابزارهای ژنتیکی، بسیاری از مطالعات مسیرهای اصلی درگیر در سازوکارهای پاسخ سلولی را شناسایی کرده‌اند. در این زمینه، لازم است تمام سازوکارهای مولکولی درگیر در پاسخ به تنش گرمایی روشن شود. از این‌رو، پژوهش کنونی با هدف آنالیز پاسخ سیستماتیک رونوشت هیپوتالاموس مرغ به تنش حرارتی و رسم شبکه ژنی با هدف شناسایی کمپلکس‌های پروتئینی و مسیرهای سیگنالدهی مهم درگیر در شرایط تنش گرمایی در هیپوتالاموس جوجه‌های گوشتی انجام شد.

مواد و روش‌ها

در پژوهش کنونی، داده‌های پروفایل بیانی ۸ بافت هیپوتالاموس مرغ (۴ مرغ تحت تنش گرمایی و ۴ مرغ در شرایط بدون تنش) با شماره دسترسی GSE37400 (Sun *et al.*, 2015) از پایگاه داده GEO^۱ استخراج گردید. تحقیق در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد با ۱۰-۵٪ رطوبت نسبی انجام شده بود. روش جمع‌آوری هیپوتالاموس به شرح زیر بود: پس از بریدن سر، مغز با دقت خارج کرده اند و آن را با ایجاد یک مقطع عمود بر سطح قشر در انتهای نیمکره، نصف کردند. سپس با استفاده از موچین، لایه‌های منژ را با دقت از مغز جدا کرده و هنگامی که هیپوتالاموس مشخص شده است، کل نمونه را با دقت برداشته‌اند. تمام بافت‌ها یک شب در RNAfixer در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شده و سپس تا زمان جداسازی RNA در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد

بین ۱۸ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد قادر به زندگی سالم خود می‌باشند و هرگونه افزایش یا کاهش دما خارج از این دامنه موجب اثرات زیان‌بار مرگ و میر، کاهش مصرف غذا، کاهش رشد و انواع اختلالات ایمنی و متابولیسمی در جوجه‌ها می‌شود (Sinaki *et al.*, 2020). علت افزایش مرگ و میر به‌دلیل نقش سرکوب‌کنندگی گرما بر سیستم ایمنی و تضعیف مقاومت حیوان گزارش شده است. تنش گرمایی اثرات مخربی بر بهره‌وری و عملکرد تولید مثلی حیوانات دارد. در مرغ تخم‌گذار تنش گرمایی بر تخم‌گذاری، بلوغ تخمک، رشد و میزان لانه‌گزینی جنین تأثیر منفی دارد (Abbasi *et al.*, 2021). جوجه‌های گوشتی در دمای بالا بیشتر مستعد بروز علائم تنش گرمایی، مانند کاهش مصرف خوراک، کاهش سطح ترشح برخی هورمون‌ها هستند که در نهایت سرعت متابولیسم بدن را تغییر می‌دهند (Rajaei-Sharifabadi *et al.*, 2017). بنابراین، تولیدات طیور در مناطق گرمسیری طی فصل تابستان، تحت تأثیر درجه حرارت، رطوبت بالا، و در نتیجه بروز تنش گرمایی شدید قرار می‌گیرد (Rajaei-Sharifabadi *et al.*, 2017). از طرفی، طیور، برای مقابله با تنش گرمایی به فرایند لاله زدن و کاهش مصرف غذا رو می‌آورد و تغییرات متابولیسمی و هورمونی و مورفولوژیکی -حرکتی روده در طیور به‌هنگام مواجه با تنش گرمایی رخ می‌دهد که همگی اساس بی‌اشتهایی می‌باشند. علاوه بر این، طیور به‌دلیل نداشتن غدد عرق، زودتر در تنش گرمایی، به مرز بحران تعدیل دمای بدن رسیده و به‌همین منظور همه فعالیت‌های متابولیسمی را تا حد ممکن پایین می‌آورند. یکی از این تغییرات شامل افزایش ترشح CRH یا هورمون آزاد کننده کورتیکوپروتین و متقابلاً افزایش کورتیکواسترون خون می‌باشد، که زمینه‌ساز تغییرات سازوکارهای ملکولی در طول تنش است (He *et al.*, 2019). هیپوتالاموس به‌عنوان بخش مهمی از سیستم عصبی مرکزی، قابلیت‌های زیادی مانند تنظیم مصرف خوراک، دستکاری غدد درون‌ریز از طریق مسیرهای مختلف دارد و به‌عنوان یک مرکز حیاتی برای تنظیم دمای بدن شناخته می‌شود و با واکنش‌های اضطراری به عوامل تنش‌زا در محیط درگیر است (Quinteiro-Filho *et al.*, 2015). هیپوتالاموس، در پاسخ به تنش گرمایی از طریق محور هیپوتالاموس-هیپوفیز، آدرنال، سیستم عصبی سمپاتیک و سایر مسیرهای عصبی غدد درون‌ریز برای حفظ یا دفع گرما عمل می‌کند (Quinteiro-Filho *et al.*, 2015) در مطالعه‌ای نشان داده شده است که استرس گرمایی می‌تواند بر تعداد سلول‌های در گردش تأثیر بگذارد و نسبت هتروفیل به لنفوسیت را افزایش دهد. این عمدتاً به‌دلیل کاهش غلظت لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها و افزایش هتروفیل‌ها در گردش خون است که در نتیجه افزایش غلظت گلوکوکورتیکوئیدها مانند کورتیکواسترون است که با فعال شدن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال ایجاد می‌شود (Sanchez *et al.*, 2022). Sun و همکاران در سال ۲۰۱۵ داده‌های مطالعه حاضر را تولید کردند با هدف شناسایی پاسخ بیان ژن‌ها به استرس گرمایی در هیپوتالاموس مرغ گوشتی و براساس نتایج تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های هیپوتالاموس مرغ گزارش کردند زمانیکه جوجه‌ها در معرض استرس گرمایی قرار

دادند. ژن‌ها با بیان بالا به رنگ زرد و ژن‌ها با بیان پایین به رنگ آبی و رنگ‌های متمایل به سفید تفاوت بیان بالایی ندارند (شکل ۲). جوجه‌های گوشتی که تحت تنش گرمایی هستند به تبادل گرما بین بدنشان و محیط نیاز دارند. این تبادل از طریق مسیر خون و عبور جریان مواد مغذی از اندام‌های داخلی مثل کبد، کلیه و روده به بافت‌های سطحی مثل پوست انجام می‌شود (Quinteiro-Filho et al., 2015). این روند منجر به کاهش اکسیژن در سلول‌های پوششی روده می‌شود که یکپارچگی بافت روده را به خطر می‌اندازد و انتقال باکتری‌ها و مواد تولید شده توسط آنها مانند لیپوپلی ساکاریدها را در محیط داخلی تسهیل می‌کند، پدیده‌ای که به آن نشانگان دستگاه گوارش نشأت‌کننده می‌گویند (Quinteiro-Filho et al., 2015).

به دنبال آن، یک پاسخ ایمنی همراه با فعال شدن سیستم عصبی و ترشح آدرنال کورتیکو استروئیدها ایجاد می‌شود که به تضعیف سیستم ایمنی حیوان منجر می‌گردد (Quinteiro-Filho et al., 2015). در پژوهش کنونی، بررسی بیشتر ژن‌های دارای اثر تنظیم‌شوندگی بالاتر و معنی‌دار مرتبط با تنش گرمایی منجر به شناسایی ژن‌هایی تأثیرگذار بر فرایند مذکور گردید که به صورت مختصر بعضی از آن‌ها مورد بحث قرار گرفته‌اند. ژن‌های TULP1 و IL15 در فاگوسیتوز و فعالیت سلول‌های NK (سلول‌های کشنده طبیعی) نقش دارند. تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی باعث کاهش فعالیت سلول‌های NK می‌شود که نشان‌دهنده افزایش مشاهده شده در کورتیکوسترون است (Mitchell et al., 2002). کورتیکو استروئیدها باعث کاهش ترشح هورمون‌های تیروئید (T3 و T4) که مسئول کنترل دما و متابولیسم بدن هستند می‌شوند و در نتیجه حساسیت جوجه گوشتی به تنش گرمایی را افزایش می‌دهند و همچنین تأثیرات منفی بر مصرف خوراک خواهند داشت. از این‌رو، ترکیب تنش گرمایی، سیستم ایمنی ضعیف و مصرف خوراک پایین احتمال التهاب و مرگ و میر را بالا می‌برند (Merya et al., 2015). همچنین اخیراً گزارش شده در مطالعه‌ای که در جوجه‌های گوشتی، افزودن مکمل آنزیمی ترکیبی شامل انواع کربوهیدرازها و پروتئاز موجب بهبود پاسخ ایمنی از طریق افزایش تولید آنتی‌بادی و فعالیت فاگوسیتوزی شده است که این موضوع تا حدودی اثر مثبت آنزیم‌های موجود در مکمل ترکیبی بر فعالیت هورمون‌ها و در نتیجه کاهش تنش را نیز توجیه می‌کند (Khodaei et al., 2022).

ژن‌های HK2، MAPK14 و SREBF1 در هموستازی گلوکز نقش دارند. افزایش گلوکز خون ممکن است بخشی از پاسخ جنگ یا گریز باشد که به بقای جوجه‌ها کمک می‌کند، پرنده‌گانی که از یک عامل تنش‌زا جان سالم به در می‌برند دارای سطوح بالاتری از گلوکز در گردش هستند. جوجه‌های گوشتی که در معرض دمای بالای ۳۳ درجه سانتی‌گراد قرار دارند، تغییرات قابل‌توجهی در متابولیت‌های خونشان از جمله گلوکز در گردش نشان می‌دهند (Lucio et al., 2016). Hsp90AB1 در هنگام تنش گرمایی ترشح می‌شود و Hsp90AB1 یک چاپرون مولکولی بسیار حفاظت‌شده است که بلوغ طیف وسیعی از پروتئین‌ها را تسهیل می‌کند (Garcia et al., 2016). در مطالعه‌ای که Xing و همکاران (Xing et

al., 2015) (Sun et al., 2015) RNA کل با استفاده از TRIZOL Reagent از هیپوتالاموس جدا شد. کمیت و خلوص RNA هر نمونه با استفاده از اسپکتروفتومتر شناسایی شد. یکپارچگی RNA هر نمونه با استفاده از Agilent 2100 Bioanalyzer تعیین شد. اعداد یکپارچگی RNA برای نمونه‌ها همگی بالاتر از ۷/۶ بود که نشان می‌دهد کیفیت نمونه‌ها برای تجزیه و تحلیل ریزآرایه مناسب است. داده‌های ریزآرایه موجود شامل داده‌های خام پردازش نشده بودند که با استفاده از نرم‌افزار GEO2R کنترل کیفیت و نرمال‌سازی انجام شد. GEO2R برای انجام تجزیه و تحلیل‌ها از بسته‌های نرم‌افزاری GEO quarry، Limma موجود در نرم‌افزار R استفاده می‌کند. در این نرم‌افزار بررسی کیفیت داده‌های خام و نرمال‌سازی آنها توسط پیش‌فرض‌های خود نرم‌افزار صورت می‌گیرد (Agapito et al., 2022) و معیار انتخاب ژن‌های متفاوت بیان، $P\text{-value} < 0.05$ و $LogFC > 0.5$ (در نظر گرفته شد. در پژوهش کنونی به ساخت شبکه تنظیم بیان ژن و مطالعه روابط بین ژن‌های دخیل در تنش گرمایی جوجه‌های گوشتی با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape (Doncheva et al., 2018) (Doncheva) پرداخته شد. ژن‌های متفاوت بیان معنی‌دار انتخاب شده برای ترسیم شبکه به پایگاه String معرفی و با نرم‌افزار Cytoscape (Doncheva et al., 2018). شبکه ژنی با بیان متفاوت مصورسازی گردید بعد از ترسیم شبکه محل‌های متراکم شبکه که به خوشه موسوم‌اند، بررسی شدند. این مناطق در واقع، بخش‌هایی می‌باشند که در آنجا ارتباط پروتئین‌ها با همدیگر زیاد است و شامل پروتئین‌هایی می‌باشند که از نظر خصوصیات زیستی می‌توانند بسیار مشابه یا عملکرد مشابه داشته باشند. این کمپلکس‌ها می‌توانند بخشی از یک مسیر زیستی را تشکیل دهند (Rual et al., 2005). خوشه‌های پروتئینی با استفاده از افزونه CytoCluster تعیین و بررسی گردید (جدول ۱). این نرم‌افزار قابلیت مشخص کردن محل‌های پرتراکم را دارد (Li et al., 2017) پس از شناسایی و مشخص شدن ژن‌ها با تراکم بالا جهت شناسایی مسیرهای زیستی از پایگاه داده‌های DAVID استفاده شد. این پایگاه داده‌ای با اتصال به پایگاه‌های دیگر مانند KEGG، Wikipathway، GeneOntology و Reactome به بررسی عملکردی و مسیرهای متابولیکی ژن‌های معنی‌دار می‌پردازد.

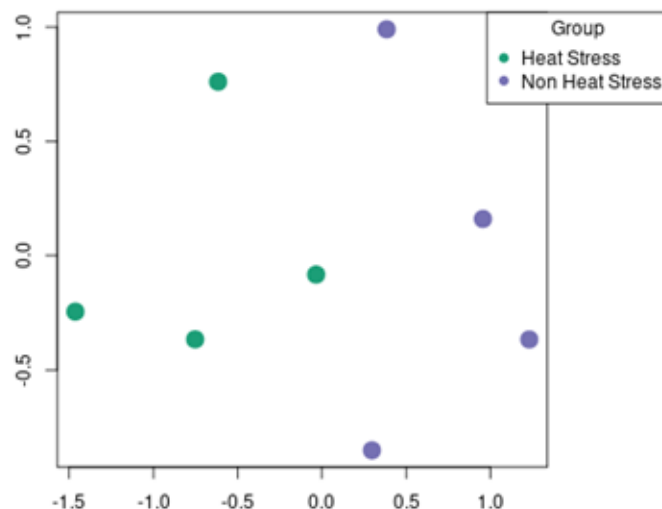
نتایج و بحث

نتایج توزیع نمونه‌ها مورد مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است که در بین نمونه‌ها یکنواختی مناسبی وجود دارد و داده بدون کیفیتی وجود ندارد که براساس این نمودار PCA نمونه‌های تحت تنش و بدون تنش به تعداد ۸ عدد به صورت واضح از هم جدا هستند و داده گمشده‌ای ندارند و تجزیه و تحلیل داده‌های ریزآرایه نشان داد از تعداد ۴۳۶۰۷ پروپ استخراج شده، پس از حذف ژن‌های تکراری و خارج از سطح معنی‌داری ۵۹۳ ژن متفاوت بیان شناسایی شد و فهرست ژن‌ها تهیه گردید. سپس همه ژن‌های انتخاب شده به نرم‌افزار STRING معرفی شدند و شبکه ژنی آن‌ها با حداقل امتیاز تعامل مورد نیاز ۰/۴۰۰ در نظر گرفتیم و ۱۴۹ ژن تشکیل شبکه

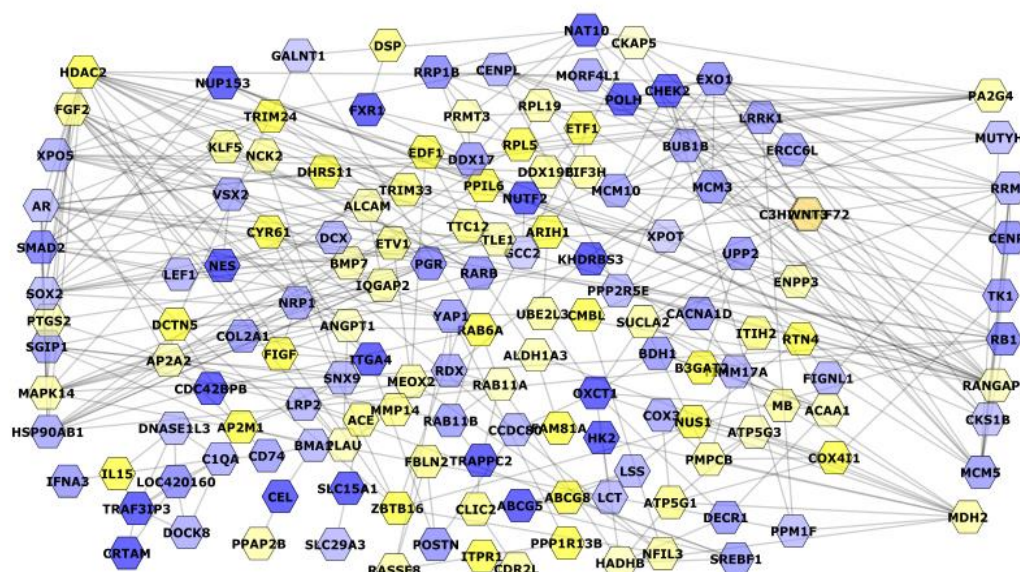
گوشتی از طریق ژن‌های منحصربه‌فرد در هیپوتالاموس تأثیر می‌گذارد (Hao et al., 2016). ژن‌های OXCT1، DECR1، ABCG5 و ABCG7 در اکسیداسیون اسیدهای چرب نقش دارد در نتیجه گرمازدگی تشدید کننده‌ی اکسیداسیون اسیدهای چرب است، گمان می‌رود اکسیداسیون اسیدهای چرب به‌منظور دستیابی به انرژی مورد نیاز پرندگان در معرض تنش گرمایی افزایش یافته است که اکسیداسیون شدید اسیدهای چرب و تجمع آنها در میتوکندری منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود (Bao et al., 2018).

YAP1 در سیگنال‌دهی NF- κ B ناشی از شوک حرارتی نقش دارد (Jiang et al., 2021). مسیر NF- κ B در بهبود تنش اکسیداتیو و توانایی‌های ضد التهابی بدن نقش دارد. علاوه بر این، می‌تواند افزایش گلوکز خون ناشی از تنش گرمایی را تنظیم کند تا قند خون را در مرغ‌ها ثابت نگه دارد (Jiang et al., 2021). ژن ANGPT1 به‌عنوان لیگاند گیرنده‌های Tie2 در سلول‌های آندوتلیال عمل می‌کند و توسط میوبلاست‌های اسکلتی و میوتیب‌ها تولید می‌شود و این ژن یک تنظیم کننده مهم مایوژنز است که در دمای بالای ۴۰ درجه بیان می‌شود (Cheng et al., 2015). KLF5 توسط تنش گرمایی القا می‌شود KLF5 یک فعال کننده رونویسی قوی است که معمولاً در سلول‌های در حال تکثیر مسیر گوارشی بیان می‌شود و در سرکوب آپوپتوز نقش دارد (Sun et al., 2015). ژن FGF2 به فعال‌سازی در مسیر سیگنال‌دهی PI3K/AKT مؤثر است و در تنظیم بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی سلولی و فعال کردن مولکول‌های مؤثر متقابل پایین دست، نقش مهمی در چرخه سلولی، رشد و تکثیر دارند درگیر می‌باشند (Birey et al., 2015). بنابراین ژن FGF2 با تنظیم منفی مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT مانع رشد و تکثیر سلول‌های توموری می‌شود. در نتیجه قرار گرفتن در شرایطی مانند تنش گرمایی می‌تواند از بیان ژن FGF2 جلوگیری کند (Birey et al., 2015).

al., 2020) جهت شناسایی چندشکلی ژن HSP90AB1 در گاوهای بومی تایلند داشتند پیشنهاد کردند این ژن یک کاندید مناسب برای تحمل گرما است و حداقل باید به‌عنوان یک نشانگر ژنتیکی برای انتخاب نژادهای مناسب برای آب و هوای گرم استفاده شود (Xing et al., 2020). ژن ITPR1 کاندید مربوط به سیستم عصبی و عملکردهای برهمکنش لیگاند-گیرنده عصبی فعال برای تحمل گرما هستند و می‌تواند کمک به توسعه رویکردهای ژنتیکی و مدیریتی برای مبارزه با تنش گرمایی باشد (Cheruiyot et al., 2021). ژن MAPK14 معمولاً توسط تنش و سیتوکین‌ها فعال می‌شود و منجر به فسفریلاسیون بیش از ۱۰۰ پروتئین می‌شود (Zou et al., 2021). ژن COX3 در زنجیره تنفسی نقش دارد (Sen Weller et al., 2013). تنش گرمایی در طیور منجر به افزایش تعداد تنفس می‌شود با افزایش تعداد دفعات تنفس (لهله زدن) دمای بدن خود را کاهش می‌دهند، این افزایش تنفس با دفع بیش از حد دی‌اکسید کربن، تعادل اسید-باز بدن را به سمت قلیایی شدن (آلکالوز) هدایت می‌کند (Weller et al., 2013). Sen و همکاران وجود گونه‌های الیگومری Lrrk1 را در کمپلکس‌های با وزن مولکولی بالا ترانسفکت شده و رده‌های سلولی لنفوبلاست گزارش کرده‌اند. که در هنگام تنش گرمایی بیان می‌شود (Sen et al., 2009). ژن‌های BMP7، CYR61 و DCX در تنظیم مورفوژنز نقش دارند. مورفوژنز در رشد اندام عضلانی، توسعه بافت عضلانی مخطط، و توسعه بافت ماهیچه‌ای قلب دخیل است، رشد بافت عضلانی در طول تنش گرمایی به‌طور قابل‌توجهی مهار می‌شود (Sakuma et al., 2006). ژن‌های CACNA1D، ITPR1، TRIM24 و TRIM33 در تنظیم یون کلسیم نقش دارند، تنش گرمایی کلسیم خون را کاهش می‌دهد و کلسیم یونیزه را که برای استخوان‌سازی و پوسه تخم‌مرغ ضروری است کاهش می‌دهد (Larkindale et al., 2002). ژن‌های EMP1، GCH1، EDN3 و GPR23 و INSIG1 و PDK4 تحت تنش گرمایی تنظیم شده‌اند و کیفیت گوشت، کیفیت اسپرم، رشد و کیفیت اسکلتی جوجه‌های



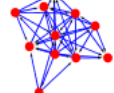
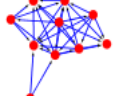
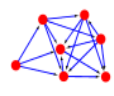
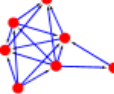
شکل ۱- توزیع نمونه‌های استفاده شده در پژوهش حاضر (رنگ سبز نمونه‌های تحت تنش گرمایی و رنگ آبی نمونه‌های بدون تنش)
Figure 1. Distribution of the samples used in the current research (green color of samples under thermal stress and blue color of non-stressed samples)



شکل ۲- شبکه ژنی مبتنی بر ژن‌های متفاوت بیان دخیل در تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی بر اساس $p \text{ value} < 0.05$ و $\text{LogFC} < 0.5$ (رنگ زرد و آبی پررنگ نشان دهنده تغییرات زیاد سطح بیان ژن‌ها می‌باشند و رنگ‌ها متغییل به سفید تفاوت بیان بالایی ندارند).

Figure 2. Gene network based on the different expression of genes involved in heat stress in broiler chickens based on $p \text{ value} < 0.05$ and $\text{LogFC} < 0.5$ (the intensity of yellow and blue color changes indicate large changes in gene expression levels and colors tending to white do not have a high expression difference).

جدول ۱- کمپلکس‌های پروتئینی و مسیرهای زیستی مرتبط با ژن‌های تشکیل دهنده این کمپلکس‌ها

کمپلکس پروتئینی COMPLEX PRO	رتبه RANK	تعداد EDGES	گره NODES	ژن GENE	مسیر Pathway
	1	40	11	CKS1B, MUTHYH, TK1, MCM10, CHEK2, CENPI, RRM2, MCM3, EXO1, MCM5, BUB1B	Cell cycle, DNA replication, Pyrimidine metabolism, Purine metabolism, Glutathione metabolism p53 signaling pathway
	2	32	10	C3H20ORF72, MUTHYH, TK1, CHEK2, CENPI, RRM2, MCM3, EXO1, MCM5, BUB1B	Cell cycle, DNA replication, Pyrimidine metabolism, p53 signaling pathway, metabolic pathway
	3	17	7	XPOT, NUTF2, GCC2, CKAP5, XPO5, NUP153, RANGAP1	RNA transport
	4	16	7	PPIL6, XPOT, NUTF2, GCC2, XPO5, NUP153, RANGAP1	RNA transport
	5	16	7	PTGS2, PGR, HSP90AB1, MAPK14, RB1, AR, HDAC2	Oocyte meiosis, Progesterone-mediated, oocyte maturation, VEGF signaling pathway, C-type lectin receptor signaling pathway, Cell cycle, NOD-like receptor signaling pathway

می‌اندازد، بلکه مهم‌تر از آن بر سیستم ایمنی آن‌ها تأثیر می‌گذارد، باعث سرکوب سیستم ایمنی و منجر به بروز بیماری‌های مختلف می‌شود و بر توسعه صنعت طیور تأثیر نامطلوبی می‌گذارد (Abbasi et al., 2021). تنش گرمایی مسیرهای ملکولی را در سلول در پاسخ به شرایط تنش تنظیم می‌کند و هموستازی سلول و بافت‌ها را تغییر می‌دهد این تغییرات بر فیزیولوژی بافت در نتیجه توانایی تولید حوضه تأثیر

در شرایط عادی، بدن حیوان می‌تواند از طریق خودتنظیمی به تنش‌های نامطلوب خارجی پاسخ دهد، اما اگر تنش، بیش از حد باشد یا برای مدت طولانی رخ دهد، سلامت حیوان را به‌خطر می‌اندازد. در صنعت پرورش طیور، به‌طور کلی به آسیب‌های ناشی از تنش بیش از حد که بیشتر شامل پاسخ‌های تنش مزمن یا مکرر می‌باشد، توجه می‌کنند. این پاسخ‌های تنشی نه‌تنها رشد طبیعی و عملکرد تولید طیور را به‌خطر

است. هرگونه تغییر در این تعادل ممکن است باعث ایجاد شرایط پاتولوژیک شود، VEGF علاوه بر اینکه واسطه اساسی رگ‌زایی فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک است، نقش مهمی در تنظیم تهاجم عروقی، تخریب و بازسازی ماتریکس، تمایز، بلوغ بقا و فعالیت عملکردی غضروف دارد (et al., 2018). تحلیل‌های مسیر KEGG نشان داد که بعضی ژن‌های مورد مطالعه در میوز تخمک هم نقش دارند، تنش گرمایی (HS) کارایی تولید مثل را با تغییر در اسپرم‌زایی، رشد یا بلوغ فولیکولی و تخمک در حیوانات به خطر می‌اندازد. در طول ماه‌های گرم تابستان، برخی تغییرات در سطح محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG) باعث کاهش باروری می‌شود توضیح داده شده است که سرعت رشد فولیکولی نامناسب تغییرات در غلظت استرادیول، کاهش بیان گیرنده‌های LH و فعالیت کم آروماتاز، فرآیند تخمک‌گذاری تحت HS را به تأخیر می‌اندازد. علاوه بر این، قرار گرفتن حیوانات ماده در معرض HS در طول مرحله قبل از تخمک‌گذاری کیفیت تخمک را با دخالت افزایش تولید اکسیداتیو فعال را کاهش می‌دهد (Naseer et al., 2017).

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه ۵۹۳ ژن تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه تحت شرایط بدون تنش داشتند که از این تعداد ۱۴۹ مورد تشکیل شبکه دادند. تجزیه و تحلیل فعالیت عملکردی ژن‌های وارد شده به شبکه نشان داد که پاسخ ایمنی ذاتی و مرگ سلولی ناشی از تنش گرمایی پیچیده است، برخی از ژن‌های شناسایی شده در تنظیم مثبت ایمنی با واسطه سلول T، مسیرهای سیگنالدهی VEGF، WNT و MAPK می‌باشند. مطالعه حاضر با معرفی پانل بیومارکری که شامل ژن‌های MAPK14، TLE1 و LEF1، LRRK1، FGF2، YAP1، SOX2، NT3 می‌باشد، می‌تواند در درک مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی پاسخ به تنش در طیور و کشف ژن‌های جدیدی که به شیوه‌ای خاص تحت تنش حرارتی تنظیم می‌شوند، مؤثر باشد.

References

- Abbasi, A., Hashemi, R., Hassani, S., & Ebrahimi, M. (2021) Growth Response and Humoral Immunity of Broiler Chickens Fed Organic Acids and Zeolite Coated with Silver Nanoparticles under Heat Stress Conditions. *Research on Animal Production*, 12 (33), 113-123. (In Persian). <https://doi.org/10.52547/rap.12.33.113>.
- Agapito, G., Milano, M., & Cannataro, M. (2022). A statistical network pre-processing method to improve relevance and significance of gene lists in microarray gene expression studies. *BMC bioinformatics*, 23(6), 1-20.
- Bao, J. W., Qiang, J. Y., Tao, F., Li, H. X., He, J., Xu, P. & Chen, D. J. (2018). Responses of blood biochemistry, fatty acid composition and expression and microRNAs to heat stress in genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Journal of thermal biology*, 73, 91-93. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.02.007>.
- Birey, F., Kloc, M., Chavali, M., Hussein, I., Wilson, M., Christoffel, D. J. & Aguirre, A. (2015). Genetic and stress-induced loss of NG2 glia triggers emergence of depressive-like behaviors through reduced secretion of FGF2. *Neuron*, 88(5), 941-956. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.046>
- Chen, Z., Xie, J., Wang, B., & Tang, J. (2014). Effect of γ -aminobutyric acid on digestive enzymes, absorption function, and immune function of intestinal mucosa in heat-stressed chicken. *Poultry Science*, 93(10), 2490-2500. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03398>.
- Cheng, C. Y., W. Tu, L. S., Wang, H. P., Tang, C., Chen, C. F., Chen, H. H., & Huang, S. Y. (2015). Annotation of differential gene expression in small yellow follicles of a broiler-type strain of Taiwan country chickens in response to acute heat stress. *PloS one*, 10(11), e0143418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143418>.

می‌گذارد (Zerini et al., 2020). اطلاعات به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل مسیرهای بیولوژیکی کمپلکس‌های پروتئینی (جدول ۱) نشان داد بعضی از ژن‌های دخیل در کمپلکس پروتئینی بر روی چرخه سلولی تأثیرگذار هستند. چرخه سلولی مجموعه‌ای از فرآیندهای بسیار منظم است که منجر به تولید سلول می‌شود. تنش گرمایی باعث توقف چرخه سلولی در مهره‌داران و مکانیسم جدیدی از مقاومت در برابر تنش می‌شود (Nakai and Ishikawa., 2001). ژن BUB1B یکی از ژن‌های کمپلکس‌های پروتئینی ۱ و ۲ است که در مطالعه دیگری هم در گروه پروتئین‌های شوک حرارتی و تنظیم‌کننده چرخه سلولی است به طور عمده در پاسخ تنش، عملکرد چارپون (تاخوردگی/باز شدن پروتئین)، آپوپتوز، در انتقال پروتئین و سایر عملکردهای متابولیکی نقش دارند (Singh et al., 2020). تنش گرمایی فعالیت آنزیم‌های گوارشی را مهار می‌کند و جذب و عملکردهای ایمنی مخاط روده را کاهش دهد (Chen et al., 2014). ژن PTGS2 از جمله ژن‌های شرکت کننده در کمپلکس ۵ می‌باشد و در میان ۱۶ ژن مربوط به سرکوب سیستم ایمنی، تنش اکسیداتیو و اختلال عملکرد غدد درون ریز به عنوان شرکت کننده در مسیر سیگنالینگ VEGF^۱ و اکسیژن رسانی شناسایی شد، مسیر سیگنالینگ VEGF را برای بهبود اکسیژن رسانی در زمان تنش گرمایی تنظیم مثبت می‌کند (Wang et al., 2021). یکی از مسیرهای سیگنال دهی که در مسیر KEGG شناسایی شده مسیر سیگنالینگ p53 است یک پروتئین سرکوب‌گر تومور است که اتوفاژ را تنظیم می‌کند و با مسیرهای SIRT1^۲ و mTOR^۳ تعامل دارد در هنگام تنش این مسیر و AMPK^۴ فعال می‌شوند با افزایش سن بیان آن در مغز کاهش می‌یابد، برای حفظ دمای بدن و اتلاف گرما در شرایط هائپرترمیک انرژی قابل‌توجهی صرف می‌کند (Huang et al., 2021). مسیر سیگنالینگ VEGF یک سازوکار کلیدی برای استخوان‌زایی است که سرعت رشد استخوان را تعیین می‌کند و پیش‌نیازی برای تشکیل استخوان

- Cheruiyot, E. K., Haile-Mariam, M. B., Cocks, G. I., MacLeod, M., Xiang, R., & Pryce, J. E. (2021). New loci and neuronal pathways for resilience to heat stress in cattle. *Scientific reports*, 11(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95816-8>
- Doncheva, N. T., Morris, J. H., Gorodkin, J., & Jensen, L. J. (2018). Cytoscape StringApp: network analysis and visualization of proteomics data. *Journal of proteome research*, 18(2), 623-632. [10.1021/acs.jproteome.8b00702](https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00702).
- Garcia, R., Merino, D. J., Gómez, M. J., Nistal, F. M., Hurlé, A. A., Cortajarena, L., & Villar, A. V. (2016). Extracellular heat shock protein 90 binding to TGF β receptor I participates in TGF β -mediated collagen production in myocardial fibroblasts. *Cellular Signalling*, 28(10), 1563-1579. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.07.003>.
- Hao, Y., Liu, J.R., Zhang, Y., Yang, P. G., Feng, Y. J., Cui, Y. J., & Gu, X. H. (2016). The micro RNA expression profile in porcine skeletal muscle is changed by constant heat stress. *Animal genetics*, 47(3), 365-369. <https://doi.org/10.1111/age.12419>.
- He, X., Lu, Z. B., Ma, L., Zhang, J., Li, Y., Jiang, & Gao, F. (2019). Chronic heat stress alters hypothalamus integrity, the serum indexes and attenuates expressions of hypothalamic appetite genes in broilers. *Journal of thermal biology*, 81, 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.02.025>.
- Huang, Z., Ma, A., Yang, X., Liu, T., Zhao, J., Zhang, L., & Xu, R. (2020). Transcriptome analysis and weighted gene co-expression network reveals potential genes responses to heat stress in turbot *Scophthalmus maximus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D, Genomics and Proteomics*, 33, 100632. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2019.100632>.
- Jiang, X., Maruyama, H., Iwasa, K., Arimoto-Matsuzaki, H., Nishina, J., & Hata, Y. (2021). Heat shock induces the nuclear accumulation of YAP1 via SRC. *Experimental Cell Research*, 399(1), 112439. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112439>.
- Khodaei, M., Ghasemi H.A., & Salehizadeh, A. (2022). Effect of Different Levels of a Blended Supplement Including Probiotics, Prebiotics and Enzymes on Productive Performance, Blood Metabolites, Hormonal Profile and Antioxidant Status of Laying Hens. *research on Animal Production*, 13(38), 128-137. (in Persian). <https://doi.org/10.52547/rap.13.38.128>.
- Larkindale, J., & Knight, M. R. (2002). Protection against heat stress induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant physiology*, 128(2), 682-695. <https://doi.org/10.1104/pp.010320>.
- Li, M., Li, D., Tang, Y., Wu, F., & Wang, J. (2017). CytoCluster: a cytoscape plugin for cluster analysis and visualization of biological networks. *International journal of molecular sciences*, 18(9), 1880. [10.3390/ijms18091880](https://doi.org/10.3390/ijms18091880).
- Lucio, A., Alves, K. A., Alves, M. C., Martins, L. S., Braga, L., Miglio, L., & Beletti, M. E. (2016). Selected sperm traits are simultaneously altered after scrotal heat stress and play specific roles in in vitro fertilization and embryonic development. *Theriogenology*, 86(4), 924-933. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.015>.
- Mehmood, K., Zhang, K., Li, L., Wang, M. U., Rehman, F., Nabi, H., & Li, J. (2018). Effect of tetramethylpyrazine on tibial dyschondroplasia incidence, tibial angiogenesis, performance and characteristics via HIF-1 α /VEGF signaling pathway in chickens. *Scientific reports*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20562-3>.
- Merya, J., Mohit, A., Hasanzadeh, M., & Shahbazee, B. (2015). Effect of tryptophan, melatonin and dark diet on performance and blood parameters of broilers under heat stress. *Research on Animal Production*, 6(12), 70-78 (In Persian).
- Mitchell, J. B., Dugas, B. K., Mcfarlin, J., & Nelson, M. J. (2002). Effects of exercise, heat stress. And hydration on immune cell number and function. *Medicine and Science in sports and exercise*, 34(12), 1941-1950. <https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000039070.40418.90>.
- Mohammadabadi M. R., Kheyroodin, H., & Latifi Babenko, A. (2022). mRNA expression profile of DNAH1 gene in testis tissue of Raini Cashmere goat. *Agricultural Biotechnology Journal*, 14 (3), 243-256. (in Persian) <https://doi.org/10.22103/jab.2022.20199.1428>.
- Nakai, A., & Ishikawa, T. (2001). Cell cycle transition under stress conditions controlled by vertebrate heat shock factors. *The EMBO Journal*, 20(11), 2885-2895. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.11.2885>.
- Naseer, Z., Ahmad, E., Epikmen, U., Uçan, M., & Akosy, M. (2017). Quercetin supplemented diet improves follicular development, oocyte quality, and reduces ovarian apoptosis in rabbits during summer heat stress. *Theriogenology*, 96, 136-141. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.029>.
- Quinteiro-Filho, M., Rodrigues, A., Ribeiro, V., Ferraz-de-Paula, M. L., Pinheiro, L., & Palermo-Neto, J. (2015). Acute heat stress impairs performance parameters and induces mild intestinal enteritis in broiler chickens, role of acute hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. *Journal of animal science*, 90(6), 1986-1994. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-3949>.
- Rajaei-Sharifabadi, H., Ellestad, T., Porter, A., Donoghue, W., Bottje, G., & Dridi, S. (2017). Noni (*Morinda citrifolia*) modulates the hypothalamic expression of stress-and metabolic-related genes in broilers exposed to acute heat stress. *Frontiers in genetics*, 8, 192. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00192>.

- Rual, J. F., Venkatesan, T., Hao, T., HirozaneKishikawa, A., Dricot, B., & Li, N. (2005). Towards a proteome-scale map of the human protein– protein interaction network. *Nature*, 437(7062), 1173-1178. <https://doi.org/10.1038/nature04209>.
- Sakuma, Y., Maruyama, F., Qin, Y., Qsakabe, Y., Shinozaki, K., Shinozaki, F., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat -stress-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(49), 18822-18827. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605639103>.
- Sen, S., Webber, J., & West, A. B. (2009). Depend of leucine-rich repeat kinase2 (LRRK2) kinase activity on dimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (52), 36346-36356. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.025437>.
- Sinaki, M. R., Sadeghi, A., Bahrami, D., & Shahrababak, M. M. (2020). Identification of genes biological pathways and signaling affecting heat stress with microarray data sets in poultry. *Iranian Journal of Animal Science*, 51(3), 243-251. <https://doi.org/10.22059/ijas.2020.307066.653793>.
- Singh, A. Upadhyay, G., Chandra, S., Kumar, D., Malakar, S. V., & Singh, M. K. (2020). Genomewide expression analysis of the heat stress response in dermal fibroblasts of Tharparkar (zebu) and Karan-Fries (zebu× taurine) cattle. *Cell Stress and Chaperones*, 25(2), 327-344. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01076-2>.
- Sun, H., Jiang, R., Xu, S., Zhang, Z., Xu, G., Zheng, J., & Qu, L. (2015). Transcriptome responses to heat stress in hypothalamus of a meat-type chicken. *Journal of animal science and biotechnology*, 6, 1-12. 10.1186/s40104-015-0003-6.
- Sun, L., Lamont, A. M., Cooksey, F., McCarthy, C. O., Tudor, K., Vijay-Shanker, S., & Schmidt, C. J. (2015). Transcriptome response to heat stress in a chicken hepatocellular carcinoma cell line. *Cell Stress and Chaperones*, 20(6), 939-950. <https://doi.org/10.1007/s12192-015-0621-0>.
- Tohidi Nezhad, F., Mohammadabadi, M. R., Esmaeili Zadeh, A., & Najmi Nouri, O. (2015). Comparison of different levels of rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmi goat. *Agricultural Biotechnology Journal*, 6(4), 37-50. 10.22103/JAB.2015.1338.
- Wang, J., Xiang, Y., Jiang, S., Li, F., Caviezel, S., Katawatin, H., & Duangjinda. M. (2021). Involvement of the VEGF signaling pathway in immunosuppression and hypoxia stress, analysis of mRNA expression in lymphocytes mediating panting in Jersey cattle under heat stress. *BMC veterinary research*, 17(1), 1-14. 10.1186/s12917-021-02912-y.
- Weller, M., Alebrante, H., Campose, A., Saraiva, B., Silva, J., Donzele L., & Guimaraes, S. (2013). Effect of heat stress and feeding phosphorus levels on pig electron transport chain gene expression. *Animal*, 7(12), 1985-1993. <https://doi.org/10.1017/S1751731113001535>.
- Xing, T., Zhao, X., Zhao, S., Zhuang, D., & Xu, X. (2020). Phosphoproteome analysis of sarcoplasmic and myofibrillar proteins in stress-induced dysfunctional broiler pectoralis major muscle. *Food chemistry*, 319, 126531. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126531>.
- Zerini, F., Cendron, F., Rovelli, G., Castellini, C., Cassandro, M. & Lasagna, E. (2020). Emerging genetic tools to investigate molecular pathways related to heat stress in chickens, A review. *Animals*, 11(1), 46. <https://doi.org/10.3390/ani11010046>.
- Zou, L., Cheng, C., Xu, H., Liu, Y., Wang, N., Li, E., & Xia, W. (2021). The role of miR-128-3p through MAPK14 activation in the apoptosis of GC2 spermatocyte cell line following heat stress. *Andrology*, 9(2), 665-672. <https://doi.org/10.1111/andr.12923>.