

افزودن میلورم در جیره جوجه‌های گوشتی سویه راس و تأثیر آن بر بیان ژن *BDNF* در بافت‌های مختلف

علیرضا دریجانی^۱، محمدرضا محمدآبادی^{۲*}، محسن افشارمنش^۳، حسینعلی ساسان^۴، امین خضری^۵ و دیانا شبان جرجندی^۶

(۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶) بخش علوم دامی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران.

نویسنده مسئول*: mrm@uk.ac.ir

شماره صفحات

۲۵-۴۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۷

چکیده

امروزه استفاده از کرم میلورم (*Tenebrio molitor*) در جیره طیور علاوه بر تأمین بخشی از پروتئین موردنیاز، نه تنها به کاهش هزینه‌های تولید و بهبود سلامت پرندگان کمک می‌کند، بلکه تأثیرات مثبتی بر محیط‌زیست نیز دارد. از طرف دیگر پروبیوتیک به‌عنوان یک ماده مؤثر در سلامتی طیور سال‌ها است که توسط بسیاری از پرورش‌دهنده‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و احتمالاً می‌تواند از ترکیبات تشکیل‌دهنده کرم میلورم به‌عنوان یک پری‌بیوتیک استفاده کند. در این تحقیق مقدار بیان نسبی ژن *BDNF* در بافت‌های مختلف ۱۶ قطعه جوجه گوشتی که تحت تغذیه میلورم بودند، با استفاده از تکنیک Real-time PCR بررسی شد. به این منظور جوجه‌های گوشتی در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار، ۴ تکرار و ۱۰ قطعه جوجه در هر تکرار تحت تغذیه میلورم به‌صورت افزودنی مورد بررسی قرار گرفتند. هر گروه با جیره‌های آزمایشی شامل (۱) جیره پایه، (۲) جیره پایه + میلورم (۰/۵ درصد) به‌صورت آزاد تغذیه شدند و پس از پایان دوره ۴۲ روزه‌ی پرورشی جوجه‌ها کشتار شدند و از بافت‌های کبد، طحال، ماهیچه ران و سینه آن‌ها نمونه‌برداری انجام شد. RNA کل با حفظ شرایط دمایی نگهداری از نمونه‌های بافتی استخراج و بلافاصله کمیت و کیفیت آن بررسی شد. پس از تایید RNA کل استخراج‌شده، cDNA ساخته شد. شرایط بهینه برای انجام PCR تعیین و در نهایت Real-time PCR برای ارزیابی بیان نسبی ژن هدف (*BDNF*) و ژن مرجع (*GAPDH*) انجام و نتایج به‌وسیله نرم‌افزارهای Excel و Prism بررسی شدند. نتایج نشان داد که افزودن میلورم در جیره جوجه‌های گوشتی اثر معنی‌داری ($P < 0/05$) برافزایش بیان ژن *BDNF* در بافت‌های ماهیچه ران و ماهیچه سینه دارد. به‌طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت که افزودن میلورم در جیره جوجه‌های گوشتی باعث تغییر بیان ژن *BDNF* در بافت‌های عضلانی مرتبط با رشد می‌شود که با توجه به ارتباط حیاتی این ژن با بسیاری از مکانیسم‌های فیزیولوژیک، از جمله تقویت اتصالات عصب-ماهیچه، بازسازی ماهیچه‌ها، جذب گلوکز تنظیم‌شده توسط انسولین و فرآیندهای بتا اکسیداسیون در بافت ماهیچه‌ای، می‌توان با انجام آزمایش‌های تکمیلی و درک مکانیسم‌های مربوطه برای تغییر بیان این ژن در بافت‌های هدف از افزودن میلورم استفاده کرد.

کلمات کلیدی: بیان ژن، میلورم، طیور و *BDNF*.

مقدمه

میلورم یک منبع پروتئین جایگزین است که می‌تواند بدون تأثیر بر عملکرد رشد پرندگان در خوراک طیور گنجانده شود. در مطالعه‌ای اثر مکمل میلورم پودری تولیدشده محلی در پرندگان گوشتی بر مصرف خوراک، افزایش وزن بدن، ضریب تبدیل خوراک (FCR)، درصد لاشه و تیترا آنتی‌بادی و مرگ‌ومیر بررسی شد. نتایج نشان داد که افزایش سطوح کنجاله پودری میلورم از ۰/۱ به ۰/۳ درصد باعث افزایش معنی‌داری ($P < 0/05$) در افزایش وزن و ضریب تبدیل خوراک می‌شود. همچنین بیشترین درصد لاشه در گروه مکمل با ۰/۳ درصد کنجاله‌ی پودری میلورم ثبت شد (Hussain et al. 2017). یافته‌های مطالعه ذکرشده توسط Hall و همکاران (۲۰۱۸) تأیید شد. بدین‌صورت که نتایج مطالعه‌ی آن‌ها نشان داد که افزودن میلورم تا ۱۰ درصد در جیره جوجه‌های گوشتی، هیچ اثر منفی بر افزایش وزن، خوراک مصرفی و ضریب تبدیل خوراک ندارد (Hall et al. 2018). مکمل غذایی کرم میلورم بر فیزیولوژی جوجه‌های گوشتی نیز تأثیر می‌گذارد. به‌عنوان مثال، Ballitoc و Sun (۲۰۱۳) گزارش کردند که رژیم‌های غذایی حاوی یک درصد کرم میلورم، طول روده کوچک را افزایش می‌دهند، درحالی‌که چربی شکم را کاهش می‌دهند. Bellezza Oddon و همکاران (۲۰۲۱) گزارش دادند که تغذیه جیره غذایی مکمل با ۵ درصد کرم میلورم زنده تأثیر مثبتی بر وزن نسبی طحال دارد. Selaledi و همکاران (۲۰۲۱) همچنین مشاهده کردند که مکمل غذایی با ۵ درصد پودر کرم میلورم به‌طور مثبت بر pH و بافت گوشت سینه جوجه‌های بومی بوشولد تأثیر می‌گذارد. باین‌حال، مکمل با ۱۰ یا ۱۵ درصد پودر کرم آرد زرد اثرات نامطلوبی بر سایر جنبه‌های کیفیت گوشت مانند از دست دادن پخت‌ویز داشت (Ballitoc and Sun 2013; Bellezza Oddon et al. 2021; Selaledi et al. 2021). اثرات منفی اضافی گزارش‌شده شامل کاهش *E. coli* caecal پس از مصرف مکمل با ۵ درصد کرم آرد زرد است (Sedgh-Gooya et al. 2021). علاوه بر این، پرندگانی که با جیره‌های حاوی ۲۹/۷ درصد کرم‌های زردآلو تغذیه می‌شوند، نسبت تبدیل خوراک (FCR) کمتری نسبت به آن‌هایی که با جیره‌های حاوی ۴۴/۷ درصد کنجاله سویا تغذیه می‌شوند، داشتند (Bovera et al. 2015). سنجش دیگری با هدف جایگزینی کامل کنجاله سویا با لارو میلورم در جیره جوجه‌های گوشتی بر عملکرد رشد، قابلیت هضم مواد مغذی و ویژگی‌های لاشه و گوشت جوجه‌های گوشتی توسط Bovera و همکاران انجام شد و در نتایج هیچ اثر معنی‌داری بر عملکرد رشد، صفات لاشه و کیفیت گوشت مشاهده نشد. علاوه بر این، ضریب تبدیل خوراک به‌طور قابل توجهی در گروه تغذیه‌شده با میلورم افزایش یافت ($P < 0/05$). همچنین، در مقایسه با گروه شاهد (گروه تغذیه‌شده با کنجاله سویا)، جوجه‌های گوشتی که با میلورم به‌عنوان یک منبع پروتئین منحصربه‌فرد تغذیه شدند، به‌طور معنی‌داری سیستم گوارشی توسعه‌یافته‌تر، طحال بزرگ‌تر و روده‌ها و ایلئوم و سکوم بلندتری داشتند ($P < 0/05$). نکته مهم این است که کمترین نسبت آلبومین/گلوبولین در جوجه‌های گوشتی که جیره میلورم دریافت کرده بودند ثبت شد که نشان‌دهنده مقاومت بهتر بیماری و پاسخ ایمنی در پرندگان است. این یافته ممکن است به اثرات پری‌بیوتیک کیتین و سایر مولکول‌های زیست فعال تولیدشده توسط حشره نسبت داده شود. علاوه بر این، مقادیر

آسپارات آمینوترانسفراز گروه میلورم در محدوده طبیعی برای جوجه‌های گوشتی بود و با افزایش گاما گلوتامیل ترانسفراز، لاکتیک دهیدروژناز یا لاکتیک دهیدروژناز همراه نبود. چنین نتایجی نشان می‌دهد که هیچ تغییری در سلول‌های کبدی و ماهیچه‌ای رخ نداده و نشان می‌دهد که لارو میلورم می‌تواند به‌عنوان یک منبع پروتئین منحصربه‌فرد در جیره‌های گوشتی استفاده شود (Bovera et al. 2016). فاکتور نوروتروفیک مغزی^۱ (*BDNF*) عضوی از خانواده فاکتورهای رشد نوروتروفین، همراه با فاکتور رشد عصبی و نوروتروفین ۳، ۴/۵ و ۶ است (Berkemeier et al. 1991; Ernfors et al. 1990; Götz et al. 1990; Levi-Montalcini, 1987; Maisonpierre et al. 1990). نوروتروفین‌ها به‌صورت ایزوفرم‌های ۳۲-۳۵ کیلو دالتونی ساخته می‌شوند که بعداً به اشکال بالغی تقسیم می‌شوند که پس از ترجمه دایمر می‌شوند و سپس به‌عنوان لیگاندهای گیرنده عمل می‌کنند (Kolbeck et al. 1994). *BDNF* بالغ به‌عنوان فرم فعال بیولوژیک در نظر گرفته می‌شود که میل ترکیبی زیادی با گیرنده کیناز B (*TrkB*) مرتبط با تروپومیزین دارد (Klein et al. 1991). *BDNF* به‌وفور در سراسر دستگاه عصبی مرکزی در حال رشد و بالغ و در بسیاری از بافت‌های محیطی از جمله ماهیچه، کبد و چربی بیان می‌شود (Mousavi and Jasmin 2006; Ukropec et al. 2008). در سال‌های اخیر، توجه زیادی به *BDNF* برای نقش آن در هموستاز انرژی شده است (Conner et al. 1997). *Lapchak* و همکاران در حین بررسی *BDNF* و انعطاف‌پذیری عصبی در داخل بدن، اشاره کرد که تزریق بلند مدت داخل بطنی *BDNF* از افزایش وزن جلوگیری می‌کند (Lapchak and Hefti 1992). از آن زمان در بسیاری از مطالعات مشاهده شده است که تزریق مرکزی *BDNF* باعث سرکوب اشتها و کاهش وزن، افزایش فعالیت حرکتی (Naert et al. 2006) و سرعت متابولیسم در حالت استراحت می‌شود (Wang, Bomberg, et al. 2010). علاوه بر اثرات مرکزی، *BDNF* اعمال محیطی را اعمال می‌کند که بر متابولیسم گلوکز (Yamanaka, Itakura, et al. 2008)، مصرف انرژی (Tsuchida, et al. 2008) و مصرف غذا تأثیر می‌گذارد (Yamanaka, Itakura, et al. 2008). پروتئین *BDNF* توسط ژنی به نام *BDNF* که روی کروموزوم ۱۱ انسان و روی کروموزوم ۵ پرندگان یافت می‌شود، کدگذاری می‌شود. از نظر ساختاری، رونویسی *BDNF* توسط هشت پروموتر مختلف کنترل می‌شود که هر کدام منجر به رونوشت‌های متفاوتی می‌شود که حاوی یکی از هشت اگزون^۵ ترجمه نشده (۱ تا ۶) متصل به اگزون کدکننده ۳ است (Zheng and Wang, 2009). در جوجه‌های گوشتی، *BDNF* برای فرآیندهای فیزیولوژیک مختلف از جمله رشد، نمو و رفتار نقش دارد و درک بیان و عملکرد *BDNF* در جوجه‌های گوشتی می‌تواند بینش‌هایی را در مورد بهبود رفاه طیور و راندمان تولید ارائه دهد (Bayraktar, Tekce, Aksakal, et al. 2020; Wu et al. 2020; Zarei et al. 2024). *BDNF* در ابتدا در مغز بیان می‌شود، اما وجود آن در بافت‌های دیگر مانند ماهیچه و کبد نیز شناسایی شده است. سطوح بیان *BDNF* را می‌توان تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله سن، رژیم غذایی و شرایط محیطی قرار داد. به‌عنوان مثال، جوجه‌های گوشتی جوان‌تر ممکن

^۱ Brain-Derived Neurotrophic Factor

است الگوهای بیان *BDNF* متفاوتی را در مقایسه با پرندگان مسن‌تر نشان دهند که نشان‌دهنده نیازهای رشدی آن‌ها است. علاوه بر این، نشان داده شده است که اجزای رژیم غذایی مانند اسیدهای چرب امگا ۳ بیان *BDNF* را افزایش می‌دهند که نشان می‌دهد تغذیه نقشی حیاتی در تعدیل این نوروتروفین ایفا می‌کند (Bayraktar, Tekce, Aksakal, et al. 2020). *BDNF* در فرآیندهای مختلفی که برای رشد و نمو جوجه‌های گوشتی حیاتی هستند، دخالت دارد. این باعث بقا و تمایز نورون‌ها می‌شود که برای عملکرد صحیح سیستم عصبی ضروری است. علاوه بر این، *BDNF* در رشد و بازسازی عضلات نقش دارد و آن را به یک عامل کلیدی در بهینه‌سازی نرخ رشد در جوجه‌های گوشتی تبدیل می‌کند. تحقیقات نشان می‌دهد که غلظت‌های بیشتر *BDNF* ممکن است با بهبود راندمان خوراک و افزایش وزن مرتبط باشد و پتانسیل آن را به‌عنوان هدفی برای افزایش صفات تولیدی در طیور برجسته می‌کند (Zarei et al. 2024). علاوه بر نقش فیزیولوژیک، *BDNF* با ویژگی‌های رفتاری جوجه‌های گوشتی نیز مرتبط است. مطالعات نشان داده‌اند که *BDNF* ممکن است بر رفتارهای اجتماعی و پاسخ‌های استرس تأثیر بگذارد که برای رفاه کلی طیور حیاتی است (Yang et al. 2022). در مطالعه‌ای Zarei و همکاران (۲۰۲۴) با بررسی احتمالی اثر *BDNF* بر مصرف غذای جوجه‌های گوشتی و اثر متقابل آن با سیستم سروتونرژیک نشان دادند که *BDNF* مصرف غذا را در جوجه‌های گوشتی کاهش می‌دهد (Zarei et al. 2024). در این مطالعه با هدف تجزیه و تحلیل اثرات مخلوط اسیدهای چرب ضروری (EOM) بر جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی، با تمرکز بر آدیپوکین‌ها (*BDNF*, *Apelin*)، تغییرات هیستوپاتولوژیک در کبد و روده و پارامترهای مختلف بیوشیمیایی طی ۴۲ روز بررسی شد. چهارصد قطعه جوجه گوشتی نر رأس ۳۰۸ به‌طور تصادفی در هشت گروه قرار گرفتند که تحت شرایط دمایی مختلف و دوزهای گروه اسیدهای چرب ضروری (۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌لیتر/لیتر آب مصرفی) قرار گرفتند. مشاهده شد که در شرایط بدون استرس، سطح *Apelin* کاهش و سطح *BDNF* افزایش یافت. در گروه‌های تحت استرس، سطوح آپلین افزایش یافت، برخلاف سطوح *BDNF* که در گروه ۲۵۰ به اوج خود رسید. همچنین، افزودن ۲۵۰ میلی‌لیتر/لیتر ۱۰۰۰ EOM به آب آشامیدنی بر سطوح سرمی آپلین و *p-BDNF* در جوجه‌های گوشتی تحت استرس به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) تأثیر مثبت گذاشت (Bayraktar et al. 2020). Tiunova و همکاران (۲۰۱۸) اثرات نور و تحریک غیراختصاصی صوت را بر بیان نسبی دو فاکتور رونویسی *c-Fos* و *Egr-1* و نوروتروفین *BDNF* در مغز جنین جوجه‌های اهلی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد، ژن‌های *Egr-1* و *c-Fos* در سطح پایه بالایی بیان شدند و نه نور و نه تحریک صدا بر تعداد سلول‌های بیان‌کننده این عوامل تأثیری نداشت. همچنین mRNA ژن *BDNF* در بعضی از نواحی مغز جنین‌های تحریک نشده وجود داشت، اما تحریک نور و صدا بیان نسبی mRNA ژن *BDNF* را در بخشی از ساختارهای مغز افزایش داد که نشان می‌دهد، *BDNF* احتمالاً در تأثیرات اعلا قبل از تولد و بر رشد رفتار گونه‌های خاص نقش دارد (Tiunova et al. 2018). در مطالعه‌ای بررسی کردند که آیا فعالیت خود به خودی شبکه چشم (SRA) بر حمل‌ونقل آکسونی پروتئین فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (*BDNF*) درون سیستم بینایی جوجه در حال رشد

نظارت دارد یا خیر؟ با توجه به اینکه در طول دوره طبیعی SRA، سطح پروتئین *BDNF* شبکه حدود ۵۰٪ کاهش می‌یابد درحالی‌که سطوح *mRNA BDNF* همچنان بالا می‌ماند؛ تطابق طبیعی بین *mRNA BDNF* شبکه و پروتئین *BDNF* را به‌وسیله محاصره SRA با تترودوتوکسین (TTX)، یا محاصره حمل‌ونقل آکسونی معکوس کردند. نتایج نشان دادند که حمل و نقل آکسونی *BDNF* مشتق از شبکه در بخش‌هایی از عصب بینایی و همچنین پروتئین *BDNF* مشتق از ناحیه تکتوم که در بخش‌هایی از دستگاه بینایی منتقل می‌شوند، هر دو به‌طور قابل‌توجهی پس از دوره‌های بسیار کوتاهی از محاصره فعالیت کاهش یافتند. این نتایج نشان می‌دهد که SRA طبیعی نقشی در تنظیم حمل‌ونقل آکسونی پروتئین *BDNF* درون‌زا ایفا می‌کند (Chytrova and Johnson, 2004). در مطالعه‌ای به بررسی نقش *BDNF* (فاکتور نوروتروفیک مغزی) سیناپتوژن در تعیین آسیب‌پذیری استرس و افسردگی در جوجه‌ها پرداخته شده است. بدین‌صورت که دو سویه، Black Australorps و Production Reds را با تجزیه و تحلیل سطوح بیان نسبی *BDNF* هیپوکامپ آن‌ها در پاسخ به مدت‌زمان‌های مختلف استرس جدایی اجتماعی، مقایسه می‌کند. این مطالعه نشان می‌دهد که Australorps سیاه‌پوست آسیب‌پذیری بیشتری نسبت به استرس جدایی‌های اجتماعی و سطوح *BDNF* هیپوکامپال در طول دوره آزمایش نشان می‌دهد. در مقابل، قرمزهای تولیدی انعطاف‌پذیری بیشتری نسبت به استرس و سطوح *BDNF* پایدار در طول دوره آزمایش نشان می‌دهند. این یافته‌ها به‌خوبی با این مفهوم مطابقت دارند که آسیب‌پذیری استرس وابسته به فشار تا حدی منعکس‌کننده تغییرات بیشتر در مکانیسم‌های هموستاتیک کنترل سیناپتوژن است و تغییر سیناپتوژن با واسطه *BDNF* یکی از عوامل اصلی آسیب‌پذیری استرس و افسردگی است (Loria et al. 2013). به‌علاوه، تولیدات دامی، به ویژه تولیدات طیور نقش حیاتی اجتماعی-اقتصادی برای افرادی که در کشورهای کم‌درآمد آفریقا و آسیا زندگی می‌کنند ایفا می‌کند (Mohammadifar et al. 2014; Moazeni et al. 2016a). طیور اهلی به دلیل فاصله نسلی کوتاه و سازگاری آنها در طیف وسیعی از اکولوژی‌های زراعی، از گونه‌های پرندگانی هستند که پراکندگی گسترده‌ای در سراسر جهان دارند (Mohammadifar and Mohammadabadi, 2018; Moazeni et al. 2016b). مرغ‌های خانگی پروتئین و درآمد با کیفیت بالایی را برای خانوارهای روستایی فقیر فراهم می‌کنند و به‌طور گسترده‌ای نگهداری می‌شوند (Mohammadabadi et al. 2010; Mohammadifar and Mohammadabadi, 2018). این به دلیل وجود صفات ارزشمند مرغ مانند مقاومت به بیماری، سازگاری با محیط‌های سخت و توانایی استفاده از خوراک‌های بی کیفیت است (Shahdadnejad et al. 2016; Khabiri et al. 2023). بنابراین، هدف از این مطالعه ارزیابی افزودن میلووم بر پروفایل بیان ژن *BDNF* در بافت‌های ماهیچه ران، ماهیچه سینه، کبد و طحال جوجه گوشتی بود.

مواد و روش‌ها

برای اندازه‌گیری مقدار بیان نسبی ژن *BDNF*، هنگام کشتار از بافت‌های مختلف ۱۶ قطعه جوجه گوشتی سویه راس نمونه‌برداری شده است. به این منظور ۸۰ قطعه جوجه گوشتی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲ گروه، ۴ تکرار و ۱۰ قطعه جوجه

در هر تکرار تحت تغذیه با میلورم به‌صورت افزودنی موردبررسی قرار گرفتند. هر گروه با جیره‌های آزمایشی شامل (۱) جیره پایه، (۲) جیره پایه + میلورم (۵/۰ درصد) به‌صورت آزاد تغذیه شدند و پس از پایان دوره ۴۲ روزه‌ی پرورشی جوجه‌ها کشتار شدند و از بافت‌های کبد، طحال، ماهیچه ران و سینه آن‌ها نمونه‌برداری انجام شد. طی دوره پرورش، واکسیناسیون علیه سویه‌های نیوکاسل و گامبرو نیز انجام شد. RNA کل با استفاده از کیت غیر ستونی استخراج Total RNA (شرکت دنازیست)، همراه با تغییرات جزئی استخراج شد. پس از استخراج و تخلیص RNA، کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده با الکتروفورز روی ژل آگارز ۲٪ با بافر TBE 1X (۵۰ دقیقه با ولتاژ ۹۴ ولت) و روش نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت. برای ساخت DNA مکمل، از دستورالعمل شرکت سازنده (پارستوس، مشهد) استفاده شد. از آنجاکه توالی ژن‌های موردنظر در بانک ژن موجود بود، آغازگرهای ژن *BDNF* و *GAPDH* بر اساس توالی‌های موجود در بانک ژن ensemble (<http://www.ensembl.org>) و با استفاده از سایت Primer3 plus، Nupack و NCBI طراحی و بررسی شدند (جدول ۱). ساخت آغازگرهای طراحی‌شده توسط شرکت سیناکلون انجام شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای ژن‌های *BDNF* و *GAPDH*
Table 1- Sequences of used primers for *BDNF* and *GAPDH* genes

ژن gene	توالی آغازگرها (5'→3')	طول قطعه (bp) Size of PCR Product (bp)	شماره دسترسی accession number
<i>BDNF</i>	Fwd: GAAGGCTGCAGGGGCATAGA Rev: ACCGCCAGCCAACCTCTCTTT	109	NM_001031616.1
<i>GAPDH</i>	Fwd: TGACCACTGTCCATGCCATC Rev: TAAGCTTCCCATTCAGCTCAGG	162	NM_204305.1

برای انجام واکنش Real-time PCR مستر مخصوص Real-time PCR، آب (ddw) و درنهایت آغازگرهای اختصاصی ژن هدف و ژن مرجع در شرایط کاملاً یکسان استفاده شد. مخلوط واکنش شامل مواد مندرج در جدول ۲ بود و جدول حرارتی در جدول ۳ آورده شده است. سپس منحنی‌های تکثیر و ذوب نیز رسم شدند. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از Relative Real-time PCR از نرم‌افزار Rotor-Gene Q Series Software برای محاسبه راندمان واکنش PCR و محاسبه سیکل آستانه (Cq) استفاده شد. نتایج به‌دست آمده، با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 8 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای ارزیابی تغییرات بیان ژن بین تیمار و شاهد از روش آنالیز آماری One-way ANOVA استفاده شد و با تعیین p-value سطح معنی‌داری نتایج مشخص شد. در تمامی آزمایش‌ها $P < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری آماری در نظر گرفته شد. همچنین در این نرم‌افزار رسم نمودارها با میانگین داده‌ها به‌صورت $\text{Mean} \pm \text{S.E.M}$ برای هر گروه نشان داده شد.

جدول ۲- مقدار و مواد مورد استفاده در هر واکنش Real-time PCR
Table 2 - Amount and materials used in each Real-time PCR reaction

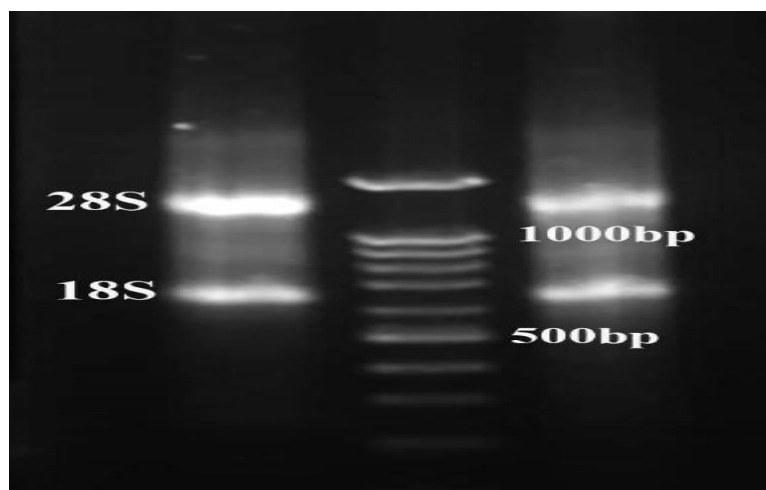
نوع ماده Type of material	مقدار مورد استفاده Amount used
مستر میکس سایبر گرین Master Mix Cyber Green	7.5 μL
آغازگرهای رفت و برگشت Forward and reverse primers	1.5 μL
DNA مکمل cDNA	1 μL
آب مقطر dH2O	تا حجم ۱۵ μL Up to 15 μL volume

جدول ۳- برنامه حرارتی Real-time PCR
Table 3- Real-time PCR thermal program

Time مدت زمان	Temperature درجه حرارت	تعداد سیکل‌ها Number of cycles	مرحله انجام شده Step completed
15 min	95°C	1	واسرشت سازی اولیه Initial denaturation
20 Sec	95°C		واسرشت سازی هر چرخه Denaturation of each cycle
30 Sec	63°C	35	اتصال آغازگر Primer annealing
20 Sec	72°C		سنتز Synthesis
8 min	72°C	1	سنتز نهایی Final Synthesis

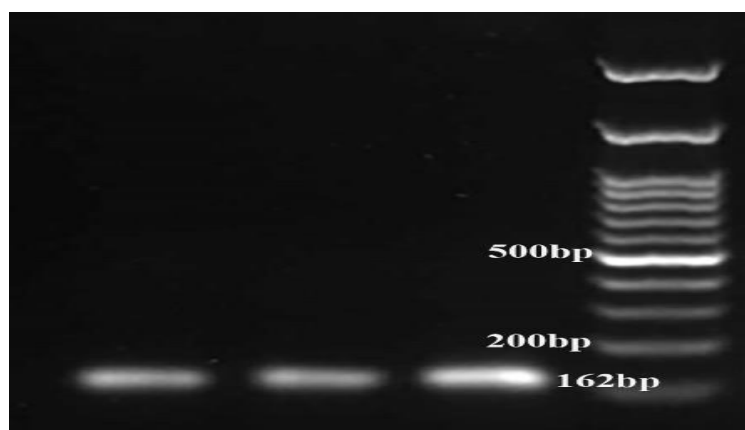
نتایج و بحث

از آنجایی که RNAهای ریبوزومی (rRNAs)، ۷۰ درصد RNAی کل سلول را تشکیل می‌دهند، بنابراین مشاهده‌ی باندهای RNAهای ریبوزومی، به‌صورت شارپ و واضح روی ژل آگارز، می‌تواند نشان‌گر یک استخراج با کیفیت مطلوب باشد. درحالی‌که وجود باندهای تخریب‌شده برای RNAهای ریبوزومی، حاکی از تخریب احتمالی سایر RNAهای سلول و کیفیت پایین تلخیص است. همچنین، در RNA به‌دست‌آمده از نمونه‌های یوکاریوتی، باید شدت باند S۲۸ به باند S۱۸، به نسبت ۲ به ۱ باشد. در بررسی مطالعه حاضر، RNA کل استخراج‌شده دارای باندهای rRNA 18S و rRNA 28S واضح و کاملاً سالم بود (شکل ۱). برای سنجش کمیت، RNA نمونه استخراج‌شده در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. نتایج نشان‌دهنده RNA با غلظت معقول و فاقد آلودگی پروتئینی و الکی بودند. برای سنجش cDNA ساخته‌شده نیز از الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد. نتایج نشان‌دهنده یک تک باند اختصاصی (۱۶۲) تأیید کننده ساخته شدن cDNA برای *GAPDH* بود (شکل ۲). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از نرم‌افزار Rotor-Gene سری Q، منحنی‌های تکثیر ژن *BDNF* و مرجع از سیکل ۲۲-۳۳ شروع به تکثیر کرده، وارد فاز نمایی شدند. در مرحله بعد محصولات در حال تکثیر وارد فاز خطی و درنهایت، وارد فاز آستانه شدند. همچنین، منحنی‌های ذوب در طول واکنش به‌منظور اطمینان از تکثیر اختصاصی ژن‌ها بررسی شدند؛ نمونه‌ها در دمای ۸۱/۵°C یک پیک تولید کردند که نشان‌دهنده تولید محصول اختصاصی می‌باشد. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز ژن *BDNF* در تأیید با نتایج حاصل از منحنی‌های ذوب این ژن بررسی شدند. وجود تک باند نشان‌دهنده اختصاصی عمل کردن واکنش‌ها و تأیید کننده‌ی نتایج منحنی‌های ذوب بود (شکل ۳). در بافت ماهیچه ران، افزودن میلورم در جیره، اثر معنی‌داری ($P<0/05$) برافزایش بیان ژن *BDNF* نسبت به گروه شاهد داشت (شکل ۴). در بافت ماهیچه سینه هم مثل ماهیچه ران، افزودن میلورم در جیره، اثر معنی‌داری ($P<0/05$) برافزایش بیان ژن *BDNF* نسبت به گروه شاهد داشت (شکل ۵). بیان نسبی ژن *BDNF* در بافت کبد در گروه تغذیه‌شده با میلورم تحت تأثیر قرار گرفت. بیان نسبی ژن *BDNF* در این گروه به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) نسبت به شاهد افزایش داشت (شکل ۶). بیان نسبی ژن *BDNF* در بافت طحال تحت تأثیر میلورم قرار نگرفت (شکل ۷). بیشترین مقدار بیان نسبی ژن *BDNF* در ماهیچه‌های ران و سینه بود که با بافت‌های کبد و طحال اختلاف معنی‌داری داشتند ($P<0/005$).



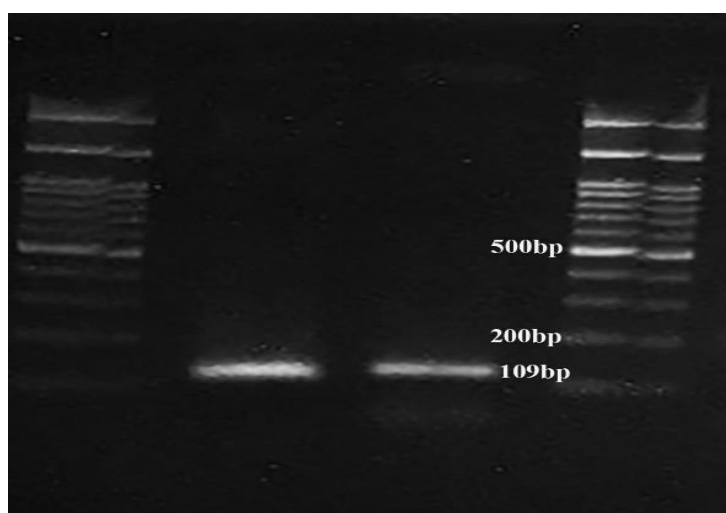
شکل ۱- تصویر نمونه RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۲٪

Figure 1 - Image of extracted RNA sample on 2% agarose gel



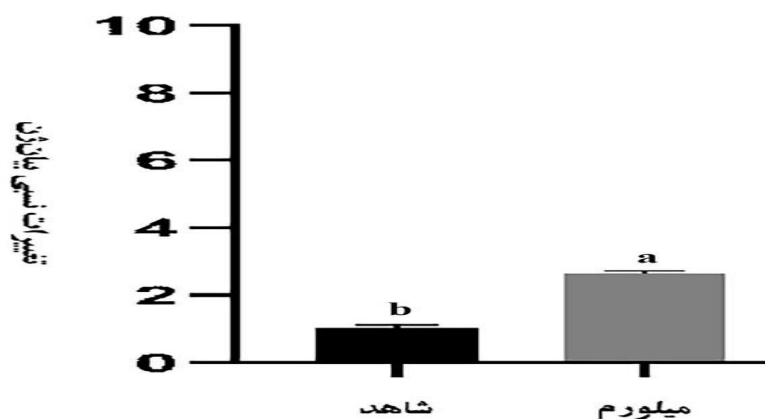
شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR با آغازگر *GAPDH* برای سنجش cDNA ساخت شده

Figure 2- PCR electrophoresis with *GAPDH* primer to measure the synthesized cDNA



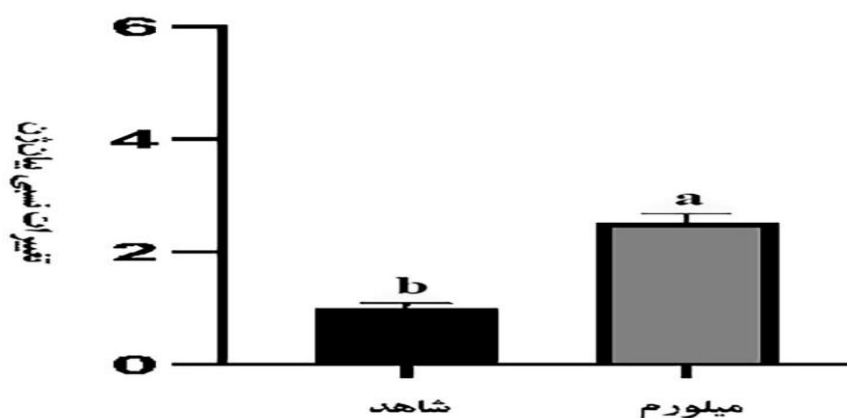
شکل ۳- الکتروفورز محصولات PCR ژن *BDNF*

Figure 3- Electrophoresis of *BDNF* gene PCR products



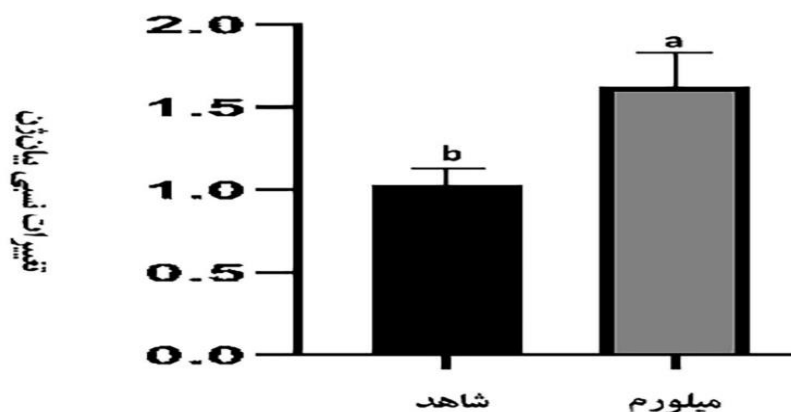
شکل ۴- اثر افزودن میلورم بر بیان ژن *BDNF* در بافت ماهیچه ران جوجه گوشتی (گروه‌هایی که با حروف غیرمشترک نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند ($P<0.05$))

Figure 4 - Effect of adding mealworm on BDNF relative gene expression in broiler femur muscle tissue (groups indicated with different letters have significant differences ($P<0.05$))



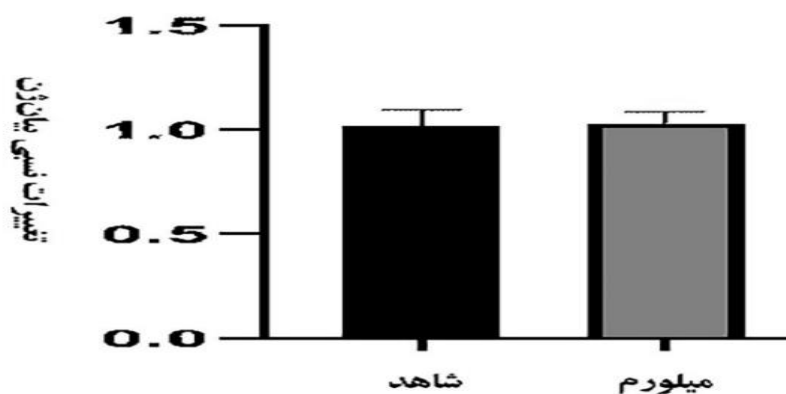
شکل ۵- اثر افزودن میلورم بر بیان نسبی ژن *BDNF* در بافت ماهیچه سینه جوجه گوشتی (گروه‌هایی که با حروف غیرمشترک نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌داری هستند ($P<0.05$))

Figure 5 - Effect of adding mealworm on BDNF relative gene expression in broiler breast muscle tissue (groups indicated with different letters have significant differences ($P<0.05$))



شکل ۶- اثر افزودن میلورم بر بیان نسبی ژن *BDNF* در بافت کبد جوجه گوشتی (گروه‌هایی که با حروف غیرمشترک نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌داری هستند ($P<0.05$))

Figure 6 - Effect of adding mealworm on BDNF relative gene expression in broiler liver tissue (groups indicated with different letters have significant differences ($P<0.05$))

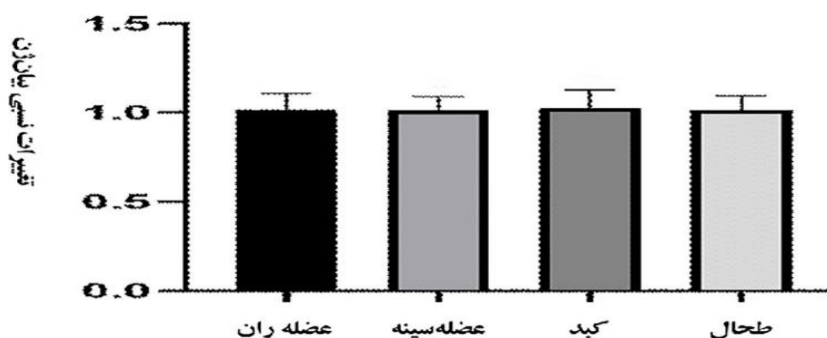


شکل ۷- اثر افزودن میلورم بر بیان نسبی ژن *BDNF* در بافت طحال (گروه‌هایی که با حروف غیرمشترک نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌داری هستند ($P < 0.05$))

Figure 7 - Effect of adding mealworm on *BDNF* relative gene expression in spleen tissue (groups indicated with different letters have significant differences ($P < 0.05$))

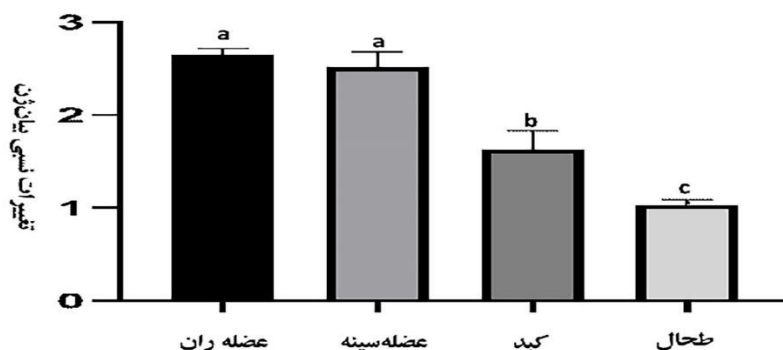
همچنین، بیان نسبی ژن *BDNF* در بافت کبد به‌طور معنی‌داری از بافت طحال بیشتر بود (شکل ۹). بیان نسبی ژن

BDNF در گروه شاهد تحت تأثیر نوع بافت مورد آزمایش قرار نگرفت (شکل ۸).



شکل ۸- تأثیر جیره شاهد بر بیان نسبی ژن *BDNF* در بافت‌های ماهیچه ران، ماهیچه سینه، کبد و طحال (گروه‌هایی که با حروف غیرمشترک نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌داری هستند ($P < 0.05$))

Figure 8- Effect of control diet on *BDNF* relative gene expression in thigh muscle, breast muscle, liver and spleen tissues (groups indicated with different letters have significant differences ($P < 0.05$))



شکل ۹- تأثیر میلورم بر بیان نسبی ژن *BDNF* در بافت ماهیچه ران، ماهیچه سینه، کبد و طحال (گروه‌هایی که با حروف غیرمشترک نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌داری هستند ($P < 0.05$))

Figure 9 - Effect of mealworm on *BDNF* relative gene expression in thigh muscle, pectoral muscle, liver and spleen tissue (groups indicated with different letters have significant differences ($P < 0.05$))

امروزه استفاده از کرم میلورم (*T. molitor*) در جیره طیور علاوه بر تأمین بخشی از پروتئین موردنیاز، نه تنها به کاهش هزینه‌های تولید و بهبود سلامت پرندگان کمک می‌کنند، بلکه تأثیرات مثبتی بر محیط‌زیست نیز دارد. به‌طوری‌که در سال ۲۰۱۶، میلورم به‌عنوان یک ماده خوراکی در کره جنوبی تأیید شد. همچنین، میلورم به‌عنوان منبع پروتئین جایگزین در جیره جوجه‌های گوشتی معرفی شده و می‌تواند بدون تأثیر منفی بر رشد در خوراک آن‌ها گنجانده شود. (Abdel-Hafeez *et al.* 2017). فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (*BDNF*) یک پروتئین کلیدی است که در بقای نورون‌ها، تمایز و شکل‌پذیری سیناپسی نقش دارد و نقش مهمی در سلامت و عملکرد مغز ایفا می‌کند. در جوجه‌های گوشتی، *BDNF* در فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلفی از جمله رشد، نمو و رفتار نقش دارد و درک بیان نسبی و عملکرد *BDNF* در جوجه‌های گوشتی می‌تواند بینش‌هایی را در مورد بهبود رفاه طیور و راندمان تولید ارائه دهد (Bayraktar *et al.* 2020). در مطالعه‌ای بدخشان و همکاران (۲۰۲۱) تأثیر تنش گرمایی بر غلظت کورتیکواسترون (Corticosterone) خون و بیان نسبی ژن فاکتور رشد عصبی مشتق از مغز ناحیه مغز میانی (Diencephalon) جوجه ۷ روزه گوشتی را بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که استرس گرمایی حاد در جوجه ۷ روزه گوشتی قادر به ایجاد اختلال در سیستم هیپوتالاموس، هیپوفیز و فوق کلیوی (Adrenal)، به‌واسطه کاهش بیان نسبی ژن *BDNF* می‌باشد (Badakhshan *et al.* 2021). همچنین در مطالعه‌ای دیگر تغییرات هیستوپاتولوژیک در کبد و روده و پارامترهای مختلف بیوشیمیایی جوجه‌های گوشتی طی ۴۲ روز بررسی شد. ۴۰۰ قطعه جوجه گوشتی در رأس ۳۰۸ به‌طور تصادفی در هشت گروه قرار گرفتند که تحت شرایط دمایی مختلف و دوزهای گروه اسیدهای چرب ضروری (۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌لیتر/لیتر) قرار گرفتند. مشاهده شد که در شرایط بدون استرس، سطح *Apelin* کاهش و سطح *BDNF* افزایش یافت. در گروه‌های تحت استرس، سطوح آپلین افزایش یافت، برخلاف سطوح *BDNF* که در گروه ۲۵۰ به اوج خود رسید. همچنین، افزودن ۲۵۰ میلی‌لیتر/۱۰۰۰ لیتر EOM به آب آشامیدنی بر سطوح سرمی آپلین و *p-BDNF* در جوجه‌های گوشتی تحت استرس به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) تأثیر مثبت گذاشت (Bayraktar *et al.* 2020). با این وجود برخی از مطالعات نشان دادند که *BDNF* در هموستاز انرژی و سیستم‌های مرتبط با رشد نقش دارد، لذا بررسی عملکرد این ژن در بافت، سیستم و مکانیسم‌های متفاوت احساس شد. میلورم در جیره جوجه‌های گوشتی ممکن است بر بیان ژن فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز (*BDNF*) تأثیر مثبت بگذارند که برای سلامت نورون‌ها و عملکرد شناختی ضروری است. میلورم‌ها، غنی از پروتئین و مواد مغذی ضروری هستند و احتمالاً می‌توانند وضعیت کلی تغذیه را بهبود بخشند و سطح استرس را در جوجه‌های گوشتی کاهش دهند که به‌طور بالقوه منجر به افزایش بیان *BDNF* می‌شود. هدف این مطالعه بررسی اثرات میلورم در جیره‌های گوشتی بر بیان نسبی ژن *BDNF* بود. درک این اثرات می‌تواند بینشی در مورد مکانیسم‌های بالقوه‌ای ارائه دهد که از طریق آن مداخلات غذایی می‌تواند سلامت و بهره‌وری طیور را افزایش دهد و در نهایت به سیستم‌های تولید مرغداری پایدارتر و کارآمدتر کمک کند. با بررسی تأثیر متقابل بین این اجزای غذایی و بیان نسبی *BDNF*، می‌توانیم تأثیر کل‌نگر تغذیه بر رفاه و عملکرد جوجه‌های گوشتی را بهتر

درک کنیم. تغذیه از طریق تأثیر متقابل پیچیده عوامل محیطی و اپی‌ژنتیکی بر سلامت، رفاه و تولید تأثیر می‌گذارد که اساساً، منجر به تغییرات در بیان نسبی ژن می‌شود. همچنین، درک بیشتر از تعاملات پیچیده بین تغذیه، محیط و بیان ژن به بهبود سلامت، رفاه و تولید پرندگان کمک می‌کند. برای مثال، تأثیرات بر رشد و عملکرد عصبی، بر جنبه‌های متعدد تولید حیوانات از جمله رشد، متابولیسم و رفاه تأثیر می‌گذارد و مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی که نقش اصلی را در این پاسخ‌ها بازی می‌کنند تا حدی از طریق تغییر در بیان مولکول‌های سیگنال‌دهنده سلولی مانند هورمون‌های تیروئید (TH) و فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (*BDNF*) عمل می‌کنند (Avian and Course, 2014). علاوه بر این، ارتباط مستقیم ماهیچه با عملکرد رشد، اهمیت آن را در تولید طیور افزایش می‌دهد. نشان داده‌شده که در ماهیچه‌ها، ژن‌های *BDNF* و *c-FOS* بیان‌شده در هیپوتالاموس به سلول‌ها کمک می‌کند تا با محیط نامطلوب سازگار شوند. در نتیجه، پروفایل بیان ژن هیپوتالاموس ژن‌های *BDNF* و *c-FOS* می‌تواند به‌طور مؤثر برای ارزیابی امکان سازگاری با محیط نامطلوب مورد استفاده قرار گیرد (Goel et al. 2021). به‌عنوان مثال در مطالعه‌ای هنگامی که جوجه‌های ۳ روزه به مدت ۶ ساعت در معرض دمای بالا (۳۷٫۵ درجه سانتی‌گراد) و پایین (۳۰ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند، بیان *BDNF* به ترتیب هفت و سه برابر افزایش یافت که نشان‌دهنده نقش آن در سازگاری القایی است (Heinrich, 2003). علاوه بر این، در طول محرک‌های ورزشی، *BDNF* به‌طور مستقیم به تقویت اتصالات عصبی عضلانی، بازسازی عضلات، جذب گلوکز تنظیم‌شده توسط انسولین و فرآیندهای اکسیداسیون β در بافت عضلانی کمک می‌کند (Rentería et al. 2022). در مطالعه حاضر، افزودن میلورم اثر معنی‌داری ($P < 0.05$) بر افزایش بیان نسبی ژن *BDNF* در بافت‌های ماهیچه سینه و ران نسبت به گروه شاهد داشتند. به نظر می‌رسد میلورم در جیره‌ی جوجه‌های گوشتی می‌تواند به‌طور بالقوه بیان نسبی ژن *BDNF* را در بافت عضلانی از طریق بهبود تغذیه، کاهش استرس، سلامت بهتر روده و کاهش التهاب افزایش دهد. این رویکرد ممکن است منجر به بهبود رشد عضلانی، بهبودی و عملکرد کلی در جوجه‌های گوشتی شود و اهمیت استراتژی‌های غذایی در مدیریت طیور برای بهینه‌سازی رفاه و بهره‌وری حیوانات را برجسته کند. کبد اندام متابولیک مرکزی در کنترل هموستاز متابولیک است و به‌عنوان محل اولیه متابولیسم لیپید عمل می‌کند، جایی که بیش از ۹۰ درصد اسیدهای چرب جوجه‌ها سنتز می‌شود. همچنین، متابولیسم لیپید کبدی با متابولیسم گلوکز در بیماری‌های کبدی تعامل نزدیک دارد. چراکه کبد گلوکز را به شکل گلیکوژن ذخیره می‌کند و گلوکز را با گلیکوژنولیز یا گلوکونئوز در گردش آزاد می‌کند (Kang et al. 2024). آسیب کبدی ناشی از استرس منجر به آسیب به سلول‌های کبدی (سلول‌های پارانشیمی و سینوسی) می‌شود. پس از پرفیوژن، سلول کوپفر رادیکال‌های آزاد و سیتوکین‌های پیش التهابی را آزاد می‌کند. این سیتوکین‌ها همراه با افزایش بیان مولکول‌های چسبنده توسط سلول‌های اندوتلیال سینوسی، باعث نفوذ نوتروفیل‌ها به کبد و آسیب به بافت‌ها می‌شوند. بیان‌شده است که میلورم با وجود داشتن پپتیدهای زیست فعال با خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی به دنبال کاهش نفوذ نوتروفیل‌ها، از بافت کبد محافظت می‌کنند (Bayraktar, Tekce, Aksakal, et al. 2020). این پپتیدها دارای مزایای سلامتی بالقوه هستند و می‌توانند در جریان

خون به اهداف مختلف بروند. آن‌ها ممکن است از سد خونی مغزی عبور کنند و احتمالاً با سلول‌های سیستم عصبی تعامل کنند، بیان ژن را در میکروگلیا تعدیل کنند و التهاب را کاهش دهند. در مطالعه حاضر، بیان نسبی ژن *BDNF* در بافت کبد در جوجه‌های تغذیه‌شده با میلورم تحت تأثیر قرار گرفت. بیان نسبی ژن *BDNF* در این گروه به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) نسبت به سایر گروه‌ها افزایش داشت. به نظر می‌رسد که افزودن میلورم در جیره‌های جوجه‌های گوشتی می‌تواند با افزایش سنتز پروتئین، ارتقای متابولیسم لیپید مطلوب و به‌طور بالقوه افزایش بیان نسبی *BDNF* منجر به بهبود سلامت کبد شود. این اثرات در مجموع از عملکردهای متابولیک بهتر در کبد پشتیبانی می‌کنند و در نهایت به بهبود سلامت کلی و عملکرد رشد در جوجه‌های گوشتی کمک می‌کنند.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر اثر تغذیه میلورم در جیره طیور بر بیان نسبی ژن *BDNF* در بافت‌های مختلف جوجه‌های گوشتی بررسی شد. نتایج نشان داد که افزودن میلورم در جیره جوجه‌های گوشتی اثر معنی‌داری ($P < 0.05$) برافزایش بیان نسبی ژن *BDNF* در بافت‌های ماهیچه ران و ماهیچه سینه دارد. نتایج همچنین نشان داد که بیان نسبی ژن *BDNF* در بافت کبد در جوجه‌های تغذیه‌شده با میلورم تحت تأثیر قرار گرفت و بیان نسبی ژن در این گروه به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) نسبت به سایر گروه‌ها افزایش داشت. به‌طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت که افزودن میلورم در جیره جوجه‌های گوشتی باعث تغییر بیان نسبی ژن *BDNF* در بافت‌های عضلانی مرتبط با رشد می‌شود که با توجه به ارتباط حیاتی این ژن با بسیاری از مکانیسم‌های فیزیولوژیک از جمله تقویت اتصالات عصبی عضلانی، بازسازی عضلات، جذب گلوکز تنظیم‌شده توسط انسولین و فرآیندهای اکسیداسیون β در بافت عضلانی، می‌توان با انجام آزمایش‌های تکمیلی و درک مکانیسم‌های مربوطه برای تغییر بیان نسبی این ژن در بافت‌های هدف از افزودن میلورم استفاده کرد.

منابع

Abdel-Hafeez, H., Saleh, E., Tawfeek, S., Youssef, I., & Abdel-Daim, A. (2017). Effects of probiotic prebiotic and synbiotic with and without feed restriction on performance hematological indices and carcass characteristics of broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30(5): 672-682.

Avian, F., & Course, N. (2014). Nutrition environment and gene expression: impact on health welfare and production. *FACTA Avian Nutrition Course*, 20: 27-28.

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

Ballitoc, D., & Sun, S. (2013). Ground Yellow Mealworms (*Tenebrio molitor* L.) Feed Supplementation Improves Growth Performance and Carcass Yield Characteristics in Broilers. *Open Science Repository Agriculture*, e23050425.

Bayraktar, B., Tekce, E., Aksakal, V., Gül, M., Takma, Ç., Bayraktar, S., Bayraktar, F., & Eser, G. (2020). Effect of the addition of essential fatty acid mixture to the drinking water of the heat

stress broilers on adipokine (Apelin BDNF) response histopathologic findings in liver and intestines and some blood parameters. *Italian Journal of Animal Science*, 19(1): 656-666.

Bayraktar, B., Tekce, E., Kaya, H., Karaalp, M., & Turunc, E. (2020). The impact of dietary tarragon (*Artemisia dracuncululus*) on serum apelin brain-derived neurotrophic factor cardiac troponin concentrations and histopathology of liver tissue in laying hens housed at different stocking densities. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 65(6): 269-279.

Bellezza Oddon, S., Biasato, I., Imarisio, A., Pipan, M., Dekleva, D., Colombino, E., Capucchio, M., Meneguz, M., Bergagna, S., Barbero, R., Gariglio, M., Dabbou, S., Fiorilla, E., Gasco, L., & Schiavone, A. (2021). Black soldier fly and yellow mealworm live larvae for broiler chickens: Effects on bird performance and health status. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 105(S1): 10-18.

Berkemeier, L., Winslow, J., Kaplan, D., Nikolics, K., Goeddel, D., & Rosenthal, A. (1991). Neurotrophin-5: A novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron Journal*, 7(5): 857-866.

Bovera, F., Loponte, R., Marono, S., Piccolo, G., Parisi, G., Iaconisi, V., Gasco, L., & Nizza, A. (2016). Use of *Tenebrio molitor* larvae meal as protein source in broiler diet: Effect on growth performance nutrient digestibility and carcass and meat traits. *Journal of Animal Science*, 94(2): 639-647.

Bovera, F., Piccolo, G., Gasco, L., Marono, S., Loponte, R., Vassalotti, G., Mastellone, V., Lombardi, P., Attia, Y., & Nizza, A. (2015). Yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor* L.) as a possible alternative to soybean meal in broiler diets. *British Poultry Science*, 56(5): 569-575.

Chytrova, G., & Johnson, J. (2004). Spontaneous retinal activity modulates BDNF trafficking in the developing chick visual system. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 25(4): 549-557.

Conner, J., Lauterborn, J., Yan, Q., Gall, C., & Varon, S. (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). protein and mRNA in the normal adult rat CNS: Evidence for anterograde axonal transport. *Journal of Neuroscience*, 17(7): 2295-2313.

Ernfors, P., Ibáñez, C., Ebendal, T., Olson, L., & Persson, H. (1990). Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: Developmental and topographical expression in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(14): 5454-5458.

Ghaly, A., & Alkoai, F. (2009). The yellow mealworm as a novel source of protein. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 4(4): 319-331.

Goel, A., Ncho, C., & Choi, Y. (2021). Regulation of gene expression in chickens by heat stress. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12(1): 11.

Götz, R., Köster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Scharl, M., & Thoenen, H. (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature*, 372(6503): 266-269.

Hall, H., O'Neill, H., Scholey, D., Burton, E., Dickinson, M., & Fitches, E. (2018). Amino acid digestibility of larval meal (*Musca domestica*) for broiler chickens. *Poultry Science*, 97(4): 1290-1297.

Heinrich, G. (2003). A novel BDNF gene promoter directs expression to skeletal muscle. *BMC Neuroscience*, 4(1): 11.

Hussain, I., Khan, S., Sultan, A., Chand, N., Khan, R., Alam, W., & Ahmad, N. (2017). Meal worm (*Tenebrio molitor*). as potential alternative source of protein supplementation in broiler. *International Journal of Biosciences*, 10(04): 255-262.

Kang, S., Christensen, K., Jr, M., & Orlowski, S. (2024). Effects of Environmental Enrichments on Welfare and Hepatic Metabolic Regulation of Broiler Chickens. *Animals*, (14): 4.

Khabiri, A., Toroghi, R., Mohammadabadi, M., & Tabatabaeizadeh, S. (2022). Cloning and nucleotide sequencing of the complete matrix protein of Newcastle disease virus subgenotype VII. 1.1 prevalence in broiler flocks of northeastern Iran. *Modern Genetic Journal*, 17(2): 113-125.

- Khabiri, A., Toroghi, R., Mohammadabadi, M., & Tabatabaeizadeh, SE. (2023).** Introduction of a Newcastle disease virus challenge strain (sub-genotype VII. 1.1). isolated in Iran. *Veterinary Research Forum*, 14(4): e221.
- Klein, R., Nanduri, V., Jing, S., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K., Reichardt, L., & Barbacid, M. (1991).** The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell*, 66(2): 395–403.
- Kolbeck, R., Jungbluth, S., & Barde, Y. (1994).** Characterisation of Neurotrophin Dimers and Monomers. *European Journal of Biochemistry*, 225(3): 995–1003.
- Lapchak, P., & Hefti, F. (1992).** BDNF and NGF treatment in lesioned rats: Effects on cholinergic function and weight gain. *Neuro Report*, 3(5): 405–408.
- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengeler, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., & Barde, Y. (1989).** Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*, 341(6238): 149–152.
- Levi-Montalcini, R. (1987).** The nerve growth factor: thirty-five years later. *The EMBO Journal*, 6(5): 1145–1154.
- Loria, M., White, S., Robbins, S., Salmeto, A., Hymel, K., Murthy, S., Manda, P., & Sufka, KJ. (2013).** Brain-derived neurotrophic factor response in vulnerable and resilient genetic lines in the chick anxiety-depression model. *Behavioural Brain Research*, 245., 29–33.
- Maisonpierre, P., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N., Furth, M., Lindsay, R., & Yancopoulos, G. (1990).** Neurotrophin-3: A neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*, 247(4949): 1446–1451.
- Moazeni, S., Mohammadabadi, MR., Sadeghi, Moradi Shahrababak, H., Esmailizadeh Koshkoie, A., & Bordbar, F. (2016a).** Association between UCP Gene Polymorphisms and Growth., Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in Mazandaran Indigenous Chicken. *Open Journal of Animal Science*, 6: 1-8.
- Moazeni, SM., Mohammadabadi, MR., Sadeghi, & Moradi Shahrababak. (2016b).** Association of the melanocortin-3(MC3R). receptor gene with growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. *Journal of Livestock Science and Technology*, 4., 51-56.
- Mohammadabadi, MR., Nikbakhti, M., Mirzaee, H., M, Shandi., D Saghi, M Romanov, & I Moiseyeva(2010).** Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics*, 46(4): 505-509
- Mohammadifar, A., Faghieh Imani, SA., Mohammadabadi, MR., & Soflaei, M. (2014).** The effect of TGFβ3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. *Agricultural Biotechnology Journal*, 5: 125-136.
- Mohammadifar, A., & Mohammadabadi, MR. (2017).** Effect of Uncoupling Protein Polymorphisms on Growth., Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in the Fars Indigenous Chicken. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 7., 679-685.
- Mohammadifar, A., & Mohammadabadi, MR. (2018).** Melanocortin-3 receptor (MC3R). gene association with growth and egg production traits in Fars indigenous chicken. *Malaysian Applied Biology*, 47: 85–90.
- Mousavi, K., & Jasmin, B. (2006).** BDNF is expressed in skeletal muscle satellite cells and inhibits myogenic differentiation. *Journal of Neuroscience*, 26(21): 5739–5749.
- Naert, G., Ixart, G., Tapia-Arancibia, L., & Givalois, L. (2006).** Continuous i.c.v. infusion of brain-derived neurotrophic factor modifies hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity locomotor activity and body temperature rhythms in adult male rats. *Neuroscience*, 139(2): 779–789.
- Rentería, I., García-Suárez, P., Fry, A., Moncada-Jiménez, J., Machado-Parra, J., Antunes, B., & Maldonado, A. (2022).** The Molecular Effects of BDNF Synthesis on Skeletal Muscle: A Mini-Review. *Frontiers in Physiology*, 13: 934714.

- Sedgh-Gooya, S., Torki, M., Darbemamieh, M., Khamisabadi, H., Karimi, Torshizi, M., & Abdolmohamadi, A. (2021).** Yellow mealworm *Tenebrio molitor* (Col: Tenebrionidae). larvae powder as dietary protein sources for broiler chickens: Effects on growth performance carcass traits selected intestinal microbiota and blood parameters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 105(1): 119–128.
- Selaledi, L., Baloyi, J., Mbajorgu, C., Sebola, A., de Kock, H., & Mabelebele, M. (2021).** Meat quality parameters of boschveld indigenous chickens as influenced by dietary yellow mealworm meal. *Foods*, 10(12): 3094.
- Shahdadnejad, N., Mohammadabadi, MR., & Shamsadini, M. (2016).** Typing of *Clostridium Perfringens* Isolated from Broiler Chickens Using Multiplex PCR. *Genetic in the Third millennium*, 14 (4): 4368-4374.
- Tiunova, A., Komissarova, N., & Anokhin, K. (2018).** Prenatal Sensory Stimulation Induces *BDNF* Gene Expression in the Brain and Potentiates the Development of Species-Specific Predisposition in Newborn Chicks. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 166(2): 229–232.
- Ukropec, J., Ukropcova, B., Kurdiova, T., Gasperikova, D., & Klimes, I. (2008).** Adipose tissue and skeletal muscle plasticity modulates metabolic health. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 114(5): 357–368.
- Wang, C., Bomberg, E., Billington, C., Levine, A., & Kotz, C. (2010).** Brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*). in the hypothalamic ventromedial nucleus increases energy expenditure. *Brain Research*, 1336: 66–77.
- Wu, J., Yang, D., Gong, H., Qi, Y., Sun, H., Liu, Y., Liu, Y., & Qiu, X. (2020).** Multiple omics analysis reveals that high fiber diets promote gluconeogenesis and inhibit glycolysis in muscle. *BMC Genomics*, 21(1): 660.
- Yamanaka, M., Itakura, Y., Ono-Kishino, M., Tsuchida, A., Nakagawa, T., & Taiji, M. (2008).** Intermittent administration of brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*). ameliorates glucose metabolism and prevents pancreatic exhaustion in diabetic mice. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(4): 395–402.
- Yamanaka, M., Itakura, Y., Tsuchida, A., Nakagawa, T., & Taiji, M. (2008).** Brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*). prevents the development of diabetes in prediabetic mice. *Biomedical Research*, 29(3): 147–153.
- Yamanaka, M., Tsuchida, A., Nakagawa, T., Nonomura, T., Ono-Kishino, M., Sugaru, E., Noguchi, H., & Taiji, M. (2007).** Brain-derived neurotrophic factor enhances glucose utilization in peripheral tissues of diabetic mice. *Diabetes Obesity and Metabolism*, 9(1): 59–64.
- Yang, Y., Cong, W., Liu, J., Zhao, M., Xu, P., Han, W., Wang, D., & Zhao, R. (2022).** Constant light in early life induces fear-related behavior in chickens with suppressed melatonin secretion and disrupted hippocampal expression of clock- and *BDNF*-associated genes. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13(1): 67.
- Zarei, H., Akhlaghi, H., & Zendehtdel, M. (2024).** The effect of brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*). on food consumption of broilers: Role of serotonergic receptors. *The Journal of Poultry Sciences and Avian Diseases*, 2(4): 1–8.
- Zheng, F., & Wang, H. (2009).** NMDA-mediated and self-induced *BDNF* exon IV transcriptions are differentially regulated in cultured cortical neurons. *Neurochemistry International*, 54(5–6): 385–392.