تولیدات دامی
دوره ۲۳ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۴۰۰
صفحه‌های ۳۰۲-۲۹۳
DOI: 10.22059/jap.2021.314795.623578

مقاله پژوهشی

تغییرات فراسنجه‌های بافت‌شناسی و بیان نسبی ژن TGF-β4 و StAR در بیضه خروس‌های تغذیه‌شده با کوآنزیم Q10 و اسیدهای چرب امگا۳

حمیدرضا سالاری[۱]، یوسف جعفری آهنگری[۲*]، زربخت انصاری پیرسرایی[۳]
۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲. استاد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۳. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۹/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۱۲/۰۵

چکیده
در این پژوهش، اثر تغذیه کوآنزیم Q10 و اسیدهای چرب امگا۳ بر بافت‌شناسی و بیان نسبی ژن‌های TGF-β4 و StAR در بیضه خروس‌های نژاد هوبارد بررسی شد. تعداد ٤٨ خروس در سن ۵۰ هفتگی به‌صورت تصادفی به چهار گروه مساوی تقسیم شدند و جیره پایه به اضافه سطوحی از کوآنزیم Q10 و امگا۳ شامل صفر، ۳۰ گرم در کیلوگرم امگا۳ (سالومگا)، ٤۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کوآنزیم Q10 و مخلوط کوآنزیم Q10 و امگا۳ (۳۰+٤۰۰) در روز به‌مدت هشت هفته متوالی دریافت کردند. در پایان آزمایش خروس‌ها کشتار و بیضه‌ها به دقت خارج شدند. سپس دو نمونه از یک بیضه از هر تکرار برداشته شد، یک نمونه برای بررسی بافت‌شناسی به درون محلول فرمالین ۱۰ درصد و یک نمونه جهت بررسی بیان نسبی ژن به درون ازت مایع منتقل شد. نتایج نشان داد که قطر لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵)، ولی تعداد سلول‌های سرتولی و لایدیگ تفاوت معنی‌داری نداشت. بیان نسبی ژن TGF-β4 در سه گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد کاهش یافت (P<۰/۰۵). اما بیان نسبی ژن StAR در پرندگانی که با استفاده از مخلوطی از کوآنزیم Q10 و امگا۳ (سالومگا) تغذیه شدند، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). براساس نتایج این مطالعه اضافه‌نمودن مخلوطی از کوآنزیم Q10 و اسیدهای چرب امگا۳ در خوراک خروس‌ها، فراسنجه‌های بافت‌شناسی و بیان ژن‌های مرتبط با اسپرم‌سازی را بهبود می‌بخشد.

کلیدواژه‌ها: اسیدهای چرب امگا۳، باروری، سلول سرتولی، سلول لایدیگ، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز.

Changes of testis histology parameters and relative expression of TGF-β4 & StAR genes in roosters fed CoQ10 and omega 3 fatty acids

Hamid Reza Salari[1], Yousef Jafari Ahngari[2*], Zarbakht Ansari pirsaraei[3]
1. Ph.D. Candidate, Department of Animal genetic, breeding and physiology, Faculty of Animal science, University of Agricultural and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2. Professor, Department of Animal genetic, breeding and physiology , Faculty of Animal science, University of Agricultural and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Science Natural Resources University, Sari, Iran.
Received: December 8, 2020 Accepted: February 23, 2021

Abstract
In this research, the effect of feeding coQ10 and omega 3 fatty acids on testicular histology and relative expression of TGF-β4 & StAR genes in Hubbard roosters was investigated. Forty-eight roosters, at fifty weeks age, were randomly divided into four groups and were subjected to the basal diet supplemented with omega-3 (30gr), coQ10 (400mg) and omega-3+ coQ10 (30gr+400mg) per day for eight successive weeks. At the end of the trial, all birds were killed and two samples were collected from the same testicle one of which was processed for histology, whereas another was snap-frozen in liquid nitrogen to assess relative gene expression. Results showed that seminiferous tubule diameters of experimental groups were significantly improved compared to the control group (P<0.05). However, leydig cell numbers and sertoli cells were not significantly affected. The relative expression of TGF-β4 genes were significantly decreased in three groups compared to control (P<0.05). Birds fed coQ10 and omega-3 had significantly higher StAR transcript level compared to other groups (P<0.05). Results of the present study showed that addition of a mixture of coQ10 and omega-3 fatty acids to rooster`s feed, lead to improvement in testicular histology and genes expression related to spermatogenesis.

Keywords: Omega 3 fatty acids, Fertility, Leydig cells, seminiferous tubule diameters, Sertoli cells.

* نویسنده مسئول Email: jafari@gau.ac.ir

مقدمه

یکی از مهم‌ترین نگرانی‌ها در مدیریت تولیدکنندگان مرغ مادر گوشتی، تولید انبوه تخم‌های بارور است که می‌تواند به جوجه تبدیل شود. عملکرد تولیدمثلی و باروری در پرندگان تحت تأثیر خروس و مرغ قرار می‌گیرد، با توجه به این‌که هر خروس حدود ده قطعه مرغ مادر را در جفت‌گیری طبیعی تحت پوشش قرار می‌دهد، بنابراین در حفظ باروری گله دارای اهمیت بیش‌تری می‌باشد [۳]. در یک گله تجاری با خروس‌های پیر، به‌ویژه پس از سن ٤٥ هفتگی، شاخص ابعادی و وزنی بیضه، تعداد سلول‌های سرتولی، تولید اسپرم و غلظت تستوسترون کاهش یافته که در پی آن قدرت جفت‌گیری و باروری نیز کاهش می‌یابد [۱۸ و ۲۰]. پژوهش‌ها نشان داد که افزودن اسیدهای چرب ضروری مانند امگا۳ در رژیم غذایی پرندگان موجب بهبودی PUFA غشای اسپرم می‌شود [۱۹ و ٢٤]. با این‌حال، مطالعات دیگر گزارش دادند که مکمل امگا۳ ممکن است اثرات نامطلوبی بر اسیدهای چرب دیواره سلول و کیفیت اسپرم در حیوان داشته باشد [۱۷ و ۷]. بنابراین، استفاده از یک آنتی‌اکسیدان قوی مانند کوآنزیم Q10 همراه با اسیدهای چرب امگا۳ در رژیم غذایی ممکن است اثرات نامطلوب اسیدهای چرب امگا۳ را خنثی کند یا اثر تقویت‌کننده‌ای بر عملکرد تولیدمثلی و باروری داشته باشد. مطالعات انجام‌شده در گونه‌های مختلف به‌خوبی نشان دادند که افزایش سن همراه با افزایش تنش اکسیداتیو و کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی ارتباط دارد، که منجر به صدمه جدی به ساختارهای سلولی از جمله میتوکندری می‌شود [۲۳].

کاهش عملکرد تولیدمثل خروس‌های مادر گوشتی پس از پیک تولید، از جمله عواملی است که در کاهش باروری گله‌های مرغ مادر نقش دارد. تغییر در ساختار بافت بیضه و تشدید تنش‌های اکسیداتیو ناشی از افزایش سن، منجر به کاهش باروری می‌شود [۱۱ و ۲]. مشخص شده است که افزایش تنش‌های اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در خروس‌های مادر گوشتی پس از پیک تولید، عملکرد میتوکندری‌ها را کاهش و پراکسیداسیون لیپیدها در بیضه را افزایش می‌دهد [٦]. با وجود غلظت پایین اکسیژن در بافت بیضه، به‌دلیل حضور میزان بالای اسید چرب غیراشباع و سامانه تولیدکننده ترکیبات واکنش‌گر اکسیژن، مستعد تنش اکسیداتیو است. ترکیبات واکنش‌گر اکسیژن عمده شامل آنیون سوپراکسید، پراکسیدهیدروژن و یون هیدرواکسیل است [۲۲].

ترکیب اسیدهای چرب دیواره اسپرم یک عامل تعیین‌کننده در انعطاف‌پذیری مورد نیاز اسپرم برای حرکت نرمال است. همبستگی مثبت بین درصد اسید چرب سری امگا۳ و تحرک اسپرم وجود دارد [۸]. تولید تخم مرغ‌های بارور بستگی به چهار عامل اصلی به‌ترتیب شامل توانایی و تمایل خروس به جفت‌گیری، تعداد کافی اسپرم و مقدار مناسب مایع منی و اسپرم، قدرت پذیرش مرغ، شرایط مناسب مجرای اویداکت که می‌تواند تحت تأثیر تغذیه قرار گیرد [۹].

کوآنزیم Q10 با فرمول شیمیایی ($4C59H90O$) یک ترکیب محلول در چربی غشایی تمام سلول‌ها است، در انتقال الکترون از کمپلکس یک و دو به کمپلکس سه در زنجیره تنفسی نقش دارد [۹]. اسیدهای غیراشباع بلند زنجیر سری امگا۳ با تبدیل به ایکوزان‌ها (Eicosapentaenoic acid: EPA) و دکوزان‌ها (Docosahexaenoic acid: DHA) به‌عنوان پیش‌ساز با عملکرد حیاتی در تولیدمثل از قبیل شرکت در ساختار پروستاگلاندین، غشای سلولی و پیش‌سازهای برخی هورمون‌ها، می‌توانند نقش‌های مهمی را در افزایش قدرت باروری و هم‌چنین بهبود سامانه ایمنی ایفا نمایند [۲۱]. خانواده TGF-β نقش مهمی را در تقسیم سیتوپلاسم پس از تقسیم هسته و نیز نقش مهمی در پیام‌رسانی بین‌سلولی جهت هموستازی و توسعه بافت‌ها

دارند [۱۶]. افزایش سن، کاهش سطح رونویسی پروتئین StAR و بنابراین نقص در انتقال کلسترول به درون میتوکندری از دلایل کاهش استروئیدسازی و غلظت تستوسترون در سلول‌های لایدیگ موش صحرایی گزارش شده است. وجود همبستگی بالا بین تولید تستوسترون و بیان زن StAR نشان می‌دهد که افزایش ترشح تستوسترون ممکن است ناشی از انتقال کلسترول به درون میتوکندری باشد [۱۴].

بنابراین هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر کوآنزیم Q10 و اسیدهای چرب امگا۳ بر برخی فراسنجه‌های بافت‌شناسی شامل تعداد سلول‌های سرتولی، تعداد سلول‌های لایدیگ و قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و بیان نسبی ژن‌های TGF-β4 و StAR مرتبط با اسپرم‌سازی در بیضه خروس‌های مولد گوشتی بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام آزمایش از یک گله تجاری مادر گوشتی نژاد هوبارد در سن ۴۹ هفتگی، تعداد ۴۸ قطعه خروس مادر گوشتی (با وزن ۹۰/۹۹±۴۵۷۶/۰۵ گرم) انتخاب و روی بستر، به ۱۶ جایگاه تفکیک شده، منتقل شدند. قبل از ورود خروس‌ها، کف بستر با پوشال به ضخامت ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر پوشانیده شد. در هر جایگاه آزمایشی سه قطعه خروس قرار گرفت. واحدهای آزمایشی به ابعاد ۱/۲۵×۱ متر و مجهز به دان‌خوری و آب‌خوری زنگوله‌ای بود. آب مصرفی به‌صورت آزاد در اختیار خروس‌ها قرار گرفت. برنامه نوری نیز به‌صورت ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت خاموشی اجرا شد. توزیع خوراک ۲۰ دقیقه پس از شروع روشنایی انجام و میزان مصرف خوراک براساس وزن بدن و توصیه کاتالوگ پرورشی گله مادر گوشتی نژاد هوبارد تنظیم شد [۷]. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار بدون اسیدهای چرب امگا۳ (مکمل سالومگا) و کوآنزیم Q10 در جیره غذایی، تیمار با اسیدهای چرب امگا۳ (مکمل سالومگا) ۳۰ گرم در کیلوگرم جیره غذایی، تیمار با کوآنزیم Q10 ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی، تیمار با مخلوط اسیدهای چرب امگا۳ (مکمل سالومگا) و کوآنزیم Q10 (۳۰+۴۰۰) در جیره غذایی بودند که به‌طور تصادفی هر تیمار به چهار تکرار و سه خروس در هر تکرار اختصاص داده شد.

مقدار مشخص کوآنزیم Q10 و اسیدهای چرب امگا۳ (سالومگا) در یک کیلوگرم خوراک به‌خوبی مخلوط و سپس به جیره‌ها افزوده شد. جیره آزمایشی شامل جیره پایه حاوی ۲۷۰۰ کیلوکالری انرژی متابولیسمی و ۱۱/۵ درصد پروتئین بر پایه ذرت و سویا تأمین شد (جدول ۱). خوراک خروس‌ها طی یک بار خوراک‌دهی در کل روز به‌صورت یکجا ۲۰ دقیقه پس از روشنایی در اختیار آن‌ها قرار گرفت. کوآنزیم Q10 از کمپانی (Webber naturals, Canada) و امگا۳ (مکمل سالومگا) از کمپانی AGRITECH، کشور ایرلند که توسط شرکت گلبار نوید بهار وارد شده بود، تهیه شد. خروس‌های آزمایش در پایان هفته هشتم نگهداری و در سن ۵۸ هفتگی کشتار شدند و بیضه‌های آن‌ها به دقت جدا شده و دو نمونه از یک بیضه (سمت چپ) برداشته شد. نمونه اول برای بررسی بافت‌شناسی به درون محلول بوئن و نمونه دوم برای ارزیابی بیان نسبی ژن به درون ازت مایع منتقل شد.

نمونه‌های بافت بیضه به‌مدت ۲۴ ساعت در درون محلول فیکساتیو بوئن (حاوی ۷۰ بخش اسید پیریک، ۲۵ بخش فرمالین (۴۰ درصد) و ۵ بخش استیک گلسیال) تثبیت شد. سپس توسط فرمالین ۱۰ درصد به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه به درون دستگاه اتوتکنیکون (مدل: DS/2080/H شرکت دید سبز، ایران) انتقال داده شدند. این دستگاه کار تثبیت، آب‌گیری و تمایز نمونه‌های بافتی را برای حفظ ساختار سلولی به‌صورت اتوماتیک انجام می‌دهد تا اجزای سلولی نمونه به شکل درست در زیر میکروسکوپ نوری یا الکترونی مشاهده شود. محلول‌های دستگاه به‌ترتیب

شامل محلول یک و دو حاوی فرمالین ۱۰ درصد، محلول سه حاوی الکل ۷۰ درصد، محلول چهار حاوی الکل ۸۰ درصد، محلول پنج حاوی الکل ۹۰ درصد، محلول شش حاوی الکل ۹٦ درصد به‌منظور آبگیری، محلول هفت و هشت حاوی الکل ۱۰۰ درصد (هرکدام به‌مدت سه دقیقه)، محلول نه و ده حاوی گزیلول ۱۰۰ درصد جهت شفاف‌سازی بافت و خروج الکل و محلول یازده و دوازده حاوی پارافین بود.

جدول ۱. مواد خوراکی و ترکیب مواد مغذی جیره خروس‌های مادر گوشتی

مواد خوراکی	مقدار (درصد)
ذرت	٦٨/٨٦
کنجاله سویا (٤٤ درصد)	۳/۵
سبوس گندم	٢٤/٨٩
دی کلسیم فسفات	۱/۳۰
صدف	۰/۵۱
نمک طعام	۰/۳۲
مکمل ویتامینی[1]	۰/۲۵
مکمل معدنی[2]	۰/۲۵
دی- ال- متیونین (۹۹ درصد)	۰/۱۲
مجموع	۱۰۰
ترکیب مواد مغذی	
انرژی قابل متالولیسم (کیلوکالری برکیلوگرم)	۲۷۰۰
پروتئین خام (درصد)	۱۱/۵٤
کلسیم (درصد)	۰/۷۰
فسفر قابل دسترس (درصد)	۰/۳۰
سدیم (درصد)	۰/۱۸
متیونین (درصد)	۰/۲۸
لیزین (درصد)	۰/۳۰

۱. مکمل ویتامینی در هر کیلوگرم جیره: ویتامین A (ویتامین A استات) ۱۲۰۰۰ IU، ویتامین IU 3500 D3، ویتامین E (دی‌ال- آلفا- توکوفرول استات) 100 IU، ریبوفلاوین ۱۲ میلیگرم، نیاسین ۵۰ میلی‌گرم، پنتوتنیک اسید ۱۳ میلی‌گرم، پیریدوکسین (پیریدوکسین هیدروکلراید) ٦ میلی‌گرم، فولیک اسید ۲ میلی‌گرم، کوبالامین ۰/۰۳ میلی‌گرم، بیوتین ۰/٦٦ میلی‌گرم.
۲. مکمل معدنی در هر کیلوگرم جیره: آهن ۵۰ میلی‌گرم، منگنز ۱۲۰ میلی‌گرم، روی ۱۱۰ میلی‌گرم، ید ۲ میلی‌گرم، سلنیوم ۰/۳ میلی‌گرم.

پس از پایان مراحل آماده‌سازی با دستگاه اتوتکنیکون، نمونه‌ها در پارافین قالب‌گیری و با دستگاه میکروتوم دوار (مدل DS4055 دید سبز، ایران)، برش‌های پنج میکرومتری تهیه شد [۱]. از هر نمونه بیضه دو اسلاید تهیه و برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین به قرار زیر استفاده شد. اسلایدها را در گیره رنگ‌آمیزی قرار داده و گیره در داخل دستگاه آون (مدل BMS55 شرکت فن آزماگستر، ایرن) با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه جهت پارافین‌زدایی و چسبیدن برش‌ها به روی لام، قرار داده شدند. اسلایدها به‌ترتیب به داخل محلول‌های زیر منتقل شدند. گزیلول سه بار هر بار پنج دقیقه (پارافین‌زدایی)، الکل ۷۰ درصد، ۸۰ درصد، ۹۰ درصد، ۱۰۰ درصد هر کدام به‌مدت سه دقیقه (آب دهی)، شست‌وشو با آب مقطر یک دقیقه، رنگ هماتوکسیلین ۱۵ دقیقه، شست‌وشو با آب جاری یک دقیقه، غوطه‌ورسازی در اسید الکل (شفاف‌سازی) سه ثانیه، شست‌وشو با آب جاری یک دقیقه، رنگ ائوزین پنج دقیقه، الکل ۷۰ درصد، ۸۰ درصد، ۹۰ درصد، ۱۰۰ درصد (برای آب‌گیری)، هر کدام به‌مدت سه دقیقه، گزیلول دو بار هر بار پنج دقیقه (برای شفاف‌سازی) انجام شد. در نهایت روی اسلایدهای تهیه‌شده لامل چسبانده شد و تا زمان ارزیابی درون جعبه نگهداری لام قرار گرفتند [۱۱].

داده‌های مورفومتری از ۲۰ عکس گرفته‌شده از هر اسلاید توسط میکروسکوپ نوری (Ziess, Germany) مجهز به دوربین چشمی (Anmo Electronics, New Taipei City, Taiwan) با بزرگ‌نمایی ۱۰۰× جهت شمارش سلول‌های سرتولی و لایدیگ در هر عکس (مساحت ۰/۳۹ میلی‌مترمربع) و بزرگ‌نمایی ٤۰ جهت قطر لوله‌های اسپرم‌ساز به‌طور تصادفی انجام شد و میانگین‌گیری از آن‌ها به‌دست آمد [۱۰ و ٤].

برای بررسی اثر ترکیب کوآنزیم Q10 و اسیدهای چرب امگا۳ در بیضه، بیان نسبی ژن‌های StAR و TGF-β4 ارزیابی شدند. به این منظور ابتدا RNA کل سلول‌های بیضه جدا شد.

ابتدا ۳۰ میلی‌گرم از بافت فریزشده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد جدا شد و به درون بوته چینی دارای نیتروژن مایع انداخته شد و بافت به‌خوبی کوبیده شد. یک میلی‌لیتر محلول RNX-Plus به تیوب دو میلی‌لیتری دارای نمونه پودر شده، ریخته شد. نمونه به‌مدت ۱۰-۵ ثانیه ورتکس شد، سپس به‌مدت پنج دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه اضافه شد و به‌مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شد. پس از قرار گرفتن در چهار درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه، نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰، در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. فاز بالایی ایجاد شده که شامل RNA بود به تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس مایع جمع شده در تیوب دور ریخته شد و یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به آن اضافه شد. پس از ورتکس کوتاه، به‌مدت هشت دقیقه با دور ۷۵۰۰ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مایع جمع شده پس از انجام سانتریفیوژ دور ریخته شد و Pellet تشکیل شده برای چند دقیقه در دمای اتاق به‌منظور خشک‌شدن قرار گرفت. سپس ۵۰ میکرولیتر RNase free به Pellet تشکیل شده، اضافه شد و تیوب‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد در بن ماری قرار داده شدند. در پایان، RNA جداسازی شده به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. RNA تا زمان ساخت cDNA درون فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کیفیت RNA روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد.

به‌منظور ساخت cDNA از کیت شرکت یکتا تجهیز استفاده شد. درون میکروتیوب‌های این کیت آنزیم RT، بافرهای مخصوص، dNTP می‌باشند. بدین ترتیب فقط پرایمر oligo dT و نمونه RNA را به درون این میکروتیوپ‌ها ریخته و به‌ترتیب زیر استفاده شد. ابتدا ۱۰ میکرولیتر از نمونه DNase را به درون میکروتیوپ‌ها اضافه شد. میکرولیتر نیز RNase free اضافه کردیم. سپس به‌مدت ٤٥ دقیقه نمونه‌ها را داخل دستگاه PCR (QIAGENHIDEN, Germany) قرار دادیم. در نهایت نمونه‌ها را به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل کردیم.

واکنش‌های Real-time PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی SYBR Green PCR ساخت شرکت یکتا تجهیز و از ژن β-actin به‌عنوان کنترل داخلی طی فرایند زیر انجام شد. مشخصات آغازگرها و دمای بهینه‌ی فعالیت آن در جدول (۲) نشان داده شده است. پس از انجام آزمایش‌های آغازین با دستگاه PCR، شرایط لازم جهت تکثیر هر یک از ژن‌ها و واکنش‌های Real-time PCR به‌کار گرفته شد. اجزای واکنش که در حجم ۱۵ میکرولیتر به ریز لوله‌های موبین افزوده شدند، از ۷/۵ میکرولیتر Master Mix، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت، یک میکرولیتر cDNA و ٤/٥ میکرولیتر از آب بدون RNase تشکیل می‌شود. این اجزا به‌خوبی در ریزلوله‌ها با یکدیگر ترکیب شدند و در فاصله زمانی کوتاهی بین زمان تهیه و قرارگرفتن در دستگاه، در یک جعبه فلزی خنک گذاشته شدند. برنامه PCR شامل یک گامه فعال‌سازی ۵ دقیقه‌ای در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ چرخه ۱۰ ثانیه‌ای در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ٦٠ درجه سانتی‌گراد بود. در انتهای هر PCR یک آنالیز منحنی ذوب برای ژن‌ها انجام شد.

جدول ۲. اطلاعات مربوط به آغازگرهای مورداستفاده در Real-time PCR

Gene	Orientation	Sequences	Product length (bp)	Accession number
β-actin	Forward Reverse	ACGTCGCACTGGATTTCGAG AAAGATGGCTGGAAGAGGGC	١٤٥	X00182
StAR	Forward Reverse	TTCAGCGAGATGGAGATGTCC GGAACACCTTACCCACGTCC	١٦٠	NN_204686.2
TGF-β4	Forward Reverse	ACCTCGACACCGACTACTGCTT ATCCTTGCGGAAGTCGATGT	٨٦	M31160

داده‌های اولیه مربوط به بیان نسبی‌ژن با استفاده از روش لیواک و همکاران آماده‌سازی و آنالیز ژنتیکی شد و سپس داده‌های حاصل از بیان نسبی‌ژن و بافت‌شناسی با رویه GLM نرم‌افزار آماری {(نسخه ۹/۱ (SAS)} (Institute Inc., Car, NC) برای مدل (۱) تجزیه و میانگین‌ها توسط آزمون توکی در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ مقایسه شدند.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$ رابطه ۱)

که، Y_{ij}، مقدار مشاهده؛ μ، میانگین، T_i، اثر تیمار و ε_{ij}، خطای آزمایش است.

نتایج و بحث

اثر تجویز خوراکی مخلوط کوآنزیم Q10 و اسیدهای چرب امگا۳ به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی، بر برخی فراسنجه‌های بافت‌شناسی، تعداد سلول‌های سرتولی، لایدیگ و قطر لوله‌های اسپرم‌ساز (جدول ۳) و بیان نسبی‌ژن‌های StAR و TGF-β4 (جدول ٤) نشان داده شد. اثر تیمارهای آزمایشی بر تعداد سلول‌های سرتولی و لایدیگ معنی‌دار نبود. اما قطر لوله‌های اسپرم‌ساز در خروس‌هایی که کوآنزیم Q10 و اسیدهای چرب امگا۳ و یا ترکیب هر دو را دریافت کردند بیش‌تر از پرندگان شاهد بود (P<۰/۰۵) (جدول۳). بیان ژن TGF-β4 در خروس‌هایی که کوآنزیم Q10 و اسیدهای چرب امگا۳ و یا ترکیب هر دو را دریافت کردند کم‌تر از پرندگان شاهد بود (P<۰/۰۵)، بیش‌ترین میزان کاهش در خروس‌هایی مشاهده شد که ترکیب کوآنزیم Q10 و اسیدهای چرب امگا۳ را دریافت کردند و از این نظر با بقیه تیمارها تفاوت داشت. بیان ژن StAR در خروس‌هایی که کوآنزیم Q10 و اسیدهای چرب امگا۳ و یا ترکیب هر دو را دریافت کردند بیش‌تر از پرندگان شاهد بود، به‌طوریکه بیش‌ترین سطح بیان این ژن در خروس‌هایی مشاهده شد که ترکیب کوآنزیم Q10 و اسیدهای چرب امگا۳ را دریافت کردند و از این نظر با بقیه تیمارها تفاوت داشت (P<۰/۰۵) (جدول ٤).

یافته‌های پژوهش حاضر تأثیر افزودن کوآنزیم Q10 و اسیدهای چرب امگا۳ بر حفظ ساختار و عملکرد بیضه و بیان ژن‌های مرتبط با باروری با افزایش سن در خروس‌های مولد گوشتی هم‌خوانی داشت. تغییرات در خروس‌ها شامل کاهش وزن بیضه، کاهش تعداد سلول‌های رتولی، پس‌روی ملایم تا شدید لوله‌های اسپرم‌ساز، کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتید و غلظت اسپرم در انزال و کاهش تعداد و اندازه سلول‌های لایدیگ، شبکه آندوپلاسمی، قطرات چربی سیتوپلاسمی و کاهش تعداد میتوکندری در خروس‌های مسن، موجب کاهش باروری شد [۲۰]. خانواده TGF-β نقش مهمی را در تقسیم سیتوپلاسم پس از تقسیم هسته و نیز نقش چندگانه‌ای در پیغام‌رسانی بین سلولی جهت هموستازی و توسعه بافت‌ها ایفا می‌نمایند [١٦]. TGF-β یک فاکتور با فعالیت‌های متنوع می‌باشد. طیف فعالیت‌های آن از تمایز سلولی و مهار رشد سلولی تا تحریک ماتریکس خارج سلولی،

تعدیل و سرکوب پاسخ‌های ایمنی و التهابی متغیر می‌باشد که از سلول‌های مختلفی از جمله سلول‌های T، ماکروفاژها، کراتینوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها ترشح می‌شود. هم‌چنین نوعی سیتوکین است که در سیگنال‌دهی سلولی نقش دارد و در بسیاری از بافت‌های بدن هم‌چون مغز، قلب، کلیه، کبد، بیضه‌ها بیان می‌شود. افزایش میزان TGF-β با بروز فیبروز کلیه، دیابت، نارسایی مزمن کلیه و ناتوانی بیضه در ارتباط است. پیشرفت‌های اخیر نشان می‌دهد که کاهش میزان TGF-β می‌توانند روند این نارسایی‌ها را قطع کند [۱۲ و ۱۳].

افزایش سن، کاهش سطح رونویسی پروتئین StAR و در پی آن، نقص در انتقال کلسترول به درون میتوکندری از دلایل کاهش استروئیدسازی و غلظت تستوسترون در سلول‌های لایدیگ موش صحرایی گزارش شده است. وجود همبستگی بالا بین تولید تستوسترون و StAR نشان می‌دهد که افزایش ترشح تستوسترون ممکن است ناشی از انتقال کلسترول به درون میتوکندری باشد [۱٤]. رادیکال‌های آزاد به‌دلیل تمایل زیاد به گرفتن الکترون، باعث آسیب به مولکول‌ها از جمله اسیدهای چرب غشاهای بیولوژیک و اکسیداسیون آن‌ها می‌شوند، در نتیجه ساختار و عملکرد غشای سلول‌ها در بیضه را دچار اختلال می‌نمایند [۱۵].

افزون بر این، تغذیه با کوآنزیم Q10 که یک آنتی‌اکسیدان عمده سلولی و محلول در چربی است، از تخریب سلول‌ها و میتوکندری با مهار رادیکال‌های چربی از پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری می‌کند. هم‌چنین اسیدهای چرب بلند زنجیر غیر اشباع (امگا۳) با جلوگیری از مرگ سلول‌های بیضه در برابر تنش اکسیداتیو، نقش مهمی را در ساختار و عملکرد بیضه و حفظ باروری دارند [۵ و ۹].

سلول‌های سرتولی، لایدیگ و قطر لوله‌های اسپرم‌ساز در سن ۵۸ هفتگی در شکل‌های (۱) و (۲) نشان داده شده است.

جدول ۳. اثر کوآنزیم Q10 و اسیدهای چرب امگا۳ (سالومگا) بر تعداد سلول‌های سرتولی، لایدیگ و قطر لوله‌های اسپرم‌ساز در خروس‌های مولد گوشتی

فراسنجه‌ها	تیمارها				SEM	P-value
	شاهد	امگا۳	Q10	Q10 + امگا۳		
سرتولی (تعداد)	۱۳۹	۱۵۲	۱۵۸/۵	۱٦۳	٦/۹۰	۰/۱۰۰۱
لایدیک (تعداد)	۱۱۳	۱۱۸	۱۳٤/٤	۱۳۸	۱۳/۲۵	۰/۵۲٤
قطر لوله‌های اسپرم‌ساز (میکرومتر)	۰/۱۵ [b]	۰/۱۸ [a]	۰/۱۹ [a]	۰/۱۸ [a]	۰/۰۰۸	۰/۰۲۲۳

a-b: تفاوت اعداد با حروف نامشابه در هر ردیف معنی دار است (P<۰/۰۵).

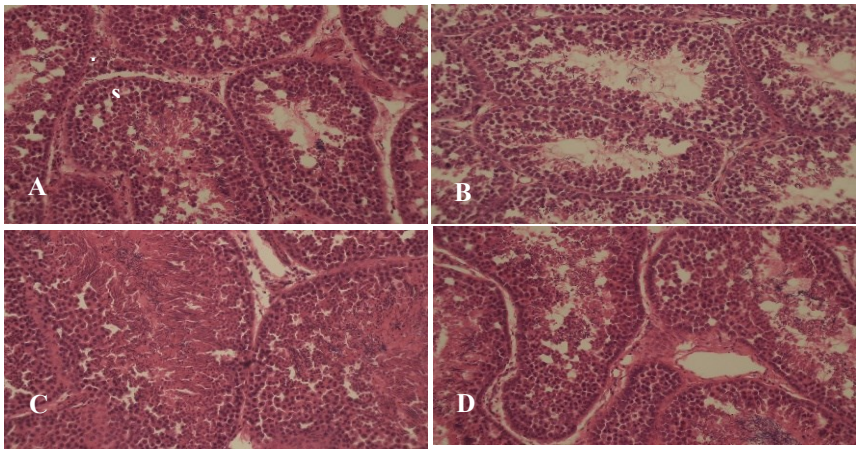
SEM: انحراف استاندارد میانگین.

جدول ٤. اثر کوآنزیم Q10 و اسیدهای چرب امگا۳ (سالومگا) بر بیان نسبی‌ژن StAR و TGF-β4 در خروس‌های مولد گوشتی

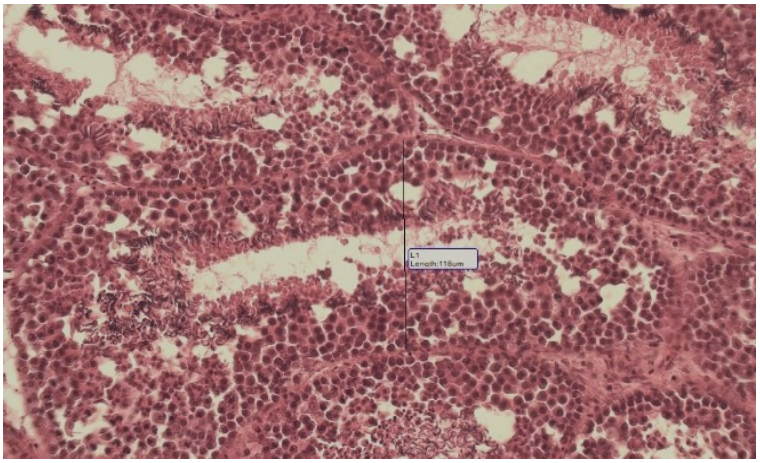
فراسنجه‌ها	تیمارها				SEM	P-value
	شاهد	امگا۳	Q10	Q10 + امگا۳		
TGF-β4	۱/۰۰[a]	۰/٦۷[b]	۰/۷٦[b]	۰/٤۸[c]	۰/۰۲٦	<۰/۰۰۰۱
StAR	۱/۰۰ [b]	۱/۵۷[b]	۱/٤۰[b]	۳/۹۸[a]	۰/۱٤	<۰/۰۰۰۱

a-b: تفاوت اعداد با حروف نامشابه در هر ردیف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SEM: انحراف استاندارد میانگین.



شکل ۱. بافت بیضه. A: گروه شاهد، B: گروه امگا۳، C: گروه CoQ10، D: گروه امگا۳ + CoQ10، شرایط نرمال بافتی، سلول سرتولی (S)، سلول لایدیگ (L)، رنگ‌آمیزی H&E، بزرگنمایی X40.



شکل ۲. قطر لوله‌های اسپرم‌ساز (بزرگ‌نمایی کل ۱۰۰) بیضه خروس‌های مادرگوشتی که با رنگ هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی شده بودند.

براساس نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان با افزودن کوآنزیم Q10 و اسیدهای چرب امگا۳ به جیره توان باروری را در خروس‌های مسن بهبود بخشید.

تشکر و قدردانی

از مدیریت محترم شرکت سهامی مزرعه نمونه به‌خاطر حمایت‌های ارزنده در جمع‌آوری داده‌ها و تهیه نمونه‌های این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع مورد استفاده

1. Abdoljabar Ali A, Zhandi A, Tohidi A, Zaghari A and Ansari M (2017). The effect of oral letrozole on plasma gonadotropin concentrations and some testicular histological parameters in broilers at 40 weeks of age. Iranian Journal of Animal Sciences, 2(48): 183-175. (in persian).
2. Aitken RJ and Roman SD (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, (1): 15-24.

3. Akhlaghi A, Ahangari, YJ, Navidshad B, Pirsaraei, ZA, Zhandi M, Deldar H, Rezvani MR, Dadpasand M, Hashemi SR, Poureslami R and Peebles ED (2014a). Improvements in semen quality, sperm fatty acids, and reproductive performance in aged Cobb 500 breeder roosters fed diets containing dried ginger rhizomes. Poultry Science, 93: 1236-1244.
4. Bachmid NA, Purba FY, Apada A M S and Sari DK (2019). Morphology and histomorphometric study of 1-to 4-month- old Gaga'chicken's testes. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 343(1): 120-131.
5. Ben-Meir A, Burstein E, Borrego-Alvarez A, Chong J, Wong E, avorska T, Naranian T, Chi M, Wang Y, Bentov Y, Alexis J, Meriano J, Sung H K, Gasser D L, Moley K H, Hekimi S, Casper R F and Jurisicova A (2015). Coenzyme Q10 restores oocyte mitochondrial function and fertility during reproductive aging. Aging cell, 14: 887-95.
6. Borghei-Rad SM, Zeinoaldini S, Zhandi M, Moravej H and Ansari M (2017). Feeding rosemary leaves powder ameliorates rooster age-related subfertility. Theriogenology, 101: 35-43.
7. Castellano CA, Audet I, Bailey JL, Chouinard PY, Laforest JP and Matte JJ (2010). Effect of dietary n-3 fatty acids (fish oils) on boar reproduction and semen quality. Journal of animal science, 88: 2346-2355.
8. Cerolini S, Kelso RC, Noble BK, Speake F Pizzi and Cavalchini LG (1997a). Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. Biology Reproduction, 57: 976-980.
9. Hudson BP (2000). Alternative sources of fat and zinc in broiler breeder diets and their influences on performance. University of Georgia (Athens), Ph.D.Thesis.
10. Karimi A, Shahneh AZ, Zeynoaldini, S, Kohram H, Pirsaraei Z A and Adibmoradi M (2013). Effect of propylthiouracil on puberty initiation and semen production in broiler breeder roosters. Animal Production Research, 2(2). (in persian).
11. Kazemizadeh, Zare Shahneh, Zainudini, Yousefi Ar, Heidari Amaleh, Tavakoli Al-Mutawi and Ansari Pirsaraei (2017). The 2effect of curcumin on lipid profiles and some parameters of quality of sperm of broilers. Iranian Journal of Animal Sciences. (in persian).
12. Kuhnlein U, Nie L, Weigend S, Gavora JS, and Fairfall W (1997). DNA polymorphism in chicken growth gene, response to selection for disease resistance and association with egg production. Journal of Animal Genetics, 20: 145-155.
13. Letterio JJ and Roberts AB(1998). Regulation of immune responses by TGF- beta. Annual Review Immunology, 16: 137-61.
14. Luo L, Chen H and Zirkin BR (2001). Leydig cell agin: steroidogenic acute regulatory protin and cholesterol side-chain cleavage enzyme. Journal of Andrology, 22: 149-56.
15. Modaresi M, Messripour M and Rajaei R(2010). Effect of cinnamon extract on the number of spermatocyte and spermatozoa cells in mice. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 26 (1): 83-90. (in persian).
16. Piek E, Heldin Dijke PT (1999). Specificity, diversity, and regulation in TGF-β superfamily signaling. J. FASEB, 13: 2105-2124.
17. Paulenz H, Taugbøl, Hofmo O and Saarem K (1995). A preliminary study on the effect of dietary supplementation with cod liver oil on the polyunsaturated fatty acid composition of boar semen. Veterinary research communications, 19: 273-284.
18. Saemi F, Zamiri MJ, Akhlaghi A, Niakousari M, Dadpasand M and Ommati MM (2012). Dietary inclusion of dried tomato pomace improves the seminal characteristics in Iranian native roosters. Poultry Science, 91(9): 2310-2315. (in persian).
19. Safari A, Shariatmadari R, Sharafi F, Karimi Torshizi and M, Shahverdi MA, (2018). Improvements in semen quality, sperm fatty acids, and reproductive performance in aged Ross breeder roosters fed a diet supplemented with a moderate ratio of n-3: n-6 fatty acids. Poultry Science, 97: 4113-4121.
20. Sarabia Fragoso J, Pizarro Diaz M, Abad Moreno J C, Casanovas Infesta P, Rodriguez-Bertos A and arger K (2013). Relationships between fertility and some parameters in male broiler breeders (body and testicular weight, histology and immunohistochemistry of testes, spermatogenesis and hormonal levels). Reproduction in Domestic Animals, 48: 345-52.
21. Sebokova E, Garg ML, Wierzbicki A, Thomson ABR and Clandinin MT (1990). Alteration of the lipid composition of rat testicular plasma membranes by dietary (n-3) fatty acids changes the responsiveness of leydig cells and testosterone synthesis. Journal of Nutrition, 120: 610-8.
22. Turner TT and Lysiak JJ (2008). Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. Journal of Andrology, 29: 488-98.

23. Wu LL, Russell DL, Wong SL, Chen M, Tsai TS, St John JC, Norman RJ, Febbraio MA, Carroll J and Robker RL (2015). Mitochondrial dysfunction in oocytes of obese mothers: transmission to offspring and reversal by pharmacological endoplasmic reticulum stress inhibitors. Development (Cambridge, England), 142: 681-91.
24. Zanussi HP, Shariatmadari F, Sharafi M and Ahmadi H (2019). Dietary supplementation with flaxseed oil as source of Omega-3 fatty acids improves seminal quality and reproductive performance in aged broiler breeder roosters. Theriogenology, 130: 41-48.