

بهبود فراسنجه‌های بافت‌شناسی و بیان نسبی ژن StAR در بیضه خروس‌های تغذیه‌شده با کریسین

علی سامی امین الطواش^۱، احمد زارع شهنه^{۲*}، حسین مروج^۲، مهدی انصاری^۱ و حمید دلداری^۳
۱ و ۲. دانشجوی سابق دکتری و استاد، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۹)

چکیده

در این پژوهش اثر کریسین خوراکی بر بافت‌شناسی و بیان نسبی StAR در بیضه خروس‌های راس ۳۰۸ تغذیه‌شده با کریسین بررسی شد. بیست خروس (۴۰ هفته) به صورت تصادفی به چهار گروه مساوی تقسیم شدند و جیره پایه به اضافه سطوح متفاوتی از کریسین شامل صفر (Ch0)، ۲۵ (Ch25)، ۵۰ (Ch50) و ۷۵ (Ch75) میلی‌گرم در روز به مدت ۱۲ هفته متوالی دریافت کردند. در پایان آزمایش خروس‌ها کشتار و بیضه‌ها به دقت خارج شدند. دو نمونه از یک بیضه برداشته شد، نمونه اولی برای مطالعه بافت‌شناسی به درون محلول بوئن و نمونه دوم برای ارزیابی بیان نسبی ژن به درون ازت مایع منتقل شد. نتایج نشان داد که قطر و ضخامت اپیتلیوم لوله اسپرم‌ساز ($p < 0.05$) و تعداد اسپرماتوگونی-ها ($p < 0.01$) در دو گروه Ch75 و Ch50 نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، اما تعداد سلول‌های لایدیگ و رگ‌های خونی بین گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری نداشت. بیان نسبی ژن StAR در پرندگان که ۷۵ میلی‌گرم کریسین در روز دریافت کرده بودند، نسبت به سایر گروه‌های تیماری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$). به‌طور خلاصه، در این پژوهش کریسین خوراکی توانست فراسنجه‌های بافت‌شناسی و مسیر استروئیدسازی را در بیضه خروس‌ها بهبود دهد.

واژه‌های کلیدی: بافت‌شناسی، خروس، ژن، کریسین.

Improvement of testis histological parameters and relative expression of StAR gene in Chrysin-fed roosters

Ali Sami Amin Altawash¹, Ahmad Zare Shahneh^{2*}, Hossein Moravej², Mahdi Ansari¹ and Hamid Deldar³

1, 2. Former Ph.D. Student and Professor, Animal Science Department, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Science Natural Resources University, Sari, Iran

(Received: Aug. 28, 2017 - Accepted: Jan. 9, 2018)

ABSTRACT

Chrysin was orally administered to evaluate testicular histology and relative StAR expression of Ross 308 roosters in the current study. Twenty roosters were randomly divided into four groups and were subjected to the basal diet supplemented with different levels of Chrysin including 0 (Ch0), 25 (Ch25), 50 (Ch50) or 75 (Ch75) mg/bird/day for 12 successive weeks. At the end of 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 with liquid nitrogen to assess relative gene expression. According to the results, seminiferous tubule and epithelium diameters ($p < 0.05$) and spermatogonial numbers ($p < 0.01$) of both CH75 and Ch50 groups were significantly improved compared to control group. However, Leydig cell numbers and blood vessels were not significantly affected. Birds fed 75 mg of Chrysin per day had significantly higher StAR transcript level compared to other groups ($p < 0.05$). In conclusion, oral administration of Chrysin to roosters could improve testicular histology and steroidogenic parameters in the current study.

Keywords: Chrysin, gene, histology, rooster.

* Corresponding author E-mail: azareh@ut.ac.ir

مقدمه

باروری نرهای مولد گوشتی در ۳۷ هفتگی به اوج رسیده و پس از آن به سرعت کاهش می‌یابد (Weil *et al.*, 1999b). این کاهش باروری با کاهش وزن بیضه، پسروی ملایم تا شدید لوله‌های اسپرم‌ساز، کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتید و غلظت اسپرم در انزال همراه است (Weil *et al.*, 1999b; Sarabia *et al.*, 2013). کاهش غلظت تستوسترون (Rosenstrauch *et al.*, 1998; Sarabia *et al.*, 2013) و قدرت سامانه آنتی‌اکسیدانی از جمله کاهش غلظت ویتامین E در بیضه (Surai *et al.*, 2000) از دلایل این کاهش باروری در خروس گزارش شده است. بافت بیضه، با وجود غلظت پایین اکسیژن در آن، به دلیل حضور میزان بالای اسید چرب غیراشباع و سامانه تولیدکننده ترکیبات واکنش‌گر اکسیژن (ROS, Reactive oxygen species) مستعد تنش اکسیداتیو است. تنش اکسیداتیو در هر بافتی ناشی از عدم تعادل بین تولید و حذف ROS توسط سامانه آنتی‌اکسیدانی است. ROS به مولکول‌های کوچک بر پایه اکسیژن اما به شدت واکنشی به‌خاطر حضور الکترون‌های جفت‌نشده گفته می‌شود. ترکیبات واکنش‌گر اکسیژن عمده شامل آنیون سوپراکسید (O_2^-), پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و یون هیدرواکسیل (OH) است (Turner & Lysiak, 2008). تولید ROS در میتوکندری و توسط آنزیم‌های گوناگونی شامل گزانتین- و NADPH- اکسیداز و سیتوکروم P450 به‌طور اختصاصی یا ناخواسته و در نتیجه فعالیت بیوشیمیایی آنها روی می‌دهد. برای مقابله با این متابولیت‌های ناخواسته سیستم آنتی‌اکسیدانی با اجزای آنزیمی و غیرآنزیمی در بیضه توسعه یافته است (Aitken & Roman, 2008)، اما تضعیف این سیستم با افزایش سن سبب نقص در عملکرد سلول‌های لایدیگ می‌شود زیرا ROS تولید شده به اجزای ضروری مسیر استروئیدسازی آسیب می‌رساند (Zirkin & Chen, 2000). علاوه بر مسیر استروئیدسازی، تنش اکسیداتیو سبب القای آپوپتوز در سلول‌های زاینده لوله اسپرم‌ساز می‌شود (Ikeda *et al.*, 1999). در مطالعات اخیر با استفاده از تیمارهای خوراکی آنتی‌اکسیدانی (Borghei *et al.*, 2017) و آنتی آروماتاز (Ali *et al.*, 2017)

باروری و فراسنجه‌های منی خروس‌های مولد گوشتی را بهبود داده‌اند، اما استفاده از یک ترکیب دارای هر دو اثر آنتی‌اکسیدانی و محرک استروئیدسازی برای بهبود فراسنجه‌های بافت بیضه ضروری به نظر می‌رسد. فلاوونوئیدها با داشتن اسکلت ۱۵ کربنی از دو حلقه فنیلی (A و B) و یک حلقه هتروسیکلیک (C) ترکیبات پلی‌فنولی هستند که در میوه‌ها و گیاهان یافت می‌شوند. کریسین با نام شیمیایی ۵ و ۷-دی‌هیدروکسی فلاون، یک ترکیب پلی‌فنلی طبیعی در گل ساعتی (*Passiflora caerulea*)، عسل، و چندین گیاه دیگر می‌باشد. اثرات محافظتی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو و التهابی (Mantawy *et al.*, 2014) همراه با اثر محرک استروئیدسازی (Jana *et al.*, 2008) و فعالیت آنتی‌آروماتازی از طریق تداخل در عمل (برهمکنش گروه 4-oxo با اتم آهن آروماتاز) یا بیان ژن آنزیم آروماتاز (Campbell & Kurzer, 1993; Sanderson *et al.*, 2004)، کریسین را به گزینه جذابی برای بررسی اثر آن در تولیدمثل تبدیل کرده است. موش‌های صحرایی تیمار شده با کریسین شمار اسپرم و نرخ باروری بالایی داشتند (Dhawan *et al.*, 2002). در مطالعه دیگر سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بیضه نظیر گلوکوتاتیون، گلوکوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز پس از تجویز کریسین بهبود یافتند. علاوه بر این، شمار اسپرم و جنبایی افزایش و درصد ناهنجاری اسپرم کاهش یافت (Ciftci *et al.*, 2012). علاوه بر اثر آنتی‌اکسیدانی، مطالعات درون و برون تنی نقش کریسین را در افزایش سطح تستوسترون و میل جنسی تأیید کرده‌اند (Jana *et al.*, 2012; Ciftci *et al.*, 2008). با توجه به اثرات مثبت کریسین بر فراسنجه‌های منی، پروفایل اسید چرب اسپرم و افزایش تستوسترون خون خروس (Amin Altawash *et al.*, 2017) در این پژوهش اثر احتمالی آن بر برخی فراسنجه‌های بافت‌شناسی و بیان نسبی ژن StAR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش

این پژوهش در مزرعه آموزشی و پژوهشی گروه علوم دامی دانشگاه تهران در کرج انجام گرفت. بیست قطعه

بخش فرمالین (۰.۴۰٪) و ۵ بخش اسید استیک گلسیال تثبیت شده و سپس به داخل محلول فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۷۲ ساعت منتقل شدند پس از اتمام زمان فوق، نمونه‌ها به داخل دستگاه تیشوپروسور (DS 2080/H، دید سبز، ایران) انتقال داده شدند. این دستگاه کار تثبیت، آب‌گیری و تمایز نمونه‌های بافتی را برای حفظ ساختار سلولی به صورت اتوماتیک انجام می‌دهد تا اجزای سلولی نمونه به شکل درست در زیر میکروسکوپ نوری یا الکترونی مشاهده شود. ترتیب محلول‌های دستگاه شامل محلول ۱ و ۲ حاوی فرمالین ۱۰ درصد، محلول ۳ الکل ۷۰ درصد، محلول ۴ الکل ۸۰ درصد، محلول ۵ الکل ۹۰ درصد و محلول ۶ الکل ۹۶ درصد بود. محلول ۷ و ۸ حاوی الکل مطلق یا ۱۰۰ درصد و محلول ۹ و ۱۰ گزلیول ۱۰۰ درصد بودند که کار شفاف‌سازی بافت و خارج کردن الکل از آن را بر عهده داشتند و در نهایت محلول‌های ۱۱ و ۱۲ پارافین بود. پس از اتمام مراحل تیشوپروسور، نمونه‌ها در پارافین قالب‌گیری و با استفاده از دستگاه میکروتوم دوار (DS 4055، دید سبز، ایران)، برش‌های ۵ میکرومتری تهیه شد. از هر نمونه بافت بیضه دو اسلاید تهیه و برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین به قرار زیر استفاده شد.

خروس مادر گوشتی راس ۳۰۸ (سن ۴۰ هفتگی) به شیوه کاملاً تصادفی به چهار گروه مساوی (پنج قطعه خروس در هر گروه) تقسیم شده و به درون پن‌های انفرادی ($1\text{ m}^3 \times 1/2 \times 1/2$) منتقل شدند برنامه نوری شامل ۱۴ ساعت نور و ۱۰ ساعت تاریکی بود. خروس‌ها جیره یکسان با مقدار انرژی ۲۷۵۰ کیلوکالری در کیلوگرم جیره و ۱۲ درصد پروتئین دریافت کردند (جدول ۱).

سطوح مختلف کریسین شامل صفر (Ch0)، ۲۵ (Ch25)، ۵۰ (Ch50) و ۷۵ (Ch75) میلی‌گرم به ازای هر پرنده در روز به مدت ۱۲ هفته به صورت کپسول (force feed) به پرندگان خوراندند. در پایان هفته دوازدهم خروس‌ها کشتار، بیضه‌ها به دقت درآورده شده و دو نمونه از یک بیضه (به‌طور قراردادی بیضه راست) برداشته شد. نمونه اولی برای مطالعه بافت‌شناسی به درون محلول بوئن و نمونه دوم برای ارزیابی بیان نسبی ژن به درون ازت مایع منتقل شد.

بافت‌شناسی بیضه

نمونه‌های بافت‌شناسی به مدت ۲۴ ساعت در داخل محلول فیکساتیو بوئن (۷۰ بخش اسید پیریک، ۲۵

جدول ۱. اجزا و ترکیب شیمیایی جیره استاندارد خروس‌ها

Table 1. Ingredient and chemical composition of standard diet fed roosters

Item	Value (%)	Digestible amino acids	Value (%)
Corn	69.5	Lysine	0.46
Soybean meal	9	Methionine	0.39
Wheat bran	19.5	Methionine & Cysteine	0.49
Dicalcium phosphate	0.18	Tryptophan	0.12
Calcium carbonate	0.85	Arginine	0.67
Sodium chloride	0.35	Valine	0.5
DL-Met	0.12	Leucine	0.53
Vitamin premix*	0.25	Isoleucine	0.4
Trace mineral premix**	0.25	Threonine	0.37
Composition			
ME (kcal/kg)	2754.5	CP (%)	12
Ca (%)	0.7	Available P (%)	0.35
Na (%)	0.15	Cl (%)	0.15
K (%)	0.6		

* هر کیلوگرم جیره خروس‌های مادر گوشتی ۱۵۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۱۰۰ واحد بین المللی ویتامین E، ۴ میکروگرم ویتامین K₃، ۲۵ میکروگرم ویتامین B₁₂، ۳۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D₃، ۵۰ میکروگرم بیوتین، ۷/۵ میلی‌گرم ریبوفلاوین، ۵۰ میکروگرم نیاسین، ۵/۵ میلی‌گرم پیریدوکسین، ۱۸ میلی‌گرم پنتوتینیک اسید و ۱/۵ میلی‌گرم اسید فولیک داشت.

** هر کیلوگرم جیره خروس‌های مادر گوشتی ۹۰ میلی‌گرم آهن، ۱۲۰ میلی‌گرم منگنز، ۱۱۰ میلی‌گرم روی، ۱۰/۹ میلی‌گرم مس، ۲ میلی‌گرم ید و ۰/۳ میلی‌گرم سلنیوم داشت.

* Supplied per kg diet broiler breeder roosters: vitamin A; 15000 IU, vitamin E; 100 IU, vitamin K₃; 4 mg, vitamin B₁₂; 25 µg, vitamin D; 3000 IU, biotin; 50 mg, riboflavin; 7.5 mg, niacin; 50 mg, pyridoxine; 5.5 mg, pantothenic acid; 18 mg and folic acid; 1.5 mg

** Supplied per kg diet broiler breeder roosters: Fe, 90 mg; Mn, 120 mg; Zn, 110 mg; Cu, 10.9; I, 2 mg and Se, 0.3 mg.

ژن StAR ارزیابی شد. توالی ژن نامزد و بتا-اکتین (به‌عنوان کنترل داخلی) از پایگاه داده NCBI به‌دست آمد (جدول ۲). آغازگرها توسط نرم‌افزار آنلاین Primer3Plus طراحی و توسط نرم‌افزارهای آنلاین OligoAnalyser، OligoCalc و Primer-BLAST مورد بازبینی قرار گرفتند.

استخراج RNA و ساخت cDNA

جداسازی RNA کل سلول‌های بیضه با کمک کیت RNeasy Mini تولیدی شرکت کیژن (شماره کاتالوگ: ۷۴۱۰۴) و به ترتیب زیر صورت گرفت:

الف- ۳۰ میلی‌گرم بافت بیضه یخ‌زده (-70°C) پیش از یخ‌گشایی کامل به درون بوتله چینی دارای نیتروژن مایع انداخته شد. بافت به‌خوبی کوبیده و آسیاب شد و به‌همراه نیتروژن مایع به یک لوله میکروسانتریفیوژ ۲ میلی‌لیتری بدون RNase ریخته شد. مقدار ۶۰۰ میکرولیتر بافر RLT (بافر لیزکننده) به لوله افزوده شد. با کمک سرنگ استریل بدون RNA و سر سوزن شماره ۲۰، بافت به درون سرنگ کشیده و تخلیه شد (بین ۵ تا ۱۰ بار) تا بافت هموژنیزه شود.

ب- لوله دارای بافت، برای ۳ دقیقه در $14000 \times g$ دور سانتریفیوژ شد، سپس بخش بالایی جدا و به درون یک لوله میکروسانتریفیوژ دیگر ریخته شد و یک حجم از الکل ۷۰ درصد به آن افزوده شده و بخوبی مخلوط شد.

پ- ۷۰۰ میکرولیتر از مایع این لوله به درون لوله‌های فیلتردار ریخته شد و ۱۵ ثانیه در $10000 \times g$ دور سانتریفیوژ شد. مایع لوله زیرین دور ریخته شده و فیلتر دوباره در همین لوله جمع‌آوری قرار داده شد.

ث- مرحله فوق یک بار با افزودن ۷۰۰ میکرولیتر از بافر RW1 و بار دیگر با افزودن ۵۰۰ میکرولیتر از بافر RPE تکرار شد.

اسلایدها را در گیره رنگ‌آمیزی قرار داده و گیره در داخل دستگاه آون با دمای 70°C به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. با این کار علاوه بر پارافین‌زدایی، برش‌ها نیز به خوبی به لام چسبیدند. گیره حاوی اسلایدها به ترتیب به داخل محلول‌های زیر انتقال داده شدند: گزیلول؛ ۵ دقیقه، گزیلول؛ ۱۰ دقیقه (برای پارافین زدایی)، الکل ۱۰۰، ۹۰، ۸۰ و ۷۰ درصد؛ هر کدام به‌مدت ۳ دقیقه (برای آب‌دهی)، شستشو با آب جاری؛ ۱ دقیقه، رنگ همتوکسیلین؛ ۱۵ دقیقه، شستشو با آب شهری؛ ۱ دقیقه، غوطه‌ورسازی در اسید الکل (برای شفاف‌سازی)، شستشو با آب جاری؛ ۱ دقیقه، رنگ ائوزین؛ ۵ دقیقه، الکل ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد (برای آب‌گیری)؛ هر کدام به‌مدت ۳ دقیقه، گزیلول؛ ۱۰ دقیقه (برای شفاف سازی). در نهایت روی اسلایدهای تهیه شده لامل چسبانده شد و تا زمان ارزیابی به داخل جعبه نگهداری لام منتقل شدند.

داده‌های مورفومتری از ۲۰ عکس گرفته شده از هر اسلاید توسط میکروسکوپ نوری (Ziess, Germany) مجهز به دوربین چشمی (AnMo Electronics, New Taipei City, Taiwan) در بزرگنمایی $100\times$ به‌دست آمد و با نرم‌افزار Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD) ارزیابی شدند. قطر لوله اسپرم‌ساز، ضخامت اپیتلیوم لوله اسپرم‌ساز و تعداد اسپرماتوگونی‌ها با شمارش مقاطع عرضی ۲۰ لوله اسپرم‌ساز به‌طور تصادفی و میانگین‌گیری از آنها به‌دست آمد (Islam et al., 2010). تعداد سلول‌های لایدیگ و عروق خونی نیز در هر عکس (مساحت 0.37 میلی‌متر مربع) شمارش و میانگین گرفته شد.

بیان نسبی ژن مورد مطالعه

برای بررسی سازوکار اثر کریسین در بیضه، بیان نسبی

جدول ۲. اطلاعات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده در real-time PCR

Table 2. Details of primer sequences used for quantitative real-time PCR

Gene	Sequence	Product length (bp)	Accession number
β -actin	F: ACGTCGCACTGGATTTCGAG R: AAAGATGGCTGGAAGAGGGC	145	X00182
StAR ^o	F:TTCAGCGAGATGGAGATGTCC R:GGAACACCTTACCCACGTCC	160	NM_204686

^o Steroidogenic acute regulatory protein

Green PCR ساخت کپژن (شماره کاتالوگ: ۲۰۴۰۵۴) و دستگاه Rotor-Gene[®] ساخت شرکت Corbette Research (model:RG2072D) طی فرایندهای زیر انجام شدند.

الف- پس از انجام آزمایش‌های آغازین با دستگاه PCR معمولی، بهترین شرایط واکنش برای تکثیر در مورد هر یک از ژن‌ها، روشن شد و برای واکنش‌های Real-time PCR به کار گرفته شد.

ب- اجزای واکنش که در حجم ۲۰ میکرولیتر به ریزلوله‌های مویین افزوده شدند، از ۱۰ میکرولیتر Master Mix، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (غلظت ۵ پیکومول در میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر cDNA و ۸/۵ میکرولیتر از آب بدون RNase تشکیل می‌شد. این اجزا به خوبی در ریزلوله‌ها با یکدیگر آمیخته شدند و در فاصله زمانی کوتاهی بین زمان تهیه آن‌ها و قرار داده شدن در دستگاه، در یک جعبه فلزی خنک قرار داده شدند. برنامه PCR شامل یک گامه فعال‌سازی ۵ دقیقه‌ای در ۹۵ °C، ۴۰ چرخه ۱۵ ثانیه‌ای در ۹۵ °C و ۴۰ ثانیه در ۶۰ °C بود. در انتهای هر PCR یک آنالیز منحنی یخ‌گشایی با نرخ ۰/۱ °C/sec برای همه ژن‌ها انجام شد تا اختصاصی بودن محصولات بررسی شود. کارایی ارزیابی‌ها ۹۵ درصد یا بیشتر بود و R² منحنی استاندارد ۰/۹۹ یا بیشتر بود. در مورد هر یک از نمونه‌ها و برای هر کدام از ژن‌های کاندید، چرخه آستانه (Ct) از روی نمودارها تعیین و داده‌های حاصل با استفاده از روش 2^{-ΔΔCt} آنالیز شد (Livak & Schmittgen, 2001). نمونه‌های گروه Ch0، به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند.

آنالیز آماری

داده‌های آزمایش حاضر با رویه MIXED نرم‌افزار SAS و پیرایش ۹ (SAS Institute Inc., Cary, NC) تجزیه و تحلیل شدند. اثر تیمار به عنوان عامل ثابت و حیوان به عنوان عامل تصادفی در معادله مدل قرار داده شدند. مقایسه میانگین با LSmeans برای آزمون توکی و در سطح آماری ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج و بحث

نقص در سامانه آنتی‌اکسیدانی و کاهش غلظت

ث- فیلتر در یک لوله جمع‌آوری ۱/۵ میلی‌لیتری جدید قرار داده شد. مقدار ۳۰ تا ۵۰ میکرولیتر آب بدون RNase به‌طور مستقیم روی غشای فیلتر ریخته شد. پس از بستن درب فیلتر و ۱۰ دقیقه درنگ، برای ۱ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. با این کار RNA که به غشای فیلتر چسبیده بود در این آب حل و در لوله زیرین جمع شد و پس از بستن درب آن در دمای ۷۰ °C- منجمد شد تا در ادامه از آن cDNA ساخته شود.

ساخت cDNA

برای ساخت cDNA از کیت QuantiTec Reverse Transcription تولیدی شرکت کپژن (شماره کاتالوگ: ۲۰۵۳۱۱) به ترتیب زیر استفاده شد:

الف- RNA الگو از فریزر ۷۰ °C- روی یخ و اجزای کیت بالا در دمای اتاق (۱۵-۲۵ °C) یخ‌گشایی شدند.

ب- برای پاک‌سازی نمونه RNA از gDNA، ۲ میکرولیتر بافر از بین برنده gDNA و ۱۲ میکرولیتر RNA الگو (در مجموع ۱۴ میکرولیتر) در یک میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتری ریخته و به‌خوبی آمیخته شدند. این لوله در یک دستگاه PCR معمولی برای ۲ دقیقه در دمای ۴۲ °C نگهداری شد. پس از آن لوله از دستگاه بیرون آورده و بی‌درنگ روی یخ گذاشته شد.

پ- آمیزه مربوط به RT روی یخ آماده شد که از ۱ میکرولیتر آنزیم RT، ۱ میکرولیتر آمیزه آغازگرها و ۴ میکرولیتر بافر RT تشکیل شده بود. با افزودن این آمیخته به لوله گامه ب، حجم محلول در لوله به ۲۰ میکرولیتر رسید. لوله اخیر در حالیکه روی یخ بود به دستگاه PCR معمولی انتقال داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۲ °C قرار گرفت تا تکثیر انجام شود. سپس ۳ دقیقه در دمای ۹۵ °C قرار داده شد تا آنزیم RT غیرفعال شود.

ت- cDNA ساخته‌شده در دمای ۲۰ °C- قرار گرفت و در ادامه برای انجام واکنش Real-time PCR به کار رفت.

واکنش‌های Real-time PCR

این واکنش‌ها با کمک آغازگرهای ویژه ژن‌های نامزد ساخت شرکت سیناکلون و کیت QuantiFast SYBR[®]

تبدیل کننده پراکسید هیدروژن به آب) و سوپراکسید دیسموتاز (تبدیل کننده رادیکال‌های سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و اکسیژن) در بیضه موش‌های صحرایی مسن کاهش می‌یابد (Luo *et al.*, 2006). سلول‌های اسپرماتوگونی در بخش پایه لوله‌های اسپرم‌ساز قرار گرفته و توسط سلول‌های سرتولی احاطه شده‌اند. همئوستازی آن‌ها توسط فرسته‌های خارجی و بیان ژن داخلی تنظیم می‌شود (Giudice *et al.*, 2017). با وجود این که آپوپتوز سلول‌های زاینده به‌عنوان فرایندی مرسوم در اسپرم‌سازی مطرح است، اما در شرایط تنش اکسیداتیو افزایش می‌یابد (Turner & Lysiak, 2008). در انسان تغییرات بافت‌شناسی مرتبط با افزایش سن در اپیتلیوم لوله اسپرم‌ساز و فضای بینابینی شامل گسترش واکوئل‌های درون اپیتلیوم لوله اسپرم‌ساز و کاهش ارتباطات سلول‌های لایدیگ است. این رویداد ناشی از پس‌روی یا غیاب سلول‌های زاینده منجر به افزایش فضای بین سلولی و کاهش هر چه بیشتر توان اسپرم‌سازی و ترشح تستوسترون می‌شود (Xu *et al.*, 2013). تغییرات متناظر در خروس‌ها شامل کاهش وزن بیضه، پس‌روی ملایم تا شدید لوله‌های اسپرم‌ساز، کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتید و غلظت اسپرم در انزال است. تغییرات ساختاری فضای بینابینی نیز شامل کاهش تعداد و اندازه سلول‌های لایدیگ، شبکه آندوپلاسمی، قطرات چربی سیتوپلاسمی و کاهش تعداد میتوکندری است (Rosenstrauch *et al.*, 1998; Weil *et al.*, 1999a; Sarabia Frago *et al.*, 2013).

تستوسترون بیضه و پلازما از دلایل کاهش باروری خروس‌های مادر گوشتی پس از اوج تولید گزارش شده است (Weil *et al.*, 1999b; Surai *et al.*, 2000). در این پژوهش تجویز خوراکی کریسین به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی و محرک استروئیدسازی توانست برخی فراسنجه‌های بافت‌شناسی و استروئیدسازی را در بیضه خروس بهبود دهد. اثر سطوح مختلف کریسین بر فراسنجه‌های بافت‌شناسی جدول ۳ آورده شده است. در گروه‌های Ch50 و Ch75 نسبت به شاهد، قطر لوله اسپرم‌ساز (۳۰۸/۳۱ و ۳۰۲/۸۰ در برابر ۲۵۹/۰۰)، ضخامت اپیتلیوم لوله اسپرم‌ساز (۹۱/۴۲ و ۱۰۰/۵۷ در برابر ۷۴/۲۶) و تعداد اسپرماتوگونی‌ها (۲۰۳/۲۵ و ۲۰۳/۱۷ در برابر ۱۷۶/۸۵) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، اما تعداد سلول‌های لایدیگ و رگ‌ها خونی تغییرات معنی‌داری نداشت (جدول ۳). این پژوهش با گزارش (Amin Altawash *et al.*, 2017) مطابقت داشت که در آن افزودن کریسین به جیره خروس‌های مادر سبب بهبود شمار، جنبایی و ترکیب اسید چرب اسپرم شده و غلظت MDA منی را کاهش داده است. همچنین تجویز خوراکی کریسین به موش‌های صحرایی علاوه بر بهبود غلظت و جنبایی اسپرم و سطح تستوسترون سرم، سطح گلوکوتائون، کاتالاز، گلوکوتائون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز بیضه‌ای را افزایش داده است (Ciftci *et al.*, 2012). تنش اکسیداتیو از دلایل پیری جنسی گزارش شده است اجزای سامانه آنتی‌اکسیدانی وابسته به گلوکوتائون

جدول ۳. فراسنجه‌های بافت‌شناسی خروس‌های تغذیه شده با کریسین

Table 3. Testicular parameters of Chrysin fed roosters

Traits	Treatments* (LSmean ±SE)				P value
	Ch0	Ch25	Ch50	Ch75	
Seminiferous tubule diameter** (µm)	259.00±17.33 ^b	291.29±4.57 ^{ab}	308.31±11.06 ^a	302.80±7.56 ^a	0.03
Seminiferous epithelium thickness** (µm)	74.26±3.03 ^b	89.27±6.34 ^{ab}	91.42±7.83 ^a	100.57±4.36 ^a	0.03
Spermatogonia*** (n)	176.85±5.4 ^b	182.75±8.96 ^b	203.25±4.78 ^a	203.17±2.76 ^a	<0.01
Leydig cells**** (n)	13.22±0.78	14.40±1.23	15.42±1.02	15.55±0.94	0.36
Blood vessels**** (n)	2.08±0.29	1.44±0.18	2.19±0.30	2.02±0.39	0.27

(a-b) مقادیر موجود در یک ردیف با حروف غیرمشترک تفاوت معنی‌داری دارند.

* پرنده‌گان (پنج پرنده در هر تیمار) سطوح مختلف کریسین شامل صفر (Ch0)، ۲۵ (Ch25)، ۵۰ (Ch50) و ۷۵ (Ch75) میلی‌گرم در روز را به‌مدت ۱۲ هفته دریافت کردند.

** براساس میانگین مقاطع عرضی ۲۰ لوله اسپرم‌ساز در هر پرنده محاسبه شده است.

*** براساس میانگین ۲۰ تصویر (۰/۳۷ میلی‌متر مربع) محاسبه شده است.

a-b) Values within a row with different superscripts are significantly different.

* The birds (n=5/treat) received different levels of Chrysin including: 0 (Ch0), Ch25 (Ch25), Ch50 (Ch50) or Ch75 (Ch75) mg/bird/day for 12 consecutive weeks.

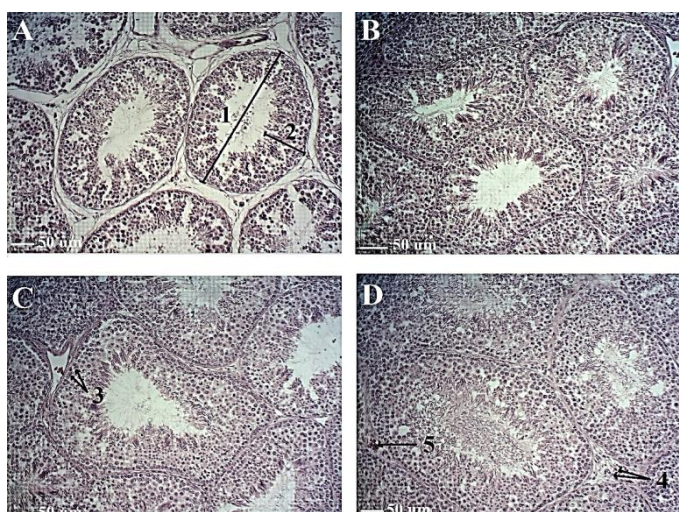
** Calculated based on 20 randomly cross-sections of seminiferous tubules in each bird and averaged.

*** Calculated based on 20 micrographs (0.37 mm²) and averaged.

یافت (شکل ۲). علاوه بر اثر آنتی‌اکسیدانی، اثرات محرک استروئیدسازی (Jana *et al.*, 2008) و آنتی‌آروماتازی (Campbell & Kurzer, 1993; Sanderson *et al.*, 2004) کریسین نیز در مطالعات گذشته گزارش شده است. با افزایش سن، کاهش سطح ترانسکریپت و پروتئین StAR و بنابراین نقص در انتقال کلسترول به درون میتوکندری از دلایل کاهش استروئیدسازی و غلظت تستوسترون در سلول‌های لایدیگ موش صحرائی گزارش شده است (Luo *et al.*, 2001).

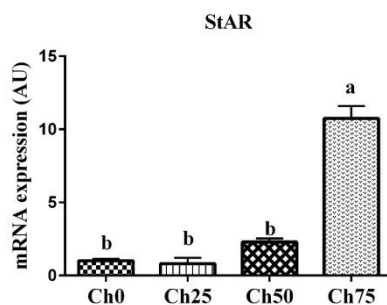
در پژوهش حاضر احتمالاً کریسین با بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی توانسته است سبب کاهش تنش اکسیداتیو و آپوپتوز در اپیتلیوم زاینده لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه و در نهایت افزایش تکثیر اسپرماتوگونی‌ها شود. یافته‌های مورفولوژیک (شکل ۱) نیز تأییدی بر یافته‌های مورفومتریک است (جدول ۳).

در پژوهش حاضر سطح ترانسکریپت StAR در پرندگانی که روزانه ۷۵ میلی‌گرم کریسین دریافت کرده بودند، نسبت به گروه‌های دیگر به‌طور معنی‌داری افزایش



شکل ۱. مقطع عرضی بیضه خروس‌های تغذیه شده با سطوح مختلف کریسین [صفر (A)، ۲۵ (B)، ۵۰ (C) و ۷۵ (D) میلی‌گرم به ازای هر پرنده در روز به مدت ۱۲ هفته متوالی]. ۱- قطر لوله اسپرم‌ساز، ۲- ضخامت اپیتلیوم لوله اسپرم‌ساز، ۳- اسپرماتوگونی‌ها، ۴- سلول‌های لایدیگ و ۵- رگ خونی. نوار مقیاس ۵۰ میکرومتر است. بزرگنمایی $\times 100$

Figure 1. Testicular cross-section of roosters fed different levels of Chrysin [A: 0 (Ch0), B: 25 (Ch25), C: 50 (Ch50) or D: 75 (Ch75) mg/bird/day for 12 successive weeks]. 1: Seminiferous tubule diameter, 2: Seminiferous epithelium thickness, 3: Spermatogonia, 4: Leydig cells, 5: Blood vessel. Scale bar is 50 μ m. Magnificent: 100x



شکل ۲. بیان نسبی StAR در بیضه خروس‌های (پنج پرنده در هر گروه) تغذیه شده با سطوح مختلف کریسین [صفر (Ch0)، ۲۵ (Ch25)، ۵۰ (Ch50) و ۷۵ (Ch75) میلی‌گرم به ازای هر پرنده در روز به مدت ۱۲ هفته متوالی]. بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت $LSmean \pm SE$ نمایش شده است. ستون‌های با حروف غیرمشترک در سطح 0.05 اختلاف معنی‌دار دارند. AU: واحد اختیاری

Figure 2. Testicular StAR mRNA expression of broiler breeder roosters (five birds per each group) fed different levels of Chrysin [0 (Ch0), 25 (Ch25), 50 (Ch50) or 75 (Ch75) mg/bird/day for 12 successive weeks]. β -actin was considered as an internal control. Data are presented as mean \pm SE. Bars bearing different letters are significantly ($p < 0.05$) different. AU: arbitrary units.

به‌طور غیرمستقیم و از طریق سلول‌های سرتولی تحت تأثیر قرار می‌دهند. با حذف گیرنده آندروژن از سلول‌های سرتولی، توسعه سلول‌های زاینده در گامه‌های اسپرماتوسیت و یا اسپرماتید اولیه متوقف می‌شود بنابراین، گیرنده‌های آندروژن نقش مهمی در حفظ توانایی سلول‌های سرتولی در پشتیبانی از اسپرم‌سازی داشته و سلول‌های سرتولی مکان اصلی میانجی‌گر حمایت آندروژن از اسپرم‌سازی است (Dimitriadis *et al.*, 2015). با وجود نیاز به تمایز اثرات مختلف کریسین در بیضه، به نظر می‌رسد که در این پژوهش اثرات مثبت مشاهده‌شده احتمالاً با تحریک سامانه آنتی‌اکسیدانی، ماشین استروئیدسازی و فعالیت آنتی‌آروماتازی میانجی‌گری شده است.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش استفاده از سطوح ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم کریسین در روز به مدت ۱۲ هفته متوالی توانست برخی فراسنجه‌های بافت‌شناسی و بیان نسبی StAR در بیضه خروس‌های مادر گوشتی را بهبود دهد. تقویت سامانه آنتی‌اکسیدانی و تحریک مسیر آدنیلات سیکلاز- پروتئین کیناز A و همچنین فعالیت آنتی‌آروماتازی از سازوکارهای احتمالی اثر کریسین برای پژوهش پیشنهاد می‌شود اما برای تأیید این نتایج نیاز به مطالعات بیشتری است.

به‌خوبی مشخص شده است که اثر حاد LH بر استروئیدسازی پس از اتصال آن به گیرنده خود و فعال‌سازی مسیر آدنیلات سیکلاز-پروتئین کیناز A، شامل انتقال کلسترول از ذخایر درون سلولی به غشای داخلی میتوکندری است، اما اثر مزمن آن افزایش بیان آنزیم‌های استروئیدسازی است (Midzak *et al.*, 2009). با وجود اینکه مقدار cAMP در این پژوهش اندازه‌گیری نشده است، اما احتمالاً اثر مثبت کریسین بر بیان نسبی StAR در بیضه با افزایش cAMP میانجی‌گری 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 (Luo *et al.*, 2001). افزایش تولید تستوسترون از بیضه نیز توسعه بیشتر اپیتلیوم زاینده را سبب می‌شود و همبستگی مثبتی بین غلظت تستوسترون پلازما و تعداد و کنش سلول‌های سرتولی گزارش شده است (Thurston & Korn, 2000). علاوه براین، گیرنده آندروژن نیز نقش مهمی در تنظیم سطح تستوسترون دارد. این گیرنده در سلول‌های سوماتیک بیضه‌ای شامل سلول‌های لایدیگ، میوتید فراتوبولی، سلول‌های ماهیچه صاف رگ‌های خونی و سلول‌های سرتولی حضور دارد. به‌نظر نمی‌رسد که سلول‌های زاینده بیضه بالغ نیازی به گیرنده‌های آندروژن فعال داشته باشند و این نشان می‌دهد که آندروژن‌ها اسپرم‌سازی را

REFERENCES

1. Aitken, R. J. & Roman, S. D. (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1, 15-24.
2. Ali, E. A., Zhandi, M., Towhidi, A., Zaghari, M., Ansari, M., Najafi, M. & Deldar, H. (2017). Letrozole, an aromatase inhibitor, reduces post-peak age-related regression of rooster reproductive performance. *Animal Reproduction Science*, 183, 110-117.
3. Amin Altawash, A. S., Shahneh, A. Z., Moravej, H. & Ansari, M. (2017). Chrysin-induced sperm parameters and fatty acid profile changes improve reproductive performance of roosters. *Theriogenology*, 104, 72-79.
4. Borghei-Rad, S. M., Zeinoaldini, S., Zhandi, M., Moravej, H. & Ansari, M. (2017). Feeding rosemary leaves powder ameliorates rooster age-related subfertility. *Theriogenology*, 101, 35-43.
5. Campbell, D. R., & Kurzer, M. S. (1993). Flavonoid inhibition of aromatase enzyme activity in human preadipocytes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 46, 381-8.
6. Ciftci, O., Ozdemir, I., Aydin, M. & Beytur, A. (2012). Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. *Andrologia*, 44, 181-6.
7. Dhawan, K., Kumar, S. & Sharma, A. (2002). Beneficial effects of chrysin and benzoflavone on virility in 2-year-old male rats. *Journal of Medicinal Food*, 5, 43-8.
8. Dimitriadis, F., Tsiampali, C., Chaliasos, N., Tsounapi, P., Takenaka, A. & Sofikitis, N. (2015). The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *Hormones (Athens)*, 14, 479-503.

9. Giudice, M. G., de Michele, F., Poels, J., Vermeulen, M. & Wyns, C. (2017). Update on fertility restoration from prepubertal spermatogonial stem cells: How far are we from clinical practice? *Stem Cell Research*, 21, 171-177.
10. Ikeda, M., Kodama, H., Fukuda, J., Shimizu, Y., Murata, M., Kumagai, J. & Tanaka, T. (1999). Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biology of Reproduction*, 61, 393-399.
11. Islam, M. N., Zhu, Z. B., Aoyama, M. & Sugita, S. (2010). Histological and morphometric analyses of seasonal testicular variations in the Jungle Crow (*Corvus macrorhynchos*). *Anatomical Science International*, 85, 121-129.
12. Jana, K., Yin, X., Schiffer, R. B., Chen, J. J., Pandey, A. K., Stocco, D. M., Grammas, P. & Wang, X. (2008). Chrysin, a natural flavonoid enhances steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression in mouse Leydig cells. *Journal of Endocrinology*, 197, 315-23.
13. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*, 25, 402-8.
14. Luo, L., Chen, H., Trush, M. A., Show, M. D., Anway, M. D. & Zirkin, B. R. (2006). Aging and the brown Norway rat Leydig cell antioxidant defense system. *Journal of Andrology*, 27, 240-7.
15. Luo, L., Chen, H. & Zirkin, B. R. (2001) Leydig cell aging: steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and cholesterol side-chain cleavage enzyme. *Journal of Andrology*, 22, 149-56.
16. Mantawy, E. M., El-Bakly, W. M., Esmat, A., Badr, A. M. & El-Demerdash, E. (2014). Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, 728, 107-18.
17. Midzak, A. S., Chen, H., Papadopoulos, V. & Zirkin, B. R. (2009). Leydig cell aging and the mechanisms of reduced testosterone synthesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299, 23-31
18. Rosenstrauch, A., Weil, S., Degen, A. A. & Friedländer, M. (1998). Leydig cell functional structure and plasma androgen level during the decline in fertility in aging roosters. *General and Comparative Endocrinology*, 109, 251-258.
19. Sanderson, J. T., Hordijk, J., Denison, M. S., Springsteel, M. F., Nantz, M. H. & van den Berg, M. (2004). Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by natural and synthetic flavonoid compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicological Sciences*, 82, 70-79.
20. Sarabia Fragoso, J., Pizarro Diaz, M., Abad Moreno, J. C., Casanovas Infesta, P., Rodriguez-Bertos, A. & Barger, 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. Surai, P., Noble, R., Sparks, N. & Speake, B. (2000). Effect of long-term supplementation with arachidonic or docosahexaenoic acids on sperm production in the broiler chicken. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120, 257-264.
22. Thurston, R. J. & Korn, N. (2000). Spermiogenesis in commercial poultry species: anatomy and control. *Poultry Science*, 79, 1650-68.
23. Turner, T. T. & Lysiak, J. J. (2008). Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *Journal of Andrology*, 29, 488-98.
24. Weil, S., Degen, A. A., Friedlander, M. & Rosenstrauch, A. (1999a). Low fertility in aging roosters is related to a high plasma concentration of insulin and low testicular contents of ACTH and lactate. *General and Comparative Endocrinology*, 115, 110-5.
25. Weil, S., Rozenboim, I., Degen, A.A., Dawson, A., Friedländer, M. & Rosenstrauch, A. (1999b). Fertility decline in aging roosters is related to increase testicular and plasma levels of estradiol. *General and Comparative Endocrinology*, 115, 23-28.
26. Xu, Y., Li, J., Liang, W. & Zhu, W. (2013). Evaluation on Changes of Testicular Histology in Aging Men. *Journal of Reproduction and Contraception*, 24, 199-204.
27. Zirkin, B. R. & Chen, H. (2000). Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biology of Reproduction*, 63, 977-81.