Archive of SID

تولیدات دامی
دوره ۲۱ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۸
صفحه‌های ۴۳۹-۴۳۱

بررسی اثر گیاه خارخاسک بر نسبت جنسیت اسپرم قوچ عربی خوزستان با تکنیک Real-time qPCR

کبری کریمی[1*]، محمدتقی بیگی نصیری[2]، محمود نظری[3]، خلیل میرزاده[4]
۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران.
۲. استاد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران.
۳. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران.
۴. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۰۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۴/۲۸

چکیده

این پژوهش به‌منظور بررسی اثر گیاه خارخاسک بر نسبت جنسیت اسپرم قوچ عربی خوزستان با تکنیک Real-time qPCR با استفاده از ۱۸ راس قوچ عربی خوزستان با سه تیمار انجام شد. ژن‌های SRY و PLP به‌ترتیب برای جداسازی قطعات خاصی از توالی‌های کروموزوم Y- و X- تکثیر شدند. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱- گروه شاهد، ۲- جیره حاوی ۱۵ گرم بر کیلوگرم گیاه خارخاسک، ۳- جیره حاوی۳۰ گرم بر کیلوگرم گیاه خارخاسک در جیره بود. از تمامی قوچ‌ها در ماه دهم اسپرم‌گیری و در ماه هشتم و دهم خون‌گیری انجام شد. نتایج نشان داد، که با افزایش سطح خارخاسک میزان بیان ژن SRY روند افزایشی داشت و حیواناتی که جیره حاوی ۳۰ گرم در کیلوگرم گیاه خارخاسک را دریافت کردند بالاترین میزان افزایش بیان ژن SRY را داشتند و هم‌چنین با افزایش سطح خارخاسک میزان بیان ژن PLP دارای روند کاهشی بود (p-value=۰/۰۰۴). همبستگی بین ژن SRY و غلظت تستوسترون در سن هشت و ۱۰ ماهگی به‌ترتیب برابر ۰/۶۵ و ۰/۵۹ و برای ژن PLP و غلظت تستوسترون به‌ترتیب برابر با ۰/۶۱- و ۰/۶۶- بود (p-value=۰/۰۰۶). براساس یافته‌های حاصل از این تحقیق مشخص شد که گیاه خارخاسک با افزایش آندروژن‌ها سبب افزایش نسبت ژن SRY و اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y و به‌عبارتی افزایش نسبت جنسیت به سمت ژن نرزایی در قوچ‌های عربی خوزستان می‌شود.

کلیدواژه‌ها: تستوسترون، جنسیت، ژن PLP، ژن SRY، گیرنده آندروژن.

Effect of Tribulus trrestris herb on sex ratio of sperm in Arabic-Khozestan ram by real-time-qPCR technique

Kobra Karimi [1*], Mohammad Taghi Beigi Nassiri [2], Mahmood Nazari [3], Khalil Mirzadeh [4]
1. Former M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran.
2. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran.
4. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran.
Received: April 22, 2019 Accepted: July 19, 2019

Abstract

The present study was conducted to evaluate the effect of Tribulus Tresstrise (TT) herb on sex ratio of semen in Arabic Khouzestan ram using real time-qPCR technique using 18 rams in a completely randomized design with 3 treatments. The SRY and PLP genes were amplified to isolate the specific fragments of Y- and X- chromosome sequences. The treatments included: i) the control group (0% TT), ii) Diet containing 15 g/kg TT, iii) Diet containing 30 g/kg TT. Sperm sampling was taken from all rams at 10 month of age and blood sampling was performed at 8 and 10 month of age. The results showed that expression rate of SRY gene increased with increasing TT level and rams that received 30 g/kg TT diet had the highest SRY gene expression and PLP gene expression decreased with increasing TT level (p-value =0.004). There was positive correlation between Testosterone concentration and SRY gene expression at 8 (0.65) and 10 (0.59) month of age, and the relationship between PLP gene expression and Testosterone concentration was negative and -0.61 and -0.66 at 8 and 10 month of age, respectively (p-value= 0.006). The results indicated that adding Tribulus Tresstrise herb to the ram diet increases the SRY gene expression and also sperm containing Y chromosome. In other words, it increases the sex ratio toward male gens in Arabic Khozestan ram by increasing the androgen hormones.

Keywords: Androgen receptor, PLP gene, Sex, SRY gene, Testosterone.

* نویسنده مسئول
Email: MSc.k.karimi98@asnrukh.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گیاه دارویی خارخاسک با نام علمی (*Tribulus terrestri*) گیاهی است یک‌ساله و علفی با ساقه‌های خوابیده و انشعابات گسترده بر سطح خاک که برگ‌ها و ساقه‌های جوان آن توسط تارهای ظریف ابریشمی پوشیده شده‌اند [۴]. ترکیبات شیمیایی این گیاه شامل انواع رزین‌ها، فلانونیدها، آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، پروتودیوسین، اسیدهای چرب غیراشباع، ویتامین‌ها، پتاسیم، موادمعدنی، اسیدآسپارتیک و اسیدگلوتامیک می‌باشند. هم‌چنین دارای ۵ نوع ماده گلیکوزیدی است که همه گلوکز، آرابینوز و رامنوز دارند [۲]. خارخاسک حاوی اسیدهای چرب غیراشباع است. اسیدهای چرب غیراشباع فعالیت آنزیم ۱۷- بتاهیدروکسی استروئید دهیدروژناز را افزایش می‌دهند؛ ازآنجایی‌که این آنزیم در تولید تستوسترون دخیل است بنابراین سبب افزایش غلظت هورمون تستوسترون می‌شود [۱۶]. در مطالعه‌ای دیگرگزارش کردند که این ترکیبات اسیدی فعالیت آنزیم آروماتاز را مهار می‌کند و با توجه به این‌که این آنزیم سبب تبدیل آندروژن به استروژن می‌شود، بنابراین مهار فعالیت آن سبب افزایش میزان آندروژن (تستوسترون) در خون می‌شود [۲۲].

افزایش سطح تستوسترون خون نرها می‌تواند منجر به انحراف نسبت جنسیت به سمت نرزایی شود؛ که این اثر احتمالاً ناشی از تغییر نسبت جنسیتی اسپرماتوزوئیدها می‌باشد، چون نرها هتروگامت هستند [۹]. تستوسترون هورمون استروئیدی است که می‌تواند مستقیماً به گیرنده‌های آندروژن متصل شود و یا توسط آنزیم آروماتاز (سیتوکروم P450) به استرادیول آروماتیزه شود [۵]. هورمون تستوسترون وارد سلول شده و به گیرنده آندروژن متصل می‌شود، سپس این گیرنده دچار تغییر ساختاری شده و منجر به رهاسازی پروتئین گرماشوک (HSPs) می‌شود. واکنش فسفریلاسیون قبل یا بعد از این اتصال هورمونی رخ می‌دهد. کمپلکس AR به داخل هسته سلول نقل مکان می‌کند و در آنجا دیمریزاسیون، اتصال به DNA و به‌کارگیری راه‌اندازها پیش می‌آید؛ ژن‌های هدف رونویسی می‌شوند و به پروتئین مربوطه ترجمه می‌شوند. ژن‌های تنظیم‌شونده توسط آندروژن‌ها (هورمون‌های جنسی مردانه) برای شکل‌گیری و تداوم فنوتیپ جنسی مردانه نقش مهمی ایفا می‌کنند [۳]. گیرنده آندروژن روی کروموزوم X قرار دارد [۱۹]. این گیرنده متعلق به خانواده‌ای از گیرنده‌های هورمونی هسته‌ای است که شامل گیرنده استروژن و پروژسترون نیز می‌شود و در سیتوزول سلول‌های هدف حضور دارند و به‌عنوان عوامل نسخه برداری وابسته به لیگاند انجام وظیفه می‌نمایند [۳].

کروموزوم Y حاوی ژن‌هایی است که که در تعیین جنسیت جنین در حیوانات اهلی مؤثرند. SRY یکی از ژن‌های مؤثر در تعیین جنسیت است [۱۷]. بیان ژن SRY سبب تمایز سلول‌های سرتولی از سلول‌های پیش‌ساز و در نهایت تشکیل بیضه می‌شود [۱]. جهت شناسایی کروموزوم X از ژن PLP استفاده می‌شود این ژن مسئول تولید پروتئولیپید پروتئین روی کروموزوم X می‌باشد که در تمام بافت‌های عصبی و غیرعصبی بیان می‌شود [۱۹]. دو ناحیه اتوزومی کاذب شامل PAR1 و PAR2 که به ترتیب روی بازوی کوتاه و بلند کروموزوم Y قرار دارند، همولوگ‌هایی نیز روی کروموزوم X دارند. PAR1 روی بازوی کوتاه کروموزوم‌های X و Y انسان و میمون‌ها وجود دارد و برای سیناپس کروموزوم‌های جنسی، حین تقسیم میوز ضروری می‌باشد. PAR2 روی بازوی بلند قرار دارد و در تقسیم میوز و باروری مردان و سیناپس کروموزوم‌ها ضروری نیست [۱۱]. یکی از روش‌های تغییر نسبت جنسی، تغییر نسبت اسپرم X و Y در انزال است. طی فرایند اسپرماتوژنز، انتظار می‌رود که نسبت

www.SID.ir

Archive of SID

اسپرم X به Y، ۵۰ به ۵۰ باشد [۷]. روش‌هایی برای ارزیابی نسبت جنسیت در سال ۱۹۷۰ معرفی شدند که در میان این روش‌ها، روش‌های مبتنی بر PCR آسان و دقیق‌تر بودند.

در تحقیقی مشخص شد که عصاره گیاه خارخاسک سبب افزایش غلظت هورمون تستوسترون، محیط بیضه، ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی اسپرم و تعداد کل اسپرم‌ها در قوچ‌ها می‌شود [۱۸]. به‌نظر می‌رسد که تغذیه گیاه خارخاسک در قوچ‌ها می‌تواند سبب تغییرات هورمونی مخصوصاً تستوسترون در دام شده و به‌تبع آن منجر به تغییرات نسبت جنسیتی اسپرم گردد. لذا هدف از این آزمایش بررسی اثر تغذیه گیاه خارخاسک در قوچ‌های عربی خوزستان بر نسبت جنسیتی اسپرم با استفاده از تکنیک Real-time qPCR بود.

مواد و روش‌ها

تمامی مواد و محلول‌های مورد استفاده برای استخراج DNA از شرکت Merck آلمان تهیه شدند. از کیت تجاری AMPLIQON (CAT. NO: 5000830-1250). به‌منظور تکثیر قطعات مورد نظر در تکنیک Real-time qPCR استفاده شد. این پژوهش در ایستگاه دامپروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. از تعداد ۱۸ راس بره عربی خوزستان با میانگین سن سه ماه و میانگین وزن یکسان استفاده شد. بره‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی به سه تیمار (شش راس قوچ در هر تیمار) و از سه تا ۱۰ ماهگی با جیره‌های حاوی صفر، ۱۵ و ۳۰ گرم گیاه خارخاسک در هر کیلوگرم تغذیه شدند. اسپرم گیری در ماه دهم و خون‌گیری نیز در ماه هشتم و دهم بعد از تولد بره‌ها صورت گرفت. برای اطمینان از اثر گیاه بر غلظت هورمون در کل دوره اسپرماتوژنز و با توجه به درنظرگرفتن طول دوره اسپرماتوژنز در قوچ، بررسی غلظت تستوسترون خون در ماه هشتم برای اندازه‌گیری غلظت تستوسترون خون در مراحل ابتدایی تکامل اسپرماتوزوئید و در ماه دهم نیز به‌دلیل بررسی غلظت تستوسترون خون در زمان تکامل و بلوغ اسپرم (زمان اسپرم‌گیری) انجام گرفت. نمونه‌های خون از سیاهرگ وداج گردن از طریق لوله‌های ونوجکت بدون ماده ضدانعقاد گرفته شده و با استفاده از سانتریفیوژ (مدل: eppendorf، کشور آلمان) به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سرم آنها جدا و در میکروتیوب‌های پلاستیک در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان ارسال به آزمایشگاه نگهداری شدند.

جهت اسپرم‌گیری از دستگاه الکترواجکولاتور (مدل: OGAVA SEIKI، کشور ژاپن) استفاده شد. به‌منظور اندازه‌گیری غلظت تستوسترون خون از کیت تجاری انسانی AccuBind ELISA شرکت دیامترا استفاده شد. استخراج DNA با استفاده از پروتکل استخراج نمکی صورت گرفت [۱۲]. کیفیت DNA استخراج‌شده روی ژل آگارز یک درصد مورد سنجش قرار گرفت. پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های موردنظر روی کروموزوم Y و X مشخص شدند. ژن SRY به‌عنوان ژن نرزایی روی کروموزوم Y با طول قطعه ۸۹ جفت باز و با شماره بانک ژنی AJ009913-1 انتخاب شد. هم‌چنین ژن PLP به‌عنوان ژن ماده‌زایی با طول قطعه۹۰ جفت باز و با شماره بانک ژنی EU581861-1 انتخاب شد. از ژن PAR به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. این ژن با طول قطعه ۷۹ جفت باز و شماره بانک ژنی AC234910-2 مورد استفاده قرار گرفت [۱۰]. به‌منظور تأیید تکثیر اختصاصی ژن‌های موردنظر در این مطالعه با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده ابتدا واکنش PCR انجام شد. در صورت تکثیر ژن‌های موردنظر با استفاده از پرایمرهای مشخص‌شده، به‌منظور بررسی مقایسه‌ای بیان ژن‌ها از آزمون PCR در زمان حقیقی (Real time PCR) استفاده شد. توالی، طول قطعه و نیز دمای اتصال هر پرایمر در (جدول ۱) آمده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در واکنش Real-time PCR

پرایمر	توالی	اندازه محصول (bp)	دمای اتصال
ژن SRY	F:5´CTCAGACATCAGCAAGCAGC3´ R:5´-GTAGTCTCTGTGCCTCCTCA-3´	۸۹	۶۰
ژن PLP	F:5´GAGGGAGGGTGGATCATAGA3´ R:5´:CCTCTGGGACCTTCAACAAT3´	۹۰	۶۰
ژن PAR	F:5´-GCCATCACATCTGAGACCAC-3´ R:5´-GACTCAGCATCTCGAAGCAA-3´	۷۹	۶۰

برای انجام واکنش PCR از دستگاه (مدل Thermalcycler Mini، کشور آلمان) استفاده شد. طی این مرحله، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز پیشرفته برای نمونه‌های DNA حاصل از اسپرماتوزوئیدها با دو تکرار آزمایشی برای ژن‌های PLP، SRY و ژن مرجع PAR با استفاده از دستگاه (step one Plus Real Time PCR System، کشور آمریکا) در پلیت‌های مجزا انجام شد. پس از آماده‌کردن پلیت، تنظیمات مربوط به دستگاه انجام و تحت دستورالعمل (جدول ۲) چرخه‌های دمایی واکنش‌ها طی سه مرحله زمانی صورت گرفت.

برای آنالیز داده‌های حاصل از Real-time PCR با استفاده از نرم‌افزار Step-one ABI استفاده شد. برای محاسبه درصد ژن SRY و PLP مقادیر مربوط به چرخه آستانه (C_T) حاصل از تکرارهای بیولوژیکی و تکنیکی هر نمونه به نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۳) انتقال داده شد و به‌منظور محاسبه درصد ژن SRY و PLP در اسپرماتوزوئیدها، میانگین C_T برای تکرارهای تکنیکی محاسبه و با استفاده از (رابطه ۱) میزان Δ_{CT} برآورد شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۸) با استفاده از آنالیز روند انجام شد و بهترین سطح مصرف براساس آزمون تابعیت و مشتق‌گیری تابع برآورد شد. هم‌چنین با استفاده از دستور Corr در نرم‌افزار SPSS ضریب همبستگی بین غلظت تستوسترون و ژن SRY و PLP براساس محاسبه شد.

(رابطه ۱)

$$\text{Fold chang} = \frac{2^{-(ct\ \text{target}-ct\ reference)_{sample}}}{2^{-(ct\ \text{target}-ct\ reference)_{control}}} = 2^{-(\Delta ct\ sample-\Delta ct\ control)}$$

$\Delta_{CT}= C_{T(target)}-C_{T(reference)}$

$\Delta_{CT}= C_{T\ (sry)}-C_{T(par)}$

$\Delta_{CT}=C_{T(plp)}-C_{T(par)}$

جدول ۲. چرخه‌های دمایی مورد استفاده در واکنش Real-time qPCR

مراحل	تعداد چرخه‌ها		دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان
مرحله اول	۱	واسرشت‌سازی اولیه	۹۵	۱۵ دقیقه
مرحله دوم	۴۰	واسرشت‌سازی	۹۵	۱۵–۳۰ ثانیه
		اتصال پرایمر	۶۰	۳۰ ثانیه
		بسط	۷۲	۳۰ ثانیه
مرحله سوم		رسم منحنی تفکیک	۵۵–۵۹	۱۰ ثانیه

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

نتایج حاصل نشان داد که میزان بیان ژن SRY دارای روند خطی افزایشی و نیز درجه دوم است. هم‌چنین با استفاده از ضرایب تابعیت به‌دست‌آمده (جدول ۳) مشخص شد که مصرف جیره حاوی ۳۰ گرم بر کیلوگرم از گیاه خارخاسک در جیره، موجب بالاترین میزان افزایش بیان ژن SRY به‌میزان ۲/۴۴ شد (رابطه ۳). میزان بیان ژن PLP دارای روند خطی کاهشی بوده (جدول ۴) و میزان آن در نقاط ابتدا و انتها (سطح صفر و سطح ۳۰ گرم در کیلوگرم گیاه خارخاسک) به‌ترتیب برابر۰/۷۲۲ و ۰/۷۸۷ برآورد شد (رابطه‌های ۲ و ۳). میانگین مربعات مدل خطی و مدل درجه دوم برای ژن PLP به‌ترتیب برابر ۰/۳۴۶ (p-value=۰/۰۰۴) و ۰/۳۸۵ (p-value=۰/۰۰۰۱) و برای ژن SRY به‌ترتیب ۴/۶۴۳ (p-value=۰/۰۰۰۱) و ۲/۶۱۲ (p-value=۰/۰۰۰۱) برآورد شد.

جدول ۳. ضریب تابعیت برای ژن SRY

مدل	ضریب تابعیت	خطای استاندارد
خطی		
عرض از مبدأ	۱/۷۴۹	۰/۰۴۷
X	۰/۶۲۲	۰/۰۵۷
درجه دوم		
عرض ار مبدأ	۱/۷۴۹	۰/۰۱۴
X	۰/۶۲۲	۰/۰۱۷
X^2	−۰/۱۲۷	۰/۰۱۰

با استفاده از نتایج حاصل از جدول فرمول محاسبه روند درجه دوم برای ژن PLP (رابطه ۲) و SRY (رابطه ۳) محاسبه شدند. برای ژن PLP چون دارای مینیمم است با مشتق‌گیری از فرمول و برابر با صفر قراردادن آن، نقاط ابتدا و انتها یعنی سطح صفر و ۳۰ را برآورد می‌کنیم و برای ژن SRY چون دارای ماکزیمم است و روند صعودی دارد فرمول را برابر با صفر قرار داده و بیشینه آن را در یک نقطه و یعنی سطح ۳۰ گرم در کیلوگرم (نقطه ماکزیمم) برآورد می‌کنیم.

$PLP = ۰/۷۲۲ - ۰/۱۷x + ۰/۱۰۸x^۲$ (رابطه ۲)

$x = ۰ _ PLP = ۰/۷۲۲$

$x = ۳۰ _ PLP = ۰/۷۸۷$

$SRY = ۱/۷۹۴ + ۰/۶۲۲x - ۰/۱۲۷x^۲$ (رابطه ۳)

$x = \frac{-b1}{2b2} = ۲/۴۴$

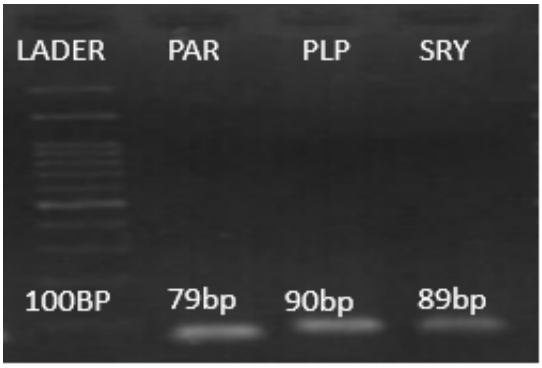
جدول ۴. ضریب تابعیت برای ژن PLP

مدل	ضریب تابعیت	خطای استاندارد
خطی		
عرض از مبدأ	۰/۷۲۲	۰/۰۴۱
X	۰/۱۷۰	۰/۰۵۰
درجه دوم		
عرض از مبدأ	۰/۷۲۲	۰/۰۱۴
X	۰/۱۷۰	۰/۰۱۷
X^2	۰/۱۰۸	۰/۰۱۰

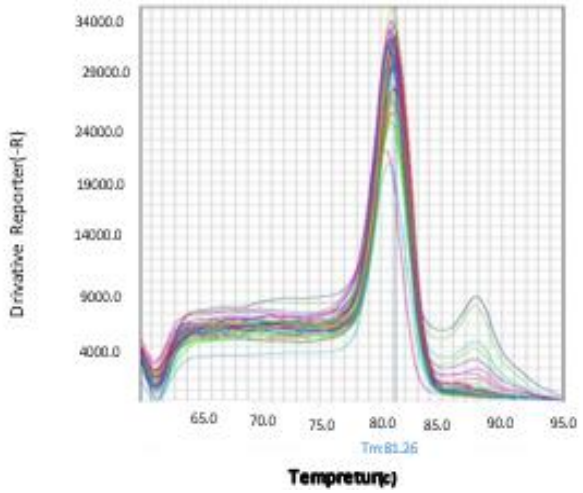
بررسی کیفیت محصول PCR روی ژل آگارز برای ژن‌های PLP، SRY و PAR تکثیر مناسب را برای پرایمرهای هر سه ژن نشان داد (شکل ۱). منحنی قله ذوب ژن PLP، SRY و PAR نشان‌دهنده تکثیر اختصاصی قطعات موردنظر است (شکل‌های ۲، ۳ و ۴). همبستگی بین ژن SRY و غلظت تستوسترون خون در ماه هشتم برابر ۰/۶۵ و در ماه دهم برابر ۰/۵۹ و این همبستگی برای ژن PLP در ماه هشتم برابر ۰/۶۱− و در ماه دهم ۰/۶۶− برآورد شد (جدول ۵). با افزایش غلظت تستوسترون خون میزان نسبی اسپرماتوزوئیدهای حاوی ژن SRY افزایش و میزان نسبی اسپرماتوزوئیدهای حاوی ژن PLP به‌طور معنی‌داری کاهش یافت.

www.SID.ir

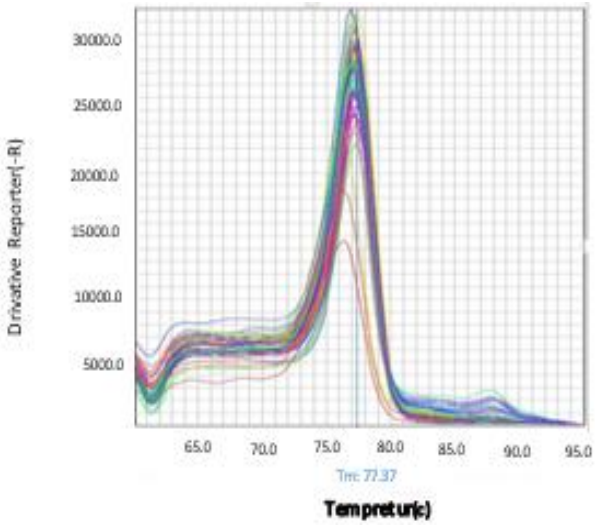
Archive of SID



شکل ۱. نتیجه الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ۲ درصد



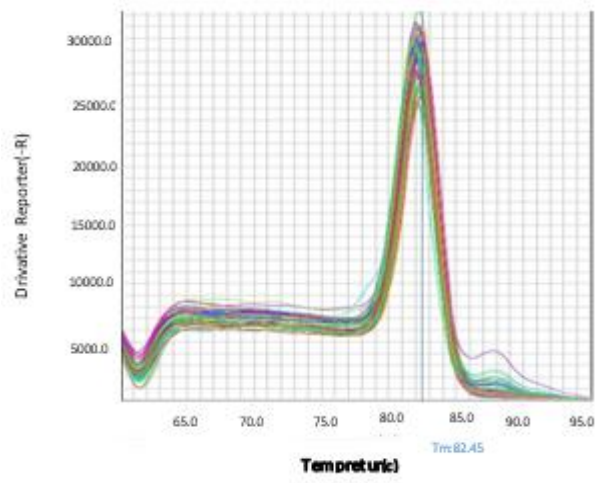
شکل ۲. منحنی ذوب برای ژنPLP



شکل ۳. منحنی ذوب برای ژن SRY

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴. منحنی ذوب برای ژن PAR

جدول ۵. اثر تغذیه گیاه خارخاسک بر غلظت تستوسترون سرم خون (نانوگرم/ میلی‌لیتر) قوچ عربی خوزستان در ماه ششم و هشتم بعد از تولد (میانگین± خطای استاندارد)

	گروه کنترل	گروه دوم	گروه سوم
غلظت تستوسترون خون در ماه هشتم	۱۵/۸۸۵ ± ۱/۶۶۷ [b]	۱۹/۹۴۰±۱/۵۹۸ [a]	۱۸/۸۶۴ ±۱ /۵۱۵ [a]
غلظت تستوسترون خون در ماه دهم	۱۵/۶۰۹۸ ±۲/۲۵۴[b]	۱۹/۳۶۸ ± ۱/ ۹۵۴[a]	۱۸/۳۷۵±۱/۶۲۵[a]

a-c: تفاوت ارقام در هر ردیف با حروف نامشابه معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

نسبت جنسیت اولیه و ثانویه در طبیعت در تمام گروه‌های مهره‌داران با غلظت هورمون‌ها در ارتباط است و هم‌چنین یک الگوی قابل‌توجهی در بین این گروه‌ها وجود دارد و ثابت شده است که افزایش غلظت آندروژن‌ها سبب تولید نتاج نر بیش‌تری نسبت به نتاج ماده در مهره‌داران می‌شود [۱۳].

یکی از مهم‌ترین فاکتورهای زنده‌مانی سلول‌های بنیادی در مردان، هورمون‌ها و از جمله تستوسترون می‌باشد [۱۰]. افزایش غلظت هورمون تستوسترون منجر به القای آپوپتوز اسپرماتوسیت و اسپرماتید می‌شود و هر دو مسیر درونی و بیرونی مرگ سلولی فعال می‌شوند. تستوسترون احتمالاً یا از طریق آنتی‌ژن‌ها و یا از طریق گیرنده مرگ سبب تغییر نسبت جنسیتی اسپرم می‌شود [۲۰]، بنابراین می‌توان بیان کرد که مصرف گیاه خارخاسک از طریق افزایش سطح هورمون تستوسترون سبب مرگ سلولی می‌شود از طرفی با توجه به این‌که ژن گیرنده آندروژن روی کروموزوم X قرار دارد می‌توان بیان کرد که سبب دیمریزاسیون DNA آن شده و سبب کاهش نسبی اسپرماتوزوئیدهای حامل کروموزوم X شده و به‌تبع آن نسبت اسپرماتوزوئیدهای حامل کروموزوم Y افزایش می‌یابد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان بیان داشت که با توجه به این‌که غلظت هورمون تستوسترون در هر دو گروه مصرف‌کننده گیاه خارخاسک برابر بوده ولی گروه مصرف‌کننده ۳۰ گرم گیاه خارخاسک نسبت به گروه دوم افزایش معنی‌داری را در نسبت بیان ژن SRY نشان دادند؛ پس می‌توان بیان کرد که در این پژوهش علاوه بر غلظت

www.SID.ir

Archive of SID

هورمون تستوسترون خون، عوامل مؤثره دیگری نیز وجود داشته‌اند که احتمالاً در افزایش بیان ژن SRY مؤثر بوده‌اند. در مطالعات زیادی نقش هورمون‌های استرس بر نسبت جنسیت نوزادان مورد بررسی قرار گرفته است؛ مشخص شده مردانی که در معرض شغل‌های استرس‌زا قرار دارند، غلظت گلوکوکورتیکوئیدها در آنها افزایش می‌یابد، سطح هورمون‌های تولیدمثلی در آنها کاهش یافته و به‌طور معمول نسبت نتاج ماده تولیدی در آنها افزایش می‌یابد [۱۴]. تجویز خوراکی خارخاسک می‌تواند برخی از شاخص‌های پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو بافت مغزی را در موش دیابتی کاهش دهد و در جلوگیری از برخی بیماری‌های عصبی ناشی از تشدید استرس اکسیداتیو مؤثر باشد [۱۵].

با توجه به این‌که دام‌ها در فصل تابستان و در استان گرم خوزستان نگهداری شده‌اند، می‌توان بیان کرد که دام‌ها تحت شرایط استرس گرمایی بوده‌اند و گیاه خارخاسک احتمالاً در کاهش این استرس مفید بوده است. در تحقیقی گزارش شد که استرس باعث افزایش تولد نوزادان ماده نسبت به نوزادان نر می‌شود [۸]؛ پس می‌توان گفت که گیاه خارخاسک از طریق کاهش استرس می‌تواند باعث افزایش نسبت ژن SRY شود. از دیگر ترکیبات مؤثر گیاه خارخاسک در این زمینه می‌توان به مواد فلاونوئیدی آن اشاره کرد که با خاصیت آرام بخشی خود [۸] می‌توانند در کاهش استرس گرمایی واردشده به دام‌ها مؤثر باشد و با توجه به نقش هورمون‌های استرس بر جنسیت احتمالاً می‌توانند در تولید اسپرماتوزوئیدهای حامل کروموزوم Y مؤثر باشند. گیاه خارخاسک حاوی اسیدهای چرب است و ثابت شده است که تغذیه گاوها با جیره‌های حاوی اسید چرب اشباع سبب انحراف نسبت جنسیتی نتاج به سمت نرزایی می‌شود [۲۱]. ازآنجایی‌که ترکیبات اسیدی از طریق مهار آنزیم آروماتاز و نیز جلوگیری از تبدیل آندروژن به استروژن، سبب افزایش غلظت هورمون تستوسترون می‌شوند؛ به این ترتیب باعث افزایش نسبت اسپرم‌های حامل کروموزوم Y می‌شود.

براساس نتایج حاصل از این مطالعه گیاه خارخاسک سبب افزایش غلظت سرمی هورمون تستوسترون خون می‌شود. افزایش غلظت تستوسترون خون از طریق اثر بر گیرنده‌های آندروژنی و هم‌چنین آپوپتوز اسپرماتوزوئیدهای حامل کروموزوم X سبب افزایش نسبت اسپرماتوزوئیدهای حامل کروموزوم Y و به‌تبع آن افزایش نسبت ژن SRY به ژن PLP می‌شود. بنابراین می‌توان بیان کرد که مصرف گیاه خارخاسک در قوچ‌های عربی خوزستان سبب افزایش نسبت ژن نرزایی نسبت به ژن ماده‌زایی می‌شود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع

1. Baarske LA and Capel B (2008) B luring the edge in vertebrate sex determination. Current Opinion in Genetics and Development 18: 499-505.
2. Braun L and Cohen M (2010) Herbs and Natural Supplements. An Evidence Base Guide, 3rd edition: 893-896.
3. Collins LC, Cole KS, Marotti JD, Hu R, Schnitt SJ. and Tamimi RM (2011) Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. Mod Pathol 24(7): 924-31.
4. Esfandiari A, Dehghan A, Sharifi S, Nagafi B and Vaseli S (2011) Effect of tribulus terrestrise extract on ovarian activity in immature wistar rat: A Histopalogical evaluation. Journal Animal Vet Advance 10: 883-886.
5. Foecking EM, McDevitt MA, Acosta-Martínez M, Horton TH and Levine JE (2008) Neuroendocrine consequences of androgen excess in female rodents. Horm Behavior 53: 673-692.
6. Gottlieb B, Lombroso R, Beitel L K and Trifiro MA (2005) Molecular patology of the anderogen receptor in male(in) fertility. Reproductive Biomedicin online 10(1): 42-8.

www.SID.ir

Archive of SID

7. Hassan BJ, Hossain SO and Jebur MSh (2016) Evaluation of semen sex ratio in cooled and frozen semen straws by real -time PCR. Basreh Jornal of Veterinary Research 15(3): 225-238.
8. Hosseini SE (2015) Effect of Alcoholic Extract of Hops Flowers (*Humulus lupulus* L.) on the Sex Ratio in Offspring of Syrian Mice. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services 38: 12-17. (in Persian)
9. James WH (2004) Further evidence that mammalian sex ratios at birth are partially controlled by parental hormone levels around the time of conception. Human Reproduction 19(6): 1250-1256.
10. Kholghi M, Heydari F, Rostamzadeh J.and Razmkabir M (2016) Investigation of the ratio of X and Y chromosomes population in Holstein bulls' ejaculation and the role of blood testosterone concentration on population ratio. Journal of Cellular and Molecular Research.1 29: 72-79. (in Persian)
11. Mangs AH and Morris BJ (2007) The Human Pseudoautosomal Region PAR: Origin, Function and Future. Current Genomics 8: 129-136.
12. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16: 12-15.
13. Navara KJ (2013) Hormone-Mediated Adjustment of Sex RatioinVertebrates. Integrative and Comparative Biology 53(6): 877-887.
14. Navara KJ (2010) Programming of offspring sex ratios by maternal stress in humans: assessment of physiological mechanisms using a comparative approach. Journal Company Physiology B 180: 785-96.
15. Roghani M and Arbab-Soleymani S (2013) The Effect of Oral Feeding of Tribulus Terrestris Fruit on SomeMarkers of Oxidative Stress in the Brain of Diabetic Rats. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical of Science 21(2): 127-135.
16. Said L, Banni M Kerkeni A, Said K and Messaoudi I (2010) Influence of combined treatment whit zinc and selenium on cadmium induced testicular pathophysiology in rat. Food Chemistry Toxicology 48: 2759-65.
17. Sekido R and Lovell-Badge R. (2008). Sex determination and SRY:down to wink and nudge. Trends in Genetics 25(1): 19-29.
18. Sharawy SM, Saleh NH, Attalah SA, Absy GM and Doaa HK (2015) Effect of plant extract of Tribulusterrestris and probiotics on the reproductive performance, total cholesterol and testosterone hormone levels of rams.MENAScience Journal-MENAS J 1(1): 14-19.
19. Skoff RP, Bessert DA, Cerghet M, Franklin MJ, Rout UK, Nave KA, Carlock L, Ghandour MA and Armant DR (2004) The myelin proteolipid protein gene modulates apoptosis in neural and non-neural tissues. Cell Death and Differentiation 11: 1247-1257.
20. Zhang Z, Zhou X C, Wei P, Hu Z and Liu YX (2003) Expression of Bcl-2 and Bax in rhesus monkey testis during germ cell apoptosis induced by testosterone undecanoate. Archives of Andrology 49: 439-447.
21. Waleed FA, Mareia, Wael A, Khalil B, Anil PG, Mostafa A, El-Harairyb Ahmed MA, Abo El-Attab D and Claire Wathesd, Ali FN. (2018) Polyunsaturated fatty acids influence offspring sex ratio in cows. International Journal of Veterinary Science and Medicine.
22. Yang NY, Li K, Yang YF and Li YH (2009) Aromatase inhibitory fatty acid derivatives from the pollen of Brassica campestris L. var. oleifera DC. Journal Asian Natural Production Research 11(2): 132-7.

www.SID.ir