تولیدات دامی
دوره ۲٤ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱٤۰۱
صفحه‌های ۲۷۹-۲۷۱
DOI: 10.22059/jap.2022.336656.623668

مقاله پژوهشی

تأثیر ویتامین E و نانولیپوزوم ویتامین E بر بیان ژن *STAR* در بیضه و ژن *TSPO* در تخمدان بلدرچین مولد ژاپنی

فاطمه هندیجانی[۱]، جمال فیاضی[۲*]، هدایت اله روشنفکر[۲]، محمدرضا قربانی[۳]
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۲. استاد، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ملاثانی، ایران.
۳. دانشیار، گروه مهندسی طبیعت، دانشکده کشاورزی شیروان، دانشگاه بجنورد، بجنورد، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۰۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۰۳/۱۸

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر ویتامین E و نانولیپوزوم ویتامین E بر بیان ژن *STAR* در بیضه و ژن *TSPO* در تخمدان بلدرچین مولد ژاپنی، آزمایشی با استفاده از ۸٦٤ قطعه بلدرچین به‌مدت ۱۰ هفته در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار، شش تکرار و ۲٤ قطعه بلدرچین مولد (۱٦ ماده و هشت نر) در هر تکرار به انجام رسید. تیمارها از جیره حاوی سطوح مختلف ویتامین E (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ IU در کیلوگرم جیره) و نانولیپوزم ویتامین E (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ IU در کیلوگرم جیره) تغذیه کردند. نتایج این پژوهش نشان داد، اثر تیمارهای آزمایشی بر بیان ژن *TSPO* در تخمدان و ژن *STAR* در بیضه معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵). افزودن سطح ۵۰ IU ویتامین E بیان ژن *TSPO* در تخمدان را نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش داد (P<۰/۰۵). هم‌چنین نتایج نشان داد سطح ۲۵ IU نانولیپوزوم ویتامین E باعث افزایش بیان ژن *TSPO* در تخمدان شد. این افزایش تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت. استفاده از سطوح ویتامین E و سطوح نانولیپوزوم ویتامین E باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن *STAR* در بیضه بلدرچین ژاپنی شد (P<۰/۰۵). براساس نتایج این مطالعه اضافه‌نمودن سطح ۲۵ IU نانولیپوزوم ویتامین E و هم‌چنین سطوح ۵۰ و ۱۰۰ IU ویتامین E تأثیر زیادی بر بیان ژن TSPO در تخمدان که از ژن‌های مؤثر بر باروری و تولید مثل است دارد.

کلیدواژه‌ها: بلدرچین، ژن *STAR*، ژن *TSPO*، نانولیپوزوم، ویتامین E.

The effect of vitamin E and vitamin E nanoliposomes on *STAR* gene expression in testis and *TSPO* gene in ovary of Japanese quail

Fatemeh Hendijani[1], Jamal Fayazi[2*], Hedayat Allah Roshanfekr[2], Mohammad Reza Ghorbani[3]
1. M.Sc. Student, Department of Animal Sciences, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
2. Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
3. Associate Professor, Department of Nature Engineering, Shirvan Faculty of Agriculture, University of Bojnord, Bojnord, Iran.
Received: February 28, 2022 Accepted: June 8, 2022

Abstract

In order to investigate the effect of vitamin E and vitamin E nanoliposomes on the expression of the *STAR* gene in testis and *TSPO* gene in the ovary of Japanese quail, an experiment using 864 pieces of quail for 10 weeks in a completely randomized design with six treatments, six replications and 24 Breeding quail (16 females and eight males) was performed in each replication. The treatments were fed diets containing different levels of vitamin E (25, 50 and 100 IU per kg of diet) and vitamin E nanoliposomes (25, 50 and 100 IU per kg of diet). The results of this study showed that the effect of the experimental treatments on the expression of *TSPO* gene in the ovary and *STAR* gene in the testis was significant (P<0.05). The addition of 50 IU of vitamin E significantly increased *TSPO* gene expression in the ovary compared to the control treatment (P<0.05). The results also showed that the level of 25 IU nanoliposome of vitamin E increased the expression of *TSPO* gene in the ovary, which was not significantly different from the control treatment. The use of vitamin E and vitamin E nanoliposome levels significantly decreased the expression of *STAR* gene in the testis of Japanese quail (P<0.05). According to the results of this study, the addition of 25 IU vitamin E nanoliposomes as well as 50 and 100 IU levels of vitamin E has a significant effect on the expression of *TSPO* gene in the ovary, which is one of the genes affecting fertility and reproduction.

Keywords: Nano liposomes, Quail, *STAR* gene, *TSPO* gene, Vitamin E.

* نویسنده مسئول Email: j_fayazi@asnrukh.ac.ir

مقدمه

پرورش بلدرچین به‌عنوان یک فعالیت پربازده و سودآور توجه بسیاری را به خود جلب کرده است. ویژگی‌هایی نظیر رشد سریع، فاصله نسل کوتاه، بلوغ زودرس و میزان تخم‌گذاری بالا سبب شده است تا بلدرچین جایگاه ویژه‌ای در میان پرورش‌دهندگان طیور داشته باشد. بلدرچین ژاپنی (*Coturnix japonica*) پرنده‌ای پرطاقت، نیرومند و خوش‌بنیه بوده و می‌تواند به محیط‌های مختلف سازگار شده و به‌سرعت رشد کرده و در عرض شش هفته به سن بلوغ برسد و در محدوده ۵۰ روزگی، گله تخم‌گذار به‌شمار می‌آیند [۲۱]. رشد سریع و سرعت متابولیک بالا در پرندگان می‌تواند باعث تحریک بیش‌تر تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو شود. بدن پرندگان یا هر موجود زنده دیگری دارای یک سیستم دفاعی است که درون بافت‌های بدن جهت مقابله با رادیکال‌های آزاد توسعه یافته که به آن سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌گویند. هنگامی‌که گونه‌های فعالی اکسیژن (ROS) بر توانایی سیستم آنتی‌اکسیدانی یک ارگانیسم پیشی می‌گیرد، استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد [۲٤]. بافت بیضه، با وجود غلظت پایین اکسیژن در آن، به‌دلیل حضور میزان بالای اسید چرب غیراشباع و رادیکال‌های آزاد مستعد تنش اکسیداتیو است [۲٦]. تضعیف این سیستم با افزایش سن سبب نقص در عملکرد سلول‌های لایدیگ می‌شود، زیرا ROS تولیدشده به اجزای ضروری مسیر استروئیدسازی آسیب می‌رساند [۲۷]. 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 [۱٤].

با توجه به مکانیسم انتقال کلسترول، شواهد نشان می‌دهد Translocator protein با Steroidogenic Acute Regulatory برای انتقال کلسترول به میتوکندری تعامل داشته باشد. هردو از اجزای ضروری مسیر استروئیدسازی هستند، و به میزان زیادی در بیضه و تخمدان بیان می‌شوند [۸]. این دو ژن، نقش حامل داشته، کلسترول را به درون سلول منتقل می‌کنند و دو سیستم آنزیمی در تبدیل آنزیمی کلسترول به پروژسترون دخالت دارند. با ورود کلسترول در این مکانیسم شاخه جانبی کلسترول باید به‌وسیله آنزیم حذف شود. این شاخه جانبی حاوی شش کربن است که در صورت حذف آن مولکول کلسترول به پروگننولون تبدیل می‌شود. این مرحله آنزیمی سرعت واکنشی آهسته‌ای دارد، بنابراین مرحله‌ای کنترل‌کننده است و مقدار تولید پروژسترون را تنظیم می‌کند [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. هم‌چنین وجود همبستگی بالا بین تولید تستوسترون و *STAR* نشان می‌دهد که افزایش ترشح تستوسترون ممکن است ناشی از انتقال کلسترول به درون میتوکندری باشد [۱۲]. پژوهش‌هایی که تاکنون انجام شده است، ثابت کرده است که *TSPO* یکی از پروتئین‌های کلیدی در مسیر سنتز هورمون‌های استروئیدی است [٦].

آنتی‌اکسیدان‌ها عموماً موادی احیاکننده هستند که هم در داخل و هم در خارج سلول‌ها یافت می‌شوند و ظرفیت واکنش با رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال را دارا هستند و باعث کاهش یا جلوگیری از استرس اکسیداتیو می‌شوند [۲۰]. ویتامین E (توکوفرول) یکی از آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی قوی محلول در چربی است که با پاکسازی و مهار رادیکال‌هایی مانند هیدروکسیل، پروهیدروکسیل، سوپراکسید، موجب محافظت غشای

پلاسمایی و غشای اندامک‌ها از پراکسیداسیون توسط متابولیت‌های فعال اکسیژن می‌شود [٤]. ویتامین E به‌علت بی‌ثباتی شیمیایی حین پردازش، حمل‌ونقل و ذخیره‌سازی به‌صورت طبیعی در طبیعت اکسایش می‌شود [١١]. این مسائل، ضرورت پژوهش برای توسعه محصولات جدید را برای غلبه بر این کمبودهای ویتامین E تضمین می‌کند. تولید نانولیپوزوم ویتامین E یکی از راه‌های پیشنهادی جهت حفظ ثبات ویتامین E و جلوگیری از اکسایش آن است. در مطالعه‌ای که توسط عمورضایی و همکاران (٢٠١٥) صورت گرفته به اثر مثبت نانو ذرات اکسیدروی بر عملکرد تولیدمثلی بلدرچین نر، شامل تولید اسپرم روزانه و تولید تستوسترون اشاره شده است [٣].

نانومواد ذراتی هستند که به‌صورت آزاد، تجمع یافته و از نظر توزیع اندازه، ٥٠ درصد ذرات آن حداقل در یک بعد دارای اندازه‌های بین یک تا ١٠٠ نانومتر باشند. یافته‌های اخیر نشان داده است زمانی‌که ذرات یک ماده خاص در حد چند نانومتر کوچک شوند، این ذرات ویژگی‌های متفاوتی با ذرات اولیه خواهند داشت که از جمله می‌توان به فضای سطحی بزرگ (بالارفتن فعالیت‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی)، انحلال‌پذیری و سطح تحرک بالا اشاره کرد [٩]. اندازه کوچک نانومواد، عبور از غشای سلولی در اندامک‌هایی هم‌چون میتوکندری را ممکن می‌سازد [٢٣]. نانولیپوزوم‌ها یا کپسول‌های محافظت‌شده با چربی، نانوساختارهای خود تشکیل شونده‌ای هستند که به گونه‌ای در کنارهم قرار می‌گیرند که، گروه‌های آب گریزشان به سمت داخل کره و گروه‌های آب دوستشان به سمت خارج کره جهت‌گیری کرده باشد. این نحوه جهت‌گیری، امکان بارگیری مواد آب‌دوست در هسته و مواد آب‌گریز در پوسته لیپوزوم‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد. از مزایای نانولیپوزوم‌ها می‌توان به سهولت تولید در حجم‌های صنعتی، کیفیت عالی ساخت، تنوع در اندازه ذره‌ای، ترکیب شیمیایی و بار الکتریکی اشاره کرد. توانایی این نانوساختارها در کپسوله‌نمودن مقدار زیاد دارو، به حداقل‌رساندن عوارض جانبی ناخواسته، اثربخشی بالا و سمیت پایین توانسته علاقه محققین را به خود جلب کند [١٥]. در اواخر دهه ٨٠ میلادی مطالعات و بررسی‌های به‌عمل‌آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند [١٧]. ماده ژنتیکی یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچگاه به‌طور هم‌زمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آن‌ها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند [٥]. نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به‌صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند [١٦].

با توجه به مطالب گفته‌شده بلدرچین ژاپنی یکی از مهم‌ترین پرندگان اقتصادی در صنعت طیور می‌باشد و تولیدمثل آن به‌عنوان یکی از دغدغه‌های اصلی این صنعت موردتوجه قرار گرفته است. استرس اکسیداتیو به‌عنوان یکی از فاکتورهای منفی در مسیر استروئیدسازی همیشه مطرح بوده است. *TSPO* و *STAR* از ژن‌های مهم در سنتز هورمون‌هایی استروئیدی هستند که تاکنون بیان آن‌ها در بلدرچین مولد موردبررسی قرار نگرفته است. هدف از این پژوهش، بررسی اثر ویتامین E و نانولیپوزوم ویتامین E به‌عنوان ماده آنتی‌اکسیدان بر بیان ژن‌های *STAR* و *TSPO* بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش ٨٦٤ قطعه بلدرچین ژاپنی در سن ٧٠ روزگی انتخاب و به‌مدت ١٠ هفته در ٣٠ قفس در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار، شش تکرار و ٢٤ قطعه بلدرچین مولد شامل ١٦ قطعه ماده (با میانگین

وزن ۱۰±۲۰۷ گرم) و هشت قطعه نر (با میانگین وزن ۱۰±۲٤۰ گرم) در هر تکرار استفاده شد. تیمارها عبارت بودند از سطوح مختلف ویتامین E (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ IU در کیلوگرم جیره) و نانولیپوزم ویتامین E (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ IU در کیلوگرم در جیره) که در یک کیلوگرم خوراک به‌خوبی مخلوط و سپس به جیره‌ها افزوده شد. پرنده‌ها طی شبانه‌روز در معرض ۱٦ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی قرار گرفتند [۲۵]. تولید نانولیپوزم ویتامین E با استفاده از مواد لستین، اتانول، کلسترول، ویتامین E، ساکاروز و کلروفرم انجام شد [۱۰]. راندمان ریزپوشانی از روش مظفری و مرتضوی (۲۰۰۵) تعیین شد [۱۸]. به‌منظور بررسی بیان نسبی ژن‌های *TSPO* و *STAR* در پایان هفته ۱۰ از پرورش از هر تیمار شش قطعه بلدرچین (سه عدد نر و سه عدد ماده) به شکل تصادفی کشتار شد و بیضه‌ها و تخمدان‌ها به‌سرعت جدا شدند و به‌صورت حفاظت شده در ازت مایع به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد جهت انجام آزمایش‌ها نگهداری شد.

استخراج RNA از ۳۰ میلی‌گرم نمونه بافت (بیضه یا تخمدان) با استفاده از محلول ترایزول Trizol reagent محصول شرکت Invitrogen, life technology کشور آمریکا انجام شد. کیفیت RNA روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد. میزان غلظت RNA استخراج‌شده و میزان خلوص آن، با استفاد از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific NanOdrOp. 2000C، USA) مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور حذف DNA ژنومی از RNA تخلیص‌شده، از کیت DNase شرکت Genet Bio (کره‌ای) استفاده شد. به‌ازای هر میکروگرم RNA مقدار یک میکرولیتر بافر MgCl2 و یک میکرولیتر آنزیم DNase افزوده و مخلوط در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. در انتها مقدار یک میکرولیتر EDTA (۲۵ میلی‌مولار) به میکروتیوب افزوده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ٦۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور توقف فعالیت آنزیم DNase انکوبه شد. در نهایت نمونه‌ها جهت انجام مراحل بعدی آزمایش به فریز ۲۰- منتقل شدند. در ادامه به‌منظور ساخت cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت سیناکلون (ایران) استفاده شد.

واکنش‌های PCR Real time (Applied Biosystems، USA) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PCR SYBR Green شرکت آمپلیکون و از ژن‌های *ß.Actin* و *GAPDH* به‌عنوان کنترل داخلی طی فرایند زیر انجام شد. به‌منظور تأیید تکثیر اختصاصی ژن‌های *STAR* و *TSPO* توسط روش PCR آغازگرهای مناسبی با استفاده از برنامه Primer Quest در سایت IDT (Integrated DNA Technologies) طراحی و جهت سنتز به شرکت سیناکلون ارسال شد. مشخصات آغازگرها و دمای بهینه‌ی فعالیت آن در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول ۱. اطلاعات مربوط به آغازگرهای مورداستفاده در Real time PCR

آغازگر	توالی	اندازه محصول (جفت باز)	شماره دسترسی	دمای اتصال
ß. Actin	F: TGACCGCGGTACAAACACAG R: CATACCAACCATCACACCCTGA	۱٦۷	XM_015876619.1	٦۲
TSPO	F: GCAACTTCATTCAGAGGAAGAAATC R: CAGCTGCAGTGAGACCATAAA	۱۲۱	XM_015869896.2	٦۱
GAPDH	F: CAGTTCTGTTCCCTTCTGTCTC R: CAGATCAGTTTCTATCAGCCTCTC	۹۸	XM_015873412.2	٦۰
STAR	F: TTGCTGAAGACTCCAAGAGATG R: AGCAGGTGCAGTGTATGTATG	۱۲٤	XM_015883089.1	٦۰

پس از انجام آزمایش‌های آغازین با دستگاه PCR، شرایط لازم جهت تکثیر هریک از ژن‌ها و واکنش‌های Real time PCR به‌کار گرفته شد. اجزای واکنش که در حجم ۲۵ میکرولیتر به میکروتیوب ۰/۲ افزوده شدند، از ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix 2X، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت، ٤ میکرولیتر cDNA و ٦/٥ میکرولیتر از آب بدون RNase تشکیل شدند. این اجزا به‌خوبی در میکروتیوب با یکدیگر ترکیب شدند و در فاصله زمانی کوتاهی بین زمان تهیه و قرارگرفتن در دستگاه، بر روی رک حاوی یخ گذاشته شدند. برنامه PCR شامل یک گامه فعال‌سازی پنج دقیقه‌ای در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه ۳۰ ثانیه‌ای در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ٦۲-٦۰ درجه سانتی‌گراد بود. روش بررسی تغییرات بیان‌ژن در این پژوهش روش ΔΔCT یا آستانه مقایسه‌ای (رابطه ۱) و نسبت به بیان ژن‌های *β.Actin* و *GAPDH* بود. از ژن *β.Actin* به‌عنوان ژن مرجع در بافت تخمدان و *GAPDH* به‌عنوان ژن مرجع در بافت بیضه استفاده شده است.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT\ (\text{نمونه هدف}) - \Delta CT\ (\text{نمونه کالیبره شده}) \quad (۱)$$

در روش مقایسه نسبی، تفاوت نسبی نمونه مورد آزمایش در مقابل نمونه کنترل با رابطه $2^{-\Delta\Delta CT}$ (رابطه ۲) محاسبه شد[۲۲]. داده‌های حاصل با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/٤) طبق رابطه (۳) تجزیه و میانگین‌ها توسط آزمون توکی در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ مقایسه شدند.

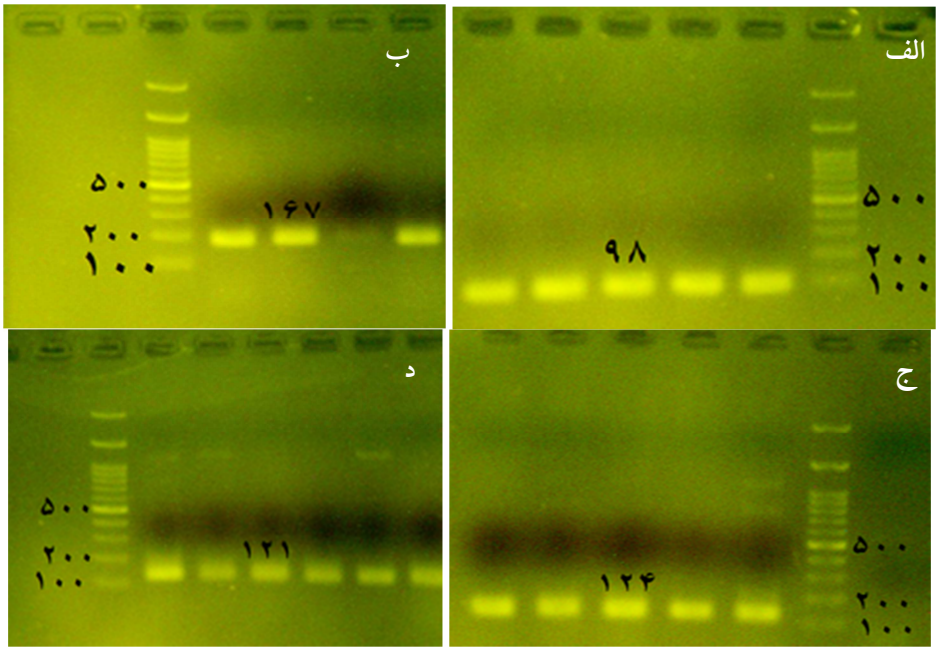
$$y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad (۳)$$

که در این رابطه، y_{ij}، بردار مشاهدات برای صفت موردمطالعه؛ μ، میانگین جامعه؛ T_i، اثر iامین تیمار افزودنی و e_{ij}، اثرات باقیمانده است.

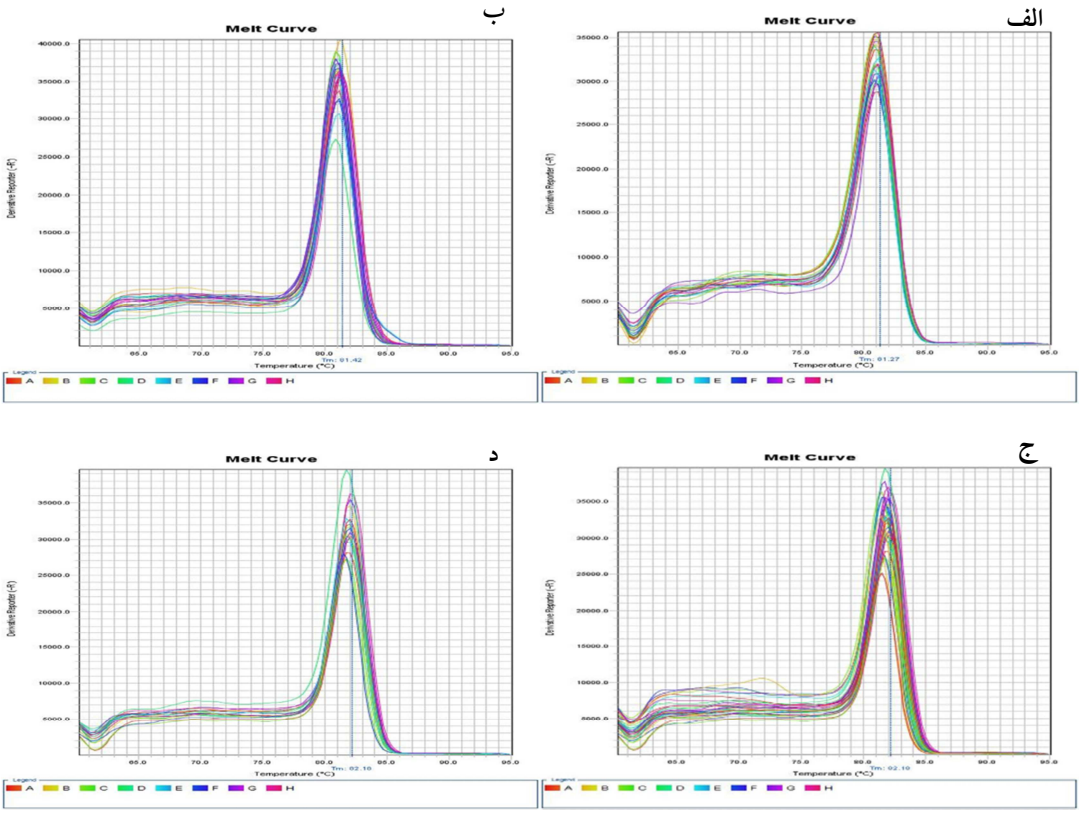
نتایج و بحث

میزان خلوص RNA با نسبت جذب نوری A_{260} به A_{280} بررسی شد. این نسبت در تمام RNAهای استخراج‌شده در این پژوهش بین ۲/۲-۱/۹ بود (میزان آلودگی در این روش باید در حدود ۲-۱/۸ باشد). نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR برای *GAPDH*، *β.Actin*، *STAR* و *TSPO* در شکل (۱) نشان داده شده است. تکنیک PCR Real time جهت بررسی بیان ژن‌های موردنظر اجرا شد (شکل ۲).

اثر ویتامین E و نانولیپوزوم ویتامین E به‌عنوان ترکیبی آنتی‌اکسیدانی، بر بیان نسبی ژن‌های *STAR* و *TSPO*در شکل (۳) نشان داده شد. اثر تیمارهای آزمایشی بر بیان ژن *TSPO* در تخمدان و ژن *STAR* در بیضه معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). نتایج بیان ژن *STAR* در بیضه، ابتدا یک روند افزایشی در هنگام استفاده از سطح پایین ویتامین E، سپس یک روند کاهشی تا تیمار شش را نشان داد (P<۰/۰۵). احتمال داده می‌شود این روند کاهشی ناشی از اثر منفی استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها باشد. درسال‌های اخیر با توجه به نظریه هورمس (Hormesis) (اندازه کم برخی مواد مضر، باعث تحریک فرایندهای مفید در سلول می‌شوند) فرضیه‌های متفاوتی مطرح شده است و به‌طور شگفت‌آوری برخی از پژوهش‌گران مشاهده کرده‌اند که مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها حین، قبل و یا پس از فعالیت نه‌تنها باعث کاهش استرس اکسیداتیو نمی‌شود بلکه گاهی باعث افزایش آن شده است [۱۹]. نتایج پژوهشی نشان داد با افزایش سطوح سلنیوم به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدانی در رژیم غذایی بزهای ماده بیان ژن *STAR* کاهش یافت [۲۲]. نظرات این پژوهش‌گران با یافته‌های این پژوهش از جهت کاهش بیان ژن با افزایش غلظت ماده مورد آزمایش مطابقت دارد. در مطالعه‌ای گزارش شد تجویز خوراکی کریسین به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی و محرک استروئیدسازی توانست بیان نسبی ژن *STAR* را در بیضه خروس‌های مادر گوشتی که روزانه ۷۵ میلی‌گرم کریسین در روز دریافت می‌کردند افزایش می‌دهد [۲]. که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت ندارد.



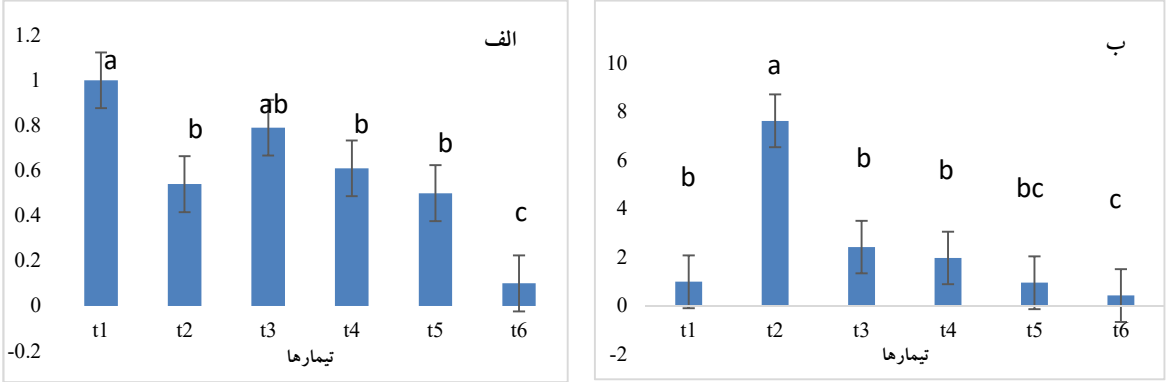
شکل ۱. الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن‌های *β.Actin* (الف)، *GAPDH*(ب)، *STAR*(ج) و *TSPO* (د) روی ژل آگارز (۲ درصد) (هر چاهک نشان‌دهنده یک تیمار است.)



شکل ۲. منحنی ذوب ژن‌های *STAR* (الف)، *GAPDH* (ب)، *β.Actin* (ج) و *TSPO*(د) در بلدرچین‌های تغذیه‌شده با تیمارهای مختلف

بیان ژن *TSPO* در تخمدان بلدرچین‌های ماده تغذیه‌شده با سطوح ۵۰ و ۱۰۰ IU ویتامین E نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۳) و به هنگام استفاده از نانولیپوزوم ویتامین E در سطح ۲۵ IU افزایش بیانی به میزان ۰/۹۸ مشاهده شد (P<۰/۰۵). بیش‌ترین میزان کاهش در بلدرچین‌هایی مشاهده شد که بالاترین سطح نانولیپوزوم ویتامین E را دریافت کردند که از این نظر با بقیه تیمارها تفاوت داشت (P<۰/۰۵). مشاهدات نشان داد درصد جوجه‌درآوری تخم بلدرچین‌ها به‌طور معنی‌داری در سطوح دریافت‌کننده ویتامین E به میزان ۵۰ و ۱۰۰ IU در کیلوگرم (به‌ترتیب ۹۰/۲۲ درصد و ۹۰/۱۳ درصد جوجه‌درآوری) نسبت به سطح ۲۵ IU در کیلوگرم ویتامین E (۸٦/۸٤ درصد جوجه‌درآوری) افزایش یافت (P<۰/۰۵). پژوهش‌گران گزارش کردند استفاده از استروئیدهای آندروژنی آنابولیک (متاندیون) باعث افزایش معنی‌دار رونویسی mRNA ژن *TSPO* در غده آدرنال مردان بالغ شد. از طرفی استفاده از مخمر سلنیوم به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان باعث کاهش قابل‌توجهی در سطح mRNA ژن *TSPO* در غده آدرنال مردان بالغ شد [۱] که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت ندارد. پژوهش‌هایی که تاکنون انجام شده است، ثابت کرده است که *TSPO* یکی از پروتئین‌های کلیدی در مسیر سنتز هورمون‌های استروئیدی است که در روند تولید مثل ضروری هستند [۹]. طبق نتایج به‌دست‌آمده گزارش شده است که ویتامین E میزان باروری مرغ‌های تخم‌گذار را به میزان قابل‌توجهی افزایش داد [۱۲]. در پژوهشی نشان داده شد که جیره‌های غذایی حاوی ویتامین E به میزان قابل‌توجهی باعث افزایش هچ و باروری بلدرچین می‌شود. که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد [۷].

نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش حاکی از آن است که استفاده از سطوح ویتامین E و سطوح نانولیپوزوم ویتامین E باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن *STAR* در بیضه بلدرچین ژاپنی می‌شود. براساس نتایج این مطالعه اضافه نمودن سطح ۲۵ IU نانولیپوزوم ویتامین E و هم‌چنین سطوح ۵۰ و ۱۰۰ IU ویتامین E در جیره می‌تواند تأثیر بسزایی بر بیان ژن *TSPO* در تخمدان که از ژن‌های مؤثر بر باروری و تولیدمثل است داشته باشد.



شکل ۳. بررسی بیان ژن *STAR* در بیضه (الف) و بررسی بیان ژن *TSPO* در تخمدان (ب) براساس داده‌های fold change. حروف مشابه در هر نمونه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار هرتیمار در سطح ۵ درصد می‌باشد. تیمارهای آزمایشی شامل T1– تیمار کنترل ۲۵ IU ویتامین E، T2– ۵۰ IU ویتامین E، T3– ۱۰۰ IU ویتامین E، T4– ۲۵ IU نانولیپوزوم ویتامین E، T5– ۵۰ IU نانولیپوزوم ویتامین E، T6– ۱۰۰ IU نانولیپوزوم ویتامین E می‌باشد.

تشکر و قدر دانی

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به‌خاطر حمایت مالی و معنوی و دوستانی که در انجام فاز اجرایی این پروژه یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع مورداستفاده

1. Abed S and Al-Azawi T. S (2020) Selenium Enriched Yeast Modifies the Effects of Methandienone in Male Rabbits on the HPA Axis and Adrenal Gland Oxidative Stress. Al-Anbar Journal of Veterinary Sciences 13(2).
2. Al-Tawash A, Sami A, Shahneh Z, Ansari M and Deldar (2019) Improvement of histological parameters and relative expression of StAR gene in testis of chrysin-fed roosters. Iranian Animal Sciences 50 (3): 207-215.
3. Amorezae S, Farzinpour A, Farshad A and Razmkabir M (2015) The effects of dietary zinc oxide nanoparticles on some reproductive parameters of male quail. Research Journal of Poultry Sciences 1(2): 21-31.
4. Aprioku JS (2013) Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. Journal Reprod Infertil 14(4): 158-72.
5. Arabpour Z, Mohammadabadi M and Khezri A (2021) The expression pattern of p32 gene in femur, humeral muscle, back muscle and back fat tissues of Kermani lambs. Agricultural Biotechnology Journal 13 (4):183-200.
6. BAR-Ami S, Amiri Z, Fares F and Gavish M (1994) Modulation of peripheral benzodiazepine receptors infemale rat genital organs by various gonadal steroids. Life Sciences 54(25): 1965-75.
7. Biswas A, Mohan J, Sastry KVH and Tyagi JS (2007) Effect of dietary vitamin E on the cloacal gland, foam and semen characteristics of male Japanese quail. Theriogenology 67(2): 259-263.
8. Bogan RL, Davis TL and Niswender GD (2007) Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) aggregation and absence of steroidogenic acute regulatory protein (STAR)/PBR association in the mitochondrial membrane as determined by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). The Journal of steroid biochemistry and molecular biology 104(1-2): 61-67.
9. David B Warheit (2008) How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization?. Toxicological sciences 101(2): 183-185.
10. Khan I, Yousaf S, Subramanian S, Korale O, Alhnan MA, Ahmed W and Elhissi A (2015) Proliposome powders prepared using a slurry method for the generation of beclometasone dipropionate liposomes. International journal of pharmaceutics 496(2): 342-350.
11. Li F, Liu J, Liu N, Kuhn LA, Garavito RM and Ferguson-Miller S (2016) Translocator protein 18 kDa (TSPO): an old protein with new functions. Biochemistry 55(20): 2821-2831.
12. Lin YF, Chang SJ and Hsu AL (2004) Effects of supplemental vitamin E during the laying period on the reproductive performance of Taiwan native chickens. British Poultry Science 45 (6): 807-814.
13. McCune RW, Roberts S and Young PL (1970) Competitive inhibition of adrenal Δ5-3β-hydroxysteroid dehydrogenase and Δ5-3-ketosteroid isomerase activities by adenosine 3', 5'-monophosphate. Journal of Biological Chemistry 245(15): 3859-3867.
14. 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).
15. Moghimipour M, Kouchak M and Bahmandar R (2013) Nano-liposomes as new Drug Delivery Carriers. Jundishapur Science Med Journal, 12 (5): 467-483.
16. Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. Agric Biotechnol Journal 12 (1): 177-192. (In Persian).
17. Mohammadabadi MR. and Tohidinejad F (2017) Charachteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. Iran J Appl Anim Sci 7: 289-295.
18. Mozafari MR and Mortazavi SM (2005) Nanoliposomes: From Fundamentals to Recent Developments, Trafford Publishing, Ltd, Oxford, UK. *ISBN* 1(4120): 5545-8.
19. Nikolaidis MG, Kerksick CM, Lamprecht M and McAnulty SR (2012) Does vitamin C and E supplementation impair the favorable adaptations of regular exercise? Oxidative medicine and cellular longevity.

20. Powers SK and Jackson MJ (2008) Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. Physiological reviews 88(4): 1243-1276.
21. Sahin T, Kaga I, Unal Y and Elmail DA (2008) Dietary supplementation of probiotic and prebiotic combination (Combiotics) on performance, carcass quality and blood parameters in growing quails. Journal of Animal and Veterinary Advances 7(11): 1370-1373.
22. Shi L, Song R, Yao X, Duan Y, Ren Y, Zhang C and Lei F (2018) Effects of maternal dietary selenium (Se-enriched yeast) on testis development, testosterone level and testicular steroidogenesis-related gene expression of their male kids in Taihang Black Goats. Theriogenology 114: 95-102.
23. Široká Z and Drastichova J (2004) Biochemical marker of aquatic environment contamination-cytochrome P450 in fish. A review. Acta Veterinaria Brno, 73(1): 123-132.
24. Surai PF, Kutz E, Wishart GJ, Noble RC and Speake B.K (1997) The relationship between the dietary provision of α-tocopherol and the concentration of this vitamin in the semen of chicken: Effects on lipid composition and susceptibility to peroxidation. Journal of reproduction and fertility 110: 47-51.
25. Tabatabai Vakili S, Darabi A, Aghaei A and Mehrnia M.A (2021) The effect of injecting different levels of thyme essential oil nanoemulsion into Japanese quail eggs on reproductive performance and blood parameters. Animal Science Research (Agricultural Science) 31 (2): 87-99.
26. Turner TT and Lysiak JJ (2008) Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. Journal of andrology 29 (5): 488-498.
27. Zirkin BR and Chen H (2000) Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. Biology of reproduction 63(4): 977-98.