

## مطالعه اثر مهارکننده‌های آروماتاز و آنتی استروژن‌ها بر تمایز جنسیت جوجه‌های گوشتی

عین اله ولی زاده<sup>۱\*</sup>، حسین جدیری<sup>۲</sup>

۱. گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، شبستر، شبستر، ایران

۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، تبریز، ایران

\* نویسنده مسئول مکاتبات: Evalizade@Tabriz.pun.ac.ir

(دریافت مقاله: ۸۸/۲/۱۳، پذیرش نهایی: ۸۹/۹/۱)

### چکیده

در طول تکوین جنین جوجه، ژنوتیپ تخم ماهیت غده‌های جنسی را تعیین می‌کند که پس از آن فنوتیپ نر یا ماده ایجاد می‌شود. تمایز غده‌های جنسی، در دوره‌ای بنام "دوره بحرانی تمایز جنسیت" همزمان با شروع ترشح هورمون‌های استروئیدی جنسی صورت می‌گیرد. هرگونه تغییری در میزان غلظت هورمون‌های استروئیدی در دوره بحرانی، بر ساختار غدد جنسی اثر می‌گذارد. بر این اساس تزریق مهارکننده‌های آروماتاز (که سنتز استروژن از تستوسترون را بلوکه می‌کند) در روز پنجم انکوباسیون به داخل تخم‌ها سبب ایجاد نرهایی با ژنوتیپ ماده می‌شود که این ماده‌های جنس برگشته دارای بیضه‌های دو طرفی هستند که توانایی کامل اسپرماتوزن و تظاهرات فیزیکی و رفتارهای طبیعی را دارند. در این مطالعه مهارکننده ۱۴-آلفا-هیدروکسی-۳ و ۶ و ۱۷ آندرواستن-تریون با دوز ۱ میلی‌گرم در هر تخم تزریق شد. علاوه بر این، تأثیر سه آنتی استروژن (که رسپتورهای استروژن را بلوکه می‌کنند) به نام‌های تاموکسیفن و کلومیفن سترات و GAR79 نیز مورد بررسی قرار گرفت. تزریق آنتی آروماتاز به داخل تخم مرغ در دوره انکوباسیون در ۷۲٪ تا ۸۴٪ موارد موجب تولید جنس نر می‌گردد که در مقایسه با شاهد (۵/۵۲٪) افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0.05$ ). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که آنتی آروماتاز بر جنس جوجه‌ها تأثیر می‌گذارد.

مجله علوم تشخیصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۹، دوره ۴، شماره ۴، پیاپی ۱۶، صفحات: ۹۶۴-۹۶۱.

کلید واژه‌ها: مهارکننده‌های آروماتاز، آنتی استروژن، تمایز جنسیت جوجه

### مقدمه

تولید مثل ماده جلوگیری می‌کند (۳). سطح هورمون‌های استروئیدی به وسیله مهار آنزیم آروماتاز تنظیم می‌شود که این آنزیم آخرین مرحله از مسیر بیوسنتز استروئیدهای جنسی را کاتالیز و آندروژن‌ها را به استروژن‌ها تبدیل می‌کند (۱). در روی کروموزوم Y قبل از انتهای اتوزومی کاذب یک ناحیه ۳۵ کیلو جفت باز قرار دارد که یک پپتید ۲۳۳ اسید آمینه را کد می‌کند. این ناحیه را ژن SRY (Sex-determining Region of Y) یا ناحیه تعیین کننده جنسیت کروموزوم Y

تمایز جنسیت یک فرایند منظم و متوالی است. ژنوتیپ تخم ماهیت غدد جنسی را تعیین می‌کند که منجر به تکامل فنوتیپ نر یا ماده می‌شود (۱). در پستانداران، کروموزوم Y و تکامل یک بیضه از گناد تمایز نیافته نقش اساسی دارد. تکامل بیضه‌ها و تمایز جنسیت بیشتر وابسته به تنظیم‌های هورمونی از دو طریق AMH (Anti-Mullerian Hormone) و آندروژن ترشح شده از بیضه‌ها است (۲). AMH از سلول‌های سرتولی ترشح شده و با تحلیل مجرای مولر از تکوین دستگاه

## مواد و روش‌ها

در این بررسی از تخم مرغ‌های تولید شده از مرغ‌های نژاد Arian استفاده شد. تخم‌ها به ۵ گروه ۶۰ تایی تقسیم و در داخل دستگاه تمام اتوماتیک جوجه‌کشی قرار گرفتند. کلیه آزمایشات در شرکت دامپروری سفید رود رشت صورت گرفته است. در صبح روز پنجم انکوباسیون به گروه اول ۰/۱ میلی‌لیتر آب مقطر، به گروه دوم یک میلی‌گرم AI (اهدایی پروفیسور Makoto Yoshihama از انستیتو تحقیقات استراتژیک ژاپن)، به گروه سوم یک میلی‌گرم تاموکسیفن حل شده در آب، به گروه چهارم یک میلی‌گرم کلومیفن سترات حل شده در آب و به گروه پنجم یک میلی‌گرم GAR79 (ترکیب استخراجی که به صورت تحقیقات اولیه در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت) تزریق شد. تزریق از ناحیه سر کوچک تخم مرغ (مقابل کیسه هوا) با سرنگ انسولین ۰/۵ میلی‌لیتر به داخل سفیده تخم مرغ انجام شد. سپس به کمک پیپت پاستور سوراخ تخم‌ها را با پارافین جامد مذاب شده مسدود و تخم‌ها به داخل دستگاه برگردانده شد. جوجه‌ها پس از هچ شدن در یک روزگی به روش Feather Sexing تعیین جنسیت شدند. در عین حال به منظور اطمینان کار، جوجه‌ها به مدت ۴۵ روز پرورش و مجدداً تعیین جنسیت داده شد. نتایج به وسیله آزمون خی دو ارزیابی شدند.  $p < 0/05$  معنی دار تلقی شد.

## یافته‌ها

نتایج به دست آمده در جدول ۱ نشان داده شده است. در هر چهار گروه آزمایشی تغییر معنی داری در تعداد جنس‌های نر تولیدی مشاهده گردید. اگرچه تاموکسیفن و کلومیفن دارای اثرات منفی در میزان هچ تخم مرغ‌ها داشت و تیمار با این دو آنتی استروژن علاوه بر تأثیر منفی بر هچ شدن جوجه، جوجه‌های هچ شده نیز دارای آسیب‌های جدی بوده و بعد از هچ شدن تعدادی تلف شدند. مشاهدات ماکروسکوپی

می‌نامند (۴). ژن‌های دیگری بنام SOX شناسایی شده است که پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که با ناحیه SRY HMG box بیش از ۶۰٪ تشابه دارد و SOX9 نقش مهمی در تعیین جنسیت دارد (۵). پرندگان ماده به صورت هتروگامت (ZW) بوده، در حالی که نر به صورت هموگامت (ZZ) می‌باشد. از نظر شباهت با کروموزوم Y، کروموزوم W در تعیین جنسیت پرندگان ایفای نقش می‌کند. در پرندگان، استروئیدهای جنسی و همچنین هورمون آنتی مولارین به طور طبیعی در تمایز جنسیت دخالت داشته و آندروژن و استروژن به ترتیب روی تولید نر و ماده مؤثر هستند. آنزیم P450 آروماتاز (P450 arom mRNA) یک آنزیم کلیدی در تبدیل استروژن شناخته شده و در جوجه‌های ماده P450 arom mRNA نسبت به AMH نرها زودتر بیان می‌شود. بنابراین بیان ژن P450 arom به عنوان یک پروسه مهم در ابتدای مسیر تمایز ماده بوده و نکته مهم‌تر اینکه فرآیند مذکور مستقیماً با مکانیسم‌های ژنتیکی تعیین جنسیت در ارتباط است (۶).

مطالعات ایمنوسیتوشیمیایی نشان داده است که جنسیت به تولید متفاوت آندروژن و استروژن بعد از روز ۶/۵ انکوباسیون بستگی دارد که در گندهای نر نسبت به گندهای ماده آندروژن بیشتری تولید و استروژن در گندهای ماده نسبت به گندهای نر بیشتر تولید می‌گردد (۷). جنین جوجه‌های هر دو جنس توانایی سنتز آندروژن را دارند در حالی که جنین‌های با ژنوتیپ ماده قادر به تولید استروژن، جدای از آندروژن در مدت کوتاهی قبل از تمایز جنسیت گندها است. بنابراین در جنین جوجه ماده بیان P450 arom mRNA نقش اساسی در مراحل اولیه تولید استروژن دارد.

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات مهار کننده استرادیولی آروماتاز ۱۴-آلفا-هیدروکسی-۳ و ۶ و ۱۷-آندرواستن-تریون و نیز سه آنتی استروژن به نام‌های تاموکسیفن، کلومیفن سترات و GAR78 روی تعیین جنسیت جوجه‌های گوشتی آرین بود.

## بحث و نتیجه‌گیری

از آنجا که تمایز جنسیت جوجه در روز ۶/۵ انکوباسیون صورت می‌گیرد، هرگونه تغییر در غلظت هورمون‌های جنسی در این مرحله منجر به تغییرات در ساختار بافت غدد جنسی می‌شود (۲). AI با بلوکه کردن فعالیت آروماتاز سبب افزایش آندروژن‌ها و به‌طور همزمان کاهش غلظت استروژن‌ها می‌شود (۱) و آنتی استروژن‌ها با بلوکه کردن رسپتور استروژن از ظاهر شدن اثر استروژن جلوگیری می‌کنند. بدین ترتیب نسبت آندروژن به استروژن تغییر می‌کند و تمایز جنسیت به سمت نر شدن پیش می‌رود (۸). این مطالعه وابستگی تمایز جنسیت به هورمون‌های جنسی را نشان می‌دهد. تزریق استرادیول بنزوات و یا مهار کننده آروماتاز هیچ تأثیری روی شرایط عمومی جنین‌ها ندارد. اساس هورمونی تمایز جنسیت در حساسیت به استروژن ناشناخته است (۸). تنظیم آروماتاز ممکن است در تمایز جنسیت گونه‌های دیگر نیز سهیم باشد، مثلاً در جنین انسان ماده در صورت نقص فعالیت آنزیم آروماتاز جنینی، هرمافرودیسیم کاذب اتفاق می‌افتد (۹) نتایج این تحقیق دلالت بر نقش فعالیت آروماتاز در کنترل تمایز و تعیین جنسیت دارد. نتایج بررسی حاضر با نتایج حاصل از مطالعات انجام شده روی سایر گونه‌های حیوانی در توافق می‌باشد (۱، ۲ و ۳).

اندام‌های تناسلی نشان داد که در برخی از موارد تخم‌دانها تحلیل رفته و کوچکتر شده‌اند. در برخی دیگر حالت بینابینی وجود دارد. ضمناً موارد ناهنجاری خاصی که بتوان به تیمارها نسبت داد، در بین جوجه‌ها مشاهده نشد. یعنی اینکه تزریق این مواد فقط تعادل هورمون‌های استروئیدی جنسی را در زمان تمایز جنسیت تغییر می‌دهد.

جدول ۱- مقایسه اثرات آنتی آروماتازهای مختلف روی درصد تولید جوجه‌های نر و ماده

ماده	نر	درصد نر	درصد ماده
آب مقطر	۲۰	۵۲/۵	۴۷/۵
AI	۳۰	۸۳	۱۷
تاموکسیفن	۲۱	۸۴	۱۶
کلومیفن	۱۱	۸۴	۱۶
GAR79	۲۱	۷۲	۲۸

ماده گیاهی استخراجی (فیتواستروژنی) در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت) نشان داده که در صورت بهینه کردن مقدار تزریق و تکمیل فرآیند استخراج می‌تواند به عنوان یک فیتواستروژن مورد استفاده قرار گیرد.

## منابع

1. Smith, R.G. and Elbrecht, A. 1992. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science*. 255: 467-70
2. Shimada, K. and Saito, N. 2000. Molecular mechanisms of sex determination and sex differentiation. *Japanese Poultry Science*. 37:3-11
3. Wibbels, T. 1992. Steroid hormone-induced male sex determination is anamniotic vertebrate. *J Exp Zool*. 262:454
4. Sinclair, A.H. 1990. Agene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 346:240-244.
5. Kwok, C. 1995. Mutations in *sox9*, the gene responsible for compomelic dysplasia and autosomal sex reversal. *Am. J. Hum. Genet*. 57:1028-1036
6. Shimada, K. 1998. Gene expression of steroidogenic Enzymes in chicken embryonic gonads. *J. Exp. Zool*. 281:450-6
7. Smith, C.A. 1997. Gondadelsen differentiation in chicken embryos. Expression of estrogen receptor and aromatase gens. *J. Steroid Bichem. Mol. Biol*. 60:295-302.

8. Baltazartj, E.A. 1992. Behavioral Demasculinization of Female quails induced by estrogens: Studies with new Aromatase inhibitor, R76713 *Hormones and Behavior*. 26:179-203.
9. Shozu, M, and Haradat, K. 1991. *J. Clin. Endocrinol. Metal*. 27: 560-4.