زیست‌شناسی جانوری، سال چهاردهم، شماره چهارم، تابستان ۱۴۰۱، صفحات ۱۹۶- ۱۸۱

مقاله پژوهشی

تاثیر سطوح مختلف عصاره گیاه خارخاسک بر جنبایی اسپرم، غلظت تستوسترون و بیان نسبی ژن Catsper در خروس‌های مادر گوشتی مسن

الهام پیرمرادی[۱]، رامین حاجیخانی[۱*]، صالح طباطبایی وکیلی[۲]، مریم خسروی[۱]، علی آقایی[۲]

۱ – گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲– گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خوزستان، ملاثانی، ایران

مسئول مکاتبات: Ramin_hajikhani@yahoo.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1943832.1330

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۲

چکیده

این پژوهش با هدف مطالعه‌ی اثر افزودن عصاره گیاه خارخاسک به جیره پایه بر جنبایی اسپرم، غلظت تستوسترون و بیان نسبی ژن Catsper در بیضه خروس‌های مادر گوشتی مسن با توجه به نقش این ژن در تحرک طبیعی اسپرم انجام گرفت. تعداد ۵۰ قطعه خروس مادرگوشتی راس ۳۰۸ در سن ٤٧ هفتگی به‌طور تصادفی به ۵ گروه (n=۱۰) تقسیم و روزانه با جیره‌ی پایه حاوی سطوح مختلف خارخاسک شامل: ۱) صفر میلی‌گرم خارخاسک (شاهد)، ۲) ۵ میلی‌گرم خارخاسک (Kh-5mg)، ۳) ۱۰ میلی‌گرم خارخاسک (Kh-10mg)، و ٤) ۱۵ میلی‌گرم خارخاسک (Kh-15mg)، ۵) ۲۰ میلی‌گرم خارخاسک (Kh-20mg) به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به مدت ۱۳ هفته تغذیه شدند. هر هفته از تمام خروس‌ها به منظور ارزیابی تحرک اسپرم‌ها نمونه‌گیری شد. در پایان آزمایش، به منظور اندازه‌گیری غلظت تستوسترون و ارزیابی بیان ژن Catsper، از هر تیمار به صورت تصادفی تعداد ۷ قطعه خروس خون‌گیری و سپس از بیضه آن‌ها نمونه‌برداری انجام گرفت. نتایج پژوهش نشان داد که تغذیه‌ی خارخاسک، جنبایی‌کل اسپرم را در گروه‌های Kh-5، Kh-10، Kh-15 و Kh-20 به ترتیب حدود ٦، ٤، ۳ و ۵٪ نسبت به گروه شاهد بهبود داد (P<۰/۰۵). غلظت هورمون تستوسترن پلاسما از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نداشت (P>۰/۰۵). بیان نسبی ژن Catsper در خروس‌های که سطح ۵ میلی‌گرم خارخاسک را دریافت کرده بودند نسبت به گروه شاهد تمایل به افزایش داشت (P=۰/۰۹)؛ با این وجود با دوز ۱۰ و۱۵ میلی‌گرم عصاره خارخاسک تفاوت معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵)، ولی با دوز ۲۰ میلی‌گرم عصاره خارخاسک اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). به طور خلاصه، در این پژوهش تغذیه عصاره خارخاسک در سطح ۵ میلی‌گرم باعث افزایش جنبای‌کل اسپرم و بیان ژن Catsper (یکی از ژن‌های مسئول تحرک اسپرم) شد.

کلمات کلیدی: اسپرم، بیضه، ژن، خروس، خارخاسک.

مقدمه

باروری گله‌های مادر گوشتی نقش مستقیمی در تولید تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار و در نتیجه سودآوری نهایی گله دارد. انتخاب ژنتیکی لاین‌های مادر گوشتی به طور عمده بر تولید جوجه‌های گوشتی متمرکز شده است به گونه‌ای که با مصرف خوراک کمتر، وزن کشتار بالاتری حاصل شود. اگر چه این موفقیت در تولید

محصول نهایی گاهی در نقطه مقابل تولیدمثل گله‌های مادر گوشتی قرار می‌گیرد (۳۵). نسبت پایین خروس به مرغ در گله‌های مادر گوشتی باعث می‌شود که کاهش جزئی در باروری خروس‌ها تأثیر زیادی بر نرخ باروری کل گله داشته باشد (۱۵، ۳۲). در شرایط کنترل شده، باروری خروس‌ها در ۳۷ هفتگی به اوج رسیده و پس از آن کاهش می‌یابد (۲۹). این کاهش باروری به عوامل مختلفی از جمله افزایش سن و وزن، مشکلات پا، کاهش میل جنسی و افزایش تنش‌های اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد (Reactive Oxygen Species: ROS) ارتباط دارد (٤، ۱۵).

با افزایش سن خروس‌های مادر گوشتی در کاهش یاخته‌های بیضه موثر است، کاهش تستوسترون و هورمون لوتئینی (Luteinizing hormone: LH) پلاسما می‌باشد (۳٤). کاهش نسبت تستوسترون به استردیول تغییرات بافت‌شناسی را در بیضه خروس‌های مسن رقم می‌زند که موجب نقص در بلوغ، کاهش تولید اسپرم، رها شدن یاخته‌های نابالغ بافت پوششی زاینده به درون حفره لوله‌های اسپرم‌ساز، کاهش ضخامت بافت پوششی لوله‌های اسپرم‌ساز، کاهش قطر لوله‌ها، ضخیم شدن فضای میان بافتی به دلیل هجوم فیبرهای کلاژن و فیبروبلاست‌ها و ظهور اسپرماتیدهای چند هسته‌ای می‌شود (۲۹).

سلول‌های زاینده بیضه‌ی پرندگان به دلیل داشتن مقادیر بالای اسید چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه و میزان ناچیز آنتی‌اکسیدان سیتوپلاسمی، بیش‌تر از سایر گونه‌ها به تنش‌های اکسیداتیوی حساس هستند (٤). در واقع غشای پلاسمایی اسپرم دارای اسیدهای چرب غیراشباع زیادی است که می‌تواند به راحتی در حضور ROS تحت پراکسیداسیون لیپیدی قرار گیرند، که این آسیب اکسیداتیو موجب کاهش یکپارچگی غشاء، آسیب به عملکرد سلول، کاهش جنبایی و کاهش توانایی باروری اسپرم برای تلقیح مصنوعی می‌شود (٤، ۱۵، ۱۸، ۳۵). بالا بودن غلظت اسیدهای چرب غیراشباع غشاء اسپرم، اسپرم‌ها را نسبت به پراکسیداسیون لیپیدی توسط اکسیژن‌های فعال حساس نموده که با ناباروری جنس نر در ارتباط است (۱٦، ۳۰، ۳٦).

حرکت پیش‌رونده اسپرم پس از عبور از اپیدیدیم و توانایی باروری آن نیز پس از استقرار در سیستم تناسلی ماده تحت فرآیند ظرفیت پذیری (Capacitation) حاصل می‌شود (۳٦). در این مسیر اسپرم‌ها توانایی انجام واکنش آکروزمی را کسب کرده و حرکت آن‌ها وارد مراحله Hyper-activation می‌شود. این مرحله با تغییراتی در غلظت یون‌های درون سلولی، سیالیت غشاء، متابولیسم و تحرک اسپرم همراه است (۳٦). مشخص شده است که در مراحل مختلف لقاح و به ویژه در تحرک اسپرم، یون کلسیم و نوکلئوتیدی‌های حلقوی نقش حیاتی دارند (۸). به طوری که افزایش غلظت یون کلسیم درون سلولی سبب تحرک اسپرم می‌شود. در بررسی کانال‌های کلسیمی مستقر در اسپرم، ژن جدیدی شناسایی شده است که یک کانال کلسیمی منحصر به فرد را در اسپرم کد می‌کند (۳۷). کانال فوق (Catsper) تک واحدی با شش تکرار بین غشایی است که ناحیه منفذ و همولوژی کلی آن به کانال‌های کلسیمی بزرگتر چهار واحد شبیه است، کانال فوق انحصارا در بیضه بیان می‌شود (۳۷). این ژن نقش کلیدی در کنترل تحرک اسپرم دارد و یک کانال کلسیمی را کد می‌کند که محصول آن تنها در قسمت اصلی (Pricipal) دم اسپرم مستقر است و جریان ورودی کلسیم به داخل اسپرم را کنترل می‌کند (۲٦)، ورود یون‌های کلسیم به نوبه خود تحرک اسپرم را کنترل می‌کنند. حذف ژن Catsper در موش مشخص کرد که حضور این کانال برای باروری در موش‌های نر، تحرک طبیعی اسپرم و

نفوذ آن به تخمک و نیز برای ورود یون کلسیم ضروری می‌باشد، موش‌های فوق کاملا عقیم بوده با این حال فیزیولوژی تولیدمثل و سایر رفتارهای آن‌ها، شبیه موش‌های طبیعی بود و هیچ گونه ناهنجاری‌های جانبی دیگر به غیر از عدم تحرک اسپرم و ناباروری در آن‌ها دیده نشد (۲۶). با افزایش سن تغییرات دژنراتیوی در بافت بیضه به همراه کاهش در کیفیت اسپرم دیده می‌شود (۱۲). از جمله عواملی که اثر سهمی روی کیفیت اسپرم دارد زیاد شدن رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که میزان کم آن‌ها برای اسپرم ضروری است تا توانایی باروری کسب کند ولی مقدار زیاد آن‌ها باید دائما غیرفعال شوند تا عملکرد سلول طبیعی بماند (۱).

با افزایش تنش‌های اکسیداتیو پس از پیک تولید در خروس‌های مادر گوشتی که با تحلیل یاخته‌های بیضه همراه است، وزن بیضه و تولید اسپرم وجنبایی اسپرم کاهش می‌یابد (۲۸).

تغذیه آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند ظرفیت آنتی‌اکسیدانی منی را بهبود و اثر رادیکال‌های آزاد را کاهش دهد (۲، ۵، ۱٤).

گیاه خارخاسک با نام علمی (*Tribulusterrestris*) و مشهور به پانکچرو، گیاه خوابیده یک ساله بومی است که در بسیاری از مناطق گرمسیری و معتدل جهان از جمله آمریکا، مکزیک و نواحی مدیترانه رشد می‌کند (۳۳). این گیاه در طب سنتی چین، ایران، عراق، هند، بلغارستان وجنوب آفریقا کاربرد دارد و به عنوان ضد افسردگی، ضد فشار خون، ضد درد و افزایش قوای جنسی استفاده می‌شود (٦). مطالعات نشان می‌دهد گیاه خارخاسک حاوی استروئیدها، ساپونین‌ها، فلاوونیدها، آلکالوئیدها، اسیدهای چرب غیراشباع، ویتامین‌ها، تانن‌ها، رزین‌ها، پتاسیم، نیترات، روغن ثابت، پلیفنل، موادمعدنی (منحصر به فرد در کلسیم)، اسیدآسپارتیک واسیدگلوتامیک است (۳۳).

گیاه خارخاسک به علت داشتن استروئیدهای مختلف باعث تحریک فرآیند اسپرماتوژنز شده و با تأثیر روی سلول‌های سرتولی موجب افزایش تولید اسپرم می‌گردد (۱۱). همچنین گیاه خارخاسک با خاصیت آنتی اکسیدانی خود می‌تواند موجب افزایش سطح آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی و تشدید فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز ((SOD) Superoxide dismutase)، گلوتاتیون پراکسیداز ((GPX) Glutathioneperoxidase) و کاتالاز ((CAT) Catalase) شود (٦، ١٤). همچنین خارخاسک به‌عنوان حذف‌کننده یا مهارکننده رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط واکنش اکسیژنی و واکنش‌های اکسیداتیوی فعالیت می‌نماید (١٤).

عصاره خارخاسک به دلیل دارا بودن ساپونینها باعث افزایش سطح ترشح هورمونهای LH و FSH از هیپوفیز شده که به دنبال آن میزان تستوسترون افزایش می‌یابد، از اینرو قادر به بهبود عملکرد جنسی از جمله افزایش تولید اسپرم و افزایش میل جنسی می‌شود (١٦).

بررسی مطالعات مختلف نشان می‌دهد که آنتی اکسیدان‌ها روی بیان ژن تأثیر می‌گذارند؛ در مطالعه محمدی و همکاران (۲۱) نشان دادند که افزایش معنی‌داری در میانگین بیان ژن Catsper در موش‌های گروه آزمون در مقایسه با گروه کنترل مشاهد شد؛ در واقع درمان با سلنیوم در موش‌های مسن شدت نسبی بیان ژنی بیشتری را در مقایسه با موش‌های بالغ دارد. با توجه به اینکه تحقیقی در زمینه تاثیر آنتی اکسیدان‌ها بر بیان ژن Catsper در خروس مادر گوشتی یافت نشد، بنابراین این پژوهش با هدف بررسی جنبایی اسپرم و بیان ژن CatSper در بیضه خروس‌های مادر گوشتی مسن پس از تجویز آنتی اکسیدان خارخاسک انجام شد.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری خارخاسک: میزان ۵ کیلوگرم از گیاه خارخاسک خرد شده با آسیاب، در ۱۵ لیتر محلول هیدروالکلی (اتانول ۹۶ و آب به نسبت ۸۰ :۲۰) به مدت ٤٨ خیسانده شد و پس از صاف کردن و روتاری (تبخیر در خلا) تا تغلیظ به میزان ۷۰٪ انجام شد و عصاره بدست آمده درون پلیت ریخته شد و در فریز درایر قرار گرفت تا خشک شود (۷).

پرنده‌ها، شرایط محیطی و جیره‌آزمایشی: پژوهش حاضر در فارم تحقیقاتی صحرای جنوب زیر مجموعه شرکت زنجیره تولید گوشت مرغ کیمند رامهرمرز (مجهز به دستگاه زمان‌سنج، دماسنج، هیتر برقی و هواکش) با همکاری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. تعداد ۵۰ قطعه خروس مادر گوشتی در سن ٤٥ هفتگی به‌صورت تصادفی انتخاب و پس از دو هفته عادت‌دهی به محیط و اسپرم‌دهی در جایگاه (پن)های انفرادی، به‌صورت تصادفی به ۵ گروه ۱۰ قطعه‌ای با میانگین وزنی مشابه تخصیص یافتند و با تغذیه‌ی سطوح مختلف خارخاسک شامل: ۱) جیره پایه (فاقد خارخاسک)، تیمار۲) جیره پایه+ سطح ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، تیمار۳) جیره پایه+ سطح ۱۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن، تیمار٤) جیره پایه+ سطح ۱۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن و تیمار ۵) جیره پایه+ سطح ۲۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن، به مدت ۱۳ هفته متوالی مورد آزمایش قرار گرفتند. پرنده‌ها در یک محیط کنترل شده و در شرایط یکسان با ١٤ ساعت روشنایی و۱۰ ساعت تاریکی و تحت دمای ۲۱-۱۷ درجه سانتی‌گراد پرورش یافتند. به‌صورت هفتگی، از تمام خروس‌ها به منظور ارزیابی جنبای‌کل اسپرم‌ها نمونه‌گیری شد. در پایان آزمایش، به منظور اندازه‌گیری غلظت تستوسترون و ارزیابی بیان ژن Catsper از هر تیمار به صورت تصادفی تعداد ۷ قطعه خروس در ابتدا خون‌گیری و سپس از بیضه آن‌ها نمونه‌برداری انجام گرفت. دوزهای عصاره گیاه خارخاسک مورد استفاده در این آزمایش بر اساس پژوهش‌های پیشین که نشان دادند میزان ۱۰-۵ میلی-گرم عصاره گیاه خارخاسک به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌طور موثری می‌تواند کیفیت اسپرم، باروری، بافت بیضه، سوخت‌وساز چربی و ظرفیت آنتی-اکسیدانی را در انسان، موش، قوچ، مرغ و جوجه‌های گوشتی بهبود دهد، انتخاب شد (١٤ ٢٨، ٣٠). جیره خروس‌ها براساس توصیه کاتولوگ راس ۳۰۸ تنظیم (جدول. ۱) و در کارخانه خوراک پلت کارون شرکت زنجیره‌ای دام و طیور کیمند رامهرمرز آماده‌سازی شد.

ارزیابی فراسنجه‌های اسپرمی: تست جنبایی‌کل اسپرم‌ها به روش تخمین چشمی ارزیابی شد. ۱۰ میکرولیتر نمونه منی با ۲۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژیک رقیق شد. برای این منظور، نمونه منی به آرامی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در داخل آون به رقیق کننده اضافه شد و به‌تدریج با آن مخلوط شد. سپس دو قطره منی رقیق شده به مقدار ۵ میکرولیتر در دو طرف لام ریخته شد و روی هر قطره یک لامل به آرامی و با دقت گذاشته شد و تحت میکروسکوپ نوری، جنبایی کل به روش تخمین چشمی ارزیابی و داده‌های آن ثبت شد (۲).

بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه: برای بررسی سازوکار اثر عصاره گیاه خارخاسک در بیضه، بیان نسبی ژن Catsperارزیابی شد. توالی ژن نامزد و بتا-اکتین (به عنوان ژن رفرنس) از پایگاه داده NCBI به دست آمد (جدول ۲). آغازگرها توسط نرم افزار آنلاین Primer3Plus طراحی و توسط نرم افزارهای آنلاین OligoAnalyser، OligoCalc و Primer-BLASTمورد بازبینی قرار گرفتند.

استخراج RNA و ساخت cDNA: جداسازی RNA کل سلول‌ها با کمک کیت RNeasy تولیدی شرکت Qiagen (شماره کاتولوگ: 74106) به ترتیب زیر صورت گرفت (۲۴) :

الف- ۳۰ میلی‌گرم بافت بیضه یخزده (۷۰- درجه سلسیوس) پیش از یخ‌گشایی کامل به درون بوته چینی دارای نیتروژن مایع انداخته شد. بافت به خوبی کوبیده و آسیاب شد و به همراه نیتروژن مایع به یک لوله میکروسانتریفیوژ ۲ میلی‌لیتری بدون RNase ریخته شد. مقدار ۶۰۰ میکرولیتر بافرRLT (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 ۱۴۰۰۰ 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 به‌خوبی مخلوط شد.

پ- ۷۰۰ میکرولیتر از مایع این لوله به درون لوله های فیلتردار ریخته شد و ۱۵ ثانیه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. مایع لوله زیرین دور ریخته شده و فیلتر دوباره در همین لوله جمع‌آوری قرار داده شد.

ت- مرحله فوق یک بار با افزودن ۷۰۰ میکرولیتر از بافر RW1 و بار دیگر با افزودن ۵۰۰ میکرولیتر از بافر RPEتکرار شد.

ث- فیلتر در یک لوله جمع‌آوری ۱/۵ میلی لیتری جدید قرار داده شد. مقدار ۳۰ تا ۵۰ میکرولیتر آب بدون RNase به طور 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 RNAغشای فیلتر چسبیده بود در این آب حل و در لوله زیرین جمع شد و پس از بستن درب آن در دمای ۷۰- درجه سلسیوس منجمد شد تا در ادامه از آن cDNAساخته شود.

ساخت cDNA: برای ساخت cDNA از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit تولیدی شرکت Thermofisher (شماره کاتولوگ: K1621) به ترتیب زیر استفاده شد:

الف- RNA الگو از فریزر ۷۰- درجه سلسیوس، روی یخ و اجزای کیت بالا در دمای اتاق (۲۵-۱۵درجه سلسیوس) 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 به خوبی آمیخته شدند. این لوله در یک دستگاهPCR معمولی برای ۲ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سلسیوس 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 ۱میکرولیتر آنزیم RT، ۱میکرولیتر آمیزه آغازگرها و ۴ میکرولیتر بافر RT تشکیل شده بود. با افزوده شدن 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 RTغیرفعال شود.

ت- cDNA ساخته شده 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 Metabion و RealQ Plus Master Mix Green ساخت Amplicon (شماره کاتولوگ: A325402) و

دستگاه Rotor-Gene® ساخت شرکت Qiagen (model: MDx 5plex HRM) 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 Mix Master، 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 فعال سازی ۵ دقیقه‌ای در دمای 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 R^2 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ آنالیز شد (۱۹). نمونه‌های گروه KH-0، به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند.

آنالیز آماری: داده‌های آزمایش مربوط به بیان ژن حاضر با رویه Oneway ANOVA و نرم افزار SPSS 20 تجزیه و تحلیل شدند. ابتدا نرمال بودن توزیع داده ها و هموژن بودن واریانس ها با تست های Shapiro و Levene's بررسی گردید و سپس ANOVA انجام شد. داده‌های مربوط به فراسنجه‌های جنبایی کل اسپرم‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند و مقایسه میانگین تیمارهای آزمایشی با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۵ ٪ انجام شد.

جدول ۱- اجزاء و ترکیب شیمیایی جیره پایه

ترکیب جیره	جیره پایه (درصد)
ذرت	٦٩/١٠
سویا	٧/٩٣
سبوس گندم	١٩/٥٥
دی ال – متیونین	٠/١
ال- لیزین	٠/٠٤
دی کلسیم فسفات	١/٤٣
کربنات کلسیم	٠/٧٣
سدیم بی کربنات	٠/٢٧
کربنات پتاسیم	٠/١
سدیم کلرید	٠/٢٥
مکمل ویتامینی*	٠/٢٥
مکمل معدنی**	٠/٢٥
کل	١٠٠
انرژی سوخت و سازی (kcal/kg)	٢٨٠٠/٠٠
پروتئین خام	١١/٥٠
کلسیم	٠/٧٠
سدیم	٠/١٨
پتاسیم	٠/٦٥
فسفر	٠/٣٥
ال- لیزین	٠/٤٤
دی ال- متیونین	٠/٢٨
ال- ترئونین	٠/٣٤
متیونین+سیستئین	٠/٤٦
تریپتوفان	٠/٣٤
آرژینین	٠/٦٢

*هر کیلوگرم جیره حاوی ۱۵۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰ واحد بین المللی ویتامین E، ٤ میلی‌گرم ویتامین K3، ۳۰ میکروگرم ویتامین B12، ۳۵۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۷/۵ میلی‌گرم B2، ۵۰ میلی‌گرم B3، ۱۸ میلی‌گرم B5، ۵/۵ میلی‌گرم B6 و ۵۰ میکروگرم B7 بود. **هر کیلوگرم جیره حاوی ۵۰ میلی‌گرم آهن، ۱۳۰ میلی‌گرم منگنز، ۱۲۰ میلی‌گرم روی، ۲ میلی‌گرم ید و ۰/۳ میلی‌گرم سلنیوم دارد.

جدول۲- اطلاعات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده درReal-time PCR

Gene	Sequence	Product length (bp)	Accession number	Annealing temperature (0_C)
β-actin	F: TGATATTGCTGCGCTCGTTG R: ATACCAACCATCACACCCTGA	132	NM_205518.1	60
Catsper	F: GCAAATGCAGGGAGTCTGC R: TCAGTCAGGTCGAAGGCAAG	86	HAEK01050811.1	60

نتایج

تأثیر سطوح مختلف عصاره گیاه خارخاسک بر فراسنجه‌های جنابی‌کل اسپرم در خروس‌های مادر گوشتی مسن در جدول (۳) آورده شده است؛ جنابی‌کل اسپرم در گروه ۵ میلی‌گرم خارخاسک بالاترین و کمترین میزان در گروه شاهد مشاهده شد (p <۰/۰۵؛ جدول ۳)؛ با این وجود تفاوت معنی‌داری بین پرندگانی که سطوح ۵ و ۲۰ میلی‌گرم خارخاسک را دریافت کرده بودند مشاهد نشد. روند تغییرات در میزان جنابی اسپرم‌های جمع‌آوری شده طی هفته‌های مختلف آزمایش (نمودار ۱) نشان داد که حداقل یک بازه‌ی ۵ هفته‌ای تغذیه خارخاسک برای بروز اثرات مثبت آن بر جنابی کل اسپرم لازم است (p <۰/۰۵). جنابی کل در پرندگان دریافت کننده عصاره خارخاسک در ۷ هفته نخست آزمایش روندی افزایشی و پس از آن روندی کاهشی با شیب ملایم داشت (شکل. ۱). در حالی که در تیمار شاهد در ۷ هفته نخست تقریبا روند ثابتی داشت و بعد از آن با شیب بسیار زیاد روند کاهشی را نشان داد (شکل. ۱). نتایج مربوط به فراسنجه هورمون تستوسترون پلاسمای خون خروس‌های مادرگوشتی تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف خارخاسک در جدول (٤) نشان داده شده است؛ غلظت هورمون تستوسترن پلاسما از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نداشت (p > ۰/۰۵؛ جدول. ٤). به لحاظ عددی غلظت هورمون تستوسترن در پرندگانی عصاره خارخاسک را دریافت کرده بودند بالاتر از تیمار شاهد بود (جدول. ٤). در پژوهش حاضر سطح بیان نسبی ژن Catsper در خروس‌های که سطح ۵ میلی‌گرم خارخاسک را دریافت کرده بودند نسبت به گروه شاهد تمایل به افزایش داشت (P=۰/۰۹)؛ با این وجود با دوز ۱۰ و۱۵ میلی‌گرم عصاره خارخاسک تفاوت معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵)، ولی با دوز ۲۰ میلی‌گرم عصاره خارخاسک تفاوت معنی‌داری نشان نداد (p >۰/۰۵).

جدول ۳- تأثیر سطوح مختلف عصاره گیاه خارخاسک بر فراسنجه‌های جنابی کل اسپرم در خروس‌های مادرگوشتی مسن (۱۰ پرنده در هر تیمار)

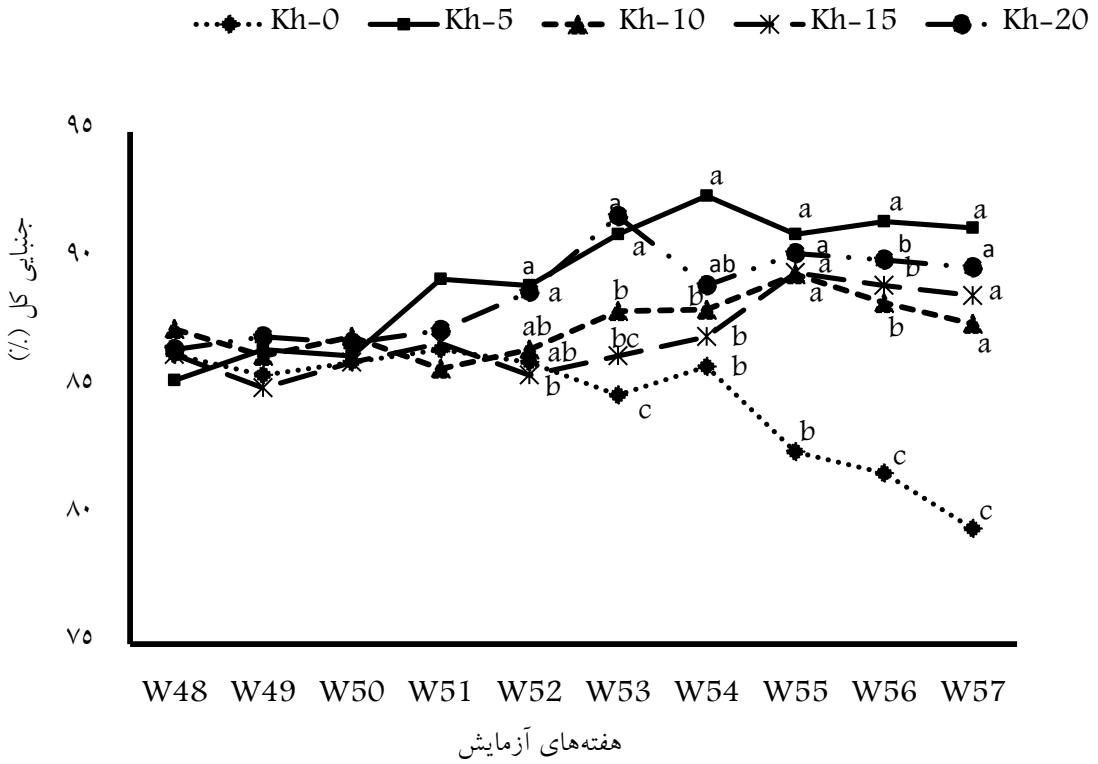
فراسنجه‌ها	سطوح مختلف خارخاسک* (*mg/kg body weight*)					*SEM*	*p- value*
	Kh-0	Kh -5	Kh -10	Kh -15	Kh -20		
جنابی کل (٪)	۸٤/۱۷^{c}	۸۹/۳۸^{a}	۸۷/۳۸^{b}	۸٦/۹٦^{b}	۸۸/۷۰^{ab}	۰/۳۷	۰/۰۰۱

a.b.c اعداد هرسطرکه حروف غیرمشابه دارند، داری اختلاف معنی‌داری هستند (P<۰/۰۵). * Kh-0=جیره پایه فاقد خارخاسک (شاهد)، Kh-5=جیره پایه حاوی ۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن خارخاسک، Kh-10=جیره پایه حاوی ۱۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن خارخاسک، Kh-15=جیره پایه حاوی ۱۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن خارخاسک و Kh-20=جیره پایه حاوی ۲۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن خارخاسک

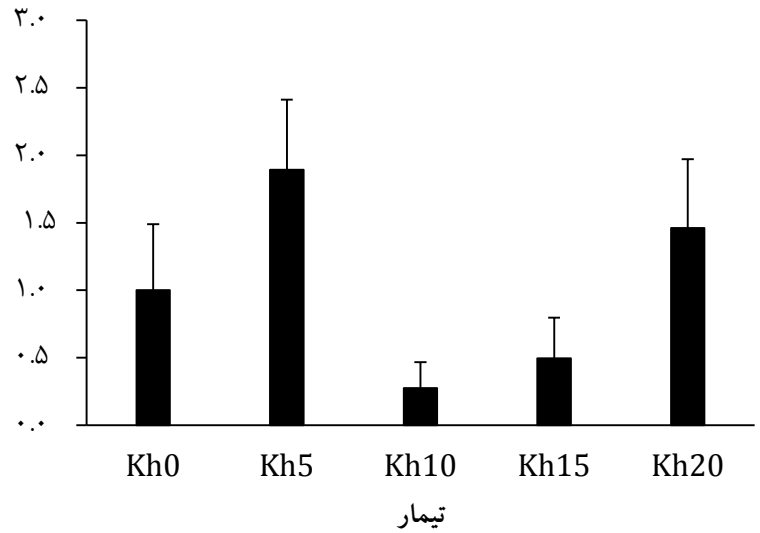
جدول ٤- تأثیر سطوح مختلف عصاره گیاه خارخاسک بر میزان هورمون تستوسترون در خروس‌های مادرگوشتی مسن (۷ پرنده در هر تیمار)

فراسنجه‌ها	سطوح مختلف خارخاسک* (*mg/kg body weight*)					*SEM*	*p- value*
تستوسترون (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	Kh-0	Kh -5	Kh -10	Kh -15	Kh -20	۰/۵۰	۰/۹۱
	۲/٤۱	۳/۷۵	۳/٦٥	۳/۳۰	۳/٥٤		

* Kh-0= جیره پایه فاقد خارخاسک (شاهد)، Kh-5=جیره پایه حاوی ۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن خارخاسک، Kh-10=جیره پایه حاوی ۱۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن خارخاسک ، Kh-15=جیره پایه حاوی ۱۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن خارخاسک و Kh-20=جیره پایه حاوی ۲۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن خارخاسک



شکل ۱- تغییرات هفتگی جنبایی کل در خروس های راس ۳۰۸ تغذیه شده با سطوح مختلف خارخاسک به مدت ۱۰ هفته از (سن ٤۷ تا ۵۷ هفتگی). ***a***، ***b*** و ***c*** در هر هفته حروف غیر همسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین تیمارهاست (p <۰/۰۵).



شکل ۲- بیان نسبی Catsper در بیضه خروس‌های مادر گوشتی مسن تغذیه شده با سطوح مختلف خارخاسک [صفر (Kh0)، ۵ (Kh5)، ۱۰(Kh10)، ۱۵(Kh15) و ۲۰ (Kh20) میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن]. بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. داده ها به صورت LSmean ±SE نمایش شده است.

بحث

در پژوهش حاضر تاثیر سطوح مختلف عصاره گیاه خارخاسک بر فراسنجه‌های جنایی‌کل و شدت نسبی بیان ژن Catsper در خروس‌های مادر گوشتی مسن مورد بررسی قرار گرفت. به دنبال این هدف هر هفته از خروس‌ها نمونه‌گیری جهت ارزیابی جنایی‌کل و در انتهایی پژوهش از هر تیمار به صورت تصادفی تعداد ۷ قطعه خروس ایتدا خون‌گیری و سپس از بیضه آن‌ها RNA استخراج و پس از انجام تکنیک RT-PCR، بیان ژن Catsper در آن‌ها بررسی شد. نتایج پژوهش حاضر، بهبود جنایی کل اسپرم‌ها در خروس‌های مادر گوشتی تغذیه با دوز ۵ میلی‌گرم عصاره گیاه خارخاسک در مقایسه با گروه کنترل را نشان داد. غشای پلاسمایی اسپرم گونه‌های مختلف به‌ویژه پرندگان، حاوی سطح بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشند که آن‌را مستعد به پراکسیداسیون لیپیدی تحت ROSها می‌کند (۱۵). به‌طور معمول، آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در پلاسمای منی با خنثی‌سازی ROSها، اکسیداسیون لیپیدها را کاهش می‌دهند، اما زمانی که سطح تولید رادیکال‌های آزاد از توان آنتی‌اکسیدانی منی فراتر رود، فراسنجه‌های کیفی منی به‌شدت کاهش می‌یابد (۴،۱۵). با افزایش سن خروس‌های مادر گوشتی پس از پیک تولید، سطح تولید ROSها و در نتیجه شاخص‌های تنش اکسیداتیو مانند مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehyde: MDA) افزایش می‌یابد. از آنجا که دو جایگاه عمده‌ی تولید ROSها، میتوکندری و غشاء پلاسمایی اسپرم می‌باشد (۳۹)، تنش‌های اکسیداتیو آسیب‌های جدی به جنبایی و سلامت غشای اسپرم وارد می‌کند. افزایش تنش‌های اکسیداتیو همراه با کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی منی در خروس‌های مسن موجب کاهش یکپارچگی غشاء، جنبایی و کاهش توانایی باروری اسپرم می‌شود (۲، ۴، ۱۵). در واقع رادیکال‌های آزاد با حمله به غشای پلاسمایی و همچنین تأثیر بر فعالیت میتوکندری، بیشترین تأثیر را بر یکپارچگی غشاء و جنبایی اسپرم

می‌گذارند (۳۹). در این راستا، مطالعات مختلفی ارتباط منفی بین افزایش تنش‌های اکسیداتیو و زنده-مانی، جنبایی و باروری اسپرم خروس را گزارش کرده‌اند (۲، ٤، ۱۵). در راستای نتایج ما پژوهشگران نشان دادند اثر بخشی آنتی‌اکسیدان‌های موجود در تفاله سیب، عصاره رزماری، پودر رزوماری و کورکومین بر جنبایی کل و در نتیجه بهبود تولیدمثل در گله‌های مادر گوشتی به تأیید رسیده است (۲، ٤، ۱۵،۳۱).

در پژوهش Salgado و همکاران (۲۸) که به بررسی گیاه خارخاسک به صورت خوراکی بر رروی کیفیت و کمیت اسپرم انسان پرداختند، نشان دادند که استفاده از گیاه خارخاسک باعث بهبود معنی‌داری در غلظت، تحرک و زنده‌مانی اسپرم می‌شود. هم‌چنین در مطالعه Sharawy و همکاران (۳۰) روی قوچ نشان دادند حجم انزال، جنبایی‌کل، درصد اسپرم زنده، مورفولوژی اسپرم، غلظت اسپرم و غشای فعال اسپرم به طور معنی‌داری در گروه تیماری با گیاه خارخاسک افزایش یافت؛ در واقع گیاه خارخاسک با استفاده از عناصر ردیاب پیشنهاد شده (Ca^{+2} در گیاه خارخاسک) که اثر محرک بر روی حرکت اسپرم دارد؛ به این صورت عنصر Ca^{+2} می‌تواند آنزیم فسفو دی استراز را مهار کند، که مانع از تجزیه آدنوزین مونوفسفات حلقوی شده (cAMP)، بنابراین جنبایی اسپرم را افزایش می دهد (۱۷، ۳۰). فروستانول یکی از ساپونین‌های خارخاسک است که اثر محرک بر اسپرماتوژنز دارد. این ماده سبب بهبود معنی‌دار کیفیت و کمیت اسپرم می‌شود (۵). این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر مبنی بر بهبود جنبایی‌کل مطابقت داشت. در واقع گیاه خارخاسک به علت داشتن استروئیدهای مختلف باعث تحریک اسپرماتوژنز شده و با تأثیر بر سلول‌های سرتولی موجب بهبود اسپرم می‌گردد (۱۷). گیاه خارخاسک حاوی تمام پلی فنول‌های است که دارای انواع گسترده‌ای از ترکیبات مانند اسید فنولیک و فلاونول‌ها هستند. باتوجه به فعالیت آنتی اکسیدانی بالا و مهار پراکسیداسیون لیپیدی خارخاسک، این گیاه می‌تواند در درمان ناباروری مفید باشد؛ در نتایج برخی مطالعات گزارش شده است که این گیاه در انسان باعث توسعه و پیشرفت اسپرماتوژنز و میل جنسی می‌شود (۱۷).

در این پژوهش عصاره خارخاسک از نظر عددی باعث افزایش غلظت تستوسترون شد، مطالعات عصاره خارخاسک به دلیل دارا بودن ساپونین‌ها باعث افزایش سطح ترشح هورمون‌های LH و FSH از هیپوفیز شده که به دنبال آن میزان تستوسترون افزایش می‌یابد، از این‌رو قادر به بهبود عملکرد جنسی از جمله افزایش تولید اسپرم و افزایش میل جنسی می‌شود (١٦). عصاره این گیاه باعث تحریک سلول‌های سرتولی برای تقسیم و تحریک سلول‌های لیدیگ جهت سنتز تستوسترون می‌شود (۹). پروتودیوسین موجود در عصاره این گیاه از طریق افزایش میزان دی هیدرواپی آندروسترون (DHEA) موجب بهبود عملکرد جنسی می‌شود (۱۵). Grigorova و Kashamov در سال (۱۰) در تحقیقی سطح ۱۰ میلی‌گرم پودر گیاه خارخاسک در آب آشامیدنی خروس مادرگوشتی روی فراسنجه‌های کمی و کیفی اسپرم بررسی کردند، آن‌ها گزارش کردند فراسنجه حجم منی به طور بارز و برجسته‌ای (۲۹ درصد) افزایش یافته بود، همچین میزان زنده‌مانی اسپرم را افزایش داده بود، این نتیجه همراه با افزایش تستوسترون درطول دوره تحقیق بود.

در این پژوهش، میزان بیان ژن Catsper بعد از اضافه شدن عصاره گیاه خارخاسک در سطح ۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن افزایش یافت؛ پژوهشگران نشان دادند که کوئرستین، کاتچین و تریبولوزامید (از آنتی اکسیدان‌های مهم در عصاره گیاه خارخاسک)

می‌توانند بیان ژن TNFα و IL-4 را تغییر دهند، که منجر به تأثیر مثبت بر شرایط مختلف التهابی می‌شود (۲۳). در مطالعه محمدی و همکاران (۲۱)، بیان ژن Catsper در موش‌های مسن در مقایسه با موش‌های جوان کاهش یافت؛ بنابراین افزایش سن (پیری) از عوامل کاهش بیان ژن می‌تواند باشد، همچنین فراسنجه‌هایی مانند جنبایی و مورفولوژی اسپرم تحت تاثیر ROS قرار گرفت. برخی گیاهان دارای اجزای مهم آنتی اکسیدانی هستند؛ خارخاسک نمونه‌ای از گیاهان دارویی است که دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مهمی مانند کاتچین، کامپرول، کوئرستین و اپی‌کاتچین است (۲۳). همانند مطالعه حاضر، کاظمی زاده و همکاران (۱۵) نشان دادند که استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدانی می‌تواند منجر به بهبود قابل توجهی در جنبایی اسپرم شود. در راستای نتایج حاضر، نشان دادند که کاتچین، کوئرستین و فلاونوئید می‌توانند بیان ژن گلوتاتیون پراکسیداز را در گروه‌های آزمایشی تغییر دهند. همچنین در راستایی مطالعه ما نشان دادند که استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی منجر به تنظیم بیان ژن Catsper می‌شود (۱۳، ۲۱). پژوهش حاضر نشان داد که آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره گیاه خارخاسک (۵ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن) می‌تواند باعث بهبود جنبایی کل اسپرم و تنظیم بیان ژن Catsper در خروس‌های مادر گوشتی مسن شود.

در پژوهش Ren و همکاران (۲۳)، با استفاده از تکنیک ایمونوفلورسنت غیر مستقیم نشان دادند که پروتئین Catsper در ناحیه اصلی دم اسپرم قرار دارد. برای تعیین محل دقیق پروتئین در دم اسپرم از تکنیک میکرسکوپ الکترونی با ایونوگلد غیر مستقیم استفاده شد و حضور این پروتئین در غشایی پلاسمایی ناحیه اصلی اسپرم تایید شد. به دنبال آن Lobely و همکاران (۲۰) و Quill و همکاران (۲۵) نیز محل پروتئین Catsper را در ناحیه فلاژی اسپرم یافتند. گزارش مکتوبی در زمینه اثر آنتی‌اکسیدان‌ها بر بیان ژن Catsper در خروس‌مادر گوشتی یافت نشد. بررسی مطالعات مختلف نشان می‌دهد که آنتی‌اکسیدان‌ها بر روی بیان ژن تاثیر گذارند. در مطالعه‌ای Rota و همکاران (۲۷)، رژیم غذایی با کمبود ویتامین E باعث کاهش بیان ژن‌ها در هیپوکامپ شد. همچنین، مطالعه Jeivis و همکاران (۱۳) نشان می‌دهد که درمان با ویتامین E در موش‌های مسن باعث کاهش بیان ژن موثر در استرس اکسیداتیو و همچنین کمبود ویتامین E باعث تشدید اثرات وابسته به سن و تجمع فراورده‌های استرس اکسیداتیو می‌شود. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که عصاره گیاه خارخاسک بر بیان ژن Catsper در بیضه خروس تاثیرگذار است و باعث افزایش بیان ژن Catsper می‌شود.

نتیجه‌گیری

در یک جمع‌بندی کلی می‌توان گفت اضافه کردن عصاره گیاه خارخاسک به جیره پایه خروس‌های مادر گوشتی مسن روی جنبایی کل اسپرم تاثیرگذار بوده و همچنین باعث افزایش در غلظت تستوسترون و بیان ژن Catsper بیضه‌ای شد؛ در واقع ژن Catsper، یک ژن مهم در اسپرماتوژنز است، بنابراین ممکن است تقویت دفاع آنتی اکسیدانی و افزایش یون کلسیم بتواند بعنوان راهکاری در بهبود اسپرم در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

از شرکت صحرای جنوب زیر مجموعه شرکت زنجیره تولید گوشت مرغ کیمند رامهرمرز به سبب فراهم نمودن امکانات و کمک مالی مورد نیاز این تحقیق و دانشگاه آزاد اسلامی واحد شمال تهران و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به

سبب مساعدت‌های علمی کمال تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1. Agarwal A., Nallella K.P., Allamaneni S.R., Said T.M., 2004. Role of antioxidant in treatment of male infertility: anoverview of the literature. *Reproductive BioMedicine*. 8(6): 616-627.

2. Akhlaghi A., Ahangari Y.J., Zhandi M., Peebles E.D., 2014. Reproductive performance, semen quality, and fatty acid profile of spermatozoa in senescent broiler breeder roosters as enhanced by the long-term feeding of dried apple pomace. *Animal Reproduction Science,* 147 (1): 64–73.

3. Ammar N.M., El-Hawary S.S. E.D., Mohamed, D.A., Afifi M.S., Ghanem, D. M. Awad G., 2018. Phytochemical and biological studies of Tribulus terrestris L. growing in Egypt. *International Journal of Pharmacology,* 14(2): 248-259.

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. Brown G.A., Vukovich M.D., Martini E.R., Kohut M.L., Franke W.D., Jackson D.A., King D.S., 2002. Endocrine and lipid responses to chronic androstenediol-herbal supplementation in 30 to 58 years old men. *American College Nutrition.* 20 (5): 520–528.

6. Chhatre Sa., Nesari T., Somani G., Kanchan D., Sathaye S., 2014. Phytopharmacological overview of Tribulus terrestris. *Pharmacognosy Reviews.* 8(15): 45–51.

7. Dakshayini P.N., Mahaboob Basha P., 2018. Phytochemical screening and in vitro antioxidant potential of Tribulus terrestris fruit and Mesua ferrea flower extracts: A comparative study. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,* 10(3): 70-75.

8. Darszon A., Labarca P., Nishigaki T., Espinosa, F., 1999. Ion channels in sperm physiology. *Physiological Reviews,* 79(2): 481-510.

9. Gauthaman, K., Ganesan, A. P., & Prasad, R. N. V. (2003). Sexual effects of puncturevine *(Tribulus terrestris)* extract (protodioscin): an evaluation using a rat model. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine,* 9(2), 257-265.

10. Grigorova, S., Kashamov, B., Sredkova, V., Surdjiiska, S., Zlatev, H. (2008). Effect of Tribulus terrestris extract on semen quality and serum total cholesterol content in White Plymouth Rock-mini cocks. *Biotechnology in Animal Husbandry.* 24 (3-4): 139–146.

11. Gulaya N.M., Margitich V.M., Govseeva N.M., Klimashevsky V.M., Gorpynchenko I.I., Boyko M.I., 2001. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. *In Archives of andrology,* 46 (3):169–175.

12. Homonnai Z.T., Fainman N., David M.P. Paz G.F., 1982. Semen quality and sex hormone pattern of 29 middle aged men. *Journal Androl,* 14: 164-170.

13. Jervis K.M., Robaire B., 2004. The effects of long-term vitamin E treatment on gene expression and oxidative stress damage in the aging Brown Norway rat epididymis. *Biology of reproduction,* 71(4): 1088-1095.

14. Kamboj P., Aggarwal M., Puri S., Singla, S.K., 2011. Effect of aqueous extract of *Tribulus terrestris* on oxalate-induced oxidative stress in rats. Indian. *Indian Journal of Nephrology.* 21 (3): 154.

15. Kazemizadeh A., Zaree Shahnh A., Heidari Amale M., Mohammadi M., Zhandi M., Ansari Pirsaraei Z., 2018. Correlation of plasma lipids' profile with testicular histology parameters in broiler breeder

Sciences, 30:13-18.

22. Naseri, L., Khazaei, M., 2019. A Review on Therapeutic Effects of *Tribulus terrestris*. *Journal of Medicinal Plants,* 18(72):1-22.

23. Qi X., Shang M., Chen C., Chen Y., Hua J., Sheng, X., Guo, Y., 2019. Dietary supplementation with linseed oil improves semen quality, reproductive hormone, gene and protein expression related to testosterone synthesis in aging layer breeder roosters. *Theriogenology,* 131: 9-15.

24. Quill T.A., Sugden S.A., Rossi K.L., Doolittle L.K., Hammer, R.E., Garbers, D.L. 2003. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 100(25): 14869-14874.

25. Ren D., Navarro B., Perez G., Jackson A.C., Hsu S., Shi Q., Clapham, D.E., 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature,* 413(6856): 603-609.

26. Rota C., Rimbach G., Minihane A.M., Stoecklin E., Barella L., 2005. Dietary vitamin E modulates differential gene expression in the rat hippocampus: potential implications for its neuroprotective properties. *Nutritional neuroscience,* 8(1): 21-29.

27. Salgado R.M., Marques-Silva M.H., Goncalves E., Mathias A.C., Aguiar J.G., Wolff P., 2017. Effect of oral administration of tribulus terrestris extract on semen quality and body fat index of infertile men. *Andrologia.* 49 (5):12655.

28. Sarabia Fragoso, J., Pizarro Díaz, 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* roosters. *Research On Animal Production (Scientific and Research),* 9(22): 52-59. [In Persian].

1-1-1-1 Keshtmand, Z., Ghanbari, A., Khazaei, M., & Rabzia, A. (2015). Protective Effect of Tribulus terrestris Hydroalcoholic Extract Against Cisplatin-Induced Apoptosis on Testis in Mice. *International Journal of Morphology,* 33(1): 279-284

16. Khaleghi S., Bakhtiari M., Asadmobini A., Esmaeili F., 2017. Tribulus terrestris Extract Improves Human Sperm Parameters In Vitro, Journal of Evidence Based on *Complementary Alternatives,* 22(3): 407–412.

17. Khalil-Khalili A.A., Zhandi M., Zaghari M., Mehrabani-Yeganeh H., Yousefi A.R., Tavakoli-Alamooti, M., 2021. The effect of dietary organic selenium on reproductive performance of broiler breeder roosters under dexamethasone induced stress. *Theriogenology,* 161: 16-25.

18. Livak K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods,* 25(4): 402-408.

19. Lobley A., Pierron V., Reynolds L., Allen L., Michalovich, D., 2003. Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis. *Reproductive biology and endocrinology,* 1(1):1-15.

20. Mohammadi M., Movahedin M., Molly S.G., 2011. Effect of selenium on Catsper gene expression in the testis of elderly mice. *Medical Journal of Shiraz University of Medical Sciences,* 32(1):73-79. [In Persian].

21. Mohaned, M. M., 2013. Effects of Tribulus terrestris ethanolic extract in male rats and cocks fertility. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical*

Kharabaf S., Zeinali S., Mohammadirad A., Amini S., Larijani B., 2010. Effects of Satureja khuzestanica on serum glucose, lipids and markers of oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus: a double-blind randomized controlled trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7(4):465-470.

35. Ward G.E., Brokaw C.J., Garbers, D.L., Vacquier, V.D. 1985. Chemotaxis of Arbacia punctulata spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. *The Journal of cell biology*, 101(6): 2324-2329.

36. Wiesner B., Weiner J., Middendorff R., Hagen V., Kaupp U.B., Weyand I., (1998). Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca2+ entry into sperm. The Journal of cell biology, 142(2): 473-484.

37. Ye N., Lv Z., Dai H., Huang, Z., Shi, F., 2021. Dietary alpha-lipoic acid supplementation improves spermatogenesis and semen quality via antioxidant and anti-apoptotic effects in aged breeder roosters. *Theriogenology*, 159:20-27.

38. Zegura B., Dobnik D., Niderl M.H., Filipic M., 2011. Antioxidant and antigenotoxic effects of rosemary *(Rosmarinus officinalis L.)* extracts in Salmonella typhimurium TA98 and HepG2 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32(2):296–303.

Animals, 48(2): 345-352.

29. Sharawy S.M., Saleh N.H., Attalah S.A., Absy G.M., Doaa H.K. 2015. Effect of plant extract of Tribulus terrestris and probiotics on the reproductive performance, total cholesterol and testosterone hormone levels of rams. *MENA Science Journal*, 1: 14-19.

30. Shariatmadari F., Sharaf M., Torshizi M.A.K., 2020. Amelioration effects of n-3, n-6 sources of fatty acids and rosemary leaves powder on the semen parameters, reproductive hormones, and fatty acid analysis of sperm in aged Ross broiler breeder roosters. *Poultry science*, 99(2): 708-718.

31. Sharideh H., Zhandi M., Zenioaldini S., Zaghari M., Sadeghi, M., 2019. The effect of coenzyme Q10 on rooster semen preservation in cooling condition. *Theriogenology*, 129:103-109.

32. Sharma, D.K., 2017. Enumerations on thytochemical and pharmacological properthes of *tribulus terrestris* linn: indian viagra. Asian Journal of Science and Technologies. 11(8):6462-6467.

33. Vizcarra, J. A., Kirby, J. D., Kreider, D. L. (2010). Testis development and gonadotropin secretion in broiler breeder males. *Poultry science*, 89(2):328-334.

34. Vosough-Ghanbari S., Rahimi R.,

Effect of Tribulus terrestris Extract on Sperm Motility, Testosterone Concentration and Relative Expression of Catsper Gene in Older Male Broiler Breeder

Elham Pirmoradi[1], Ramin Hajikhani[1,*], Saleh Tabatabai Vakili[2], Maryam Khosravi[1], Ali Aghaei[2]

1 Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2 Associate Professor and Assistant Professor, Department of Animal Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of adding thistle extract to the basal diet on sperm motility and the relative expression of Catsper gene in the testes of older broilers due to the role of this gene in normal sperm motility. A total of 50 Ross 308 broiler roosters at 47 weeks of age were randomly assigned to five groups (n = 10) and were daily feed with a basic diet containing different levels of Tribulus terrestris including: 1) 0 mg of Tribulus terrestris (control), 2) 5 mg of Tribulus terrestris (Kh-5mg), 3) 10 mg of Tribulus terrestris (Kh-10mg), 4) 15 mg of Tribulus terrestris (Kh-15mg), and 5) 20 mg of Tribulus terrestris (Kh-20mg) per kg of body weight for 13 weeks. All roosters were weekly sampled to assess motility of sperm. At the end of the experiment, in order to measure testosterone concentration and evaluate the expression of Catsper gene, seven roosters were randomly slaughtered from each treatment and their testes were sampled. Results showed that Tribulus terrestris feeding improved total sperm motility in Kh-5, Kh-10, Kh-15 and Kh-20 groups by about 6, 4, 3 and 5%, respectively, compared to the control group ($P<0.05$). Plasma testosterone concentrations were not statistically significant between treatments ($P <0.05$). Relative expression of Catsper gene in roosters receiving 5 mg level of Tribulus terrestris tended to increase compared to the control group ($P = 0.09$); however, at doses of 10 and 15 mg of Tribulus terrestris extract showed a significant difference ($P <0.05$). But with a dose of 20 mg of thistle extract did not show a significant difference ($P<0.05$). In summary, in this study, feeding thistle extract at the level of 5 mg increased sperm motility and expression of Catsper gene (one of the genes responsible for sperm motility).

Keywords: Sperm, Testis, Gene, Rooster, Tribulus Terrestris