

بررسی الگوی بیان نسبی ژن‌های GnRH، FSH و LH در دو بازه زمانی متعاقب پیک تولید تخم‌مرغ در مرغ تخم‌گذار

Study of the relative expression pattern of GnRH, FSH, and LH genes in two-time intervals following the peak of egg production in laying hens

زهرا محمدی^۱، امجد فرزین‌پور^{*۲}، رضا علی‌بخشی^۳

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی

۲- دانشیار، دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی

۳- استاد، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی

Zahra Mohammadi¹, Amjad Farzinpour^{*2}, Reza Alibakhshi³

1- PhD, University of Kurdistan, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science

2- Associate Professor, University of Kurdistan, Faculty of Agriculture, Department of Animal Sciences

3- Professor, Kermanshah University of Medical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Department of Clinical Biochemistry

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: amjadfarzinpour@uok.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۲۳)

چکیده

از لحاظ مدیریت پرورش در مرغ‌های تخم‌گذار، تولید تخم‌مرغ پس از رسیدن به اوج تولید، به تدریج کاهش می‌یابد. این پدیده، می‌تواند ناشی از تغییرات در بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG) باشد. در مطالعه حاضر، پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های تولیدمثلی طراحی شدند و بیان ژن‌های هدف در اوج تولید تخم‌مرغ و پس از اوج تولید تخم‌مرغ (۳۵ و ۵۱ هفته) در مرغ‌های تخم‌گذار مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های هدف از پایگاه‌های داده ژنومی استخراج شدند. پرایمرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی طراحی و ویژگی‌های آن‌ها از جمله دمای ذوب، طول محصول و بازده تکثیر مورد بررسی قرار گرفت. سپس، RNA کل از بافت‌های هدف (هیپوتالاموس و هیپوفیز) استخراج شد و پس از بررسی کیفیت و کمیت، cDNA سنتز شد. بیان ژن‌های هدف با استفاده از تکنیک Real-Time PCR و با به کارگیری پرایمرهای طراحی‌شده، در دو بازه زمانی مختلف پس از اوج تولید تخم‌مرغ ارزیابی شد. داده‌های خام حاصل با روش $\Delta\Delta Ct$ نرمال‌سازی و تحلیل شدند. در نهایت، نتایج نشان داد که پرایمرهای طراحی‌شده برای شناسایی و ارزیابی ژن‌های GnRH، FSH و LH از اختصاصیت و بازده مناسبی برخوردار بودند. همچنین، الگوهای بیان ژن‌های مورد مطالعه در دو بازه زمانی مورد بررسی تفاوت‌های معنی‌داری را نشان دادند که می‌تواند به تغییرات فیزیولوژیکی مرتبط با کاهش تولید تخم‌مرغ پس از اوج تولید مرتبط باشد ($P < 0.05$). این مطالعه نشان داد که طراحی پرایمرهای اختصاصی و استفاده از تکنیک Real-Time PCR ابزارهای قدرتمندی برای بررسی بیان ژن‌های تولیدمثلی در مرغ‌های تخم‌گذار هستند. تغییرات مشاهده‌شده در بیان این ژن‌ها پس از اوج تولید تخم‌مرغ می‌تواند به عنوان مبنایی برای مطالعات آینده در جهت بهبود عملکرد تولیدمثل در مرغ‌های تخم‌گذار مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

پیری
مرغ تخم‌گذار
بیان ژن
تولید تخم‌مرغ
GnRH

تخم‌مرغ یکی از مقرون به صرفه‌ترین منابع پروتئین حیوانی است که در دسترس اکثر مردم جهان است. بنابراین، تعجب آور نیست که تعداد گله‌های تخمگذار در جهان به سرعت در حال افزایش است. امروزه اولویت افزایش تولید تخم با افزایش عمر مفید تخمگذاری و پایداری در کیفیت تخم است، به‌طوری که طول دوره تخمگذاری در گله‌های تجاری به ۹۰ تا ۱۰۰ هفته یا بیشتر افزایش یافته‌است. اوج تولید مرغ‌های تخمگذار در سن ۲۷ تا ۲۹ هفتگی است و پس از آن به تدریج در اواخر پیک تولید کاهش می‌یابد. طبق مشاهدات انجام‌شده، پیری با از دست دادن تدریجی عملکرد تولیدی و کاهش تولید در پرورش‌دهندگان طیور همراه است (Wu et al. 2010; Veldhuis 2013; Rosner et al. 2013). اختلالات مرتبط با سن در پرندگان تخمگذار شامل درصد پایین‌تر تولید تخمک، آترزی فولیکولی، میزان کمتر رشد فولیکولی، کاهش اندازه کلاچ^۱، پوسته تخم‌مرغ نازک‌تر و درصد بالاتری از تخم‌مرغ‌های ترک‌خورده می‌باشد (Grossman et al. 2000; Mohammadi et al. 2018; Ma et al. 2025). به‌طوری که مطالعات نشان داده‌اند، همزمان با کاهش رشد فولیکولی در مرغ‌های تخمگذار مسن، از تولید و کیفیت تخم‌مرغ کاسته می‌شود (Hansen et al. 2003; Mohammadi et al. 2018; Ma et al. 2025).

این موارد از نگرانی‌های اصلی در اواخر دوره تخمگذاری هستند که منجر به زیان‌های اقتصادی عمده در صنعت طیور می‌شوند (Molnár et al. 2016). تغییرات هورمون‌های جنسی ناشی از افزایش سن یا پیری، شامل استروژن، تستوسترون، هورمون لوتئینی (LH) و هورمون محرک فولیکولی (FSH)، در کنار عوامل محیطی مانند دما، تغذیه، داروها، بیماری‌ها، از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر باروری، اسپرمتوزن، تخمک‌گذاری و در نهایت عملکرد تولیدمثل هستند (Ng and Hazrati 2022). از سوی دیگر، با افزایش سن، عملکرد فیزیولوژیکی سیستم غدد درون‌ریز و رفتارهای تولیدمثلی مانند تمایلات جنسی و قدرت جفتگیری کاهش می‌یابد، که این امر منجر به ناباروری در انسان و حیوانات و همچنین، کاهش تولید در دام و طیور می‌شود (Lebedeva et

al. 2010; De Loof et al. 2016; Wojnarowski et al. 2021; Assersohn et al. 2021; Wu et al. 2023). هورمون آزادکننده گنادوتروپین‌ها (GnRH)، مولکولی تنظیم‌کننده کلیدی در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز است که رونویسی LH و FSH در هیپوفیز را القا می‌کند. در واقع، عملکرد تولیدمثلی در مغز از طریق محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-غدد جنسی تنظیم می‌شود (Stamatiades et al. 2019). در قسمت برجستگی میانی، هورمون GnRH به عروق خونی باب^۲ هیپوفیز ترشح می‌شود و به هیپوفیز قدامی منتقل می‌شود. در هیپوفیز قدامی، نوروهورمون GnRH بر سلول‌های گنادوتروپ اثر می‌گذارد و با کمک سایر هورمون‌ها از جمله استروئیدهای جنسی، ترشح گنادوتروپین‌ها یعنی LH و FSH را تنظیم می‌کند (Constantin et al. 2022). گنادوتروپین‌ها از طریق خون به غدد جنسی (تخمدان‌ها و بیضه‌ها) می‌رسند و در آنجا موجب تنظیم رشد فولیکول‌ها، تخمک‌گذاری در ماده‌ها، اسپرمتوزن و بلوغ اسپرم در جنس نر می‌شوند (Casarini et al. 2016; Orisaka et al. 2021; Casarini et al. 2022).

به‌طور کلی هورمون‌های سه‌گانه GnRH، FSH و LH اصلی‌ترین عوامل تنظیم‌کننده فعالیت تولیدمثلی محسوب می‌شوند که در اواخر دوره تولید مرغ‌های تخمگذار، میزان بیان آن‌ها تعیین‌کننده درصد تولید تخم‌مرغ است. سطح بیان ژن‌های مرتبط با تولید و عملکرد این هورمون‌ها در مرغ‌های مسن‌تر (به‌ویژه بعد از اوج تولید) ارتباط تنگاتنگی با نرخ افت تولید تخم‌مرغ دارد. به عبارت دیگر، کاهش در بیان و کارایی این هورمون‌ها یکی از دلایل فیزیولوژیک کلیدی کاهش درصد تخم‌گذاری در پایان چرخه تولیدی مرغ است (Miao et al. 2024). کاهش بیان ژن‌ها با افزایش سن نتیجه تعامل پیچیده‌ای از عوامل سلولی و مولکولی است شامل آسیب تجمعی DNA، استرس اکسیداتیو و تخریب مولکول‌های حیاتی، تغییرات اپی‌ژنتیک (هیپرمیتلاسیون و تغییرات هیستونی)، اختلال در فاکتورهای رونویسی، پیری سلولی و ترشح فاکتورهای التهابی می‌باشد. درک دقیق این نوسانات ژنی، پتانسیل بالایی به‌عنوان پایه‌ای برای پژوهش‌های آینده دارد که هدف نهایی آن‌ها بهبود راندمان تولیدمثل و طولانی‌تر کردن دوره بهره‌وری اقتصادی گله‌های تخمگذار است (Davalli et al. 2016; Guo et

² Hypothalamic-Pituitary Portal System

¹ Clutch size

شدند. پس از کشتار مرغ‌های تخم‌گذار از هر گروه در سن ۳۵ و ۵۱ هفته، نمونه‌های سر به سرعت جدا شده و با استفاده از دما بان به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند تا زمان انجام آزمایش نگهداری شوند. در طول انجام آزمایش، نمونه‌ها با دما بان به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر علی بخشی منتقل شدند و فرآیند استخراج RNA کل از غده هیپوتالاموس و هیپوفیز، مطابق با دستورالعمل مندرج در کیت استخراج بافت حیوانی شرکت دنازیست آسیا انجام شد (Christou ET AL, 2014). برای هر کدام از نمونه‌ها ۳ بار استخراج RNA انجام دادیم و پس از انجام فرآیند استخراج کیفیت و کمیت RNA های به دست آمده با استفاده از دستگاه نانودراپ شرکت MAESTRO و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی شد (O'Neill et al, 2011). سپس، از بین ۳ نمونه RNA استخراج شده، یک نمونه برای سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت پارس توس و بر اساس دستورالعمل آزمایشگاهی ارائه شده توسط این شرکت انجام شد. پس از اتمام فرآیند سنتز و اندازه‌گیری کمیت و کیفیت cDNA تولید شده با دستگاه نانودراپ و الکتروفورز، از یک میکرولیتر RNA و یک میکرولیتر cDNA استفاده شد تا اطمینان حاصل شود که مقادیر دقیق و استاندارد برای مراحل بعدی آزمایش‌ها در نظر گرفته شده‌اند. پرایمرهای ژن‌های GnRH, FSH و LH با استفاده از نرم‌افزارهای Primer3Plus و Oligo7 طراحی شدند که در جدول ۱ آورده شده‌اند. ژن β -actin به عنوان ژن رفرنس در نظر گرفته شد و سنتز پرایمرها توسط شرکت سیناکلون انجام شد. پس از سنتز cDNA، از هر نمونه cDNA سنتز شده، سه نمونه برای ۳ ژن هدف (GnRH, FSH و LH) با ۳ تکرار استفاده شد و به منظور تکثیر قطعه هدف و ارزیابی کمی بیان ژن‌ها واکنش Real-time PCR با استفاده از دستگاه ABI مدل Step One Plus انجام شد. لازم به ذکر است که برای بررسی احتمال وجود آلودگی از کنترل منفی استفاده شد. بدین اینگونه که تعداد ۶ چاهک خالی در هر ران دستگاه جهت کنترل منفی و ۳ چاهک خالی با حضور تمامی ترکیبات بدون وجود ژن هدف انجام شد. برنامه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، واسرشت سازی با دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲ درجه

al. 2022; Tan et al. 2021; Soto-Palma et al. 2022; Xin et al. 2024). با توجه به توضیحات بیان شده، مشخص می‌شود که الگوهای بیان ژن‌های کلیدی در مرغ‌های تخم‌گذار، به ویژه پس از رسیدن به اوج تولید تخم مرغ، دستخوش تغییرات معناداری می‌شود. این تغییرات تنها بازتابی از فرآیندهای زیستی طبیعی نیستند، بلکه می‌توانند پنجره‌ای به سوی مکانیسم‌های تنظیم کننده کاهش تدریجی باروری در مرغ‌ها باشند. درک دقیق این نوسانات ژنی، پتانسیل بالایی به عنوان پایه‌ای برای پژوهش‌های آینده دارد که هدف نهایی آن‌ها بهبود راندمان تولیدمثل و طولانی‌تر کردن دوره بهره‌وری اقتصادی گله‌های تخم‌گذار است (Tan et al. 2021; Xin et al. 2024). بنابراین هدف از انجام این تحقیق، طراحی پرایمرهای مناسب برای شناسایی ژن‌های GnRH, FSH و LH در بافت مغز مرغ‌های تخم‌گذار (هیپوتالاموس و هیپوفیز) و بررسی میزان بیان این ژن‌ها در سیستم عصبی مرکزی مرغ‌های تخم‌گذار مسن در اوج تولید تخم مرغ و پس از اوج تولید تخم مرغ (۳۵ و ۵۱ هفته) بود تا نشان دهیم با افزایش سن میزان بیان ژن‌های GnRH, FSH و LH کاهش می‌یابد که می‌تواند با کاهش تولید تخم مرغ پس از اوج تولید مرتبط باشد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر، در پاییز سال ۱۴۰۲ در سالن پرورش مرغ تخم‌گذار صنعتی شهرک صنعتی بیستون، واقع در استان کرمانشاه، انجام گرفت. برای اجرای این آزمایش، از تعداد ۳۶ قطعه مرغ تخم‌گذار از نژاد های-لاین سویه W-36 (۱۸ قطعه مرغ تخم‌گذار برای هر گروه سنی) با شش تکرار و سه پرنده در هر تکرار (قفس) در قالب یک طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. برنامه نوردهی شامل ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. درجه حرارت محیط بصورت شبانه‌روزی کنترل می‌شد و تمامی مرغ‌ها به صورت آزاد به آب آشامیدنی و غذا دسترسی داشتند. جیره‌های آزمایشی بر پایه مواد خوراکی مانند ذرت و کنجاله سویا و با توجه به احتیاجات غذایی توصیه شده در (NRC 1994) برای مرغ‌های تخم‌گذار تنظیم شدند. این جیره‌ها همگی دارای انرژی قابل متابولیسم (۲۸۰۰ کیلوکالری بر کیلوگرم) و پروتئین خام یکسان (۱۴ درصد) بودند و با استفاده از نرم‌افزار UFFDA تنظیم

الکتروفورز شدند و تطابق کامل طول قطعات تکثیرشده با اطلاعات ارائه‌شده توسط شرکت سازنده پرایمرها تأیید شد (شکل ۱).

پس از جمع‌آوری داده‌ها به روش RT-qPCR، آنالیز به کمک نرم‌افزارهای REST 2009، Graphpad Prism v8.0 و SPSS v26 انجام شد (جدول ۲، ۳ و شکل ۲). طبق آنالیز انجام شده با نرم‌افزار REST 2009 که محاسبه آن بر اساس fold change است، بیان GnRH در هیپوتالاموس در سن ۵۱ هفتگی نسبت به سن ۳۵ هفتگی با کاهش ۱/۱۸ برابری همراه بود، به‌طوری‌که این مقدار کاهش بیان GnRH در دو سن مورد مطالعه معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). کاهش بیان ژن LH در غده هیپوفیز در سن ۵۱ هفتگی نسبت به ۳۵ هفتگی با میزان ۱/۳۳ مشاهده شد به نحوی که برطبق آنالیزهای آماری نیز معنی‌داری را بیان داشت ($P < 0.05$). بیان ژن FSH نیز از این قاعده مستثنی نبوده و در سن ۵۱ هفتگی ۱/۴۸ برابر کاهش نسبت به ۳۵ هفتگی را نشان داد ($P < 0.05$).

به مدت ۳۰ ثانیه، بسط نهایی با دمای ۷۲ به مدت ۲ دقیقه برای تهیه نمودار ذوب می‌باشد. پس از دریافت داده‌ها به روش RT-qPCR با کمک نرم‌افزارهای REST 2009، Graphpad Prism v8.0 و SPSS v26 آنالیز داده‌ها انجام شد تا میزان بیان ژن‌های موردنظر به صورت کمی ارزیابی شود. تغییرات میزان بیان ژن‌های مورد با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Livak and Schmittgen 2001; Reddy et al. 2012; Wagner 2013).

$$\text{Fold Change} = 2^{-(\text{Control Target Gene Ct} - \text{Control BActin Ct}) - (\text{Target Gene Ct} - \text{Target BActin Ct})}$$

نتایج

پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، به منظور ارزیابی سطح بیان ژن‌های GnRH، LH، FSH و Beta Actin (به عنوان کنترل داخلی)، واکنش RT-qPCR انجام گردید. این آزمایش با حداقل سه تکرار برای ژن‌های هدف GnRH، LH، FSH و سه تکرار برای ژن کنترل داخلی بتا اکتین طراحی شد. جهت تأیید نتایج، محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز یک درصد (۱٪)

جدول ۱- توالی و خصوصیات آغازگرهای رفت و برگشت مورد استفاده در واکنش PCR

ژن‌ها	توالی پرایمرها	اندازه محصول	دمای اتصال	شماره دسترسی GenBank
ژن‌های GnRH	F: 5'-ATTTTCCAGCGGGAAGAGTTG-3' R: 5'-TGGGTTTGTGATGGTGTGTG-3'	۳۵۰	۶۱	NC_052553.1
ژن‌های LH	F: 5'-GCTGATCTTAATGCTCAACG-3' R: 5'-TTGGCAATCTTGGTGTCTTTAT-3'	۱۲۰	۶۰	NM_204936.1
ژن‌های FSH	F: 5'-TCAGCAGCTACATGAAGGT-3' R: 5'-AAGGCAAGTACATTCAACACTA-3'	۱۰۳	۶۰	NM_205079.1
ژن β-actin	F: 5'-ACGTCGCACTGGATTTTCGAG-3' R: 5'-TGTCAGCAATGCCAGGGTAC-3'	۲۸۲	۶۰	NM_205518.1

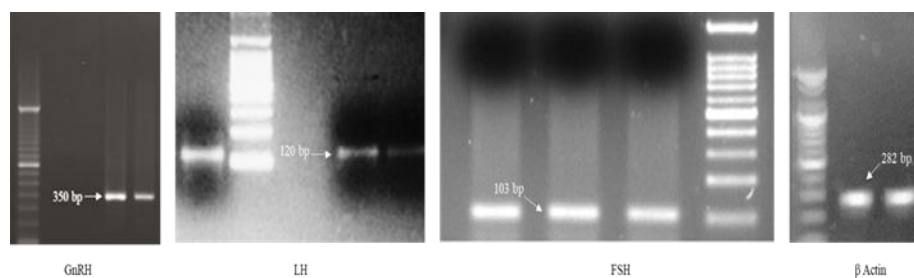
جدول ۲- نسبت بیان ژن‌های GnRH، LH و FSH در سن ۳۵ هفتگی نسبت به سن ۵۱ هفتگی در مرغان تخمگذار

پارامترهای بیان ژن	سن	
	۳۵ هفتگی	۵۱ هفتگی
GnRH	۱°	-۱/۱۸°
LH	۱°	-۱/۳۳°
FSH	۱°	-۱/۴۸°

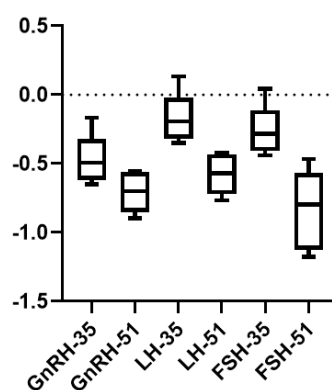
* معنی‌داری در سطح ۰.۰۵٪

جدول ۳- میانگین و انحراف استاندارد ΔCt نمونه‌ها

ژن FSH		ژن LH		ژن GnRH		سن (هفته)
خطای استاندارد میانگین (SEM)	انحراف استاندارد (SD)	خطای استاندارد میانگین (SEM)	انحراف استاندارد (SD)	خطای استاندارد میانگین (SEM)	انحراف استاندارد (SD)	
۰/۰۷۵	۰/۱۸۳۵	۰/۰۷۵	۰/۱۸۳۵	۰/۰۷۵	۰/۱۸۳۵	۳۵
۰/۱۱۶۱	۰/۲۸۴۴	۰/۰۶۳	۰/۱۵۴۹	۰/۰۶۳	۰/۱۵۴۳	۵۱



شکل ۱- تصویر محصولات بر روی ژل آگارز



شکل ۲- مقایسه سطح بیان ژنهای GnRH, LH و FSH با استفاده از نرم‌افزار Graphpad

بحث

پژوهش حاضر، به بررسی تأثیر پیری و تغییرات سنی بر عملکرد تولیدمثلی و هورمونی در مرغ‌های تخم‌گذار پرداخته است. همان‌طور که اشاره شد، پیری با کاهش عملکرد دستگاه تولیدمثل همراه است و این کاهش به‌ویژه در غدد جنسی و ترشح هورمون‌های مرتبط با تولیدمثل مشهود است. در پرندگان ماده، فرآیند پیری تولیدمثلی با تغییر از چرخه‌های منظم به نامنظم و در نهایت توقف تولید تخم مشخص می‌شود. این تغییرات با کاهش سطح هورمون‌هایی مانند استرادیول و تغییر در نسبت هورمون‌های FSH و LH همراه است. در این مطالعه، تغییرات

بیان ژن‌های مرتبط با هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) و هورمون‌های FSH و LH در سنین ۳۵ و ۵۱ هفتگی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزایش سن باعث کاهش بیان این ژن‌ها می‌شود، بطوریکه بالاترین سطح بیان ژن‌ها در سن ۳۵ هفتگی و کمترین سطح در سن ۵۱ هفتگی مشاهده شد. این یافته‌ها تأیید می‌کنند که پیری و تغییرات سنی می‌توانند با تأثیر بر عملکرد غدد نورواندوکرین (سیستم عصبی-هورمونی)، منجر به تغییر در بیان ژن‌های مرتبط با تولیدمثل و در نتیجه کاهش ترشح هورمون‌های تولیدمثلی شوند. این نتایج با مطالعات قبلی که کاهش سطح هورمون‌های تولیدمثلی مانند استرادیول، LH و FSH

را در حیوانات مسن گزارش کرده‌اند، همخوانی دارد. همچنین، این یافته‌ها نشان می‌دهند که تغییرات سنی می‌توانند بر عملکرد تولیدمثلی و تولیدی مرغ‌های تخم‌گذار تأثیر منفی بگذارند. پیری با کاهش تدریجی عملکرد سلولی همراه است که بخش عمده‌ای از آن ناشی از اختلال در بیان ژن‌هاست. این فرآیند پیچیده تحت تأثیر چندین مکانیسم سلولی و مولکولی قرار دارد. در این بین، عوامل کلیدی شامل آسیب DNA، استرس اکسیداتیو، تغییرات اپی‌ژنتیک، اختلال در فاکتورهای رونویسی تأثیرگذار هستند (Wei et al. 2009; Davalli et al. 2016; Shavlakadze et al. 2019; Guo et al. 2022). به‌طوری‌که با افزایش سن، تجمع آسیب‌های DNA در ژن‌ها باعث اختلال در رونویسی و کاهش بیان آن‌ها می‌شود. این پدیده در سلول‌های با تقسیم محدود (مانند نورون‌ها) بارزتر است، چرا که مکانیسم‌های ترمیم DNA در این سلول‌ها کارایی کمتری دارند. همچنین گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)¹ مانند سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل به‌طور مداوم در میتوکندری تولید می‌شوند. با افزایش سن، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز) منجر به تجمع گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که گونه‌های فعال اکسیژن به‌طور مستقیم به DNA حمله کرده و باعث شکست‌های رشته‌ای، جهش‌ها و تغییر در ساختار نوکلئوتیدی می‌شود که نتیجه آن اختلال در رونویسی ژن‌هاست (Gil del Valle et al. 2015; Hemagiri et al. 2022). استرس اکسیداتیو فعالیت فاکتورهای رونویسی حیاتی مانند FOXO3 و p53 را مختل می‌کند. به‌طور ویژه FOXO3 که مسئول فعال‌سازی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی (مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز) است، تحت شرایط استرس اکسیداتیوی مزمن مهار می‌شود. p53 در پاسخ به آسیب DNA، چرخه سلولی را متوقف می‌کند، اما فعالیت طولانی‌مدت آن منجر به پیری سلولی و کاهش بیان ژن‌ها می‌شود (Miyaguchi et al. 2009; Liu and Xu 2011; Rodriguez-Colman, 2024). همچنین با افزایش سن، الگوهای متیلاسیون DNA در نواحی پرموتوری ژن‌ها تغییر می‌کند. هایپرمتیلاسیون این نواحی باعث فشرده‌سازی کروماتین

(هتروکروماتین) و ممانعت از دسترسی فاکتورهای رونویسی به DNA می‌شود (Cencioni et al. 2013). استفاده از این اطلاعات می‌تواند به بهبود مدیریت تولید مرغ‌های مسن و افزایش بهره‌وری در صنعت پرورش طیور کمک کند. بطور خلاصه، این پژوهش نشان می‌دهد که پیری با تغییر در بیان ژن‌های مرتبط با هورمون‌های تولیدمثلی و کاهش ترشح این هورمون‌ها همراه است، که این تغییرات می‌تواند به کاهش عملکرد تولیدمثلی و تولیدی در مرغ‌های تخم‌گذار منجر شوند. این یافته‌ها می‌تواند در طراحی استراتژی‌های مدیریتی برای بهبود عملکرد تولیدی در حیوانات مسن مورد استفاده قرار گیرند. در پژوهشی، اثر پودر میوه گیاه پنج‌انگشت (*Vitex Agnus Castus*) بر بیان ژن‌های GnRH و LH در مرغان تخم‌گذار پیر بررسی شد. نتایج نشان داد که افزودن ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت به جیره، منجر به افزایش بیان ژن GnRH نسبت به تیمار شاهد شد. همچنین، نتایج نشان داد که افزودن پودر میوه گیاه پنج‌انگشت تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن LH نداشت (Sabahi et al. 2020). در مطالعه‌ای دیگر، ثابت شد که استفاده از دوز ۴۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم جنسیتین در پرندگان، موجب افزایش بیان ژن GnRH، بهبود سطح استروژن خون و همچنین افزایش نرخ تخم‌گذاری در مرغ‌های مبتلا به سندرم کبد چرب می‌شود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که جنسیتین با تأثیرگذاری بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز، نه تنها ترشح هورمون‌های مرتبط با تولیدمثل را تنظیم می‌کند، بلکه می‌تواند به‌عنوان یک راهکار درمانی برای بهبود عملکرد تخمدان در شرایط پاتولوژیک مانند کبد چرب مورد توجه قرار گیرد (Lv et al. 2018). در پژوهش دیگری گزارش شده است که افزایش سن با تغییرات چشمگیری در ترشح گنادوتروپین مرتبط است. نتایج به‌دست‌آمده از هیبریداسیون کمی در محل در چندین پژوهش نشان داد که بیان ژن GnRH در طول فرآیند پیری در موش‌های صحرایی نر و ماده کاهش می‌یابد. به‌طوری‌که این پیامد منفی در حیوانات ماده (۲۰٪) بیشتر از نر (۱۳٪) بود. این نتایج نشان می‌دهد که در موش‌های صحرایی، پیری با کاهش سنتز و آزادسازی GnRH همراه است (Gruenewald and Matsumoto 1991; Wise and Ratner 1991). در پژوهشی که بر روی بلدرچین‌های

¹ Reactive Oxygen Species

هفتگی، کاهش قابل توجهی در بیان ژنهای GnRH, FSH و LH مشاهده شد. این کاهش بیان ژن‌ها با کاهش عملکرد تولیدمثلی و کاهش تولید تخم در مرغ‌های مسن مرتبط است. این تغییرات احتمالاً ناشی از کاهش عملکرد غدد نورواندوکرین و تغییرات فیزیولوژیکی مرتبط با پیری است، که منجر به کاهش ترشح هورمون‌های تولیدمثلی و در نتیجه کاهش تولید تخم می‌شود (Liu et al. 2001; Bovera et al. 2014; Miao et al. 2024).

باتوجه به نتایج این پژوهش، برای تحقیقات آینده بررسی تغییرات بیان ژنهای GnRH, FSH و LH در طول دوره تولید، از سنین جوانی تا پیری، می‌تواند به درک بهتر از دینامیک تغییرات هورمونی و تولیدمثلی در مرغ‌های تخم‌گذار کمک کند. این بررسی می‌تواند شامل سنین قبل از اوج تولید (به‌عنوان مثال، ۲۰ تا ۳۰ هفتگی)، اوج تولید (۳۵ هفتگی) و سنین پس از اوج تولید (۴۰ تا ۶۰ هفتگی) باشد. همچنین بررسی مکانیسم‌های مولکولی که منجر به کاهش بیان ژنهای GnRH, FSH و LH با افزایش سن می‌شوند، می‌تواند به شناسایی عوامل کلیدی درگیر در پیری تولیدمثلی و کاهش تولید کمک کند. این مطالعات می‌توانند شامل بررسی تغییرات اپی‌ژنتیکی، استرس اکسیداتیو و سایر عوامل مؤثر بر بیان ژن‌ها باشند. از سوی دیگر، تأثیر عوامل مدیریتی مانند تغذیه، شرایط محیطی و استرس بر بیان ژنهای GnRH, FSH و LH می‌تواند به توسعه استراتژی‌هایی برای بهبود عملکرد تولیدی در مرغ‌های مسن کمک کند. به عنوان مثال، استفاده از مکمل‌های غذایی یا بهبود شرایط محیطی ممکن است بتواند کاهش بیان ژن‌ها را به تأخیر انداخته یا کاهش دهد. در نهایت، مقایسه بیان ژنهای GnRH, FSH و LH در نژادهای مختلف مرغ‌های تخم‌گذار می‌تواند به شناسایی نژادهایی که مقاومت بیشتری به کاهش تولید با افزایش سن دارند، کمک کند. این اطلاعات می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی برای بهبود عملکرد تولیدی در مرغ‌های مسن مورد استفاده قرار گیرد.

تضاد منافع

نویسنده اعلام می‌دارد که هیچ تضاد منافی در رابطه با نویسندگی و یا انتشار این مقاله ندارد.

نر و ماده پیر انجام شد، مشخص شد که با کاهش بیان mRNA LH و FSH در هیپوفیز، عملکرد غدد درون‌ریز کاهش می‌یابد. این کاهش منجر به کیفیت پایین مایع منی، غلظت پایین تستوسترون پلاسما، پس‌رفت بیضه و باروری پایین در هر دو جنس می‌شود (Ottinger et al. 2004). بر اساس پژوهش‌های دیگری که بر روی موش‌های نر و ماده پیر انجام شد، کاهش فعالیت سیستم عصبی مرکزی، هیپوفیز قدامی و غدد جنسی ممکن است به پیری سیستم تولیدمثل کمک کند. در ناحیه پری‌اِپتیک و هیپوتالاموس، تغییراتی در غلظت هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) گزارش شده است. بطوریکه نتایج این مطالعات نشان داد در موش‌های نر پیر، محتوای GnRH در ناحیه پری‌اِپتیک و همچنین برجستگی میانی کاهش می‌یابد. همچنین، غلظت کمتری از GnRH در هیپوتالاموس حیوانات ماده پیر در مقایسه با غلظت‌های اندازه‌گیری‌شده در ماده‌های جوان گزارش شد (Wise and Ratner, 1980; Dorsa et al., 1984).

به‌طور کلی، نتایج مطالعات نشان می‌دهد که کاهش پاسخ هیپوفیز به GnRH با افزایش سن رخ می‌دهد و احتمالاً به کاهش کلی ترشح گنادوتروپین با افزایش سن منجر می‌شود. این یافته‌ها، با تأکید بر اینکه عملکرد هیپوفیز با افزایش سن کاهش می‌یابد، به دانش فعلی در مورد پیری باروری می‌افزاید. اگرچه واضح است که تخمدان نقش اصلی را در از دست دادن عملکرد تولیدمثلی ایفا می‌کند، اما، نمی‌توان سهم بالقوه اجزای عصبی غدد درون‌ریز محور تولیدمثلی را بر عملکرد تولیدمثلی با افزایش سن نادیده گرفت (Dunaif 1986; Pagán et al. 2006; Sowers et al. 2008; Stephens and Johnson 2020; Tan et al. 2021).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر به وضوح نشان می‌دهد که پیری و تغییرات سنی تأثیر قابل توجهی بر بیان ژنهای کلیدی مرتبط با سیستم تولیدمثلی، یعنی GnRH, FSH و LH، در مرغ‌های تخم‌گذار دارند. در سن ۳۵ هفتگی، که معمولاً دوره اوج تولید تخم در مرغ‌های تخم‌گذار است، بیشترین میزان بیان این ژن‌ها مشاهده شد. این افزایش بیان ژن‌ها با عملکرد بهینه سیستم تولیدمثلی و ترشح هورمون‌های مرتبط همراه است، که به نوبه خود منجر به تولید تخم بیشتر و کیفیت بهتر تخم‌ها می‌شود. در مقابل، در سن ۵۱

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از مدیر مزرعه مرغ تخم‌گذار تجاری شهرک صنعتی بیستون، واقع در استان کرمانشاه به جهت همکاری در

تامین امکانات و پرندگان مورد نیاز آزمایش، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماید.

منابع

- Assersohn K, Brekke P, Hemmings N (2021). Physiological factors influencing female fertility in birds. *Royal Society Open Science* 8:202274.
- Bovera F, Iannaccone F, Piccolo G, Meo C D, Russo F, Piscitelli D, Nizza A (2014). Effect of group size on performance and egg quality of laying hens during 20 to 36 weeks of age. *Italian Journal of Animal Science* 13:3148.
- Casarini L, Brigante G, Simoni M, Santi D (2016). Clinical applications of gonadotropins in the female: assisted reproduction and beyond. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 143:85-119.
- Casarini L, Paradiso E, Lazzaretti C, D'Alessandro S, Roy N, Mascolo E, Simoni M (2022). Regulation of antral follicular growth by an interplay between gonadotropins and their receptors. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 39:893-904.
- Cencioni C, Spallotta F, Martelli F, Valente S, Mai A, Zeiher A M, Gaetano C (2013). Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 14:17643-17663.
- Christou A, Georgiadou E C, Filippou P, Manganaris G A, Fotopoulos V (2014). Establishment of a rapid, inexpensive protocol for extraction of high-quality RNA from small amounts of strawberry plant tissues and other recalcitrant fruit crops. *Gene* 537: 169-173.
- Constantin S, Bjelobaba I, Stojilkovic S S (2022). Pituitary gonadotroph-specific patterns of gene expression and hormone secretion. *Current Opinion in Pharmacology* 66:102274.
- Davalli P, Mitic T, Caporali A, Lauriola A, D'Arca D (2016). ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016:3565127.
- De Loof A, Schoofs L, Huybrechts R (2016). The endocrine system controlling sexual reproduction in animals: Part of the evolutionary ancient but well conserved immune system?. *General and Comparative Endocrinology* 226:56-71.
- Dorsa D M, Smith E R, Davidson J M (1984). Immunoreactive- β -endorphin and LHRH levels in the brains of aged male rats with impaired sex behavior. *Neurobiology of Aging* 5:115-120.
- Dunaif A (1986). Do androgens directly regulate gonadotropin secretion in the polycystic ovary syndrome?. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 63:215-221.
- Gil del Valle L, Gravier Hernández R, Delgado Roche L, León Fernández O S (2015). Oxidative stress in the aging process: fundamental aspects and new insights. In *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy* 2:177-219.
- Grossman M, Gossman T N, Koops A W (2000). A model for persistency of egg production. *Poultry Science* 79:1715-1724.
- Gruenewald D A, Matsumoto A M (1991). Age-related decreases in serum gonadotropin levels and gonadotropin-releasing hormone gene expression in the medial preoptic area of the male rat are dependent upon testicular feedback. *Endocrinology* 129:2442-2450.
- Guo J, Huang X, Dou L, Yan M, Shen T, Tang W, Li J (2022). Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7:391.
- Hansen K K, Kittok R J, Sarath G, Toombs C F, Caceres N, Beck, M M (2003). Estrogen receptor- α populations change with age in commercial laying hens. *Poultry Science* 82:1624-1629.
- Hemagiri M, Sasidharan S (2022). Biology of aging: Oxidative stress and RNA oxidation. *Molecular Biology Reports* 49:5089-5105.
- Lebedeva I Y, Lebedev V A, Grossmann R, Parvizi N (2010). Age-dependent role of steroids in the regulation of growth of the hen follicular wall. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8: 1-13.
- Liu D, Xu Y (2011). p53, oxidative stress, and aging. *Antioxidants and redox signaling* 15:1669-1678.
- Liu H K, Long D W, Bacon W L (2001). Preovulatory luteinizing hormone surge interval in old and young laying turkey hens early in the egg production period. *Poultry Science* 80: 1364-1370.
- 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* 25:402-408.
- Lv Z, Xing K, Li G, Liu D, Guo Y (2018). Dietary genistein alleviates lipid metabolism disorder and inflammatory response in laying hens with fatty liver syndrome. *Frontiers in Physiology* 9:1493.
- Ma Y, Lu L, Chen Q, Hua X, Zhang X, Zhao X, Liu X (2025). Comparison of laying performance and egg quality between peak and late laying phases in Korean quail. *Poultry Science* 105:262.
- Miao D Z, Liu C, Deng Z Y, Zhang C, Guo Z Y, Li W Q, Wang Z Y (2024). Characterization of reproductive hormones and related gene expression in the hypothalamus

- and pituitary gland in the egg-laying interval in White King pigeon. *Poultry Science* 103:103422.
- Miyaguchi Y, Tsuchiya K, Sakamoto K (2009). P53 negatively regulates the transcriptional activity of FOXO3a under oxidative stress. *Cell Biology International* 33:853-860.
- Mohammadi H, Ansari-Pirsaraei Z (2018). Follicle diameters, egg weight, and egg production performance in old laying hens injected with growth hormone and testosterone. *Journal of Agricultural Science and Technology* 949-959.
- Molnár A, Maertens L, Ampe B, Buyse J, Kempen I, Zoons J, Delezie E (2016). Changes in egg quality traits during the last phase of production: is there potential for an extended laying cycle?. *British Poultry Science* 57:842-847.
- Ng M, Hazrati L N (2022). Evidence of sex differences in cellular senescence. *Neurobiology of Aging* 120:88-104.
- O'Neill M, McPartlin J, Arthure K, Riedel S, McMillan N D (2011). Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the reference Qubit system. In *Journal of Physics: Conference Series*, IOP Publishing, 307:12047.
- Orisaka M, Miyazaki Y, Shirafuji A, Tamamura C, Tsuyoshi H, Tsang B K, Yoshida Y (2021). The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in follicle development: A mini-review. *Reproductive Medicine and Biology* 20:169-175.
- Ottinger M A, Abdelnabi M, Li Q, Chen K, Thompson N, Harada N, Panzica G C (2004) The Japanese quail: a model for studying reproductive aging of hypothalamic systems. *Experimental Gerontology* 39:1679-1693.
- Pagán Y L, Srouji S S, Jimenez Y, Emerson A, Gill S, and Hall J E (2006) Inverse relationship between luteinizing hormone and body mass index in polycystic ovarian syndrome: investigation of hypothalamic and pituitary contributions. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91:1309-1316.
- Reddy I J, David C G, Selvaraju S, Mondal S, Ravi Kiran G (2012). GnRH-1 mRNA, LH surges, steroid hormones, egg production, and intersequence pause days alter in birds exposed to longer wavelength of light in the later stages of production in *Gallus gallus domesticus*. *Tropical Animal Health and Production* 44:1311-1317.
- Rodriguez-Colman M J, Dansen T B, Burgering B M (2024). FOXO transcription factors as mediators of stress adaptation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 25:46-64.
- Rosner W, Hankinson S E, Sluss P M, Vesper H W, Wierman, M E (2013) Challenges to the measurement of estradiol: an endocrine society position statement. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98:1376-1387.
- Sabahi R, Nazari M, Taghi Beigi Nassiri M, Ghorbani M R (2020). The Effect of Vitex Agnuse Castus Fruit Powder on Hypothalamic GnRH Gene Expression in Laying Hens. *Research on Animal Production* 11:92-100. (In Farsi).
- Shavlakadze T, Morris M, Fang J, Wang S X, Zhu J, Zhou W, Glass D J (2019). Age-related gene expression signature in rats demonstrate early, late, and linear transcriptional changes from multiple tissues. *Cell Reports* 28:3263-3273.
- Soto-Palma C, Niedernhofer L J, Faulk C D, Dong X (2022). Epigenetics, DNA damage, and aging. *The Journal of Clinical Investigation* 132.
- Sowers M R, Zheng H, McConnell D, Nan B, Harlow S D, and Randolph Jr J F (2008) Estradiol rates of change in relation to the final menstrual period in a population-based cohort of women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93:3847-3852.
- Stamatiades G A, Carroll R S, Kaiser U B (2019). GnRH—a key regulator of FSH. *Endocrinology* 160: 57-67.
- Stephens C S, Johnson P A (2020). Reproductive physiology of poultry. In *Animal Agriculture*, Academic Press, 331-347.
- Tan Y G, Xu X L, Cao H Y, Zhou W, Yin Z Z (2021). Effect of age at first egg on reproduction performance and characterization of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in chickens. *Poultry Science* 100:101325.
- Veldhuis J D (2013) Changes in pituitary function with ageing and implications for patient care. *Nature Reviews Endocrinology* 9:205-215.
- Wagner E M (2013). Monitoring gene expression: quantitative real-time rt-PCR. *Lipoproteins and Cardiovascular Disease: Methods and Protocols* 19-45.
- Wei Y H, Wu S B, Ma Y S, Lee H C (2009). Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging. *Chang Gung Medical Journal* 32:113-132.
- Wise P M, Ratner A (1980) Effect of ovariectomy on plasma LH, FSH, estradiol, and progesterone and medial basal hypothalamic LHRH concentrations in old and young rats. *Neuroendocrinology* 30:15-19.
- Wise P M, Scarbrough K, Larson G H, Lloyd J M, Weiland N G, Chiu S (1991) Neuroendocrine influences on aging of the female reproductive system. *Frontiers in Neuroendocrinology* 12:323-356.
- Wojnarowski K, Podobiński P, Cholewińska P, Smoliński J, Dorobisz K (2021). Impact of estrogens present in environment on health and welfare of animals. *Animals* 11: 2152.
- Wu F C, Tajar A, Beynon J M, Pye S R, Silman A J, Finn J D, Huhtaniemi I T (2010) Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged and elderly men. *New England Journal of Medicine* 363:123-135.
- Wu T, Fu F, Cheng J, Li X, Zhou S, Xi Y, Du D (2023). The cellular and molecular mechanisms of ovarian aging. In *Ovarian Aging*, Singapore, Springer Nature Singapore, 119-169.
- Xin Q, Jiao H, Wang X, Zhao J, Liu M, Li H, Lin H (2024). Effect of energy level of pullet diet and age on laying performance and expression of hypothalamus-pituitary-gonadal related genes in laying hens. *Poultry Science* 103:103873.