

تأثیر لتروزول خوراکی بر غلظت گونادوتروپین‌های پلازما و برخی فراسنجه‌های بافت‌شناسی بیضه در خروس مادر گوشتی در ۴۰ هفتگی

عماد عبدالجبار علی^۱، مهدی زندی^{۲*}، آرمین توحیدی^۳، مجتبی زاغری^۳ و مهدی انصاری^۱
۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۱۰)

چکیده

در این پژوهش تأثیر لتروزول خوراکی بر غلظت LH و FSH پلازما و برخی فراسنجه‌های بافت‌شناسی بیضه خروس‌های گله مادر سوئی راس ۳۰۸ بررسی شد. بیست قطعه خروس با سن ۴۰ هفته به صورت تصادفی به چهار گروه یکسان تقسیم و در جایگاه (پن)‌های انفرادی توزیع شدند. تیمارهای آزمایشی شامل دزهای مختلف لتروزول (۰ (L0)، ۰/۵ (L0.5)، ۱ (L1) و ۱/۵ (L1.5) میلی‌گرم به ازای هر پرنده در روز) بوده که به مدت ۱۲ هفته به پرندگان خوراندند. خون‌گیری از پرندگان در هفته‌های اول، سوم، پنجم، هفتم و نهم و نمونه‌برداری از بافت بیضه در انتهای آزمایش (هفته دوازدهم) انجام شد. بنا بر نتایج، میزان FSH و LH پلاسمای خون، قطر و ضخامت بافت پوششی (اپیتلیوم) لوله اسپرم‌ساز و شمار یاخته‌های لایدیگ در گروه‌های تغذیه‌شده با لتروزول نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت و در بین گروه‌های آزمایشی نیز میزان FSH و LH به ترتیب در گروه‌های L1 (۱۱/۳۹±۰/۱۰ و ۰/۸±۰/۹۳) و L1.5 (۲/۹۳±۰/۰۸ و ۰/۲±۰/۹۵) بالاترین بود. شمار یاخته‌های اسپرماتوگونی در دو گروه L0.5 و L1 نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری بهبود یافت، اما شمار رگ‌های خونی تغییر معنی‌داری نداشت. به طور خلاصه، تجویز خوراکی لتروزول (۱ و ۱/۵ میلی‌گرم) توانست غلظت گونادوتروپین‌ها و برخی فراسنجه‌های بافت‌شناسی بیضه خروس‌های مادر گوشتی را بهبود دهد، اما برای تأیید این نتایج و تعمیم آن‌ها به باروری نهایی خروس‌ها به بررسی‌های بیشتری نیاز است.

واژه‌های کلیدی: اسپرماتوگونی، بافت‌شناسی بیضه، خروس، گونادوتروپین، لتروزول.

The effect of dietary Letrozole on plasma gonadotropin concentrations and some testicular histology parameters in 40 weeks old broiler breeder rooster

Emad Abdulgabar Ali¹, Mahdi Zhandi^{2*}, Armin Towhidi³, Mojtaba Zaghari³ and Mahdi Ansari¹

1, 2, 3. Ph. D. Candidate, Associate Professor and Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Apr. 22, 2017 - Accepted: May. 31, 2017)

ABSTRACT

The current study was carried out to evaluate the effect of Letrozole feeding on plasma LH and FSH concentrations and testicular histology in Ross 308 broiler breeder roosters. Twenty 40-week old roosters were randomly divided into four groups, individually housed and fed different levels of capsulated Letrozole including 0 (L0), 0.5 (L0.5), 1 (L1) or 1.5 (L1.5) mg/bird/day for 12 consecutive weeks. Blood sampling was done on 1th, 3th, 5th, 7th and 9th weeks of trail. Testicular histology was assessed on samples from last week (12th) of experiment. According to the results, plasma LH and FSH levels, seminiferous tubule diameter and epithelium thickness as well as Leydig cell numbers were significantly increased in Letrozole treated groups compared to control group. The highest concentration of FSH and LH were recorded for L1 (10.39 ±0.11 and 2.93±0.08) and L1.5 (9.5±0.2 and 3.17±0.08) groups, respectively. Both L0.5 and L1 groups had significantly higher spermatogonial numbers than control group. However, blood vessel numbers were not significantly affected. In conclusion, orally feeding Letrozole (1 and 1.5 mg) could improve gonadotropin concentration and testicular histology parameters of male broiler breeders at 40 weeks of age. Further studied are needed to confirm these results and extend them to final fertility.

Keywords: Gonadotropin, letrozole, rooster, spermatogonium, testis histology.

* Corresponding author E-mail: mzhandi@ut.ac.ir

مقدمه

تولید تخم‌مرغ بارور هدف اصلی گله‌های مادر گوشتی است، زیرا شمار تخم‌مرغ‌های بارور، سودآوری نهایی آن‌ها را مشخص می‌کند. باروری خروس‌های نگهداری‌شده در شرایط کنترل‌شده در ۳۷ هفتگی به اوج رسیده و پس از آن کاهش می‌یابد (Weil *et al.*, 1999). این کاهش باروری به عامل‌هایی مانند وزن زیاد، مشکل پا یا لنگش، کمبود بیش از حد مواد مغذی، کاهش میل جنسی و بازدهی جفت‌گیری ارتباط داده شده است (Hocking & Bernard, 2000; Romero-Sanchez *et al.*, 2008). انتخاب ژنتیکی رگه (لاین)‌های مادر گوشتی به‌طور عمده به تولید جوجه‌های گوشتی متمرکز شده تا با کاهش مصرف خوراک، وزن کشتار بالاتری داشته باشند. به‌هرحال، این موفقیت در تولید محصول نهایی گاهی در نقطه‌ی مقابل تولیدمثل گله‌های مادر قرار می‌گیرد (Vizcarra *et al.*, 2010).

تستوسترون و LH پلاسمای خروس‌ها با افزایش سن، کاهش می‌یابد به‌هرحال انتظار براین است که کاهش سطح تستوسترون، ترشح LH را از راه سازوکار بازخورد منفی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گونداد افزایش دهد. در این خروس‌ها، استرادیول آزادسازی گونادوتروپین‌ها را با اثرگذاری بر غده‌ی هیپوفیز مهار می‌کند. این فرضیه با بررسی‌هایی تقویت می‌شود که در آن‌ها کلومیفن سترات^۱ و تاموکسیفن^۲ به‌عنوان داروهای تعدیل‌کننده‌ی استروژن، بررسی شده است. تجویز این داروها به خروس سبب افزایش سطوح LH و تستوسترون پلازما و بهبود باروری می‌شود. استرادیول توسط آنزیم آروماتاز از تستوسترون ساخته می‌شود. بنابراین، پیشنهاد می‌شود که میزان استرادیول بیضه‌ای پایین در خروس‌های باروری بالا ناشی از کاهش فعالیت این آنزیم باشد (Weil *et al.*, 1999).

افزون بر کاهش نسبت تستوسترون به استرادیول، تغییر بافت‌شناسی متناسب با این پدیده در بیضه‌ی خروس شامل نقص در بلوغ، کاهش تولید اسپرم، رها

شدن یاخته‌های نابالغ بافت پوششی (اپیتلیوم) زاینده به درون حفره‌ی لوله‌های اسپرم‌ساز، کاهش ضخامت بافت پوششی زاینده، کاهش اندک در قطر لوله‌ها و ضخیم‌شدن فضای میان بافتی به دلیل هجوم فیبرهای کلاژن و فیبروبلاست‌ها و ظهور اسپرماتیدهای چند هسته‌ای است (Sarabia Fragoso *et al.*, 2013). با توجه به مطالب بالا بررسی راهکار بهبود نسبت استروئیدهای جنسی به نفع تستوسترون و بررسی تأثیر آن بر گونادوتروپین‌ها و بافت‌شناسی بیضه‌ی خروس ارزشمند خواهد بود.

آروماتاز عضوی از ابر خانواده‌ی سیتوکروم P450 است که در بیضه، مغز، کبد و بافت چربی یافت می‌شود و تبدیل یک آندروژن به استروژن را با حذف گروه متیل متصل به کربن ۱۹ و آروماتیزه کردن حلقه‌ی A آندروژن‌ها انجام می‌دهند (Carreau *et al.*, 2003). مهارکننده‌های آروماتاز این واکنش را مهار کرده و سبب افزایش تولید LH، FSH و نسبت تستوسترون به استرادیول می‌شوند. تجربه‌ی موفق استفاده از مهارکننده‌های آروماتاز برای درمان سرطان پستان (Smith & Dowsett, 2003; Karnon, 2006)، محققان را متقاعد کرد تا از آن برای کاهش سطح استرادیول استفاده کنند. لتروزل از آخرین نسل مهارکننده‌های آروماتاز با اتصال به اتم آهن آنزیم آروماتاز بسیار اختصاصی عمل می‌کند (de Ronde & de Jong, 2011). استفاده از لتروزل سبب افزایش تستوسترون، LH و FSH در مردان سالم و نابارور شده است (T'Sjoen *et al.*, 2005; Cavallini *et al.*, 2013).

در گونه‌های مختلف طیور، مهار آروماتاز بیشتر بر تمایز جنسی و رفتار آواز خواندن متمرکز شده است (Balthazart *et al.*, 1994; Alward *et al.*, 2016). به دلیل اختصاصی بودن و گزارش‌های علمی در مورد تأثیر لتروزل بر اسپرم‌سازی و برگرداندن تستوسترون به سطح طبیعی (T'Sjoen *et al.*, 2005; Saylam *et al.*, 2011; Moss *et al.*, 2013; Dabaja & Schlegel, 2016; Ribeiro *et al.*, 2014)، در این تحقیق تأثیر آن بر غلظت گونادوتروپین‌ها و بافت‌شناسی بیضه‌ی خروس‌های مادر در سن ۴۰ هفتگی بررسی شود.

1. Clomiphene Citrate
2. Tamoxifen

مواد و روش‌ها

اختصاص تیمارها به حیوانات و نمونه‌برداری

این آزمایش روی ۲۰ قطعه خروس مادر گوشتی راس ۳۰۸ با میانگین وزنی $49.6/25 \pm 69/83$ گرم و سن ۴۰ هفته انجام شد. خروس‌ها به چهار گروه پنج‌تایی تقسیم و درون جایگاه (پن)‌های انفرادی ($1/2 \times 1/2 \times 1$ متر) قرار گرفتند. برنامه نوری شامل ۱۴ ساعت نور و ۱۰ ساعت تاریکی بود و دمای سالن در ۲۱ تا ۲۳ درجه سلسیوس حفظ شد. جیره پایه بنا بر توصیه میزان مواد مغذی در کتابچه راهنمای شرکت "راس ۳۰۸" (۲۰۱۳) تنظیم شد و تجزیه مواد خوراکی بر پایه جدول تجزیه و تحلیل مواد خوراکی کتاب NRC (1994) و با استفاده از نرم‌افزار جیره‌نویسی UFFDA (جدول ۱) انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل سطوح مختلف لتروزل (۰، (L0)، ۰/۵، (L0.5)، ۱، (L1) و ۱/۵ (L1.5) میلی‌گرم به ازای هر پرنده در روز) به صورت کپسوله و مدت ۱۲ هفته به پرندگان خوراندند. خون‌گیری پرندگان از سیاهرگ بال و در هفته‌های اول، سوم، پنجم، هفتم و نهم آزمایش صورت گرفت. در انتهای آزمایش (هفته دوازدهم) همه خروس‌ها کشتار و از بافت بیضه (به‌طور قراردادی از بیضه راست همه خروس‌ها) نمونه‌برداری شد.

بافت‌شناسی بیضه

برای تثبیت، نمونه‌ها در محلول بوئن (به مدت ۲۴ ساعت) و سپس در فرمالین ۱۰ درصد (به مدت ۷۲ ساعت) غوطه‌ور شدند. پس از پایان زمان بالا، نمونه‌ها به درون دستگاه فرآیندساز بافت (تیشوپروسور) منتقل شدند. این دستگاه کار تثبیت، آب‌گیری و تمایز نمونه‌های بافتی برای حفظ ساختار یاخته‌ای را به صورت خودکار انجام می‌دهد تا اجزای یاخته‌ای نمونه به شکل درست در زیر میکروسکوپ نوری یا الکترونی مشاهده شود. ترتیب محلول‌های دستگاه شامل محلول ۱ و ۲ حاوی فرمالین ۱۰ درصد، محلول ۳ حاوی الکل ۷۰ درصد، محلول ۴ الکل ۸۰ درصد، محلول ۵ الکل ۹۰ درصد و محلول ۶ الکل ۹۶ درصد بود. افزایشی بودن درصد الکل‌ها برای آب‌گیری آهسته بود. محلول ۷ و ۸ حاوی الکل مطلق یا ۱۰۰ درصد و محلول ۹ و ۱۰

گزیلول بودند، که شفاف‌سازی بافت و خروج الکل از آن را بر عهده داشتند و در نهایت محلول‌های ۱۱ و ۱۲ پارافین بود. پس از پایان مراحل فرآیندسازی بافت، نمونه‌ها در پارافین قالب‌گیری و با استفاده از دستگاه میکروتوم دوار، برش‌های ۵ میکرومتری تهیه شد. از هر نمونه بافت بیضه دو اسلاید تهیه و برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین به صورت زیر استفاده شد:

اسلایدها را در گیره رنگ‌آمیزی قرار داده و گیره درون دستگاه آن با دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. با این کار افزون بر پارافین‌زدایی، برش‌ها نیز به خوبی به لام چسبیدند. گیره حاوی اسلایدها به ترتیب به درون محلول‌های زیر انتقال داده شدند:

(۱) گزیلول (۵ دقیقه)، (۲) گزیلول (۱۰ دقیقه)، (۳) الکل ۱۰۰ درصد (۳ دقیقه)، (۴) الکل ۹۰ درصد (۳ دقیقه)، (۵) الکل ۸۰ درصد (۳ دقیقه)، (۶) الکل ۷۰ درصد (۳ دقیقه)، (۷) شستشو با آب جاری (۱ دقیقه)، (۸) رنگ هماتوکسیلین (۱۵ دقیقه)، (۹) شستشو با آب جاری (۱ دقیقه)، (۱۰) محلول اسید الکل (یک‌بار غوطه‌ورسازی)، (۱۱) شستشو با آب جاری (۱ دقیقه)، (۱۲) رنگ اتوزین (۵ دقیقه)، (۱۳) الکل ۷۰ درصد (۳ دقیقه)، (۱۴) الکل ۸۰ درصد (۳ دقیقه)، (۱۵) الکل ۹۰ درصد (۳ دقیقه)، (۱۶) الکل ۱۰۰ درصد (۳ دقیقه)، (۱۷) گزیلول (۵ دقیقه و ۱۸) گزیلول (۵ دقیقه). محلول‌های ۱ و ۲ برای پارافین زدایی، محلول‌های ۳ تا ۶ برای آب‌دهی، محلول ۱۰ برای تمایز، محلول‌های ۱۳ تا ۱۶ برای آب‌گیری و در محلول‌های ۱۷ و ۱۸ شفاف‌سازی صورت گرفت. در نهایت روی اسلایدهای تهیه‌شده لامل چسبانده شد (مونت کردن) و تا زمان ارزیابی به درون جعبه نگهداری لام منتقل شدند.

داده‌های ریخت‌سنجی (مورفومتری) از ۲۰ عکس گرفته‌شده از هر اسلاید با میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی $100 \times$) مجهز به دوربین چشمی، به دست آمد و با نرم‌افزار Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD) قطر لوله اسپرم‌ساز، ضخامت بافت پوششی لوله اسپرم‌ساز و شمار اسپرماتوگونی‌ها با شمارش مقاطع عرضی ۲۰ لوله اسپرم‌ساز به‌طور تصادفی و میانگین‌گیری از آن‌ها

۱۰ دقیقه) شده و نمونه‌های پلازما به ریزلوله (میکروتیوپ)های ۰/۵ میلی‌لیتری ریخته شده و به دمای ۲۰- منتقل شدند. برای اندازه‌گیری LH و FSH پلازما از روش الیزا و کیت ویژه طیور آبگزا (Abbexa Ltd., Cambridge, UK) استفاده شد. دامنه اندازه‌گیری کیت LH و FSH به ترتیب ۷-۱/۰ و ۴۰-۰/۸ نانوگرم در میلی‌لیتر و حساسیت آن‌ها نیز به ترتیب ۰/۰۱ و ۰/۱ نانوگرم در میلی‌لیتر بود.

به دست آمد (Islam et al., 2010). شمار یاخته‌های لایدیگ و عروق خونی نیز در هر عکس (مساحت ۰/۳۷ میلی‌مترمربع) شمارش و میانگین گرفته شد.

اندازه‌گیری LH و FSH پلاسمای خون

بی‌درنگ پس از خون‌گیری نمونه‌ها به لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA) منتقل شدند. برای جداسازی پلاسمای خون لوله‌ها سانترویفیوژ (۳۰۰۰ دور به مدت

جدول ۱. اجزاء و ترکیب شیمیایی جیره استاندارد خروس‌های راس ۳۰۸

Item	Value (%)	Digestible amino acids	Value (%)
Corn	69.5	Lysine	0.46
Soybean meal	9	Methionine	0.39
Wheat bran	19.5	Methionine & Cysteine	0.49
Dicalcium phosphate	0.18	Tryptophan	0.12
Calcium carbonate	0.85	Arginine	0.67
Sodium chloride	0.35	Valine	0.5
DL-Met	0.12	Leucine	0.53
Vitamin premix [■]	0.25	Isoleucine	0.4
mineral premix [▲]	0.25	Threonine	0.37
[■] Supplied per kilogram of diet: vitamin A, 15,000 IU; vitamin E, 100 IU; vitamin K3, 4 mg; vitamin B12, 25 µg; vitamin D, 3,000 IU; riboflavin, 7.5 mg; niacin, 50 µg; pantothenic acid, 18 mg; pyridoxine, 5.5 mg; biotin, 50 mg and folic acid, 1.5 mg.		Calculated Composition	
[▲] Supplied per kilogram of diet: Fe, 90 mg; Mn, 120 mg; Zn, 110 mg; I, 2 mg and Se, 0.3 mg.		ME (kcal/kg)	2754.5
		CP (%)	12
		Ca (%)	0.7
		Available P (%)	0.35
		Na (%)	0.15
		Cl (%)	0.15
		K (%)	0.6

استرادیول توانست غلظت گونادوتروپین‌های پلازما و فرانسجه‌های ریخت‌سنجی بافت بیضه را به‌طور معنی‌داری بهبود بخشید (جدول ۲ و ۳). قطر و ضخامت بافت پوششی لوله اسپرم‌ساز در گروه‌های تغذیه‌شده با لتروزل نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. افزون بر این، شمار یاخته‌های اسپرماتوگونی در دو گروه L1 و L0.5 نسبت به شاهد و شمار یاخته‌های لایدیگ در گروه‌های L1.5 و L1 نسبت به دو گروه دیگر به‌طور معنی‌داری بالاتر بود، اما شمار رگ‌های خونی تغییر معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

پدیده‌های مرتبط با افزایش سن در بافت بیضه انسان شامل گسترش واکوئل‌ها درون بافت پوششی لوله اسپرم‌ساز است. این واکوئل‌ها زاینده شدن ممکن است ناشی از پس‌روی یا نبود یاخته زاینده باشد، که منجر به سست شدن فضاهای بین یاخته‌ای و کاهش ارتباط بین یاخته‌ای و کاهش اسپرم‌سازی می‌شود. رویداد دیگر، تغییر موزاییکی در اسپرم‌سازی است. برخی لوله‌های

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

اندازه‌گیری‌های تکرار‌شونده در زمان (داده‌های مربوط به خون‌گیری) با PROC MIXED و دیگر داده‌ها (داده‌های مربوط به بافت‌شناسی) با PROC GLM نرم‌افزار SAS ویرایش ۹ (SAS Institute Inc., Cary, NC) تجزیه و تحلیل شدند. تأثیر تیمار به‌عنوان عامل ثابت و حیوان به‌عنوان عامل تصادفی در معادله مدل قرار داده شد. مقایسه میانگین با استفاده از LSmeans و در سطح آماری ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج و بحث

خروس‌های مادر گوشتی پس از اوج تولید با کاهش غلظت گونادوتروپین‌ها، نسبت تستوسترون به استرادیول و تغییر بافت‌شناسی در بیضه روبه‌رو هستند (Weil et al., 1999; Sarabia Frago et al., 2013). در این پژوهش استفاده از یک مهارکننده آروماتاز به‌عنوان افزایشنده نسبت تستوسترون به

2013). تغییر متناظر در خروس نیز کاهش ضخامت بافت پوششی زاینده، کاهش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخیم‌شدن فضای میان بافتی به دلیل هجوم فیبرهای کلاژن و فیبروبلاست‌ها و ظهور اسپرماتیدهای چند هسته‌ای است (Sarabia Fragoso *et al.*, 2013).

اسپرم‌ساز از لحاظ اسپرم‌سازی فعال ولی برخی دیگر غیرفعال هستند، که سبب تحلیل رفتن بافت بیضه می‌شود. افزون بر این، تغییر غیرطبیعی دیگری شامل سست شدن اتصال‌ها و کاهش تجمع یاخته‌های لایدیگ سبب کاهش ترشح تستوسترون می‌شود (Xu *et al.*,

جدول ۲. فراسنجه‌های بافت‌شناسی خروس‌های تغذیه‌شده با لتروزول

Table 2. Testicular parameters of roosters administered Letrozole

Traits	Treatments (LSmean \pm SE)				P value
	L0	L0.5	L1	L1.5	
Seminiferous tubule diameter [▲] (μ m)	259 \pm 17.33 ^b	344.98 \pm 14.36 ^a	332.62 \pm 19.14 ^a	324.11 \pm 18.21 ^a	0.01
Seminiferous epithelium thickness [▲] (μ m)	74.26 \pm 3.03 ^b	94.27 \pm 4 ^a	96.22 \pm 4.19 ^a	93.17 \pm 4.41 ^a	<0.01
Spermatogonia [▲] (n)	176.85 \pm 5.4 ^c	200.25 \pm 7.47 ^{ab}	204.8 \pm 6.65 ^a	181.3 \pm 9.38 ^{bc}	0.02
Leydig cells [□] (n)	13.22 \pm 0.78 ^b	15.26 \pm 0.71 ^b	17.62 \pm 0.93 ^a	18.09 \pm 0.56 ^a	<0.01
Blood vessels [□] (n)	2.08 \pm 0.29	1.8 \pm 0.27	1.76 \pm 0.24	1.9 \pm 0.36	NS

^{a-b} مقادیر موجود در یک ردیف با حرف‌های غیرمشترک در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری دارند.

■ پرندگان (پنج پرنده در هر تیمار) سطوح مختلف لتروزول شامل ۰ (L0)، ۰/۵ (L0.5)، ۱ (L1) و ۱/۵ (L1.5) میلی‌گرم در روز را به مدت ۱۲ هفته دریافت کردند.

▲ بر پایه میانگین مقاطع عرضی ۲۰ لوله اسپرم‌ساز در هر پرنده محاسبه شده است.

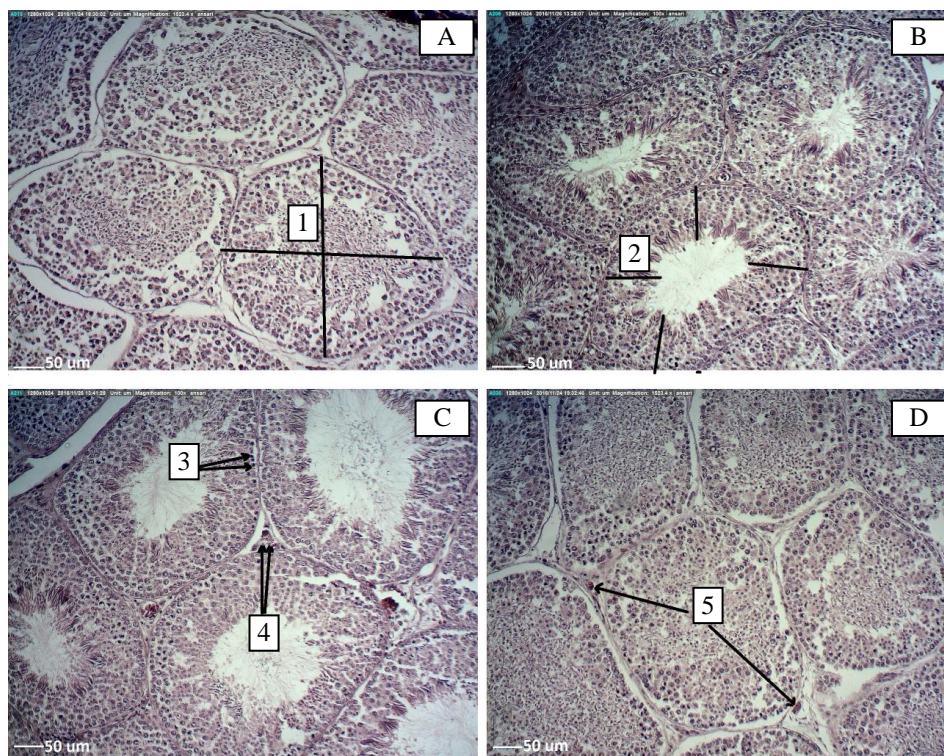
□ بر پایه میانگین ۲۰ تصویر (۰/۳۷ میلی‌متر مربع) محاسبه شده است.

^{a-b} Values within a row with different superscripts differ at $p < 0.05$.

■ The birds (n=5/treat) received different levels of Letrozole including: 0 (L0), 0.5 (L0.5), 1 (L1) or 1.5 (L1.5) mg/bird/day for 12 consecutive weeks.

▲ Calculated based on 20 randomly cross-sections of seminiferous tubules in each bird and averaged.

□ Calculated based on 20 micrographs (0.37 mm²) and averaged.



شکل ۱. مقطع عرضی بیضه خروس‌های تغذیه‌شده با سطوح مختلف لتروزول [۰ (A)، ۰/۵ (B)، ۱ (C) و ۱/۵ (D) میلی‌گرم به ازای هر پرنده در روز به مدت ۱۲ هفته]. ۱- قطر لوله اسپرم‌ساز، ۲- ضخامت بافت پوششی لوله اسپرم‌ساز، ۳- اسپرماتوگونی‌ها، ۴- یاخته‌های لایدیگ و ۵- رگ‌های خونی. بزرگنمایی: $\times 100$ ، نوار مقیاس: ۵۰ میکرومتر.

Figure 1. Cross sections of testes of roosters treated with different levels of Letrozole (0 (L0), 0.5 (L0.5), 1 (L1) or 1.5 (L1.5) mg/kg BW/day) for 12 weeks. 1: Seminiferous tubule diameter, 2: Seminiferous epithelium thickness, 3: spermatogonia, 4: Leydig cells, 5: vessel blood. Magnification: 100 X. Scale bar: 50 μ m.

کمی و کیفی بافت بیضه ارتباط مثبتی وجود دارد (جدول ۲). غلظت گونادوتروپین‌ها (FSH و LH) در گروه‌های تیماری لتروزول نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری بالاتر بود (جدول ۳). افزایش غلظت FSH (نانوگرم در میلی‌لیتر) در پرندگانی که ۱ میلی‌گرم لتروزول دریافت کرده بودند، نسبت به دیگر گروه‌ها معنی‌داری بود. در مورد LH نیز، بیشترین میزان (نانوگرم در میلی‌لیتر) در گروه L1.5 مشاهده شد که اختلاف آن با L1 غیر معنی‌دار و با L0.5 معنی‌دار بود. ارتباط منفی بین غلظت استرادیول پلاسما و گونادوتروپین‌ها در مدل‌های آزمایشی مختلف به‌خوبی تأیید شده است (Weil et al., 1999; Raven et al., 2006). استفاده از لتروزول در بررسی‌های انسانی توانسته است نسبت تستوسترون به استرادیول پلاسما، غلظت FSH و LH پلاسما و فراسنجه‌های کیفی اسپرم انسان را به‌طور معنی‌داری افزایش دهد (Cavallini et al., 2011).

ارزیابی لوله‌های اسپرم‌ساز (فراسنجه‌های ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی) راهکاری ساده برای پایش تغییر اسپرم‌سازی است. تولید اسپرم با نقص در الگوی تقسیم یاخته‌های بنیادی، پس‌روی یا بلعیده شدن یاخته‌های زاینده در نتیجه نبود هورمونی یا تأثیر سمی مواد شیمیایی، کاهش می‌یابد (Altoé et al., 2014). اندازه‌گیری قطر لوله‌های اسپرم‌ساز به‌عنوان شاخصی از فعالیت اسپرم‌سازی در بررسی‌های مربوط به فعالیت بیضه است. ضخامت بافت پوششی لوله اسپرم‌ساز نیز یک ویژگی مؤثر برای ارزیابی تولید اسپرم مطرح است، زیرا از تغییر چرخه بافت پوششی لوله اسپرم‌ساز و یاخته‌های میوئید پیروی می‌کند (Altoé et al., 2014). در این آزمایش، یافته‌های کیفی بافت‌شناختی (هیستولوژیکی) بافت بیضه تأییدی بر داده‌های کمی است (شکل ۱ و جدول ۲). افزون بر این، نشان داده شد، بین غلظت گونادوتروپین‌ها (جدول ۳) و تستوسترون (داده‌های چاپ‌نشده) در پرندگان تحت آزمایش و شاخص‌های

جدول ۳. سطح گونادوتروپین‌های پلاسما در خروس‌های تغذیه‌شده با لتروزول

Table 3. Plasma gonadotropin levels of roosters administered Letrozole

Feature	Treatments (LSmean ±SE)				P Value		
	L0	L0.5	L1	L1.5	Treat	Time	Treatment×Time
FSH (ng/mL)	6.91±0.15 ^c	9.71±0.1 ^b	10.39±0.11 ^a	9.5±0.2 ^b	<0.01	0.04	NS
LH (ng/mL)	2.07±0.08 ^c	2.83±0.09 ^b	2.93±0.08 ^{ab}	3.17±0.08 ^a	<0.01	NS	NS

^{a-b} مقادیر موجود در یک ردیف با حرف‌های غیرمشترک در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری دارند.

▪ پرندگان (پنج پرند در هر تیمار) سطوح مختلف لتروزول شامل ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در روز را به مدت ۱۲ هفته دریافت کردند.

^{a-c} values within a row with different superscripts differ at p<0.05.

▪ The birds (n=5/treat) received different levels of Letrozole including: 0 (L0), 0.5 (L0.5), 1 (L1) or 1.5 (L1.5) mg/bird/day.

توسط نوروها در هیپوتالاموس تولید می‌شود. گزارش شده است که جیره با انرژی بالا فراوانی ضربه (پالس)های GnRH، وزن بیضه و تولید اسپرم را افزایش می‌دهد (Feng et al., 2015). افزون بر این اسپرم‌سازی و استروئیدسازی در بیضه طیور بستگی به FSH، LH و تستوسترون دارد (Vizcarra et al., 2010). اثر FSH و LH به‌طور عمده بر یاخته‌های سرتولی و یاخته‌های لایدیگ متمرکز است و به‌صورت هم‌افزایی از روش cAMP افزایش یاخته‌های بیضه‌ای را تحریک می‌کنند (Huang et al., 2003; Kim et al., 2016). باوجوداینکه FSH، LH و تستوسترون برای اسپرم‌سازی در طیور ضروری هستند به نظر

توانایی بیضه در تولید اسپرم با شمار یاخته‌های سرتولی در هر بیضه تنظیم می‌شود و تولید روزانه اسپرم با شمار یاخته‌های سرتولی و اسپرماتوگونی به ازای هر بیضه ارتباط دارد (Okwun et al., 1996). مهم‌ترین تنظیم‌کننده افزایش و تمایز یاخته‌های سرتولی FSH است. افزون بر این، تستوسترون اثر FSH بر یاخته‌های سرتولی را تقویت می‌کند (Dimitriadis et al., 2015). با در نظر گرفتن این موارد، باوجوداینکه تولید اسپرم به شمار یاخته‌های سرتولی بستگی دارد، این فرآیند به‌طور کامل با HPG کنترل می‌شود. ترشح گونادوتروپین‌ها (FSH و LH) از هیپوفیز پیشین با GnRH تنظیم می‌شود (Tsutsui et al., 2013)، که

پیشنهاد شده است. نتایج بررسی‌ها نشان داده است، LH با تأثیر بر یاخته‌های لایدیگ سبب تحریک تولید آندروژن می‌شود که با اثرگذاری بر یاخته‌های میوئید فراتوبولی سبب تولید پروتئین تنظیم‌کننده کنش سرتولی (Pmods) می‌شود و آن نیز به‌نوبه خود کنش یاخته‌های سرتولی را تنظیم کرده و برهمکنش تغذیه‌ای ضروری برای گسترش یاخته زاینده را فراهم می‌کند. این تنظیم برهمکنش بین یاخته‌های لایدیگ و در دیگر یاخته‌های بیضه‌ای به‌واسطه آندروژن، برای تداوم اسپرم‌سازی ضروری بوده و کنش غیرمستقیم آندروژن در بیضه را نشان می‌دهد. تأثیر پروتئین تنظیم‌کننده کنش سرتولی بر یاخته‌های سرتولی و ناتوانی آن‌ها در پاسخ به آندروژن‌ها در محیط برون تنی، وجود تأثیر غیرمستقیم آندروژن را تأیید می‌کند که یک مسیر پیام‌رسانی را از یاخته‌های لایدیگ به یاخته‌های میوئید، یاخته‌های سرتولی و سرانجام به یاخته‌های زاینده پیشنهاد می‌کند (Chang *et al.*, 2004).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش استفاده از لتروزول، به‌عنوان یک مهارکننده آروماتاز، در دزهای ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم توانست باعث افزایش برخی از فراسنجه‌های بافت‌شناسی بیضه و غلظت FSH و LH در خروس‌های مادر گوشتی شود.

می‌رسد که FSH شاخص بهتری برای عملکرد بیضه است (Vizcarra *et al.*, 2010). بررسی‌های گذشته نشان دادند، FSH ارتباط بالایی با کنش و وزن بیضه در خروس‌های گله مادر گوشتی دارد (Heng *et al.*, 2017). افزون بر این، FSH شمار اسپرماتوگونی‌ها، اسپرماتوسیت‌ها و یاخته‌های اسپرم را در میمون افزایش داده است (Ramaswamy & Plant, 2001).

تولید تستوسترون در یاخته لایدیگ بالغ به ترشح ضربه‌ای LH از غده هیپوفیز به درون جریان خون بستگی دارد. اتصال LH به گیرنده غشایی خود در یاخته لایدیگ سبب آغاز آبخاری از رویدادهایی می‌شود که شامل جفت شدن گیرنده LH به G پروتئین‌ها، فعال شدن آدنیلات سیکلاز، افزایش تشکیل cAMP درون‌یاخته‌ای و فسفری شدن (فسفوریلاسیون) وابسته به cAMP پروتئین‌ها توسط پروتئین کیناز A می‌شود. اتصال LH به گیرنده‌اش اثرگذاری حاد و مزمن بر یاخته‌های لایدیگ دارد. در اثرگذاری حاد آن، cAMP توسط LH تشکیل شده و انتقال کلسترول به درون میتوکندری تحریک می‌شود و اثرگذاری مزمن شامل افزایش بیان آنزیم‌های استروئیدسازی است (Midzak *et al.*, 2009).

افزون بر این، یک ارتباط کاربردی بین آندروژن/گیرنده آندروژن در یاخته‌های سرتولی با تولید/ترشح تستوسترون در یاخته‌های لایدیگ نیز

REFERENCES

1. Altoe, P. M., Tatsuo, E. S., Paulo, D. N. S., Jarske, R., Milagres, M. & Loureiro, I.D. (2014). Effects of human chorionic gonadotropin on the normal testicular tissue of rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, 29, 292-298.
2. Alward, B. A., de Bournonville, C., Chan, T. T., Balthazart, J., Cornil, C. A. & Ball, G. F. (2016). Aromatase inhibition rapidly affects in a reversible manner distinct features of birdsong. *Scientific Reports* 6, 1-9.
3. Balthazart, J., Phillipe, A., Veronique, F. & Ball, G. F. (1994). Effects of the Aromatase Inhibitor R76713 on Sexual Differentiation of Brain and Behavior in Zebra Finches. *Behaviour* 131, 225-260.
4. Carreau, S., Lambard, S., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bilinska, B. & Bourguiba, S. (2003). Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 35-41.
5. Cavallini, G., Beretta, G. & Biagiotti, G. (2011). Preliminary study of letrozole use for improving spermatogenesis in non-obstructive azoospermia patients with normal serum FSH. *Asian Journal of Andrology*, 13, 895-897.
6. Cavallini, G., Biagiotti, G. & Bolzon, E. (2013). Multivariate analysis to predict letrozole efficacy in improving sperm count of non-obstructive azoospermic and cryptozoospermic patients: a pilot study. *Asian Journal of Andrology*, 15, 806-811.
7. Chang, C., Chen, Y. T., Yeh, S. D., Xu, Q., Wang, R. S., Guillou, F., Lardy, H. & Yeh, S. (2004). Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 101, 6876-6881.

8. Dabaja, A. A. & Schlegel, P. N. (2014). Medical treatment of male infertility. *Translational Andrology and Urology*, 3, 9-16
9. de Ronde, W. & de Jong, F.H. (2011). Aromatase inhibitors in men: effects and therapeutic options. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 93-99
10. Dimitriadis, F., Tsiampali, C., Chaliasos, N., Tsounapi, P., Takenaka, A. & Sofikitis, N. (2015). The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *Hormones*, 14, 479-503.
11. Feng, Y., Ding, Y., Liu, J., Tian, Y., Yang, Y., Guan, S. & Zhang, C. (2015). Effects of dietary omega-3/omega-6 fatty acid ratios on reproduction in the young breeder rooster. *BMC Veterinary Research*, 11, 73-79.
12. Heng, D., Zhang, T., Tian, Y., Yu, S., Liu, W., Xu, K., Liu, J., Ding, Y., Zhu, B., Yang, Y. & Zhang, C. (2017). Effects of dietary soybean isoflavones (SI) on reproduction in the young breeder rooster. *Animal Reproduction Science*, 177, 124-131.
13. Hocking, P. & Bernard, R. (2000). Effects of the age of male and female broiler breeders on sexual behaviour, fertility and hatchability of eggs. *British Poultry Science*, 41, 370-376.
14. Huang, H. F. S., Li, M. T., Wang, S., Pogach, L. M. & Ottenweller, J. E. (2003). Alteration of Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Signaling In Rat Testicular Cells After Spinal Cord Injury. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 26, 69-78.
15. Islam, M. N., Zhu, Z. B., Aoyama, M. & Sugita, S. (2010). Histological and morphometric analyses of seasonal testicular variations in the Jungle Crow (*Corvus macrorhynchos*). *Anatomical Science International*, 85, 121-129.
16. Karnon, J. (2006). Aromatase Inhibitors in Breast Cancer. *PharmacoEconomics*, 24, 215-232.
17. Kim, J. H., Park, S. J., Kim, T. S., Kim, J. M. & Lee, D. S. (2016). Testosterone production by a Leydig tumor cell line is suppressed by hyperthermia-induced endoplasmic reticulum stress in mice. *Life Sciences* 146, 184-191
18. Midzak, A. S., Chen, H., Papadopoulos, V. & Zirkin, B. R. (2009). Leydig cell aging and the mechanisms of reduced testosterone synthesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299, 23-31.
19. Moss, J. L., Crosnoe, L. E. & Kim, E. D. (2013). Effect of rejuvenation hormones on spermatogenesis. *Fertility and Sterility*, 99, 1814-1820.
20. Okwun, O. E., Igboeli, G., Ford, J. J., Lunstra, D. D. & Johnson, L. (1996). Number and function of Sertoli cells, number and yield of spermatogonia, and daily sperm production in three breeds of boar. *Journal of Reproduction and Fertility*, 107, 137-149.
21. Ramaswamy, S. & Plant, T. M. (2001). Operation of the follicle-stimulating hormone (FSH)-inhibin B feedback loop in the control of primate spermatogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 180, 93-101.
22. Raven, G., de Jong, F. H., Kaufman, J. M. & de Ronde, W. (2006). In men, peripheral estradiol levels directly reflect the action of estrogens at the hypothalamo-pituitary level to inhibit gonadotropin secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91, 3324-8
23. Ribeiro, M. A., Gameiro, L. F., Scarano, W. R., Briton-Jones, C., Kapoor, A., Rosa, M. B. & El Dib, R. (2016). Aromatase inhibitors in the treatment of oligozoospermic or azoospermic men: a systematic review of randomized controlled trials. *JBRA Assisted Reproduction*, 20, 82-88.
24. Romero-Sanchez, H., Plumstead, P., Lekrisompong, N., Brannan, K. & Brake, J. (2008). Feeding broiler breeder males. 4. Deficient feed allocation reduces fertility and broiler progeny body weight. *Poultry science*, 87, 805-811.
25. Sarabia Fragoso, J., Pizarro Diaz, 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 Animals*, 48, 345-352.
26. Saylam, B., Efesoy, O. & Cayan, S. (2011). The effect of aromatase inhibitor letrozole on body mass index, serum hormones, and sperm parameters in infertile men. *Fertility and Sterility*, 95, 809-811.
27. Smith, I. E. & Dowsett, M. (2003). Aromatase Inhibitors in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 348, 2431-2442.
28. T'Sjoen, G. G., Giagulli, V. A., Delva, H., Crabbe, P., De Bacquer, D. & Kaufman, J. M. (2005). Comparative assessment in young and elderly men of the gonadotropin response to aromatase inhibition. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90, 5717-5722.
29. Tsutsui, K., Ubuka, T., Bentley, G. E. & Kriegsfeld, L. J. (2013). Review: regulatory mechanisms of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) synthesis and release in photoperiodic animals. *Frontiers in Neuroscience*, 7, 1-17.
30. Vizcarra, J. A., Kirby, J. D. & Kreider, D. L. (2010). Testis development and gonadotropin secretion in broiler breeder males. *Poultry Science*, 89, 328-334.

31. Weil, S., Rozenboim, I., Degen, A. A., Dawson, A., Friedländer, M. & Rosenstrauch, A. (1999). Fertility decline in aging roosters is related to increase testicular and plasma levels of estradiol. *General and Comparative Endocrinology*, 115, 23-28.
32. Xu, Y. C., Li, J., Liang, W. B. & Zhu, W. J. (2013). Evaluation on Changes of Testicular Histology in Aging Men. *Journal of Reproduction and Contraception*, 24, 199-204.