

## تأثیر سطوح بالا آلفا-توکوفرول استات بر فراسنجه‌های بافت‌شناسی بیضه خروس‌های سنگین مادر گوشتی

مجید اجعفر<sup>۱</sup>، مجتبی زاغری<sup>۲\*</sup>، مهدی زندی<sup>۳</sup> و لیلا لطفی<sup>۴</sup>

۱، ۲، ۳ و ۴. دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار و دانشجوی سابق دکتری، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱/۹)

## چکیده

هدف از این بررسی ارزیابی تأثیر افزودن سطوح بالای آلفاتوکوفرول استات بر فراسنجه‌های بافت‌شناسی بیضه خروس‌های سنگین مادر گوشتی بود. در این راستا، شمار ۶۰ خروس مادر گوشتی راس ۳۰۸ (با سن ۲۰ هفته) در دو گروه وزنی استاندارد (۳۰=شمار؛ ۳/۱۰۹±۰/۱۶۹kg میانگین وزن بدن) و سنگین (۳۰=شمار؛ ۳/۵۰۹±۰/۱۶۱kg میانگین وزن بدن) تقسیم شدند. خروس‌ها به صورت تصادفی در ده گروه تیماری تقسیم و به قفس‌های انفرادی منتقل شدند (به صورت فاکتوریل ۲×۵ با شش تکرار در هر تیمار). تیمارهای آزمایشی با جیره‌ای همسان افزون بر سطوح مختلف ویتامین E (E0)، ۱۰۰ (E100)، ۲۰۰ (E200)، ۳۰۰ (E300)، ۴۰۰ (E400) میلی‌گرم در کیلوگرم جیره ویتامین E به مدت ده هفته تغذیه شدند. در مدت آزمایش، گروه سنگین ۳۰ درصد بیشتر از گروه سبک خوراک دریافت کرد. در پایان آزمایش خروس‌ها کشتار شدند و بیضه‌ها برای ارزیابی‌های بافت‌شناسی از لاشه جدا شدند. نتایج نشان داد، ویتامین E به صورت معنی‌داری اندازه بیضه‌ها و شمار لوله‌های اسپرم‌ساز را در همه گروه‌های تیماری نسبت به گروه شاهد (کنترل) افزایش داده است (P≤۰/۰۵). همچنین، در هر دو گروه وزنی، قطر بیضه چپ، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، ضخامت بافت پوششی (اپیتلیوم) اسپرم‌ساز، شمار یاخته‌های لایدیگ و شمار رگ‌های خونی برای گروه ۴۰۰ میلی‌گرم ویتامین E بالاتر بود (P≤۰/۰۵). درکل، بنابر نتایج به‌دست‌آمده می‌توان عنوان کرد، سطوح بالای ویتامین E (۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) موجب بهبود فراسنجه‌های بافت‌شناسی بیضه خروس شده است.

واژه‌های کلیدی: اپیتلیوم اسپرم‌ساز، خروس سنگین، لوله‌های اسپرم‌ساز، ویتامین E، یاخته‌های لایدیگ.

Effect of high doses of  $\alpha$ -tocopherol acetate on testicular morphology and histology parameters in broiler breeder roostersMajid Ajafar<sup>1</sup>, Mojtaba Zaghari<sup>2\*</sup>, Mahdi Zhandi<sup>3</sup>, Leila Lotfi<sup>4</sup>

1, 2, 3, 4. Ph. D. Candidate, Professor, Associate Professor and Former Ph.D. Student, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Dec. 20, 2017 - Accepted: Mar. 29, 2018)

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate effect of dietary supplementation by high doses of  $\alpha$ -tocopherol acetate breeder (20 weeks of age) were used in two groups, standard (n=30; body weight= 3.109±0.169) and heavy (n=30;  $\pm$ body weight= 3509±0.161) weight. Roosters were individually kept and randomly divided into 10 treatments (in a 2×5 factorial arrangements with six replicates in each group). The experimental treatments were fed a same diet supplemented with different levels of vitamin E (0, 100, 200, 300, 400 mg  $\alpha$ -tocopherol acetate/kg diet) for 10 weeks. The heavy weight group received 30% excessive diet than standard group from beginning until the end of the experiment. After 5 weeks of adaptation period, roosters were fed by supplemented diet for 10 weeks. In the end of experiment roosters slaughtered and testicles removed from carcass for morphology and histology analysis. Results showed that vitamin E were significantly increased the size of testis, the number of seminiferous tubules in all treatment group compared to the control group (P ≤ 0.05). As well as, in two body weight groups the weight of testis, left testis diameter, seminiferous tubules diameter, seminiferous epithelium thickness, number of leydig cell and blood vessels were highest in E400 group (P ≤ 0.05). Finally, based on these results, it was concluded that high dose of vitamin E (400 mg/kg diet) improved testis morphology and histology parameters.

**Keywords:** Heavy weight roosters, leydig cells, seminiferous tubules, seminiferous epithelium, vitamin E.

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

## مقدمه

عملکرد تولیدمثلی خروس‌ها یکی از مهم‌ترین عامل‌ها در موفقیت تولیدمثل در مرغ مادر گوشتی است. باوجود اینکه نرها تنها ۱۰ درصد جمعیت گله را تشکیل می‌دهند اما در ۵۰ درصد از ژنتیک گله سهمیم هستند. بنابراین، کمتر بودن خروس‌ها نسبت به مرغ‌ها سبب می‌شود کوچک‌ترین کاهش در عملکرد تولیدمثلی خروس‌ها باعث کاهش نرخ تولیدمثل گله شود. بنابراین، سلامت جنسی آن‌ها برای موفقیت باروری ضروری است (Saemi et al., 2012; Molapo & Kompfi, 2016). با توجه به اینکه وراثت‌پذیری صفات تولیدمثلی به نسبت پایین است، عامل‌های غیرژنتیکی همچون تغذیه اثر مهم‌تری بر عملکرد تولیدمثلی طیور دارند. با این حال، مدیریت تغذیه‌ای پرنده‌های ماده گوشتی نسبت به نرها توجه بیشتری را به خود جلب کرده است و افزایش وزن در خروس‌ها یکی از مشکلات مزرعه‌های مرغ مادر گوشتی است (Zaghari et al., 2013). در نتایج تحقیقی گزارش شده است، عملکرد تولیدمثل خروس، به‌طور مستقیم تحت تأثیر وزن بدن قرار می‌گیرد. بنابراین، به تأثیر وزن بدن خروس بر شاخص‌های اصلی باروری در طول دوره تولید توجه ویژه شده است. فرض بر این است که وزن بدن خروس بر تولیدمثل، از طریق عامل‌های چندی مانند وضعیت هورمونی، رشد و توسعه بیضه‌ها، بر کیفیت و کمیت منی تأثیر می‌گذارد (Dermanović et al., 2013). به‌منظور تولید مداوم تخم‌مرغ‌های بارور لازم است که خروس‌ها در شرایط پایدار تولیدمثلی حفظ شوند و باید به وزن بدن آن‌ها توجه ویژه شود. همچنین، یکنواختی گله از نظر وزن بدن به‌ویژه در هفته‌های آخر چرخه (سیکل) تولیدمثلی عامل بسیار مهم در تولیدمثل خروس است. در کنار سن والد‌های جوجه گوشتی وزن بدن نیز تأثیر شایان توجهی بر باروری و تفریح تخم‌مرغ دارد (Celeghini et al., 2001). عملکرد هورمونی مناسب سامانه غدد درون‌ریز مرغ‌های تخم‌گذار و خروس‌ها به‌طور قابل توجهی بستگی به سن و افزایش وزن بدن دارد (Wilson et al., 1979).

تنش اکسایشی (اکسیداتیو) در سامانه‌های زیستی (بیولوژیکی) نتیجه نبود تعادل بین تولید عامل‌های اکسیدکننده و پاسخ پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی)

درون‌یاخته است (Halliwell and Gutteridge, 1986; Kappus, 1987; Rikans et al., 1991). واکنش زنجیره‌ای رادیکال پراکسیداسیون لیپید یک فرآیند فیزیولوژیک مداوم به نظر می‌رسد. این فرآیند اگر از کنترل خارج شود می‌تواند عملکردهای حیاتی یاخته‌ها را تغییر دهد و منجر به مرگ یاخته‌ای شود (Chance et al., 1979). تنش اکسایشی ناشی از افزایش سن و وزن مشکل اصلی در تولیدمثل خروس‌ها است که روی غذای مصرفی، کیفیت مایع منی، سطوح تستوسترون و لیپیدهای پلاسمای اسپرم اثر منفی می‌گذارد (Saemi et al., 2012). غشای پلاسمایی اسپرم گونه‌های مختلف به‌ویژه پرندگان، حاوی سطح بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع است که آن را مستعد به پراکسیداسیون لیپیدی تحت تأثیر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌کند (Kelso et al., 1997). به‌طور معمول، پاداکسندگی‌های طبیعی موجود در پلاسمای منی با خنثی‌سازی ROSها، اکسایش (اکسیداسیون) لیپیدها را کاهش می‌دهند (Partyka et al., 2012).

یکی از مهم‌ترین عامل‌های محافظت غیرآنزیمی در برابر پراکسیداسیون لیپید، ویتامین E است. که رادیکال‌های آزاد را پاک‌سازی می‌کند (Kappus, 1987; Halliwell, 1989). مقدار اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFA: Poly unsaturated fatty acid) موجود در اسپرم خروس وابسته به مقدار ویتامین E غشا است (Cerolini et al., 2006). مقدار ویتامین E نیز به مقدار آن در مکمل جیره بستگی دارد (Surai et al., 1997). ویتامین E پاداکسندگی اصلی در غشای زیستی است که از آسیب‌های اکسایشی ناشی از رادیکال‌های آزاد از طریق به دام انداختن ROSها جلوگیری می‌کند. این رادیکال‌های آزاد توسط واکنش‌های بیوشیمیایی در میتوکندری یاخته تولید می‌شوند، که تمایل بالایی به آسیب رساندن به ساختارهای یاخته شامل لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک دارند (Min et al., 2016). گونه‌های فعال اکسیژن ممکن است در طی روند تنفس از طریق زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری در یاخته‌های لایدیگ و همچنین توسط آنزیم سیتوکروم P450 مسیر استروئیدی تولید شود (Hornsby, 1989; Peltola et al., 1996). همچنین، ویتامین E یک نقش

ویتامین E (۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره) انجام شد.

#### بافت‌شناسی و ریخت‌شناسی بیضه

در پایان آزمایش (هفته ۱۰) پس از کشتار به منظور بررسی بافت‌شناسی بیضه و اندازه‌گیری‌های بیضه (وزن، سایز، قطر) انجام شد. وزن بیضه با ترازو، اندازه بیضه (طول بیضه) و قطر بیضه (عرض بیضه) با کولیس اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری ویژگی‌های بافت بیضه، بافت‌شناسی بیضه به روش مرسوم (Ali et al., 2017) انجام گرفت. به‌طور اختصار، برای تثبیت، نمونه‌ها در محلول بوئن (به مدت ۲۴ ساعت) و پس از آن در فرمالین ۱۰ درصد (به مدت ۷۲ ساعت) غوطه‌ور شدند. سپس نمونه‌ها برای آب‌گیری و شفاف‌سازی به درون دستگاه فرآیندساز بافت (تیشوپروسور) منتقل شدند. پس از پایان مراحل فرآیندسازی بافت، نمونه‌ها در پارافین قالب‌گیری و با استفاده از دستگاه میکروتوم دوار، برش‌های ۵ میکرومتری و به‌روی اسلایدهای شماره‌گذاری شده منتقل شد. به‌منظور رنگ‌آمیزی و پارافین زدایی، اسلایدها به ترتیب در محلول‌های زیر قرار گرفتند:

(۱) گزیلول، (۲) الکل ۱۰۰ درصد، (۳) الکل ۹۰ درصد، (۴) الکل ۸۰ درصد، (۵) الکل ۷۰ درصد، (۶) شستشو با آب جاری، (۷) رنگ همتوکسیلین، (۸) شستشو با آب جاری، (۹) محلول اسید الکل (یک‌بار غوطه‌ورسازی)، (۱۰) شستشو با آب جاری، (۱۱) رنگ ائوزین، (۱۲) الکل ۷۰ درصد، (۱۳) الکل ۸۰ درصد، (۱۴) الکل ۹۰ درصد، (۱۵) الکل ۱۰۰ درصد، (۱۶) گزیلول. محلول ۱ برای پارافین زدایی، محلول‌های ۲ تا ۵ برای آب‌دهی، محلول ۹ برای تمایز، محلول‌های ۱۳ و ۱۶ برای آب‌گیری و در محلول ۱۶ شفاف‌سازی صورت گرفت. درنهایت روی اسلایدهای تهیه شده لامل چسبانده شد (مونت کردن). برای ارزیابی فراسنجه‌های مربوط به بافت‌شناسی برای هر یک از تیمارها شمار ۲۰ عکس گرفته شد از هر اسلاید با میکروسکوپ نوری (بزرگ‌نمایی  $\times 100$ ) به‌دست‌آمده و با استفاده از نرم‌افزار Image J فراسنجه‌های بافتی مانند قطر لوله اسپرم‌ساز، قطر بافت پوششی (اپیتلیوم) سطحی، شمار یاخته‌های لایدیگ اندازه‌گیری و شمارش شد.

کلی در تثبیت غشاها دارد، برخی از این اثرگذاری‌های تثبیت‌کننده مربوطه به اعمال سوخت‌وسازی (متابولیکی) آن مانند توانایی تشکیل کمپلکس با اسیدهای چرب آزاد و جلوگیری از تأثیر زیانبار آن‌ها، فعالیت شبه‌کلسترولی در بین دو لایه غشاء لیپیدی است (Surai, 1999). کمبود ویتامین E باعث تخریب اکسایشی بافت بیضه و اسپرماتوگونی‌ها و لوله‌های اسپرم‌ساز و درنهایت ناباروری خروس‌ها می‌شود (Wilson et al., 2003). با توجه به مطالب بالا، فرضیه ما این است که استفاده از ویتامین E در جیره خروس‌های مادر گوشتی بتواند ویژگی‌های بافت بیضه را تحت تأثیر قرار دهد، بنابراین آزمایشی برای بررسی تأثیر سطوح مختلف ویتامین E بر خروس سنگین‌وزن و مقایسه آن با خروس‌های دارای وزن استاندارد طراحی و اجرا شد.

#### مواد و روش‌ها

##### روند اجرا و طرح آزمایش

این آزمایش روی ۶۰ قطعه خروس مادر گوشتی سوئه راس ۳۰۸ با سن ۲۰ هفته و در دو وزن استاندارد و سنگین (۳۰ درصد جیره بیشتر مصرف کردند) به مدت ده هفته انجام شد. خروس‌ها به ده گروه شش‌تایی (شش تکرار در هر گروه و سه تکرار برای هر میانگین وزنی) تقسیم و درون قفس‌های انفرادی ( $40 \times 40 \times 50$  سانتی‌متر) قرار گرفتند. برنامه نوری (۱۴ ساعت روشنایی ۱۰ ساعت تاریکی) و شرایط محیطی یکنواخت و کنترل‌شده بود و دمای سالن در ۲۱ تا ۲۳ درجه سلسیوس حفظ شد. پس از پنج هفته عادت‌دهی (سه هفته جیره بدون ویتامین برای خالی شدن ذخایر ویتامینی بدن و دو هفته عادت‌دهی برای اسپرم‌گیری) خروس‌ها در ده گروه به‌صورت تصادفی تقسیم شدند. گروه شاهد (کنترل) با جیره پایه بدون ویتامین E تغذیه شد (جدول ۱). گروه‌های دیگر همان جیره پایه مکمل شده با چهار سطح ویتامین E (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره) را دریافت کردند. همچنین، گروه سنگین‌وزن از اول تا آخر آزمایش ۳۰ درصد جیره بیشتر نسبت به گروه با وزن استاندارد دریافت کردند. آزمایش در قالب طرح فاکتوریل ( $2 \times 5$ ) با دو وزن متفاوت (سنگین و استاندارد) و پنج سطح مختلف

جدول ۱. اجزاء و ترکیب شیمیایی جیره استاندارد خروس‌های راس ۳۰۸ (بر پایه راهنمای راس ۳۰۸، ۲۰۱۶)

Table 1. Ingredients and the chemical composition of experimental diets (DM basis, based on catalog of ROSS-308, 201

Ingredient	Percentage	C.F%	Fat%	Linoleic acid%
Corn	67.31	1.68	2.55	1.27
Soya meal (44%)	6.20	0.192	0.032	0.025
Wheat bran	23.28	2.42	1.11	0.39
DCP	1.36	-	-	-
Limestone	0.81	-	-	-
Sodium chloride	0.32	-	-	-
Vitamin and mineral premix*	0.5	-	-	-
DL- Methionine	0.11	-	-	-
Baking soda	0.10	-	-	-
L-Lysine HCl	0.01	-	-	-
Sum	100	4.292	3.642	1.685
Composition				
ME (Kcal/Kg)	2700	-	-	-
Crude protein (%)	11.5	-	-	-
Calcium (%)	0.7	-	-	-
Available phosphorus (%)	0.35	-	-	-
Na (%)	0.18	-	-	-
Lysine (%)	0.45	-	-	-
Methionine (%)	0.31	-	-	-
Threonine (%)	0.33	-	-	-
Methionine + Cysteine (%)	0.57	-	-	-
DEB( meq/kg)	165.571	-	-	-

در هر کیلوگرم خوراک مقادیر زیر تأمین شد: ویتامین A: ۱۱۰۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین کا ۳: ۵ میلی‌گرم؛ ویتامین ب ۱۲: ۰/۰۳ میلی‌گرم؛ ویتامین د ۳: ۲۵۰۰ واحد بین‌المللی؛ ریبولوین: ۷/۵ میلی‌گرم؛ نیاسین: ۵۵ میلی‌گرم؛ پانتوتنیک اسید: ۱۵ میلی‌گرم؛ پیردوکسین: ۴ میلی‌گرم؛ بیوتین: ۰/۲۵ میلی‌گرم و اسید فولیک: ۲ میلی‌گرم و مواد معدنی: آهن: ۵۰ میلی‌گرم؛ منگنز: ۱۱۰ میلی‌گرم؛ ید: ۲ میلی‌گرم و سلنیوم: ۰/۳ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک (بدون ویتامین ای).

\* Provide per Kg of diet; A: 11,000 IU; K3: 5 mg; B12: 0.03 mg; D3: 3500 IU; riboflavin: 7.5 mg; niacin: 55 mg; pantothenic acid: 15 mg; pyridoxine: 4 mg; biotin: 0.25 mg and folic acid: 2 mg and minerals; Fe: 50 mg; Mn: 120 mg; Zn: 110 mg; I: 2 mg and Se: 0.3 mg per kg Diet (without vitamin E).

### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها با استفاده از PROC MIXED نرم‌افزار SAS (SAS Institute 2002) و ویرایش 9.1 و در قالب طرح فاکتوریل (۲×۵) تجزیه و تحلیل شدند. تفاوت میانگین بین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ انجام شد.

### نتایج و بحث

در این بررسی استفاده از سطوح بالا ویتامین E (۲۰۰-۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) عنوان پاداکسندۀ فراسنجه‌های ریخت‌شناسی بیضه (جدول ۲) و فراسنجه‌های بافت‌شناسی را به‌طور معنی‌داری بهبود بخشید (جدول ۳). وزن هر دو بیضه و قطر هر دو بیضه در گروه‌های E200، E300، E400 نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌دار افزایش یافتند ( $P \leq 0/05$ ). اما در گروه E100 افزایش معنی‌داری نداشتند. اندازه هر دو بیضه در گروه‌های تغذیه‌شده با ویتامین E نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌دار افزایش یافت ( $P \leq 0/05$ ). در نتایج بررسی‌های گذشته (Marin-Guzman *et al.*, 1997; Mehranjani *et al.*, 2009) افزایش در وزن و

طول و عرض بیضه در خوک و موش ناشی از ویتامین E را گزارش کردند. در این آزمایش اثر متقابل وزن و ویتامین E بر فراسنجه‌های ریخت‌شناسی بیضه معنی‌دار نشد (جدول ۲). ارزیابی لوله‌های اسپرم‌ساز راهکاری ساده برای پیش‌تغییر اسپرم‌سازی است. برخی لوله‌های 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.*, 2013). تغییر متناظر در خروس با افزایش سن کاهش ضخامت بافت پوششی زاینده، کاهش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخیم شدن فضای میان‌بافتی به دلیل هجوم فیبرهای کلاژن و فیبروبلاست‌ها و ظهور اسپرماتیدهای چندهسته‌ای است (Sarabia Frago *et al.*, 2013). 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 شده، زیرا از تغییر چرخه بافت پوششی لوله اسپرم‌ساز و یاخته‌های میوئید پیروی می‌کند (Altoe et al., 2014).

بنابر نتایج این آزمایش (شکل ۱)، شمار لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه‌های تغذیه‌شده با ویتامین E نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت و در گروه E400 بالاترین مقدار مشاهده شد ( $P \leq 0.05$ ). این بدین معنی است که با افزایش سطح ویتامین E نرخ باروری افزایش خواهد یافت. ضخامت بافت پوششی لوله‌های اسپرم‌ساز و شمار یاخته‌های لایدیگ در گروه‌های E200، E300، E400 نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد ( $P \leq 0.05$ ). برای این فراسنجه نیز گروه E400 بالاترین مقدار را داشتند، همچنین شمار رگ‌های خونی در دو گروه E300 و E400 افزایش معنی‌داری داشت ( $P \leq 0.05$ ). بررسی فراسنجه‌های تأثیرگذار بر باروری در خروس نشان داده است که در خروس‌های سنگین‌وزن سطح تستوسترون خون پایین‌تر از خروس‌های با وزن استاندارد است. در نتیجه بیضه دچار تحلیل‌شده و افزون بر کاهش وزن، بافت پوششی اسپرم‌ساز بیضه در آن‌ها کمتر شده و با بافت پیوندی جایگزین می‌شود.

در این آزمایش افزودن ویتامین E شمار لوله‌های اسپرم‌ساز را در گروه‌های E200، E300، E400 و ضخامت بافت پوششی لوله‌های اسپرم‌ساز، شمار یاخته‌های لایدیگ و رگ‌های خونی را در گروه E300 و E400 نسبت به گروه شاهد به‌صورت معنی‌داری افزایش داد ( $P \leq 0.05$ ).

تأثیر افزایش ویتامین E بر فراسنجه‌های مربوط به مایع منی و نرخ باروری در انسان، (Ener et al., 2016) و خروس (Moghbeli et al., 2016) و نشخوارکنندگان (Kargar et al., 2017) به‌خوبی روشن است. سازوکار احتمالی ویتامین E از طریق تأثیر مهاری آن بر تجزیه زنجیره PUFA و پیشگیری از تنش اکسایشی است (Rengaraj & Hong, 2015).

جدول ۲. تأثیر دو میانگین وزنی (استاندارد و سنگین) و سطوح مختلف ویتامین E (۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) بر فراسنجه‌های ریخت‌شناسی بیضه خروس‌های راس ۳۰۸

Table 2. Main effect of two BW type (S and H) and 5 different levels of vitamin E (0, 100, 200, 300, 400 mg/kg diet) on testis parameters of roosters (Means  $\pm$  SE)

Weight category	Vitamin E doses	Parameters					
		W. testis R (mg)	W. testis L (mg)	S. testis R (mm)	S. testis L (mm)	D. testis R (mm)	D. testis L (mm)
S		24.03 $\pm$ 1.06	24.90 $\pm$ 1.04	47.04 $\pm$ 0.90	46.73 <sup>b</sup> $\pm$ 0.84	25.42 <sup>b</sup> $\pm$ 0.37	25.29 <sup>b</sup> $\pm$ 0.46
H		24.43 $\pm$ 1.10	26.10 $\pm$ 1.29	49.41 $\pm$ 1.00	49.66 <sup>a</sup> $\pm$ 0.89	27.60 <sup>a</sup> $\pm$ 0.59	28.06 <sup>a</sup> $\pm$ 0.53
	0	19.75 <sup>c</sup> $\pm$ 1.74	19.45 <sup>c</sup> $\pm$ 1.72	42.87 <sup>b</sup> $\pm$ 1.79	43.20 <sup>b</sup> $\pm$ 1.40	24.15 <sup>c</sup> $\pm$ 0.89	24.36 <sup>b</sup> $\pm$ 0.83
	100	22.01 <sup>bc</sup> $\pm$ 1.66	23.66 <sup>bc</sup> $\pm$ 1.87	48.16 <sup>a</sup> $\pm$ 1.48	47.41 <sup>a</sup> $\pm$ 1.28	25.57 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.54	26.39 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.92
	200	24.81 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.61	27.45 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.17	49.86 <sup>a</sup> $\pm$ 1.16	50.25 <sup>a</sup> $\pm$ 0.96	26.91 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.90	26.79 <sup>a</sup> $\pm$ 1.08
	300	27.08 <sup>a</sup> $\pm$ 1.59	27.166 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.19	49.91 <sup>a</sup> $\pm$ 1.01	49.58 <sup>a</sup> $\pm$ 1.07	28.10 <sup>a</sup> $\pm$ 0.77	27.58 <sup>a</sup> $\pm$ 0.62
	400	27.58 <sup>a</sup> $\pm$ 0.66	29.33 <sup>a</sup> $\pm$ 0.59	50.35 <sup>a</sup> $\pm$ 1.07	50.63 <sup>a</sup> $\pm$ 1.35	27.75 <sup>a</sup> $\pm$ 0.55	28.16 <sup>a</sup> $\pm$ 0.67
	BW	0.8012	0.4616	0.0507	0.0058	0.0009	0.0001
P- Value	VE	0.0028	0.0011	0.0010	0.0002	0.0007	0.0066
	BW $\times$ VE	0.8319	0.9865	0.8605	0.7937	0.7644	0.9226

D. W. testis R: وزن بیضه راست، W. testis L: وزن بیضه چپ، S. testis R: سایز بیضه راست، size of left testis: سایز بیضه چپ، D. testis R: قطر بیضه راست، D. testis L: قطر بیضه چپ، BW: وزن بدن، H: سنگین‌وزن، SE: خطای استاندارد، S: وزن استاندارد، VE: ویتامین E، BW $\times$ VE: اثر متقابل وزن بدن و سطوح ویتامین E.

حروف متفاوت بالانویس در یک ردیف (a-b) برای وزن بدن و برای سطوح ویتامین E تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند ( $P \leq 0.05$ ). W. testis R.: weight of right testis, W. testis L.: weight of left testis, S. testis R.: size of right testis, S. testis L.: size of left testis, D. testis R: diameter of right testis, D. testis L: diameter of left testis BW: body weight, H: heavy weight, SE: standard error, S: standard weight, BW $\times$ VE: interactive effect of body weight and, VE: vitamin E, superscripts (A and B) for BW, (a-e) for VE levels within same column are differ significantly ( $p < 0.05$ ).

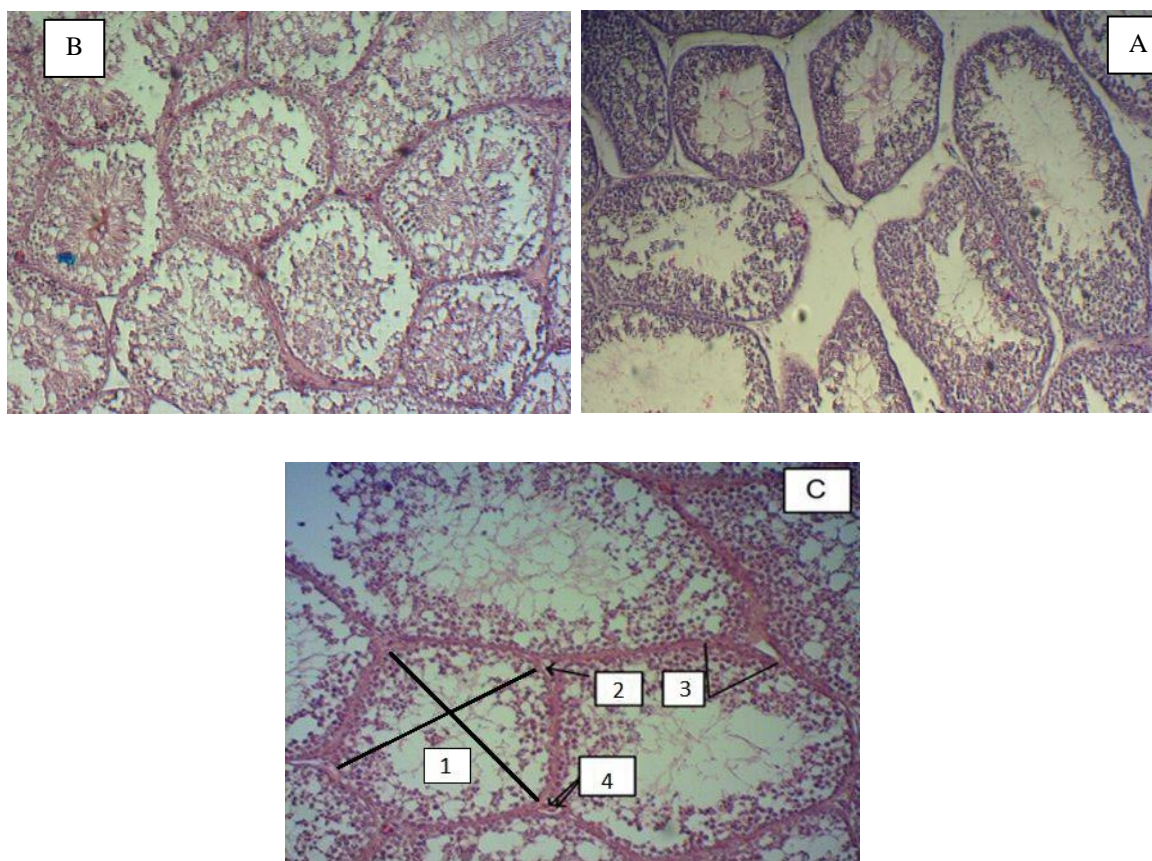


جدول ۳. تأثیر دو میانگین وزنی (استاندارد و سنگین) و سطوح مختلف E (۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) روی فراسنجه‌های بافت‌شناسی بیضه خروس‌های راس ۳۰۸

Table 3. Main effect of two BW type (S and H) and 5 different levels of VE (0, 100, 200, 300, 400 mg/kg diet) on Penetration rate, histological parameter of roosters (Means ± SE)

Weight category	Vitamin E doses	Parameters			
		Seminiferous tubules diameter (µm)	Seminiferous epithelium thickness (µm)	Leydig cells (n)	Blood vessels (n)
S		231.75 ±11.12	59.89 ±2.45	28.49 ± 1.09	1.94 ± 0.05
H		243.94 ±12.97	61.47 ± 3.25	29.50 ± 1.27	1.90 ± 0.06
	0	179.50 <sup>e</sup> ±9.92	47.722 <sup>d</sup> ±1.22	24.080 <sup>d</sup> ±0.87	1.758 <sup>c</sup> ±0.058
	100	224.40 <sup>b</sup> ±11.88	53.756 <sup>cd</sup> ±1.60	25.333 <sup>d</sup> ±0.48	1.770 <sup>c</sup> ± 0.047
	200	233.88 <sup>b</sup> ±12.95	60.733 <sup>bc</sup> ±3.30	28.042 <sup>c</sup> ±0.64	1.866 <sup>bc</sup> ±0.069
	300	255.39 <sup>b</sup> ± 7.55	67.724 <sup>ab</sup> ±3.54	32.042 <sup>b</sup> ±0.956	2.033 <sup>ab</sup> ±0.033
	400	297.54 <sup>a</sup> ±10.90	72.160 <sup>a</sup> ±3.90	35.133 <sup>a</sup> ±1.203	2.200 <sup>a</sup> ±0.079
P- Value	BW	0.1919	0.5746	0.1438	0.4704
	VE	<.0001	0.0003	.0001	0.0001
	BW×VE	0.2935	0.3296	0.0550	0.5423

Seminiferous tubules: لوله‌های اسپرم‌ساز، Seminiferous epithelium: ضخامت بافت پوششی لوله‌های اسپرم‌ساز، Leydig cell: یاخته‌های لایدیگ، Blood vessels: رگ‌های خونی، BW: وزن بدن، H: وزن سنگین، SE: خطای استاندارد، S: وزن استاندارد، VE: ویتامین E، BW×VE: اثر متقابل وزن بدن و سطوح ویتامین E. حرف‌های متفاوت بالانویس در یک ردیف (a-b) برای سطوح ویتامین E تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند (P≤۰/۰۵).  
Seminiferous tubules, seminiferous epithelium Leydig cell. Blood vessels BW: body weight, H: heavy weight, SE: standard error, S: standard weight, VE: vitamin E, BW×VE: interactive effect of body weight and vitamin E levels. Different superscripts (a-e) for VE levels within same column are differ.



شکل ۱. تصویر مقطع بافت بیضه خروس‌های مادر گوشتی سنگین A: تصویر مقطع بیضه خروس سنگین در گروه شاهد کاهش در شمار اسپرماتوگونی و واکنش‌های در بافت پوششی مشاهده می‌شود B: تصویری از بیضه خروس سنگین که دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E را دریافت کرده بود. C: فراسنجه‌های بافتی اندازه‌گیری شده شامل: ۱- قطر لوله، ۲- یاخته‌های لایدیگ، ۳- ضخامت بافت پوششی لوله‌های اسپرم‌ساز، ۴- رگ خونی

Figure 1. Cross sections of testes of roosters treated with different levels of vitamin e (0,100,200,300,400 mg/kg diet) for 18 weeks. Seminiferous tubule diameter, Seminiferous epithelium thickness, Lydig cells, 5: vessel blood. Magnification: 100 X. Scale bar: 50 µm A: control, B: 400 mg/kg diet vitamin E.

که به نظر می‌رسد مربوط به اختلال عملکرد غذایی آن‌ها است. همچنین لوله‌های اسپرم‌ساز در همان بیضه‌ها تغییرهای قابل‌توجهی در درجه‌های مختلف آسیب‌دیدگی نشان می‌دهند. طوری که چندین مرحله از این روند اغلب در لوله‌های مجاور دیده می‌شود. همه فرآیند تخریب به‌طور معمول ۳۵ تا ۵۰ روز برای کامل شدن نیاز دارد. در بررسی‌های مختلف همبستگی مثبت بین ضخامت بافت پوششی اسپرم‌ساز و باروری بیان شده است، همچنین بین وزن بیضه با باروری رابطه مستقیم وجود دارد. اما وزن بالای بدن رابطه منفی با باروری دارد که افزون بر دلایل ساختار بدنی (آناتومیکی) که امکان جفت‌گیری بهینه را از خروس سلب می‌کند، به کاهش سطح تستوسترون ناشی از افزایش تجمع چربی و افزایش فعالیت آنزیم آروماتاز مرتبط است (Dermanovic et al., 2013; Ali et al., 2017).

#### نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد، مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E به‌عنوان یک پاداکسنده در جیره خروس‌های مادر گوشتی سنگین موجب بهبود فراسنجه‌های بافت بیضه خروس‌های مادر گوشتی مانند لوله‌های اسپرم‌ساز، اپتلیوم لوله اسپرم‌ساز، یاخته‌های لایدیگ و اسپرماتوگونی شده است.

در بررسی Rohnavaz (2015) ویتامین E به‌عنوان یک پاداکسنده میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را افزایش داد. کاتالاز آنزیمی است که تاحدودی در همه موجودهای زنده و در بیشتر اندام‌های بدن یافت می‌شود. این آنزیم توان تجزیه بالا داشته، به‌طوری‌که یک مولکول کاتالاز قادر به تجزیه میلیون‌ها مولکول پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن در هر ثانیه است (Arockiaraj et al., 2012).

افزایش سطح آنزیم‌های پاداکسنده از جمله کاتالاز و بهبود ساختارهای منی‌ساز بیضه در سال ۲۰۱۳ گزارش شد (Kalender et al., 2013). نقش پاداکسندگی ویتامین E در مهار کردن تأثیر زیانبار رادیکال‌های آزاد در بیضه (Mendiola et al., 2010) و اسپرم (Agarwal et al., 2005) گزارش شده است. در دستگاه تناسلی نر، در موش‌های صحرایی با دادن جیره با کمبود ویتامین E در زمان شیرگیری تخریب بیضه‌ها به‌طور معمول پس از ۵۰ تا ۱۰۰ روز آغاز می‌شود. تغییرهای ریخت‌شناسی مشاهده‌شده شامل کرومولیز و فیوژن کامل اسپرم بالغ، حذف اسپرم از بیضه و انتقال به اپیدیدم که با تغییرهای غیرطبیعی هسته اسپرماتیدها و اسپرماتوسیت‌های ثانویه و دیواره یاخته‌ای همراه است (Mason, 1933). در نتایج یک بررسی (Kudrjaschov, 1930) نشان دادند، هسته یاخته‌های سرتولی تغییرهای ساختاری نشان می‌دهند

#### REFERENCES

1. Agarwal, A., Sharma, R. K. & Gupta, S. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3, 28-48.
2. Altoé, 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.
3. Arockiaraj, J., Easwvaran, S., Vanaraja, P., Singh, A., Othman, R.Y. & Bhassu, S. (2012). Molecular cloning, characterization and gene expression of an antioxidant enzyme catalase (MrCat) from *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32, 670-682.
4. Celeghini, E. C. C., Albuquerque, R., Arruda, R. P. & Lima, C. G. (2001). Seminal characteristics evaluation of the male broiler breeder selected by comb development to reproduction. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38, 177-183.
5. Cerolini, S., Zaniboni, L., Maldjian, A. & Gliozzi, T. (2006). Effect of docosahexaenoic acid and  $\alpha$ -tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology*, 66, 877-886.
6. Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59, 527-605.
7. Đermanović, V., Mitrović, S. & Đekić, V. (2013). Rooster body weight influence on the reproductive performance of the broiler parents. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 29, 83-91.
8. Emad Abdulgabbar A., Zhandi M., Towhidi, A., Zaghari, M. & Ansari, M. (2017). The effect of dietary Letrozole on plasma gonadotropin concentrations and some testicular histology parameters in 40 weeks old broiler breeder rooster. *Iranian Journal of Animal Science*, 48, 175-183. (in Farsi)

9. Ener, K., Aldemir, M., Işık, E., Okulu, E., Özcan, M., Uğurlu, M., Tangal, S. & Özayar, A. (2016). The impact of vitamin E supplementation on semen parameters and pregnancy rates after varicocelelectomy: a randomised controlled study. *Andrologia*, 48, 829-834.
10. F. Rohnavaz, T.M., Bayrami, A. & Zahiri, M. (2015). The effect of dietary Letrozole on plasma gonadotropin concentrations and some testicular histology parameters in 40 weeks old broiler breeder rooster. *Iran South Med*, 19(4), 511-525.
11. Halliwell, B. (1989). Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? *Acta Neurologica Scandinavica*, 80, 23-33.
12. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 246, 501-514.
13. Hornsby, P.J. (1989). Steroid and xenobiotic effects on the adrenal cortex: mediation by oxidative and other mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 6, 103-115.
14. Kalender, S., Uzun, F.G., Demir, F., Uzunhisarcıklı, M. & Aslanturk, A. (2013). Mercuric chloride-induced testicular toxicity in rats and the protective role of sodium selenite and vitamin E. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 456-462.
15. Kappus, H. (1987). Oxidative stress in chemical toxicity. *Archives of Toxicology*, 60, 144-149.
16. Kargar, R., Forouzanfar, M., Ghalamkari, G. & Esfahani, M.H.N. (2017). Dietary flax seed oil and/or Vitamin E improve sperm parameters of cloned goats following freezing-thawing. *Cryobiology*, 74, 110-114.
17. Kudrjaschov, B. (1930). Das vitamin E und die Produktion des Testikularhormons. *Endokrinol*, 7, 91-100.
18. Marin-Guzman, J., Mahan, D., Chung, Y., Pate, J. & Pope, W. (1997). Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. *Journal of Animal Science*, 75, 2994-3003.
19. Mason, K.E. (1933). Differences in testis injury and repair after vitamin A-deficiency, vitamin E-deficiency, and inanition. *Developmental Dynamics*, 52, 153-239.
20. Mehranjani, M.S., Noorafshan, A., Momeni, H., Abnosi, M., Mahmoodi, M., Anvari, M. & Hoseini, S. (2009). Stereological study of the effects of vitamin E on testis structure in rats treated with paronylphenol. *Asian Journal of Andrology*, 11, 508.
21. Mendiola, J., Torres-Cantero, A. M., Vioque, J., Moreno-Grau, J. M., Ten, J., Roca, M., Moreno-Grau, S. & Bernabeu, R. (2010). A low intake of antioxidant nutrients is associated with poor semen quality in patients attending fertility clinics. *Fertility and Sterility*, 93, 1128-1133.
22. Min, Y., Sun, T., Niu, Z. & Liu, F. (2016). Vitamin C and vitamin E supplementation alleviates oxidative stress induced by dexamethasone and improves fertility of breeder roosters. *Animal Reproduction Science*, 171, 1-6.
23. Moghbeli, M., Kohram, H., Zare-Shahaneh, A., Zhandi, M., Sharafi, M., Nabi, M. M., Zahedi, V. & Sharideh, H. (2016). Are the optimum levels of the catalase and vitamin E in rooster semen extender after freezing-thawing influenced by sperm concentration? *Cryobiology*, 72, 264-268.
24. Molapo, S. & Kompfi, P. (2016). The effect of cock: hen ratio on reproduction performance of koekoek chickens in the lowlands of lesotho. *Journal of Animal Production Advances*, 6, 884-888.
25. Partyka, A., Łukaszewicz, E. & Niżański, W. (2012). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in avian semen. *Animal Reproduction Science*, 134, 184-190.
26. Peltola, V., Huhtaniemi, I., Metsa-Ketela, T. & Ahotupa, M. (1996). Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrinology*, 137, 105-112.
27. Rengaraj, D. & Hong, Y. H. (2015). Effects of dietary vitamin E on fertility functions in poultry species. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 9910-9921.
28. Rikans, L. E., Moore, D. R. & Snowden, C. D. (1991). Sex-dependent differences in the effects of aging on antioxidant defense mechanisms of rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1074, 195-200.
29. Saemi, F., Zamiri, M., Akhlaghi, A., Niakousari, M., Dadpasand, M. & Ommati, M. (2012). Dietary inclusion of dried tomato pomace improves the seminal characteristics in Iranian native roosters. *Poultry Science*, 91, 2310-2315.
30. Sarabia Fragoso, J., Pizarro Díaz, M., Abad Moreno, J., 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.
31. Surai, P., Kutz, E., Wishart, G., Noble, R. & Speake, B. (1997). The relationship between the dietary provision of  $\alpha$ -tocopherol and the concentration of this vitamin in the semen of chicken: effects on lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 110, 47-51.



32. Surai, P. F. (1999). Vitamin E in avian reproduction. *Poultry and Avian Biology reviews* 10, 1-60.
33. Wilson, H., Piesco, N., Miller, E. & Nesbeth, W. (1979). Prediction of the fertility potential of broiler breeder males. *World's Poultry Science Journal*, 35, 95-118.
34. Wilson, M. J., Kaye, D., Smith, W. E., Quach, H. T., Sinha, A. A. & Vatassery, G. T. (2003). Effect of vitamin E deficiency on the growth and secretory function of the rat prostatic complex. *Experimental and Molecular Pathology*, 74, 267-275.
35. XU, Y. C., Jing, L., Liang, W. B., ZHU & W. J. (2013). Evaluation on Changes of Testicular Histology in Aging Men. *Journal of Reproduction and Contraception*, 24, 199-204.
36. Zaghari, M., Sedaghat, V. & Shivazad, M. (2013). Effect of vitamin E on reproductive performance of heavy broiler breeder hens. *Journal of Applied Poultry Research*, 22, 808-813.