Iranian Journal of Animal Science
Vol 48, No 1, Spring 2017 (141-151)
DOI: 10.22059/ijas.2017.225029.653494

علوم دامی ایران
دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۶ (ص ۱۵۱-۱۴۱)

تأثیر لتروزل بر کیفیت و باروری اسپرم منجمد- ذوب‌شده در خروس‌های مادر گوشتی

محبوب محمدی[۱]، احمد زارع‌شحنه[۲*]، سعید زین‌الدینی[۳] و مهدی انصاری[٤]

۱، ۲، ۳ و ٤. دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، دانشیار و دانشجوی دکتری، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۲٦ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۱/۳۰)

چکیده

در این پژوهش تأثیر تجویز خوراکی لتروزل بر غلظت تستوسترون پلاسما و کیفیت و باروری اسپرم خروس‌های مادر گوشتی پس از انجماد-یخ‌گشایی بررسی شد. بیست قطعه خروس سویهٔ راس ۳۰۸ با سن ۵۰ هفته به‌صورت تصادفی به چهار گروه پنج‌تایی در پن‌های انفرادی تقسیم و سطوح ۰ (کنترل)، ۰/۵ ($L_{0.5}$)، ۱ (L_1)، ۱/۵ ($L_{1.5}$) میلی‌گرم لتروزل به ازای هر پرنده در روز دریافت کردند. اسپرم‌گیری و گردآوری نمونهٔ خون برای اندازه‌گیری تستوسترون به‌صورت هفتگی و به ترتیب به مدت هفت و شش هفته انجام گرفت. در نمونه‌های مربوط به چهار هفته اول، فراسنجه‌های جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی و فعالیت غشای پلاسمایی پیش از انجماد و فراسنجه‌های یادشده و درصد اسپرم‌های نابهنجار پس از انجماد-یخ‌گشایی بررسی شد و نمونه‌های سه هفتهٔ بعدی پس از انجماد-یخ‌گشایی برای ارزیابی نفوذ اسپرم و نرخ باروری استفاده شد. بنا بر نتایج، جنبایی کل و پیش‌رونده و زندمانی پیش و پس از انجماد-یخ‌گشایی در گروه‌های تغذیه‌شده با لتروزل نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. همچنین فعالیت غشای پلاسمایی پیش و پس از انجماد-یخ‌گشایی و میزان نفوذ و باروری در گروه‌های $L_{0.5}$ و L_1 نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بهبود یافت اما تستوسترون در گروه $L_{1.5}$ نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت. با وجود مشاهدهٔ تأثیر منفی در سطح ۱/۵ میلی‌گرم لتروزل، به نظر می‌رسد سطوح ۰/۵ میلی‌گرم لتروزل برای هر پرنده در روز برای بهبود قابلیت انجماد اسپرم خروس قابل استفاده بوده، اما برای تأیید نتایج این پژوهش، نیاز به بررسی‌های بیشتری است.

واژه‌های کلیدی: **اسپرم، انجماد، باروری، تستوسترون، لتروزل.**

The effect of Letrozole on frozen-thawed sperm quality and fertility of broiler breeder roosters

Mahbub Mohammadi[1], Ahmad Zare-Shahaneh[2*], Saeid Zeinoaldini[3] and Mahdi Ansari[4]
1, 2, 3, 4. M.Sc. student, Professor, Associate Professor and Ph.D. Condidate, Department of Animal Science, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Jan. 15, 2017 - Accepted: Apr. 19, 2017)

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the effect of the oral administration of Letrozole on blood testosterone level and frozen-thawed sperm quality and fertility of broiler breeder roosters. Twenty 50-week-old Ross 308 roosters were randomly divided into four groups (five roosters per each), individually housed in pens and received 0 (Control), 0.5 (L0.5), 1 (L1) or 1.5 (L1.5) mg Letrozole/bird/day. Semen and blood collections were done weekly for seven and six weeks, respectively. Sperm quality parameters including total and forward motility, viability and plasma membrane functionality were assessed prior freezing and these parameters along with abnormality were evaluated using post-thawed semen samples. The last three weeks were frozen and artificially inseminated to evaluate sperm penetration and fertility rate. According to the results, total and forward motility and viability of fresh and frozen-thawed sperm were significantly higher in Letrozole treated groups compared to control group. Plasma membrane functionality of fresh and frozen-thawed sperm as well as penetration and fertility rates were significantly improved in both $L_{0.5}$ and L_1 groups compared to control group. However, blood testosterone level was significantly higher in $L_{1.5}$ than control group. In spite of observing negative effects in 1.5 level, both 0.5 mg of Letrozole/bird/day could improve sperm freezability of roosters, however, further research are needed to ascertain this results.

Keywords: Cryopreservation, fertility, Letrozole, sperm, testosterone.

* Corresponding author E-mail: azareh@ut.ac.ir Tel: +98 912 3614259

مقدمه

اگرچه تلاش‌های چندی برای گسترش کاربرد یک روش مناسب برای حفظ اسپرم خروس انجام شده اما تاکنون روش موفقی برای انجماد ارائه نشده است. نرخ باروری اسپرم منجمدشدهٔ طیور در مقایسه با دیگر گونه‌ها با چالش جدی روبه‌رو است این چالش ممکن است به برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی خاص اسپرم خروس مربوط شود که به افزایش حساسیت آن‌ها به فرآیند انجماد می‌انجامد (Shahverdi *et al*., 2015). عامل‌های غشائی اسپرم از جمله روانی (سیالیت) غشاء، نفوذپذیری و همچنین ترکیب‌های لیپیدی آن در نتیجهٔ انجماد اسپرم تحت تأثیر قرار می‌گیرند، به‌طوری‌که میزان روانی غشاء و میزان این ترکیب‌ها کاهش‌یافته و در نتیجه کیفیت اسپرم و باروری پرنده کاهش می‌یابد (Blesbois *et al*., 2005). اسپرم منجمدشده نسبت به اسپرم تازه، هنگامی‌که در یک برنامهٔ تلقیح مصنوعی با دُز مناسب و یکسانی استفاده می‌شود، باروری کمتری دارد (Buss, 1993). سازوکار دقیق کاهش باروری پس از انجماد و یخ‌گشایی هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است. توانایی بقا و لقاح اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی در میان گونه‌های طیور و سویه‌ها متفاوت است (Abouelezz *et al*., 2015). مقاومت اسپرم به تنش اسمزی و روانی غشاء به‌عنوان عامل‌های مؤثر در این پاسخ متفاوت، گزارش شده است (Blesbois *et al*., 2008; Holt, 2000) و نیز وجود ارتباط مستقیم بین کیفیت و باروری اسپرم تازه و پس از انجماد تأیید شده است (Blesbois *et al*., 2008). به‌طوری‌که کیفیت مناسب اولیهٔ منی به مقاومت اسپرم در برابر انجماد و یخ‌گشایی کمک می‌کند و کاهش کیفیت پس از انجماد و افزایش هرگونه آسیبی، می‌تواند ناشی از پایین بودن کیفیت اسپرم اولیه باشد. عامل‌های زیستی (بیولوژیکی) خاص مانند نفوذپذیری و روانی غشاء و همچنین کیفیت مناسب اسپرم اولیه ممکن است آسیب‌های ناشی از انجماد را کاهش دهد (Blesbois *et al*., 2008). در بررسی روی طیور نشان داده‌اند که کیفیت اولیهٔ اسپرم یعنی نسبت اسپرم زنده، ریخت‌شناسی طبیعی و نسبت اسپرم جنبا ممکن است بیانگر مناسب بودن اسپرم برای انجماد باشد (Blesbois *et al*., 2008). برخی بررسی‌ها در انسان نشان داده‌اند که قابلیت باروری اسپرم منجمدشده به‌طور عمده به کیفیت اولیهٔ اسپرم و همچنین به روش انجماد بستگی دارد (Esteves *et al*., 2003). اسپرم با کیفیت بالا مقاومت بیشتری در برابر انجماد و یخ‌گشایی خواهد داشت (Long, 2006).

نسبت آندروژن به استروژن برای فیزیولوژی یاخته‌های جنسی مهم باشد. این نسبت در مهره‌داران توسط آنزیمی به نام آروماتاز کنترل می‌شود (Séralini & Moslemi, 2001). آروماتاز کمپلکس آنزیمی است که در تخمدان، جفت، پستان، مغز، کبد، بافت چربی و بیضه یافت می‌شود و قادر به تسریع تبدیل برگشت‌ناپذیر آندروستندیون و تستوسترون به استرادیول و استروژن در بافت چربی، مغز و بیضه است (Raman & Schlegel, 2002; Saylam *et al*., 2011). این آنزیم نقش مهمی در رشد، تمایز جنسی، تولیدمثل و رفتار ایفا می‌کند (Carreau *et al*., 2001). استروژن بازدارندهٔ آزاد شدن GnRH در هیپوتالاموس و در نتیجه باعث مهار گناوتروپین‌ها در هیپوفیز می‌شود (Raven *et al*., 2006). مهارکننده‌های آروماتاز با مهار تبدیل تستوسترون به استروژن، می‌تواند غلظت سرمی استروژن را کاهش دهد و این به نوبهٔ خود، بازخورد (فیدبک) منفی در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گوناد را کاهش داده و با افزایش ترشح گونادوتروپین‌ها، تأثیر مثبتی بر روند اسپرم‌سازی داشته باشد (Gregoriou *et al*., 2012; Patry *et al*., 2009). بررسی‌ها نشان می‌دهد، برخی از مهارکننده‌های آروماتاز مانند لتروزل، با کاهش سطح استروژن و افزایش سطح آندروژن، افزایش یاخته‌های اسپرم‌ساز بیضه و همچنین تولید و باروری اسپرم را افزایش می‌دهد (Cardone *et al*., 2002). لتروزل نسل جدیدی از مهارکنندهٔ آروماتاز غیراستروئیدی است که نسبت به دیگر مهارکننده‌های آروماتاز، قوی‌تر و اختصاصی‌تر عمل می‌کند (Cavallini *et al*., 2011; Thurlimann *et al*., 2005). بررسی‌ها نشان می‌دهد، مصرف روزانهٔ لتروزل باعث مهار آروماتاز می‌شود و در نتیجه سطوح گناوتروپین‌ها و تستوسترون افزایش

می‌یابد (T'Sjoen *et al*., 2005). در مردان کم‌بارور با نسبت پایین تستوسترون به استروژن (Raman & Schlegel, 2002; Saylam *et al*., 2011) و الیگواسپرمی شدید (شمار اسپرم کم در هر انزال) (Gregoriou *et al*., 2012)، استفاده از لتروزل باعث افزایش نسبت تستوسترون به استروژن و همچنین افزایش فراسنجه‌های کیفی اسپرم از جمله غلظت، کیفیت، جنبایی، باروری اسپرم و حجم مایع منی شد. لتروزل با آنزیم آروماتاز در بافت‌های ترشح‌کنندهٔ استروژن تعامل کرده و با کاهش سطح استروژن، سطوح گونادوتروپین‌ها و تستوسترون سرم را افزایش می‌دهد (Gregoriou *et al*., 2012). پژوهش‌های مختلفی برای بهبود کیفیت و باروری اسپرم خروس انجام شده است که از آن جمله می‌توان به مکمل کردن جیره با اسیدآمینه (Dong *et al*., 2016)، تغییر میزان پروتئین جیره (Romero-Sanchez *et al*., 2007) و افزودن ویتامینE و اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA) (Cerolini *et al*., 2006) اشاره کرد. بنابراین هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر خوراکی لتروزل به‌عنوان مهارکننده آروماتاز بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس‌های مادر گوشتی پیش از انجماد و کیفیت و باروری آن پس از انجماد-یخ‌گشایی است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

مواد شیمیایی مصرف‌شده در این آزمایش به‌غیراز موارد یادشده از شرکت سیگما (St. Louis, MO, USA) و مرک (Darmstadt, Germany) خریداری شد.

مدیریت مزرعه و تیمارها

این پژوهش در ایستگاه آموزشی و پژوهشی علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد. بیست قطعه خروس مادر گوشتی سویهٔ راس ۳۰۸ در ۵۰ هفتگی از گلهٔ تجاری انتخاب و به‌صورت تصادفی به چهار گروه پنج‌تایی تقسیم شدند، سپس به‌صورت جداگانه در لاوک (پن)های ۱/۲×۱/۲ متری در دمای ۲۴ - ۲۱ درجهٔ سلسیوس و با دورهٔ نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند. خروس‌ها یک رژیم غذایی مشترک با ۲۷۵۴/۵۷ کیلوکالری در کیلوگرم جیرهٔ انرژی قابل سوخت‌وساز (متابولیسم)، ۱۲ درصد پروتئین، ۰/۷ درصد کلسیم و ۰/۳۵ درصد فسفر قابل‌دسترس دریافت کردند (جدول ۱). آب به‌صورت آزاد در دسترس آن‌ها قرار گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل سطوح ۰ (کنترل)، ۰/۵ ($L_{./۵}$)، ۱ ($L_{۱}$)، ۱/۵ ($L_{1.5}$) میلی‌گرم لتروزل (شرکت سها، ساوجبلاغ، کرج، ایران) به ازای هر پرنده در روز بود و برای اطمینان از دریافت کامل تیمارها توسط پرنده تیمارها به‌صورت کپسوله به آن خورانده شد.

گردآوری نمونه‌های خون و منی

خروس‌ها به مدت دو هفته با روش مالش شکمی برای اسپرم‌گیری عادت‌دهی شدند (Burrows & Quinn, 1936). نمونه‌های اسپرم به‌صورت هفتگی و به مدت هفت هفته گردآوری شد. بی‌درنگ پس از گردآوری، مایع منی به درون اتاقک رشد (انکوباتور با ۳۷ درجهٔ سلسیوس) منتقل شد. معیارهای اولیه از جمله حجم، رنگ، کیفیت و جنبایی ارزیابی شد. در این پژوهش انزالی استفاده شد که دارای حجم ۰/۹-۰/۳ میلی‌لیتر، جنبایی بیشتر از ۸۰ درصد و اسپرم‌های غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد باشد (Nabi *et al*., 2016). نمونه‌های مربوط به چهار هفتهٔ اول برای تعیین فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل جنبایی، جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی و فعالیت غشای پلاسمایی و فراسنجه‌های یادشده همراه با درصد نابهنجاری در نمونه‌های پس از انجماد-یخ‌گشایی‌شده بررسی شد. نمونه‌های سه هفتهٔ بعدی پس از انجماد-یخ‌گشایی برای ارزیابی نفوذ اسپرم و نسبت باروری استفاده شدند. برای اندازه‌گیری تستوسترون پلاسمای خون، خون‌گیری از پرندگان نیز به‌صورت هفتگی انجام و نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی مادهٔ ضد انعقاد (EDTA) ریخته و سانتریفوژ (۱۰ دقیقه، ۱۳۰۰×g) شد. نمونه‌های پلاسمای جداشده، در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری و در نهایت غلظت تستوسترون با کیت الیزا (ELISA مونوبایند، کالیفرنیا، آمریکا) (۰/۰۵۷۶ نانوگرم در میلی‌لیتر) اندازه‌گیری شد.

تهیهٔ رقیق‌کننده

ترکیب رقیق‌کنندهٔ اسپرم به‌صورت زیر بود: دی پتاسیم فسفات (۷/۵۹ گرم در لیتر) سدیم گلوتامات (۸/۶۷ گرم در لیتر) دی فروکتوز (۵ گرم در لیتر) سدیم استات (۳/۲ گرم در لیتر) n-تریس (هیدروکسی متیل) متیل ۱-۲-آمینو اتان سولفونیک (TES) (۳/۲ گرم در لیتر)، پتاسیم سیترات (۰/۶۴ گرم در لیتر)، منو پتاسیم فسفات (۰/۷ گرم در لیتر)، منیزیم کلرید (۰/۳۴ گرم در لیتر)، لسیتین سویا (۵ درصد وزنی حجمی)، دی متیل سولفوکساید (DMSO) (۰/۴۷ درصد حجمی). پیش از مخلوط کردن DMSO و لسیتین سویا، فشار اسمزی در ۳۱۰ میلی‌اسمول در کیلوگرم و pH رقیق‌کننده در ۷/۴ تنظیم شد (Ansari *et al.*, 2017).

روش انجماد-یخ‌گشایی

انزال هر خروس به‌صورت جداگانه گردآوری‌شده و با رقیق‌کنندهٔ بالا، رقیق‌سازی (غلظت نهایی ۴۰۰×۱۰^{۶} اسپرم در میلی‌لیتر) و بی‌درنگ در نی‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شد. از پودر پلی وینیل الکل برای بستن سر نی‌ها استفاده شد آنگاه نی‌ها درون یخچال با دمای ۵ درجهٔ سلسیوس به مدت دو ساعت نگهداری شدند. در مرحلهٔ بعد، نمونه‌های منی در فاصلهٔ ۵ سانتی‌متری بالای نیتروژن مایع به مدت هفت دقیقه قرار گرفتند. در نهایت نی‌ها درون نیتروژن مایع غوطه‌ور و به تانک نیتروژن منتقل شدند. پیش از ارزیابی فراسنجه‌های مورد نظر، نی‌ها به‌صورت انفرادی در حمام آب ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه یخ‌گشایی شدند (Shahverdi *et al.*, 2015).

ارزیابی فراسنجه‌های اسپرم پیش و پس از انجماد-یخ‌گشایی

جنبایی

برای تعیین فراسنجه‌های جنبایی و جنبایی پیش‌رونده، نمونه‌های اسپرم پیش و پس از انجماد-یخ‌گشایی به ترتیب با نسبت ۱:۲۰ و ۱:۲ با محلول سدیم سیترات ۲/۹ درصد رقیق‌سازی شدند. سپس یک قطره از منی رقیق‌شده روی لام (اسلاید) قرار گرفت و با لامل پوشش داده شد. برای جلوگیری از تکانهٔ (شوک) سرمایی محلول سدیم سیترات، لام و لامل درون اتاقک رشد با دمای ثابت ۳۷ درجهٔ سلسیوس قرار گرفت. جنبایی و جنبایی پیش‌رونده با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰X و به شیوهٔ چشمی ارزیابی شد (Akhlaghi *et al.*, 2014).

جدول ۱. اجزاء و ترکیب شیمیایی جیرهٔ پایه در دورهٔ آزمایش
Table 1. Ingredients and the chemical composition of basal diet during the experimental period

Item (%)	Roosters	Hens
Corn	69.5	69.48
Soybean meal	9	20
Wheat bran	19.5	2
Dicalcium phosphate	0.18	1.4
Calcium carbonate	0.85	6.2
Sodium chloride	0.35	0.3
DL-Met	0.12	0.12
Vitamin premix*	0.25	0.25
Trace mineral premix**	0.25	0.25
Total	100	100
Chemical composition		
ME (kcal/kg)	2754.5	2800
CP	12	15
Ca	0.7	3
Available P	0.35	0.35
Na	0.15	0.15
Cl	0.15	0.16
K	0.6	0.6
Digestible amino acids		
Lysine	0.46	0.6
Methionine	0.39	0.3
Methionine & Cysteine	0.49	0.56
Tryptophan	0.12	0.14
Arginine	0.67	0.79
Valine	0.5	0.56
Leucine	0.53	0.94
Isoleucine	0.4	0.53
Threonine	0.37	0.47

* هر کیلوگرم جیرهٔ خروس‌های مادر گوشتی ۱۵۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامینA ؛ ویتامین E، ۳۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین K_3، ۴ میلی‌گرم؛ ویتامین B_{12}، ۲۵ میکروگرم؛ ویتامین D_3، ۳۰۰۰ واحد بین‌المللی؛ بیوتین، ۵۰میکروگرم؛ ریبوفلاوین، ۷/۵ میلی‌گرم؛ نیاسین، ۵۰ میلی‌گرم؛ پیردوکسین، ۵/۵ میلی‌گرم؛ پنتوتنیک اسید، ۱۸ میلی‌گرم و اسیدفولیک ۱/۵ میلی‌گرم دارد.

* هر کیلوگرم جیرهٔ مرغ‌های مادر ۱۱۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامینA ؛ ویتامین E ۱۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین K_3 ۵ میلی‌گرم؛ ویتامین B_{12} ۰/۰۳ میلی‌گرم؛ ویتامین D3 ۳۵۰۰ واحد بین‌المللی؛ بیوتین ۰/۲۵ میلی‌گرم؛ ریبوفلاوین ۱۲ میلی‌گرم؛ نیاسین ۵۵ میلی‌گرم؛ پیرودوکسین ۴ میلی‌گرم؛ پنتوتنیک اسید ۱۵ میلی‌گرم و اسیدفولیک ۲ میلی‌گرم دارد.

** هر کیلوگرم جیرهٔ خروس‌های مادر گوشتی ۵۰ میلی‌گرم آهن، ۱۲۰ میلی‌گرم منگنز، ۱۱۰ میلی‌گرم روی، ۱۰/۹ میلی‌گرم مس، ۰/۳ میلی‌گرم سلنیوم و ۲ میلی‌گرم ید دارد.

** هر کیلوگرم جیرهٔ مرغ‌های مادر۵۰ میلی‌گرم آهن، ۱۲۰ میلی‌گرم منگنز، ۱۱۰ میلی‌گرم روی، ۱۰ میلی‌گرم مس، ۰/۳ میلی‌گرم سلنیوم و ۲ میلی‌گرم ید دارد.

* Supplied per kg diet broiler breeder roosters: vitamin A, 15,000 IU; vitamin E, 30 IU; vitamin K3, 4 mg; vitamin B12, 25 µg; vitamin D, 3,000 IU; biotin, 50 µg; riboflavin, 7.5 mg; niacin, 50 mg; pyridoxine, 5.5 mg; pantothenic acid, 18 mg and folic acid, 1.5 mg

* Supplied per kg diet broiler hens: vitamin A, 11,000 IU; vitamin E, 100 IU; vitamin K3, 5 mg; vitamin B12, 0.03 mg; vitamin D, 3,500 IU; biotin, 0.25 mg; riboflavin, 12 mg; niacin, 55 mg; pyridoxine, 4 mg; pantothenic acid, 15 mg and folic acid, 2 mg

** Supplied per kg diet broiler breeder roosters: Fe, 50 mg; Mn, 120 mg; Zn, 110 mg; Cu, 10.9; I, 2 mg and Se, 0.3 mg.

** Supplied per kg diet broiler hens: Fe, 50 mg; Mn, 120 mg; Zn, 110 mg; Cu, 10.9; I, 2 mg and Se, 0.3 mg.

قابلیت زنده‌مانی و ریخت‌شناسی اسپرم

درصد اسپرم زنده و مرده با رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین انجام شد. برای این منظور نمونه‌های پیش و پس از انجماد-یخ‌گشایی به ترتیب به نسبت ۱:۲۰ و ۱:۲ با محلول سدیم سیترات ۲/۹ درصد رقیق‌سازی شدند. یک قطره از مایع منی رقیق‌شده روی لام قرار گرفته و با یک قطرهٔ کوچک رنگ ائوزین-نیگروزین مخلوط و گسترش یافت. درصد اسپرم زنده و مرده با شمارش ۲۰۰ اسپرم در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰X مشخص شد (Akhlaghi *et al*., 2014; Moghbeli *et al*., 2016). اسپرم‌هایی که رنگ نگرفته و به‌عنوان اسپرم زنده و اسپرم‌هایی که رنگ را جذب کرده بودند به‌عنوان اسپرم مرده در نظر گرفته شد. همچنین برای بررسی ریخت‌شناختی (مورفولوژی) اسپرم در نمونه‌های منجمد-یخ‌گشایی شده، اسپرم‌های با سر جدا شده، سر ناقص، سر دوتایی، دم پیچ‌خورده، دم دوتایی و دم جدا شده به‌عنوان اسپرم‌های غیرطبیعی در نظر گرفته شد (Akhlaghi *et al*., 2014; Lukaszewicz *et al*., 2008).

فعالیت غشای پلاسمایی

آزمون تورم هیپواسموتیک (HOST) برای ارزیابی عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم پیش و پس از انجماد-یخ‌گشایی انجام گرفت. این آزمون به مقاومت غشای اسپرم در شرایط تنش‌زای محیط هیپواسموتیک بستگی دارد. برای انجام این آزمون، ۵ میکرولیتر نمونه‌های منی پیش و پس از منجمد-یخ‌گشایی شده با ۲۵۰ میکرولیتر محلول هیپواسموتیک (۱ گرم سدیم سیترات در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب) مخلوط و در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری (انکوبه) شد. سپس یک قطره از آن روی لام قرار گرفته و با لامل پوشش داده شد. در نهایت درصد اسپرم‌های با دم و ناحیهٔ میانی پیچ‌خورده (غشای پلاسمایی سالم) نسبت به اسپرم‌های صاف، با شمردن ۲۰۰ اسپرم در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰X تعیین شد (Akhlaghi *et al*., 2014).

تلقیح مصنوعی و گردآوری تخم‌مرغ

برای تلقیح مصنوعی، ۱۲۰ قطعه مرغ تخم‌گذار سویهٔ آرین با میانگین سنی ۳۸ هفته انتخاب شده و یک رژیم غذایی مشترک با ۲۸۰۰ کیلوکالری در کیلوگرم انرژی، ۱۵درصد پروتئین، ۳درصد کلسیم و ۰/۳۵درصد فسفر قابل‌دسترس دریافت کردند (جدول۱). نمونهٔ منی هر خروس از هر تیمار پس از ذوب به‌صورت جداگانه به شش مرغ تلقیح شد (۱۰۰×۱۰^{۶} اسپرم برای هر مرغ). توانایی باروری اسپرم با استفاده از سه تلقیح مصنوعی در فاصله‌های سه روز برآورد شد. تخم‌مرغ‌ها دو روز پس از نخستین تلقیح تا چهار روز پس از آخرین تلقیح (۹ روز) به‌صورت روزانه گردآوری و شماره‌گذاری شد و به‌منظور اطمینان از غلظت اسپرم تلقیح‌شده و دقت در تلقیح مصنوعی، تخم‌مرغ‌های مربوط به دو روز اول (روز سوم و چهارم پس از نخستین تلقیح) برای سنجش نفوذ اسپرم استفاده شد. تخم‌مرغ‌های تولیدی طی هفت روز بعد، پس از گازدهی با فرمالین (۲۰ دقیقه) به دستگاه جوجه‌کشی انتقال یافت.

نفوذ اسپرم

روش نفوذ اسپرم به غشای پری‌ویتلین به‌عنوان شاخص کلی باروری استفاده می‌شود که در آن شمار روزنه‌های بیشتر، نشان‌دهندهٔ توانایی بالای اسپرم برای لقاح است (Bramwell *et al*., 1996). در این بررسی تخم‌مرغ‌ها شکسته شده و زرده از سفیده به‌طور کامل جدا شد، آنگاه در محلول NaCl ۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه برای حذف هرگونه آلبومین باقی‌مانده قرار گرفت. صفحهٔ زایندهٔ موجود روی زرده به سمت بالا قرار گرفته و با قیچی برداشته شد، آنگاه زائدهٔ جداشده به آهستگی با کمک پنس روی یک لام کشیده شد و با استفاده از فرمالین ۵درصد عمل شستشو روی لام انجام گرفت، سپس با محلول ۱ درصد NaCl شستشو داده شد. یک تا دو قطره محلول پریودیک اسید (Periodic acid solution) روی غشاء ریخته شد و غشاء به مدت یک تا دو دقیقه در آن غوطه‌ور شد، دوباره با محلول ۱ درصد NaCl شستشو داده شد. در نهایت پس از اضافه کردن معرف شیف (این معرف در

رنگ‌آمیزی بافت‌های زیستی یا بیولوژیک با هدف شناسایی آلدهیدهایی به کار می‌رود که در فرآیند واکنش اسید پریودیک با گلیکوژن، موکوپروتئین‌ها و دیگر کربوهیدرات‌های سنگین تشکیل شده‌اند و در فرآیند واکنش پایانه‌های آلدهیدی آزاد با معرف شیف یا بی‌رنگ، رنگ ارغوانی ایجاد می‌شود)، نمونه در دمای آزمایشگاه خشک شده و روزنه‌های موجود در یک میدان دید (۰/۵ میلی‌متر مربع)، با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی X ۴۰) شمارش شد (Sharideh *et al*., 2016).

نرخ باروری

تخم‌مرغ‌های ذخیره‌شده، در دستگاه جوجه‌کشی با دمای ۳۷/۵ درجهٔ سلسیوس و رطوبت ۶۵ درصد به مدت هفت روز قرار گرفت. در این بررسی تخم‌مرغ‌ها در روز هفتم جوجه‌کشی شکسته شده و میزان باروری بر پایهٔ شمار تخم‌مرغ‌های بارور نسبت به شمار کل تخم‌مرغ‌های خوابانده‌شده در دستگاه سنجیده شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

داده‌های گردآوری‌شده با استفاده از آزمون Shapiro-wilk برای آزمون عادی‌سازی (نرمالیته) بررسی شدند و از تبدیل Arcsin برای داده‌های غیرعادی استفاده شد. دادهای کیفیت اسپرم و داده‌های مربوط به هورمون تستوسترون با استفاده از طرح اندازه‌گیری‌های تکرارشونده و با رویهٔ MIXED تجزیه‌وتحلیل شد. همچنین داده‌های باروری با رویهٔ GLM تجزیه شد (SAS 9.1). مقایسهٔ میانگین‌ها با روش LS means برای آزمون توکی و در سطح آماری P<۰/۰۵ انجام شد.

$$y_{ijk} = \mu + treat_i + Rooster(treat)_{jk} + week_j + (treat \times week)_{ij} + e_{ijk}$$

y_{ijk}: مشاهدهijk

μ: میانگین کل

$Treat_i$: اثر تیمار i

$Week_j$: اثر دوره j

(treat × week): اثر متقابل تیمار در دوره

$Rooster\ (treat)_{ik}$: اثر خروس در تیمار

e_{ijk}: اثر باقی‌مانده

مدل آماری برای داده‌های باروری:

$$Y_{ijk}= \mu + treat_i + Rooster\ (treat)_{jk} + e_{ijk}$$

y: داده‌های باروری

μ: میانگین کل

$treat_i$: اثر تیمار iام (i=۱،۲،۳،۴)

$Rooster\ (treat)_{ik}$: اثر خروس در تیمار

e_{ijk}: اثر باقی‌مانده

نتایج و بحث

تأثیر سطوح مختلف لتروزل بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم پیش و پس از انجماد-یخ‌گشایی به ترتیب در جدول‌های ۲ و ۳ آورده شده است. در این پژوهش برای نخستین بار تأثیر لتروزل بر فراسنجه‌های کیفی پیش و قابلیت انجماد و باروری پس‌ازآن بر اسپرم خروس بررسی شد و این تیمار توانست به‌طور معنی‌داری فراسنجه‌های کیفی اسپرم را در نمونه‌های پیش و پس از انجماد-یخ‌گشایی و نیز غلظت پلاسمایی تستوسترون را در خروس‌های مادر گوشتی بهبود دهد. جنبایی و جنبایی پیش‌روندهٔ اسپرم پیش از انجماد در گروه $L_{۰/۵}$ و همین فراسنجه‌ها پس از انجماد-یخ‌گشایی در خروس‌های تغذیه‌شده با لتروزول بهبود یافت. اثر متقابل تیمار در زمان پیش و پس از انجماد برای فراسنجه‌های جنبایی و جنبایی پیشرونده معنی‌دار نبود. نتایج این آزمایش با بررسی Saylam *et al.* (2011) همخوانی داشت که در آن مصرف روزانهٔ لتروزل نسبت تستوسترون به استروژن، حجم منی، غلظت و جنبایی اسپرم را در مردان نابارور به میزان شایان توجهی افزایش داد. در بررسی دیگری که روی مردان با اولیگواسپرمی شدید و نسبت پایین تستوسترون به استروژن انجام شد، مصرف مهارکنندهٔ آروماتاز باعث افزایش نسبت تستوسترون به استروژن و فراسنجه‌های کیفی اسپرم همچون حجم منی، غلظت، جنبایی و کیفیت اسپرم شد (Gregoriou *et al*., 2012). به‌احتمال بهبود جنبایی در سطوح $L_{۰/۵}$ و $L_{۱}$ از راه افزایش تستوسترون خون میانجی‌گری شده است. زیرا بررسی‌های گذشته نشان داده‌اند که افزایش تستوسترون خون با افزایش pH مجرای اسپرم‌بر و

فعال‌سازی مسیرهای وابسته به cAMP سبب بهبود جنبایی اسپرم می‌شود (Miura *et al*., 1992).

زنده‌مانی و درصد اسپرم‌های دارای غشای فعال نیز پیش و پس از انجماد-یخ‌گشایی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر لتروزل قرار گرفتند. (جدول‌های ۲ و ۳). اثر متقابل تیمار در زمان برای زنده‌مانی (نمودار ۱) و اسپرم‌های دارای غشای فعال (نمودار ۲) در نمونه‌های پس از انجماد-یخ‌گشایی روند تا حدودی یکسانی برای این دو فراسنجه داشتند. به‌طوری‌که از اواسط آزمایش به بعد تیمار L۰/۵ توانسته به‌طور معنی‌داری اسپرم‌های زنده و دارای غشای فعال را نسبت به دیگر گروه‌های تیماری افزایش دهد. سازوکار دقیق این اثرگذاری مشخص نیست ولی تیمار با استروژن باعث کاهش تدریجی گنادوتروپین‌ها و تستوسترون شده و منجر به آپوپتوز همهٔ یاخته‌های جنسی از جمله اسپرماتیدها می‌شود. از سوی دیگر تستوسترون می‌تواند روند آپوپتوز یاخته‌ها را مهار کرده و موجب بقاء و زنده‌مانی یاخته‌های زایا و اسپرماتیدها شود (Dimitriadis *et al*., 2015). بنابراین در این آزمایش، تستوسترون ممکن است از راه افزایش بقاء و زنده‌مانی یاخته‌های زایا و اسپرماتیدها، زنده‌مانی و فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم را تحت تأثیر قرار دهد. اثر متقابل تیمار در زمان برای زنده‌مانی و فعالیت غشای پلاسمایی برای نمونه‌های پیش از انجماد معنی‌دار نبود.

تأثیر تیمار بر درصد اسپرم‌های نابهنجار پس از انجماد-یخ‌گشایی معنی‌دار بود (جدول ۳) ولی تأثیر زمان و برهمکنش آن با تیمار معنی‌دار نبود. تیمار L۰/۵ و L۱ به‌طور معنی‌داری نسبت به کنترل و سطح بالاتر لتروزل درصد اسپرم نابهنجار کمتری داشتند. وجود ارتباط پاراکرینی بین اسپرماتیدها و یاخته‌های سرتولی گزارش شده است و تستوسترون اتصال‌های سرتولی و اسپرماتید را تنظیم می‌کند و در نبود آن اسپرم‌ها آزاد نشده و توسط یاخته‌های سرتولی بلعیده می‌شوند (Smith & Walker, 2014). نبود تستوسترون یا سطح نامناسب آن ممکن است کارایی انتخاب یاخته‌های طبیعی را کاهش داده و اسپرم‌های نابالغ یا با ریخت‌شناختی غیرطبیعی آزاد شوند افزون براین لولهٔ فرابیضه (اپیدیدیم) نیز به‌عنوان محل ذخیره و بلوغ اسپرم برای کنش مناسب خود به نسبت مناسبی از تستوسترون و استرادیول نیازمند است.

جدول ۲. تأثیر سطوح مختلف لتروزل بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم در خروس‌های مادر گوشتی

Table 2. The effect of different levels of Letrozole on sperm quality parameters in broiler breeder roosters

Parameters	Treatments (LSM±SE)*				P value		
	Control	$L_{0.5}$	L_{1}	$L_{1.5}$	Treat	week	Treat× week
Total motility (%)	82±0.76^{c}	91.85±0.79^{a}	88.25±1.04^{b}	87.50±0.67^{b}	<0.01	0.71	0.60
Forward motility (%)	70.50±0.88^{c}	79.25±0.65^{a}	75.25±1.11^{b}	77.50±0.76^{ab}	<0.01	0.70	0.06
Viability (%)	80.25±0.88^{b}	85.20±0.43^{a}	85.10±0.41^{a}	82.95±0.45^{a}	<0.01	0.44	0.92
Membrane functionality (%)	63.50±0.36^{b}	66.20±0.83^{a}	65.95±0.78^{a}	60.90±0.81^{c}	<0.01	0.07	0.76

* تیمارها شامل ۰ (شاهد)، ۰/۵ ($L_{0.5}$)، ۱ (L_{1}) یا ۱/۵ ($L_{1.5}$) میلی‌گرم لتروزل به ازای هر پرنده در روز

a، b، c) میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرهمسان اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

* Treatment groups including: 0 (Control), 0.5 ($L_{0.5}$), 1 (L_{1}) or 1.5 ($L_{1.5}$) mg Letrozole/bird/day

a, b, c) Means with different superscript letters within a row are statistically significant ($p < 0.05$).

جدول ۳. تأثیر سطوح مختلف لتروزل بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم منجمد-ذوب شده و غلظت تستوسترون پلاسما در خروس‌های مادر گوشتی

Table 3. The effect of different levels of Letrozole on quality parameters of frozen-thawed sperm and plasma testosterone level in broiler breeder roosters

Parameters	Treatments (LSM±SE)*				P value		
	Control	$L_{0.5}$	L_{1}	$L_{1.5}$	Treat	week	Treat× week
Total motility (%)	45.21±2.42^{b}	55.80±2.26^{a}	56.9±2.34^{a}	55.1±1.85^{a}	0.02	<0.01	0.19
Forward motility (%)	39.30±2.32^{b}	49.15±2.19^{a}	50.55±2.15^{a}	47.9±1.8^{a}	0.03	0.01	0.22
Viability (%)	47.48±1.49^{b}	55.90±2.32^{a}	50.21±1.31^{a}	50.40±1.01^{a}	0.04	0.32	<0.01
Abnormality (%)	2.72±0.24^{a}	1.74±0.18^{b}	1.94±0.17^{b}	2.78±0.14^{a}	<0.01	0.4	0.14
Membrane functionality (%)	32.72±1.15^{c}	40.20±0.80^{a}	36.16±0.88^{b}	35.23±0.75^{bc}	<0.01	0.62	0.05
Testosterone (ng/ml)	4.87±0.07^{c}	5.24±0.09^{b}	5.36±0.08^{b}	5.67±0.1^{a}	<0.01	0.17	0.14

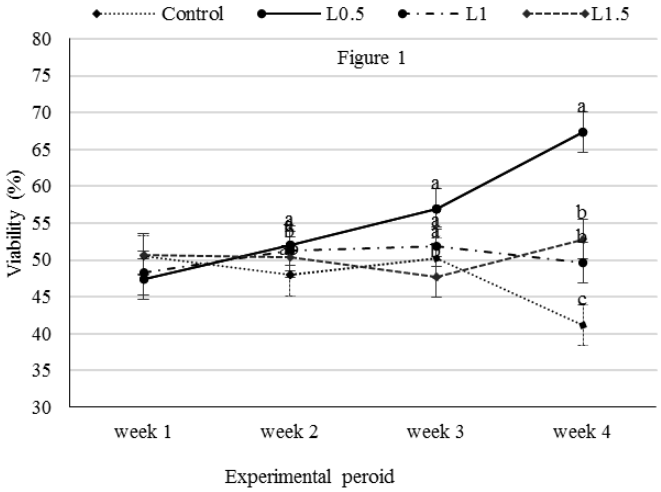
* تیمارها شامل ۰ (شاهد)، ۰/۵ ($L_{0.5}$)، ۱ (L_{1}) یا ۱/۵ ($L_{1.5}$) میلی‌گرم لتروزل به ازای هر پرنده در روز

a، b، c) میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرهمسان اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

* Treatment groups including: 0 (Control), 0.5 ($L_{0.5}$), 1 (L_{1}) or 1.5 ($L_{1.5}$) mg Letrozole/bird/day

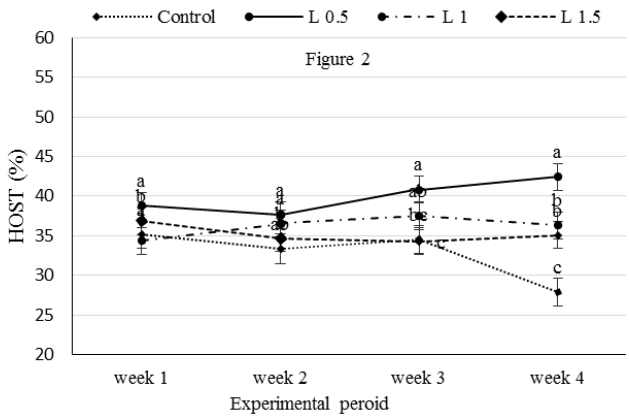
a, b, c) Means with different superscript letters within a row are statistically significant ($p < 0.05$).

لتروزل در سطح $L_{۱/۵}$ تأثیر کمتری نسبت به سطح‌های $L_{۰/۵}$ و $L_{۱}$ بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم و باروری خروس‌های گلهٔ مادر گوشتی داشت. علت آن، می‌تواند کاهش شدید فعالیت آروماتاز و غلظت استروژن در پلاسمای خون و بیضه در دزهای بالای لتروزل باشد. شواهدی برای هر دو اثرگذاری سودمند و زیانبار استروژن بر یاخته‌های بیضه و اسپرماتیدها وجود دارد (Dimitriadis *et al*., 2015). در خروس افزایش سطح استروژن باعث مهار ترشح گنادوتروپین در هیپوفیز می‌شود، بنابراین برای افزایش فعالیت بیضه و باروری خروس لازم است تولید استروژن در بافت‌های تولیدکنندهٔ استروژن مهار شود. مهار تولید استروژن می‌تواند باعث افزایش غلظت LH و تستوسترون شده و تولید اسپرم و باروری را بهبود بخشد (Weil *et al*., 1999). به‌طوری‌که LH باعث ترشح تستوسترون از یاخته‌های لایدیگ شده و آن‌هم به نوبهٔ خود برگیرندهٔ آندروژن در سطح یاخته‌های بافت پوششی (اپیتلیوم) اسپرم‌ساز اثر کرده و روند اسپرم‌سازی را کنترل می‌کند. باوجوداینکه فرآیند تولید اسپرم به غلظت بالای گنادوتروپین‌ها و تستوسترون نیاز دارد، اما استروژن هم می‌تواند در این فرآیند نقش داشته باشد به‌طوری‌که مهار کامل آروماتاز و کاهش شدید تولید استروژن تأثیر همسان با تولید بیش‌ازحد استروژن داشته و عملکرد لولهٔ وابران، افزایش یاخته‌های سرتولی و یاخته‌های لایدیگ، رشد و تمایز یاخته‌های زاینده (germ cells) و در نتیجه تولید اسپرم مختل می‌شود (O'donnell *et al*., 2001). در بررسی میمون‌هایی که از لتروزل برای افزایش سطح تستوسترون استفاده کردند نشان دادند، با وجود افزایش تستوسترون سرم، کاهش شایان توجهی در غلظت و کیفیت اسپرم رخ داد (Shetty *et al*., 1997). در بیضهٔ استروژن دو گیرندهٔ ERα و ERβ دارد که در بسیاری از یاخته‌های بیضه از جمله یاخته‌های سرتولی، یاخته‌های لایدیگ و یاخته‌های زایا و همچنین در بافت پوششی و لوله وابران دیده می‌شود (O'donnell *et al*., 2001; Shaha, 2008). افزون بر این‌ها گیرندهٔ استروژن در اسپرم و لولهٔ فرابیضه نیز مشاهده شده است و در صورت کمبود آن، بلوغ کامل اسپرم و تحرک آن کاهش می‌یابد (Carreau *et al*., 2009). همچنین گزارش شده است که نبود استروژن به دلیل یک جهش در ژن p450 آروماتاز، منجر به تولید اسپرم‌های نابهنجار، کاهش غلظت اسپرم و آپوپتوز یاخته‌های زاینده می‌شود (Carreau *et al*., 2007). در مردان کاهش شدید آروماتاز و استروژن منجر به کاهش در غلظت و تحرک اسپرم می‌شود (Carreau *et al*., 2008) بنابراین افزون بر گنادوتروپین‌ها و تستوسترون، به‌احتمال استروژن نیز در روند تولید و بلوغ نهایی اسپرم و نیز در جنبایی و زندمانی اسپرم نقش دارد.



نمودار ۱. تغییر هفتگی زندمانی اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی. تیمارها شامل ۰ (شاهد)، ۰/۵ ($L_{0.5}$)، ۱ (L_1) یا ۱/۵ ($L_{1.5}$) میلی‌گرم لتروزل به ازای هر پرنده در روز. a، b، c: میانگین‌تیمارها در هر هفته با حرف‌های غیرهمسان اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

Figure 1. Weekly variation in sperm viability. Treatment groups including: 0 (Control), 0.5 ($L_{0.5}$), 1 (L_1) or 1.5 ($L_{1.5}$) mg Letrozole /bird/day. a, b, c: Means with different superscript letters within a row are statistically significant ($p < 0.05$).



نمودار ۲. تغییر هفتگی در صد اسپرم‌های دارای غشای فعال پس از انجماد- یخ‌گشایی. تیمارها شامل ۰ (شاهد)، ۰/۵ ($L_{0.5}$)، ۱ (L_1) یا ۱/۵ ($L_{1.5}$) میلی‌گرم لتروزل در روز. a، b، c: میانگین‌های هر ردیف با حرف‌های غیرهمسان اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

Figure 2. Weekly variation in percentage of sperm with functional membrane. Treatment groups including: 0 (Control), 0.5 ($L_{0.5}$), 1 (L_1) or 1.5 ($L_{1.5}$) mg Letrozole/bird/day. a, b, c: Means with different superscript letters within a row are statistically significant ($p < 0.05$).

تأثیر سطوح مختلف لتروزل بر نفوذ اسپرم به غشای پری‌ویتلین و باروری خروس‌ها در جدول ۴ آورده شده است. تأثیر تیمار بر نفوذ اسپرم به غشای پری‌ویتلین و باروری خروس‌ها معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). تیمار $L_{1/5}$ و $L_{0/5}$ به ترتیب کمترین نفوذ اسپرم و بیشترین نرخ باروری را داشت (جدول ۴). نرخ باروری اسپرم در فرآیند انجماد به‌طور شایان توجهی کاهش می‌یابد افزون براین برای بارورسازی تخم‌مرغ به شمار مناسبی از اسپرم زنده در لوله‌های ذخیرهٔ اسپرم خروس نیاز است. بنابراین تأثیر لتروزل بر نفوذ اسپرم و باروری ممکن است به واسطهٔ تأثیر آن بر بهبود جنبایی (Raman & Schlegel, 2002; Saylam *et al*., 2011) و زنده‌مانی (Dimitriadis *et al*., 2015) اسپرم باشد.

جدول ۴. تأثیر سطوح مختلف لتروزل بر نفوذ اسپرم به غشای پری‌ویتلین و باروری اسپرم منجمد-ذوب شده در خروس‌های مادر گوشتی

Table 4. The effect of different levels Letrozole on frozen-thawed sperm fertility and penetration in broiler breeder roosters

Parameter	Treatments (LSM±SE)*				P value
	Control	$L_{0.5}$	L_1	$L_{1.5}$	
Sperm penetration¶	13.80 ± 1.28^{bc}	16.80 ± 1.24^{ab}	17.75 ± 1.37^{a}	13.20 ± 0.86^{c}	0.02
Fertility (%)	36.69 ± 5.66^{c}	54.4 ± 2.83^{a}	47.93 ± 2.99^{ab}	40.83 ± 1.88^{bc}	0.01

* تیمارها شامل ۰ (شاهد)، ۰/۵ ($L_{0/5}$)، ۱ (L_1) یا ۱/۵ ($L_{1/5}$) میلی‌گرم لتروزل به ازای هر پرنده در روز.

¶بر پایهٔ شمار روزنه‌های شمارش‌شده در مساحت ۰/۵ میلی‌متر مربع صفحهٔ زاینده

a، b، c: میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرهمسان اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

*Treatment groups including: 0 (Control), 0.5 ($L_{0.5}$), 1 (L_1) or 1.5 ($L_{1.5}$) mg Letrozole/bird/day.

¶Calculated based on number of holes in 0.5 mm^2 of germinal disc.

a, b, c: Means with different superscript letters within a row are statistically significant ($p< 0.05$).

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی در این پژوهش استفاده از سطح ۰/۵ میلی‌گرم لتروزل برای هر پرنده در روز توانست برخی از فراسنجه‌های کیفی اسپرم از جمله جنبایی، جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشاء را پیش و پس از انجماد-یخ‌گشایی شده و همچنین باروری را در خروس‌های مادر گوشتی بهبود دهد.

سپاسگزاری

بخشی از هزینه‌های انجام این تحقیق به‌وسیله معاونت علمی دانشگاه تهران (طرح شماره ۷۱۰۸۰۱۱/۶/۴۷) تأمین گردیده است و همچنین از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور که از این طرح به شماره ۹۵۸۳۶۶۶۹ نیز حمایت مالی کرده است، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Abouelezz, F. M., Castano, C., Toledano-Diaz, A., Esteso, M. C., Lopez-Sebastian, A., Campo, J. L. & Santiago-Moreno, J. (2015). Effect of the interaction between cryoprotectant concentration and cryopreservation method on frozen/thawed chicken sperm variables. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(1), 135-141.
2. Akhlaghi, A., Ahangari, Y. J., Navidshad, B., Pirsaraei, Z. A., Zhandi, M., Deldar, H., Peebles, E. D. (2014). Improvements in semen quality, sperm fatty acids, and reproductive performance in aged Cobb 500 breeder roosters fed diets containing dried ginger rhizomes (Zingiber officinale). *Poultry Science*, 93(5), 1236-1244.
3. Akhlaghi, A., Jafari Ahangari, Y., 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(1-2), 64-73.
4. Ansari, M., Zhandi, M., Kohram, H., Zaghari, M., Sadeghi, M. & Sharafi, M. (2017). Improvement of post-thawed sperm quality and fertility of Arian rooster by oral administration of D-aspartic acid. *Theriogenology*.
5. Blesbois, E., Grasseau, I. & Seigneurin, F. (2005). Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction*, 129(3), 371-378.
6. Blesbois, E., Grasseau, I., Seigneurin, F., Mignon-Grasteau, S., Saint Jalme, M. & Mialon-Richard, M. M. (2008). Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology*, 69(2), 252-261.
7. Bramwell, R. K., McDaniel, C. D., Wilson, J. L. & Howarth, B. (1996). Age effect of male and female broiler breeders on sperm penetration of the perivitelline layer overlying the germinal disc. *Poultry Science*, 75(6), 755-762.
8. Burrows, W. & Quinn, J. (1936). The Collection of Spermatozoa from the Domestic Fowl and Turkey. *Poultry Science*, 16(1), 19-24.
9. Buss, E. G. (1993). Cryopreservation of rooster sperm. *Poultry Science*, 72(5), 944-954.
10. Cardone, A., Comitato, R., Bellini, L. & Angelini, F. (2002). Effects of the aromatase inhibitor fadrozole on plasma sex steroid secretion, spermatogenesis and epididymis morphology in the lizard, Podarcis sicula. *Molecular Reproduction and Development*, 63(1), 63-70.
11. Carreau, S., Bourguiba, S., Lambard, S., Galeraud-Denis, I., Genissel, C., Bilinska, B., Levallet, J. (2001). Aromatase expression in male germ cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 79(1-5), 203-208.
12. Carreau, S., de Vienne, C. & Galeraud-Denis, I. (2008). Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances. *Advances in Medical Sciences*, 53(2), 139-144.
13. Carreau, S., Delalande, C. & Galeraud-Denis, I. (2009). Mammalian sperm quality and aromatase expression. *Microscopy Research and Technique*, 72(8), 552-557.
14. Carreau, S., Silandre, D., Bois, C., Bouraima, H., Galeraud-Denis, I. & Delalande, C. (2007). Estrogens: a new player in spermatogenesis. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 11(3), 174-193.
15. 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(6), 895-897.
16. 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(4), 877-886.
17. 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 (Athens)*, 14(4), 479-503.
18. Dong, H. J., Wu, D., Xu, S. Y., Li, Q., Fang, Z. F., Che, L. Q., Lin, Y. (2016). Effect of dietary supplementation with amino acids on boar sperm quality and fertility. *Animal Reproduction Science*, 172, 182-189.
19. Esteves, S. C., Spaine, D. M., Cedenho, A. P. & Srougi, M. (2003). Effects of the technique of cryopreservation and dilution/centrifugation after thawing on the motility and vitality of spermatozoa of oligoasthenozoospermic men. *International Brazilian Journal of Urology*, 29(2), 133-140.
20. Gregoriou, O., Bakas, P., Grigoriadis, C., Creatsa, M., Hassiakos, D. & Creatsas, G. (2012). Changes in hormonal profile and seminal parameters with use of aromatase inhibitors in management of infertile men with low testosterone to estradiol ratios. *Fertility and Sterility*, 98(1), 48-51.
21. Holt, W. V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 3-22.
22. Long, J. A. (2006). Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? *Poultry Science*, 85(2), 232-236.

23. Lukaszewicz, E., Jerysz, A., Partyka, A . &Siudzinska, A. (2008). Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. *Research in Veterinary Science*, 85(3), 583-588.
24. Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H. & Nagahama, Y. (1992). The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. *Journal of experimental zoology*, 261(3), 359-363.
25. Moghbeli, M., Kohram, H., Zare-Shahaneh, A., Zhandi, M., Sharafi, M., Nabi, M. M., 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(3), 264-268.
26. Nabi, M. M., Kohram, H., Zhandi, M., Mehrabani-Yeganeh, H., Sharideh, H., Zare-Shahaneh, A. & Esmaili, V. (2016). Comparative evaluation of Nabi and Beltsville extenders for cryopreservation of rooster semen. *Cryobiology*, 72(1), 47-52.
27. O'donnell, L., Robertson, K. M., Jones, M. E. & Simpson, E. R. (2001). Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, 22(3), 22.
28. Patry, G., Jarvi, K., Grober, E. D. & Lo, K. C. (2009). Use of the aromatase inhibitor letrozole to treat male infertility. *Fertility and Sterility*, 92(2), 829.e1-829.e2.
29. Raman, J. D. & Schlegel, P. N. (2002). Aromatase inhibitors for male infertility. *The Journal of Urology*, 167(2 Pt 1), 624-629.
30. 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. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(9), 3324-3328.
31. Romero-Sanchez, H., Plumstead, P. W. & Brake, J. (2007). Feeding broiler breeder males. 1. Effect of feeding program and dietary crude protein during rearing on body weight and fertility of broiler breeder males. *Poultry Science*, 86(1), 168-174.
32. 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(2), 809-811.
33. Séralini, G.-E. & Moslemi, S. (2001). Aromatase inhibitors: past, present and future. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 178(1–2), 117-131.
34. Shaha, C. (2008). Estrogens and spermatogenesis. *Advances in experimental medicine and biology*, 636, 42-64.
35. Shahverdi, A., Sharafi, M., Gourabi, H., Yekta, A. A., Esmaeili, V., Sharbatoghli, M., Mostafayi, F. (2015). Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology*, 83(1), 78-85.
36. Sharideh, H., Esmaeile Neia, L., Zaghari, M., Zhandi, M., Akhlaghi, A. & Lotfi, L. (2016). Effect of feeding guanidinoacetic acid and L-arginine on the fertility rate and sperm penetration in the perivitelline layer of aged broiler breeder hens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(2), 316-322.
37. Shetty, G., Krishnamurthy, H., Krishnamurthy, H. N., Bhatnagar, S. & Moudgal, R. N. (1997). Effect of estrogen deprivation on the reproductive physiology of male and female primates. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 61(3-6), 157-166.
38. Smith, L. B. & Walker, W. H. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 30, 2-13.
39. 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. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(10), 5717-5722.
40. Thurlimann, B., Keshaviah, A., Coates, A. S., Mouridsen, H., Mauriac, L., Forbes, J. F., Goldhirsch, A. (2005). A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 353(26), 2747-2757.
41. Weil, S., Rozenboim, I., Degen, A. A., Dawson, A., Friedländer, M. & Rosenstrauch, A. (1999). Fertility Decline in Aging Roosters Is Related to Increased Testicular and Plasma Levels of Estradiol. *General and Comparative Endocrinology*, 115(1), 23-28.