مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۶، شماره۱، ۱۴۰۰، ۱۰۲-۹۴
مقاله پژوهشی

تأثیر مکمل ال-کارنیتین در جیره‌ی جوجه‌خروس‌های نابالغ بر بافت‌شناسی بیضه، شاخص‌های اسپرماتوژنز و لیپوپروتئین‌های پلاسما در پیک تولید

وحید محمدی[۱]، سیدداود شریفی[۱]، محسن شرفی[۲]، عبداله محمدی-سنگ چشمه[۱]

[۱] گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۲] گروه علوم طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۵ مهر ماه ۱۳۹۹، تاریخ پذیرش: ۴ آذر ماه ۱۳۹۹
10.22059/jvr.2020.290133.2977 https://dorl.net/dor/20.1001.1.20082525.1400.76.1.11.9

چکیده

زمینهٔ مطالعه: پروفایل لیپوپروتئین پلاسما یکی از مکانیسم‌های مؤثر در توسعه‌ی بافت بیضه و فرآیند اسپرماتوژنز در خروس‌ها است.

هدف: مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر مکمل ال-کارنیتین در جیره‌ی جوجه خروس‌های نابالغ بر هیستولوژی بیضه، شاخص‌های اسپرماتوژنز و لیپوپروتئین‌های پلاسما در پیک تولید اجرا شد.

روش‌کار: ۱۲ قطعه خروس مادر گوشتی سویه‌ی راس (۱۲ هفتگی) به مدت ۲۲ هفته، در یک طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار (سطوح صفر و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ال-کارنیتین در جیره) و شش تکرار استفاده شد. برنامه‌ی خوراک‌دهی و نوردهی بر اساس کاتالوگ سویه‌ی راس ۳۰۸ انجام گرفت. برای دستیابی به اهداف تحقیق، در سن ۳۴ هفتگی به‌طور تصادفی چهار پرنده از هر تیمار انتخاب و پس از خونگیری از سیاهرگ زیر بال کشتار شدند. در نهایت غلظت کلسترول، LDL و HDL پلاسما با استفاده از کیت تجاری مخصوص و شاخص‌های بافتی بیضه (تعداد سلول‌های اسپرم‌ساز، سلول‌های سرتولی، قطر لوله منی‌ساز، ارتفاع اپی‌تلیوم منی‌ساز، ضریب تمایز لوله‌ای و ضریب اسپرماتوژنز) پس از تهیه مقاطع پارافینی پنج میکرومتری، با نرم افزار SAS بررسی شدند.

نتایج: نتایج نشان داد که تعداد لوله‌های منی‌ساز و سلول‌های سرتولی به طور معنی‌داری تحت تأثیر ال-کارنیتین جیره‌ای قرار گرفت ($P<۰/۰۵$). مکمل‌سازی ال-کارنیتین در جیره جوجه‌خروس‌ها پیش از بلوغ جنسی باعث افزایش معنی‌داری در شاخص اسپرماتوژنز ($P<۰/۰۰۳$)، و شاخص تمایز لوله‌ای ($P<۰/۰۲$) شد. میزان HDL به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر مکمل ال-کارنیتین قرار گرفت ($P<۰/۰۰۷$). یک تمایل به معنی‌داری در غلظت LDL ($P=۰/۰۹$)، و نسبت LDL/HDL ($P=۰/۰۵۹$)، بین تیمارها مشاهده شد، ولی بین تیمارها تفاوت معنی‌داری از لحاظ کلسترول مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری نهایی: بر اساس نتایج این مطالعه، تغذیه جوجه‌خروس‌های نابالغ با ۲۵۰ میلی‌گرم ال-کارنیتین توسعه‌ی بافت بیضه و فرآیند اسپرماتوژنز را بهبود می‌بخشد.

کلمات کلیدی: خروس، بافت‌شناسی، بیضه، لیپوپروتئین‌ها، ال-کارنیتین

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: سیدداود شریفی، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: sdsharifi@ut.ac.ir

مقدمه

مرغ‌های مادر گوشتی از اجزای اساسی صنعت طیور می‌باشند، که هدف اصلی از پرورش آن‌ها تولید بیشترین تعداد تخم‌مرغ بارور است. از این‌رو، در این گله‌ها باروری مهم‌ترین ضرورت برای دستیابی به سودآوری نهایی است. پرندگان نر و ماده هر دو در باروری نقش دارند، بدلیل این‌که تنها ۱۰-۱۲ درصد گله را خروس تشکیل می‌دهد و در ۵۰ درصد ژنتیک نتاج شرکت دارد، بنابراین جنس نر نقش مهم‌تری نسبت به ماده در باروری و تولید جوجه‌های گوشتی ایفا می‌نماید (۲۱). در سال‌های اخیر بیشتر مطالعات در زمینه گله‌های مادر گوشتی، به بررسی مشکلات تولید مثلی و باروری در مراحل انتهایی دوره تولید متمرکز شده‌اند (۲،۳،۹،۱۵،۲۹).

در صورتی که در ابتدای دوره‌ی تولید پرنده از سیستم تناسلی تکامل‌یافته و باروری مناسبی برخوردار باشد، می‌تواند نوید بخش یک زندگی تولیدمثلی ایده‌آل پس از اوج تولید باشد. گنادهای خروس مولد گوشتی بالغ به صورت مجزا، با ارتباطات سلولی و بخش‌های عملکردی سازمان یافته‌اند (۳۲). بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی و شاخص‌های اسپرماتوژنز (تولید اسپرماتوزوآ) دو عملکردی هستند که اساساً بیضه‌ها انجام می‌دهند. بیضه‌ها حاوی لوله‌های اسپرم‌ساز و فضای بینابینی هستند، که لوله‌های اسپرم‌ساز عناصر عملکردی بیضه‌اند و سلول‌های سرتولی اساس ساختاری لوله‌های اسپرم‌ساز بر روی غشاء پایه می‌باشند. سلول‌های سرتولی "سلول‌های پرستار" مسئول مهیا کردن انرژی و مواد مغذی برای توسعه سلول‌های بنیادی به منظور دسترسی به اسپرماتوژنز موفق می‌باشند (۱۹،۲۵).

این سلول‌های پرستار از سوبستراها و مسیرهای مختلفی برای تحقق نیازهای متابولیکی خود استفاده می‌کنند، که بتا-اکسیداسیون اسیدهای چرب مسیر اصلی تولید ATP در آن‌ها است. به‌طوری‌که، سلول‌های سرتولی تولید انرژی را زمانی‌که گلیکولیز بلوکه می‌شود، حفظ می‌کنند، با این حال در صورت بلوکه شدن بتا-اکسیداسیون تولید ATP در این سلول‌ها بسیار کاهش می‌یابد (۳۳).

Rato و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند که شاخص‌های اسپرماتوژنز موفق وابسته به عملکرد طبیعی سلول‌های سرتولی است (۲۴). از طرفی، تستوسترون هورمونی استروئیدی است که برای اسپرماتوژنز و باروری جنس نر ضروری است (۱۴،۲۸).

Ergun و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که لیپوپروتئین‌ها میزان عرضه استرول مورد نیاز برای انجام برخی از فعالیت‌های سلولی از جمله شکل‌گیری غشاءها و سنتز هورمون‌های استروئیدی را تنظیم می‌کنند (۵). همبستگی بین لیپوپروتئین‌های سرم و سلول‌های جنسی، پشتیبان و فعالیت ترشحی سلول‌های لایدیگ بافت بیضه مشخص شده است (۱۰).

ال-کارنیتین "ماده مغذی مولتی‌فانکشن" ترکیبی است که در کبد، کلیه و مغز از دو اسید آمینه ضروری لایزین و متیونین سنتز می‌شود. در سلول‌های زنده بدن عملکرد اصلی این ترکیب تسهیل عبور اسیدهای چرب از غشای میتوکندری به منظور ورود به چرخه بتا-اکسیداسیون است (۱۲). اهمیت ال-کارنیتین در تولید مثل جنس نر، وقتی برجسته‌تر شد که گزارش گردید غلظت آن در پلاسمای منی و لومن اپیدیدیمال در حدود ۲۰۰۰ -۱۰۰ برابر بیشتر از پلاسمای خون است (۸). این شبه‌ویتامین علاوه بر تنظیم هموستازی انرژی، همچنین دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپاپتوزی در سیستم تناسلی می‌باشد (۱۷،۲۳،۲۶). Palmero و همکاران در سال ۲۰۰۰ گزارش کردند که ال-کارنیتین یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی عملکرد سلول‌های سرتولی می‌باشد (۲۲).

با توجه به اینکه جیره‌ی طیور اساساً یک ماهیت گیاهی دارد و از لحاظ ال-کارنیتین فقیر است و از طرفی لایزین و متیونین به ترتیب اولین و دومین اسیدآمینه محدود کننده در جیره پرندگان می‌باشند، از این‌رو، به نظر می‌رسد با گنجاندن ال-کارنیتین به جیره جوجه‌خروس‌های نابالغ بتوان به بافت بیضه توسعه یافته‌ای در پرندگان دست یافت و در نهایت عملکرد تولید مثلی را بهبود بخشید. تا به حال هیچ مطالعه‌ای در ارتباط با تأثیر ال-کارنیتین جیره بر بافت‌شناسی بافت بیضه، شاخص‌های اسپرماتوژنز و لیپوپروتئین‌های پلاسمای خروس‌های مولد گوشتی گزارش نشده است. بنابراین مطالعه حاضر به منظور بررسی تأثیر ال-کارنیتین در جیره‌ی جوجه‌خروس‌های نابالغ بر فراسنجه‌های بافت‌شناسی بیضه، شاخص‌های اسپرماتوژنز و لیپوپروتئین‌های پلاسما در زمان پیک تولید صورت گرفت.

مواد و روش‌کار

پرندگان و جیره‌ها: مطالعه حاضر در خرداد ماه سال ۱۳۹۷، در مرکز تحقیقات طیور پردیس ابوریحان- دانشگاه تهران انجام شد. مواد شیمیایی مورد استفاده در مطالعه حاضر از شرکت‌های سیگما (sigma; St, Louis, Mo ,USA) و مرک (Merck Darmstadt, Germany) خریداری گردید. در مطالعه حاضر تعداد دوازده قطعه خروس مولد گوشتی سویه تجاری راس ۳۰۸ در سن دوازده هفتگی، به شیوه‌ی تصادفی در دو گروه شش‌تایی (۶ تکرار) قرار گرفتند. خروس‌ها در قفس‌های جداگانه انفرادی نگه‌داری شدند و اندازه‌ی قفس‌ها ۱*۱/۲*۱/۲ متر مکعب در نظر گرفته شد. در ابتدای آزمایش تا ۲۰ هفتگی ۸ ساعت روشنایی و ۱۶ ساعت تاریکی اعمال گردید و تحریک نوری در سن ۲۱ هفتگی صورت گرفت و ساعات روشنایی به ۱۴ ساعت افزایش یافت. جیره‌ی پرندگان بر اساس احتیاجات توصیه شده در کاتالوگ راس ۳۰۸، تنظیم و در مزرعه‌ی پرورش مرغ مادر گوشتی بهپرور ساخته شد (جدول ۱). بعد از دوره‌ی عادت دهی، ال-کارنیتین (صفر و ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) در جیره گنجانده شد و خوراک روزانه به طور دقیق (گرم در روز) به وسیله‌ی ترازوی دیجیتال توزین و در اختیار پرندگان قرار گرفت. دسترسی پرنده‌ها به آب به صورت آزاد بود. دمای سالن نیز با استفاده از دماسنج در محدوده‌ی ۲۴ - ۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

جدول۱. مواد خوراکی و ترکیب شیمیائی جیره پایه.

ماده خوراکی	مقدار (درصد)
دانه ذرت	۶۹/۰۰
کنجاله‌ی سویا (۴۴ درصد پروتئین)	۸/۵۰
سبوس گندم	۱۹/۱۹
دی کلسیم فسفات	۱/۴۰
نمک	۰/۳۲
صدف	۰/۸۰
دی-ال-متیونین	۰/۱۱
مکمل معدنی[۱]	۰/۲۵
مکمل ویتامینه[۲]	۰/۲۵
مواد مغذی محاسبه شده	
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری در کیلوگرم)	۲۷۵۴
پروتئین (درصد)	۱۲
کلسیم (درصد)	۰/۷
فسفر (درصد)	۰/۳۵
سدیم (درصد)	۰/۱۵
ال-لایزین (درصد)	۰/۴۵
دی ال-متیونین (درصد)	۰/۲۹
متیونین + سیستئین (درصد)	۰/۴۹

[۱]مکمل معدنی حاوی ۱۰۰۰۰۰ میلی‌گرم روی، ۶۰۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم مس، ۶۰۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۲۰۰۰ میلی‌گرم ید، ۲۰۰ میلی‌گرم سلنیوم بود. [۲] مکمل ویتامینه دارای ۱۲ میلیون واحد بین‌المللی ویتامین A، سه میلیون واحد بین‌المللی ویتامین D۳، صدهزار واحد بین‌المللی ویتامین E، ۳۰۰۰ میلی‌گرم تیامین، ۱۲۰۰۰ میلی‌گرم B۲، ۱۵۰۰۰ میلی‌گرم B۳، ۵۵۰۰۰ میلی‌گرم B۵، ۴۰۰۰ میلی‌گرم B۶، ۴۰ میلی‌گرم B۱۲، ۵۰۰۰ میلی‌گرم K۳، ۲۵۰ میلی‌گرم بیوتین و یک کیلوگرم کولین کلراید بود.

جدول ۲. اثرات ال-کارنیتین جیره بر شاخص‌های بافت‌شناسی بیضه خروس‌های مولد گوشتی.

فراسنجه	ال-کارنیتین (میلی‌گرم بر کیلوگرم)		خطای استاندارد	مقدار احتمال
	۰	۲۵۰		
لوله‌های منی‌ساز (تعداد)	۱۰/۴۳ [b]	۱۹/۰۶[a]	۳/۵۷	۰/۰۱
سلول‌های سرتولی (تعداد)	۲۲/۷۵ [b]	۲۷/۱۸ [a]	۲/۰۲	۰/۰۲
ارتفاع اپی‌تلیوم منی‌ساز (میکرومتر)	۵۵/۹۵	۵۹/۶۶	۳/۹۵	۰/۱۸
قطر لوله منی‌ساز (میکرومتر)	۱۳۷/۰۳	۱۴۰/۲۰	۱/۷۷	۰/۰۶۶

[a-b] میانگین‌ها با حروف نامشابه درون هر ردیف تفاوت معنی‌داری نسبت به هم دارند ($P<۰/۰۵$).

جدول ۳. اثرات ال-کارنیتین جیره بر شاخص‌های اسپرماتوژنز خروس‌های مولد گوشتی.

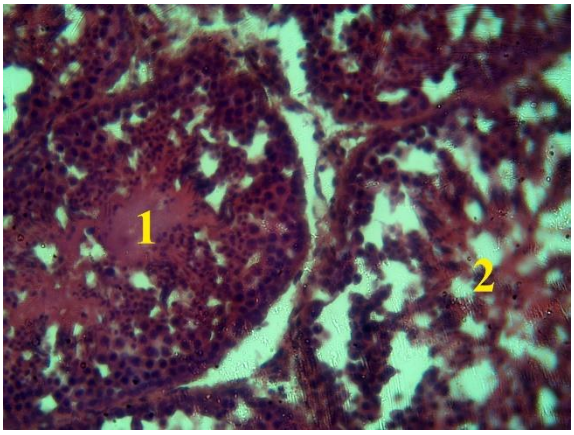
فراسنجه	ال-کارنیتین (میلی‌گرم بر کیلوگرم)		خطای استاندارد	مقدار احتمال
	۰	۲۵۰		
شاخص اسپرمیوژنز	۶۰/۲۵ [b]	۷۲/۵۶ [a]	۳/۵۴	۰/۰۰۳
شاخص تمایز لوله‌ای	۵۲/۵۶ [b]	۶۸/۹۳ [a]	۳/۹۸	۰/۰۲

[a-b] میانگین‌ها با حروف نامشابه درون هر ردیف تفاوت معنی‌داری نسبت به هم دارند ($P<۰/۰۵$).

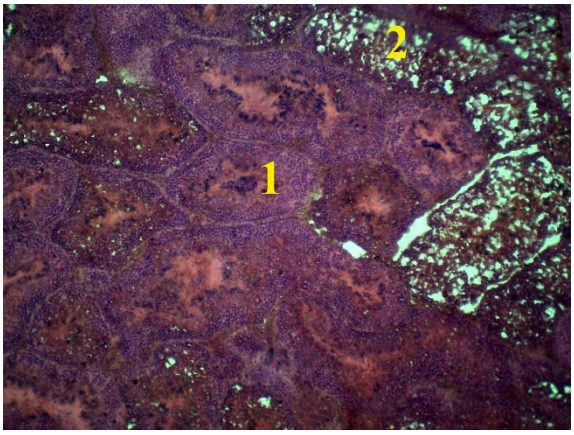
جدول ۴. اثرات ال-کارنیتین جیره بر لیپوپروتئین‌های پلاسمای خروس‌های مولد گوشتی.

فراسنجه*	ال-کارنیتین (میلی‌گرم بر کیلوگرم)		خطای استاندارد	مقدار احتمال
	۰	۲۵۰		
کلسترول	۱۵۹/۷۵	۱۵۵/۲۵	۳/۷۷	۰/۱۴
HDL	۱۲۶/۵۰ [a]	۱۱۹/۰۰ [b]	۲/۶۱	۰/۰۰۷
LDL	۳۵/۵۰	۲۸/۷۵	۲/۸۳	۰/۰۹
LDL/ HDL	۰/۲۸	۰/۲۴	۰/۰۴۲	۰/۰۵۹

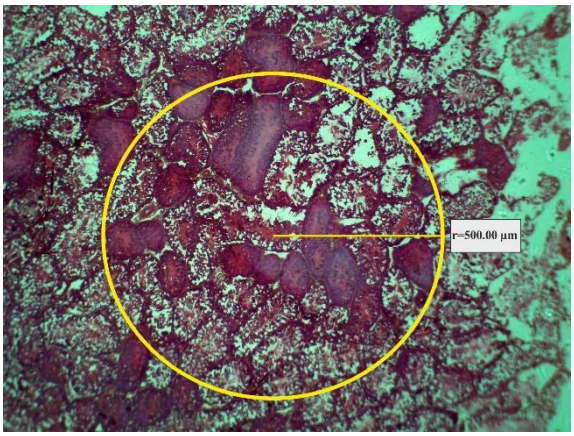
[a-b] میانگین‌ها با حروف نامشابه درون هر ردیف تفاوت معنی‌داری نسبت به هم دارند ($P<۰/۰۵$). *فراسنجه: HDL (لیپوپروتئین با وزن مولکولی بالا)، LDL (لیپوپروتئین با وزن مولکولی پایین).



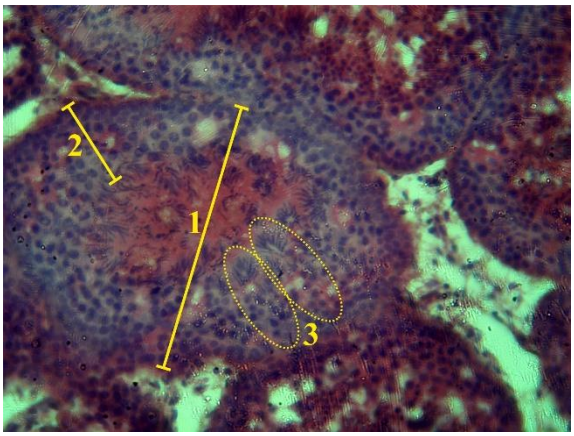
تصویر B-۱. شاخص اسپرمیوژنز/ عدد ۱: لوله منی‌ساز SI مثبت/عدد ۲: لوله منی‌ساز SI منفی/بزرگنمایی ۱۰۰برابر.



تصویر A-۱. شاخص ضریب توبولار / عدد ۱: لوله منی ساز TDI مثبت / عدد ۲: لوله منی ساز TDI منفی/ بزرگنمایی ۴۰۰ برابر.



تصویر D-۱. لوله‌های منی‌ساز بالغ در دایره‌ای به شعاع ۵۰۰ میکرومتر، بزرگنمایی ۴۰ برابر.



تصویر C-۱. قطر لوله منی‌ساز / شماره ۲: ارتفاع اپی‌تیلیوم منی‌ساز / شماره ۳: هر کدام از دایره‌ها نشان دهنده یک سلول سرتولی، بزرگنمایی ۴۰۰برابر.

بافت شناسی بیضه: در پایان آزمایش (سن ۳۴ هفتگی)، چهار قطعه پرنده از هر تیمار انتخاب و پس از خون‌گیری از آن‌ها کشتار شدند. سپس بیضه‌ها به‌سرعت از بدن خارج‌شده و نمونه‌هایی به ضخامت مشخص از بیضه چپ تهیه گردید. برای تثبیت، نمونه‌هایی به ضخامت ۰/۵ سانتی‌متری در محلول فرمالین ۴ درصد (به مدت ۷۲ ساعت) غوطه‌ور شدند. سپس، نمونه‌ها به درون دستگاه فرآیندساز بافت (تیشوپروسسور) 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 مشاهده شود. 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 ائوزین استفاده شد (۲۷).

ضریب تمایز لوله‌ای و ضریب اسپرمیوژنز: به منظور ارزیابی اسپرماتوژنز در لوله‌های منی‌ساز، از ضریب تمایز لوله‌ای (TDI) و ضریب اسپرمیوژنز (SI) استفاده شد. برای بررسی TDI، درصد لوله‌های منی‌ساز که شامل چهار یا بیش از چهار ردیف از سلول‌های تمایز یافته از اسپرماتوگونی A می‌باشد، محاسبه گردید. برای این منظور تعداد ۴۰۰ عدد لوله منی‌ساز (۴ بار، هر بار ۱۰۰ لوله منی‌ساز) بررسی و نهایتاً نتایج به صورت لوله‌های TDI مثبت و TDI منفی گزارش گردید (تصویر A-۱). به منظور بررسی SI نیز، درصد لوله‌های منی‌ساز حاوی اسپرم به لوله‌های فاقد اسپرم محاسبه شد. برای این منظور نیز تعداد ۴۰۰ عدد لوله منی‌ساز (۴ بار، هر بار ۱۰۰ لوله منی‌ساز) بررسی و نهایتاً نتایج به صورت لوله‌های SI مثبت و SI منفی گزارش گردید (تصویر B-۲) (۱).

قطر لوله منی‌ساز و ارتفاع اپی‌تلیوم منی‌ساز: برای اندازه‌گیری قطر لوله منی‌ساز مقاطع دایره شکل لوله منی‌ساز

انتخاب و از غشای پایه تا غشای پایه روبه‌روی لوله منی‌ساز اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری ارتفاع اپی‌تلیوم منی‌ساز از قسمت غشای پایه تا انتهای سر سلول‌های اسپرماتید اندازه‌گیری شد. برای شمارش سلول‌های سرتولی در هر لوله منی‌ساز، تجمع سر سلول‌های اسپرماتید به عنوان یک سلول سرتولی لحاظ شده و شمارش شدند (تصویر C-۳).

شمارش لوله‌های منی‌ساز: برای این کار تعداد لوله‌های منی‌ساز بالغ در دایره‌ای به شعاع ۵۰۰ میکرومتر شمارش گردید (تصویر D-۴).

سنجش لیپوپروتئین‌های پلاسما: در سن ۳۴ هفتگی بی‌درنگ پس از خون‌گیری نمونه‌ها به لوله‌های حاوی ماده‌ی ضد انعقاد (EDTA) منتقل شدند. برای جداسازی پلاسمای خون، لوله‌ها سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه) شده و نمونه‌های پلاسما به ریزلوله‌ی میکروتیوپ‌های ۰/۵ میلی‌لیتری ریخته شدند و به دمای ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند. برای اندازه‌گیری لیپوپروتئین‌های پلاسما (کلسترول تام، HDL و LDL) از کیت تجاری مخصوص (شرکت پارس-آزمون، تهران، ایران) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای آنالیز داده‌ها از رویه‌ی GLM نرم افزار SAS، در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه توکی در سطح ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

در جدول ۲ تأثیر تیمارهای آزمایشی بر بافت‌شناسی بیضه نشان داده شده است. تعداد لوله‌های منی‌ساز و سلول‌های سرتولی به طور معنی‌داری تحت تأثیر ال-کارنیتین جیره قرار گرفت ($P<۰/۰۵$). تمایل به معنی‌داری ($P=۰/۰۶۶$)، بین تیمارهای آزمایشی از لحاظ قطر لوله منی‌ساز مشاهده شد، ولی ارتفاع اپی‌تلیوم منی‌ساز تحت تأثیر مکمل ال-کارنیتین قرار نگرفت.

نتایج مربوط به تأثیر ال-کارنیتین بر شاخص‌های اسپرماتوژنز در جدول ۳ گزارش شده است. مکمل‌سازی ال-کارنیتین جیره‌ای در زمان پیش از بلوغ جنسی باعث افزایش معنی‌داری در شاخص اسپرمیوژنز ($P<۰/۰۰۳$)، و شاخص تمایز لوله‌ای ($P<۰/۰۲$) نسبت به گروه شاهد شد.

جدول ۴ اثرات ال-کارنیتین جیره بر لیپوپروتئین‌های پلاسمای خروس‌های مولد گوشتی را نشان می‌دهد. میزان لیپوپروتئین‌ها با وزن مولکولی بالا به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر مکمل ال-کارنیتین قرار گرفت ($P<۰/۰۰۷$). یک تمایل به معنی‌داری در میزان لیپوپروتئین‌ها با وزن مولکولی کم ($P=۰/۰۹$)، و نسبت LDL به HDL ($P=۰/۰۵۹$)، بین تیمارها مشاهده شد، ولی مکمل‌سازی ال-کارنیتین تأثیر معنی‌داری بر میزان کلسترول بین تیمارها نگذاشت.

بحث

رشد و توسعه‌ی بافت بیضه برای حفظ عملکرد تولیدمثلی نرمال (سنتز هورمون‌های جنسی و تولید اسپرم) در خروس حیاتی است. مطالعه‌ی حاضر به‌منظور بررسی تأثیر استفاده از ال-کارنیتین در جیره‌ی جوجه‌خروس‌های نابالغ بر فراسنجه‌های هیستولوژی بیضه، شاخص‌های اسپرماتوژنز و لیپوپروتئین‌های پلاسما در پیک تولید انجام شد. نتایج نشان داد تغذیه‌ی ۲۵۰ میلی‌گرم ال-کارنیتین به جیره‌ی جوجه‌خروس‌های نابالغ منجر به افزایش تعداد لوله‌های اسپرم‌ساز فعال در بیضه نسبت به پرندگان گروه شاهد شد. مطالعات پیشین گزارش کردند که درمان طولانی مدت ال-کارنیتین برای عملکرد تولید مثلی و ظرفیت باروری مؤثر است (۴،۶). در مطالعه‌ای Topcu-Tarladacalisir و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که ال-کارنیتین اثرات تخریبی ناشی از آسیب رادیکال گاما القایی بر لوله‌های اسپرم‌ساز را بهبود می‌بخشد. در مطالعه‌ی آن‌ها تغییرات هیستوپاتولوژیکی در بیضه‌ی خرگوش‌های القا شده با اشعه‌ی گاما و درمان شده با ال-کارنیتین نسبت به گروه القا شده با اشعه‌ی گاما بسیار پایین‌تر بود، که این بهبود هیستولوژی بیضه را به اثرات آنتی‌اکسیدانی ال-کارنیتین نسبت دادند (۳۱).

در مطالعه‌ی حاضر، تعداد سلول‌های سرتولی در بیضه‌ی پرندگان تغذیه شده با مکمل ال-کارنیتین درحدود ۲۰ درصد نسبت به پرندگان گروه شاهد بیشتر بود. ال-کارنیتین یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی عملکرد سلول‌های سرتولی می‌باشد (۲۲). از آنجایی‌که، مسیر اصلی تولید انرژی در سلول‌های سرتولی بتا-اکسیداسیون اسیدهای چرب است (۳۳)، و با توجه به اینکه ال-کارنیتین به عنوان حامل اسیدهای چرب به درون میتوکندری نقش اساسی در مسیر بتا-اکسیداسیون ایفا می‌کند (۱۳) و همچنین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی (۱۷)، و آنتی‌آپاپتوزی (۲۶)، ال-کارنیتین در سیستم تولیدمثلی، بنابراین بهبود شمار سلول‌های سرتولی در این آزمایش دور از انتظار نبوده است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ۲۵۰ میلی‌گرم ال-کارنیتین در جیره‌ی جوجه‌خروس‌های نابالغ شاخص‌های اسپرماتوژنز (اسپرمیوژنز و تمایز لوله‌ای) را نسبت به گروه شاهد بهبود بخشید. توانایی بیضه در تولید اسپرم با شمار یاخته‌های سرتولی در هر بیضه تنظیم می‌شود و تولید روزانه‌ی اسپرم با شمار یاخته‌های سرتولی و اسپرماتوگونی به ازای هر بیضه ارتباط دارد (۱۸). سلول‌های سرتولی مواد مغذی و انرژی مورد نیاز سلول‌های بنیادی جهت انجام فرآیند اسپرماتوژنز را فراهم می‌نماید (۱۹،۲۵). بنابراین، به نظر می‌رسد در مطالعه‌ی حاضر در بخشی از بهبود فرآیند اسپرماتوژنز، افزایش سلول‌های سرتولی نقش داشته است. نتایج مطالعه اخیر نشان داد که غلظت HDL پلاسما در پرندگان تغذیه شده با ۲۵۰ میلی‌گرم ال-کارنیتین نسبت به پرندگان گروه شاهد بیشتر بود. ال-کارنیتین به‌عنوان یک داروی کاهش دهنده چربی خون (هیپولیپیدمیک) قادر است غلظت لیپوپروتئین‌های با دانسیته پایین (LDL) را کاهش داده و غلظت لیپوپروتئین‌های با دانسیته بالا (HDL) را افزایش دهد (۱۷)، که با یافته‌های ما در توافق بود. Mirzapor Sarab و همکاران در سال ۲۰۱۶ گزارش کردند، جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی تغذیه شده با ۱۰۰ میلی‌گرم ال-کارنیتین غلظت HDL و LDL را نسبت به پرندگان گروه شاهد به ترتیب افزایش و کاهش می‌دهد (۱۶). لیپوپروتئین‌ها وظیفه جابه‌جایی چربی‌هایی از قبیل کلسترول را بین بافت ترشح‌کننده آن و اندام‌های هدف بر عهده دارند؛ جذب لیپید در ارگان هدف عمدتاً با واسطه گیرنده‌های لیپوپروتئین صورت می‌گیرد (۷)، همچنین لیپوپروتئین‌ها میزان عرضه استرول مورد نیاز برای انجام برخی از فعالیت‌های سلولی از جمله شکل‌گیری غشاءها و سنتز هورمون‌های استروئیدی را تنظیم می‌کنند (۶). در مطالعه حاضر با افزایش غلظت HDL در پرندگان تغذیه شده با ال-کارنیتین تعداد سلول‌های اسپرم‌ساز و سرتولی نیز افزایش یافت. مطالعات قبلی ارتباط مثبت بین HDL و بافت‌شناسی بافت بیضه در بز (۱۰)، موش صحرایی (۱۱)، و خروس (۹) را نشان داده‌اند. سلول‌های سرتولی نقش تغذیه سلول‌های جنسی موجود در بیضه با مواد مغذی مختلف از جمله لیپیدها را بر عهده دارند (۲۱،۳۰). همچنین داربست موجود در بین سلول‌های اسپرم‌ساز و مویرگ‌های خونی بیضه، از عبور و مرور LDL و VLDL جلوگیری نموده و تنها اجازه تبادل ذرات HDL و تحویل کلسترول موجود در آن را به سلول‌های سرتولی می‌دهد (۱۲). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در ساختار بیضه‌ی پرندگان تغذیه شده با ال-کارنیتین، کلسترول موجود در HDL در مقایسه با سایر ترکیبات لیپیدی پلاسما، علاوه بر بکارگیری برای سنتز تستوسترون، جهت تغذیه سلول‌های جنسی در حال ساخت نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد تغذیه جوجه‌خروس‌ها پیش از بلوغ جنسی با ۲۵۰ میلی‌گرم ال-کارنیتین می‌تواند توسعه‌ی بافت بیضه و فرآیند اسپرماتوژنز را در زمان پیک تولید بهبود دهد. با این حال، مطالعات بیشتری در این زمینه مورد نیاز است.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از اعضای محترم گروه علوم دام و طیور پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران برای فراهم کردن تجهیزات و امکانات لازم در جهت انجام این پژوهش قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Abbaspour, B., Sharifi, S.D., Ghazanfari, SH., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Honarbakhsh. SH. (2019). The effect of l-arginine and flaxseed on plasma testosterone concentration, semen quality and some testicular histology parameters in old broiler breeder roosters. Theriogenology, 128, 101-109. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.034 PMID: 30743098
2. Ali, E.A., Zhandi, M., Towhidi, A., Zaghari, M., Ansari, M., Najafi, M., Deldar, H. (2017). Letrozole, an aromatase inhibitor, reduces post-peak age-related regression of rooster reproductive performance. Anim Reprod Sci, 183, 110-117. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.05.010 PMID: 28578791
3. Avital-Cohen, N., Heiblum, R., Rosenstrauch, A., Chaiseha, Y., Mobarkey, N., Gumułka, M., Rozenboim, I. (2015). Role of the serotonergic axis in the reproductive failure associated with aging broiler breeder roosters. Domest Anim Endocrinol, 53, 42-51. https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.04.001 PMID: 26051791
4. Balercia, G., Regoli, F., Armeni, T., Koverech, A., Mantero, F., Boscaro, M. (2005). Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. Fertil Steril, 84(3), 662 671. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.03.064 PMID: 16169400

5. Ergün, A., Köse, S.K., Aydos, K., Ata, A., Avci, A. (2007). Correlation of seminal parameters with serum lipid profile and sex hormones. Arch Androl, 53(1), 21-23. https://doi.org/10.1080/01485010600888961 PMID: 17364460
6. Garolla, A., Maiorino, M., Roverato, A., Roveri, A., Ursini, F., Foresta, C. (2005). Oral carnitine supplementation increases sperm motility in asthenozoospermic men with normal sperm phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase levels. Fertil Steril, 83(2), 355-361. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.10.010 PMID: 15705374
7. Gwynne, J.T., Hess, B., Hughes, T., Rountree, R., Mahaffee, D. (1984). The role of serum high density lipoproteins in adrenal steroidogenesis. Endocr Res, 10(3-4), 411-430. https://doi.org/10.1080/07435808409036509 PMID: 6100250
8. Jeulin, C., Lewin, L.M. (1996). Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. Hum Reprod Update, 2(2), 87-102. https://doi.org/10.1093/humupd/2.2.87 PMID: 9079406
9. Kazemizadeh, A., Zare Shahneh, A., Zeinoaldini, S., Yousefi, A.R., Mehrabani Yeganeh, H., Ansari Pirsaraei, Z., Akhlaghi, A. (2019). Effects of dietary curcumin supplementation on seminal quality indices and fertility rate in broiler breeder roosters. Br Poult Sci, 60(3), 256-264. https://doi.org/10.1080/00071668.2019.1571165 PMID: 30668151
10. Loueimonfared, A., Jaafar Zadeh, A. (2013). Correlation of serum lipids and lipoproteins with spermatogenic activity and histomorphometric structure of the testes in the male goats of Ilam province. Iran J Vet Clin Sci, 6(2), 3-15.
11. Loueimonfared, A., Nooraei, A. (2016). Correlation of Serum Lipids Profile with Anatomical and Histomorphometrical Parameters of the Testes in the Rat. Scientific J Ilam Uni Med Sci, 24(3), 59-69. https://doi.org/10.18869/acadpub.sjimu.24.3.59
12. Maboundou, J.C., Fofana, M., Fresnel, J., Bocquet, J., Goff, D.L. (1995). Effect of lipoproteins on cholesterol synthesis in rat Sertoli cells. Biochem Cell Biol, 73(1-2), 67-72. https://doi.org/10.1139/o95-008 PMID: 7662317
13. Matalliotakis, I., Koumantaki, Y., Evageliou, A., Matalliotakis, G., Goumenou, A., Koumantakis, E. (2000). L-carnitine levels in the seminal plasma of fertile and infertile men: correlation with sperm quality. Int J Fertil Womens Med, 45(3), 236-240. PMID: 10929687
14. McLachlan, R.I., O'Donnell, L., Meachem, S.J., Stanton, P.G., De Kretser, D.M., Pratis, K., Robertson, D.M. (2002). Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. Recent Prog Horm Res, 57(1), 149-179. https://doi.org/10.1210/rp.57.1.149 PMID: 12017541
15. 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. Anim Reprod Sci, 171, 1-6. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.005 PMID: 27297178
16. Mirzapor Sarab, S., Salari, S., Mirzadeh, Kh., Aghaei, A. (2016). Effect of Different Levels of Vitamin C and L-Carnitine on Performance and some Blood and Immune Parameters of Broilers under Heat Stress. Iran J Anim Sci Res, 8(1), 141-153.
17. Neuman, S.L., Lin, T.L., Heste, P.Y. (2002). The effect of dietary carnitine on semen traits of white Leghorn roosters. Poult Sci, 81(4), 495-503. https://doi.org/10.1093/ps/81.4.495 PMID: 11989749
18. 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. J Reprod Fertil, 107(1), 137-149. https://doi.org/10.1530/jrf.0.1070137 PMID: 8699427
19. Oliveira, P.F., Sousa, M., Barros, A., Moura, T., Da Costa, A.R. (2009). Intracellular pH regulation in human Sertoli cells: role of membrane transporters. Reproduction, 137(2), 353-359. https://doi.org/10.1530/REP-08-0363 PMID: 19028925
20. Ommati, M. M., Zamiri, M.J., Akhlaghi, A., Atashi, H., Jafarzadeh, M.R., Rezvani, M.R., Saemi, F. (2013). Seminal characteristics, sperm fatty acids, and blood biochemical attributes in breeder roosters orally administered with sage (Salvia officinalis) extract. Anim Prod Sci, 53(6), 548-554. https://doi.org/10.1071/AN12257
21. Orth, J.M., Gunsalus, G.L., Lamperti, A.A. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. Endocrinology, 122(3), 787-794. https://doi.org/10.1210/endo-122-3-787 PMID: 3125042
22. Palmero, S., Bottazzi, C., Costa, M., Leone, M., Fugassa, E. (2000). Metabolic effects of L-carnitine on prepubertal rat Sertoli cells. Horm Metab Res, 32(3), 87-90. https://doi.org/10.1055/s-2007-978596 PMID: 10786925
23. Qi, S.N., Zhang, Z.F., Wang, Z.Y., Yoshida, A., Ueda, T. (2006). L-carnitine inhibits apoptotic DNA fragmentation induced by a new spin-labeled derivative of podophyllotoxin via caspase-3 in Raji cells. Oncol Rep, 15(1), 119-122. https://doi.org/10.3892/or.15.1.119 PMID: 16328043
24. Rato, L., Alves, M.G., Socorro, S., Duarte, A.I., Cavaco, J.E., Oliveira, P.F. (2012). Metabolic regulation is important for spermatogenesis. Nat Rev Urol, 9(6), 330. https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.77 PMID: 22549313
25. Rato, L., Socorro, S., Cavaco, J.E., Oliveira, P.F. (2010). Tubular fluid secretion in the seminiferous epithelium: ion transporters and aquaporins in Sertoli cells. J Membr Biol, 236(2), 215-224. https://doi.org/10.1007/s00232-010-9294-x PMID: 20697886
26. Roy, V.K., Verma, R., Krishna, A. (2017). Carnitine-mediated antioxidant enzyme activity and Bcl2 expression involves peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α in mouse testis. Reprod Fertil Dev, 29(6), 1057-1063. https://doi.org/10.1071/RD15336 PMID: 27064025
27. 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). Reprod Domest Anim, 48(2), 345-352. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02161.x PMID: 22957657
28. Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C., Fisher, J.S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. Reproduction, 125(6), 769-784. https://doi.org/10.1530/rep.0.1250769 PMID: 12773099
29. Silveira, M.M., de Freitas, A.G., Moraes, C.A., Gomes, F.S., Litz, F.H., Martins, J.M.S., Fernandes, E.A. (2014). Feeding management strategy for male broiler breeders and its effects on body weight, hatchability and fertility. Brazil J Poul Sci, 16(4), 397-402. http://dx.doi.org/10.1590/1516-635X1604397-402
30. Speake, B.K., Surai, P.F., Rooke, J.A., De Vriese, S., Christophe, A. (2003). Regulation of avian and mammalian sperm production by dietary fatty acids. In: Male Fertility and Lipid Metabolism. De Vriese, S.R., Christophe, A.B. (eds.). (1rd ed.) AOCS Publishing. New York, USA. p. 96-117.

31. Topcu-Tarladacalisir, Y., Kanter, M., Uzal, M.C. (2009). Role of L-carnitine in the prevention of seminiferous tubules damage induced by gamma radiation: a light and electron microscopic study. Arch Toxicol, 83(8), 735-746. https://doi.org/10.1007/s00204-008-0382-y PMID: 19015832
32. Vizcarra, J., Alan, R., Kirby, J. (2015). Reproduction in male birds. In: Sturkie's Avian Physiology, (6rd ed.) Academic Press. Wisconsin, United States, p. 667-693. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407160-5.00029-4
33. Xiong, W., Wang, H., Wu, H., Chen, Y., Han, D. (2009). Apoptotic spermatogenic cells can be energy sources for Sertoli cells. Reproduction, 137(3), 469-479. https://doi.org/10.1530/REP-08-0343 PMID: 19074501

Journal of Veterinary Research

The Effect of L-Carnitine Supplementation in the Diet of Immature Cockerels on Testicular Histology, Spermatogenesis Indices and Plasma Lipoproteins at the Peak of Production

Vahid Mohammadi[1], Seyed Davood Sharifi[1], Mohsen Sharafi[3], Abdollah Mohammadi-Sangcheshmeh[1]

[1] *Department of Animal and Poultry Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran*
[2] *Department of Animal and Poultry Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tarbiat Modarres, Tehran, Iran*

10.22059/jvr.2020.290133.2977

Received: *26 September 2020,* ***Accepted:*** *24 November 2020*

Abstract

BACKGROUND: Plasma lipoprotein profile is one of the effective mechanisms in testicular tissue development and spermatogenesis process in roosters.

OBJECTIVES: The present study was conducted to investigate the effect of dietary supplementation of l-carnitine during pre-pubertal period on testicular histology, spermatogenesis indexes and plasma lipoproteins of immature cocke**rels**

METHODS: A total of twelve Ross broiler breeder males (12 weeks) for 22 weeks in a completely randomized design with two treatments (0, and 250 mg/kg of L-carnitine in the diet) and six replications were used. Feeding program, and photoperiod regimen was performed based on ROSS 308 management handbook. To achieve the objectives of the study, at the age of 34 weeks, four birds were randomly selected from each treatment and after collecting blood samples from the veins under the wings, the birds were slaughtered. Finally, plasma cholesterol, LDL and HDL concentrations using a commercial kit and testicular parameters (number of seminiferous tubules, number of Sertoli cells, height of epithelium seminiferous tubules, seminiferous tubules diameter, spermatogenesis index, and tubular differentiation index) after preparation of 5-

RESULTS: The results showed that the number of seminiferous tubules, and the number of Sertoli cells were significantly affected by l-carnitine ($P<0.05$). L-carnitine supplementation in the diet of immature cockerels before sexual maturity significantly increased the spermatogenesis index ($P<0.003$) and tubular differentiation index ($P<0.02$). HDL levels were significantly affected by l-carnitine supplementation ($P<0.007$). There was a significant tendency in LDL concentration ($P=0.09$) and LDL/HDL ratio ($P=0.059$) between treatments, but no significant differences were observed in cholesterol concentration between treatments.

CONCLUSIONS: According to the results of this study, feeding immature cockerels before sexual maturity with 250 mg l-carnitine improves testicular tissue development and spermatogenesis process.

Keywords: Cockerels, Testis, Histology, Lipoproteins, L-carnitine

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

sdsharifi@ut.ac.ir Tel/Fax: 021-36040967/021-36040730

How to cite this article:

Mohammadi, V., Sharifi, S., Sharafi, M., Mohammadi-Sangcheshmeh, A. (2021). The Effect of L-Carnitine Supplementation in the Diet of Immature Cockerels on Testicular Histology, Spermatogenesis Indices and Plasma Lipoproteins at the Peak of Production. J Vet Res, 76(1), 94-102. https://doi.org/10.22059/jvr.2020.290133.2977

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Ingredients and nutrient composition of basal diet. [1] Supplied per kilogram of diet: Fe, 60000 mg; Mn, 6000 mg; Zn, 100000 mg; I, 2000 mg; cu,10000 mg; and Se, 200 mg. [2] Supplied per kilogram of diet: vitamin A, 12000000IU; vitamin E, 100000 IU; vitamin K3, 5000 mg, B1, 3000 mg; riboflavin, 12000 mg; niacin, 15000 mg; vitamin B12, 40 mg; vitamin D, 3,000000 IU; pantothenic acid, 55000 mg; pyridoxine, 4000 mg; biotin, 250 mg and Choline chloride, 1 kg.
Table 2. Effects of dietary l-carnitine on testes histology indices of male breeder broilers. [a-b] Mean differences in each row were significantly different ($P<0.05$).
Table 3. Effects of dietary l-carnitine on Spermatogenesis indices of males breeder broilers. [a-b] Mean differences in each row were significantly different ($P<0.05$).
Table 4. Effect of dietary l-carnitine on Plasma Lipoproteins of male breeder broilers. [a-b] Mean differences in each row were significantly different ($P<0.05$). Parameter: HDL (High-density lipoprotein), LDL (Low-density lipoprotein).
Figure 1 A. Tubular Differentiation Index (1= TDI $^{+}$, 2= TDI), Magnification: 400 X. **B.** Spermiogenesis Index (1= SI $^{+}$, 2= SI $^{-}$), Magnification: 100 .**C.** 1= Seminiferous tubules diameter, 2= Height of epithelium seminiferous tubules, 3= Sertoli cells, Magnification: 400 .**D.** Number of adult seminiferous tubules in a
.