

اثر پروپیل تیویوراسیل بر بروز بلوغ و تولید اسپرم در خروس‌های گله مادر گوشتی

امیر کریمی^۱، احمد زارع شحنه^{۲*}، سعید زین الدینی^۳، حمید کهرام^۳، زربخت انصاری پیرسرایبی^۴، مسعود ادیب مرادی^۵

۱- دانشجوی دوره دکتری فیزیولوژی دام پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران

۲- استاد گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران

۳- استادیار گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران

۴- استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۵- دانشیار گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت ۹۲/۳/۴- تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۷)

چکیده

آزمایش حاضر به منظور بررسی اثر کم‌کاری موقت غده تیروئید در بروز فرآیند بلوغ، ویژگی‌های بافت‌شناسی بیضه و کیفیت اسپرم تولیدی در خروس‌های گله مادر گوشتی انجام گرفت. تعداد ۶۶ قطعه جوجه خروس در قالب طرح کاملاً تصادفی به دو گروه آزمایشی شاهد و کم‌کاری موقت تیروئیدی و هر گروه به ۳ بخش (تکرار) تقسیم شدند. در گروه کم‌کاری تیروئیدی، داروی پروپیل تیویوراسیل به مقدار ۰/۱ درصد در خوراک پرندگان، در حدفصل هفته‌های ۶ الی ۱۲ پرورش گنجانده شد. وزن بدن، مقادیر هورمون‌های تیروکسین و تستوسترون خون هر ۳ هفته از سن ۶ تا ۱۸ هفتگی و نیز در هفته ۲۶ اندازه‌گیری شد. ویژگی‌های بافت‌شناسی و بیان ژن کانکسین ۴۳ بیضه در هفته‌های ۱۸ و ۲۶ پرورش در گروه‌های آزمایشی مورد سنجش قرار گرفته و برای مدت ۱۰ هفته پس از تحریک نوری از لحاظ کیفیت منی ارزیابی شدند. میزان بیان ژن کانکسین ۴۳ در ۱۸ هفتگی در گروه شاهد (۱/۱۸۱) نسبت به گروه کم‌کاری تیروئیدی (۰/۷۸۲) بیشتر بود ($P < 0/05$) ولی در ۲۶ هفتگی تفاوتی بین دو گروه مشاهده نشد ($P > 0/05$). حجم منی تولیدی در گروه کم‌کاری تیروئیدی (۰/۴۶ میلی‌لیتر) بالاتر از شاهد (۰/۳۹ میلی‌لیتر) بود ($P < 0/05$). همچنین شمار سلول‌های سرتولی در هفته‌های ۱۸ (۱۵۹/۹ سلول در میلی‌متر مربع) و ۲۶ (۱۶۵/۹ سلول در میلی‌متر مربع) و نیز وزن نسبی بیضه در هفته ۲۶ (۷۴۹ میلی‌گرم به‌ازای ۱۰۰ گرم بافت بدن) در گروه کم‌کاری تیروئیدی بالاتر بود ($P < 0/05$). بنابراین افزودن پروپیل تیویوراسیل در جیره جوجه‌های خروس مادر گوشتی در دوران پیش از بلوغ احتمالاً به واسطه تاخیر نسبی در بروز بلوغ سبب افزایش تعداد سلول‌های سرتولی و افزایش وزن بیضه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بلوغ، خروس، کم‌کاری موقت تیروئیدی، کیفیت اسپرم

مقدمه

تقریباً ۷۰ درصد شکست مراحل مختلف جوجه‌کشی مربوط به تخم‌مرغ‌های غیربارور و نیز مرگ و میر زود هنگام جنینی است (Bramwell, 2002). برخی عوامل مانند تغذیه، مدیریت، نسبت پرندگان نر و ماده می‌تواند بر روی باروری تخم‌مرغ‌ها تاثیرگذار باشد (Bakst, 2011). یکی از مهمترین عوامل موثر در کاهش باروری و افزایش مرگ و میرهای زود هنگام جنینی، مربوط به وجود مقادیر بالای هورمون کورتیکوستروئید در تخم‌مرغ است (Satterlee et al., 2008). در این رابطه نسبت پرندگان نر به ماده به عنوان یک عامل مبهم مد نظر قرار می‌گیرد؛ از یک سو جهت افزایش باروری ممکن است در گله اقدام به افزایش تعداد پرندگان نر شود، اما با این عمل رفتارهای جنسی رقابتی و استرس ناشی از درگیری‌های آن در خروس‌ها باعث افزایش کورتیکوسترون در مرغ‌ها و افزایش مرگ و میر زود هنگام جنینی و نهایتاً کاهش جوجه‌درآوری می‌شود زیرا هورمون کورتیکوسترون قابلیت انتقال از بدن مادر به تخم‌مرغ را دارد (Satterlee et al., 2008) و از سویی دیگر اگر با هدف کاهش استرس تعداد خروس‌ها کاهش یابد، باروری نیز کاهش پیدا می‌کند.

در سال‌های اخیر با پیشرفت‌های ژنتیکی و اصلاح نژادی در گله‌های مادر گوشتی، سرعت رشد پرندگان افزایش یافته است و باعث بروز مشکلاتی، هنگام مخلوط سازی دو جنس در نزدیکی زمان بلوغ و شروع تحریک نوری می‌شود (Joseph et al., 2002). معمولاً پرندگان نر زودتر از پرندگان ماده بالغ می‌شوند، احتمالاً تفاوت در بلوغ ناشی از تفاوت‌های هورمونی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز در پاسخ به تحریک نوری است (Tyler and Gous, 2009). حتی در داخل یک جنس نیز تفاوت‌های فردی در زمان شروع بلوغ وجود دارد (Lewis, 2009). در این رابطه نشان داده شده است که پرندگان با سطح هورمون LH خون بالاتر، دارای رشد تاج، ریش و فعالیت جنسی بیشتر هستند (Tyler and Gous, 2008)؛ شروع بلوغ در برخی پرندگان نر و متعاقب آن رفتارهای رقابتی، می‌تواند باعث بروز استرس در سایر افراد گله شده و بدنال آن نیز گله از یکپارچگی بلوغ برای شروع دوره تولیدی خارج می‌شود (Keeling and Gonyou, 2001). همچنین خروس‌هایی که زودتر بالغ می‌شوند عمر باروری کوتاهتری دارند (Jones et al., 1977). در این رابطه وجود روش و یا روش‌هایی که بتواند

هماهنگی در بلوغ خروس‌ها ایجاد نماید و در عین حال بتواند با افزایش قدرت باروری آنها موجبات کاهش تعدادشان را در گله فراهم کند مفید به نظر می‌رسد. برخی مطالعات در جوندگان نشان داده‌اند که کم‌کاری موقت غده تیروئید در دوران قبل از بلوغ، از طریق تاخیر در تمایز سلول‌های سرتولی می‌تواند شروع بلوغ را در جنس نر به تاخیر بیندازد (Buzard et al., 2009). همچنین مطالعات مشابه حاکی از آن است که کم‌کاری موقت تیروئید در تمایز سلول‌های سرتولی و افزایش مدت زمان تقسیمات میتوزی آنها می‌تواند باعث افزایش تعداد آنها در زمان بلوغ شود؛ در این رابطه نشان داده شده است که تعداد سلول‌های سرتولی با اندازه بیضه و تولید اسپرم رابطه مستقیم دارد (Holsberger and Cook, 2005). گزارش شده است کم‌کاری موقت غده تیروئید در دوران قبل از بلوغ در خروس‌های گوشتی باعث افزایش اندازه بیضه می‌شود (Kirby et al., 1996)، اما در مورد زمان شروع بلوغ گزارشی ارائه نشده و فقط به بیان هورمون تستوسترون به عنوان نشانه‌ای از بلوغ اشاره شده است و گزارشی از ویژگی‌های بافت‌شناسی و یا سلولی-ملکولی فرآیند بلوغ ارائه نشده است. این در حالی است که ایجاد پرکاری تیروئید، باعث کاهش تقسیمات میتوزی سلول‌های سرتولی و تمایز سریع آنها و نهایتاً تسریع بلوغ می‌شود (Palmero et al., 1995) که می‌توان نشانه‌های آنرا از لحاظ بافت‌شناسی در ظهور سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید مشاهده نمود؛ همچنین هورمون‌های تیروئیدی باعث تسریع ظهور ژن کانکسین ۴۳ و تولید پروتئین آن در زمان نزدیک به بلوغ می‌شود. پروتئین کانکسین شامل خانواده‌ای با ۲۰ عضو از پروتئین‌های ارتباطی^۱ است؛ کانکسین ۴۳ به عنوان مهمترین تنظیم کننده تقسیمات و تمایز سلول‌های سرتولی در زمان بلوغ مطرح است (Ebihara, 2003).

هدف از مطالعه حاضر، بررسی تاثیر کم‌کاری موقت غده تیروئید در تاخیر بروز بلوغ به منظور هماهنگی در شروع بلوغ و قدرت باروری خروس‌های گله مادر گوشتی است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۶۶ قطعه جوجه خروس گله مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ در سن ۶ هفتگی با متوسط وزن $43/63 \pm$ ۱۱۴۵/۷۷ بطور تصادفی به دو گروه آزمایشی (تیمار) شاهد و کم‌کاری تیروئیدی تقسیم شدند. هر گروه آزمایشی شامل ۳ تکرار و در هر تکرار ۱۱ پرنده در نظر گرفته شد. دو گروه آزمایشی از لحاظ شرایط آزمایشی خوراک، آب، نور و برنامه‌های واکسیناسیون در شرایط یکسان و طبق راهنمای پرورش شرکت راس قرار داشتند (Aviagen, 2007). بجز اینکه در گروه کم‌کاری تیروئید به مدت ۶ هفته، در فاصله ۶ الی ۱۲ هفتگی از داروی پروپیل تیوراسیل (شرکت ایران هورمون، ایران) به عنوان عامل ایجاد کننده کم‌کاری تیروئید به میزان ۰/۱ درصد وزن خوراک به جیره گروه مربوطه اضافه شد. با شروع سن ۶ الی ۱۸ هفتگی بطور منظم با فاصله زمانی ۳ هفته، خونگیری از سیاهرگ زیر بال ۵ پرنده معین از هر قفس (تکرار) که بطور تصادفی انتخاب شده بودند، انجام شد. برای جمع‌آوری سرم نمونه‌های خون، اجازه داده شد خون محتوی لوله‌های آزمایش منعقد شود، پس از سانتریفیوژ لوله‌های آزمایش، سرم جداسازی شده از نمونه‌های خون در ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان سنجش هورمون‌های تستوسترون و تیروکسین ذخیره شد (Akhlaghi and Zamiri, 2007). غلظت هورمون تستوسترون توسط کیت میکروپلت الایزای دیپلاس (DiaPlus Inc. USA) و سطح هورمون تیروکسین با استفاده از کیت الایزای اکیوباند (Monobind Inc. USA) اندازه‌گیری شد. ضریب تغییرات بین و داخل نمونه‌های سرم خونی مخلوط شده جوجه خروس‌ها به ترتیب ۴/۵ و ۱۰/۶ درصد برای تستوسترون و ۶/۸۲ و ۵/۷ درصد برای تیروکسین بود. در شروع برنامه تحریک نوری (Aviagen, 2007) در سن ۱۸ هفتگی و نیز بعد از دوره تحریک نوری در سن ۲۶ هفتگی، ۲ پرنده از هر قفس و در مجموع ۶ پرنده از هر تیمار آزمایشی بطور تصادفی انتخاب و پس از اندازه‌گیری وزن بدن و ذبح، بیضه سمت چپ آنها وزن‌کشی شده و در فرمالین خنثی ۱۰ درصد جهت بافت‌شناسی به آزمایشگاه منتقل شد. وزن نسبی بیضه به صورت میلی‌گرم به‌ازای ۱۰۰ گرم وزن بدن بیان شد. در طی مراحل بافت‌شناسی پس از تثبیت سازی و مقطع‌گیری با کمک پارافین مذاب، توسط رنگ ائوزین و هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شده و نمونه‌های آماده میکروسکوپی از لحاظ

قطر و نیز قطر حفره داخلی لوله اسپرم‌ساز، و نیز تعداد سلول‌های سرتولی، لایدیگ، اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در هر میلی‌متر مربع مورد سنجش و اندازه‌گیری قرار گرفتند. همچنین قبل از قرارگیری بیضه چپ در بافر فرمالین مقدار حدود یک گرم بافت بیضه جدا شده و در داخل ازت مایع به آزمایشگاه منتقل شد و تا زمان آزمایش سنجش بیان نسبی ژن کانکسین ۴۳ داخل فریزر ۸۰- نگهداری شد. در داخل آزمایشگاه پس از خروج از انجماد و استخراج mRNA توسط کیت شرکت جنا (Jena Bioscience GmbH. Germany) با استفاده از کیت شرکت بیونیر (Bioneer Tech. Korea) و مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) مخلوط رشته DNA مکمل (cDNA) تهیه شد و در نهایت با کمک کیت گرین سایبر شرکت کایژن (Qiagen Ltd, Germany) و روش Real-Time PCR (RT-PCR) نمونه‌ها از لحاظ بیان کمی ژن کانکسین ۴۳ مورد سنجش قرار گرفتند. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای فرادست^۱ و فرودست^۲ ژن کانکسین ۴۳ (NCBI, GenBank: M29003.2) به همراه توالی پرایمرهای فرادست و فرودست ژن بتا اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی در جدول ۱ ارائه شده است. پس از پایان برنامه، با استفاده از CT نمونه‌های آزمایشی، آنالیز داده‌های نهایی به صورت نسبی و با روش مقایسه CT ها (روش $2^{-\Delta\Delta CT}$) انجام گرفت (Livak and Schmittgen, 2001).

در طول آزمایش در هنگام خون‌گیری، پرندگان وزن‌کشی می‌شدند. جهت بررسی کیفیت و کمیت اسپرم تولیدی، تعداد ۵ پرنده از هر گروه آزمایشی در هفته ۲۹ انتخاب شده و پس از دو هفته آموزش از سن ۳۲ الی ۴۲ هفتگی، به مدت ۱۰ هفته، به روش مالش شکمی انزال‌گیری شده و نمونه‌های منی جمع‌آوری شده از پرندگان هر گروه آزمایشی با هم مخلوط شدند و ویژگی‌های مربوطه شامل مجموع حجم انزال خروس‌های هر گروه آزمایشی اندازه‌گیری شده توسط پیت مدرج، غلظت اسپرم توسط لام هموسیتومتری، درصد اسپرم‌های زنده توسط رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین (Bajpai, 1963) و درصد اسپرم‌های متحرک (Bakst, 1980) گزارش شدند. برای تجزیه آماری داده‌های غیر تکرار شونده شامل وزن بدن، سنجش‌های هورمونی، بافت‌شناسی و بیان ژن از رویه

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در Real-Time PCR

Table 1. Sequences of primers used for Real-Time PCR

Primer	Sequence
Cx43-F	5'-CTACAATAAGCAAGCCAGCG-3'
Cx43-R	5'-TTCGTGTTCTGGTGCTCATC-3'
BAct-F	5'-TGCGTGACATCAAGGAGAAG-3'
BAct-R	5'-TGCCAGGGTACATTGTGGTA-3'

جدول ۲- اثر پروپیل تیویوراسیل بر وزن بدن، غلظت هورمون‌های تیروکسین و تستوسترون در گروه‌های آزمایشی شاهد و کم‌کاری تیروئید در سن ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸ و ۲۶ هفتگی

Table 2. Effect of propylthiouracil on body weight, thyroxin and testosterone concentrations in control and hypothyroidism groups at 6, 9, 12, 15, 18 and 26 week of age.

Trait		Week of blood sampling					
		6	9	12	15	18	26
Body weight (g)	Control	1140.13	1766.53	2191.38 ^a	2286.54	2603.85	3620.34
	Hypothyroidism	1151.41	1766.83	2109.48 ^b	2267.63	2620.19	3592.81
	SEM	5.37	6.53	5.79	6.83	5.59	7.28
	P-value	0.29	0.19	0.01	0.13	0.15	0.317
Thyroxin (µg/dL)	Control	1.69	1.77 ^a	1.75 ^a	1.79	1.91	1.82
	Hypothyroidism	1.72	0.92 ^b	1.11 ^b	1.66	1.83	1.79
	SEM	0.053	0.158	0.14	0.046	0.035	0.033
	P-value	0.81	0.002	0.011	0.12	0.25	0.77
Testosterone (µg/dL)	Control	0.62	0.76 ^a	0.85 ^a	0.84	1.06	1.674
	Hypothyroidism	0.59	1.14 ^b	1.32 ^b	0.96	0.99	1.586
	SEM	0.026	0.06	0.087	0.041	0.037	0.042
	P-value	0.56	0.006	0.002	0.17	0.41	0.32

^{a, b}: Values with different superscripts within a column are different significantly ($P < 0.05$).

تستوسترون خون در گروه کم‌کاری تیروئید بطور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۲، $P < 0.05$).

در هفته ۲۶، وزن نسبی بیضه در گروه کم‌کاری تیروئیدی بطور معنی‌داری بالاتر بود (جدول ۳، $P < 0.05$). دو گروه آزمایشی از لحاظ قطر لوله اسپرم ساز، قطر حفره داخلی لوله اسپرم ساز و نیز تعداد سلول‌های لایدیگ، اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه در زمان قبل (۱۸ هفتگی) و بعد از تحریک نوری (۲۶ هفتگی) تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (جدول ۳، $P > 0.05$). تعداد سلول‌های سرتولی در هفته‌های ۱۸ و ۲۶ در گروه کم‌کاری تیروئیدی نسبت به گروه شاهد بیشتر بود (جدول ۳، $P < 0.05$). تعداد سلول‌های اسپرماتید و نیز بیان ژن کانکسین ۴۳ در گروه آزمایشی شاهد نسبت به گروه کم‌کاری تیروئیدی در هفته ۱۸ بطور معنی‌داری بیشتر بود (جدول ۳، $P < 0.05$). اما این مقادیر در دوره بعد از تحریک نوری برای دو گروه آزمایشی تفاوتی با یکدیگر نداشتند ($P > 0.05$). در سایر ویژگی‌های بافت‌شناسی بیضه تفاوت‌های مشخص و معنی‌داری مشاهده نشد.

GLM و برای داده‌های تکرار شونده شامل فراسنجه‌های مربوط به انزال‌گیری از رویه Mixed نرم افزار SAS (1996) استفاده شد. کلیه داده‌ها مورد آزمون نرمال قرار گرفتند و در صورت لزوم تبدیل داده‌ها انجام شد. میانگین‌ها به روش LSMeans مورد مقایسه قرار گرفت و اختلاف‌ها در سطح ۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج نشان داد تفاوت معنی‌داری بین وزن بدن در گروه‌های آزمایشی در هفته ۱۲ وجود دارد (جدول ۲، $P < 0.05$); ولی در سایر هفته‌های پرورش تفاوت معنی‌دار بین دو گروه آزمایشی مشاهده نشد ($P > 0.05$). مقدار هورمون تیروکسین خون خروس‌های گروه کم‌کاری تیروئیدی در طی هفته‌های ۹ و ۱۲ بطور مشخص تحت تاثیر داروی پروپیل تیویوراسیل^۴ کاهش یافته است (جدول ۲، $P < 0.05$). در زمان‌های ۹ و ۱۲ هفتگی، مقدار هورمون

جدول ۳- اثر افزودن پروپیل تیویوراسیل بر ویژگی‌های بافت‌شناسی بیضه و بیان کمی ژن کانکسین ۴۳، در گروه‌های آزمایشی شاهد و کم‌کاری تیروئید در سن ۱۸ و ۲۶ هفتگی

Table 3. Effect of propylthiouracil on histological traits and connexin 43 gene quantitative expression between control and hypothyroidism groups at 18 and 26 week of age.

Traits	18 wk of age		SEM	P-value	26 wk of age		SEM	P-value
	Control	Hypothyroidism			Control	Hypothyroidism		
Relative testis weight (mg/100g BW)	39.35	42.22	1.12	0.09	531.08 ^b	748.63 ^a	24.96	0.002
Seminiferous diameter (mm)	0.045	0.047	0.003	0.68	0.47	0.54	0.04	0.35
Seminiferous lumen diameter (mm)	0.036	0.04	0.001	0.16	0.044	0.47	0.001	0.055
Leydig cell number (/mm ²)	165.48	171.80	3.172	0.33	167.17	173.33	3.27	0.36
Sertoli cell number (/mm ²)	124.13 ^b	159.93 ^a	8.86	0.031	126.87 ^b	165.37 ^a	8.15	0.017
Spermatogonia cell number (/mm ²)	210.82	208.50	3.65	0.76	219.67	214.83	2.92	0.47
Primary spermatocyte cell number (/mm ²)	207.48	201.17	6.34	0.63	209.33	223.17	6.25	0.27
Spermatid cell number (/mm ²)	202.30 ^a	178.37 ^b	6.37	0.047	209.67	216.33	6.28	0.61
Connexin 43 gene quantitative expression	1.181 ^a	0.782 ^b	0.12	0.044	1.53	1.35	0.09	0.23

^{a, b}: Values with different superscripts within a row are different significantly ($P < 0.05$).

جدول ۴- اثر افزودن پروپیل تیویوراسیل بر حجم منی، غلظت اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده و متحرک در گروه‌های آزمایشی شاهد و کم‌کاری تیروئید در سن ۳۲ الی ۴۲ هفتگی

Table 4. Effect of propylthiouracil on semen volume, sperm concentration, live sperm and sperm motility in control and hypothyroidism groups

Semen traits	Experimental group		SEM	P-value
	Control	Hypothyroidism		
Semen volume (mL)	0.39 ^b	0.46 ^a	0.014	0.02
Sperm concentration ($\times 10^9$ /mL)	1.38	1.43	0.017	0.19
Live sperm (%)	72.18	69.67	0.97	0.20
Sperm motility (%)	67.48	64.85	1.09	0.27

^{a, b}: Values with different superscripts within a row are different significantly ($P < 0.05$).

می‌تواند باعث کاهش بیان ژن mRNA مربوط به گیرنده هورمون رشد و عوامل رشد شبه انسولینی^۵ شود (Tsukada *et al.*, 1996). به همین دلیل کم‌کاری تیروئیدی می‌تواند باعث کاهش رشد بدن در هفته‌های ۹ و ۱۲ شده باشد. با حذف داروی پروپیل تیویوراسیل، اثرات ضد تیروئیدی داروی مذکور برداشته شده و وزن پرنده‌گان مشابه گروه کنترل شده است.

نتایج نشان داد داروی پروپیل تیویوراسیل به صورت برگشت‌پذیر سبب کاهش هورمون تیروکسین می‌شود به گونه‌ای که در طی هفته‌های ۹ و ۱۲ پرورش باعث کاهش سطح هورمون تیروکسین شد ولی حذف آن سبب افزایش هورمون تیروکسین در گروه کم‌کاری تیروئیدی در هفته ۱۵ شد. پروپیل تیویوراسیل باعث کاهش سنتز هورمون‌های تیروئیدی از طریق مهار فعالیت آنزیم تیروئید

خروس‌های گروه کم‌کاری تیروئیدی دارای حجم انزال بیشتر نسبت به گروه شاهد بودند (جدول ۴، $P < 0.05$) و این در حالی است که دو گروه آزمایشی از لحاظ غلظت اسپرم، درصد اسپرم زنده و نیز تحرک اسپرم تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند ($P > 0.05$).

بحث

نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در افزایش وزن زنده پرنده‌گان در هفته ۱۲ وجود دارد (جدول ۱) اما در سایر هفته‌ها تفاوتی بین گروه‌های آزمایشی وجود نداشت. گزارش شده است که کاهش فعالیت غده تیروئید باعث کاهش وزن زنده و نیز کاهش رشد در خروس‌های بومی استان فارس شده است (Akhlaghi and Zamiri, 2007). هورمون‌های تیروئیدی قابلیت تحریک ترشح هورمون رشد را دارند (Jiang *et al.*, 2000)؛ همچنین کاهش تولید هورمون‌های تیروئیدی

فرد نر تازه متولد شده به تدریج با افزایش سن، در سلول‌های گونوسیت واجد گیرنده‌های تیروزین کینازی می‌شود؛ این گیرنده‌ها در تمایز سلول‌های گونوسیت به سلول‌های اسپرماتوگونی و تبدیل شدن به اسپرماتید نقش ایفا می‌کنند و تولید آنها به هورمون‌های تیروئیدی وابسته است (Yoshida *et al.*, 2006). همچنین سلول‌های سرتولی هدف اصلی هورمون‌های تیروئیدی در بیضه هستند و برای این منظور دارای گیرنده‌های آن هورمون بوده که موجب توقف تقسیمات سلولی و آغاز تمایز آنها و نیز شروع تولید اسپرماتید در لوله‌های سمنی‌فروس می‌گردد (Jannini *et al.*, 2000). ظهور تعداد پایین سلول‌های اسپرماتید در گروه کم‌کاری تیروئیدی نسبت به شاهد می‌تواند نشانه بلوغ تاخیر افتاده در این گروه باشد، به ویژه اینکه در هفته ۱۸، بیان ژن کانکسین ۴۳ نیز در گروه مذکور نسبت به شاهد کمتر بوده است. گزارش شده است که در اثر هورمون‌های تیروئیدی روی سلول‌های سرتولی در هنگام بلوغ، ارتباطات بین سلول‌های سرتولی از طریق افزایش ساخت پروتئین کانکسین ۴۳ افزایش می‌یابد (Gilleron *et al.*, 2006). همچنین در این رابطه آزمایشات *In vivo* و *In vitro* نشان داده‌اند که فقدان و یا کاهش تولید پروتئین کانکسین ۴۳ در سلول‌های سرتولی در پی کم‌کاری تیروئیدی موجب تداوم تقسیمات سلول‌های سرتولی و تاخیر تمایز آنها و نهایتاً افزایش رشد بیضه می‌شود (Brehm *et al.*, 2007).

در تحقیق حاضر، حجم انزال در گروه کم‌کاری تیروئید بطور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود (۰/۴۵ میلی‌لیتر در برابر ۰/۳۴ میلی‌لیتر). این نتیجه با نتایج Kirby (1996) *et al.* مطابقت دارد و در این رابطه همانگونه که پیشتر بیان شد، پیشنهاد شده است که افزایش تعداد سلول‌های سرتولی بعد از یک دوره کم‌کاری موقت تیروئیدی در فرد نر با افزایش اندازه بیضه در هنگام بلوغ رابطه مستقیم دارد (Orth *et al.*, 1988; Pointis *et al.*, 2010). لذا استقرار تعداد بیشتری سلول‌های سرتولی و افزایش اندازه بیضه می‌تواند به افزایش تولید اسپرم و نهایتاً قابلیت باروری بیشتر منجر شود (Wagner *et al.*, 2008).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، مصرف داروی پروپیل تیویوراسیل در خروس‌های گله مادر گوشتی در دوران پیش از بلوغ علی‌رغم تاخیر در فرآیند بلوغ باعث افزایش تعداد سلول‌های سرتولی و نهایتاً افزایش اندازه بیضه شد.

پروکسیداز در غده تیروئید و کاهش تولید تیروکسین می‌شود (Ganong, 2005). مصرف داروی پروپیل تیویوراسیل باعث افزایش سطح هورمون تستوسترون در طی زمان‌های ۹ و ۱۲ هفتگی می‌شود. طی گزارشات مشابه در دوران قبل از بلوغ جنسی در خروس‌ها (Kirby *et al.*, 1996; Akhlaghi and Zamiri, 2007) و نیز در بوقلمون‌های نر (Knowlton *et al.*, 1999) پیشنهاد شده است که هورمون‌های تیروئیدی می‌توانند همانند هورمون‌های گنادی در کنترل بازخور منفی هیپوتالاموس نقش داشته باشند (Akhlaghi and Zamiri, 2007). بنابراین در هنگام مصرف داروی پروپیل تیویوراسیل، سطح هورمون‌های تیروئیدی کاهش می‌یابد و اثر بازدارندگی آنها بر هورمون LH برداشته شده و هورمون تستوسترون در هفته ۹ و ۱۲ افزایش می‌یابد. همچنین در مطالعه‌ای دیگری نیز نشان داده شده است که با تجویز هورمون تیروکسین سطح هورمون‌های LH و تستوسترون کاهش می‌یابد (Jacquet *et al.*, 1993).

نسبت وزن بیضه به وزن بدن بین دو گروه آزمایشی در هفته ۱۸ تفاوت مشخص آماری از خود نشان نداد، اما این نسبت در هفته ۲۶ برای گروه کم‌کاری تیروئیدی افزایش قابل توجهی داشت. متعاقب مصرف داروهای ایجاد کننده کم‌کاری تیروئید، تمایز سلول‌های سرتولی بیضه به دلیل کاهش هورمون‌های تیروئیدی، به تاخیر افتاده و به تقسیمات سلولی خود ادامه داده و تعداد آنها افزایش می‌یابد (Auharek and Franca, 2010; Holsberger and Cook, 2005). سلول‌های سرتولی دارای نقش اساسی در تمایز بیضه می‌باشند و تعداد آنها با اندازه بیضه ارتباط مستقیم دارد (Capel, 2000; Wagner *et al.*, 2008). بنابراین با حذف اثر مهاری کم‌کاری تیروئیدی، تمایز سلول‌های سرتولی شروع شده و نهایتاً به اندازه بیضه بزرگتر منجر می‌شود. نتایج نیز افزایش معنی‌داری را در تعداد سلول‌های سرتولی در گروه کم‌کاری تیروئید طی هفته‌های ۱۸ و ۲۶ نشان می‌دهد. تعداد سلول‌های اسپرماتید در طی هفته ۱۸ در گروه شاهد نسبت به گروه کم‌کاری تیروئیدی بیشتر بود. در دوران جنینی در طی مراحل اولیه تمایز، سلول‌های زایای اولیه تبدیل به سلول‌های گونوسیت می‌شوند (Ross and Capel, 2005) و

فهرست منابع

- Akhlaghi A. and Zamiri M. J. 2007. Effect of transient prepubertal hypothyroidism on serum testosterone level and seminal characteristics of chickens. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 8: 23-31.
- Aviagen. 2007. Ross308 parent stock management manual. Aviagen Incorporated Cumming Research Park. Huntsville, Alabama.
- Bajpai P. K. 1963. The effect of photoperiodicity on semen characteristics of poultry. *Poultry Science*, 42: 462-465.
- Bakst M. R. 1980. Fertilizing capacity and morphology of fowl and turkey spermatozoa in hypotonic extender. *Journal of Reproduction and Fertility*, 60: 121-127.
- Bakst M. R. 2011. Physiology and endocrinology symposium: role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. *Journal of Animal Science*, 89: 1323-1329.
- Brehm R., Zeiler M., Ruttinger C., Herde K., Kibschull M., Winterhager E., Willecke K., Guillou F., Lecureuil C. and Steger K. 2007. A sertoli cell specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. *American Journal of Pathology*, 171: 19-31.
- Buzzard J. J., Morrison J. R., O'Bryan M. K., Song Q. and Wreford N. G. 2000. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biology of Reproduction*, 62: 664-669.
- Capel B. 2000. The battle of the sexes. *Mechanisms of Development*, 92: 89-103.
- Ganong W. F. 2005. Review of medical physiology. 22nd Edn., McGraw-Hill publication. PP: 302-310.
- Gilleron J., Nebout M., Scarabelli L., Senegas-Balas F., Palmero S., Segretain D. and Pointis G. 2006. A potential novel mechanism involving connexin 43 gap junction for control of Sertoli cell proliferation by thyroid hormones. *Journal of Cellular Physiology*, 209: 153-161.
- Holsberger D. R. and Cooke P. S. 2005. Understanding the role of thyroid hormone in sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell and Tissue Research*, 322: 133-140.
- Jacquet M.J., Seigneurin F. and deReviere M. 1993. Effect of thyroxine on testicular function, circulating luteinising hormone & pituitary sensitivity to luteinising hormone-releasing hormone in the cockerel. *British Poultry Science*, 34: 803-814.
- Jannini E. A., Crescenzi A., Rucci N., Screponi E., Carosa E., deMatteis A., Macchia E., d'Amati G. and d'Armiento M. 2000. Ontogenetic pattern of thyroid hormone receptor expression in the human testis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85: 3453-3457.
- Jiang J. Y., Umezu M. and Sato E. 2000. Improvement of follicular development rather than gonadotropin secretion by thyroxine treatment in infertile immature hypothyroid rdw rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 119: 193-199.
- Jones J. E., Hughes B. L. and Wall K. A. 1977. Effect of light intensity and source on tom reproduction. *Poultry Science*, 56: 1417-1420.
- Joseph N. S., Robinson F. E., Renema R. A. and Zuidhof M. J. 2002. Effects of age at photostimulation on reproductive efficiency in three strains of broiler breeders varying in breast yield. *Journal of Applied Poultry Research*, 11: 308-319.
- Keeling L. J. and Gonyou H. W. 2001. Social behaviour in farm animal. CABI International publication, PP: 307-331.
- Kirby J. D., Mankar M. V., Hardesty D. and Kreider D. L. 1996. Effects of transient prepubertal 6-N-propyl-2-thiouracil treatment on testis development and function in the domestic fowl. *Biology of Reproduction*, 55: 910-916.
- Knowlton J. A., Siopes T. D., Roads M. L. and Kirby J. D. 1999. Effect of transient treatment with 6-N-propyl-2-thiouracil on testis development and function in breeder turkeys. *Poultry Science*, 78: 999-1005.
- Lewis P. 2009. Lighting for broiler and turkey breeders. *Lohman Information*, 44: 49-56.
- Livak J. K. and Schmittgen D. T. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25: 402-408.
- Orth J. M., Gunsalus G. L. and 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: 787-794.
- Palmero S., Prati M., Bolla F. and Fugassa E. 1995. Tri-iodothyronine directly affects rat sertoli cell proliferation and differentiation. *Journal of Endocrinology*, 145: 355-362.
- Pointis G., Gilleron J., Carette D. and Segretain D. 2010. Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 365: 1607-1620.
- Ross A. J. and Capel B. 2005. Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 16: 19-25.
- SAS. 1996. Statistical Analysis System (SAS) Users Guide Rev. 04, SAS Institute, Cary, North Carolina.

- Satterlee D. G., Hester A., LaRay K. and Schmidt J. B. 2008. Influences of maternal corticosterone and selection for contrasting adrenocortical responsiveness in Japanese quail on developmental instability of female progeny. *Poultry Science*, 87: 1504-1509.
- Tsukada A., Ohkubo T., Sakaguchi K., Tanaka M., Nakashima K., Hayashida K., Wakita M. and Hoshino S. 1996. Thyroid hormones are involved in insulin-like growth factor (IGF)-I production by regulating growth hormone receptor (GHR) in the chicken. *Poultry and Avian Biology Reviews*, 8: 253 (abs).
- Tyler N. C. and Gous R. M. 2008. The effect of constant photoperiod on testis weight and the use of comb area to predict testis weights in broiler breeder males. *South African Journal of Animal Science*, 38: 153-158.
- Wagner M., Magagin S. and Maia A. L. 2008. The role of thyroid hormone on testicular development and function. *Journal of Endocrinology*, 199: 351-365.
- Yoshida S., Sukeno M. and Nakagawa T. 2006. The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development*, 133: 1495-1505.

Effect of propylthiouracil on puberty initiation and semen production in broiler breeder roosters

A. Karimi¹, A. Zare Shahneh^{2*}, S. Zeynoaldini³, H. Kohram³, Z. Ansari Pirsaraei⁴, M. Adibmoradi⁵

1. PhD student, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2. Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Assistant professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

4. Assistant professor, Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

5. Associate professor, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

(Received: 25-5-2013- Accepted: 8-9-2013)

Abstract

This experiment was conducted to study the effect of induced transient hypothyroidism on pubertal initiation, histological traits of testis and semen quality in breeder roosters. A total of sixty-six broiler breeder male chicks were randomly assigned to two experimental groups of control or hypothyroidism in a completely randomized design with three pens per group. In hypothyroidism group, chicks were fed dietary treatment of 0.1% propylthiouracil from 6 to 12 week of age. Body weight, thyroxin and testosterone concentrations were measured at 3-week intervals from 6 to 18 and also at 26 week of age. Histological characteristics and the expression of connexin 43 gene in testis were assayed in experimental groups and semen quality was evaluated for 10 weeks after photostimulation. Connexin 43 gene expression was higher in control group (1.181) than hypothyroidism one (0.782) at 18 week of age ($P<0.05$) and was similar at 26 week of age ($P>0.05$). Semen volume was greater in hypothyroidism group (0.46 ml) than that of control one (0.39 ml). Also, sertoli cell number was greater in hypothyroid group at 18 (159.9 /mm²) and 26 (165.9 /mm²) week of age than that in control group ($P<0.05$). Also, relative testis weight was greater in hypothyroidism group (749 mg/100gBW) than control group at age 26 week of age ($P<0.05$). Therefore, addition of propylthiouracil in breeder male chicks diet in prepubertal period, probably resulted in higher sertoli cell number and testicular weight via delay in puberty.

Keywords: Puberty, Rooster, Sperm quality, Transient hypothyroidism