Animal Production Research

Vol. 11, No. 1, 2022 (55-67)
doi: 10.22124/AR.2022.18301.1583
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872

University of Guilan

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Effect of letrozole on reproductive indices of aged broiler breeder roosters

H. Adeldust[1], A. Farzinpour[2]*, A. Farshad[2], A. Vaziry[3], J. Rostamzadeh[3]

1. Former Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
3. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

(Received: 29-11-2020 – Accepted: 09-03-2021)

Introduction: The importance of androgen-estrogen balance has been postulated to be more than complete levels of estrogen or androgen for an optimum reproductive function in males. In aged broiler breeder males, the low fertility is influenced by greater plasma and testicular estradiol as well as a low synthesis of plasma and testicular testosterone concentrations. Since aromatase is the main enzyme that converts the androgens into estrogens; therefore, it has been hypothesized that using the aromatase inhibitors could increase endogenous testosterone production without an associated increase in circulating estrogens. It is hypothesized that these steroid hormone changes that occur during post-peak fertility can affect the expression of several genes whose activity may be associated with steroid hormone changes, including *Foxj1*, *PVRL3*, and *LPR2* genes. Estradiol plays a vital role in the proliferation and differentiation of the epithelial cells, which cause activation of the *Foxj1* gene in these cells. The knocked-out mice for the *Fox j1* gene (epithelium lacked ciliated cells) informing the importance of *Foxj1* in estradiol-dependent epithelial cell differentiation. In this study, the effects of an aromatase inhibitor, letrozole, were evaluated on reproductive indices of broiler breeder roosters at short-term (three weeks) and during an interval (three days of use and two days of a stop).

Materials and methods: Eighteen 55-weeks-old roosters were randomly divided into three groups receiving letrozole T0, T1, and T2 (0, 0.015, and 0.03 mg/kg of body weight, respectively). Deranged semen was collected via a syringe from the distal cauda of the vas deferens from each rooster as a single sample (n=6). Seminal traits, steroid hormone concentrations, the relative abundance of *Pvrl3*, *Foxj1*, and *Lpr2* mRNA, and *in vitro* fertility were assessed at the end of the trial. Testes were carefully removed and the epididymal region was dissected free of extraneous tissues and weighed to determine the gonadal/somatic index [testis weight (g)/body weight (kg)]. Total RNA was extracted from the tissues using the TRI® reagent (Ambion, USA) according to the manufacturer's protocol. The nucleotide sequences of all candidate genes of the roosters (*Gallus gallus*) were obtained from the GenBank database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). The primer was designed using Primer3Plus online software and assessed using OligoCalc and PrimerBLAST. Beta-actin was considered an internal control. Quantification of all transcripts was performed using QuantiFast Eva Green PCR Kit (HOT FIRE Pol® EvaGreen ® qPCR Mix Plus) in a 20 µL reaction volume containing 3 µL single-strand cDNA, 7 µL of the master mix, 0.75 µL of either forward and reverse primers, and 8.5 µL of distilled H_2O in 20 µL by a Rotor-Gene 6000 Real-Time PCR software (Corbett Research, Sydney, Australia). The data were tested for normality using the Shapiro-Wilk test. Single and repeated measurement data were analyzed with the GLM and Mixed procedures of SAS software. Rooster's testicular data and body weight were considered as covariates in the statistical models. Duncan's multiple range test was used to compare means. Sperm quality characteristics and *in vivo* fertility were analyzed with the same models.

* Corresponding author: amjadfarzinpour@uok.ac.ir

CC BY

Results and discussion: The results showed that gonadal somatic index (GSI), sperm total and forward motility, viability, membrane integrity, semen concentration, and fertility rate were improved for letrozole groups compared with the control group (P<0.001). Lipid peroxidation and sperm abnormalities measurements in the T1 and T2 groups were lower compared to the control group. The epithelium thickness and tubular diameter of seminiferous, and the epididymal and testes sperm count increased in the T1 and T2 groups. A concentration of testosterone was statistically increased in T2 group and testicular concentration testosterone was lower in both letrozole groups compared to the control group. FSH concentration was significantly influenced by letrozole (P<0.05). Plasma concentration of estrogen decreased in the T1 and T2 groups and the lowest one was in T2 group, also testicular concentration was lower compared with the control group. The ratio of estrogen to testosterone was significantly influenced by T1 group. An increase in relative mRNA levels was observed for a PVRL3 gene (related to spermiation) in testes, and a decrease of *Foxj1* gene (related to ciliogenesis) and LPR2 in epididymal (related to endocytosis) in the T1 and T2 groups.
Conclusions: Based on the results of this study, using aromatase inhibitor improved reproductive indices in aged broiler breeder roosters. It is suggested that increasing testosterone alone cannot improve reproductive performance and a balance in the estradiol/testosterone ratio is necessary to achieve optimal fertility.

Keywords: Estradiol, Testosterone, Broiler breeder rooster, Aromatase inhibitor

Ethics statement: This study was conducted with the full consideration of animal welfare and the approval of this study was granted by the Ethics Committee of University of Kurdistan, Iran.

Data availability statement: The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: The authors received no specific funding for this project.

How to cite this article:

Adeldust H., Farzinpour A., Farshad A., A. Vaziry and Rostamzadeh J. 2022. Effect of letrozole on reproductive indices of aged broiler breeder roosters. Animal Production Research, 11(1): 55-67. doi: 10.22124/AR.2022.18301.1583

تحقیقات تولیدات دامی

سال یازدهم/شماره اول/بهار ۱۴۰۱ (۶۷-۵۵)

Animal Production Research

مقاله پژوهشی

اثر مصرف لتروزول بر شاخص‌های تولیدمثلی خروس‌های مسن در گله مرغ مادر گوشتی

حمیده عادل دوست[۱]، امجد فرزین پور[۲*]، عباس فرشاد[۲]، اسعد وزیری[۳]، جلال رستم زاده[۳]

۱- دانش‌آموخته مقطع دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۰۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۹)

چکیده

در این مطالعه، آثار مهارکننده آروماتاز داروی لتروزول بر شاخص‌های تولیدمثلی خروس‌های گله مرغ مادر گوشتی در آخر دوره تولید به‌صورت کوتاه مدت (سه هفته) و متناوب (سه روز مصرف و دو روز قطع دارو) مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد ۱۸ قطعه خروس ۵۵ هفته (با میانگین وزنی ۵۲۰۰ گرم) به‌صورت تصادفی به سه گروه آزمایشی دریافت‌کننده لتروزول T0، T1 و T2 (به ترتیب ۰، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ میلی‌گرم به ازای هرکیلوگرم وزن بدن) تقسیم شدند. نتایج نشان داد که شاخص گنادی، جنبایی و جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی، فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم، غلظت منی و نرخ باروری در گروه‌های لتروزول نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/001$). میزان پراکسیداسیون لیپیدی و درصد اسپرم‌های نابهنجار در گروه‌های T1 و T2 کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان دادند. ضخامت اپیتلیوم و قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و تعداد سلول‌های اسپرم داخل بیضه و اپیدیدیم در گروه‌های T1 و T2 بهبود یافت. غلظت تستوسترون پلاسما در گروه T2 بالاتر و غلظت بیضه‌ای در هر دو گروه لتروزولی تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشتند، و غلظت هورمون FSH در گروه‌های T1 و T2 نسبت به T0 افزایش یافت ($P<0/05$). غلظت استروژن پلاسما، بر عکس تستوسترون، در گروه T2 کمتر از بقیه گروه‌ها بود و غلظت بیضه‌ای در هر دو گروه T1 و T2 کمتر از گروه شاهد اندازه‌گیری شد. نسبت استروژن به تستوسترون در گروه T2 به‌طور معنی‌داری کمتر بود. روند افزایشی برای سطح ژن *PVRL3* بافت بیضه (مرتبط با اسپرم‌ریزی) و روند کاهشی برای سطوح ژن‌های *Foxj1* (مرتبط با مژه‌زایی) و *LPR2* (مرتبط با اندوسیتوز) بافت اپیدیدیم در گروه‌های T1 و T2 مشاهده شد. بر اساس نتایج این پژوهش، استفاده از داروی لتروزول سبب بهبود شاخص‌های تولیدمثلی خروس‌های گله مرغ مادر گوشتی شد.

واژه‌های کلیدی: استروژن، تستوسترون، خروس مادر گوشتی، مهارکننده آروماتاز

* نویسندهٔ مسئول: amjadfarzinpour@uok.ac.ir

doi: 10.22124/AR.2022.18301.1583

مقدمه

هدف گله‌های مرغ مادر، تولید تخم‌های بارور بوده و کاهش باروری به ویژه بعد از ۵۰ هفتگی، مهمترین معضل در صنعت مرغ مادر است (Romero-Sanchez *et al*., 2008). با وجود اینکه پرنده نر و پرنده ماده به عنوان مسئول این کاهش باروری شناخته شده‌اند، اما پرندگان نر، بیشترین نقش را در این افت باروری ایفا می‌کنند. تلقیح مصنوعی و جایگزینی خروس‌های پیر با جوان یکی از روش‌های معمول جهت حفظ و افزایش باروری در گله‌های مرغ مادر است (Hocking and Romero-Sanchez *et al*., 2008; Bernard, 2000). باروری در خروس‌های مادر گوشتی به‌طور معمول در سن ۳۰ تا ۴۰ هفتگی به بالاترین میزان رسیده و سپس به تدریج کاهش می‌یابد (Weil *et al.,* 1999). کاهش غلظت و حجم منی در پرندگان پیر، عامل اصلی افت باروری است (Zhang *et al*., 1999). نسبت استرادیول به تستوسترون در بافت بیضه و نیز پلاسمای خون به عنوان شاخص هورمونی برای ارزیابی باروری در جنس نر مطرح است. این شاخص در پرندگان با باروری بالا نسبت به خروس‌های با باروری پایین به لحاظ عددی کمتر است (Weil *et al*., 1999). گزارش شده است که کاهش باروری در خروس از ۴۵ هفتگی با کاهش وزن بیضه، تولید اسپرم و سطوح تستوسترون همراه است (Fragoso *et al*., 2013). لتروزول نسل سوم مهارکننده‌های غیر استروئیدی آروماتاز است که با مهار آنزیم آروماتاز از تبدیل تستوسترون به استروژن جلوگیری کرده و بدین ترتیب بازخورد منفی استروژن بر محور هیپوتالاموس/ هیپوفیز کاهش می‌یابد (Pritts, 2010). مهارکننده‌های آروماتاز با مهار مسیر تبدیل اندروستندیون به استرون و تستوسترون به استرادیول در درمان سرطان سینه تهاجمی و القاء تخمک‌گذاری در انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Noriega *et al*., 2008; Regan *et al*., 2011). مطالعات زیادی با استفاده از مهارکننده‌های آروماتاز از جمله لتروزول با الگوی حیوانی مختلف و جنس نر و ماده صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به تغییر جنسیت پرندگان در دوره انکوباسیون اشاره داشت (Valizadeh and Seratinouri, 2013). تحقیقات دیگر نشان داد که لتروزول سبب کاهش معنی‌دار هورمون استروژن، افزایش هورمون تستوسترون و پروژسترون و توقف تخم‌گذاری شد، ولی بعد از قطع مصرف آن، سبب تحریک و افزایش تخمک‌گذاری در بلدرچین‌های تخم‌گذار جوان و مسن شد (Azimi *et al.,* 2013; Zandi *et al.,* 2019). نتایج حاصل از پژوهش انجام گرفته روی موش‌های نر به مدت ۱۰ روز نشان داد که تجویز مهارکننده آروماتاز سبب افزایش معنی‌داری در تستوسترون سرم، وزن بدن، طول بدن، طول دم و سطح سرمی هورمون رشد شد، در حالی که تاثیر معنی‌داری بر سطح سرمی IGF-1 نداشت (Eshet *et al*., 2004). بر اساس گزارشاتی، استفاده از لتروزول در مردان نابارور با علایم آزوسپرمی غیرانسدادی و آزواسپرمی نهان، موجب افزایش غلظت FSH، LH و تستوسترون، افزایش میزان اسپرم، جنبندگی اسپرم و کاهش افراد تحت درمان شده بود (Cavallini *et al*., 2013; Saylam *et al*., 2011)، در حالی که بالا بودن سطح استرادیول در خروس‌های با باروری پایین به دلیل اثر بازخورد منفی بر هیپوتالاموس و هیپوفیز پیشین سبب کاهش سطح پلاسمایی LH و تستوسترون می‌شود. ولی در خروس‌های با باروری بالا، سطح استرادیول پایین بوده و بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز تاثیر مثبت خواهد داشت. این نتایج پیشنهاد می‌کند که کنترل اندوکرینی این محور به نسبت بین سطوح پلاسمایی استرادیول و تستوسترون مرتبط است. فرض شده است که در خروس‌های با باروری پایین، تستوسترون کمتری در بیضه ساخته شده و میزان بیشتری به استرادیول متابولیزه می‌شود که منجر به نسبت‌های بالای این دو در بیضه و پلاسما می‌شود. این فرضیه با مطالعاتی تقویت می‌شود که در آنها، کلومفن سیترات و تاموکسیفن به عنوان داروهای غیراستروئیدی با قابلیت اتصال به گیرنده‌های استروژن، مورد بررسی قرار گرفته است. تجویز این آنتی استروژن‌ها به خروس سبب افزایش سطوح LH و تستوسترون پلاسما و بهبود باروری شد (Rosenstrauch *et al*., 1994). با توجه به اهمیت باروری در گله‌های مرغ مادر و کاهش باروری بعد از اوج تولید، ارائه راهکاری کاربردی و موثر برای حفظ باروری بعد از اوج می‌تواند سبب افزایش سودآوری صنعت مرغ مادر شود. لذا ارائه

راهکاری فیزیولوژیک برای تحریک مسیر تولیدمثلی ارزشمند خواهد بود. بنابراین استفاده از مهارکننده‌های آروماتاز از مسیر کاهش تبدیل تستوسترون به استرادیول و جلوگیری از بهم خوردن نسبت این دو هورمون می تواند راهکار موثری باشد. هدف از این پژوهش، بررسی آثار دارویی لتروزول به عنوان نسل سوم مهارکننده آنزیم آروماتاز بر عملکرد تولیدمثلی خروس‌های گله مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ در انتهای دوره است.

مواد و روش‌ها

مکان آزمایش و حیوانات: این تحقیق در شرکت مرغ مادر واروک شهرستان سنندج در استان کردستان انجام شد. ۱۸ قطعه خروس مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ در سن ۵۵ هفتگی (آخر دوره تولید) در داخل سالن به‌طور تصادفی انتخاب و پس از وزن‌کشی در گروه‌های وزنی مشابه قرار گرفته و هر گروه با شماره‌های مشخص پلاک بندی شدند. خروس‌ها به سه گروه شش تایی دسته‌بندی و به شرح زیر تیماردهی شدند: گروه شاهد (T0)، لتروزول به میزان ۰/۰۱۵ (T1) و ۰/۰۳ (T2) میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن/روز به‌صورت منقطع (سه روز استفاده از لتروزول، توقف به مدت دو روز (نیمه عمر لتروزول))، به‌صورت گاواژ همراه با آب آشامیدنی به مدت سه هفته تیماردهی شدند. برنامه نوری شامل ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و دمای داخل سالن بین ۲۰-۲۲ درجه سلسیوس و برنامه غذایی مطابق با برنامه مدیریتی شرکت مرغ مادر بود (جدول ۱). برای تعیین مقدار ۰/۰۳ میلی‌گرم لتروزول از مقدار استاندارد شده ۲/۵ میلی‌گرم روزانه در انسان استفاده شد که با تقسیم کردن آن به وزن استاندارد یک انسان بالغ به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بدست آمد.

نمونه‌برداری: در پایان آزمایش، بعد از وزن‌کشی و خون‌گیری از سیاهرگ بال، خروس‌ها کشتار شدند. بلافاصله پس از خون-گیری، نمونه‌ها به لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA) و همچنین لوله‌های عاری از ماده ضد انعقاد منتقل شدند. بیضه‌ها و ناحیه اپیدیدیم به دقت جدا و خارج شدند و برای محاسبه شاخص بیضه (تقسیم وزن بیضه (گرم) به وزن بدن (کیلوگرم)) توزین شدند (Heng *et al.*, 2017). دو نمونه از بیضه و اپیدیدیم یکی برای بررسی بافت شناسی به داخل محلول بافر فرمالین ۱۰ درصد و نمونه دوم برای اندازه‌گیری بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه به فریزر ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شدند.

جدول ۱- اجزای تشکیل‌دهنده جیره پایه خروس‌های مادر راس ۳۰۸

Table 1. Ingredients of the standard diet of Ross 308 broiler roosters

Item	Value (%)	Amino acids	Value (%)
Corn	69.5	Lys	0.46
Soybean meal	9	Met	0.39
Wheat bran	19.5	Met-Cys	0.49
Dicalcium phosphate	0.18	Ile	0.4
Calcium carbonate	0.85	Leu	0.53
Vitamin premixa[a]	0.25	Val	0.5
Trace mineral premix[b]	0.25	Trp	0.12
DL-Met	0.12	Arg	0.67
(%)CP	12	Na	0.15
(%) Available P	0.35	Cl	0.15
Ca (%)	0.7	K	0.6
Salt	0.35	Thr	0.37
ME (Kcal/kg)	2754/5		

[a] Supplied per kg of diet: vitamin A, 15,000 IU; vitamin D, 3000 IU; vitamin E, 100 IU; vitamin K3, 4 mg; vitamin B12, 25 µg; biotin, 50 mg; pantothenic acid, 18 mg; riboflavin, 7.5 mg; pyridoxine, 5.5 mg; folic acid, 1.5 mg and niacin, 50 µg.

[b] Supplied per kg of diet: Mn ($MnSO_4 \cdot H_2O$), 120 mg; Zn (ZnO), 110 mg; Fe ($FeSO4 \cdot H2O$), 90mg; I, 2 mg and Se (Na_2SeO_3), 0.3 mg.

ارزیابی کیفی اسپرم: فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل جنبایی کل و پیش‌رونده، حجم منی، غلظت اسپرم، درصد اسپرم‌های نابهنجار، زنده‌مانی و درصد اسپرم‌های دارای غشای فعال، اندازه‌گیری تولید روزانه اسپرم در بیضه و میزان پراکسیداسیون لیپیدی از منی جمع‌آوری شده از وازودفران مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین درصد اسپرم‌های با آکروزوم سالم و یا اسپرم‌های ناهنجار از لحاظ آکروزوم از محلول فرمالین-سیترات و برای ارزیابی فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم از آزمون تورم هایپواسموتیک استفاده شد و در نهایت، لام‌های تهیه شده زیر میکروسکوپ نوری و با بزرگ‌نمایی X ۴۰ قرار داده شده و ۱۰ نقطه از لام (به‌طور تصادفی) و در هر نقطه، ۲۰ اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت (Ansari *et al.,* 2017). میزان پراکسیداسیون لیپیدی از راه اندازه‌گیری غلظت مالون دی‌آلدهید انجام شد (Esterbauer *et al.*, 1990).

اندازه‌گیری هورمون‌های خون و بافت بیضه: به منظور تعیین اثر تیمارهای آزمایشی روی سطوح هورمون‌های پلاسما و بیضه از جمله FSH، تستوسترون و استرادیول از روش الایزا و کیت مونوبایند (Monobind Inc., Costa Mesa, CA, USA) استفاده شد. حساسیت کیت‌های تستوسترون، ۰/۰۵۷۶ نانوگرم در میلی‌لیتر با ضریب تغییرات ۴/۸ درصد، استرادیول، ۸/۲ پیکوگرم در میلی‌لیتر با ضریب تغییرات ۸/۵ درصد و FSH، ۰/۰۰۶ mIU در هر چاهک با ضریب تغییرات ۳/۸ درصد بودند. به منظور تعیین سطوح هورمون بافت بیضه، سوسپانسیون تهیه شد که به‌طور خلاصه، یک گرم از بافت بیضه از هر پرنده با استفاده از تیغ جراحی به تکه‌های خیلی کوچک خرد شده و با دو میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=7) مخلوط و هموژن شد. بافت هموژن شده (۲۲۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه) سانتریفیوژ و سپس مایع رویی بدست آمده دوباره (۱۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه) سانتریفیوژ شد. مایع رویی برداشته شده و تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (Taras *et al.*, 2006).

باروری برون تنی و ارزیابی نفوذ اسپرم: روش (Bramwell *et al.* 1995) برای اندازه‌گیری باروری برون تنی و ارزیابی نفوذ اسپرم به غشای پری‌ویتلین استفاده شد که به‌طور خلاصه در زیر توضیح داده می‌شود: ۱- جداسازی زرده تخم‌مرغ بدون نطفه و قرار دادن در ظرف حاوی سرم فیزیولوژیک یک درصد، ۲- بعد از پاک‌سازی، انکوباسیون به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در محلول کلرید هیدروژن ۰/۰۱ مولار، ۳- شستشو در محلول نمکی و برش زدن لایه اطراف بلاستودیسک، چندین بار شستشو در محلول نمکی و در نهایت لایه پری ویتیلن بدست آمد، ۴- غشای پری ویتلین آماده شده به داخل ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت TCM-199 منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۴۰ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس ۲۰۰ میلی‌لیتر از منی رقیق شده به محیط کشت اضافه و به مدت ۵ دقیقه به حالت شیک در حمام آب گرم ۴۰ درجه سلسیوس انکوبه شد (غلظت نهایی $۱/۲۵ \times ۱۰^{۷}$ اسپرم /میلی لیتر). بعد از انکوباسیون غشاها، دو بار در محلول نمکی یک درصد شستشو شده و سپس به آهستگی و به کمک پنس روی لام پهن شدند. یک تا سه قطره فرمالین۱۰ درصد روی غشا ریخته و غشا به مدت یک دقیقه در آن غوطه‌ور و تثبیت شد. یک تا دو قطره معرف شیف روی غشا ریخته شد، بلافاصله پس از رنگ گرفتن غشا، با استفاده از محلول نمکی یک درصد کلرید سدیم به میزان دو مرتبه شستشو داده شده و پس از خشک شدن رنگ، تعداد سوراخ‌های ایجاد شده به وسیله اسپرم با استفاده از میکرسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰x در مساحت یک میلی‌متر مربع شمارش شدند.

بافت شناسی: جهت مطالعات بافت شناسی، نمونه‌های بافت بیضه و اپیدیدیم (شش خروس در هر تکرار) در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شده و برای تکمیل فرآیند تثبیت بافتی، مراحل پاساژ، قالب‌گیری، برش قالب‌های پارافینی و رنگ-آمیزی ائوزین– هماتوکسیلین روی نمونه ها صورت گرفت. اسلایدها با میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ×۱۰۰) مجهز به دوربین چشمی، عکس‌برداری شدند و قطر لوله اسپرم‌ساز و ضخامت اپیتلیوم لوله اسپرم‌ساز با بررسی مقاطع عرضی ۲۰ لوله اسپرم‌ساز و تعداد اسپرم‌ها در داخل لوله‌های ناحیه اپیدیدیم به‌طور تصادفی و با میانگین‌گیری از آنها بدست آمد.

بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه: برای بررسی ساز و کار اثر مهارکننده آروماتاز در بیضه، بیان نسبی ژن *PVRL3* (درگیر در فرآیند اسپرم‌ریزی) و در اپیدیدیم، بیان نسبی ژن‌های *LPR2* (درگیر در اندوسیتوز) و *FOXJ1* (درگیر در رشد و

تکثیر مژه)(جدول ۲) مورد ارزیابی قرار گرفتند. توالی ژن‌های نامزد از پایگاه داده NCBI بدست آمد. پرایمرها با نرم افزار آنلاین Primer3Plus طراحی و به وسیله نرم افزارهای آنلاین OligoAnalyser، OligoCalc و همچنین PrimerBLAST مورد بازبینی قرار گرفتند و بتا-اکتین به عنوان شاهد داخلی در نظر گرفته شد.

جداسازی RNA کل بافت‌های بیضه و اپیدیدیم با کمک محلول ترایزول (Ambion, USA) و ساخت DNA مکمل با استفاده از کیت مخصوص (GeneAll, South Korea) در حجم نهایی ده میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر (BioRad, USA) انجام گرفت. واکنش‌های Real-time PCR با کمک آغازگرهای ویژه ژن‌های نامزد ساخت شرکت تکاپوزیست و مسترمیکس HOT FIREPol® EvaGreen®qPCR Mix Plus (شماره کاتالوگ: ۰۸-۰۰۰۰۱-۲۵) و دستگاه Rotor-® Gene ساخت شرکت Corbette Research (model: RG2072D) انجام شد. برنامه PCR شامل یک گامه واسرشته‌سازی ۵ دقیقه‌ای در ۹۵ °C ، ۴۰ چرخه ۲۵ ثانیه‌ای در ۹۵ °C ، ۲۰ ثانیه در ۵۵ °C و ۲۰ ثانیه در ۷۲°C بود. در مورد هر یک از نمونه‌ها و برای هر کدام از ژن‌های کاندید، چرخه آستانه (Ct) از روی نمودارها تعیین شده و داده‌های حاصل با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری: داده ها در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل شدند. وزن بدن به عنوان متغیر همبسته در مدل آماری گنجانده شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و در سطح آماری پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به حجم مایع منی نشان داد که گروه T2 بیشترین حجم مایع منی را داشته و اختلاف معنی‌داری با گروه‌های T0 و T1 دارد ($P<۰/۰۵$). شاخص جنبایی، جنبایی پیش‌رونده، شاخص سلامت غشاء، شمارش اسپرم در مایع منی و زنده‌مانی نشان دادند که تیماردهی با لتروزول سبب بهبود معنی‌داری نسبت به گروه شاهد شد ($P<۰/۰۱$)(جدول ۳). لتروزول سبب کاهش معنی‌داری در درصد اسپرم‌های نابهنجار نسبت به گروه شاهد شد ($P<۰/۰۰۱$). تیماردهی کوتاه مدت با لتروزول به‌صورت منقطع می‌تواند باعث بهبود پراکسیداسیون لیپیدی شود و نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری دارد، ولی تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های تیماری مشاهده نشد ($P<۰/۰۱$)(جدول ۳). استفاده از لتروزول به‌صورت طولانی مدت در خروس‌های مرغ مادر بعد از اوج تولید باعث بهبود کیفیت فراسنجه‌های اسپرم و هم چنین شاخص گنادی شده بود که این نتایج با نتایج پژوهش دیگر (Ali *et al.*, 2017) همخوانی دارد. استفاده از سطح ۲/۵ میلی گرم در روز لتروزول باعث بهبود نسبت تستوسترون به استرادیول و همچنین افزایش غلظت و جنبایی اسپرم در مردان با کمبود اسپرم شد (Saylam *et al.*, 2011) که با نتایج پژوهش حاضر در یک راستا هستند.

وزن بدن بین پرنده‌های گروه‌های آزمایشی مختلف تفاوت معنی‌داری نشان نداد، ولی وزن بیضه در گروه T2 بالاترین مقدار را داشته و با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۰۳$)(جدول ۳). شاخص گنادی در گروه‌های آزمایشی روند مثبت معنی داری داشت و بالاترین مقدار در گروه T2 مشاهده شد ($P<۰/۰۱$).

جدول ۲- جزئیات مربوط به توالی پرایمرهای مورد استفاده در real-time PCR

Table 2. Details of primer sequences used for quantitative real-time PCR

Gene	Sequence	Product size (bp)	Accession number
β-actin	F: AGCTATGAACTCCCTGATGG R: ATCTCCTTCTGCATCCTGTC	236	X00182
PVRL3	F: CATGTGGACCAGGCTGGATG R:GTCTTCTGATCACTCCTCTGACC	150	XM_416630.5
LPR2	F: GGAGTGTTAGCGATTGGAGGC R: CCACACTACCAGCTCCTGTTA	349	XM_004942766.2
FOXJ1	F: TCCTACGCCACTCTCATCTG R: TTCAAGGACAGGTTGTGTCG	155	NM_001321535

PVRL3: cell adhesion molecule 3 Protein, *LPR2*: lipoprotein receptor-related protein 2; *FOXJ1*: Forkhead box J1.

بر اساس نتایج بدست آمده، اختلاف معنی‌داری ($P<۰/۰۱$) در تولید اسپرم روزانه در هر گرم بیضه در گروه T1 نسبت به بقیه گروه‌ها مشاهده شد. مطالعه در خروس‌ها نشان داد که تکامل و توسعه بیضه با تکامل بدن تناسب داشته و کاهش وزن بیضه با کاهش تولید اسپرم همراه است. در نتیجه، هم وزن بدن بالا و هم وزن بدن پایین، تاثیر منفی بر تکامل بیضه داشته و سبب کاهش باروی یا ناباروی حیوانات می‌شود (Fragoso *et al.*, 2013). در مطالعه حاضر، وزن بدن پرندگان در گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند، ولی وزن بیضه در گروه‌های لتروزلی نسبت به گروه شاهد دارای تفاوت معنی‌دار بود. با توجه به افزایش معنی‌دار وزن بیضه در پرندگان تیمار شده با لتروزل، شاخص گنادی نیز در گروه‌های تیماری افزایش پیدا کرد، که با نتایج پژوهش دیگر (Ali *et al.*, 2017) در خروس‌های گله مادر مطابقت دارد. همچنین استفاده از لتروزول در خوک سبب افزایش وزن بیضه، تعداد سلول‌های سرتولی و تولید اسپرماتید شد (Taras *et al.*, 2006). استفاده کوتاه مدت از لتروزل به‌صورت پیوسته در خروس‌های مرغ مادر آخر دوره تولید نیز نتایج تقریباً مشابهی نسبت به استفاده منقطع از لتروزول نشان داد که با توجه به این نتایج می‌توان بیان کرد که هم استفاده پیوسته و هم منقطع، نتایج تقریباً مشابهی در ارزیابی اسپرم دارند (Adeldust *et al.*, 2021).

بررسی‌های انجام شده روی باروری نشان داد (جدول ۳) که واکنش اسپرم-تخمک در گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۱$)، به‌طوری که گروه دریافت‌کننده ۰/۰۳ میلی گرم لتروزول دارای بیشترین نقاط هیدرولیز شده ناشی از واکنش اسپرم روی غشای پری‌ویتلین بود و کمترین واکنش اسپرم-تخمک در گروه شاهد شمارش شد. آثار تحریک‌کنندگی و مهارکنندگی استروژن در فیزیولوژی جنس نر عمدتاً در اسپرمیوژنز گزارش شده است (Seralini and Moslemi, 2001). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که جنس نر نسبت به فعالیت بازدارندگی استروژن نسبت به جنس ماده حساس‌تر بوده و غلظت بالای استروژن و غلظت‌های پایین تستوسترون در سنین بالا مشاهده می‌شود. سطح بالای استروژن همراه با سطوح پایین آندروژن‌ها در اسپرم‌سازی، مانند حالتی که در افراد چاق کم بارور وجود دارد، با تولید پایین اسپرم همراه است که در این افراد، استفاده از مهارکننده‌های آروماتاز باعث بهبود باروری می‌شود (Peter and Schlegel, 2012).

ارزیابی فراسنجه‌های بیوشیمیایی از جمله کلسیم، فسفر و پروتئین خام نشان داد که تیماردهی کوتاه مدت با لتروزول تاثیر معنی‌داری بر مقادیر این فراسنجه‌ها ندارد و حتی در گروه دریافت‌کننده ۰/۰۱۵ میلی‌گرم لتروزول، میزان کلسیم و فسفر نسبت به گروه شاهد کمتر است که علت آن مشخص نیست و احتمال دارد که این کاهش در ارتباط با تغییرات غلظت هورمون‌های تستوسترون و استرادیول باشد که در سوخت و ساز و بازجذب کلسیم نقش دارند (جدول ۴). مطالعه بافت‌شناسی بیضه و ناحیه اپیدیدیم پرندگان تیمار شده با لتروزول نشان داد که تیماردهی کوتاه مدت خروس‌های مسن گله مرغ مادر باعث بهبود وضعیت لوله منی‌ساز، ضخامت اپیتلیوم و مجاری ناحیه اپیدیدیم از جمله مجرای دیستال و اپیدیدیمیس می‌شود. همانطور که در جدول ۴ نشان داده شده است، قطر و ضخامت اپیتلیوم لوله منی‌ساز در گروه‌های تیماری نسبت به گروه شاهد افزایش یافته و از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند و بیشترین بهبود در گروه دریافت‌کننده پیوسته ۰/۰۳ میلی-گرم لتروزول است. جمعیت اسپرم در داخل مجاری اپیدیدیم نیز نسبت به گروه شاهد افزایش یافته که بیشترین میزان در گروه ۰/۰۳ میلی‌گرم است. استفاده طولانی مدت از لتروزل در خروس‌های گله مادر بعد از اوج تولید باعث افزایش جمعیت اسپرم در مجاری اپیدیدیم و لوله‌های اسپرم‌ساز شد (Adeldust *et al.*, 2017).

در مطالعاتی که برای مقایسه بافت‌شناسی بیضه خروس‌های جوان و مسن انجام شد، نشان داده شد که با افزایش سن و کاهش باروری، وزن و اندازه بیضه کاهش یافته و این تغییرات فیزیکی بیضه و اپیدیدیم منطبق با تغییرات فیزیولوژیکی بود. از جمله این تغییرات، کاهش قطر مجاری، کم شدن تعداد اسپرم در مجاری، پس‌روی بافت بیضه، جدا شدن سلول‌های جنسی پیش از کامل شدن تقسیمات، کاهش ضخامت اپیتلیوم، کاهش تعداد لوله‌های منی‌ساز و افزایش فضای بینابینی بودند (Fragoso *et al.*, 2013).

جدول ۳- اثر لتروزول بر برخی فراسنجه‌های تولیدمثلی خروس‌های مسن گله مادر گوشتی (میانگین±انحراف معیار)

Table 3. Effect of letrozole on some reproductive traits in aged broiler breeder roosters (mean±SD)

Traits[1]	Letrozole (mg/kg of body weight)			*P*-value
	0	0.015	0.03	
Semen volume (mL)	0.46 ± 0.05^{b}	0.46 ± 0.08^{b}	0.55 ± 0.05^{a}	0.06
Total motility (%)	80.7 ± 0.62^{b}	85 ± 0.6^{a}	84.9 ± 0.4^{a}	0.01
Forward motility (%)	70.7 ± 0.42^{c}	72.6 ± 0.4^{b}	74.7 ± 0.3^{a}	0.01
Sperm abnormality (%)	10.6 ± 0.08^{a}	10.2 ± 0.13^{b}	10.2 ± 0.1^{b}	0.01
Live sperm (%)	69.9 ± 0.4^{c}	77 ± 0.3^{b}	80.5 ± 0.3^{a}	0.01
Plasma membrane integrity (%)	70.5 ± 0.34^{c}	73.8 ± 0.24^{b}	76.1 ± 0.23^{a}	0.01
Sperm concentration ($\times 10^{9}$)	4.2 ± 0.05^{c}	4.4 ± 0.03^{b}	4.6 ± 0.05^{a}	0.01
Malondialdehyde (nM/mL)	0.94 ± 0.03^{a}	0.8 ± 0.01^{b}	0.77 ± 0.01^{b}	0.01
Body weight (kg)	5.2 ± 0.16	5.1 ± 0.19	5.1 ± 0.12	0.3
Testes weight (g)	37.4 ± 4.1^{b}	40.5 ± 0.53^{b}	41 ± 0.35^{a}	0.003
Gonadal somatic index[2]	7.1 ± 0.73^{b}	7.6 ± 0.70^{a}	8.7 ± 0.80^{a}	0.01
Sperm concentration in testes(106)	25.1 ± 0.43^{b}	31.5 ± 0.4^{a}	$24.8 \pm 0/8^{b}$	0.01
Fertilization index (holes/mm2)	117.5 ± 1.5^{c}	123.3 ± 2.3^{b}	130.1 ± 2.3^{a}	0.01

[1] Different superscript letters in each row indicate significant differences ($P<0.05$).
[2] The gonadal somatic index is calculated as testicular weight (g)/body weight (kg).

جدول۴- اثر لتروزول بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی پلاسما و هیستولوژیکی در خروس‌های مسن

Table 4. Effect of letrozole on some histological and plasma biochemical parameters in aged roosters

Traits[1]	Letrozole (mg/kg of body weight)			*P*-value
	0	0.015	0.03	
Phosphor (mg/dL)	0.44 ± 0.15	0.4 ± 0.16	0.43 ± 0.16	0.91
Calcium (mg/dL)	0.2 ± 0.06	0.18 ± 0.07	0.2 ± 0.09	0.93
Total protein (g/dL)	0.16 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.3
DST[3](µm)	17.1 ± 0.35^{c}	18.3 ± 0.32^{b}	18.8 ± 0.3^{a}	0.001
TSE[4](µm)	2.3 ± 0.3^{c}	2.5 ± 0.2^{b}	3.1 ± 0.2^{a}	0.001
Proximal ductules	+	+	+	0.001
Distal ductules	+	++	++	0.01
Epididymal duct	+	++	++	0.01

[1] Different superscript letters in each row indicate significant differences ($P<0.05$).
[2] The gonadal somatic index is calculated as testicular weight (g)/body weight (kg).
[3] Diameter of the seminiferous tubule.
[4] Thickness of the seminiferous epithelium.
[+] Sections in which >30% of the ducts displayed full sperms.
[++] Sections between 30-60 % of the ducts displayed a full sperm.

استفاده از لتروزول در خوک نیز سبب افزایش وزن بیضه، تعداد سلول‌های سرتولی و تولید اسپرماتید شد (Taras *et al.*, 2006). نتایج مربوط به اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت هورمون‌های تستوسترون، استرادیول، FSH و همچنین نسبت استرادیول به تستوسترون پلاسمایی و بیضه‌ای در شکل ۱ نشان داده شده است. غلظت پلاسمایی و بیضه‌ای هورمون تستوسترون روند افزایشی معنی‌داری داشت و بالاترین غلظت، در گروه T2 ثبت شد (شکل ۱-A). همان‌طور که انتظار می‌رفت، لتروزول باعث کاهش غلظت هورمون استرادیول در خروس‌های آخر دوره شد، بدین صورت که غلظت پلاسمایی استرادیول در گروه T2 کمترین میزان را داشته و نسبت به دو گروه دیگر اختلاف معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$). غلظت استرادیول بیضه‌ای در گروه‌های لتروزلی کمتر از گروه شاهد بود و اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تیماری وجود داشت (شکل ۱-B). نسبت هورمون‌های استرادیول به تستوسترون نشان داد که نسبت استرادیول به تستوسترون پلاسمایی در گروه T2 به‌طور معنی‌داری کمتر از دو گروه دیگر بود (۰/۰۵ >P)(شکل ۱-C). غلظت پلاسمایی FSH در گروه‌های لتروزول بالاتر از گروه شاهد بود و بیشترین غلظت در گروه T1 مشاهده شد، هر چند بین گروه‌های لتروزولی اختلاف

معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۱-D). مطالعات زیادی در ارتباط با هورمون درمانی برای بهبود باروری و ارزیابی فراسنجه‌های اسپرم انجام شده است که از آن جمله می‌توان به این مورد اشاره کرد: تجویز تستوسترون و دی هیدروتستوسترون به مدت ۱۰ روز در موش‌های هیپوفیزبرداری شده سبب توقف اسپرم‌سازی در مرحله اسپرماتوسیت شد، در حالی که تداوم تجویز تا ۶۴ روز سبب تکمیل زنجیره اسپرماتوژنز شد. میزان باروری برای تیمارهای تستوسترون، دی هیدروتستوسترون در موش بزرگ هیپوفیزبرداری شده کمتر از ۵۰ درصد گزارش شده بود که علت این کاهش باروری به‌طور دقیق بررسی نشده است. به‌طور کلی، برای حفظ باروری طبیعی بدون گنادوتروپین‌ها، غلظت بالایی از تستوسترون برای اسپرم‌سازی لازم است (Buhl *et al.*, 1982). استفاده از لتروزول به مدت دو ماه در اسب موجب افزایش معنی‌دار غلظت تستوسترون و کاهش معنی‌دار غلظت هورمون‌های استرادیول، LH و اینهیبین شد (Stein *et al.*, 2002). در مطالعه حاضر نیز استفاده کوتاه مدت لتروزول در خروس‌های آخر دوره موجب تغییرات معنی‌دار در غلظت هورمون‌های تستوسترون، استرادیول پلاسمایی و بیضه‌ای و FSH پلاسمایی شد که نشان‌دهنده تاثیر قوی لتروزول روی آنزیم آروماتاز و در نتیجه تغییر غلظت هورمون‌های تستوسترون و استرادیول است. استفاده طولانی مدت از لتروزول به‌صورت هفتگی در خوک نشان داد که کاهش استروژن اندوژنوس تاثیری روی غلظت هورمون FSH ندارد، ولی به‌طور معنی‌داری سبب کاهش غلظت هورمون استرادیول شد که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر که لتروزول سبب افزایش گنادوتروپین FSH شد، تفاوت دارد (Taras *et al.*, 2006). این اختلاف نتایج ممکن است به علت متفاوت بودن استفاده روزانه یا هفتگی یا مقادیر استفاده شده لتروزول باشد. همچنین ممکن است آثار آن در الگوهای حیوانی مختلف متفاوت باشد. استفاده از لتروزول در موش‌های بزرگ سبب تحریک ترشح FSH و LH، کاهش غلظت پلاسمایی و بیضه‌ای استرادیول، کاهش میزان آپوپتوزیس سلول‌های جنسی و در نهایت افزایش غلظت پلاسمایی تستوسترون شد (Rambhatla *et al.*, 2016).

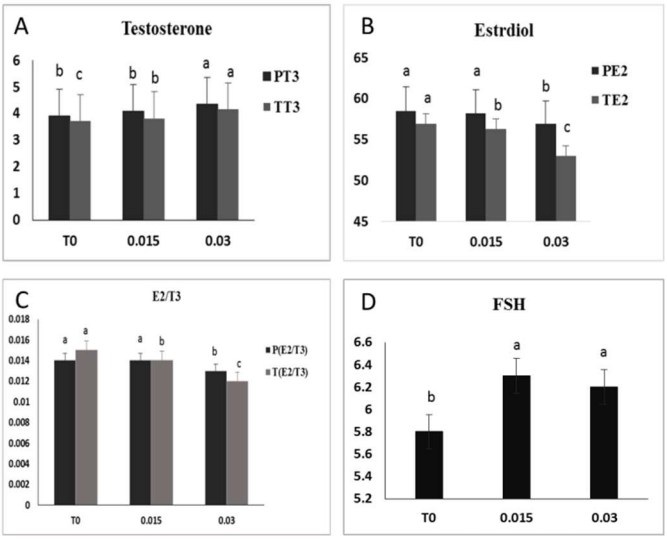

Fig. 1. Testicular and plasma concentrations of testosterone (A), estradiol (B), estradiol to testosterone ratio (C), and plasma concentration of FSH (D) following treatment with letrozole in aged broiler breeder roosters (n=6, means ± SD)

شکل ۱- غلظت‌های پلاسمایی و بیضه‌ای هورمون‌های تستوسترون (A)، استرادیول (B) و نسبت هورمون استرادیول به تستوسترون (C)، و غلظت پلاسمایی هورمون FSH (D) بعد از تیمار با لتروزول (میانگین±انحراف معیار)

بیان نسبی ژن های مورد مطالعه در شکل ۲ خلاصه شده است. نتایج نشان داد که بیان ژن‌های *Foxj1* (A) و *LPR2* (B) در تیماردهی کوتاه مدت با لتروزول در نتیجه کاهش هورمون استروژن در گروه‌های تیماری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت که از لحاظ آماری معنی‌دار بود، ولی در بین گروه‌های تیماری، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج بدست آمده از این پژوهش با نتایج تحقیقاتی که Okada *et al.* (2004) با تیماردهی استروژن روی موش‌ها انجام دادند همبستگی دارد. آنها نشان دادند که استروژن باعث تغییراتی در مورفولوژی و بیان نشانگرهای تمایز سلول‌های مژه‌دار اویداکت و تحریک سلول‌های مژه‌دار از جمله پروتئین *Foxj1* می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که لتروزل با کاهش هورمون استروژن سبب کاهش بیان ژن *Foxj1* می‌شود که با توجه به نقش این پروتئین در تکثیر و تمایز سلول‌های مژه‌دار و اهمیت سلول‌های مژه‌دار در ناحیه اپیدیدیم، احتمال دارد که سبب انباشتگی در مجاری این ناحیه شود. ژن *LPR2* کدکننده پروتئینی به نام مگالین است که در تعدادی از بافت‌ها که به هورمون‌های استروئیدی پاسخ می‌دهند بیان می‌شود و به عنوان حامل هورمون‌های جنسی عمل می‌کند (Hammes *et al.*, 2005). مطالعات زیادی در پرندگان از نظر تاثیر هورمون‌های استروئیدی بر میزان بیان ژن *LPR2* انجام نشده است. پژوهش‌ها در مرغ تخم‌گذار و خروس نشان داد که در پرندگان تیمار شده با استروژن، بیان ژن *LPR2* افزایش یافت که نشان‌دهنده القای بیان ژن *LPR2* به وسیله هورمون استروژن است (Plieschnig *et al.*, 2012)، که با نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر تطابق دارد. کاهش بیان ژن *LPR2* در مطالعه حاضر نشان‌دهنده این است که لتروزول از مسیر کاهش غلظت استروژن باعث کاهش فعالیت پروتئین مگالین در نتیجه کاهش بیان ژن *LPR2* در خروس‌های تیمار شده می‌شود. نتایج بیان نسبی ژن *PVRL3* (C) در بافت اپیدیدیم نشان داد که استفاده از لتروزول موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن *PVRL3* در گروه T2 شده است (شکل ۲). پروتئین نکتین ۳ یکی از پروتئین‌های اصلی درگیر بین اتصالات سلول‌های سرتولی و اسپرماتید در مرحله اسپرمیوژنز است که در خروس‌های مسن به علت آسیب دیدن فیلامنت‌های اکتین و میوزین در این محل، اسپرم به سلول‌های سرتولی متصل باقی می‌ماند (Inagaki *et al.*, 2006). نتایج حاصل از این آزمایش گویای این مسئله است که تیماردهی با لتروزول به‌صورت کوتاه مدت در خروس‌های آخر دوره بر بیان ژن *PVRL3* تاثیر داشته و موجب افزایش بیان آن شده است. احتمالاً لتروزول از راه کاهش هورمون استروژن و برداشته شدن بازخورد منفی از روی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز سبب افزایش ترشح FSH و در نتیجه افزایش تستوسترون می‌شود که در فرآیند اسپرم‌ریزی نقش اساسی دارند و سبب بهبود آزاد شدن اسپرم کامل از سلول‌های سرتولی می‌شود. گزارش شده است که موش‌ها ناک اوت شده ژن نکتین ۳ نابارور شده بودند و این مسئله نشان‌دهنده اهمیت این پروتئین در اتصالات اسپرماتید به سلول‌های سرتولی در فرآیند اسپرم‌سازی و تکامل اسپرماتید است (Inagaki *et al.*, 2006).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق، استفاده از لتروزول به‌صورت کوتاه مدت و متناوب در خروس‌های گله مادر گوشتی با باروری پایین در آخر دوره تولید، که همراه با کاهش سطوح پلاسمایی و بیضه‌ای هورمون استروژن و افزایش هورمون‌های تستوسترون و FSH است، می‌تواند سبب بهبود عملکرد تولیدمثلی از جمله فراسنجه‌های ارزیابی اسپرم و باروری آزمایشگاهی شود. بنابراین پیشنهاد می‌شود که در خروس‌های مسن گله مادر گوشتی می‌توان از داروهایی که تولید هورمون تستوسترون را افزایش می‌دهند برای بهبود باروری استفاده کرد.

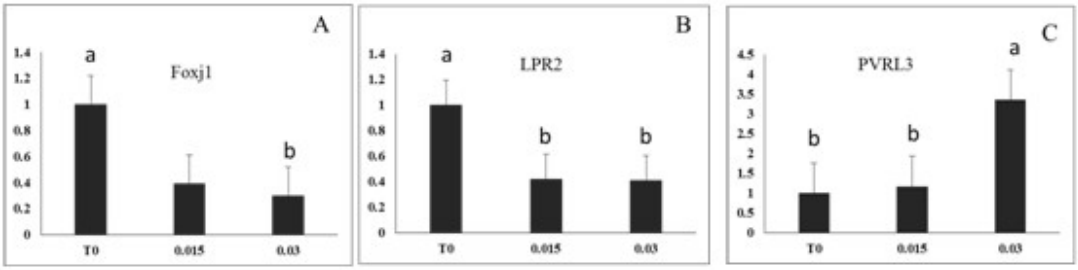

Fig. 2. The relative expression of *Foxj* (A), *LPR2* (B), and *PVRL3* (C) genes in the epididymis region and testis following short-time (three weeks) treatment with letrozole in aged broiler breeder roosters. Beta-actin gene was selected as an internal control; Data are presented as mean ± SD; Values with different letters are significantly different (P<0.05)

شکل ۲- بیان نسبی ژن‌های *Foxj1* (A)، *LPR2* (B) و *PVRL3* (C) در ناحیه اپیدیدیم و بیضه در پی تیمار کوتاه مدت (سه هفته) با لتروزول در خروس‌های مسن گله مادر گوشتی. ژن بتا-اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی انتخاب شد. داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار نمایش داده شده‌اند. مقادیر با حروف متفاوت در سطح معنی‌داری ۵ درصد دارای تفاوت معنی‌دار هستند

فهرست منابع

Adeldust H., Farzinpour A., Farshad A., Rostamzadeh J. and Lopez-Bejar M. 2020. Effect of orally administrated Letrozole on the reproduction performance and the mRNA transcription level of FOXJ1, LPR2, and PVRL3 genes in the reproductive tract of aged roosters.Theriogenology 161: 131-139.

Adeldust H., Farzinpour A., Farshad A., Rostamzadeh J. and Lopez-Bejar M. 2017. Increased sperm cell production in aging roosters by an oral treatment with an aromatase inhibitor and a natural herbal extract designed for improving fertility. Reproduction in Domestic Animals, 52: 58-60.

Ali E. A., Zhandi M., Towhidi A., Zaghari M., Ansari M and Najafi M. 2017. Letrozole, an aromatase inhibitor, reduces post-peak age-related regression of rooster reproductive performance. Animal Reproduction Science, 183: 110-117.

Ansari M., Zhandi M., Kohram H., Zaghari M., Sadeghi M. and Sharafi M. 2017. Improvement of post-thawed sperm quality and fertility of Arian rooster by oral administration of d-aspartic acid. Theriogenology, 92: 69-74.

Azimi M. 2018. Effects of aromatase inhibitor in laying quail. MSc Thesis in Animal Science. Faculty of Agriculture, University of Kurdistan. (In Persian).

Bramwell R. K., Marks H. L. and Howarth B. 1995. Quantitative determination of spermatozoa penetration of the perivitelline layer of the hen's ovum as assessed on oviposited eggs. Poultry Science, 74: 1875-1883.

Buhl A. E., Cornette J. C., Kirton K. T. and Yuan Y. D. 1982. Hypophysectomized male rats treated with polydimethylsiloxane capsules containing testosterone: Eftects on spermatogenesis, fertility, and reproductive tract concentrations of androgens. Biology of Reproduction, 27: 183-188.

Cavallini G., Biagiotti G. and Bolzon E. 2013. Multivariate analysis to predict letrozole efficacy in improving sperm count of non-obstructive azoospermic and cryptozoospermic patients: a pilot study. Asian Journal of Andrology, 15: 806-811.

Eshet R., Maor G., Ben Ari T., Ben Eliezer M., Gat-Yablonski G. and Phillip M. 2004. The aromatase inhibitor letrozole increases epiphyseal growth plate height and tibial length in peripubertal male mice. Journal of Endocrinology, 182: 165-172.

Esterbauer H. and Cheeseman K. H. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods in Enzymology, 186: 407-421.

Fragoso J. S., Dıaz M. P., Moreno J. C. A., Infesta P. C., Rodriguez-Berto A. and Barger, K. 2013. Relationships between fertility and some parameters in male broiler breeders (body and testicular weight, histology and

immunohistochemistry of testes, spermatogenesis and hormonal levels). Reproduction in Domestic Animals, 48: 345-352.

Hammes A., Spoelgen R., Nykjaar A., Willnow T. and Andreassen T. 2005. Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. Cell, 122: 751-762.

Heng D., Zhang T., Tian Y., Yu S., Liu W., Xu K., Liu J., Ding Y., Zhu B., Yang Y. and Zhang Ch. 2016. Effects of dietary soybean isoflavones (SI) on reproduction in the young breeder rooster. Animal Reproduction Science, 177: 124-131.

Hocking P. M. and Bernard R. 2000. The effects of the age of male and female broiler breeders on fertility and hatchability of eggs. British Poultry Science, 41: 370-377.

Inagaki M., Irie K., Ishizaki H., Tanaka-OkamotoM., Miyoshi J. and Takai Y. 2006. Role of cell adhesion molecule nectin-3 in spermatid development. Genes to Cells, 11: 1125-1132.

Noriega-Portella L., Noriega-Hoces L., Delgado A., Rubio J., Gonzales Castaneda C. and Gonzales G. F. 2007. Effect of letrozole at 2.5 mg or 5.0 mg/day on ovarian stimulation with gonadotropins in women undergoing intrauterine insemination. Fertility and Sterility, 90: 1818-1825.

Okada A., Ohta Y., Brody S. L., Watanabe H., Krust A., Chambon P. and Iguch T. 2004. Role of foxj1 and estrogen receptor alpha in ciliated epithelial cell differentiation of the neonatal oviduct. Journal of Molecular Endocrinology, 32: 615-526.

Peter N. and Schlegel M. D. 2012. Aromatase inhibitors for male infertility. Fertility and Sterility, 98: 1359-1362.

Plieschnig J. A., Gensberger E. T., Bajari T. M., Schneider W. J. and Hermann M. 2012. Renal LRP2 expression in man and chicken is estrogen-responsive. Gene, 508: 49-59.

Pritts E. A. 2010. Letrozole for ovulation induction and controlled ovarian hyperstimulation. Current Opinions in Obstetrics and Gynecology, 22: 289-294.

Rambhatla A., Mills J. N. and Rajfer J. 2016. The role of estrogen modulators in male hypogonadism and infertility. Reviews in Urology, 18: 66-72.

Regan M., Neven P., Hurder A., Goldhirsch A., Ejlertsen B., Mauriac L., Forbes J., Smith I., Lang I., Wardley A., Rabaglio M., Price K., Gelber R., Coates A. and Thurlimann B. 2011. Assessment of letrozole and tamoxifen alone and in sequence for postmenopausal women with steroid hormone receptor-positive breast cancer: the BIG 1-98 randomised clinical trial at 8.1 years median follow-up. Lancet Oncology, 12: 1101-1108.

Romero-Sanchez H., Plumstead P. W., Leksrisompong N., Brannan K. E. and Brake J. 2008. Feeding broiler breeder males. 4. Deficient feed allocation reduces fertility and broiler progeny body weight. Poultry Science, 87: 805-811.

Rosenstrauch A., Degen A. A. and Friedlander M. 1994. Spermatozoa retention by sertoli cells during the decline in fertility in aging roosters. Biology of Reproduction, 50: 129-136.

Sarabia Fragoso J., Pizarro Diaz M., Abad Moreno J. C., Casanovas Infesta P., Rodriguez-Bertos A. and Barger K. 2013. Relationships between fertility and some parameters in male broiler breeders (body and testicular weight, histology and immunohistochemistry of testes, spermatogenesis and hormonal levels). Reproduction in Domestic Animals, 48: 345-352.

Saylam B., Efesoy O. and Çayan S. 2011. The effect of aromatase inhibitor letrozole on body mass index, serum hormones, and sperm parameters in infertile men. Fertility and Sterility, 95: 809-811.

Seralini G. and Moslemi S. 2001. Aromatase inhibitors: past, present and future. Molecular and Cellular Endocrinology, 178: 117-131.

Stein T. A., Ball B., Conley A. J., Bhatnagar A. and Roser J. 2002. The effects of an aromatase inhibitor (Letrozole) on hormone and sperm production in the stallion. Theriogenology, 58: 381-383.

Taras E. E., Conley A. J., Berger T. and Roser J. F. 2006. Reducing estrogen synthesis does not affect gonadotropin secretion in the developing boar. Biology of Reproduction, 74: 58-66.

Valizadeh E. and Seratinouri H. 2013. Effects of garlic extract, anti-estrogens, and aromatase inhibitor on sex differentiation in embryo. International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences, 1: 51-55.

Weil S., Rozenboim I., Degen A. A., Dawson A., Friedländer M. and Rosenstrauch A. 1999. Fertility decline in aging roosters is related to increased testicular and plasma levels of estradiol. General and Comparative Endocrinology, 115: 23-28.

Zandi N., Farzinpour A. and Vaziry A. 2019. Letrozole administration as a new way of regulating reproductive activity in female quail. Journal of Applied Poultry Research, 28(4): 1288-1296.

Zhang X., Berry W. D., McDaniel G. R., Roland D. A., Liu P., Calvert C. and Wilhite R. 1999. Body weight and semen production of broiler breeder males as influenced by crude protein levels and feeding regimens during rearing. Poultry Science, 78: 190-196.