تولیدات دامی
دوره ۲۲ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۹
صفحه‌های ۲۷۹-۲۷۱

مطالعه اثر تغذیه ال-کارنیتین پیش از بلوغ بر فراسنجه‌های کیفی منی تازه و منجمد-یخ‌گشایی‌شده خروس‌های مادر گوشتی

وحید محمدی[۱]، سید داود شریفی[۲*]، محسن شرفی[۳]، عبدالله محمدی سنگ چشمه[۴]
۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران.
۲. دانشیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران.
۳. استادیار، گروه علوم دام و طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۴. استادیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۱/۱۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۵/۰۱

چکیده

اثر تغذیه ال-کارنیتین پیش از بلوغ بر فراسنجه‌های کیفی منی تازه و منجمد-یخ‌گشایی‌شده با استفاده از ۱۲ قطعه خروس مادر گوشتی سویه راس (۱۲ هفتگی) به‌مدت ۱۸ هفته، در یک طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار (سطوح صفر ، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ال-کارنیتین در جیره) و چهار تکرار انجام شد. اسپرم‌گیری به‌روش مالش شکمی از ۲۶ تا ۲۹ هفتگی(چهار مرتبه) انجام شد. اسپرم‌های گرفته‌شده در هر نوبت بعد از رقیق‌سازی (نسبت یک به ۲۰ با بلتسویل) به دو بخش تقسیم شدند، یک بخش منجمد شد و قسمت دیگر بلافاصله موردبررسی قرار گرفتند. فراسنجه‌های جنبایی (کل و پیش‌رونده)، زنده‌مانی، ریخت‌شناسی، یکپارچگی و پراکسیداسیون غشای اسپرم پیش و پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی به‌طور مجزا سنجش شدند. در اسپرم تازه، رابطه بین ال-کارنیتین و نابهنجاری خطی منفی، و رابطه بین ال-کارنیتین و زنده‌مانی خطی مثبت بود (P<۰/۰۵). آنالیز درجه دوم در جنبایی پیش‌رونده و غلظت مالون‌دی‌آلدهید معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). پرندگانی که از جیره‌های حاوی ال-کارنیتین استفاده کردند، از لحاظ درصد جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی، ناهنجاری و غلظت مالون‌دی‌آلدهید در اسپرم تازه، و همین صفات به‌همراه جنبایی کل و یکپارچگی غشای پلاسمایی در اسپرم منجمدشده، نسبت به پرندگان گروه شاهد کیفیت بالاتری داشتند (P<۰/۰۵). در اسپرم منجمد، رابطه بین ال-کارنیتین و شاخص‌های جنبایی، زندمانی و یکپارچگی غشای خطی مثبت، و بین ال-کارنیتین و غلظت مالون‌دی‌آلدهید خطی منفی بود (P<۰/۰۵). رابطه بین ال-کارنیتین و جنبایی کل و پیش‌رونده، یکپارچگی غشا و غلظت مالون‌دی‌آلدهید به‌صورت درجه دوم بود (P<۰/۰۵). براساس نتایج این تحقیق، ال-کارنیتین جیره‌ای قبل از بلوغ فراسنجه‌های کیفی اسپرم پیش و پس از انجماد را در خروس‌های مادر گوشتی بهبود می‌بخشد.

کلیدواژه‌ها: انجماد، اسپرم، ال-کارنیتین، خروس، یخ‌گشایی.

The effect of dietary supplementation of L-carnitine during pre-pubertal period on fresh and freeze-thawed semen quality of broiler breeder roosters

Vahid Mohammadi[1], Seyed Davood Sharifi[2*], Mohsen Sharafi[3], Abdollah Mohammadi-Sangcheshmeh[4]
1. Ph.D. Candidate, Department of Animal and Poultry Science, Aburaihan Campus, University of Tehran, Pakdasht, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal and Poultry Science, Aburaihan Campus, University of Tehran, Pakdasht, Iran
3. Assistant Professor, Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture, University of Tarbiat Modares, Tehran, Iran
4. Assistant Professor, Department of Animal and Poultry Science, Aburaihan Campus, University of Tehran, Pakdasht, Iran
Received: April 8, 2019 Accepted: July 23, 2019

Abstract

The effect of feeding L-carnitine during pre-puberty on the quality parameters of fresh and frozen-thawed semen by using 12 Ross broiler breeder males (12 weeks) for 18 weeks, in a completely randomized design with three treatments (0, 250 and 500 mg / kg of L-carnitine in the diet) and four replications was performed. From the age of 26 to 29 weeks, semen collection was performed using abdominal massage. The sperms taken each time after dilution (with Beltsville diluent) were divided into two parts, one section was frozen and the other part was immediately examined. Motility (total and forward), viability, morphology, membrane functionality and lipid peroxidation parameters were evaluated. In fresh sperm, the correlation between L-carnitine and abnormalities was negative linear, and with viability was positive linear (P <0.05). Quadratic analysis was significant in forward Motility and MDA concentration (P <0.05). Birds that use diets containing L-carnitine, In terms of forward motility, viability, morphology and MDA concentrations in fresh sperm, And these traits, with the total motility and integrity of the plasma membrane of frozen sperm, were higher in comparison to the control group(P <0.05). Also, in the sperm after frozen-thawed, the correlation between L-carnitine and Motility (total and forward), viability and membrane integrity were positive linear (P <0.05), and the correlation between L-carnitine and MDA concentration was negative linear (P <0.05). The correlation between L-carnitine and Motility (total and forward), membrane integrity and MDA concentration were quadratic (P <0.05). According to the results, Dietary L-carnitine supplementation in pre-puberty improves the qualitative traits of sperm before and after freezing in the breeder broilers.

Keywords: Freezing, Sperm, L- carnitine, Rooster, Thawing.

* نویسنده مسئول
Email: sdsharifi@ut.ac.ir

مقدمه

گله‌های مادر گوشتی بخش مهمی از صنعت طیور هستند که در تولید گوشت، تخم‌مرغ و تأمین نیاز پروتئینی انسان‌ها نقش کلیدی دارند. بیش‌ترین درآمد این صنعت از فروش جوجه یک‌روزه فراهم می‌شود؛ بنابراین، افزایش جوجه‌درآوری به‌ازای هر مرغ اهمیت فراوانی دارد. اگرچه مرغ و خروس جهت رسیدن به نرخ باروری مناسب در گله نقش مهمی دارند، اما تأثیر جنس نر بیش‌تر از ماده است، زیرا نسبت خروس به مرغ در گله بسیار پایین است [۱۷]. تأخیر در بلوغ جنسی در خروس، منجر به کاهش باروری کل گله در اوایل دوره تولید می‌شود [٦]. در طی توسعه بیضه خروس از ۲ تا ۱۵ هفتگی، افزایش معنی‌داری در رشد بیضه مشاهده نمی‌شود [۵]، با این‌حال، مراحل اولیه دوره خیلی مهمی برای توسعه بیضه‌ای است [۲۲]. وزن بدن خروس بر میزان باروری تأثیرگذار است، و حیوانات با وزن پایین اغلب بیضه توسعه‌نیافته‌ای دارند و در نهایت نابارور درنظر گرفته می‌شوند [٦]. از زمانی که تکنیک تلقیح مصنوعی در ۱۹۳٦ ابداع شد، پیشرفت‌های زیادی در ارتقای عملکرد آن صورت گرفته است. لازمه استفاده بهینه از تلقیح مصنوعی، امکان ذخیره‌سازی اسپرم به‌صورت منجمد می‌باشد.

باروری مطلوب نیاز به کیفیت بالای اسپرم پس از انجماد-یخ‌گشایی دارد. فرآیند انجماد اسپرم یک تکنیک ماهرانه‌ای است که در چند دهه اخیر تحقیقات مختلفی برای بهبود آن صورت گرفته است، اما هم‌چنان میزان کیفیت اسپرم پس از انجماد-یخ‌گشایی بسیار پایین بوده و بایستی بهبود یابد. در اختیار داشتن اسپرم‌های منجمد با کیفیت مناسب برای رسیدن به باروری بالا ضروری است، این اسپرم تنفس هوازی داشته و مواد و آنزیم‌های لازم برای واکنش‌های اکسیداتیو را دارند. اما درصد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در اسپرم نسبتاً پایین بوده و در نتیجه این سلول‌ها مستعد واکنش‌های اکسیداتیو می‌باشند [۱۱].

اگرچه با فرآیند انجماد سرعت متابولیسم سلول و در نتیجه تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن کاهش می‌یابد، ولی وقوع پراکسیداسیون چربی هیچ‌گاه متوقف نمی‌شود [۹]. از پیامدهای پراکسیداسیون لیپیدها تولید رادیکال‌های آزاد، کاهش اسیدهای چرب غیراشباع و تغییر سیالیت غشا است. رادیکال‌های آزاد سبب تشدید واکنش‌های پراکسیداسیون می‌شوند که منجر به شکستن غشا، مورفولوژی غیرطبیعی، کاهش جنبایی و ظرفیت نفوذ اسپرماتوزآ می‌شود [۳]. محافظت از غشای پلاسمایی اسپرم در مقابل واکنش‌های اکسیداتیو طی فرآیند انجماد توسط آنتی‌اکسیدان‌ها انجام می‌شود. در واقع آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش تشکیل رادیکال‌های آزاد، اکسیژن محیط سلولی را طوری تغییر می‌دهند که باعث حفظ تحرک اسپرم شوند [۱۸]. سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی (آنزیمی و غیرآنزیمی) اسپرماتوزوآ برای مقابله با اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد کافی نیست و نیاز به افزودن آنتی‌اکسیدان‌هایی با منشأ خارجی ضروری است [۱۷].

کارنیتین (گاما-تری متیل آمینو-بتا-هیدروکسی بوتیرات) از مشتقات اسید آمینه لایزین است، که از پلاسمای خون به درون مایع اپیدیمال و اسپرماتوزآ منتقل می‌شود و به‌صورت آزاد و استیله‌شده تجمع می‌یابد. بالاترین سطح ال-کارنیتین در بدن انسان در مایع اپیدیدیمیس، جایی‌که غلظت آن ۲۰۰۰ هزار برابر بیش‌تر از سرم است، یافت می‌شود. ال-کارنیتین با انتقال اسیدهای چرب به داخل میتوکندری، انرژی موردنیاز اسپرم را فراهم می‌کند. ال-کارنیتین در اپیدیدیمیس به درون پلاسمای منی ترشح می‌شود و می‌تواند بلوغ و جنبایی اسپرم و فرآیند اسپرماتوژنز را تحریک کند [۲۳]. خصوصیات آنتی‌اکسیدانی ال-کارنیتین در حفظ سلول اسپرم اثبات شده است [۱٦]. افزودن ال-کارنیتین به محیط رقیق‌کننده باعث بهبود کیفیت اسپرم خروس

می‌شود [۱۰]. نتیجه مطالعات دیگر اثرات مفید افزودن ال-کارنیتین به جیره خروس بر کیفیت اسپرم را تأیید نموده است [۱٦، ۲۳]. استفاده از ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم [۱٦] یا ۱۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم [۲۳]، ال-کارنیتین در خروس‌های لگهورن، منجر به افزایش غلظت اسپرم و کاهش پراکسیداسیون لیپید اسپرم شد. گزارش شده است که افزودن ال-کارنیتین در سطوح ۲۵۰ یا ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در جیره بلدرچین ژاپنی، زنده‌مانی اسپرم را به‌طور قابل توجهی افزایش داد [۲۰]. در مطالعه‌ای کمیت و کیفیت منی پرندگان تغذیه‌شده با ال-کارنیتین افزایش یافت [۱۲]. هم‌چنین این پژوهش‌گران سطوح ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ال-کارنیتین را در جیره شترمرغ مورد بررسی قرار دادند که نتایج آنها نشان از افزایش شمار، جنبایی، و زنده‌مانی اسپرم بود [۱].

با این حال، هنوز مطالعه‌ای در ارتباط با بررسی استفاده از ال-کارنیتین جیره‌ای در جوجه‌خروس‌ها قبل از بلوغ و تأثیر آن بر کیفیت اسپرم پیش و پس از انجماد-یخ‌گشایی در اوایل دوره تولید صورت نگرفته است. به‌نظر می‌رسد بتوان با تغذیه زود هنگام ال-کارنیتین قبل از بلوغ، کیفیت اسپرم تازه و پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی را در هفته‌های اولیه تولید گله‌های مادر گوشتی بهبود بخشید. بنابراین، هدف از این پژوهش بررسی تأثیر تغذیه زودهنگام ال-کارنیتین (قبل از بلوغ) در خروس‌های مادر گوشتی بر صفات کیفی اسپرم پیش و پس از انجماد – یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش با استفاده از ۱۲ قطعه خروس والد سویه راس (۱۲ هفتگی)، در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار (سطوح صفر، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ال-کارنیتین در جیره) و چهار خروس در هر تیمار (چهار تکرار) به‌مدت ۱۸ هفته انجام شد. خروس‌ها در سالن مرکز تحقیقات طیور دانشگاه تهران- پردیس ابوریحان براساس شرایط توصیه‌شده توسط کاتالوگ شرکت آویژن پرورش و با جیره‌هایی بر پایه ذرت و سویا تغذیه شدند (جدول ۱). پس از سه هفته عادت‌دهی به‌روش مالش شکمی [۷]، اسپرم‌گیری از خروس‌ها به‌مدت چهار هفته از سن ۲٦ تا ۲۹ هفتگی، انجام و پس از رقیق‌سازی، فراسنجه‌های کیفی اسپرم پیش و پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی سنجش شد.

منی پس از ۲۰ برابر رقیق‌شدن در محیط رقیق‌کننده بلتسویل شامل دی پتاسیم فسفات (٤۳ میلی‌مولار)، سدیم گلوتامات (۵۱ میلی‌مولار) ، فروکتوز (۲۷ میلی‌مولار)، سدیم استات (۳۹ میلی‌مولار)، تریس (۱۳ میلی‌مولار)، پتاسیم استات (٦/۵ میلی‌مولار)، مونو پتاسیم فسفات (۵/۱ میلی‌مولار)، کلراید منیزیم (۳۷ میلی‌مولار)، و ۳ درصد گلیسرول، با اسمولاریته ۳۱۰ میلی‌اسمول بر کیلوگرم و PH برابر ۷/۱ [۱۰] ، برای تعادل دمایی به‌مدت دو ساعت در داخل یخچال با دمای پنج درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه‌های حاوی منی به داخل نی‌های انجماد ۰/۲۵ میلی‌لیتری منتقل شدند و هفت دقیقه در معرض بخار ازت قرار گرفتند، و بلافاصله به تانک حاوی ازت مایع (۱۹٦- درجه سانتی-گراد) منتقل شدند. برای یخ‌گشایی مایع منی، نی‌ها از ازت مایع خارج و به‌مدت سه دقیقه در آب چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس محتوای آن‌ها به داخل میکروتیوب‌ها تخلیه شدند.

پیش و پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی فراسنجه‌های جنبایی، ریخت‌شناسی، زنده‌مانی، یکپارچگی و پراکسیداسیون غشای لیپیدی اسپرماتوزوآ ارزیابی شد. جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده اسپرماتوزوآ با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی ٤۰۰ به‌روش چشمی بررسی شد.

جدول ۱. مواد خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره پایه

ماده خوراکی	مقدار (درصد)
دانه ذرت	٦٩/٠٠
کنجاله سویا (٤٤ درصد پروتئین)	٨/٥٠
سبوس گندم	١٩/١٩
دی‌کلسیم فسفات	١/٤٠
نمک	٠/٣٢
صدف	٠/٨٠
دی-ال- متیونین	٠/١١
مکمل معدنی[1]	٠/٢٥
مکمل ویتامینه[2]	٠/٢٥
مواد مغذی محاسبه‌شده	
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری در کیلوگرم)	٢٧٥٤
پروتئین (درصد)	١٢
کلسیم (درصد)	٠/٧
فسفر (درصد)	٠/٣٥
سدیم (درصد)	٠/١٥
ال-لایزین (درصد)	٠/٤٥
دی ال-متیونین (درصد)	٠/٢٩
متیونین + سیستئین (درصد)	٠/٤٩

۱. مکمل معدنی حاوی ۱۰۰۰۰۰ میلی‌گرم روی، ٦۰۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم مس، ٦۰۰۰ 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، ٤۰۰۰ میلی‌گرم B٦، ٤۰ میلی‌گرم B۱۲، ۵۰۰۰ میلی‌گرم K۳، ۲۵۰ میلی‌گرم بیوتین و یک کیلوگرم کولین کلراید بود.

برای ارزیابی زنده‌مانی و ریخت‌شناسی اسپرماتوزوآ از روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین (شامل رنگ آئوزین (١٦/٧ گرم در لیتر)، رنگ نگروزین (١٠٠ گرم در لیتر)، و سدیم سیترات (٢٩ گرم در لیتر)) استفاده شد که در آن مقدار مساوی از رنگ و اسپرم رقیق‌سازی‌شده به‌صورت آهسته و به‌تدریج روی یک اسلاید قرار گرفت و نمونه جهت بررسی تهیه شد. اسلایدهای تهیه‌شده با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست و با بزرگ‌نمایی ٤٠٠ ارزیابی شدند (Zeiss, Jena, Germany). ترکیب رنگی نگروزین رنگ زمینه اسلاید را تشکیل می‌دهد، درحالی‌که ائوزین از غشای سلول مرده عبور کرده و با پروتئین‌ها و آنزیم‌های داخل آن واکنش داده و باعث می‌شود اسپرم‌های مرده به رنگ صورتی تا قرمز دیده شوند. اسپرم‌های بدون رنگ به‌عنوان اسپرم‌های زنده و اسپرم‌های رنگ‌گرفته به‌عنوان اسپرم‌های مرده در نظر گرفته شدند.

از آزمون هاس برای بررسی عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم استفاده شد. تست هاس براساس اسمولاریته محیطی است که اسپرم در آن قرار می‌گیرد. اسمولاریته محیط مورد آزمایش ١٠٠ میلی‌اسمول بر کیلوگرم و اسمولاریته موردنیاز برای اسپرم، ٣٥٠ تا ٤٠٠ میلی‌اسمول بر کیلوگرم است. اسپرم‌هایی که غشای آن‌ها سالم است، با قرارگرفتن در یک محیط با اسمولاریته پایین به‌سرعت واکنش می‌دهند و انتهای دم آن گره می‌خورد، اما اسپرم‌های مرده و دارای غشای آسیب‌دیده هیچ واکنشی نسبت به این محیط نشان نمی‌دهند. در این آزمون، اسپرم‌هایی که انتهای دم آن‌ها گره می‌خورند به‌عنوان اسپرم با عملکرد غشایی مناسب و آن‌هایی که واکنش نمی‌دهند به‌عنوان اسپرم‌های با غشای آسیب‌دیده در نظر گرفته می‌شوند. در این آزمایش از روش ریول و مرود [١٩] با کمی تغییر استفاده شد. به‌طور خلاصه ١٠ میلی‌لیتر از اسپرم تازه و همین مقدار از اسپرم یخ‌گشایی‌شده با ٢٠٠ میلی‌لیتر محلول هایپواسموتیک (١٠٠ میلی‌اسمول بر کیلوگرم)، (١ گرم سدیم‌سیترات در ١٠٠ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر، در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٢٠ دقیقه انکوبه شد. سپس ٥ میکرولیتر از محلول تهیه‌شده روی اسلاید قرار داده شد و لامل را روی آن قرار دادیم. سپس اسلاید تهیه‌شده برای شمارش ٢٠٠ اسپرم در هر اسلاید به زیر میکروسکوپ انتقال یافت.

برای سنجش پراکسیداسیون لیپید اسپرم، از روش توصیه‌شده [٤] استفاده شد. ابتدا محلول‌های یک گرم تری‌کلرواستیک اسید (TCA) در ۱۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیرشده، ۰/۰۳۷ گرم اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید (EDTA) در ۱۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیرشده، ۰/۲ گرم بوتیل‌دهیدروکسی‌تولوئن (BHT) در ۱۰ میلی‌لیتر اتیل‌الکل ۱۰۰ درصد و ۱۵ میلی‌گرم تیوباربیوتوریک اسید (TBA) در ۱۰ میلی‌لیتر محلول استیک اسید تهیه شد. سپس یک میلی‌لیتر از منی رقیق‌شده، با دو میلی‌لیتر محلول TCA به‌اضافه یک میلی‌لیتر محلول EDTA به‌همراه یک میلی‌لیتر محلول BHT در فالکون مخلوط شده و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۹۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس یک میلی‌لیتر از محلول سطحی با یک میلی‌لیتر محلول TBA مخلوط و به‌مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش (۱۰۰ درجه) قرار داده شد و در زیر شیر آب، سرد گردید و در نهایت با اسپکتوفتومتر با طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شدند.

در نهایت با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت مالون دی‌آلدهید محاسبه شد.

داده‌های حاصل از این پژوهش با استفاده از طرح کاملاً تصادفی (مدل ۱)، با رویه GLM نرم‌افزار SAS) 9.1 نسخه ۹/۱) تجزیه و تحلیل شد. میانگین‌ها با کمک آزمون کنتراست خطی و درجه دوم در سطح پنج درصد مقایسه شدند.

رابطه (۱) $Y_{ij}= \mu + T_i + R_j + eij$

در این مدل، Y_{ij}، مقدار هر مشاهده؛ μ ، میانگین، e_{ij}، خطای آزمایشی، R_j اثر تصادفی تکرار و T_i، اثر تیمارها است.

نتایج

تأثیر سطوح مختلف ال-کارنیتین بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم پیش و پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی در خروس‌های مادر گوشتی در جدول (۲) گزارش شده است.

جدول ۲. تأثیر سطوح مختلف ال- کارنیتین بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم پیش و پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی در خروس‌های مادر گوشتی

منابع تغییرات	سطوح ال-کارنیتین (میلی‌گرم در کیلوگرم)	جنبایی کل (درصد)	جنبایی پیش‌رونده (درصد)	زنده‌مانی (درصد)	ناهنجاری (درصد)	یکپارچگی غشا (درصد)	غلظت مالون‌دی‌آلدهید (نانومول بر میلی‌لیتر)
اسپرم تازه	۰	۷۰/۰۰	۵۸/۷۵	۷۲/۲۵	۱۵/۳۵	۵۵/۰۰	۱/٦۱
	۲۵۰	۷٦/۲۵	۷۰/۰۰	۷۵/۷۵	۱۱/۵۷	٦۰/۲۵	۰/۵٦
	۵۰۰	۷۵/۰۰	٦۵/۰۰	۸۲/۷۵	۱۰/۲۵	۵۸/۵۰	۰/۳۸
	SEM	۵/٤	٤/۳۳	۵/۰۱	۲/۹۸	۳/۱۲	۰/۱۳
مقدار احتمال	ال-کارنیتین در برابرشاهد*	۰/۱	۰/۰۰۹	۰/۰٤	۰/۰۵	۰/۰۷	<۰/۰۰۰۱
	خطی	۰/۱	۰/۰۷	۰/۰۱	۰/۰٤	۰/۲	<۰/۰۰۰۱
	درجه دوم	۰/٦	۰/۰۱	۰/۵	۰/۸	۰/۱	۰/۰۰۰٦
اسپرم منجمد شده	۰	٤۵/۳۰	۲۷/۲۳	۳۷/۹۰	۲۳/۳۹	۲۹/٦۳	٤/۲٤
	۲۵۰	۵۵/٤۷	۳٦/۲٦	٤۳/۱۹	۲۱/٤٦	۳۸/۰۳	۳/۱۱
	۵۰۰	۵٤/۰۰	۳۵/۱۱	٤۳/۸۲	۲۱/۷۹	۳۷/۷۳	۲/۹٦
	SEM*	۱/۸۳	۱/۵٤	۱/۲٦	۰/٦۳	۰/۷٤	۰/۰۲
مقدار احتمال	ال-کارنیتین در برابر شاهد*	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰٤	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
	خطی	۰/۰۰۸	۰/۰۰۵	۰/۰۰۹	۰/۱۰	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
	درجه دوم	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۱٦	۰/۱۸	۰/۰۰۱	<۰/۰۰۰۱

* SEM: خطای استاندار میانگین‌ها.

با افزایش سطح ال-کارنتین جیره، ناهنجاری‌های اسپرم به‌صورت خطی کاهش یافت درحالی‌که زنده‌مانی به‌صورت خطی افزایش یافت (P<۰/۰۵). سطوح افزایشی ال-کارنیتین در جیره باعث افزایش جنبایی پیش‌رونده و کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدهید در اسپرم تازه، به‌صورت درجه دوم شد (P<۰/۰۵). پاسخ پرندگان به سطوح مختلف ال-کارنیتین بر درصد جنبایی کل و یکپارچگی غشای اسپرم معنی‌دار نبود. درصد جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی و اسپرم نابهنجار و غلظت مالون‌دی‌آلدهید در اسپرم تازه، در تیمار شاهد نسبت به تیمارهای حاوی ال-کارنیتین تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).

آنالیز خطی در اسپرم پس از انجماد-یخ‌گشایی نشان داد که رابطه بین سطح ال-کارنیتین و زندمانی اسپرم به‌صورت خطی مثبت بود (P<۰/۰۵). هم‌چنین، آنالیز درجه دوم در فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از انجماد-یخ‌گشایی نشان داد، بین تیمارهای آزمایشی از لحاظ جنبایی کل و پیش‌رونده اسپرم، یکپارچگی غشا و غلظت مالون‌دی‌آلدهید تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵). آنالیز خطی در ناهنجاری اسپرم و آنالیز درجه دوم در ناهنجاری و زنده‌مانی اسپرم پس از انجماد-یخ‌گشایی تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت. آنالیز آماری تیمار شاهد در مقایسه با تیمارهای حاوی ال-کارنیتین (۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خوراک) در تمامی صفات کیفی اندازه‌گیری‌شده تفاوت معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵).

بحث

فسفولیپیدهای غشای اسپرم پرندگان سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع است، و از این‌رو به واکنش پراکسیداسیون بسیار حساس می‌باشد. تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد در اسپرم موجب کاهش سیالیت غشا، شکست DNA، آسیب پروتئین‌ها و در نهایت موجب کاهش جنبایی و باروری اسپرم‌ها می‌شود [۲۰]. در مطالعه حاضر، پاسخ خروس‌ها به افزایش سطح ال-کارنیتین بر زنده‌مانی اسپرم و نابهنجاری اسپرم به‌ترتیب مثبت و منفی بود. به‌نظر می‌رسد در این مطالعه، معنی‌داری آنالیز درجه دوم در جنبایی پیش‌رونده اسپرم و غلظت مالون‌دی‌آلدهید، نشان‌دهنده تأثیر مثبت سطح ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خوراک در این فراسنجه‌ها است. هم‌چنین در آنالیز مقایسه‌ای شاهد نسبت به تیمارهای حاوی ال-کارنیتین مشاهده شد که درصد جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی و اسپرم نابهنجار و غلظت مالون‌دی‌آلدهید با تغذیه سطوح مختلف ال-کارنیتین (۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خوراک) بهبود یافت. روند تغییر پاسخ پرندگان به افزایش سطح ال-کارنیتین بر تمامی فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از انجماد به‌غیر از ناهنجاری و زنده‌مانی اسپرم به‌صورت درجه دوم تغییر کرد، که نشان‌دهنده تأثیر مثبت سطح ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ال-کارنیتین بر فراسنجه‌های کیفی ذکرشده در اسپرم منجمد نسبت به سایر تیمارها است. در آزمایشی گزارش شده است شترمرغ‌های تغذیه‌شده با ال-کارنیتین (۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) جنبایی و زنده‌مانی اسپرم تازه بیش‌تری نسبت به گروه شاهد داشتند [۱]، که با نتایج این آزمایش در توافق بود. هم‌چنین، افزودن ۲-۱ میلی‌مولار ال-کارنیتین به محیط رقیق‌کننده باعث افزایش جنبایی و زنده‌مانی اسپرم می‌شود [۹]. با این‌حال، استفاده از ال-کارنیتین به میزان دو گرم در روز، تأثیری بر کیفیت اسپرم خوک (درصد جنبایی و زنده‌مانی) نداشت [۸]. مایع اپیدیدیمال یکی از مهم‌ترین مخازن ذخیره‌ای کارنیتین در بدن است، که این امر دلیل محکمی بر اهمیت وجود ال-کارنیتین در مکانیسم سلول اسپرم است، لذا تأثیر مستقیمی بر فرآیندهای متابولیسمی اسپرماتوزوآ دارد [۲، ۱۶]. غلظت ال-کارنیتین در پلاسمای منی نسبت به پلاسمای خون

[۱۲]، نقش ال-کارنیتین در متابولیسم [۵] و تسهیل انتقال اسیدهای چرب از عرض غشای داخلی میتوکندری توسط ال-کارنیتین منجر به بهبود تولید ATP و در نتیجه مهیاشدن عرضه انرژی برای اسپرم و جنبایی آن می‌شود.

نتایج این آزمایش در ارتباط با سلامت غشا و پراکسیداسیون لیپید موافق با گزارش‌های پیشین از اثرات مفید ال-کارنیتین بر اسپرم است [۵، ۱۵]. به‌نظر می‌رسد یکی از مهم‌ترین عوامل در کاهش جنبایی اسپرم، تخریب غشا ناشی از تنش اکسیداتیو است، زیرا کاهش تمامیت غشا منجر به افزایش نفوذپذیری غشا و کاهش توانایی تنظیم سطوح داخل سلولی یون‌ها می‌شود که مجموعه این شرایط برای جنبایی اسپرم مضر می‌باشند [۸]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ال-کارنیتین ممکن است ناشی از توانایی آن در کیلاته‌کردن یون‌های آزاد آهن، جلوگیری از تولید یون‌های سوپراکسید و زدودن گونه‌های پراکسید هیدروژن باشد [۱۲]. استفاده از ال-کارنیتین می‌تواند سبب خنثی‌شدن اثر اکسیژن‌های فعال بر آنزیم‌های مؤثر در فرآیندهای فسفوریلاسیون اکسیداتیو، گلیکولیز یا دیگر مسیرهای تولیدکننده ATP برای سلول اسپرم شود و از این طریق از کاهش جنبایی اسپرم پس از انجماد-یخ‌گشایی جلوگیری نماید [۲۰].

در این آزمایش، پرندگان تغذیه‌شده با ال-کارنیتین (۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خوراک) نسبت به پرندگان گروه شاهد کیفیت اسپرم پس از انجماد-یخ‌گشایی بالاتری را نشان دادند. کاهش کیفیت اسپرم پس از انجماد-یخ‌گشایی در آزمایش حاضر امری طبیعی است، زیرا طی فرآیند انجماد، اسپرم در معرض تنش‌های مختلفی از قبیل شوک سرمایی، تنش اسمزی و تنش اکسیداتیو قرار می‌گیرد که موجب تغییر در عملکرد اسپرم بعد از یخ‌گشایی می‌شوند [۱۳]. هم‌چنین با فرآیند انجماد اسپرم، میزان اکسیداسیون غشا به‌واسطه درصد بیش‌تر واکنش‌های اکسیداتیو افزایش می‌یابد که این امر در نهایت عمر اسپرم را کاهش می‌دهد [۱۷]. غشای اسپرم نقش مهمی در مقاومت به سرما، زنده‌مانی و تحرک اسپرم پس از انجماد-یخ‌گشایی ایفا می‌نماید. نشان داده شده است که فرآیند انجماد اسپرم باعث آسیب‌های شیمیایی و فیزیکی زیادی به غشای اسپرم می‌شود که به انتقال از فاز لیپیدی، افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا توسط گونه‌های اکسیژنی فعال، تنش‌های مکانیکی به غشا در اثر تنش اسمزی و تغییرات دمایی نسبت داده می‌شود [۱۹].

بنابراین بهبود فراسنجه‌های جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی و غلظت مالون‌دی‌آلدهید در اسپرم تازه و جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی، ناهنجاری، یکپارچگی و پراکسیداسیون غشا در اسپرم پس از انجماد-یخ‌گشایی در گروه‌های تغذیه‌شده با ال-کارنیتین نشان‌دهنده تأثیر مثبت ال-کارنیتین بر کیفیت اسپرم (با تولید رادیکال‌های آزاد کم‌تر، غشای اسپرم سالم‌تر، و در نتیجه زنده‌مانی و جنبایی بالاتر) پیش و پس از انجماد-یخ‌گشایی است. مکانیسم احتمالی این اثرات مفید ال-کارنیتین بر کیفیت اسپرم پیش و پس از انجماد-یخ‌گشایی احتمالاً در ابتدا ناشی از تأثیر مثبت ال-کارنیتین (۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) بر کیفیت اسپرم تازه، هم‌چنین مصرف ال-کارنیتین، جذب و انتقال آن از طریق ترانسپورترهای فعال از خون به درون لومن اپیدیدیمال [۱٤]، ذخیره آن در اپیدیدیمال [۲، ۱٦]، ورود آن به اسپرماتوزوآ، و بهبود کیفیت اسپرم [۱۱، ۱۵، ۲۱] می‌باشد.

براساس نتایج حاصل از این پژوهش، صفات کیفی اسپرم در منی تازه و منی منجمدشده پس از یخ‌گشایی تحت تأثیر سطوح مختلف ال-کارنیتین قرار گرفتند. با توجه به ملاحظات اقتصادی، افزودن ال-کارنیتین به میزان ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره برای بهبود صفات کیفی اسپرم در خروس‌های گله مادر گوشتی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه تهران- پردیس ابوریحان، به‌خاطر حمایت مالی برای اجرای این طرح، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع مورد استفاده

1. Adabi SG., Babaei AH, Moghaddam G, Taghizadeh A, Farahvash T, Lotfollahian H and PourFM (2008) L-carnitine effects on quantity and quality of African black neck ostrich sperm. Journal of Veterinary and Animal Advance 7(1): 51-55.
2. Agarwal A and Said TM (2004) Carnitines and male infertility. Reproductive Biomedicine Online 8(4): 376-384. .
3. Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW and Van Duin M (1995) Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. Journal of Cell Science 108(5): 2017-2025.
4. Akhlaghi A, Ahangari YJ, Zhandi M and Peebles ED (2014) Reproductive performance, semen quality, and fatty acid profile of spermatozoa in senescent broiler breeder roosters as enhanced by the long-term feeding of dried apple pomace. Animal Reproduction Science 147(1-2): 64-73.
5. Anastasiadou M, Theodoridis A, Avdi M and Michailidis G (2011) Changes in the expression of Toll-like receptors in the chicken testis during sexual maturation and Salmonella infection. Animal reproduction science 128: 93-99.
6. Brillard JP (2004) Natural mating in broiler breeders: present and future concerns. Worlds Poultry Science Journal 60: 439e45.
7. Burrows W and Quinn J (1937) The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poultry Science 16(1): 19-24 .
8. Cerovský J, Frydrychová S, Lustyková A, Lipenský J and Rozkot M (2009) Semen characteristics of boars receiving control diet and control diet supplemented with L-carnitine. Czech Journal of Animal Science 54(9): 417-425.
9. Douard V, Hermier D, Magistrini M, Labbé C and Blesbois E (2004) Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. Theriogenology 61(1): 1-13.
10. Fattah A, Sharafi M, Masoudi R, Shahverdi A, Esmaeili V and Najafi A (2017) L-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. Cryobiology 74: 148-153.
11. Foote RH, Brockett CC and Kaproth MT (2002) Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. Animal Reproduction Science 71(1-2): 13-23.
12. Golzar adabi SH, Rahimi SH, Kamali MA and Karimi Torshizi MA (2007) The effects of two dietary levels of L-carnitine and vegetable fat powder on quality of cockerels sperm, and fertility and hatchability in broiler breeders. Journal of Veterinary Research 62: 107-114. (in Farsi with English abstract)
13. Gülçin İ (2006) Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. Life Sciences 78(8): 803-811.
14. Hallak J, Sharma RK, Wellstead C and Agarwal A (2000) Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of TEST-yolk buffer and glycerol. International Journal of Fertility and Womens Medicine 45(1): 38-42.
15. Łukaszewicz E, Jerysz A, Partyka A and Siudzińska A (2008) Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. Research in Veterinary Science 85(3): 583-588.
16. Neuman S, Lin T and Heste P (2002) The effect of dietary carnitine on semen traits of white Leghorn roosters. Poultry Science 81(4): 495-503 .
17. Ommati MM, Zamiri MJ, Akhlaghi A, Atashi H, Jafarzadeh MR, Rezvani MR and Saemi F (2013) Seminal characteristics, sperm fatty acids, and blood biochemical attributes in breeder roosters orally administered with sage (*Salvia officinalis*) extract. Animal Production Science 53: 548-554 .
18. Parks JE and Graham JK (1992) Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology, 38(2): 209-222.
19. Revell SG and Mrode RA (1994) An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science 36(1-2): 77-86.
20. Sarica S, Corduk M, Ensoy U, Basmacioglu H and Karatas U (2007) Effects of dietary supplementation of L-carnitine on performance, carcass and meat characteristics of quails. South African Journal of Animal Science 37(3): 189-201.

21. Surai PE, Cerrolini S, Wishart GJ, Speake BK, Noble RC and Sparks NHC (1998) Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. Poultry and Avian Biology Review 9(1): 11-23.
22. Vizcarra JA, Kirby JD and Kreider DL (2010) Testis development and gonadotropin secretion in broiler breeder males. Poultry Science 89: 328-334.
23. Zhai W, Neuman SL Latour MA and Hester PY (2007) The effect of L-carnitine on semen traits of white leghorns. Poultry Science 86: 2228-2235.