مجله علوم دامی ایران
دوره ۴۴، شماره ۳، ۱۳۹۲ (۲۱۵-۲۰۷)

بهبود بازده تلقیح مصنوعی در میش‌های نژاد زندی با استفاده از هورمون‌های استرادیول و اکسی‌توسین

رضا مسعودی[۱]، حمید کهرام[۲*]، احمد زارع‌شحنه[۳] و عباس اکبری‌شریف[۴]
۱، دانشجوی دکتری، ۲و۳، استادیار و استاد، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران،
۴، ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند نژاد زندی، پیشوا، ورامین
(تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۶ - تاریخ تصویب:۹۲/۴/۸)

چکیده

هدف از این تحقیق بررسی اثر استرادیول و تزریق درون‌عضلانی و درون‌وریدی دوزهای مختلف اکسی‌توسین بر باز شدن سرویکس و درصد آبستنی میش‌های نژاد زندی در انتهای فصل تولید مثلی (اوایل فروردین) بود. در این مطالعه از ۶۳ میش سه تا چهار ساله با میانگین وزنی ۵۵ کیلوگرم استفاده شد. در آزمایش اول به همه میش‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر استرادیول تزریق شد، ۱۲ ساعت پس از آن میش‌ها به هفت گروه مساوی تقسیم شدند. گروه اول به عنوان گروه شاهد انتخاب شد و هورمون اکسی‌توسین دریافت نکرد. شش گروه دیگر به دو دسته تزریق درون‌عضلانی و تزریق درون‌وریدی تقسیم شدند و میش‌ها در هر دسته در سه سطح ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ واحد هورمون اکسی‌توسین را دریافت کردند. میزان نفوذ به سرویکس قبل از تزریق، ده دقیقه و ۱۲ ساعت پس از تزریق استرادیول (قبل از تزریق اکسی‌توسین) و همچنین ۱۵ دقیقه پس از تزریق اکسی‌توسین با پیپت مدرج تلقیح مصنوعی اندازه‌گیری شد. آزمایش دوم مانند آزمایش اول بود با این تفاوت که به میش‌ها استرادیول تزریق نشد و فقط اثر اکسی‌توسین بر باز شدن سرویکس تعیین شد. در آزمایش سوم میش‌ها برای همزمانی فحلی به مدت ۱۲ روز سیدرگذاری شدند و در هنگام سیدربرداری به همه میش‌ها مقدار ۵۰۰ واحد هورمون eCG تزریق شد. قبل از تلقیح مصنوعی میش‌ها به هفت گروه مساوی تقسیم شدند. گروه اول به عنوان گروه شاهد انتخاب شد و هورمون اکسی‌توسین دریافت نکرد. شش گروه دیگر به دو دسته تزریق درون‌عضلانی و تزریق درون‌وریدی تقسیم شدند و میش‌ها در هر دسته در سه سطح ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ واحد هورمون اکسی‌توسین را دریافت کردند. تمام میش‌ها ۵۴ ساعت پس از سیدربرداری به‌صورت ترانس‌سرویکال تلقیح شدند. روز ۵۰ پس از تلقیح با اولتراسونوگرافی درصد آبستنی تشخیص داده شد. تزریق عضلانی و یا وریدی اکسی‌توسین با دوزهای ۸۰ و ۱۰۰ واحد باعث بازشدن سرویکس در میش‌های زندی می‌شود (P <۰/۰۵). هنگام استفاده از ۶۰ واحد اکسی‌توسین وریدی، استرادیول اثر معنی‌داری بر بازشدن سرویکس داشت (P <۰/۰۵) ولی با استفاده از دوزهای ۸۰ و ۱۰۰ واحد اکسی-توسین، تزریق استرادیول اثر معنی‌داری بر بازشدن سرویکس نداشت (P >۰/۰۵) . استفاده این اتساع امکان تلقیح مصنوعی داخلی رحمی از طریق سرویکس و انتقال ترانس‌سرویکال رویان را در میش مهیا می‌کند. نتایج آزمایش سوم نشان داد که تزریق ۱۰۰ واحد اکسی‌توسین منجر به بهبود (P <۰/۰۵) درصد آبستنی و بره‌زایی (۵۵/۵۵) نسبت به گروه شاهد (۲۲/۲۲) و تمایل به افزایش (P <۰/۱) نسبت به گروه‌های دریافت کننده دوزهای پایین‌تر اکسی‌توسین شد. در نتیجه تزریق اکسی‌توسین باعث بازشدن سرویکس، افزایش درصد آبستنی و بره‌زایی در میش‌های زندی می‌شود و می‌توان از آن به‌عنوان ابزاری برای بهبود درصد آبستنی حاصل از تلقیح مصنوعی استفاده نمود.

واژه های کلیدی: سرویکس، استرادیول، اکسی‌توسین، اولتراسونوگرافی، درصد آبستنی

مقدمه

تلقیح مصنوعی در گوسفند به طور معمول با اسپرم تازه و از طریق سرویکس انجام می‌شود. درصد باروری در این روش حدود ۴۰ تا ۶۰ درصد است (Anel et al., 2005; Fair et al., 2005). تلقیح مصنوعی با اسپرم تازه با محدودیت‌هایی از قبیل کمبود قوچ با ویژگی‌های خاص

* نویسنده مسئول: حمید کهرام تلفن: ۰۹۱۲۳۹۰۶۳۹۳ E-mail: Hamid_kohram@yahoo.com

در گله، گرفتن همزمان اسپرم و تلقیح در گله، عدم امکان استفاده مفید از قوچ‌های برتر در سطح وسیع‌تر و محدودیت در حمل و نقل اسپرم مواجه است. تلقیح مصنوعی با اسپرم منجمد عاملی برای به حداکثر رساندن استفاده از قوچ‌های برتر و کنترل بیماری‌های مسری میان گله‌ها می‌باشد ولی متاسفانه درصد آبستنی حاصل از تلقیح مصنوعی با اسپرم منجمد در تلقیح سرویکال پایین است (Salamon & Maxwell, 1995). باروری پایین اسپرم منجمد به‌دلیل مشکل اسپرم در عبور از سرویکس ناهموار میش است (Lightfoot & Salamon, 1970). فقدان روش پربازده تلقیح مصنوعی در گوسفند سبب محدود شدن استفاده از این تکنیک شده است. برای بهبود درصد آبستنی حاصل از تلقیح مصنوعی راه‌کارهای متفاوتی ارایه شده است. یکی از این روش‌ها تلقیح مصنوعی به روش لاپاراسکوپی است. امروزه روش تلقیح مصنوعی و انتقال جنین در گوسفند با استفاده از روش لاپاراسکوپی معمول می‌باشد و دارای درصد بالای آبستنی و دریافت رویان است. ولی این روش دارای معایبی مثل هزینه بالا، زمان‌بر بودن، نیاز به تخصص و نیاز به استفاده از داروهای آرام‌بخش می‌باشد (Evans & Maxwell, 1987). برای جمع‌آوری رویان در گوسفند از لاپاراتومی نیز استفاده می‌شود ولی استفاده از لاپاراتومی نیز داری معایبی از قبیل افزایش چسبندگی رحم، تخمدان و اویداکت، هزینه بالا، نیاز به تخصص و استفاده از مواد بی‌هوشی می‌باشد (Torres and Sevellec, 1987).

سرویکس گوسفند از دو قسمت سلولی و خارج سلولی تشکیل شده است. قسمت سلولی شامل سلول‌های اپیتلیالی، سلول‌های ماهیچه‌ای صاف و فیبروبلاست است در صورتی‌که قسمت خارج سلولی متشکل از فیبرهای کلاژن و الاستین است که توسط ماتریکسی از پروتئوگلیکان، گلیکوزآمینوگلیکان و آب با هم نگه داشته می‌شوند (More, 1984; Cabrol et al., 1985). ساختار سرویکس میش بافتی لوله‌ای، دراز و فیبروزی دارد (More, 1984). میانگین طول کانال سرویکس در گوسفند ۱/۱ ± ۶/۷ سانتی‌متر است و شامل ۱/۰ ± ۴/۹ حلقه می‌باشد (Halbert et al., 1990a) که بر طبق مطالعات بافت‌شناسی، حلقه‌های داخلی سرویکس مهمترین مانع در برابر ورود پیپت تلقیح مصنوعی می‌باشند (Kershaw et al., 2005). اغلب حلقه دوم یا سوم سرویکس نسبت به دهانه سرویکس در یک خط مستقیم قرار ندارند و سبب ممانعت از نفوذ پیپت تلقیح مصنوعی به درون سرویکس و رحم می‌شود. فاصله دهانه سرویکس تا حلقه خارج از مرکز ۳/۱ ± ۹/۸ میلی‌متر است (Halbert et al., 1990a). در هر صورت برای حل این مشکل باید از سد سرویکس عبور نمود. سه روش برای کاهش اثرات فیزیکی جهت عبور از سد سرویکس در میش پیشنهاد شده است. اول روش فیزیکی که شامل ورود به سرویکس با نیروی فشاری می‌باشد (Halbert et al., 1990a). دوم روش مکانیکی (Halbert et al., 1990b; Buckrell et al., 1994; Wulster-Radcliffe et al., 1999a; Wulster-Radcliffe & Lewis, 2002) تحریک سرویکس و استفاده از پیپت‌های سفت و غیرمنعطف برای تلقیح که ممکن است سبب ایجاد زخم در سرویکس و رحم شود و در نتیجه اثرات منفی بر اسپرم اعمال می‌شود. ایجاد استرس در سرویکس می‌تواند سبب تولید مواد ضداسپرم و ضدرویان شود و در نتیجه باروری کاهش می‌یابد (Hawk, 1983; Sayre & Lewis, 1997)، ولی تحریکی که منجر به ایجاد زخم نشود مضر نیست (Stellflug et al., 2001a). در این روش پیپت‌های تلقیح ترانس-سرویکال برای عبور از حلقه‌های سرویکس طراحی شده-اند (Halbert et al., 1990b; Wulster-Radcliffe & Lewis, 2002)، ولی استفاده از این پیپت‌ها در تلقیح مصنوعی فاقد اثر مثبت بر درصد باروری و بره‌زایی بودند (Wulster-Radcliffe et al., 2004). از طرفی شکل و نوع پیپت نیز بر عبور ترانس‌سرویکال آن موثر است. سیستم گولف در برخی از مطالعات قابلیت عبور از سرویکس را دارا بود (Buckrell et al., 1994)، اما برخی محققین در استفاده از سیستم گولف نیز برای عبور از سرویکس ناموفق بودند (McKelvey, 1999) که سبب عدم استقبال از این پیپت‌ها در مصارف صنعتی شد. سومین روش عبارت از روش شیمیایی است که در آن برای باز کردن سرویکس از موادی مثل استرادیول، پروستاگلندینE و اکسی‌توسین استفاده می‌شود (Khalifa et al., 1992; Mylne et al., 1992; Wulster-Radcliffe et al., 1999a). استفاده از پروستاگلندین E

سبب باز شدن سرویکس می‌شود(Mylne et al., 1992)، ولی این ماده گران‌قیمت می‌باشد و استفاده از آن ممکن است به صرفه نباشد. از طرفی اکسی‌توسین هورمونی ارزان است که می‌توان از آن برای باز نمودن سرویکس و عبور دادن ترانس‌سرویکال پیپت تلقیح مصنوعی استفاده نمود. با باز شدن سرویکس به راحتی، با سرعت بالا و بدون نیاز به جراحی می‌توان تلقیح درون رحمی (Wulster-Radcliffe et al., 2004) و جمع‌آوری رویان (Wulster-Radcliffe et al., 1999a) را در گوسفند انجام داد و سبب بهبود بازده تولید مثلی حاصل از تلقیح مصنوعی شد. هدف از این تحقیق بررسی اثر تزریق درون‌عضلانی و درون‌وریدی اکسی‌توسین بر بازشدن سرویکس و بهبود درصد آبستنی میش‌های نژاد زندی در انتهای فصل تولید مثلی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برنامه گوسفندان و درمان هورمونی

این تحقیق در فروردین ۱۳۸۹ در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند زندی انجام شد. در این مطالعه ۶۳ راس میش سه تا چهار ساله از نژاد زندی با میانگین وزنی ۲/۵ ± ۵۵ کیلوگرم به طور تصادفی از یک گله ۶۰۰ راسی انتخاب شد. در آزمایش اول به هر میش ۱۰۰ میکرولیتر استرادیول (داروسازی ابوریحان، ۲ میلی‌گرم استرادیول منوبنزوات در هر میلی‌لیتر) که در ۵ میلی‌لیتر سرم نمکی ۰/۹ درصد و اتانول با نسبت ۱:۱ حل شده بود، تزریق گردید. ۱۲ ساعت پس از تزریق استرادیول میش‌ها به هفت گروه مساوی تقسیم شدند. گروه اول به عنوان گروه شاهد انتخاب شد و به آن‌ها فقط سالین تزریق شد. به ترتیب به میش‌های گروه دوم، سوم و چهارم ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ واحد اکسی‌توسین (داروسازی ابوریحان، ۱۰ واحد اکسی‌توسین در هر میلی‌لیتر) به عضله ران تزریق شد. به میش‌های گروه پنجم، ششم و هفتم ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ واحد اکسی‌توسین به سیاهرگ گردنی تزریق شد. در آزمایش دوم نیز میش‌ها به هفت گروه برابر تقسیم شده و گروه اول به عنوان گروه شاهد انتخاب شد و به آن‌ها فقط سالین تزریق شد. به ترتیب به میش‌های گروه دوم، سوم و چهارم ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ واحد اکسی‌توسین به عضله ران تزریق شد. به میش‌های گروه پنجم، ششم و هفتم ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ واحد اکسی‌توسین به سیاهرگ گردنی تزریق شد. در آزمایش سوم میش‌ها برای ۱۲ روز سیدرگذاری[1] شده و هنگام سیدربرداری ۵۰۰ واحد هورمون eCG[2] به عضله ران تزریق شد. ۵۴ ساعت بعد از خارج کردن سیدر از واژن به هفت گروه نه‌تایی مانند آزمایش دوم تقسیم شدند.

اندازه‌گیری میزان اتساع سرویکس

در آزمایش اول، پیش از تزریق استرادیول، ۱۰ دقیقه و ۱۲ ساعت پس از تزریق استرادیول (پیش از تزریق اکسی‌توسین) و ۱۰ تا ۱۵ دقیقه پس از تزریق اکسی‌توسین با استفاده از یک اسپیکولوم گوسفندی متصل به منبع نور و یک پیپت مدرج تلقیح مصنوعی میزان باز شدن سرویکس میش‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش دوم، پیش از تزریق اکسی‌توسین و ۱۰ تا ۱۵ دقیقه پس از تزریق میزان باز شدن سرویکس اندازه‌گیری شد. اختلاف نفوذ میان قبل و بعد از تزریق در هر میش به عنوان مقدار نفوذ پیپت تلقیح مصنوعی و باز شدن سرویکس محاسبه می‌شد. بر اساس میزان نفوذ پیپت تلقیح بین ۰ تا ۱۰، ۲۲ تا ۳۰، ۴۵ تا ۵۵ میلی‌متر به داخل سرویکس به ترتیب به عنوان سرویکس بسته، نیمه‌باز و باز تعریف شد (Khalifa et al., 1992). بر این اساس، میش‌ها بعد از تزریق هورمون به سه گروه با سرویکس بسته، نیمه‌باز و باز تقسیم شدند. علاوه بر استفاده از پیپت مدرج در تعدادی از دام‌ها ورود پیپت از راه سرویکس به داخل رحم با سونوگرافی نیز سنجیده شد تا در باقی موارد از ورود صحیح پیپت اطمینان حاصل شود.

جمع‌آوری منی و رقیق کردن اسپرم

منی با استفاده از واژن مصنوعی از قوچ‌های نژاد زندی گرفته می‌شد و سپس با استفاده از شیر کم‌چرب به نسبت ۱ به ۱ رقیق شده و با مکش وارد پایت اسپرم می‌شد. میزان جنبایی و حرکت پیش‌رونده اسپرم‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری سنجیده شده و نمونه‌هایی که کمتر از ۶۰ درصد جنبایی و حرکت پیشرونده داشتند حذف شدند.

1. EAZI-BREED™, CIDR®, Progesterone
2. Sanofi Animal Health, Libourne Cedex, France

تلقیح مصنوعی

تلقیح مصنوعی در میش‌های گروه شاهد به طور معمول انجام شد و در گروه‌های تیمار، ۱۰ تا ۱۵ دقیقه پس از تزریق هورمون اکسی‌توسین، در ساعت ۵۴ پس از خروج پروژسترون، به صورت ترانس‌سرویکال تلقیح شدند. روش تلقیح به این صورت بود که میش‌ها روی یک خرک قرار داده می‌شدند به طوری‌که اندام حرکتی عقبی بالاتر از سطح بدن قرار گیرد و سپس با استفاده از یک اسپیکولوم مجهز به منبع نور واژن میش را باز کرده تا دهانه سرویکس پیدا شود و سپس با استفاده از تفنگ تلقیح مصنوعی میش‌ها به صورت ترانس‌سرویکال تلقیح شدند.

نحوه تلقیح به این صورت بود که تفنگ به درون سرویکس رفته و تا جایی که گان تلقیح در سرویکس به آسانی نفوذ می‌کرد وارد سرویکس شده و در همان محل اسپرم تخلیه می‌شد.

تشخیص آبستنی

تشخیص آبستنی با آزمایش اولتراسونوگرافی به وسیله یک دستگاه اولتراسوند[1] مجهز به یک پراب سکتور ۷/۵ مگاهرتز، در روز۵۰ پس از تلقیح انجام شد. در آزمایش سونوگرافی، ترانسدیوسر سونوگرافی با اتصال به پوست کنار پستان آبستنی میش را نشان می‌داد.

آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS 9.1 استفاده شد. میزان باز شدن سرویکس با استفاده از رویه GLM تجزیه و تحلیل شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. داده‌های حاصل از درصد آبستنی با استفاده از رویه Genmod نرم‌افزار SAS در قالب طرح کاملا تصادفی تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج

باز شدن سرویکس و نفوذ پیپت تلقیح مصنوعی

نتایج حاصل از اتساع سرویکس گوسفندان نژاد زندی در جدل‌های ۱ و ۲ گزارش شده است. نتایج آزمایش اول این تحقیق نشان داد تزریق درون‌عضلانی ۱۰۰ میکرولیتر استرادیول به تنهایی قادر به باز کردن سرویکس نمی-باشد. استفاده از تزریق استرادیول و اکسی‌توسین، به استثنای گروه دریافت کننده ۶۰ واحد اکسی‌توسین عضلانی، سبب باز شدن (P<۰/۰۵) سرویکس نسبت به گروه شاهد شد (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین نفوذ پیپت، اثر استرادیول و دوزها و روش‌های تزریق مختلف اکسی‌توسین بر باز شدن سرویکس میش‌های زندی

	شاهد		وریدی		عضلانی			±SEM
		۶۰	۸۰	۱۰۰	۶۰	۸۰	۱۰۰	
میزان نفوذ قبل از تزریق E2 (cm)	۰/۸۴	۰/۷۶	۰/۷۲	۰/۸۵	۰/۷۳	۰/۸۲	۰/۸۰	۰/۱۷
میزان نفوذ بعد از تزریق E2 (cm)	۰/۸۶	۰/۷۹	۰/۸۱	۰/۹۲	۰/۷۹	۰/۹۵	۰/۹۰	۰/۱۱
میزان نفوذ قبل از تزریق OT (cm)	۰/۹۱	۰/۸۵	۰/۸۷	۱/۰	۰/۸۵	۰/۱	۰/۹۷	۰/۱۹
میزان نفوذ بعد از تزریق OT (cm)	۱/۰[b]	۳/۶۵[a]	۴/۳۸[a]	۵/۰۱[a]	۱/۱۲[b]	۴/۱۵[a]	۴/۸۷[a]	۰/۶۱
سرویکس بسته(٪)	(۷/۹) ۷۷/۷۷[a]	(۲/۹) ۲۲/۲۲[b]	(۰/۹) ۰[b]	(۰/۹) ۰[b]	(۷/۹) ۷۷/ ۷۷[a]	(۱/۹) ۱۱/۱۱[b]	(۰/۹) ۰[b]	
سرویکس نیمه باز(٪)	(۲/۹) ۲۲/۲۲	(۱/۹) ۱۱/۱۱	(۱/۹) ۱۱/۱۱	(۱/۹) ۱۱/۱۱	(۱/۹) ۱۱/۱۱	(۱/۹) ۱۱/۱۱	(۱/۹) ۱۱/۱۱	
سرویکس باز(٪)	(۰/۹) ۰[b]	(۶/۹) ۶۶/۶۶[a]	(۸/۹) ۸۸/۸۸[a]	(۸/۹) ۸۸/۸۸[a]	(۱/۹) ۱۱/۱۱[b]	(۷/۹) ۷۷/۷۷[a]	(۸/۹) ۸۸/۸۸[a]	

عدد درون پرانتز نشان‌دهنده تعداد میش نسبت به کل میش‌ها در هر گروه می‌باشد. [a,b] نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ردیف است (P <۰/۰۵).

در آزمایش دوم، ۶۰ واحد اکسی‌توسین عضلانی و وریدی به تنهایی موجب باز شدن سرویکس نشد، اما در صورت استفاده از تزریق استرادیول و ۱۲ ساعت بعد تزریق ۶۰ واحد اکسی‌توسین وریدی سبب بهبود باز شدن سرویکس شد (P<۰/۰۵). استفاده از دوزهای ۸۰ و ۱۰۰ واحد اکسی‌توسین سبب باز شدن کامل سرویکس

1. B-mode; Pimedical Falco 100

می‌گردد (P<۰/۰۵) که اختلاف میان این دو دوز و همچنین اختلاف میان دو روش تزریق درون‌عضلانی و درون‌وریدی معنی‌دار نبود (جدول ۲، P >۰/۰۵). تزریق ۸۰ و ۱۰۰ واحد اکسی‌توسین بدون نیاز به تزریق استرادیول منجر به بازشدن سرویکس می‌شود (جدول ۲). درصد آبستنی نتایج آزمایش سوم (جدول ۳) نشان داد که تزریق ۱۰۰ واحد اکسی‌توسین منجر به بهبود (P<۰/۰۵) درصد آبستنی و برەزایی نسبت به گروه شاهد (۵۵/۵۵ در مقابل۲۲/۲۲) و گروه دریافت کننده ۶۰ واحد اکسی‌توسین و نیز تمایل به افزایش (P<۰/۱) نسبت به گروه‌های دریافت کننده دوز ۸۰ واحد اکسی-توسین شد. در این مطالعه بالاترین درصد آبستنی برای گروه دریافت کننده ۱۰۰ واحد اکسی‌توسین عضلانی بود. اثر نوع تزریق عضلانی یا وریدی اکسی‌توسین در این تحقیق نیز معنی دار نبود (P >۰/۰۵). تزریق ۶۰ واحد اکسی‌توسین تاثیری بر درصد آبستنی نداشت و درصد آبستنی این گروه مشابه گروه شاهد بود (جدول ۳).

جدول ۲- میانگین نفوذ پیپت، اثر دوزها و روش‌های تزریق مختلف اکسی‌توسین بر باز شدن سرویکس میش‌های زندی

	شاهد		وریدی			عضلانی			SEM±
		۶۰	۸۰	۱۰۰	۶۰	۸۰	۱۰۰		
میزان نفوذ قبل از تزریق OT (cm)	۰/۸۸	۰/۷۴	۰/۸۸	۰/۹۷	۰/۶۲	۰/۵۵	۰/۹۳		۰/۱۴
میزان نفوذ بعد از تزریق OT (cm)	۰/۸۸^{b}	۲/۸۵^{ab}	۴/۲۶^{a}	۴/۸۱^{a}	۰/۶۲^{b}	۳/۹۵^{a}	۴/۵۵^{a}		۰/۵۳
سرویکس بسته(٪)	(۷/۹) ۷۷/۷۷^{a}	(۳/۹) ۳۳/۳۳^{b}	(۱/۹) ۱۱/۱۱^{b}	(۰/۹) ۰^{b}	(۷/۹) ۷۷/۷۷^{a}	(۱/۹) ۱۱/۱۱^{b}	(۰/۹) ۰^{b}		
سرویکس نیمه باز(٪)	(۱/۹) ۱۱/۱۱	(۲/۹) ۲۲/۲۲	(۱/۹) ۱۱/۱۱	(۱/۹) ۱۱/۱۱	(۲/۹) ۲۲/۲۲	(۲/۹) ۲۲/۲۲	(۲/۹) ۲۲/۲۲		
سرویکس باز(٪)	(۱/۹) ۱۱/۱۱^{b}	(۴/۹) ۴۴/۴۴^{ab}	(۷/۹) ۷۷/۷۷^{a}	(۸/۹) ۸۸/۸۸^{a}	(۰/۹) ۰^{b}	(۶/۹) ۶۶/۶۶^{a}	(۷/۹) ۷۷/۷۷^{a}		

عدد درون پرانتز نشان‌دهنده تعداد میش نسبت به کل میش‌ها در هر گروه می‌باشد. a,b نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ردیف است (P <۰/۰۵).

جدول ۳- اثر دوزهای مختلف اکسی‌توسین بر درصد آبستنی

	شاهد		وریدی			عضلانی		
		۶۰	۸۰	۱۰۰	۶۰	۸۰	۱۰۰	
تعدادآبستن (٪)	(۲/۹) ۲۲/۲۲^{a}	(۱/۹) ۱۱/۱۱^{a}	(۳/۹) ۳۳/۳۳^{ab}	(۴/۹) ۴۴/۴۴^{b}	(۱/۹) ۱۱/۱۱^{a}	(۲/۹) ۲۲/۲۲^{a}	(۵/۹) ۵۵/۵۵^{b}	

عدد درون پرانتز نشان‌دهنده تعداد میش نسبت به کل میش‌ها در هر گروه می‌باشد. ^{a,b} نشان‌دهنده تمایل به اختلاف معنی‌داری میان تیمارها در ردیف است (P <۰/۱).

بحث

تخلیه عمیق‌تر اسپرم در سرویکس میش سبب درصد باروری بالاتر می‌شود (Eppleston et al., 1994; Anel et al., 2006)، اما سرویکس به عنوان مانعی در مقابل عبور گان تلقیح مصنوعی و جمع‌آوری رویان عمل می‌کند و این خاصیت منجر به کاهش درصد آبستنی حاصل از تلقیح مصنوعی بـــه روش واژینـال و ترانس‌سرویکال می‌شود. با باز نمودن سرویکس می‌توان به‌راحتی به صورت ترانس سرویکال تلقیح مصنوعی و جمع آوری رویان را انجام داد (Wulster-Radcliffe et al., 1999a). با استفاده از برخی هورمون‌ها و مواد شیمیایی می‌توان سرویکس را باز نمود تا پیپت تلقیح مصنوعی و یا سوند جمع‌آوری رویان بتواند از آن عبور نماید. استفاده از شیاف واژنی اوواژن (حاوی FSH) در ۲۴ ساعت پس از خروج اسفنج سبب امکان‌پذیر شدن نفود به سرویکس ۱۰۰٪ میش‌ها در زمان ۵۴ و ۶۰ ساعت پس از خروج پروژسترون می‌شود. پروستاگلندین E نیز سبب باز شدن سرویکس می‌شود (Mylne et al., 1992). شیاف میزوپروستول (آنالوگ پروستاگلندین E) که ۴۸ ساعت پس از خروج اسفنج استفاده می‌گردد سبب باز شدن

سرویکس و نفوذ ترانس‌سرویکال در ۱۰۰ ٪ میش‌ها در ساعت ۵۴ پس از خروج پروژسترون می‌شود (Leethongdee et al., 2007). ولی باید به قیمت تمام شده نیز توجه نمود زیرا درست است که استفاده از این مواد منجر به باز شدن سرویکس می‌شود ولی قیمت آن‌ها نیز بالا است. علاوه بر این‌ها ریلاکسین نیز موجب باز شدن سرویکس می‌گردد ولی نرخ دریافت اووسیت و درصد آبستنی در گروه دریافت کننده هورمون نسبت به گروه شاهد پایین‌تر است (Akinbami et al., 1990). هیالورونان با وزن مولکولی کم، گلیکوپروتئینی است که طی فحلی مقدارش در سرویکس افزایش می‌یابد. استفاده از آن سبب نفوذ در حدود ۳/۴ سانتی‌متر به سرویکس می‌شود که برای میش‌های دارای سرویکس کوچک می‌تواند مفید باشد (Perry et al., 2010).

اکسی‌توسین نیز هورمونی است که باعث آغاز یکسری فرایند آنزیمی کلاژنولیتیک می‌شود که در نهایت سبب باز شدن سرویکس می‌گردد (Granström et al., 1989). نتایج تحقیقات پیشین نشان داده است که استفاده از استرادیول و اکسی‌توسین (Khalifa et al., 1992; Flohr et al., 1999; Wulster-Radcliffe et al., 1999a; Stellflug et al., 2001a) و یا اکسی‌توسین (Khalifa et al., 1992; Sayre & Lewis, 1996) به‌تنهایی سبب باز شدن سرویکس در میش می‌شود. نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقات سایر محققین همخوانی داشت با این تفاوت که از دوزهای کمتری استفاده شد که سبب کاربردی‌تر شدن استفاده از هورمون‌ها می‌شود. استفاده از ۴۰۰ واحد اکسی‌توسین درست است که باعث باز شدن سرویکس می‌شود ولی تزریق این حجم هورمون آن هم درست قبل از تلقیح ممکن است عوارضی را در پی داشته باشد (Khalifa et al., 1992; Sayre & Lewis, 1996). در این مطالعه تزریق ۱۰۰ واحد اکسی-توسین باز شدن موفقیت‌آمیز سرویکس را در پی داشته که هم از جهت هزینه و هم از جهت سادگی تزریق مناسب‌تر و عملیاتی‌تر است. از طرفی در تحقیقات گذشته معمولا از تزریق درون‌وریدی استفاده می‌شد ولی در تحقیق حاضر از تزریق درون‌عضلانی که ساده‌تر است نیز استفاده شد. با توجه به این موضوع که در باز نمودن سرویکس و درصد آبستنی اختلاف معنی‌داری میان تزریق درون‌عضلانی و درون‌وریدی وجود نداشت نتایج توصیه می‌کند تا از تزریق درون‌عضلانی استفاده شود. تزریق درون‌عضلانی نسبت به درون‌وریدی دارای دو مزیت است: اول این‌که تزریق درون‌عضلانی نسبت به تزریق درون‌رگی آسان‌تر بوده، زمان کمتری برده و عملیاتی‌تر است و دوم این‌که تزریق درون‌عضلانی اکسی‌توسین باعث باز ماندن طولانی‌تر سرویکس می-شود و در نتیجه مدت زمان بیشتری به تلقیح‌کار می‌دهد تا گوسفندان را بعد از تزریق هورمون، تلقیح مصنوعی نماید. باز ماندن بیشتر سرویکس در روش تزریق عضلانی احتمالا به دلیل این است که با تزریق عضلانی، اکسی‌توسین بیشتر در بافت باقی می‌ماند و مدت بیشتری طول می‌کشد تا هورمون از ماهیچه آزاد شود و به خون رفته و در چرخه متابولیسم قرار گیرد، در نتیجه اثراتش برای مدت بیشتری باقی می‌ماند و سرویکس برای مدت طولانی‌تری باز می‌ماند. اما در صورت استفاده از تزریق درون‌رگی، هورمون به سرعت به بافت می‌رسد و متابولیسم شده از بافت خارج می‌شود و در نتیجه نسبت به روش درون‌عضلانی باز بودن سرویکس طول عمر کوتاه‌تری دارد (Homeida & Cooke, 1984). استرادیول و اکسی‌توسین فاقد اثر بر فعالیت لوتئال می‌باشند و استفاده از آن‌ها سبب کاهش آسیب به سرویکس در هنگام تلقیح و انتقال رویان ترانس‌سرویکال می‌شود و سرعت عمل را در هنگام جمع‌آوری رویان می‌افزاید (Wulster-Radcliffe et al., 1999a). استرادیول بیان mRNA سیکلواکسیژناز و EP4 را در سرویکس تنظیم می‌کند و ممکن است با ساخت پروستاگلندین E2 و فعال سازی گیرنده‌های آن سبب باز شدن سرویکس شود. ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از تیمار استرادیول مقدار بیان سیکلواکسیژناز افزایش می‌یابد (Kershaw-Young et al., 2010). با توجه به این‌که در این مطالعه اکسی‌توسین بدون عمل زمینه‌ای استرادیول نیز باعث بازشدن سرویکس می‌شود، توصیه می‌شود که قبل از تلقیح از استرادیول استفاده نشود، تا هم از اثرات نامناسب احتمالی آن جلوگیری شود و هم در هزینه صرفه‌جویی شود. بنابراین بهتر است برای عبور از سد سرویکس فقط از تزریق ۱۰۰ واحد اکسی‌توسین استفاده شود، که حدود ۱۰-۱۵ دقیقه بعد از تزریق، سرویکس

باز می شود و می‌توان در این زمات به سهولت تلقیح درون‌رحمی با گان تلقیح مصنوعی انجام داد. دوره باز ماندن سرویکس در این روش حدود نیم ساعت است.

اکسی‌توسین فاقد اثر منفی در انتقال اسپرم به اویداکت می‌باشد و سبب افزایش انقباضات رحم و باز شدن سرویکس می‌گردد. اکسی‌توسین بر باروری تخمک نیز اثر منفی ندارد. حداقل دوز لازم برای باز کردن سرویکس ۵۰ واحد می‌باشد (Sayre & Lewis, 1996, 1997). استرادیول بیان گیرنده اکسی‌توسین را تحریک می‌کند و اثر اکسی‌توسین بر بازشدن سرویکس به‌واسطه افزایش موضعی بیان mRNA ژن سیکلواکسیژناز-۲ و در پی آن افزایش تولید پروستاگلندین E صورت می‌گیرد (Shemesh et al., 1997). پروستاگلندین E سبب تغییر شکل[1] ماتریکس خارج سلولی سرویکس و در نتیجه بازشدن آن می‌شود (Stys et al., 1981; Ledger et al., 1983). اثر پروستاگلندین E از طریق گیرنده‌های EP2 و EP4 در سرویکس سبب انبساط ماهیچه صاف و ساخت گلیکوزآمینوگلیکان می‌شود.

هیالورونان گلیکوزآمینوگلیکان غالب است (Kershaw-Young et al., 2009).

تجمع هیالورونان و مولکول‌های آب در میان فیبرهای کلاژن سبب ازهم پاشیدگی فیبرهای کلاژن می‌شود (El Mardani et al., 1997) و مقاومت سرویکس کاهش می‌یابد. ازطرفی هیالورونان با وزن مولکولی پایین دارای اثر بر واسکولاریزاسیون می‌باشد و سبب افزایش نفوذ لوکوسیت‌ها و تحریک تغییرات بیوشیمیایی سرویکس می‌شود (Perry et al., 2010). نوتروفیل‌ها حاوی مقدار زیادی از کلاژناز و الاستاز هستند، آنزیم‌هایی که در سست نمودن کلاژن و باز کردن سرویکس مهم می‌باشند. بنابراین پیشنهاد می‌شود برای تسهیل تلقیح مصنوعی برای عبور دادن گان تلقیح مصنوعی از کانال سرویکس از تزریق ۱۰۰ واحد اکسی‌توسین به‌صورت درون‌عضلانی استفاده شود تا تکنسین تلقیح را به‌گونه‌ای انجام دهد که منی به جای واژن در رحم تخلیه شود. درصد آبستنی در گروه دریافت کننده ۱۰۰ واحد اکسی‌توسین بالاتر از سایر گروه‌ها بود.

تزریق اکسی‌توسین موجب باز شدن سرویکس می‌شود و در پی آن تخلیه اسپرم در انتهای سرویکس یا درون رحم صورت می‌گیرد و در نتیجه تخلیه عمیق‌تر اسپرم در سرویکس میش سبب افزایش درصد باروری بالاتر می‌شود (Eppleston et al., 1994; Anel et al., 2006). از طرفی اکسی‌توسین می‌تواند سبب افزایش انتقال اسپرم از کانال سرویکس شود(Ayad et al., 2004) و در نتیجه اسپرم بیشتری به محل لقاح رسیده و شانس لقاح میان اسپرم و تخمک افزایش می‌یابد (Khalifa et al., 1992; Wulster-Radcliffe et al., 1999b; Stellflug et al., 2001b). بدین ترتیب استفاده از تزریق ۱۰۰ واحد اکسی‌توسین سبب باز شدن کانال سرویکس شده و به دنبال باز شدن کانال سرویکس تفنگ تلقیح مصنوعی از سرویکس عبور نموده و منی به جای واژن در رحم تخلیه می‌گردد. با تخلیه منی در رحم اسپرم بیشتری به محل لقاح می‌رسد و شانس لقاح اسپرم و تخمک افزایش و بدین ترتیب شانس آبستنی افزایش یافته و درصد آبستنی و بره‌زایی بهبود یافت.

نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های این تحقیق نشان داد که تزریق درون‌عضلانی و درون‌وریدی اکسی‌توسین با دوز ۸۰ واحد و بالاتر با یا بدون تزریق استرادیول باعث بازشدن سرویکس در میش‌های زندی می‌شود. این اتساع امکان تلقیح مصنوعی درون‌رحمی از طریق سرویکس را در میش مهیا می‌کند. همچنین نتایج درصد آبستنی نشان داد تزریق این هورمون دارای نقش موثر و مثبت در افزایش درصد آبستنی در میش‌ها می‌باشد. با توجه به نتایج این مطالعه توصیه می‌شود، ۱۵ دقیقه قبل از تلقیح مصنوعی به هر دام ۱۰۰ واحد اکسی‌توسین به صورت عضلانی تزریق شود و منی از راه سرویکس در رحم تخلیه شود تا با عبور منی از سد سرویکس درصد آبستنی و بره‌زایی بهبود یابد.

سپاسگزاری

ازمدیر و پرسنل محترم ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند زندی جهاد کشاورزی استان تهران که امکان اجرای این طرح را مهیا نمودند تشکرمی‌گردد. همچنین از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور جهت

1. Remodeling

حمایت و تامین هزینه این پژوهش (طرح شماره ۹۲۰۰۱۶۷۸) تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Akinbami, M.A., Meredith, S., Warren Jr, J.E., Anthony, R.V., Day, B.N. (1990). Cervical dilation, conception rate, and concentrations of progesterone and estradiol-17B in postpartum ewes treated with porcine relaxin. *Theriogenology*, 34, 927-940.
2. Anel, L., Alvarez, M., Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Anel, E., De Paz, P. (2006). Improvement strategies in ovine artificial insemination. Reprod Domest Anim 41 Suppl 2, 30-42.
3. Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Fuente, L.F.d.l., Paz, P.d. (2005). Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology*, 63, 1235-1247.
4. Ayad, V.J., Leung, S.T., Parkinson, T.J., Wathes, D.C. (2004). Coincident increases in oxytocin receptor expression and EMG responsiveness to oxytocin in the ovine cervix at oestrus. *Animal Reproduction Science*, 80, 237-250.
5. Buckrell, B.C., Buschbeck, C., Gartley, C.J., Kroetsch, T., McCutcheon, W., Martin, J., Penner, W.K., Walton, J.S. (1994). Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. *Theriogenology*, 42, 601-611.
6. Cabrol, D., Dallot, E., Cedard, L., Sureau, C. (1985). Pregnancy-related changes in the ditribution og glycosaminoglicans in the cervix and corpus of human uterus. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 20, 289-295.
7. El Mardani, E., Kanayama, N., Kobayashi, H., Hossain, B., Khatun, S., Liping, S., Kabayashi, T., Terao, T. (1997) .The role of hyaluronic acid as a mediator and regulator of cervical ripening. *Hum Reprod*, 12, 1080-1088.
8. Eppleston, J., Salamon, S., Moore, N.W., Evans, G. (1994). The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*, 36, 211-225.
9. Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1987). Salmon`s artificial insemination of sheep and goats. Butterworths.
10. Fair, S., Hanrahan, J.P., O'Meara, C.M., Duffy, P., Rizos, D., Wade, M., Donovan, A., Boland, M.P., Lonergan, P., Evans, A.C.O. (2005). Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology*, 63, 1995-2005.
11. Flohr, S.F., Wulster-Radcliffe, M.C., Lewis, G.S. (1999). Technical note: development of a transcervical oocyte recovery procedure for sheep. J Anim Sci 77, 2583-2586.
12. Granström, L., Ekman, G., Ulmsten, U., Malmstrom, A. (1989). Changes in the connective tissue of corpus and cervix uteri during ripening and labour in term pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*, 96, 1198-1202.
13. Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S., Buckrell, B.C., 1990a. The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology*, 33, 977-992.
14. Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S., Buckrell, B.C. (1990b). A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, 33, 993-1010.
15. Hawk, H.W. (1983). Sperm Survival and Transport in the Female Reproductive Tract. Journal of Dairy Science 66, 2645-2660.
16. Homeida, A.M., Cooke, R.G. (1984). Biological half-life of oxytocin in the goat. *Res Vet Sci*, 37, 364-365.
17. Kershaw-Young, C.M., Khalid, M., McGowan, M.R., Pitsillides, A.A., Scaramuzzi, R.J. (2009). The mRNA expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and the changes in glycosaminoglycans in the sheep cervix during the estrous cycle. *Theriogenology*, 72, 251-261.
18. Kershaw-Young, C.M., Scaramuzzi, R.J., McGowan, M.R., Pitsillides, A.A., Wheeler-Jones, C.P.D., Khalid, M. (2010). The effect of estradiol on COX-2, EP2, and EP4 mRNA expression and the extracellular matrix in the cervix of the hypogonadotrophic, ovariectomized ewe. *Theriogenology*, 73, 620-628.
19. Kershaw, C.M., Khalid, M., McGowan, M.R., Ingram, K., Leethongdee ,S., Wax, G., Scaramuzzi, R.J. (2005). The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, 64, 1225-1235.
20. Khalifa, R.M., Sayre, B.L., Lewis, G.S. (1992). Exogenous oxytocin dilates the cervix in ewes. *J Anim Sci*, 70, 38-42.
21. Ledger, W.L., Elwood, D.L., Taylor, M.J. (1983). Cervical softening in late pregnant sheep by infusion of prostaglandin E2 into cervical artery. *J Reprod Fertil*, 69, 511-515.

22. Leethongdee, S., Khalid ,M., Bhatti, A., Ponglowhapan, S., Kershaw, C.M., Scaramuzzi, R.J. (2007). The effects of the prostaglandin E analogue Misoprostol and follicle-stimulating hormone on cervical penetrability in ewes during the peri-ovulatory period. *Theriogenology*, 67, 767-777.
23. Lightfoot, R.J., Salamon, S. (1970). Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. I. Transport and viability of spermatozoa within the genital tract of the ewe. *J Reprod Fertil*, 22, 385-398.
24. McKelvey, B. (1999). AI and embryo transfer for genetic improvement in sheep: the current scene. *In Practice*, 21, 190-195.
25. More, J. (1984). Anatomy and histology of the cervix uteri of the ewe: new insights. Acta Anat (Basel), 120, 156-159.
26. Mylne, M.J.A., McKelvey, W.A.C., Ferin, K., Matthews, K. (1992). Use of a transcervical technique for embryo recovery in sheep. *Vet Rec*, 130, 450.
27. Perry, K., Haresign, W., Wathes, D.C., Khalid, M. (2010). Intracervical application of hyaluronan improves cervical relaxation in the ewe. *Theriogenology*, 74, 1685-1690.
28. Salamon ,S., Maxwell, W.M.C. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37, 185-249.
29. Sayre, B.L., Lewis, G.S. (1996). Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology*, 45, 1523-1533.
30. Sayre, B.L., Lewis, G.S. (1997). Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. *Theriogenology*, 48, 267-275.
31. Shemesh, M., Dombrovski, L., Gurevich, M., Friedman, S., Shore, L.S., Fuchs, A.R., Fields, M.F. (1997). Regulation of boine cervical secration of prostaglandins and synthesis of cyclooxygenase by oxytocin. *Reprod Fertil*, 9, 525-530.
32. Stellflug, J.N., Wulster-Radcliffe, M.C., Hensley, E.L., Cowardin, E.A., Seals, R.C., Lewis, G.S. (2001a). Oxytocin-induced cervical dilation and cervical manipulation in sheep: effects on laparoscopic artificial insemination. *J Anim Sci*, 79, 568-573.
33. Stellflug, J.N., Wulster-Radcliffe, M.C., Hensley, E.L., Cowardin, E.A., Seals, R.C., Lewis, G.S. (2001b). Oxytocin-induced cervical dilation and cervical manipulation in sheep: effects on laparoscopic artificial insemination. *J Anim Sci*, 79, 568-573.
34. Stys, S.J., Dresser, B.L., Otte, T.E., Clark, L.E. (1981). Effect of prostaglandin E2 on cervical compliance in pregnant ewes. Am J Obstetr Gynecol 140, 415-419.
35. Torres, A., Sevellec, C. (1987). Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in ewe. *Reprod Nutr Dev*, 24, 859-863.
36. Wulster-Radcliffe, M.C., Costine, B.A., Lewis, G.S. (1999a). Estradiol-17 beta-oxytocin-induced cervical dilation in sheep: application to transcervical embryo transfer. *J Anim Sci*, 77, 2587-2593.
37. Wulster-Radcliffe, M.C., Costine, B.A., Lewis, G.S. (1999b). Estradiol-17 beta-oxytocin-induced cervical dilation in sheep: application to transcervical embryo transfer. *J Anim Sci*, 77, 2587-2593.
38. Wulster-Radcliffe, M.C., Lewis, G.S. (2002). Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of a new transcervical artificial insemination catheter and traversing the cervix on semen quality and fertility. *Theriogenology*, 58, 1361-1371.
39. Wulster-Radcliffe, M.C., Wang, S., Lewis, G.S. (2004). Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology*, 62, 990-1002.