نشریه علوم دامی ایران
دوره ۴۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳ (ص۱۳۳-۱۲۵)

مطالعه اثر تزریق استرادیول، اکسی‌توسین، ریلاکسین و شیاف پروستاگلندین ای- ۱ بر باز شدن سرویکس و درصد آبستنی در گوسفندان زندی

رضا مسعودی[۱]، احمد زارع‌شحنه[۲*]، آرمین توحیدی[۳]، حمید کهرام[۴]، عباس اکبری‌شریف[۵]، محسن شرفی[۶] و وحید زاهدی[۷]
۱. ۲. ۳. ۴. ۷. دانش آموخته دکتری تخصصی، استاد، دانشیار، استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۵. کارشناس ارشد علوم دامی، سازمان جهاد کشاورزی استان تهران، ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند نژاد زندی، پیشوا، ورامین. ۶. استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
(تاریخ دریافت:۹۲/۷/۸ - تاریخ تصویب: ۹۳/۳/۲۰)

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی اثر تزریق هورمون‌های استرادیول، اکسی‌توسین، ریلاکسین و شیاف واژنی پروستاگلندین ای-۱ (میزوپروستول) بر باز شدن سرویکس، زمان باز ماندن سرویکس و بهبود درصد آبستنی حاصل از تلقیح مصنوعی در گوسفند نژاد زندی در انتهای فصل تولیدمثل بوده است. در این مطالعه از ۸۰ میش سه تا چهار ساله با میانگین وزنی ۲/۵±۵۵ کیلوگرم استفاده شد. در آزمایش اول میش‌ها به چهار گروه مساوی تقسیم شدند. گروه‌ها به ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر استرادیول به صورت تزریق درون وریدی، ۱۰۰ واحد اکسی-توسین، ۵ میلی‌لیتر ریلاکسین به صورت تزریق درون‌عضلانی و ۲۰۰ میکروگرم شیاف واژنی میزوپروستول دریافت کردند. پس از اعمال تیمار در چهار زمان باز شدن و باز ماندن سرویکس مورد معاینه قرار گرفت. تزریق هورمون استرادیول تاثیر معنی‌داری بر باز شدن و باز ماندن سرویکس نداشت. استفاده از اکسی‌توسین، ریلاکسین و میزوپروستول منجر به باز شدن و باز ماندن سرویکس شد (P<۰/۰۵). در آزمایش دوم میش‌ها برای همزمانی فحلی در انتهای فصل تولید مثلی به مدت ۱۲ روز سیدرگذاری شدند و در هنگام سیدربرداری به همه میش‌ها مقدار ۵۰۰ واحد هورمون eCG تزریق شده به چهار گروه مساوی تقسیم شدند. گروه اول به عنوان گروه شاهد انتخاب شد و تیمار بازکننده سرویکس دریافت نکرد. سه گروه دیگر به ترتیب ۱۰۰ واحد اکسی‌توسین، ۵ میلی‌لیتر ریلاکسین و ۲۰۰ میکروگرم شیاف میزوپروستول دریافت کردند و با توجه به بهترین زمان باز بودن سرویکس در آزمایش اول، به ترتیب در زمان‌های ۲۰ و ۴۰ دقیقه و ۵ ساعت پس از اعمال تیمار، ۵۴ ساعت پس از تزریق eCG، به صورت ترانس سرویکال تلقیح شدند. روز ۵۰ پس از تلقیح با اولتراسونوگرافی درصد آبستنی تشخیص داده شد. درصد آبستنی در گروه دریافت کننده اکسی‌توسین از گروه‌های دریافت کننده میزوپروستول و ریلاکسین بالاتر بود (۶۰ درصد در مقابل ۲۵ و ۱۰ درصد، P <۰/۰۵) ولی با گروه شاهد (۵۰ درصد) اختلاف معنی‌دار نبود (P >۰/۰۵). در نتیجه تزریق اکسی-توسین باعث بازشدن سرویکس، افزایش درصد آبستنی در میش‌های زندی می‌شود و می‌توان از آن به‌عنوان ابزاری برای بهبود درصد آبستنی حاصل از تلقیح مصنوعی استفاده نمود.

کلید واژگان: استرادیول، اکسی‌توسین، درصدآبستنی، سرویکس، ریلاکسین، میزوپروستول.

مقدمه

درصد باروری حاصل از تلقیح مصنوعی در گوسفند با اسپرم تازه و از طریق سرویکس حدود ۴۰ تا ۶۰ درصد است (Anel *et al*., 2005; Fair *et al*., 2005). محدودیت‌های تلقیح مصنوعی با اسپرم تازه شامل کمبود قوچ برتر 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 می‌باشد. تلقیح مصنوعی با اسپرم منجمد راهی برای به حداکثر رساندن استفاده از قوچ‌های با صفات مناسب و کنترل بیماری‌ها می‌باشد ولی متاسفانه درصد آبستنی حاصل از تلقیح مصنوعی با اسپرم منجمد در تلقیح سرویکال پایین است (Salamon & Maxwell, 1995). یکی از دلایل باروری پایین اسپرم منجمد در گوسفند سرویکس ناهموار میش و عدم توانایی اسپرم در عبور از آن است (Lightfoot & Salamon, 1970). برای بهبود

تلفن: ۰۹۱۲۳۶۱۴۲۵۹
E-mail: Azareh@ut.ac.ir

درصد آبستنی حاصل از تلقیح مصنوعی راه‌کارهای متفاوتی ارایه شده است که یکی از آن‌ها تلقیح مصنوعی به روش لاپاراسکوپی است. امروزه لاپاراسکوپی روشی معمول برای تلقیح مصنوعی و انتقال جنین در گوسفند است که 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). تلقیح با روش لاپاراتومی نیز دارای معایبی از قبیل افزایش چسبندگی رحم، تخمدان و اویداکت، هزینه بالا، نیاز به تخصص و استفاده از مواد بی‌هوشی می‌باشد (Torres & Sevellec, 1987). کانال سرویکس در گوسفند دارای 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. برای حل مشکل عبور از سد سرویکس سه روش پیشنهاد شده است. اول روش فیزیکی است که شامل ورود به سرویکس با نیروی فشاری می‌باشد (Halbert *et al.*, 1990a). دوم روش مکانیکی بوده که با استفاده از پیپت‌های دارای انعطاف پذیری نسبی انجام می‌شود (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 ممکن است موجب ایجاد جراحت در سرویکس و رحم و به دنبال آن آسیب اسپرم می‌شود. ایجاد استرس در سرویکس، موجب تولید مواد ضداسپرم و ضدرویان می‌شود و در نتیجه باروری کاهش می‌یابد (Hawk, 1983; Sayre & Lewis, 1997)، ولی تحریکی که منجر به ایجاد جراحت نشود مضر نیست (Stellflug *et al.*, 2001a). در این روش پیپت‌های تلقیح ترانس‌سرویکال برای عبور از حلقه‌های سرویکس طراحی شده‌اند (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، ریلاکسین، پروستاگلندین E و اکسی‌توسین استفاده می‌شود (Khalifa *et al.*, 1992; Mylne *et al.*, 1992; Wulster-Radcliffe *et al.*, 1999a). برای باز نمودن سرویکس و عبور دادن ترانس‌سرویکال پیپت تلقیح مصنوعی می‌توان از این مواد 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 پژوهش بررسی اثر تزریق هورمون‌های استرادیول، اکسی‌توسین، ریلاکسین و شیاف واژنی پروستاگلندین ای-۱(میزوپروستول) بر باز شدن سرویکس، زمان باز ماندن سرویکس و بهبود درصد آبستنی حاصل از تلقیح مصنوعی در گوسفند نژاد زندی در انتهای فصل تولیدمثلی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برنامه گوسفندان و درمان هورمونی

این تحقیق در فروردین ۱۳۹۲ در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند زندی انجام شد. در این مطالعه ۸۰ راس میش سه تا چهار ساله از نژاد زندی با میانگین وزنی ۲/۵ ± ۵۵ کیلوگرم به طور تصادفی از یک گله ۹۰۰ راسی انتخاب شد. در آزمایش اول میش‌ها به مدت ۱۲ روز سیدرگذاری[1] شدند و روز هفتم پس از سیدربرداری میش‌ها به چهار گروه ۲۰تایی تقسیم و

1. EAZI-BREED™, CIDR®, Progesterone

تیمارهای مربوطه را دریافت نمودند. در گروه 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 و باز شدن سرویکس در زمان‌های ۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه پس از تزریق اندازه‌گیری شد (Khalifa *et al.*, 1992). در گروه دوم به هر میش ۱۰ میلی‌لیتر (معادل ۱۰۰ واحد) اکسی‌توسین (داروسازی ابوریحان، ۱۰ واحد اکسی‌توسین در هر میلی‌لیتر) به عضله ران تزریق شد و باز شدن سرویکس در زمان‌های ۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه پس از تزریق اندازه‌گیری شد(Sayre *et al.*, 1996). در گروه سوم به هر میش ۵ میلی‌لیتر ریلاکسین (داروسازی کاسپین، ۱ گرم متاکاربامول در هر۱۰ میلی‌لیتر) به عضله ران تزریق شد و باز شدن سرویکس در زمان‌های ۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه پس از تزریق اندازه‌گیری شد. در گروه چهارم به هر میش ۲۰ میکروگرم میزوپروستول[1]، آنالوگ پروستاگاندین ای-۱، به صورت شیاف واژنی داده شد و باز شدن سرویکس در زمان‌های ۰، ۴، ۵ و ۶ ساعت پس از اعمال تیمار اندازه‌گیری شد. روش انتخاب دوزها به این صورت بوده که تعیین دوز استرادیول و اکسی‌توسین بر اساس نتایج حاصل از پژوهش‌های منتشر نشده و همچنین مقالاتی بوده که در متن آورده شده است. انتخاب دوز ریلاکسین و میزوپروستول بر اساس یک آزمایش پایلوت صورت گرفت و در نتیجه آن این دوزها انتخاب شد. در آزمایش دوم میش‌ها به مدت ۱۲ روز سیدرگذاری شدند و هنگام سیدربرداری ۵۰۰ واحد هورمون eCG[2] به صورت تزریق عضلانی دریافت نمودند. میش‌ها به چهار گروه ۲۰تایی تقسیم شدند. گروه اول به عنوان گروه شاهد انتخاب شد و تیمار هورمونی دریافت نکرد و میش‌ها ۵۴ ساعت پس از سیدربرداری به صورت واژینال تلقیح شدند. گروه دوم ۵۴ ساعت پس از سیدربرداری ۱۰ میلی‌لیتر اکسی‌توسین دریافت و ۲۰ دقیقه پس از تزریق اکسی‌توسین به صورت ترانس سرویکال تلقیح شدند. گروه سوم تقریباً ۵۴ ساعت پس از سیدربرداری ۵ میلی‌لیتر ریلاکسین دریافت و ۴۰ دقیقه پس از تزریق ریلاکسین به صورت ترانس سرویکال تلقیح شدند. گروه چهارم ۴۹ ساعت پس از سیدربرداری ۲۰۰ میکروگرم شیاف میزوپروستول دریافت کردند و ۵ ساعت پس از قرار دادن شیاف (۵۴ ساعت پس از سیدربرداری) به صورت ترانس سرویکال تلقیح شدند.

1. Pzifer, Cytotec, England
2. Sanofi Animal Health, Libourne Cedex, France

اندازه‌گیری میزان اتساع سرویکس

در آزمایش اول میزان باز شدن سرویکس با استفاده از یک اسپیکولوم گوسفندی متصل به منبع نور و یک پیپت مدرج تلقیح مصنوعی مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش پیش از اعمال تیمار میزان نفوذ پیپت اندازه‌گیری شده و اختلاف آن با میزان نفوذ پیپت در زمان‌های بعد از اعمال تیمار به عنوان میزان نفوذ و باز شدن سرویکس در نظر گرفته شد. بر اساس میزان نفوذ پیپت تلقیح بین ۰ تا ۱۰، ۲۲ تا ۳۰، ۳۵ تا ۵۵ میلی‌متر به داخل سرویکس به‌ترتیب 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 حرکت پیشرونده داشتند حذف شدند.

تلقیح مصنوعی

تلقیح مصنوعی در میش‌های گروه شاهد به طور معمول در ساعت ۵۴ پس از سیدر برداری انجام شد. در گروه دریافت کننده اکسی‌توسین ۲۰ دقیقه پس از تزریق اکسی‌توسین در ساعت ۵۴ پس خروج پروژسترون، تلقیح مصنوعی به صورت ترانس سرویکال انجام شد. در

گروه دریافت کننده ریلاکسین ۴۰ دقیقه پس از تزریق ریلاکسین در ساعت ۵۴ پس خروج پروژسترون، تلقیح مصنوعی به صورت ترانس سرویکال انجام شد. در گروه دریافت کننده میزوپروستول ۵ ساعت قرار دادن شیاف در ساعت ۵۴ پس خروج پروژسترون، تلقیح مصنوعی به صورت ترانس سرویکال انجام شد. 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 ۳/۵ مگاهرتز، در روز ۵۰ پس از تلقیح انجام شد. در آزمایش سونوگرافی، ترانسدیوسر سونوگرافی با اتصال به پوست کنار پستان آبستنی میش را نشان می‌داد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

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 توکی استفاده شد. داده‌های حاصل از درصد آبستنی با استفاده از رویه GENMOD نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج

باز شدن سرویکس و نفوذ پیپت تلقیح مصنوعی

نتایج حاصل از اتساع و باز ماندن سرویکس گوسفندان نژاد زندی در جداول ۱، ۲، ۳ و ۴ گزارش شده است. نتایج آزمایش اول این تحقیق نشان داد تزریق ۱۰۰ میکرولیتر استرادیول به تنهایی قادر به باز کردن سرویکس نیست و در زمان‌های اندازه‌گیری اتساع سرویکس، سرویکس در تمامی میش‌ها بسته بود (جدول ۱، P >۰/۰۵). استفاده از اکسی‌توسین موجب باز شدن سرویکس در میش‌ها شد و سرویکس در ۸۵ درصد میش‌های دریافت کننده اکسی‌توسین در زمان‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه پس از تزریق، اتساع را نشان داد (جدول ۲، P <۰/۰۵). در گروه ریلاکسین ۲۰ دقیقه پس از تزریق، ۲۰ و ۴۵ درصد میش‌ها به ترتیب دارای سرویکس باز و نیمه باز بودند. با گذشت زمان تعداد میش‌های دارای سرویکس باز افـزایش یافـت و در زمان‌های ۴۰ و ۶۰ دقیقه پس از تزریق به ۶۵ درصد رسید در حالی‌که ۳۵ درصد میش‌ها دارای سرویکس بسته بودند (جدول ۳، P<۰/۰۵). در گروه میزوپروستول ۴ساعت پس از قرار دادن شیاف واژنی، ۳۵ و ۴۰ درصد میش‌ها به ترتیب دارای سرویکس باز و نیمه باز بودند. با گذشت زمان تعداد میش‌های دارای سرویکس باز افزایش یافت و در زمان‌های ۵ و ۶ ساعت پس از تزریق به ۷۵ درصد رسید در حالی‌که ۲۵ درصد میش‌ها دارای سرویکس بسته بودند (جدول ۴، P <۰/۰۵). بنابراین استفاده از اکسی-توسین، ریلاکسین و میزوپروستول دارای اثر معناداری بر باز شدن و باز ماندن سرویکس میش‌های زندی داشته است (P<۰/۰۵) ولی تاثیر استرادیول بر باز شدن سرویکس معنی‌دار نبود (P >۰/۰۵). درصد میش‌های با سرویکس متسع در گروه اکسی‌توسین در زمان‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه پس از تزریق برابر بود. در گروه ریلاکسین در زمان‌های ۴۰ و ۶۰ دقیقه پس از تزریق درصد میش‌های با سرویکس متسع برابر و بیشتر از درصد سرویکس باز در زمان ۲۰ دقیقه پس از تزریق بوده است. در گروه میزوپروستول در زمان‌های ۵ و ۶ ساعت پس از قرار دادن شیاف درصد میش‌های با سرویکس متسع برابر و بیشتر از درصد سرویکس باز در زمان ۴ساعت پس از شیاف گذاری بوده است.

درصد آبستنی

نتایج حاصل از درصد آبستنی تیمارهای دریافت کننده مواد باز کننده سرویکس آزمایش دوم در جدول ۵ آورده شده است. تزریق اکسی‌توسین منجر به بهبود درصد

1. B-mode; Pimedical Falco 100

آبستنی (۶۰ درصد) نسبت به گروه‌های دریافت کننده ریلاکسین (۱۰ درصد) و میزوپروستول (۲۵ درصد) شده است (P<۰/۰۵). درصد آبستنی گروه اکسی‌توسین از گروه شاهد بالاتر بود ولی این اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). درصد آبستنی گروه شاهد از گروه ریلاکسین و میزوپروستول بالاتر بود ولی اختلاف آن با گروه میزوپزوستول معنی‌دار نبود (P >۰/۰۵).

جدول ۱. اثر استرادیول بر میانگین نفوذ پیپت به سرویکس و باز ماندن سرویکس در طول زمان در میش‌های زندی

	زمان صفر	۲۰ دقیقه	۴۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	±SEM
میانگین نفوذ پیپت (cm)	۰/۴۳	۰/۵۹	۰/۵۹	۰/۶۱	۰/۱۹
تعداد سرویکس باز (٪)	۰/۲۰ (۰)	۰/۲۰ (۰)	۰/۲۰ (۰)	۰/۲۰ (۰)	
تعداد سرویکس نیمه باز (٪)	۰/۲۰ (۰)	۰/۲۰ (۰)	۰/۲۰ (۰)	۰/۲۰ (۰)	
تعداد سرویکس بسته (٪)	۲۰/۲۰ (۱۰۰)	۲۰/۲۰ (۱۰۰)	۲۰/۲۰ (۱۰۰)	۲۰/۲۰ (۱۰۰)	

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 ۲. اثر اکسی‌توسین بر میانگین نفوذ پیپت به سرویکس و باز ماندن سرویکس در طول زمان در میش‌های زندی

	زمان صفر	۲۰ دقیقه	۴۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	±SEM
میانگین نفوذ پیپت (cm)	۰/۳۴ [b]	۳/۸ [a]	۳/۸ [a]	۳/۶ [a]	۰/۱۹
تعداد سرویکس باز (٪)	۰/۲۰ (۰)	۱۷/۲۰(۸۵)	۱۷/۲۰(۸۵)	۱۷/۲۰(۸۵)	
تعداد سرویکس نیمه باز (٪)	۰/۲۰ (۰)	۰/۲۰ (۰)	۰/۲۰ (۰)	۰/۲۰ (۰)	
تعداد سرویکس بسته (٪)	۲۰/۲۰(۱۰۰)	۳/۲۰(۱۵)	۳/۲۰(۱۵)	۳/۲۰(۱۵)	

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 ریلاکسین بر میانگین نفوذ پیپت به سرویکس و باز ماندن سرویکس در طول زمان در میش‌های زندی

	زمان صفر	۲۰ دقیقه	۴۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	±SEM
میانگین نفوذ پیپت (cm)	۰/۳۶ [c]	۱/۸۰ [b]	۳/۱۱ [a]	۳/۰۵ [a]	۰/۱۹
تعداد سرویکس باز (٪)	۰/۲۰ (۰)	۴/۲۰(۲۰)	۱۳/۲۰(۶۵)	۱۳/۲۰(۶۵)	
تعداد سرویکس نیمه باز (٪)	۰/۲۰ (۰)	۹/۲۰ (۴۵)	۰/۲۰ (۰)	۰/۲۰ (۰)	
تعداد سرویکس بسته (٪)	۲۰/۲۰(۱۰۰)	۷/۲۰(۳۵)	۷/۲۰(۳۵)	۷/۲۰(۳۵)	

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 ۴. اثر میزوپروستول بر میانگین نفوذ پیپت به سرویکس و باز ماندن سرویکس در طول زمان در میش‌های زندی

	زمان صفر	۴ ساعت	۵ ساعت	۶ ساعت	±SEM
میانگین نفوذ پیپت (cm)	۰/۳۸ [c]	۲/۴۵ [b]	۳/۳۲ [a]	۳/۱۵ [a]	۰/۱۹
تعداد سرویکس باز (٪)	۰/۲۰ (۰)	۷/۲۰(۳۵)	۱۵/۲۰(۷۵)	۱۵/۲۰(۷۵)	
تعداد سرویکس نیمه باز (٪)	۰/۲۰ (۰)	۸/۲۰ (۴۰)	۰/۲۰ (۰)	۰/۲۰ (۰)	
تعداد سرویکس بسته (٪)	۲۰/۲۰(۱۰۰)	۵/۲۰(۲۵)	۵/۲۰(۲۵)	۵/۲۰(۲۵)	

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 ۵: اثر تیمارهای بازکننده سرویکس بر درصد آبستنی میش‌های زندی

تیمار	شاهد	اکسی‌توسین	ریلاکسین	میزوپروستول
تعدادآبستن (٪)	(۱۰/۲۰)	(۱۲/۲۰)	(۲/۲۰)	(۵/۲۰)
	۵۰ [ab]	۶۰ [a]	۱۰ [c]	۲۵ [bc]

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).

بحث

تخلیه عمیق‌تر اسپرم در سرویکس میش سبب رسیدن تعداد بیشتر اسپرم به محل لقاح و به دنبال آن سبب بهبود درصد آبستنی می‌شود (Eppleston *et al.*, 1994; Anel *et al.*, 2006)، اما ساختار منحصربه فرد سرویکس میش 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 به روش واژینال و ترانس‌سرویکال می‌شود (Wulster-Radcliffe *et al.*, 1999a). 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 (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). در مطالعه حاضر استفاده از میزوپروستول موجب باز شدن سرویکس و نفوذ گان تلقیح به داخل رحم شد ولی درصد آبستنی (۲۵ درصد) بدست آمده از گروه اکسی‌توسین و شاهد کمتر بود. 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)، زیرا ریلاکسین موجب شل شدن زیاد رحم و سرویکس می‌شود که در رسیدن موثر اسپرم به محل لقاح اختلال ایجاد می‌کند. در آزمایش انجام شده نیز کمترین درصد آبستنی (۱۰ درصد) مربوط به گروه دریافت کننده ریلاکسین بوده که بیانگر این است که این هورمون برای بهبود درصد آبستنی ناشی از تلقیح مصنوعی درون رحمی بدون جراحی مناسب نمی‌باشد. اکسی‌توسین نیز با 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 دوز کمتری استفاده شد که سبب کاربردی‌تر شدن استفاده از هورمون‌ها می‌شود. درست است که استفاده از ۴۰۰ واحد اکسی‌توسین 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 ۱۰ میلی‌لیتر اکسی‌توسین باز شدن موفقیت‌آمیز سرویکس را در پی داشته که هم از جهت هزینه و هم از جهت سادگی تزریق مناسب‌تر و عملیاتی‌تر است. استرادیول و اکسی-توسین فاقد اثر بر فعالیت جسم زرد 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). 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. کمترین 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. از طرفی هیالورونان با وزن مولکولی پایین دارای اثر بر واسکولاریزاسیون می‌باشد و سبب افزایش نفوذ

1. Remodeling

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 ۱۰ میلی‌لیتر اکسی‌توسین به‌صورت درون‌عضلانی استفاده شود تا تکنسین تلقیح را به گونه‌ای انجام دهد که منی به جای واژن در رحم تخلیه شود. درصد آبستنی در گروه دریافت کننده ۱۰ میلی‌لیتر 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).

نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های این پژوهش نشان داد که تزریق اکسی‌توسین با دوز ۱۰۰ واحد موجب 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، ۲۰ 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 بهبود یابد.

سپاسگزاری

از مدیر 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 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. *Reproduction in Domestic Animal*,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. 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. *Human Reproduction*, 12, 1080-1088.
7. 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.
8. Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1987). Salmon`s artificial insemination of sheep and goats. Butterworths.

9. 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.
10. Flohr, S.F., Wulster-Radcliffe, M.C., Lewis, G.S. (1999). Technical note: development of a transcervical oocyte recovery procedure for sheep. *Journal of Animal Scienc*e, 77, 2583-2586.
11. 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. *British Journal Obstetic Gynaecology*, 96, 1198-1202.
12. 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.
13. Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S., Buckrell, B.C. (1990b). A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, 33, 993-1010.
14. Hawk, H.W. (1983). Sperm Survival and Transport in the Female Reproductive Tract. *Journal of Dairy Science*, 66, 2645-2660.
15. 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.
16. 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.
17. Khalifa, R.M., Sayre, B.L., Lewis, G.S. (1992). Exogenous oxytocin dilates the cervix in ewes. *Journal of Animal Science*, 70, 38-42.
18. Ledger, W.L., Elwood, D.L., Taylor, M.J. (1983). Cervical softening in late pregnant sheep by infusion of prostaglandin E2 into cervical artery. *Journal of Reproduction and Fertility*, 69, 511-515.
19. 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.
20. 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. *Journal of Reproduction and Fertility*, 22, 385-398.
21. McKelvey, B. (1999). *AI and embryo transfer for genetic improvement in sheep*: the current scene. I*n Practice*, 21, 190-195.
22. Mylne, M.J.A., McKelvey, W.A.C., Ferin, K., Matthews, K. (1992). Use of a transcervical technique for embryo recovery in sheep. Ve*terinary Research*, 130, 450.
23. Perry, K., Haresign, W., Wathes, D.C., Khalid, M. (2010). Intracervical application of hyaluronan improves cervical relaxation in the ewe. *Theriogenology*, 74, 1685-1690.
24. Salamon ,S., Maxwell, W.M.C. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. A*nimal Reproduction Science*, 37, 185-249.
25. 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.
26. 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.
27. 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. *Journal of Reproduction and Fertility*, 9, 525-530.
28. 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. *Journal of Animal Science*, 79, 568-573.
29. 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. *Journal of Animal Science*, 79, 568-573.
30. Stys, S.J., Dresser, B.L., Otte, T.E., Clark, L.E. (1981). Effect of prostaglandin E2 on cervical compliance in pregnant ewes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 140, 415-419.
31. Torres, A., Sevellec, C. (1987). Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in ewe. R*eproduction and Nutrition Development*, 24, 859-863.

32. 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. *Journal of Animal Science*, 77, 2587-2593.
33. 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*ournal of Animal Science*, 77, 2587-2593.
34. 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.
35. 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.