

بررسی اثر سه دوز مختلف FSH (Folltropin-V) در میزان سوپراوولاسیون در گاومیشهای رودخانه‌ای (Bubalus bubalis)

دکتر فرهاد فرخی اردبیلی^۱، دکتر روزعلی باتوانی^۱، دکتر پرویز هورشتی^۲، دکتر سید مرتضی میرترابی^۳

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۴، شماره ۲، ۵۸-۵۳، (۱۳۷۸)

یکی از مهمترین محدودیتهای کاربرد انتقال جنین در گاومیش ضعیف بودن پاسخ سوپراوولاسیون تخمدانهای این دام به گونادوتروپین‌های موجود می‌باشد. در تمامی مطالعاتی که در زمینه سوپراوولاسیون گاومیش انجام شده، نتایج به دست آمده در مقایسه با گاو ضعیفتر و متغیرتر بوده است. از جمله عواملی که در میزان سوپراوولاسیون تخمدانها مؤثر است دوز هورمون گونادوتروپین می‌باشد. هرچند در گاو دوز استاندارد گونادوتروپین‌ها ارائه گردیده است ولی در گاومیش مقادیر FSH مورد استفاده بسیار مختلف و پاسخهای به دست آمده نیز بسیار متغیر بوده است.

هدف از مطالعه حاضر مقایسه میزان تخمک‌گذاری و تعداد جنینهای به دست آمده در صورت تزریق سه دوز مختلف FSH و نیز ارزیابی میزان رشد جنینها در روز ۶ بعد از تلقیح مصنوعی در گاومیشهای رودخانه‌ای بود.

مواد و روش کار

انتخاب گاومیشهای دهنده: این مطالعه بر روی گاومیشهای شیری موجود در مرکز پرورش و اصلاح نژاد گاومیش شمال و شمال غرب کشور واقع در ۲۰ کیلومتری ارومیه و در طی ماههای آبان، آذر، دی و بهمن سال ۱۳۷۵ انجام گرفت. تغذیه دامها در این مدت شامل یونجه، سیلوی ذرت، سیلوی تفاله سیب و کنسانتره بود. گاومیشهای دهنده از گله شیری و از بین دامهایی که حداقل ۳ ماه قبل زایمان طبیعی داشته و حداقل دارای یک استروس ثبت شده بودند، انتخاب شدند. گاومیشهای انتخابی از لحاظ سلامتی عمومی در وضعیت مطلوبی بوده و دستگاه تناسلی آنها نیز از طریق ملامسه رکتال آزمایش شد. دامهایی از لحاظ سیکل استروس فعال در نظر گرفته شدند که بر روی تخمدان آنها جسم زرد درشت یا فولیکول گراف لمس می‌شد. از بین این گاومیشها، ۱۸ رأس به عنوان دام دهنده انتخاب شده و در سه گروه ۶ رأسی قرار گرفتند. گاومیشهای انتخابی دارای سن ۷-۴ سال و وزن ۵۵۰-۴۰۰ کیلوگرم بودند.

همزمان کردن استروس: برای همزمان کردن استروس تمامی گاومیشها، از دو تزریق متوالی هورمون پروستاگلاندین $F_2\alpha$ (Lutalyse, Dinaprost, Upjon) با فاصله ۱۲ روز و به میزان هر دوز ۲۵mg به صورت داخل عضلانی استفاده شد. تمامی گاومیشهای دهنده بعد از دومین تزریق پروستاگلاندین $F_2\alpha$ ، در بهار بند جداگانه‌ای قرار گرفتند که دارای نور کافی برای فحل یابی در طی شب بود. برای فحل یابی از یک رأس گاومیش نر که قزیب آن به روش جراحی انحراف داده شده بود، استفاده شد. فحل یابی سه بار در روز به فاصله ۸ ساعت انجام گرفت. فاصله زمانی بین دومین تزریق پروستاگلاندین و شروع علائم فحلی (روز صفر) در این دسته از دامها ثبت می‌شد.

سوپراوولاسیون: برای ایجاد سوپراوولاسیون در گاومیشهای دهنده، از هورمون Folltropin-V (Folltropin-V, Vetrepharm Canada Co.) که حاوی ۴۰۰mg از هورمون PPF (Follitropin Extract porcine Pituitary) است

مطالعه‌ای مقدماتی به منظور ارزیابی تأثیر سه دوز مختلف FSH بر میزان پاسخ تخمدانهای گاومیش به سوپراوولاسیون در مرکز پرورش و اصلاح نژاد گاومیش شمال و شمال غرب کشور در ارومیه انجام گرفت. برای این منظور ۱۸ رأس گاومیش بعد از معاینه دستگاه تناسلی به عنوان دامهای دهنده انتخاب شد و به سه گروه ۶ رأسی تقسیم شدند. استروس گاومیشها در هر سه گروه با دو تزریق هورمون $PGF_{2\alpha}$ با فاصله ۱۲ روز همزمان شد. در روز ۱۲ - ۹ سیکل استروس تزریق FSH آغاز گردید. دوز FSH در گروه اول ۳۰۰mg، در گروه دوم ۴۰۰mg و در گروه سوم ۵۰۰mg بود. تزریق FSH در ۸ دوز مساوی با فاصله ۱۲ ساعت انجام گرفت. همزمان با پنجمین و ششمین تزریق FSH، دو دوز $PGF_{2\alpha}$ به دامهای دهنده تزریق شد. تمامی گاومیشهای دهنده بعد از مشاهده علائم فحلی، تلقیح مصنوعی شدند. جمع‌آوری جنینها در روز ۶ بعد از شروع فحلی و به روش غیر جراحی صورت گرفت. قبل از جمع‌آوری جنینها، تعداد اجسام زرد و فولیکولهای تخمک‌گذاری نکرده، از طریق ملامسه رکتال تخمدانها تعیین شد. بیشترین میزان پاسخ تخمدانها از نظر مجموع اجسام زرد و فولیکولهای تخمک‌گذاری نکرده در گروه سوم ($5/83 \pm 0/65$) مشاهده شد ولی بیشترین میزان تخمک‌گذاری (تعداد اجسام زرد) متعلق به گروه دوم ($4/5 \pm 0/81$) بود. از نظر مجموع جنینها و تخمکهای غیر بارور بیشترین تعداد در گروه دوم ($3 \pm 1/52$) و کمترین تعداد مربوط به گروه سوم ($1 \pm 0/71$) بود. در مجموع ۲۷ رویان و تخمک جمع‌آوری گردید که ۱۷ عدد آنها بارور بودند. از رویانهای جمع‌آوری شده، ۸۲/۳ درصد در مرحله مورا، ۵/۹ درصد در مرحله بلاستوسیست اولیه و ۱۱/۸ درصد در مرحله بلاستوسیست بودند. بر اساس نتایج به دست آمده، بهترین پاسخ سوپراوولاسیون در گروهی مشاهده شد که $FSH 400mg$ دریافت کرده بودند. با این وجود بین سه دوز استفاده شده اختلافی از نظر آماری وجود نداشت.

واژه‌های کلیدی: FSH، سوپراوولاسیون، گاومیش رودخانه‌ای، انتقال جنین

گاومیش از جمله دامهای بومی کشور است که جمعیت قابل توجهی از آن در مناطق شمال غرب و جنوب کشور پراکنده است. در طی سالهای اخیر تلاشهایی در جهت اصلاح نژاد این دسته از دامهای بومی کشور و دست یابی به نژادهایی با تولید بیشتر آغاز شده است، ولی پایین بودن کارایی تولید مثلی گاومیش باعث شده است تا پیشرفت برنامه‌های اصلاح نژادی این دام با کندی بسیار همراه باشد.

انتقال جنین بعد از تلقیح مصنوعی به عنوان نسل دوم فن‌آوری‌های زیستی مطرح است. این فن به علت نقش موثری که در افزایش کارایی تولید مثلی دارد، در برنامه‌های اصلاح نژادی مورد توجه قرار گرفته است (۷، ۸، ۱۵، ۲۴ و ۲۷). انتقال جنین در گاومیش برای اولین بار توسط Drost و همکاران (۱۹۸۴) گزارش شد (۶). در کشورهایی مانند بلغارستان (۱، ۱۰ و ۱۱)، هند (۱۳، ۱۹ و ۲۰)، پاکستان (۲۱) و تایلند (۳) نیز مطالعاتی در این زمینه انجام شده است.

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران.

۲) گروه آموزشی علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۳) مرکز اصلاح نژاد دام کشور، کرج - ایران.



جدول ۱- برنامه ریزی سوپراوولاسیون در گروهای گاومیش مورد مطالعه

روز ۱	روز ۱۲	روز ۱۶-۱۲	روز شروع	روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	روز یازدهم
PG1	PG2**	استروس	درمان	AM PM	AM PM	AM PM	AM PM	(روز صفر)	(روز ۶)
			روز ۹-۱۲	FSH FSH	FSH FSH	FSH FSH	FSH* FSH	تلقیح مصنوعی	جمع آوری
			سیکل			+PG +PG		(استروس)	جنین‌ها

* مقدار دوز FSH در هر تزریق: برای گروه اول ۳۷/۵mg، گروه دوم ۵۰ mg و گروه سوم ۶۲/۵mg
** دوز PGF2α در تمامی موارد ۲۵ mg

لوپ با بزرگنمایی X۵۰-۱۰ مورد بررسی قرار گرفت. جنینهای مشاهده شده به ظروف پتری کوچکتر حاوی محلول کشت که دارای ۱ درصد BSA بود منتقل و بعد از حداقل ۵ بار شستشو مورد ارزیابی قرار گرفتند. ارزیابی جنینها بر اساس معیارهای Linder و Wright بود (۱۴). بر این اساس جنینها از لحاظ مرحله رشد به مورولا، بلاستوسیست، جنین دژنره و اووسیت غیر بارور و از نظر کیفیت به درجه ۱ (عالی)، درجه ۲ (خوب)، درجه ۳ (نسبتاً خوب) و درجه ۴ (بد) تقسیم شدند. برای ارزیابی اختلاف در زمان شروع فحلی بین گاومیشهای سوپراووله و سیکلیک، از آزمون t-student و برای ارزیابی متغیرهای مختلف در بین گروهای سوپراوولاسیون از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه استفاده شد.

نتایج

از ۱۸ رأس گاومیش که تحت تزریق FSH قرار گرفته بودند، یک رأس علائم فحلی را قبل از تزریق پروستاگلاندین نشان داد. از ۱۷ رأس گاومیش باقیمانده در ۱۳ رأس (۷۶/۵ درصد) آنها علائم فحلی مشاهده شد. زمان تزریق پروستاگلاندین تا شروع فحلی در گروه اول $3/00 \pm 50$ ، گروه دوم $4/69 \pm 49/4$ و گروه سوم $5/19 \pm 40$ ساعت بود ولی این اختلاف معنی دار نبود. میانگین فاصله زمانی تزریق پروستاگلاندین تا شروع علائم فحلی در مجموع گاومیشهای سوپراووله $2/89 \pm 46/04$ ساعت بود. از ۲۲ رأس گاومیش غیر سوپراووله‌ای که سیکل استروس آنها با دو تزریق پروستاگلاندین با فاصله ۱۲ روز همزمان شده بود، ۱۴ رأس (۶۳/۶ درصد) آنها علائم فحلی را در فاصله زمانی $5/49 \pm 69/14$ ساعت بعد از تزریق پروستاگلاندین نشان دادند. شروع فحلی در گاومیشهای سیکلیک به طور معنی داری طولانی‌تر از گاومیشهای سوپراووله بود ($2/89 \pm 46/04$ ساعت) ($P \leq 0/002$).

گاومیشهایی که در روز جمع‌آوری جنینها (روز ۶) بیش از ۲ جسم زرد داشتند، از لحاظ پاسخ به FSH مثبت تلقی شدند. از ۱۸ رأس گاومیش مورد مطالعه ۱۵ رأس آنها (۸۳/۳ درصد) به سوپراوولاسیون پاسخ دادند (گروه اول ۶۶/۷ درصد، گروه دوم ۸۳/۲ درصد، و گروه سوم ۱۰۰ درصد) از لحاظ مجموع اجسام زرد و فولیکولهای تخمک‌گذاری نکرده بیشترین میزان پاسخ سوپراوولاسیونی در گروه سوم مشاهده شد ($5/83 \pm 0/65$)، در صورتی که بیشترین میزان تخمک‌گذاری (تعداد اجسام زرد) مربوط به گروه دوم بود ($4/5 \pm 0/81$). بیشترین میزان فولیکولهای تخمک‌گذاری نکرده نیز متعلق به گروه سوم بود ($1/83 \pm 0/79$). با این حال اختلاف معنی داری بین گروههای فوق به دست نیامد (جدول ۲).

بود استفاده شد. گروه اول ۳۰۰ mg، گروه دوم ۴۰۰ mg و گروه سوم ۵۰۰ mg Folltropin دریافت کردند. در هر گروه دوز کلی در ۸ قسمت مساوی تقسیم و با فاصله ۱۲ ساعت از طریق داخل عضلانی تزریق شد. اولین تزریق گونادوتروپین طی روزهای ۹-۱۲ سیکل استروس انجام گرفت (جدول ۱). قبل از شروع تزریقات تخمدانها برای اطمینان از وجود جسم زرد درشت، از طریق ملامسه رکتال آزمایش شدند. به گاومیشهای دهنده در ساعات ۴۸ و ۶۰ بعد از اولین تزریق Folltropin (همراه با پنجمین و ششمین تزریق) دو دوز ۲۵ میلی گرمی پروستاگلاندین F2α تزریق شد. از روز بعد از تزریق پروستاگلاندین، فحلیابی دامهای دهنده آغاز گردید. گاومیشهایی که علائم فحلی را نشان دادند با منی تازه تلقیح مصنوعی شده و یا به طور طبیعی جفتگیری شدند. برای جفتگیری طبیعی گاومیشهای دهنده به مدت ۶-۴ ساعت در مجاورت گاومیش نر قرار می‌گرفتند و در صورت تلقیح مصنوعی، این عمل برای حداقل ۳ بار با فاصله ۱۲ ساعت تکرار می‌شد. اولین تلقیح در زمان مشاهده فحلی بود. اگر دام دهنده علائم فحلی را نشان نمی‌داد، اولین تلقیح ۴۸ ساعت بعد از تزریق اول پروستاگلاندین انجام می‌گرفت. برای تلقیح مصنوعی از منی‌ای که همان روز جمع‌آوری و با رقیق کننده زرده تخم مرغ رقیق شده و کیفیت آن مورد ارزیابی میکروسکوپی قرار گرفته بود استفاده می‌شد.

جمع آوری جنینها: با توجه به گزارشهای موجود در مورد این که رشد رویان گاومیش در هفته اول ۲۴-۳۶ ساعت سریعتر از رویان گاو می‌باشد (۳، ۵ و ۲۶) لذا روز ۶ بعد از شروع فحلی برای جمع‌آوری جنینها در نظر گرفته شد. جمع‌آوری جنینها به روش غیر جراحی و با استفاده از فولی کاتتر دو راهه شماره ۱۶ یا ۱۸ انجام گرفت. قبل از جمع‌آوری جنینها ابتدا هر دو تخمدان به دقت آزمایش شده و تعداد اجسام زرد و فولیکولهای قابل لمس بر روی آنها ثبت شده و سپس با تزریق اپی دورال ۸-۵ میلی لیتر لیدوکائین ۲ درصد، بی‌حسی موضعی ایجاد گردید. برای شستشوی رحم از محلول PBS حاوی ۰/۱ درصد BSA استفاده شد که در روز جمع‌آوری جنینها به آن ۳۶mg پیرووات سدیم، ۱۰۰۰mg گلوکز، ۱۰۰۰۰۰ IU پنی سیلین G پستاسیم و ۵۰ mg استریتومایسین اضافه گردید.

برای شستشوی هر شاخ رحمی حداقل ۵۰۰cc از محلول فوق استفاده شد. تزریق محلول به داخل رحم توسط یک سرنگ ۶۰ cc و به طور متناوب از حداقل ۳۰cc تا حداکثر ۵۰cc انجام گرفت. مایعات برگشتی در یک ظرف استوانه‌ای مندرج یک لیتری استریل جمع‌آوری و در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس توسط یک صافی با قطر روزه‌های کمتر از ۱۰۰μم فیلتر گردید. محلول صاف شده در بوآت پتری ریخته شده و زیر



جدول ۲- فراوانی اجسام زرد و فولیکولهای تخمک گذاری نکرده در روز ۶ بعد از شروع فحلی در بین گروههای مختلف ($\bar{X} \pm SE$)

گروه	تعداد (n)	مجموع فولیکولها و اجسام زرد	اجسام زرد	فولیکولها
۱	۶	$4/33 \pm 1/12$	$3/67 \pm 1/2$	$0/67 \pm 0/33$
۲	۶	$5/17 \pm 1/19$	$4/5 \pm 0/81$	$0/67 \pm 0/49$
۳	۶	$5/83 \pm 0/65$	$4 \pm 0/63$	$1/83 \pm 0/79$
مجموع	۱۸	$5/11 \pm 0/58$	$4/07 \pm 0/5$	$1/06 \pm 0/33$

بین گروههای مختلف از نظر آماری اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

جدول ۳- فراوانی جنینها و اووسیت‌های غیر بارور جمع آوری شده در گروههای مختلف سوپراوولاسیون ($\bar{X} \pm SE$)

گروه	تعداد (n)	مجموع جنینها و اووسیت‌ها	جنینها	اووسیت‌های نابارور
۱	۶	$1/33 \pm 0/8$	$0/17 \pm 0/17$	$1/17 \pm 1/6$
۲	۵	$3 \pm 1/52$	$2 \pm 0/84$	$1 \pm 0/78$
۳	۴	$1 \pm 0/71$	$1 \pm 0/71$	۰
مجموع	۱۵	$1/8 \pm 0/63$	$1 \pm 0/38$	$0/8 \pm 0/37$

بین گروههای مختلف از نظر آماری اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

سوپراوولاسیون این دام نسبتاً خوب ارزیابی شد (ملاسه ۳ جسم زرد و ۳ فولیکول). با این حال هیچ جنینی از آن به دست نیامد که این امر می‌تواند ناشی از بد بودن کیفیت شستشوی رحمی در این دام باشد. از ۱۷ رأس گاومیش باقیمانده، در ۱۳ رأس (۷۶/۵ درصد) علائم فحلی مشاهده گردید. درصد گاومیشهایی که در این مطالعه با سه بار فحل یابی در روز علائم فحلی را نشان دادند، تقریباً برابر با میزان گزارش شده توسط Karavanov می‌باشد (۱۰). در مطالعه وی با ۶ بار فحل یابی در روز (هر چهار ساعت یک بار) با استفاده از گاومیش نر انحراف قضیب داده شده، ۷۸/۹ درصد از گاومیشهایی که با FSH-p سوپراووله شده بودند علائم فحلی را نشان دادند. در گزارشی که Alexiev از انتقال جنینهای انجام گرفته در طی سالهای ۱۹۸۷ - ۱۹۸۴ در ایستگاه اصلاح نژاد گاومیش Shamen در بلغارستان ارائه کرد، میزان فحل یابی در گاومیشهای سوپراووله شده با FSH-p را با فحل یابی چهار ساعت یکبار، ۹۰ درصد گزارش نمود (۱). Rahil و همکاران نیز میزان فحل یابی در گاومیشهای Nili-Ravi که با FSH سوپراووله شده بودند را با فحل یابی هر ۶ ساعت ۹۲ درصد گزارش نمود (۲۱).

در مطالعه حاضر در گاومیشهای سیکلیک که با دو تزریق پروستاگلاندین با فاصله ۱۱ روز استروس در آنها همزمان شده بود میزان تشخیص استروس ۶۳/۶ درصد بود که بسیار کمتر از میزان گزارش شده توسط Jindal (۸۵ درصد) در گاومیشهای مورا می‌باشد (۹). Drost و همکاران حتی میزان بالاتری از تشخیص استروس را (۹۴/۶ درصد) متعاقب تزریق آنالوگ پروستاگلاندین گزارش نموده‌اند (۴). علت احتمالی پایین بودن میزان تشخیص استروس در مطالعه حاضر علاوه بر روش فحل یابی (از نظر زمان و دفعات مشاهده) و دقت فحل یابی ممکن است ناشی از عوامل دیگری مانند نژاد و فصل نیز باشد. وجود اختلاف در میزان بروز فحلی بین گاومیشهای سوپراووله و سیکلیک (به ترتیب

از مجموع ۱۸ رأس گاومیش مورد مطالعه، در یک رأس به علت حساسیت بیش از حد و بی‌قراری شدید دام شستشوی رحم و جمع آوری جنینها مقدور نشد و در دو رأس دیگر نیز کیفیت شستشوی رحم مطلوب نبود. در کل در ۱۳ رأس گاومیش شستشوی رحم با کیفیت عالی یا خوب انجام گرفت که از این تعداد مجموعاً ۲۷ رویان و اووسیت نابارور جمع آوری گردید. هفده عدد از جنینهای جمع آوری شده (۶۳ درصد) بارور بودند. بیشترین تعداد جنین جمع آوری شده، متعلق به گروه دوم بود. هر چند که اختلاف موجود معنی دار نبود (جدول ۳).

از مجموع ۱۷ رویان جمع آوری شده ۱۴ رویان در مرحله مورولا (۸۲/۳ درصد)، یک رویان در مرحله بلاستوسیست اولیه (۵/۹ درصد) و ۲ رویان در مرحله بلاستوسیست (۱۱/۸ درصد) بودند. در طی این مطالعه رویان خارج شده از زوناپلوسیدا یا دژنره‌ای مشاهده نگردید.

بحث

در یک رأس از گاومیشهای مورد مطالعه علائم فحلی در اوایل روز سوم تزریق گونادوتروپین یعنی قبل از تزریق پروستاگلاندین شروع گردید. این امر ممکن است ناشی از فحلی کاذب باشد. ولی گزارشی در مورد احتمال بروز علائم کاذب فحلی و درصد آن وجود ندارد. البته دلیل دیگر ممکن است مربوط به کوتاه بودن سیکل استروس باشد. گزارشهایی در مورد مشاهده سیکل‌های استروس کوتاه (۹ روزه) در گاومیش وجود دارد (۲۸). اگر چنین احتمالی را بپذیریم در این صورت زمان تزریق پروستاگلاندین مصادف با تحلیل خود به خود جسم زرد در اثر ترشح پروستاگلاندین آندوزن بوده است. به عبارت دیگر تزریق FSH در اواخر سیکل انجام گرفته است. در هنگام آزمایش رکتال در زمان شستشوی رحم (روز ۸ بعد از تزریق پروستاگلاندین)، پاسخ



نزدیک به هم می‌باشد.

از لحاظ مجموع تعداد رویانها و تخمکهای غیر بارور جمع‌آوری شده اختلاف معنی‌داری بین گروههای مختلف به دست نیامد. همان طوری که در جدول ۳ مشاهده می‌شود اختلاف میانگین تعداد کل جنینها و تخمکهای جمع‌آوری شده در گروه دو (۳ عدد) با گروه یک (۱/۳۳ عدد) و گروه سه (۱ عدد)، قابل توجه است. علت این که چنین اختلافی از لحاظ آماری معنی‌دار نیست می‌تواند ناشی از محدود بودن تعداد نمونه‌ها در هر گروه باشد.

میانگین مجموع رویانها و تخمکهای نابارور جمع‌آوری شده ($0/63 \pm 1/8$) از بسیاری از گزارشهای دیگر بهتر می‌باشد (جدول ۵). Tanja و همکاران (۲۹) در طی سوپراوولاسیون ۱۲ رأس گاومیش نژاد مورا با ۳۵ mg هورمون Folltropin میانگین $0/57 \pm 1/67$ را گزارش کردند که نزدیک به نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. ولی Misra و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی گاومیشهایی با سابقه سوپراوولاسیون مطلوب (وجود بیش از ۳ جسم زرد در سوپراوولاسیون‌های قبلی) انجام دادند، با تزریق ۳۰ mg هورمون Folltropin $0/91 \pm 2/32$ جنین جمع‌آوری نمودند (۱۸). Misra در گزارشی از عملکرد برنامه انتقال جنین در دو مرکز عمده اصلاح نژاد گاومیش در هند از مجموع ۶۹ مورد سوپراوولاسیون با دوزهای مختلف Folltropin میانگین کل جنینهای جمع‌آوری شده را ۲/۷ گزارش کرد (۱۷). علت اختلاف موجود در تعداد جنینهای جمع‌آوری شده در بین مطالعات فوق و مطالعه حاضر را می‌توان ناشی از تفاوت‌های نژادی گاومیشهای موجود در دو منطقه دانست. وجود تجربه‌های قبلی انتقال جنین در مراکز دیگر را نیز می‌توان عامل مؤثری دانست در صورتی که مطالعه حاضر برای اولین بار در کشور انجام گرفت. ضمناً در مراکز فوق احتمال بهترین «دهنده» به علت تجربه چندین ساله آنها وجود دارد.

از مجموع تعداد ۱۳ رأس گاومیش که شستشوی رحم آنها با کیفیت عالی یا خوب انجام شد، ۸ مورد ($61/5$ درصد) موفقیت‌آمیز بوده و از آنها جنین گرفته شد. این درصد موفقیت در مقایسه با گزارشهای موجود بسیار خوب می‌باشد. Karaiwanov در مطالعه‌ای بر روی گاومیشهای مورا و دورگهای مورا با نژاد بلغاری، به دنبال ایجاد سوپراوولاسیون با FSH یا PMSG، در $42/9$ درصد بعد از کشتار و $42/2$ درصد موارد در روش غیر جراحی موفق به اخذ جنین شد (۱۰). Chantaraprateap و همکاران نیز در گاومیشهای باتلاقی سوپراووله شده با FSH یا PMSG میزان موفقیت روش غیر جراحی در جمع‌آوری جنین را $54/5$ درصد گزارش کردند (۳). البته میزان موفقیت روش غیر جراحی برای اخذ جنین از گاومیشهایی که سیکلیک بوده و به طور طبیعی جفتگیری یا تلقیح شده‌اند (بدون سوپراوولاسیون)، بیشتر گزارش شده است (۷۰ درصد در گاومیشهای رودخانه‌ای (۲۵) و ۷۸ درصد در گاومیشهای باتلاقی (۳)). با توجه به گزارشهای محققین دیگر، میزان موفقیت روش غیر جراحی جمع‌آوری جنین در مطالعه حاضر ($61/5$ درصد) مطلوب بود. طویل و باریک بودن شاخ رحم و نیز باریک بودن گردن رحم باعث دشواری روش غیر جراحی برای جمع‌آوری جنینها در گاومیش می‌گردد.

از مجموع ۲۷ رویان و تخمک جمع‌آوری شده، ۱۷ عدد آنها (۶۳ درصد) بارور بودند. محققین دیگر میزان باروری بالاتری از ۷۱ درصد تا $97/6$ درصد را گزارش نمودند (۴، ۱۰، ۱۳، ۱۷، ۱۸ و ۲۶). با توجه به اینکه در اکثر گاومیشهای مورد مطالعه روش تلقیح مصنوعی به کار رفت به نظر می‌رسد علت پایین بودن میزان باروری تخمکهای جمع‌آوری شده ناشی از نقص در تلقیح مصنوعی باشد. Drost در طی مطالعات اولیه‌اش بر روی انتقال جنین گاومیش جنینهای خارج شده از زوناپلوسیدا را از روز ۷ تلقیح به بعد مشاهده نمود (۵). وی مشاهده کرد که رویانهای جمع‌آوری شده در روز ۶ در مرحله بلاستوسیست و

$76/5$ درصد و $63/6$ درصد) نیز احتمالاً می‌تواند ناشی از بالا بودن غلظت استرادیول در گاومیشهای سوپراووله باشد (۲۴).

اختلاف معنی‌داری در بین گروههای مختلف سوپراوولاسیون شده، از لحاظ زمان شروع فعلی مشاهده نگردید. در مطالعات دیگر نیز به این موضوع اشاره نشده است. فاصله بین تزریق پروستاگلاندین و شروع علائم فعلی در مجموع گاومیشهای سوپراووله شده $2/89 \pm 46/04$ ساعت بود. در صورتی که در گاومیشهای غیر سوپراووله شروع فعلی نزدیک به ۲۴ ساعت دیرتر بود ($5/19 \pm 69/14$). در سایر مطالعات نیز شروع زودتر علائم فعلی در گاومیشهای سوپراووله گزارش شده است (۱، ۱۰، ۲۱ و ۲۲). تجویز گونادوتروپین باعث تحریک رشد تعداد بیشتری فولیکول می‌گردد. افزایش سریعتر غلظت استرادیول را در گاومیشهای سوپراووله، نشان داده‌اند (۲، ۱۶ و ۲۳) که می‌توان آن را دلیل شروع زودتر فعلی در این دامها دانست.

Sarvaiya و همکاران با توجه به نتایجی که از مطالعات خود به دست آورده بودند (زمان شروع فعلی در دامهای سوپراووله و غیر سوپراووله به ترتیب $41/7$ و ۸۸ ساعت) توصیه کردند که تزریق پروستاگلاندین در دامهای گیرنده ۳۶ ساعت زودتر از گاومیشهای دهنده انجام گیرد (۲۲). ولی بر اساس نتایج مطالعه حاضر، فاصله ۲۴ ساعت بین تزریق پروستاگلاندین دامهای دهنده و گیرنده، کافی به نظر می‌رسد.

در مطالعه حاضر از مجموع ۱۸ رأس گاومیش Folltropin دریافت کرده بودند، در ۱۵ رأس ($83/3$ درصد) آنها تعداد اجسام زرد ۲ عدد یا بیشتر بود. این میزان بیشتر از مطالعات دیگر می‌باشد. در مطالعه Drost و همکاران، $70/6$ درصد از گاومیشها دارای بیش از ۲ جسم زرد بودند (۴). Alexev (1988) و Karaiwanow (1986) نیز این مقدار را به ترتیب ۷۲ درصد و ۶۰ درصد گزارش کرده‌اند (۱ و ۱۰).

در بین گروههای مختلف مورد مطالعه از لحاظ مجموع تعداد فولیکولهای تخمک‌گذاری نکرده و اجسام زرد در روز جمع‌آوری جنینها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. با وجود این که از لحاظ مجموع تعداد فولیکولها و اجسام زرد، تجویز دوز بالای هورمون Folltropin (500 mg)، باعث تحریک بیشتر تخمدان نسبت به دوز 400 mg می‌گردد ولی به علت این که تعداد فولیکولهای تخمک‌گذاری نکرده در این گروه بیشتر می‌باشد لذا در مجموع تعداد اجسام زرد (میزان تخمک‌گذاری) در گروه دوم بیشتر است. در گروه سوم که 300 mg هورمون Folltropin دریافت کرده بودند، پاسخ سوپراوولاسیون گاومیشها چه از لحاظ مجموع فولیکولها و اجسام زرد و چه از نظر میزان تخمک‌گذاری (تعداد اجسام زرد) کمتر از دو گروه دیگر بود. Misra (1993) در گزارشی که اطلاعات مربوط به انتقال جنین در 300 رأس گاومیش را در طی ۵ سال جمع‌آوری کرده بود با مقایسه نتایج مربوط به استفاده از دوزهای مختلف PMSG، FSH-p و Folltropin اعلام کرد که بیشترین تعداد اجسام زرد در گاومیشهای سوپراووله با Folltropin مشاهده می‌شود (۱۷). در گاومیشهایی که دوز $35-70$ mg هورمون Folltropin دریافت کرده بودند میانگین تعداد اجسام زرد ۴ و تعداد فولیکولهای تخمک‌گذاری نکرده $1/3$ بود. این نتایج شباهت زیادی به نتایج مطالعه حاضر دارد که در آن میانگین تعداد اجسام زرد و فولیکولهای تخمک‌گذاری نکرده در مجموع ۱۸ رأس گاومیش سوپراووله شده با Folltropin-V به ترتیب $4/07$ و $1/06$ بود. در مطالعه Misra، FSH به کار رفته از نوع Folltropin و روش مورد استفاده 10 تزریقی با فاصله ۱۲ ساعت و با دوز کاهنده بود ولی در مطالعه ما نوع گونادوتروپین، Folltropin-V (هر ویال آن حاوی 400 mg از PPF) بوده و روش سوپراوولاسیون نیز روش ۸ تزریق متوالی با دوز مساوی و با فواصل ۱۲ ساعت بود. با این حال نتایج حاصل بسیار



خارج شده از زوناپلوسیدا بودند. این نتایج نیز نشان دهنده سریعتر بودن رشد جنین گاومیش در مقایسه با گاو است. در مطالعه حاضر که جمع آوری جنینها در روز ۶ بعد از شروع فحلی انجام گرفت، از ۱۷ جنین جمع آوری شده ۸۲/۲ درصد در مرحله مورولا، ۵/۹ درصد در مرحله بلاستوسیست اولیه و ۱۱/۸ درصد در مرحله بلاستوسیست بودند و بلاستوسیست خارج شده از زوناپلوسیدا مشاهده نگردید. نتایج این مطالعه، مشابه نتایج گزارش شده در گاومیش باتلاقی می باشد (۳). با این حال به علت متغییر بودن نتایج گزارش شده توسط محققین مختلف، نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه وجود دارد.

در مجموع، از نتایج به دست آمده در طی این مطالعه می توان نتیجه گرفت: ۱- هر چند اختلاف معنی داری بین دوزهای مختلف گونادوتروپین مشاهده نشد، لیکن با استفاده از دوز ۴۰۰ mg که مشابه دوز توصیه شده برای گاو می باشد، نتایج بهتری به دست آمد. با این حال نیاز به مطالعات بیشتری احساس می شود.

۲- در رابطه با میزان باروری در این مطالعه، باید ارزیابی دقیقتری در روش تلقیح مصنوعی این مرکز انجام گیرد. به علاوه زمان مناسب برای تلقیح مصنوعی باید مورد مطالعه قرار گیرد.

۳- در طی این مطالعه، امکان بررسی دینامیسم موج فولیکولی و تأثیر حضور فولیکول غالب در پاسخ سوپراوولاسیون وجود نداشت که مطالعات بیشتری را می طلبد.

۴- با توجه به این که این تجربه برای اولین بار در ایران انجام می گرفت، مطالعات گسترده تری برای بهبود نتایج ضروری می باشد.

آنهایی که در روز ۵ جمع آوری شده بودند در مرحله مورولا قرار داشتند. با توجه به این که خروج رویان گاو از زوناپلوسیدا در روز ۱۰ - ۸ بعد از فحلی مشاهده می شود لذا وی نتیجه گرفت که رشد جنین گاومیش بایستی ۳۶ - ۲۴ ساعت سریعتر از گاو صورت گیرد. Karaivanov و همکاران به دنبال شستشوی رحم وایدوکت گاومیشهای سوپراووله که در ساعات مختلفی بعد از تلقیح کشتار شده بودند، گزارش کردند که ورود جنین از وایدوکت به رحم بین ساعات ۱۰۸ - ۱۰۰ بعد از شروع فحلی اتفاق می افتد (۱۲). با توجه به این که تمامی جنینها تا ساعت ۱۲۰ بعد از تلقیح از زوناپلوسیدا خارج شده بودند، لذا نتیجه گیری کردند که رشد جنین گاومیش حدود ۷۲ - ۶۰ ساعت سریعتر از گاو می باشد. در مطالعاتی که در گاومیش باتلاقی انجام گرفت مشاهده گردید که رشد رویان تا روز ۷/۵ - ۷ مشابه گاو می باشد (۳). تبدیل مورولا به بلاستوسیست بعد از روز ۶ اتفاق می افتد. خروج بلاستوسیست از زوناپلوسیدا در روز ۷/۵ - ۷ بعد از شروع فحلی مشاهده گردید. این نتایج با گزارشهای Karaivanov که بلاستوسیستهای خارج شده از زوناپلوسیدا را از روز ۵ بعد از شروع فحلی قابل مشاهده می داند، همخوانی ندارد. Singla و همکاران نیز در مطالعه ای بر روی رویانهای گاومیش نژاد مورا مشاهده کردند که در روز ۵ بعد از شروع فحلی تمامی رویانهای جمع آوری شده در مرحله مورولا بودند (۲۶). در روز ۶ بعد از فحلی ۳۵/۳ درصد از جنینها در مراحل مختلف بلاستوسیست و ۶۴/۷ درصد در مراحل مختلف مورولا و در روز هفتم ۵۷/۱ درصد در مراحل مختلف مورولا، ۲۸/۶ درصد در مراحل بلاستوسیست و ۱۴/۲ درصد در مرحله بلاستوسیست

References

1. Alexiev, A., Valkvov, K., Karaivanov Ch., Kacheva D., Polykhronov, O., Petrov, M., Nikolov, N., Drogoev, A. and Radev, P. Embryo transfer in buffaloes in Bulgaria. Proc. II World Buffalo Congress, New Dehli, India: 591-595, (1988).
2. Beg, M.A., Sanwal, P.C. and Yadav, M.C. Ovarian responses and endocrine change in buffalo superovulated at midluteal and late luteal stage of the estrus cycle: A preliminary report. Theriogenology, 47: 423-432, (1997).
3. Chantaraprateep, P., Lohachit, C., Techakumphu M., Kobayashi, G., Virakul, P., Kunayongkrit, A., Prateep, P. and Limskul, A. Early embryonic development in that swamp buffalo (bubalus bubalis). Theriogenology, 31: 1131-1139, (1989).
4. Drost, M., Alexiev, A., Vlahov, K., Karaivanov, Ch., Cripe, W.S., Leonards, A.P., Kacheva, D., Polihronov, O., Nicolov, N., Petrov, M. and Dragoev, A. Successful non-surgical embryo transfer in buffalo (bubalus bubalis) in Bulgaria. Theriogenology, 30: 659-668, (1988).
5. Drost, M. and Elsdon, R.P. Blastocyst development in the water buffalo (bubalus bubalis). Theriogenology. 23: 191, (1985).
6. Drost, M., Wright, J. M., Cripe, W.S., and Richter, A.R., Embryo transfer in water buffalo (bubalus bubalis). Theriogenology, 20: 579-584, (1984).
7. Gibson, J.P. and Smith, Ch., The incorporation of biotechnology in to animal breeding strategies, In: Animal Biotechnology. Edited by Babiuk, L.A. and Phillips, J.P. Pergamon Press: 204-231, (1989).
8. Hasler, J.F. Reproductive technology and genetic improvement. J., Dairy Sci., 75: 2856-2879, (1992).
9. Jindal, R., Gill, S.P.S. and Rattan, P.J.S. Influence of oestrus synchronization on the hormonal and biochemical status of blood in buffaloes. Proc. II World Buffalo Congress, New Dehli, India: 121-129, (1988).
10. Karaivanov, Ch. Comparative studies on the superovulatory effect of PMSG and FSH in water buffalo (bubalus bubalis). Theriogenology, 26: 51-59, (1986).
11. Karaivanov Ch., Kacheva, D., Petrov, M., Vlahov, K. and Sapandjiev E, Superovulatory response of river buffalo (bubalus bubalis). Theriogenology, 33: 453-464, (1990)
12. Karaivanov, Ch., Vlahov, K., Petrov, M., Kacheva, D., Stojanova, M., Alexiev A., Polihronov O. and Danev, A. Studies on preimplantation development of buffalo embryos. Theriogenology, 28: 747-753, (1987).
13. Kurup, M.P.G. Present status of embryo transfer in buffaloes and future expectations. Proc. II World Buffalo Congress, New Dehli, India: 587-590, (1988).



- 14 . Linder, G.M. and Wright R.W. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20: 407-416, (1983).
15. Lohuis, M.M. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology* 43: 51-60, (1995).
- 16 . Madan, M.L., Singla, S.K., Singh, C., Prakash B.S. and Jailhoni, S. Embryo transfer technology in buffaloes: Endocrine responses and limitation. *Proc. II World Buffalo Congress, New Delhi, India: 195-211, (1988).*
- 17 . Misra A.K., Superovulation and embryo transfer in buffalo. *Buff. J.*, 1:1-11,(1993).
- 18 . Misra, A.K., Joshi, B.V., Kasiraj K., Sivaiah, S. and Rangareddi N.S., Improved superovulatory regimen for buffalo (*bubalus bubalis*) *Theriogenology*, 35: 245, (1991).
- 19 . Misra, A.K., Yadav, M.C. and Motwani, M.T. Successful embryo transfer in a buffalo. *Proc. II World Buffalo Congress, New Delhi, India: 56, (1988).*
- 20 . Nanda, S.K. and Bhat P.N. Multiple ovulation and endocrinology profile in buffaloes. *Proc. II World Buffalo Congress, New Delhi, India: 59, (1988).*
- 21 . Rahil, T., Chaudhry, R.A., Khan, I.H. and Ahmad W. Superovulation in Nili- Ravi buffaloes using FSH-p at two different stages of oestrous cycle. *Proc. II World Buffalo Congress, New Delhi, India: 115-118, (1988).*
- 22 . Sarvaiya, N.P., Chauhan F.S. and Mehta V.M. Induction of oestrus in normal cyclic surti buffaloes, during superovulation and after embryo recovery. *Indian J. Anim. sci.*, 63: 1240-1243, (1993).
- 23 . Schallenberger E., Wagner, H.G., Papa, R., Hartl, P. and Tenhumberg, H., Endocrine evaluation of superovulation in water buffaloes. *Theriogenology*, 33: 320, (1990).
- 24 . Seidal, G.E., Seidal, J.R., and Totey, S.M., Analysis application of embryo transfer in developing countries. *Theriogenology*, 31: 3-16, (1989).
- 25 . Singla, S.K. and Madan, M.L. Single ovulation and embryo transfer in non-superovulated buffaloes. *Theriogenology*. 33: 329, (1990).
- 26 . Singla, S.K., Madan, M.L., Manik, R.S, Ambrose, J.D. and Chauhan, M.S., Fertilization and early embryo development Pattern in superovulated buffaloes. *Proc. 12th Int. cong. ani. Reprod., Hauge, Netherlands: 817-819, (1992).*
- 27 . Smith, Ch. Applications of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology*, 29: 203-212, (1988).
- 28 . Taneja, M., Ali, A. and Singh, G. Ovarian follicular dynamics in water buffalo. *Theriogenology*, 46: 121-130, (1996).

- 29 . Taneja, M., Totey, S.M., Pawshe, C.H., Ali, A. and Singh, G., Effect of GnRH incorporation into superovulation regimen for buffalo (*bubalus bubalis*). *Proc. 12th int. cong. Ani. Reprod., Hauge, Netherlands: 278-280. (1992).*

Effect of three different doses of FSH (Folltropin-V) on superovulation rate in river buffaloes (*Bubalus bubalis*)

Farokhi Ardebili, F.¹, Batavani, R.¹, Havareshti, P.², Mirtorabi, S.M.³

¹Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia - Iran. ² Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran. ³Iranian Herd Improvement Center, Karaj - Iran.

This study was conducted to evaluate the effect of three different doses of FSH (Folltropin-V, Vetrepfarm Co., Canada) on superovulatory responses in river buffaloes. Eighteen buffaloes were selected after rectal examination of reproductive tract and randomly allocated into three groups of six. All the buffaloes received two injections of prostaglandin F2 α (25 mg Lutalyse, Upjhon Co.) 12 days apart. Superovulation in all groups initiated between days 9 to 12 the estrus cycle. Buffaloes in group 1, 2 and 3 superovulated with total doses of 300 mg, 400 mg and 500 mg NIH of Folltropin respectively at 12 hours interval in 8 equal doses. All superovulated buffaloes were inseminated 3 times at the beginning of observed estrus. Embryos were collected non-surgically 6 days after the first insemination. Before embryo recovery, the number of corpora lutea (CLs) and unovulated follicles (UFs) were estimated by rectal palpation of the ovaries. The average number of CLs plus UFs was the highest in group 3 (5.83 ± 0.65). However the highest ovulation rate (number of CLs) was observed in group 2 (4.5 ± 0.81). Maximum embryo plus unfertilized ova (UO) was recovered from group 2 (3 ± 1.52) and lowest from group 3 (1 ± 0.71). From the total number of 27 embryos and UOs recovered from the donors, 10 ova were unfertilized, 13 embryos were in morula stage, 1 embryo in early blastocyst stage and 2 embryos in blastocyst stage. On the basis of our results, the best superovulatory responses were observed in group 2 (400 mg). However, the differences were not statistically significant.

Key words: FSH, Superovulation. River buffaloes, Embryo Transfer.

