# کاربرد منوتروپین انسانی در تحریک رشد فولیکول‌های تخمدانی مرغابی سانان در فصل غیر تولیدمثلی

پریس کی‌نژاد .M.Sc[۱،۲*]، کاظم پریور .Ph.D[۱]، مهناز آذرنیا .Ph.D[۱]

۱. دانشگاه تربیت معلم، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران
۲. انجمن جبهه طبیعت، سایت تحقیقات پرندگان، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۹۱۱-۱۵۷۱۹، دانشگاه تربیت معلم، گروه زیست‌شناسی
پست الکترونیک: Email: paris13us@yahoo.com

دریافت مقاله: ۸۷/۳/۱۷، پذیرش مقاله: ۸۷/۱۱/۱

## چکیده

* **هدف:** بررسی اثر داروی منوتروپین انسانی در تحریک رشد فولیکول‌های تخمدانی مرغابی‌سانان در فصل غیر تولیدمثل
* **مواد و روش‌ها:** مدل آزمایشی طرح، مرغابی سرسبز ماده بالغ بود که در خارج از فصل تولیدمثل (نیمه تیرماه تا نیمه مرداد ماه) مقدار ۷۵ واحد داروی Human Menopausal Gonadotropin (hMG) به مدت ۱۰ روز به صورت عضلانی تزریق شد سپس بافت تخمدان گروه‌های شاهد و تجربی مورد بررسی‌های ماکروسکوپی و هیستولوژیک قرار گرفت.
* **یافته‌ها:** نتایج، حاکی از اثر مثبت دارو بر بیشتر پارامترهای مورد بررسی است. در گروه تجربی اندازه تخمدان، تعداد تخمک‌های درحال تمایز (مراحل زردەسازی و پس زردەسازی) و قطر لایه تکا در تخمک‌های زردەساز به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود. تفاوت سایر پارامترها (تعداد تخمک‌های تمایز نیافته و مرحله پیش زردەسازی، قطر هسته در تخمک‌های مراحل مختلف و قطر مویرگ‌ها در بافت تخمدان) بین دو گروه از نظر آماری معنی‌دار نبود.
* **نتیجه‌گیری:** داروی hMG اثر مثبت و معنی‌داری بر رشد فولیکول‌های تخمدانی نمونه مورد آزمایش داشته است و استفاده از این دارو گام موثری در جهت ورود مرغابی سر سبز به فاز تخم‌گذاری محسوب می‌شود که به دنبال آن می‌توان با تلقیح مصنوعی به تکثیر گونه مورد نظر نیز کمک کرد.

* **کلیدواژگان:** مرغابی‌سانان، منوتروپین، روش‌های کمک باروری، تحریک تخمک‌گذاری

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۸، صفحات: ۲۱۱-۲۰۴

## مقدمه

دست بردن انسان در محیط طبیعی زندگی جانوران وحشی و روند روز افزون شکار و اسارت آنان، بسیاری از گونه‌های جانوری را با خطر انقراض مواجه ساخته است و علی‌رغم تلاش روزافزون محافظت کنندگان محیط زیست، هنوز نمونه‌های بسیاری از پرندگان وحشی و پستانداران کمیاب هستند که نسل آنها در روی کره زمین رو به نابودی است.

از طرفی نگهداری حیوانات کمیاب در شرایط اسارت به علت ایجاد اختلال در شرایط طبیعی زندگی آنان، از عوامل اصلی خودداری از زادآوری محسوب می‌گردد که یکی از پیامدهای آن توقف چرخه تولید مثلی است. به تجربه دیده شده که جفت‌های بالغ حتی پس از چندین سال نگهداری در شرایط اسارت، از زادآوری خودداری می‌کنند (اطلاعات منتشر نشده در انجمن جبهه طبیعت).

توقف چرخه تولید مثل در پرندگان کمیاب عاملی تشدید کننده در جهت کاهش تعداد آنها محسوب می‌شود؛ این امر در دراز مدت زمینه را برای ورود آنها به فاز انقراض فراهم می‌کند. این موضوع به خصوص در مورد پرندگان وحشی و پرندگان آبی مهاجر که طی سال‌های اخیر به دلیل شیوع آنفلوانزای طیور هم در معرض کشتار وسیع قرار گرفته‌اند، با شدت بیشتری مصداق پیدا می‌کند (۱).

بر اساس یافته‌های قبلی، تجویز گنادوتروپین‌ها در پستانداران چهارپا (مانند: گاو، گوسفند، بز و حتی سگ و گربه) نتایج چشم‌گیری در تحریک تخمک‌گذاری و سوپر اوولاسیون این حیوانات داشته است به طوری که با استفاده ازروش تلقیح مصنوعی (Artificial Insemination; AI) امکان بارداری و تولد زاده‌های طبیعی نیز وجود دارد. امروزه این روش به صورت کاملا رایج جهت تکثیر و تولید مثل چهارپایان مورد استفاده دامپزشکان و محققان قرار می‌گیرد (۲).

با در نظر گرفتن نتایج مثبت حاصل از انجام روش‌های تحریک تخمک‌گذاری و تلقیح مصنوعی در مدل‌های حیوانی ذکر شده، این سوالات به ذهن می‌رسد:

۱. آیا این روش‌ها در مورد پرندگان به خصوص گونه‌های کمیاب و پرندگان آبزی مهاجر هم کاربرد دارد؟

۲. در صورت مثبت بودن پاسخ سئوال بالا، نتایج هورمون درمانی در خارج از فصل تولیدمثل چگونه است؟

۳. با توجه به وابستگی سیستم تولیدمثل پرندگان به طول مدت روشنایی و چرخه‌ای (Cyclic) و نبودن عملکرد گنادها، آیا با استفاده از روش‌های تحریک کنترل شده تخمک‌گذاری (Controlled Ovarian Hyperstimulation; COH) می‌توان پرنده ماده را به تخم‌گذاری وادار کرد؟

مطالعات قبلی گریلینگ و همکاران در دانشگاه Massey نیوزیلند که برروی بلدرچین ژاپنی (*Coturnix Coturnix*



Archive of SID

www.SID.ir

*Japonica*) انجام شده حاکی از اثر مثبت گنادوتروپین جفتی اسب (Pregnant Mare Serum Gonadotropin; PMSG) بر بلوغ و رشد تخم در گونه مورد اشاره است (۳). از طرفی بر اساس یافته‌های نعمت‌الله در گله‌های مرغ تخم‌گذار، تجویز هورمون فوق افزایش میزان تخم‌گذاری را نشان داده است (۴).

سایر نتایج تحقیقات حاکی از آن است که به کارگیری ۱۰۰ میکروگرم LH گاوی، یا ۱ تا ۲ میکروگرم LH ماکیان و یا ۱۲/۵ تا ۲۵ واحد بین‌المللی (IU) از هورمون (Adreno-Croticotropic Hormone; ACTH) با منشا خوکی اثر بسیار خوبی بر تخمک‌گذاری (تولید تخم) در طیور دارد (۲). ولی هنوز مطالعه‌ای در زمینه تاثیر منوتروپین‌های انسانی بر روند تولید تخمک پرندگان انجام نشده است. لذا در این تحقیق با به کار بردن روش‌های تحریک تخمک‌گذاری مربوط به انسان برای پرندگان و با استفاده از هورمون منوتروپین انسانی، تاثیر آن را را بر رویه تولید تخمک مورد بررسی قرار دادیم.

## مواد و روش‌ها

### مدل آزمایشی

مدل حیوانی مورد استفاده در این آزمایش مرغابی سرسبز (Mallard) با نام علمی *Anas platyrhynchos* بود (n=۳ برای هر یک از دو گروه شاهد و تجربی). منشا اصلی این پرندگان، مناطق سردسیر از جمله سیبری و نواحی سردکره زمین بوده و زیستگاه آنها دریاچه‌ها، برکه‌ها و تالاب‌ها است که در زمستان در سواحل دریاها و خورها دیده می‌شوند. جهت انجام آزمایش از پرنده‌های بالغ استفاده شد و تزریقات در فارم نگهداری پرندگان آبزی در کرج و بین نیمه تیرماه تا نیمه مرداد ماه به انجام رسید. طرح مذکور مورد تصویب کمیته اخلاق در انجمن جبهه طبیعت می‌باشد.

### فاکتورهای محیطی

عملکرد غدد تولید مثلی در پرندگان با واسطه فتورسپتورهای موجود در هیپوتالاموس و وابسته به طول مدت روشنایی/تاریکی است و دما نیز عامل مهمی در فرایند فعال‌سازی گنادها محسوب می‌شود (۲، ۵). به همین دلیل در تنظیم طرح آزمایشی به گونه‌ای عمل شد که عوامل محیطی از جمله درجه حرارت و طول مدت روشنایی/تاریکی به عنوان عوامل مداخله‌گر از طرح آزمایش حذف گردد. به عبارت دیگر، با توجه به اینکه تولیدمثل پرندگان (خصوصا مرغابی‌سانان) در فصل بهار انجام می‌شود و گرمای شدید تابستان اثر مهارکنندگی بر روند تولید تخمک دارد، زمان‌بندی آزمایش‌ها به گونه‌ای تنظیم شد تا تزریقات هورمونی در خارج از فصل تولیدمثل انجام گیرد (یعنی بین نیمه تیر و نیمه مرداد ماه که گرم‌ترین زمان در فصل تابستان است). این کار به منظور حذف اثرات مداخله‌گر فصل بهار، به عنوان یک عامل تشدیدکننده ترشحات هورمونی و فاکتور مثبت در رشد تخمک‌ها و پدیده تولیدمثل انجام شد تا بتوان نتایج مشاهده شده را تنها به داروهای مورداستفاده نسبت داد و شائبه تاثیر عوامل فصلی بر کسب نتایج مثبت از بین برود. لازم به ذکر است که میزان دما در دوره آزمایش بین ۳۵ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد و طول مدت روشنایی به تاریکی در دوره آزمایش ۱۴ به ۱۰ (ساعت) بوده است.

### تغییر برنامه غذایی

جیره غذایی پرندگان از حدود یک ماه قبل از شروع درمان هورمونی با گنجاندن مکمل‌های غذایی حاوی کلسیم، فسفر، ویتامین‌های A-D3-E و پروتئین از منابع حیوانی (ماهی یا تخم مرغ) تغییرداده شد، به طوری که جیره غذایی روزانه هر پرنده شامل ۵۰ درصد جوانه گندم تازه و ۵۰ درصد از پلت‌های مختص گله پیش تولید می‌شد که مکمل‌های لازم برای تخم‌گذاری هم در ترکیب آن گنجانده شده بود (۶).

### درمان هورمونی

روزانه یک ویال هُمِگون (داروپخش) حاوی ۷۵ واحد بین‌المللی hMG (به تعداد ۱۰ تزریق) در عضله سینه پرنده ماده تزریق می‌شد. انتخاب دوز دارو بر اساس آزمایشات قبلی بر گونه‌های مختلف مرغابی سانان انجام گرفت (نتایج منتشر نشده تحقیق در انجمن جبهه طبیعت).

### نمونه‌برداری بافتی

به منظور نمونه‌برداری از بافت تخمدان، ابتدا با تزریق حدود ۱ میلی‌لیتر کتامین ۱۰ درصد پرنده‌ها بی‌حال شده سپس با تزریق وریدی حدود ۰/۷۵ میلی‌لیتر تیوپنتال از بین برده شدند. پس از ضدعفونی ناحیه شکم با بتادین و برداشت پرها، ناحیه شکم باز شده و پس از کنار زدن امعا و احشا، گنادها در ناحیه تاجی شکمی غدد فوق کلیه پدیدار شدند (شکل ۱).

**شکل ۱: نمای داخل شکمی پرنده**

گناد با قطع بافت پیوندی و لیگامان‌های نازک آن خارج شده و پس از شست‌وشو با محلول سالین نرمال و جدا کردن ضمایم آن (از جمله عروق) به قطعات کوچک‌تر برش خورده تا به محلول تثبیت کننده مناسب منتقل شود.

### آماده‌سازی بافت جهت مطالعات بافت‌شناسی

پس از برداشت بافت از فضای داخل شکم و جداسازی ضمائم آن (از جمله عروق و مجاری) با سرم فیزیولوژی، دو تا سه بار شست‌وشو به منظور حذف خون موجود بر روی بافت انجام شده و قطعات ۲ در ۴ میلی‌متری از بافت به محلول تثبیت کننده بوئن منتقل شد. آماده‌سازی نمونه‌ها با تهیه بلوک‌های پارافینی و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلن-ائوزین انجام شد (۷).

### بررسی نمونه‌ها

بررسی هیستولوژیک نمونه‌ها باروش میکروسکوپ نوری و استفاده از میکروسکوپ Zeiss انجام شد.

### روش انتخاب نمونه و شمارش سلولی در میکروسکوپی نوری

ثبت مشاهدات و شمارش‌های لازم بر اساس انتخاب ۳ لام به طور تصادفی (در مورد هر نمونه) و بررسی ۲۰ برش تصادفی در هر یک انجام گرفت. در مواردی نظیر شمارش تعداد تخمک‌های تمایز نیافته نیز در هر برش ۵ فیلد به صورت تصادفی مورد بررسی قرار گرفت.



Archive of SID

www.SID.ir

### آنالیز آماری و ارزیابی نتایج

مقایسه نتایج و بررسی مشاهدات با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۲ و از طریق آزمون T جفت شده مستقل (برای مقایسه متغیرها بین دو گروه) به انجام رسید. سپس نتایج آنالیزها در محیط Excel به نمودارهای میله‌ای تبدیل گردید. سطح معنی‌دار بودن داده‌ها $p<0/05$ و اطلاعات به صورت Mean ± SD ارایه شد.

## یافته‌ها

### مقایسه ماکروسکوپی اندازه و شکل تخمدان در گروه شاهد و تجربی

مقایسه ماکروسکوپی اندازه تخمدان در پرنده‌های ماده شاهد و تجربی به طور واضح نشانگر اثر مثبت هورمون مورد استفاده در تحریک تخمک‌گذاری و القای سوپر اوولاسیون تخمدانی می‌باشد (شکل ۲).

### شمارش تعداد تخمک‌ها

شمارش تخمک‌های مراحل مختلف در ماده‌های شاهد و تجربی انجام و نتایج از طریق آزمون T جفت شده مستقل مورد آنالیز آماری قرار گرفت که نتایج به شرح زیر است:

### تعداد تخمک های تمایز نیافته (Undifferentiated Oocytes)

میانگین تعداد تخمک‌های تمایز نیافته (بر اساس شمارش در ۵ فیلد) به ترتیب ۶/۱ ± ۱۹ در ماده‌های شاهد و ۴/۲۱ ± ۱۰/۳ در گروه تجربی بود. آزمون آماری تفاوت این دو مقدار معنی‌دار نمی‌باشد ($p>0/05$).

### تعداد تخمک‌های مرحله پیش‌زرده‌سازی (Pre-vitellogenic Oocytes)

مقادیر میانگین تعداد تخمک‌های مرحله پیش‌زرده سازی (شکل ۳) در تخمدان ماده‌های شاهد و تجربی به ترتیب ۱/۲ ± ۱۱/۴ و ۲/۲۴ ± ۱۶ بود که اختلاف بین آنها معنی‌دار نمی‌باشد ($p>0/05$).

### تعداد تخمک‌های مرحله زرده‌سازی (Pre-vitellogenic Oocytes)

تعیین مقدار میانگین تخمک‌های مرحله زرده‌سازی (شکل ۳) در ماده‌های گروه شاهد و تجربی به ترتیب ۰/۱۱ ± ۹ و ۱/۸۱ ± ۲۷/۵ بود. آنالیز آماری این تفاوت را معنی‌دار نشان داد ($p<0/01$).

### تعداد تخمک‌های مرحله پس زرده‌سازی (Post- vitellogenic Oocytes)

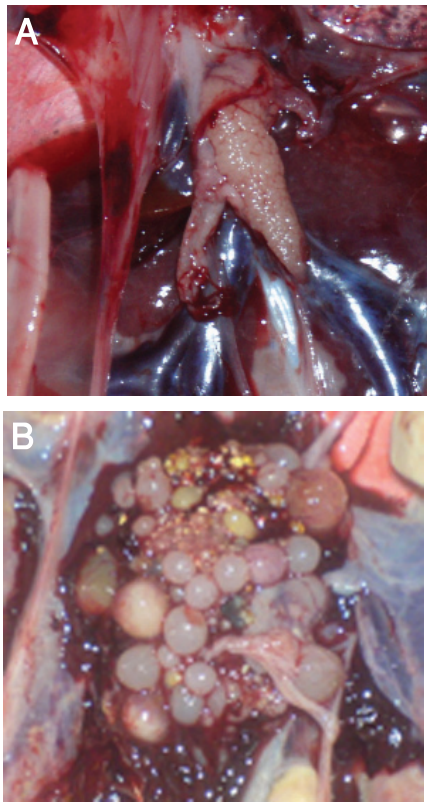
میانگین تعداد تخمک‌های مرحله پس زرده‌سازی (شکل ۴) در ماده‌های گروه شاهد و تجربی به ترتیب ۰/۱۱ ± ۴ و ۱/۶۷ ± ۱۰/۱۴ بود که تفاوت این دو مقدار معنی‌دار می باشد ($p<0/01$).

### تعداد تخمک‌های آزاد شده (Brooding Stage)

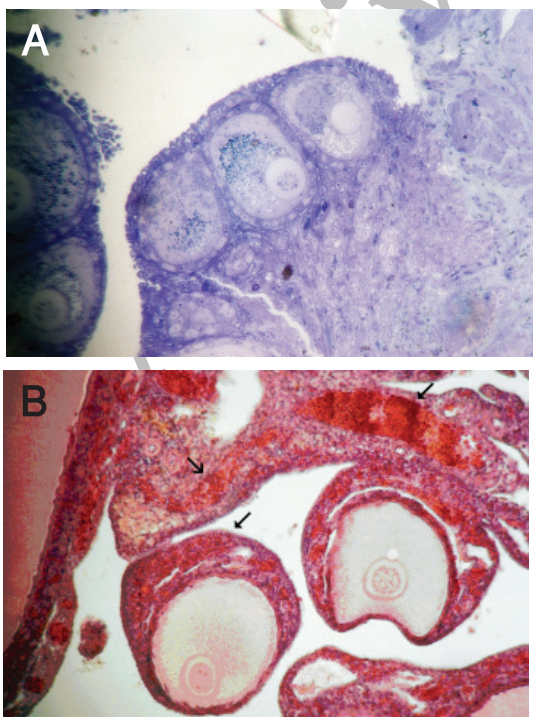
در هیچ یک از دو گروه مورد بررسی فولیکول آزاد شده دیده نشد.

### بررسی قطر لایه تکا (Theca layer) (داخلی و خارجی)

قطر لایه تکا در تخمک‌های مرحله زرده‌سازی و پس زرده‌سازی (شکل ۵ و ۶) هر دو گروه شاهد و تجربی اندازه‌گیری شد. مقایسه از طریق آزمون T جفت شده برای همه موارد انجام گرفت که نتایج به شرح زیر است:




**شکل ۲: تصویر تخمدان شاهد (A) و تجربی (B). به طوری که در تصویر مشاهده می‌شود اندازه تخمدان در نمونه تجربی (با ابعاد ۳۸۰×۵۲۰ میلی‌متر) به شکل قابل توجهی بزرگ‌تر از اندازه تخمدان در نمونه شاهد (با ابعاد ۲۰۰×۵ میلی‌متر) می‌باشد.**

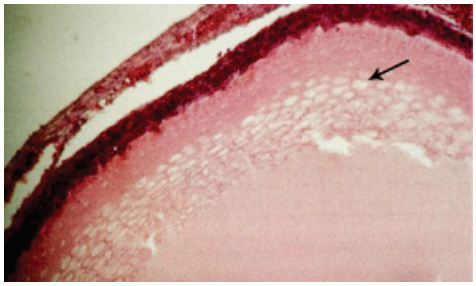



**شکل ۳: فولیکول‌های پیش زرده‌ساز و زرده‌ساز در ماده‌های شاهد (A) و تجربی (B)، ۲۰۰× ← آرتریول‌های مملو از گلبول‌های قرمز.**

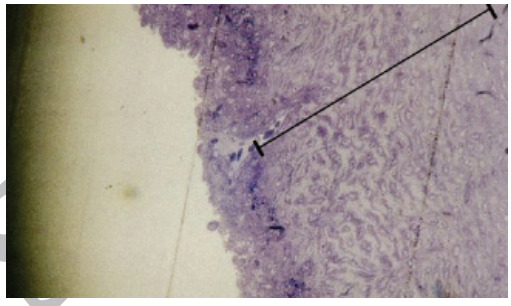
Archive of SID



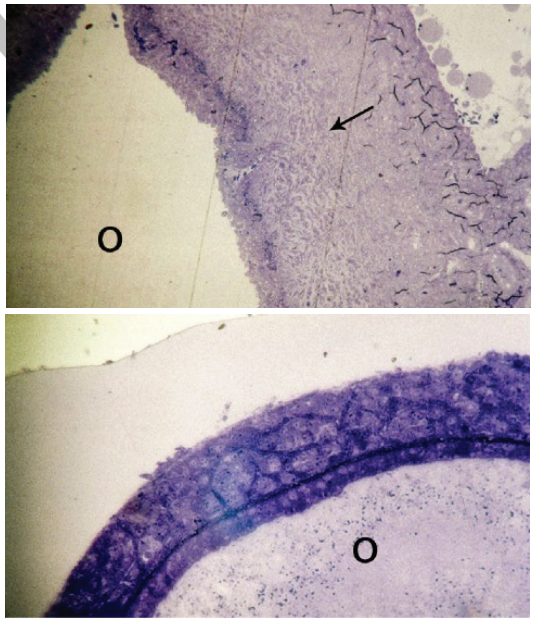
www.SID.ir



شکل ۴: اووسیت پست ویتلوژنیک در ماده تجربی، ۲۰۰ × پیکان: پلاکت‌های زرده‌ای.



شکل ۵: جدار یک فولیکول ۵ میلی‌متری پست ویتلوژنیک در ماده تجربی، ۴۰۰ × پیکان: لایه تکا.




شکل ۶: لایه‌های جدار اووسیت ویتلوژنیک اولیه و پیشرفته در ماده شاهد (A) ۴۰۰ × و ماده تجربی (B) ۲۰۰ × ، O : ائوپلاسم، خط کشیده: عرض لایه تکا.

### قطر تکا در تخمک‌های مرحله زرده‌سازی

میانگین قطر تکا داخلی در تخمک‌های مرحله زرده‌سازی گروه شاهد و تجربی به ترتیب ۳/۶۷ ± ۱۹/۶۷ و ۴/۷۶ ± ۱۷ میکرون بوده که تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد (p>۰/۰۵).

میانگین قطر تکا خارجی در تخمک‌های زرده‌ساز ماده‌های شاهد و تجربی به ترتیب ۶/۹۵ ± ۲۱/۲۸ و ۲/۱۲ ± ۱۵/۱میکرون می‌باشد که تفاوت بین آنها معنی‌دار نمی‌باشد (p>۰/۰۵).

### قطر تکا در تخمک‌های مرحله پس زرده‌سازی

میانگین قطر تکا داخلی در تخمک‌های مرحله پس زرده‌سازی گروه شاهد و تجربی به ترتیب ۲/۸۲ ± ۱۰/۴۲ و ۸/۵۳ ± ۱۸/۷۷ میکرون بوده که تفاوت از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۱).

میانگین قطر تکا خارجی در تخمک‌های مرحله پس زرده‌سازی ماده‌های شاهد و تجربی به ترتیب ۰/۰۸ ± ۸ و ۱۳/۲۴ ± ۱۰۰/۳۷ میکرون می‌باشد که تفاوت بین آنها معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۱).

### مقایسه قطر هسته در تخمک‌های هر مرحله

در امتداد سنجش‌ها، قطر هسته در تخمک‌های تمایز نیافته، مراحل پیش زرده‌سازی، زرده‌سازی و پس زرده‌سازی در ماده‌های تجربی و شاهد اندازه گیری و مقایسه شد که مقادیر به ترتیب زیر بودند (بر حسب میکرون): تخمک‌های تمایز نیافته (۱/۴۰ ± ۵/۸۳ در مقابل ۱/۷۸ ± ۵/۶)، مرحله پیش زرده‌سازی (۴/۸۴ ± ۱۰/۷۳در مقابل ۷/۹۰ ± ۱۰/۶۷)، مرحله زرده‌سازی (۵/۸۸ ± ۲۸/۵۵ در مقابل ۳/۱۷ ± ۲۵/۴۴) و مرحله پس زرده‌سازی (۳۶/۸۰ ± ۷۹/۰۰ در مقابل ۳۸/۴۴ ± ۸۱/۶۷)

در ضمن مقایسه بین قطر هسته تخمک مراحل مختلف در گروه‌های شاهد و تجربی، تفاوت آماری معنی‌داری را نشان نداد (p>۰/۰۵).

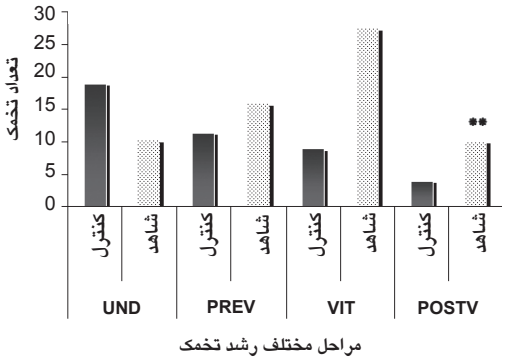
### بررسی قطر مویرگ

بررسی قطر مویرگ‌های موجود در برش‌های تهیه شده از بافت تخمدان ماده‌های شاهد و تجربی نیز انجام شد که میانگین آنها به ترتیب ۳/۵۰ ± ۱۲/۰۰ و ۱۹/۸۹ ± ۲۶/۱۸ میکرون بود. بررسی آماری تفاوت معنی‌داری را بین قطر مویرگ‌ها در گروه شاهد و تجربی نشان نداد (p>۰/۰۵).

### جمع بندی نتایج از نظر تعداد تخمک‌ها در مراحل مختلف

مقایسه ماکروسکوپی اندازه تخمدان در ماده شاهد و تجربی به وضوح نشانگر اثر مثبت هورمون مورد استفاده در تحریک تخمک گذاری و القا سوپر اوولاسیون تخمدانی می‌باشد.

بین ماده‌های شاهد و تجربی از نظر تعداد تخمک‌های تمایز نیافته و مرحله پیش زرده‌سازی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت اما تعداد تخمک‌های مراحل زرده‌سازی و پس زرده‌سازی در گروه تجربی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود (نمودار ۱).




**نمودار ۱: مقایسه تعداد تخمک‌های مراحل مختلف در ماده‌های گروه شاهد و تجربی (درمان شده با hMG).**

**UND: Undifferentiated Oocytes, PREV: Pre-vitellogenic Oocytes, VIT: Vitellogenic Oocytes, POSTV: Post-vitellogenic Oocytes.**

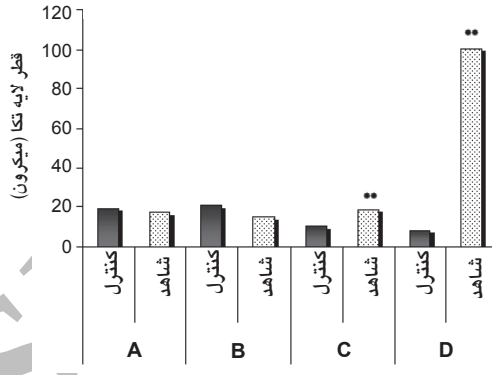
**** Statisticaly Significant (p<0.01)**



www.SID.ir

### مقایسه قطر تکا داخلی و خارجی

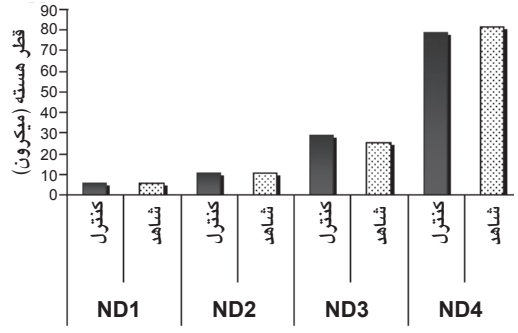
مقایسه قطر تکا داخلی و خارجی در تخمک‌های زرده‌ساز ماده‌های گروه شاهد و تجربی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد اما قطر تکا داخلی و خارجی در تخمک‌های مرحله پس زرده‌سازی ماده‌های گروه تجربی به صورت معنی‌داری بیشتر از ماده‌های گروه شاهد بود (نمودار ۲).




**نمودار ۲: قطر لایه تکا در تخمک‌های مرحله زرده‌سازی و پس زرده‌سازی ماده‌های شاهد و تجربی (درمان شده با hMG).**
**A: قطر تکا داخلی در تخمک‌های زرده‌ساز، B: قطر تک خارجی در تخمک‌های زرده‌ساز، C: قطر تکا داخلی در مرحله پس زرده‌سازی، D: قطر تکا خارجی در مرحله پس زرده‌سازی**
**Statisticaly Significant (p<0.01 **)**

### مقایسه قطر هسته تخمک‌های مراحل مختلف

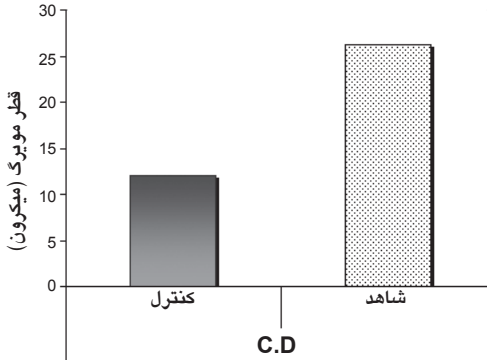
در راستای سنجش‌ها، قطر هسته در تخمک‌های تمایزنیافته، مراحل پیش زرده‌سازی، زرده‌سازی و پس زرده‌سازی در ماده‌های شاهد و تجربی اندازه‌گیری و مقایسه شد. مقایسه بین قطر هسته تخمک مراحل مختلف درگروه‌های شاهد و تجربی، تفاوت معنی‌داری را بین هیچ یک از موارد مورد مقایسه نشان نداد (نمودار ۳).




**نمودار ۳: مقایسه قطر هسته در اووسیت‌های مراحل مختلف در ماده‌های شاهد و تجربی درمان شده با hMG. ND1: اووسیت‌های تمایز نیافته، ND2: اووسیت‌های مرحله پیش زرده‌سازی، ND3: اووسیت‌های مرحله زرده‌سازی، ND4: اووسیت‌های پس زرده‌سازی**

### مقایسه قطر مویرگ‌ها در بافت تخمدان

بررسی قطر مویرگ‌های موجود در برش‌های تهیه شده از بافت تخمدان ماده‌های شاهد و تجربی نیز انجام شد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را بین قطر مویرگ‌های بافت تخمدان در ماده‌های شاهد و تجربی نشان نداد (نمودار ۴).




**نمودار ۴: نتایج مقایسه قطر مویرگ‌ها در بافت تخمدان ماده‌های شاهد و تجربی درمان شده با hMG**
**CD: Capillary Diameter**

## بحث

بررسی نتایج نشان می‌دهد که هورمون مورد استفاده برای تحریک تخمک‌گذاری (hMG) به صورت معنی‌داری باعث افزایش تعداد تخمک‌های در حال رشد به خصوص مراحل زرده‌سازی و پس زرده‌سازی در تخمدان ماده‌های گروه تجربی می‌شود. قطور بودن بارز لایه تکا در تخمک‌های گروه تجربی به وضوح نشانگر اثر تحریک کننده هورمون مورد استفاده بر لایه‌های فوق است که رابطه‌ای مستقیم با رشد تخمک‌ها و ورود آنها به فازهای پیشرفته رشد نیز دارد.

چنانچه دیده می‌شود این هورمون در قطر هسته تخمک‌های دو گروه و قطر مویرگ‌های موجود در بافت تخمدان بی‌اثر بوده اما بررسی‌های میکروسکوپ نوری به وضوح تعداد آرتریول‌های مملو از اریتروسیت‌ها را در بافت تخمدان ماده‌های تجربی نشان می‌داد که حتی بدون شمارش و در یک نگاه نیز قابل تشخیص بود (شکل۳، علامت پیکان). البته به این موضوع در مقاله گوارایا هم اشاره شده که چنین نمایی مختص تخمک‌های مرحله پس زرده‌سازی است که بر خلاف ماده‌های تجربی، تعداد آنها در ماده‌های گروه شاهد بسیار کم بوده است (۸).

با اینکه مرغابی‌سانان وحشی میزان کمی از باروری و تولیدمثل را در شرایط اسارت ازخود نشان می‌دهند، اما تحقیق حاضر نشان داد استفاده از پروتکل‌های تحریک تخمک‌گذاری در انسان بر روی پرندگان هم کاربرد دارد. از طرفی، تاکنون مطالعات محدود و اندکی بر روی اثر گنادوتروپین‌ها بر روی پرندگان ماده انجام شده است (۳، ۴).

یکی از این تحقیقات توسط نعمت‌الله و همکارانش در سال ۲۰۰۳ بر روی ماکیان انجام شده که نتایج به دست آمده حاکی از اثر مثبت گنادوتروپین جفتی اسب (PMSG) بر روند تخم‌گذاری ماکیان بود (۴). تفاوت آن تحقیق با مطالعه حاضر در این است که در طرح آزمایشی انجام شده توسط نعمت‌الله تجویز PMSG بر گله‌های مرغ بالغ و در حال تخم‌گذاری صورت گرفت. از آنجا که طیور تخم‌گذار صنعتی در محیط‌های مصنوعی و خاص نگهداری می‌شوند. برای به حداکثر رساندن میزان تولید تخم در دوره‌های تخم‌گذاری از نوردهی مصنوعی نیز استفاده می‌شود، به طور دقیق نمی‌توان اثر دوره‌های شب و روز مصنوعی (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) را از تاثیر هورمون‌های تجویز شده تفکیک کرد، زیرا دوره‌های نوردهی طولانی



Archive of SID
www.SID.ir

مدت به عنوان یک عامل مداخله‌گر (با اثر مثبت بر تخم‌گذاری)، در طرح آزمایشی نعمت‌الله و همکارانش محسوب می‌شوند. این در حالی است که تحقیق حاضر بین اواسط تیر تا اواسط مردادماه به انجام رسیده است. این زمان خارج از فصل تولیدمثل محسوب می‌شود چون مصادف با اوج گرماست و گرما اثر مهارکنندگی بر ترشح GnRH از غده هیپوتالاموس پرندگان دارد (۲، ۹). به علاوه طول دوره روشنایی به تاریکی در این محدوده زمانی، ۱۴ به ۱۰ ساعت بوده که کمتر از زمان ایده‌آل برای القا رشد تخمک‌ها در تولیدمثل پرندگان است. برخلاف تحقیق انجام شده توسط نعمت‌الله و همکارانش، دما و فصل انجام آزمایش به عنوان فاکتور مداخله‌گر از این طرح آزمایشی حذف شده و نتایج مثبت مشاهده را می‌توان به اثر هورمون مورد استفاده در گروه تجربی نسبت داد.

از نظر شباهت نتایج مشاهده شده، می‌توان گفت که در هر دو مورد (تحقیق نعمت‌الله و مطالعه حاضر) گنادوتروپین‌ها اثر مثبت و تحریک‌کننده بر میزان تولید تخمک (یا فولیکول‌های تخمدانی تا مرحله پس زرده‌سازی) داشته‌اند.

نتایج تحقیق گریلینگ و همکارانش در سال ۲۰۰۲ درباره اثر گنادوتروپین‌های جفتی اسب بر بلوغ و تخم‌گذاری بلدرچین‌های ژاپنی (۳)، یکی از معدود مطالعات منتشر شده درباره اثر گنادوتروپین‌ها بر تولیدمثل پرندگان است. با اینکه در تحقیق گریلینگ استفاده از گنادوتروپین جفتی اسب بر بلدرچین‌های نابالغ موجب بلوغ و حتی تخم‌گذاری آنان گردید اما دوزهای ارایه شده بسیار پایین بوده است (۱۰ تا ۸۰واحد بین‌المللی گنادوتروپین جفتی اسب به ازای هر کیلوگرم وزن بدن پرنده). این موضوع ما را در تحقیق خود با مشکلات زیادی برای تعیین دوز مناسب در پرندگان ماده مواجه کرد. به طوری که در چند سری اول از آزمایشات به توصیه دکتر جی‌اف کاکرم، همکار طرح مذکور و مسئول بخش تولید مثل پرندگان در دانشگاه Massey نیوزیلند، ابتدا دوزهای ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ واحد بین‌المللی به ازا هر کیلوگرم وزن بدن پرنده‌ها را مورد آزمایش قرار دادیم که نتیجه بخش نبود. پس از آن بر دوز ۳۰۰ واحد بین‌المللی به ازا هر کیلوگرم وزن بدن پرنده متمرکز شدیم که البته این دوز نیز پاسخ مناسبی در پرنده‌های ماده نداشت (نتایج منتشر نشده تحقیق).

احتمال می‌رود که یکی از دلایل نتیجه بخش نبودن این دوزها پایین بودن درجه خلوص هورمونی باشد که در ایران ساخته می‌شود (تفاوت بسیار زیاد قیمت نوع خارجی و داخلی آن نیز این موضوع را به وضوح نشان می‌داد).

در ادامه کار به عنوان بخش دوم طرح، بر تزریق منوتروپین‌های انسانی (hMG) بر پرندگان ماده متمرکز شدیم که با وجود گران بودن قیمت، از درجه خلوص بالایی برخوردار است و بر اساس مشورت با چند فوق تخصص ناباروری و تولیدمثل متوجه شدیم که دوز آنها وابسته به وزن نیست.

لازم به ذکر است که به‌کارگیری این دارو برای تحریک تخمک‌گذاری در پرندگان برای اولین بار در دنیا صورت گرفته است و بر اساس آنچه در بخش نتایج ذکر شد به طرز موثری باعث بسیج (Recruitment) فولیکول‌های تخمدانی و پیشرفت آنها تا مرحله پس زرده‌سازی (Post-vitellogenic Stage) شد.

چنانچه در بخش نتایج نیز مشاهده می‌شود پس از انجام ۱۰ تزریق به ماده‌های تجربی، اندازه بزرگترین فولیکول مشاهده شده در تخمدان ۱۰ میلی‌متر بود که این اندازه در برابر بزرگترین فولیکول موجود در تخمدان ماده شاهد (۴۰۰ میکرومتر) به طور کامل دارای تفاوت معنی‌دار آماری است.

اما در پاسخ به این سئوال که چرا پرنده‌های مورد آزمایش به مرحله تخم گذاری نرسیدند ، دلیل آن را می توان به کوتاه بودن مدت زمان و تعداد تزریقها نسبت داد. در تحقیق انجام شده توسط پری و همکارانش بر روی فاز سوم رشد تخمک در پرندگان، مرحله نهایی زرده‌سازی و رشد سریع حدود یک هفته ذکر شده است (۱۰). در این مدت قطر فولیکول تخمدانی از ۸ به ۳۷ میلی‌متر و بعد به مرحله آزادسازی می‌رسد. البته این مدت زمان در گونه‌های مختلف پرندگان، به تناسب جثه پرنده و اندازه تخم آنها کمی متفاوت است، ولی از آنجا که اندازه تخم مرغابی سرسبز (گونه مورد آزمایش) با تخم مرغ تقریبا یکسان است می‌توان مدت مشابهی را نیز برای فاز سوم رشد تخمک در مرغابی سرسبز در نظر گرفت.

نتایج مشاهدات در این تحقیق نشان داد که بزرگترین فولیکول تخمدانی در گروه تجربی حدود ۱۰ میلی‌متر بود که این امر بیانگر ورود تخمک به سومین فاز رشد است (مشاهدات میکروسکوپی الکترونی نیز چنین موضوعی را تایید کرد- نتایج منتشر نشده تحقیق). بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که اگر تزریقات حدود یک هفته بیشتر ادامه می‌یافت در گروه تجربی تخم‌گذاری هم مشاهده می‌شد.

## نتیجه‌گیری

با استناد به نتایج این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که روش مورد استفاده در مطالعه حاضر قابل استفاده بر روی گونه‌های دیگری از پرندگان به خصوص انواع کمیاب و در خطر انقراض است و می‌تواند به عنوان راهی کمکی، برای تحریک تخمک‌گذاری و با استفاده هم‌زمان از روش تلقیح مصنوعی (AI) امکان زادآوری و تکثیر آنها را فراهم آورد.

## تقدیر و تشکر

در پایان از همکاری آقای دکتر رضا محبی مسئول بیمارستان حیوانات کوچک تهران و مساعدت‌های دکتر J.F. Cockrem مسئول بخش تولید مثل پرندگان در دانشگاه Massey انگلستان تشکر و قدردانی به عمل می‌آوریم. ضمنا هزینه‌های مالی طرح توسط انجمن جبهه طبیعت و دانشگاه تربیت معلم تهران پرداخت شده است. همچنین از آقای پیمان فتاحی مسئول راهبرد و سیاستگذاری انجمن جبهه طبیعت، طراح و برنامه‌ریز اولیه این طرح که در طول انجام پروژه مجری را از نظرات و راهبردهای علمی خود بهره‌مند نمودند، نهایت تشکر و قدردانی را به عمل می‌آوریم.

## References

1. Keynazhad P. Lethal Influenza. Tehran: Yahoo Press; 2006; 5-10
2. Itches RJ. Reproduction in Poultry. Kiaii M, Modirsaneii M (Trans). Tehran: University of Tehran Press; 2001; 170-185.
3. Girling JE, Benett EJ, Cockrem JF. Administration of Pregnant mare serum gonadotropin to Japanese quail



Archive of SID
www.SID.ir

(Coturnix coturnix Japonica): dose response over seven days and comparison of delivery by daily injection or osmotic pomp. NZ Vet. 2002; 50(3): 115-121.
4. Nematallah AGM. Effects of pregnant mare serum gonadotropin on egg production and so, e blood hormones of Fayoumi chickens. J Agr Sci. 2003; 28(5): 3445-3452.
5. Akins C, Burns M. Visual control of sexual behavior. In: R G Cook (Ed). Avian visual cognition. Kentucky: Comparative Cognition Behavior Press; 2001. Available from: www.pigeon.psy.tufts.edu/avc/akins
6. Leeson S, Summers J. Commercial Poultry Nutrition. Ontario: Guelf, (Trans.) Golian A, Salarmoini M. Tehran: Kosar; 2003; 218.
7. Kouchesfahani HM, Parivar K. General Histological, Embryological and Zoological Micro-techniques. Tehran: Al hossain. 1999; 29-233.
8. Guraya SS. The structure and function of the so-called yolk-nucleus in the oogenesis of birds. Quart J Mic Sci. 962; 103(pt.4): 411- 415.
9. Girling JE, Benett EJ, Cockrem JF. Persistence of pregnant mare serum gonadotropin in plasma of Japanese quail (Coturnix coturnix Japonica) Reprod Fertil Dev. 2002; 4(5): 287-229.
10. Perry MM, Gilbert AB, Evans AG. Electron Microscope Observation on the ovarian follicles of the Domestic fowl during the rapid growth phase. J Aant. 1978; 125(pt.3): 481-497.

Archive of SID



www.SID.ir

**Original Article**

# The Effect of Human Menopausal Gonadotropin Administration on Follicle Recruitment Waterfowls During Non-Breeding Season

**Paris Keynezhad, M.Sc.[1, 2*], Kazem Parivar, Ph.D.[1], Mahnaz Azarnia, Ph.D.[1]**

**1. Biology Department, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran**
**2. Nature Front Society, Tehran, Iran**

** Corresponding Address: P.O.Box: 15719-14911, Biology Department, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran*
*Email: parisl3us@yahoo.com*

**Received: 6/May/2008, Accepted: 28/Jun/2009**

## Abstract

**Objective:** It has been seen that wild waterfowls stop breeding during captivity. In the long-term, this may put their species in danger and there would be a need to find a way for artificial reproduction.
In this study, a common medication for human controlled ovarian hyperstimulation (COH) was tested on wild waterfowls to answer the question of whether this application can cause ovarian follicular recruitment and does it help the fowl ovulate and lay eggs.
**Materials and Methods:** The animal experimental model was the adult female Mallard. The timing of research was scheduled for mid-July through mid-August which counts as out-ofseason for Mallard breeding.
75 IU/bird/day was injected IM for 10 days. After completion of injections, the ovarian tissues were retrieved and considered for morphological and histological assessments.
**Results:** The results show a positive effect for human menopausal gonadotropin (hMG) on most of the evaluated parameters. In the experimental group; ovarian size, number of differentiating oocytes (vitellogenic and post-vitellogenic) and theca layer diameter were significantly more than the control group ($p<0.05$). Differences in the other parameters (the number of undifferentiated and pre-vitellogenic oocytes, nucleus and arteriole diameter) compared between control and experimental groups were not statistically significant.
**Conclusion:** It seems that hMG has a positive and meaningful effect on ovarian follicular recruitment and its administration will be an effective method for ovulation induction in female Mallards. This may especially be combined with artificial insemination to help the laying eggs become fertilized.

***Keywords:*** Anseriformes, Human Menopausal Gonadotropins, Assisted Reproductive Techniques, Ovulation Induction

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 2, Summer 2009, Pages: 204-211

Archive of SID



www.SID.ir