Archive of SID

تلقیح مصنوعی داخل رحمی به روش لاپاروسکوپی و تلقیح سرویکال در میشهای سوپر اوولهشده در برنامه انتقال جنین

دکتر خسرو حسینیپژوه[1] دکتر پرویز تاجیک[2]* دکتر فرامرز قراگوزلو[2]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۵، شماره ۴، ۶۶-۶۱، (۱۳۷۹)

جهت بررسی کارآیی تلقیح داخل رحمی به روش لاپاروسکوپی و تلقیح مصنوعی در ابتدای سرویکس (۱ تا ۲ بار تلقیح) در میزان باروری تخم و تعداد جمعآوری تخم در میشهای سوپراوولهشده در یک برنامه انتقال جنین، سه آزمایش انجام شد. در آزمایش اول و دوم، ۵ میش نژاد مغانی با سنهای مختلف، پس از همزمانی با اسفنج پروژسترون و سوپراوولاسیون با ۱۲۰۰-۸۰۰ واحد eCG با توجه به فحلیابی حدود ۴۰-۳۵ ساعت بعد از برداشت اسفنج، تلقیح مصنوعی در ابتدای سرویکس روی آنها انجام شد (زمان و میشهای مورد آزمایش متفاوت بودند). در آزمایش اول به هر میش ۰/۳-۰/۲ میلیلیتر منی رقیقشده با شیر پس چرخ و در آزمایش دوم به همین میزان منی رقیقشده با بافر تریس تلقیح شد. منی تزریق در هر دو آزمایش حاوی ۳۰۰-۲۰۰ میلیون اسپرم زنده و متحرک بود. فاصله تهیه اسپرم تا تلقیح حداکثر ۳ ساعت بود. در آزمایش اول بلافاصله پس از تلقیح، ۱۰۰ واحد hCG به هر میش تزریق شد. در آزمایش سوم ۸ میش نژاد قزل - کیوسی پس از همزمانی با پروستاگلاندین $F_2\alpha$ و سوپراوولاسیون با FSH، میشها به دو گروه تقسیم شدند. هر گروه از یک مخزن منی رقیق شده با بافر تریس که در هر میلیلیتر آن ۱۰۰ میلیون اسپرم زنده متحرک وجود داشت تلقیح شدند. در گروه اول تلقیح با ۰/۳ میلیلیتر منی رقیق شده و دو بار در ۴۲ و ۴۸ ساعت بعد از آخرین تزریق $PGF_2\alpha$ و با توجه به فحلیابی انجام شد. در گروه دوم تلقیح داخل رحمی با روش لاپاروسکوپیک با ۰/۱ میلیلیتر از منی رقیقشده در هر شاخ در ۴۵-۴۴ ساعت بعد از آخرین تزریق $PGF_2\alpha$ انجام شد. در هر دو گروه بلافاصله بعد از تلقیح ۶۰ میلیگرم GnRH به هر میش تزریق شد. در هر سه آزمایش روز ۶ بعد از تلقیح (تلقیح = روز ۰) میشها لاپاروتومی شده و مجاری شاخهای رحم برای جمعآوری جنین شستشو شدند. در آزمایش اول از مجموع ۲۳ اوولاسیون ۱۳ تخم جدا شد که ۷ تخم لقاح یافته بودند. بدینترتیب میزان جمعآوری تخم (نسبت تخمهای جمعآوری شده به تعداد اوولاسیون) ۰/۵۷ و میزان باروری (نسبت تخمهای لقاحیافته به مجموع تخمهای جمعآوریشده) ۰/۵۴ بود. در آزمایش دوم از مجمع ۳۵ اوولاسیون ۱۱ تخم جدا شد که هیچ یک لقاح نیافته بودند (میزان جمعآوری تخم ۰/۳). در آزمایش سوم در گروه اول از مجموع ۴۱ اوولاسیون ۲۳ تخم جمعآوری شد که ۱۴ تخم لقاح یافته بودند و از این تعداد ۴ تخم کیفیت مناسبی برای انتقال نداشتند. در گروه دوم (تلقیح لاپاروسکوپی) از ۲۳ اوولاسیون ۱۸ تخم جدا شد که همه آنها لقاح یافته بودند. از این میان ۲ تخم کیفیت مناسبی برای انتقال نداشتند. بدینترتیب درصد جمعآوری تخم در گروه اول ۱۳±۵۸ درصد و در گروه دوم ۲۳±۷۸ درصد و میزان باروری بهترتیب ۱۹±۶۵ درصد و ۱۰۰ درصد بود. درصد جنینهای قابل انتقال نسبت به مجموعه جنینهای جمعآوری شده نیز بهترتیب ۲۲/۵±۴۴/۵ و ۱۹±۸۹ درصد بود. نتایج حاصله نشان میدهد که تلقیح سرویکال نمیتواند روش مناسبی برای میشهای سوپراوولهشده در برنامه انتقال جنین باشد. در مقابل تلقیح داخل رحمی به روش لاپاروسکوپی میتواند نتیجه بسیار خوبی بدهد و حتی روش دو بار تلقیح سرویکال و مقایسه آن با روش لاپاروسکوپی نشان داد که بین این دو روش تلقیح و میزان آبستنی ارتباط وجود دارد و تلقیح داخل رحمی به روش لاپاروسکوپی بهطور معنیداری مؤثرتر از روش دو بار تلقیح در ابتدای سرویکس است. شدت همبستگی (ضریب چوپروف) روش تلقیح و میزان باروری تخمکها ۴۷ درصد بود.

واژههای کلیدی : تلقیح مصنوعی، لاپاروسکوپی، میش، انتقال جنین.

با وجود اینکه تلقیح مصنوعی در گاو سالهاست که بهصورت تجارتی در آمده و در اکثر گاوداریها یک امر رایج شده است، اما نتوانسته است جای خود را در گوسفندداریها پیدا نماید، زیرا تکنیک رایج در این دام تلقیح در ابتدای سرویکس بوده و محققین نتایج ضعیفی را از آن گزارش نمودهاند. در این میان یک مشکل اساسی خصوصیت آناتومیکی سرویکس میش میباشد. چینهای نامنظم سرویکس از نفوذ عمقی پیپت تلقیح جلوگیری مینماید و در نتیجه مقدار کافی از منی نمیتواند از این چینها عبور نماید (۹). این مشکل در مورد منی منجمد بیشتر است، زیرا بهنظر میآید که توانایی اسپرمهای منجمدشده برای نفوذ از سرویکس و ورود به رحم کاهش پیدا نماید (۱۲). به علاوه، طی گزارشهایی این کاهش در باروری به عدم توانایی اسپرم در عبور از سرویکس و در نتیجه عدم ایجاد یک ذخیره کافی از اسپرم در قسمت قدامی سرویکس نسبت داده شده است (۱۶). هنگامی که انجام سوپراوولاسیون و انتقال جنین مطرح میشود این موضوع تشدید خواهد شد. در گوسفند یکی از مشکلات عمده ترویج و بسط انتقال جنین تولید ضعیف و غیرقابل اعتماد جنین میباشد که در این رابطه عوامل مختلفی را دخیل میدانند. از جمله مهمترین علت آن مهاجرت نارسای اسپرم از طریق سرویکس میباشد که خود از عوامل محدودکننده فیزیولوژیک باروری به حساب آمده است (۸ و ۷). این مشکل هنگامی که از اسپرم منجمد استفاده میشود، بیشتر خواهد شد. با وجود حفظ توانایی، اسپرمهای از انجماد خارج شده برای بارورنمودن تخم، اغلب این اسپرمها نمیتوانند از میان سرویکس عبور نمایند و این خود باعث میشود تا تعداد کافی اسپرم برای لقاح به اویدوکت نرسد (۱۶ و ۶).

واردنمودن اسپرم بهطور مستقیم به شاخهای رحم میتواند این مشکل را از میان بردارد و این امر خصوصاً در برنامه انتقال جنین و یا تلقیح با منی منجمد بسیار مهم است. واردنمودن اسپرم از انجماد خارجشده بهطور مستقیم به شاخهای رحم باعث میزان آبستنی تقریباً برابر با جفتگیری طبیعی میشود (۱۲). برای تلقیح مستقیم به داخل رحم از روشهایی مانند لاپاروتومی و لاپاروسکوپی استفاده شده است. همچنین برای عبور پیپت تلقیح از سرویکس و واردنمودن آن مطالعاتی انجام شده است (۱۱ و ۱۰). در روش اخیر برای شلنمودن سرویکس و امکان عبور پیپت تلقیح از سرویکس استروژن تجویز شده است که چندان هم مورد توجه قرار نگرفته است. اخیراً روش دیگری معرفی شده است که به نام روش گوئلف معروف است. این روش امکان تلقیح داخل رحمی از طریق سرویکس و با استفاده از یک پیپت خمیده را در درصد بالایی از میشها فراهم میسازد و از نظر تجاری میزان قابل قبولی باروری حاصل میگردد (۱۴، ۱۳، ۳، ۲).

روش لاپاروسکوپی بهعنوان روشی برای تلقیح مستقیم اسپرم به داخل رحم، حداقل صدمه را به دام وارد میسازد، مورد توجه قرار گرفته است.

این مطالعه بهمنظور بررسی اولیهای برای تعیین میزان باروری در

۱) سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، تهران - ایران.
۲) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
*) مکاتبات و تقاضای کپی مقاله.

www.SID.ir

Archive of SID

جنینهای به‌دست آمده از میشهای سوپر اوله به‌دنبال تلقیح داخل رحمی به روش لاپاروسکوپیک و مقایسه با تلقیح سرویکال دربرنامه انتقال جنین انجام شد.

مواد و روش کار

در این مطالعه سه آزمایش در مرکز تحقیقات علوم دامی کشور واقع در کرج انجام شد. آزمایش اول در فصل بهار و آزمایشهای دوم و سوم در فصل پاییز انجام گرفت. در هر یک از آزمایشهای اول و دوم ۵ میش نژاد مغانی در سنین مختلف با حداقل یک شکم زایش قرار داشت.

برای همزمانی سیکل فحلی میشها در این دو آزمایش از اسفنج آغشته به پروژسترون (45mg Florogeston acetate-Intervet) استفاده و ۱۳ روز داخل واژن قرار داده شد. در آزمایش اول ۳۶ ساعت قبل از برداشت اسفنج و گروه دوم ۲۴ ساعت قبل از برداشت اسفنج ۸۰۰ تا ۱۲۰۰ واحد از هورمون eCG، (Foligon-Intervet) به‌طور عضلانی تزریق شد. در هر دو آزمایش میشها از ۱۲ ساعت بعد از برداشت اسفنجها فحل‌یابی شدند و با توجه به نشان‌دادن فحلی حدود ۳۵ تا ۴۰ ساعت پس از برداشت اسفنج توسط یک فرد مجرب مورد تلقیح مصنوعی در ابتدای سرویکس قرار گرفتند. در هر دو آزمایش از منی به‌دست آمده از دو قوچ مغانی که به‌وسیله واژن مصنوعی تهیه شده و پس از مخلوط کردن رقیق شده بود استفاده شد. در آزمایش اول به هر میش ۰/۲ الی ۰/۳ میلی‌لیتر منی تازه و رقیق‌شده با شیر پس‌چرخ و در آزمایش دوم به هر رأس میش ۰/۲ الی ۰/۳ میلی‌لیتر منی تازه و رقیق شده با بافر تریس تلقیح شد. در هر دو آزمایش ۲۰۰ تا ۳۰۰ میلیون اسپرم زنده و متحرک در منی تلقیح شده وجود داشت. فاصله تهیه اسپرم تا تلقیح در هر دو آزمایش حداکثر نیم ساعت بود. در آزمایش اول بلافاصله بعد از تلقیح، میشها تحت تجویز ۱۰۰ واحد hCG به‌طور عضلانی قرار گرفتند.

در آزمایش سوم ۹ رأس میش نژاد قزل -کیوسی با سنهای مختلف که حداقل یک شکم زاییده بودند به‌طور اتفاقی از گله جدا و برای ایجاد همزمانی در سیکل تولیدمثل هر کدام سه بار به فواصل ۹ روز مورد تجویز ۱۳۰ میلی‌گرم کلوپروستنول که یک آنالوگ پروستاگلاندین $F_2\alpha$ می‌باشد (Estrumate Coopers England) قرار گرفتند. از ۲۴ ساعت قبل از تزریق سوم پروستاگلاندین همه میشها ۶ بار و به فواصل ۱۲ ساعت مورد تجویز FSH (Folltropin-v Veterpharm - Canada) به‌صورت مقادیر کاهنده ۲۲/۴، ۲۱، ۱۶/۸، ۱۶/۸، ۱۱/۲ و ۱۱/۲ میلی‌گرم قرار گرفتند. لازم به یادآوری است که هر میلی‌گرم فولتروپین تقریباً معادل ۰/۱۷ میلی‌گرم FSH خالص است.

میشها مورد فحل‌یابی قرار گرفتند و به جز یک رأس، بقیه فحلی را نشان دادند. در این آزمایش جهت تلقیح میشها از دو رأس قوچ نژاد آرخامرینوس توسط واژن مصنوعی منی تهیه و بلافاصله از نظر کیفیت و غلظت اسپرم مورد آزمایش قرار گرفت. سپس منی‌ها با هم مخلوط شده و به آنها رقیق‌کننده و نگهدارنده (۲) افزوده شد به‌طوری که هر میلی‌لیتر آن حاوی 10×10^8 عدد اسپرم زنده متحرک بود.

تلقیح مصنوعی در آزمایش سوم: میشها به‌طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. یک گروه مورد تلقیح سرویکال و گروه دیگر مورد تلقیح داخل رحمی به روش لاپاروسکوپی قرار گرفتند. تلقیح سرویکال دو بار به فواصل ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق PG و توسط همان عامل تلقیح‌کننده در آزمایش اول و دوم انجام شد. در هر دو بار، منی در داخل سوراخ خارجی سرویکس و حداکثر تا یک ساعت پس از اسپرم‌گیری انجام شد. بلافاصله بعد از تلقیح به هر رأس میش ۶۰ میلی‌گرم از هورمون GnRH (Fertagyl - Intervet) تزریق شد.

جهت تلقیح داخل رحمی از روش لاپاروسکوپی استفاده شد. بدین‌منظور میشها از ۳۶ ساعت قبل از تلقیح در پرهیز آب و غذا قرار گرفتند. برای آرام‌شدن میشها چند دقیقه قبل از لاپاروسکوپی هر رأس میش مورد تجویز ۰/۳ میلی‌گرم اسپرومازین قرار گرفت. پس از ضدعفونی و بیحسی موضعی محل ورود دو تروکار (۸-۵ سانتیمتر در جلوی پستان و ۶-۲ سانتیمتر در طرفین خط وسط)، ابتدا تروکار و کانول مربوط به لاپاروسکوپ از محل برش سمت چپ وارد حفره شکم شده و از طریق آن گاز CO_2 وارد حفره شکم گردید تا شکم به‌طور متوسط برآمده شود. سپس یک لاپاروسکوپ غیرقابل انعطاف ۳۶ سانتیمتر × ۷ میلیمتر و با زاویه دید ۶۰ درجه (Storz-Germany) از طریق این کانول وارد حفره شکم گردید. از برش سمت راست یک تروکار و یک کانول وارد شکم شده و از این راه یک پنس Semm برای گرفتن شاخهای رحم وارد گردید. هیچ تلاشی برای گرفتن تخمدانها و مشاهده آنها به عمل نیامد. برای تلقیح اسپرم از یک کاتتر وریدی شماره ۱۶ یا ۱۸ (I.V. Catheter placement unit - Jelco, CRITICON) استفاده گردید. کاتتر وریدی از محلی به روی خط وسط و حدود ۳-۲ سانتیمتر عقب‌تر از محل ورود تروکارها وارد شکم شده و با کمک پنس Semm شاخ رحم در نواحی میانی طول آن گرفته شده و کاتتر در این ناحیه به روی خم بزرگ شاخ رحم، در قسمتی که عروق کمتری دارد وارد شده تا داخل لومن رحم قرار گیرد. پس از اطمینان از قرارگرفتن نوک کاتتر در لومن، ۰/۱ از منی رقیق شده به داخل مجرای رحم تلقیح می‌شد. منی استفاده‌شده برای تلقیح از همان مخزن منی مورد استفاده برای تلقیح سرویکال و در نتیجه با همان غلظت (یک میلیارد اسپرم در هر میلی‌لیتر و یا ۱۰۰ میلیون اسپرم زنده و متحرک در هر تلقیح ۰/۱ میلی‌لیتری) بود. همین عمل برای شاخ دیگر رحم انجام شد. در انتها محل شکافها ضدعفونی شده و یک دز پنی‌سیلین-استرپتومایسین طویل‌الاثر تزریق می‌شد.

انجام هر عمل تلقیح لاپاروسکوپیک از زمان تزریق بیحسی تا خارج‌نمودن وسایل حدود ۸ دقیقه طول می‌کشید.

زمان انجام تلقیح لاپاروسکوپیک ۴۴ تا ۴۵ ساعت بعد از آخرین تزریق PG بوده است. بلافاصله بعد از تلقیح به هر رأس میش ۶۰ میلی‌گرم GnRH به‌طور عضلانی تزریق می‌شد.

جمع‌آوری تخمها: در هر سه آزمایش میشها در روز ۶ بعد از تلقیح (زمان تلقیح = روز ۰) مورد عمل لاپاروتومی قرار گرفتند و مجرای هر شاخ رحم با قراردادن یک کاتتر وریدی شماره ۱۸ (آنژیوکت) در محل اتصال شاخ رحم به اویدوکت و تزریق ۵۰ میلی‌لیتر مایع PBS از طریق کاتتر وریدی و جمع‌آوری آن از طریق فولی‌کاتتر شستشو شد. مایع حاصل از فلاشینگ جهت مشاهده تخم و بررسی آن در زیر استریومیکروسکوپ مورد جستجو قرار می‌گرفت. به علاوه در این مرحله تعداد اجسام زرد موجود برروی هر دو تخمدان شمارش شد که نشان‌دهنده تعداد تخمک‌گذاری بود.

نتایج

در آزمایش اول از مجموع ۲۳ تخمک‌گذاری (تعداد اجسام زرد مشاهده شده در لاپاروتومی) ۱۳ تخم جدا شد که ۷ تخم لقاح یافته بودند. میزان جمع‌آوری تخم (نسبت تخمهای جمع‌آوری‌شده به تعداد اجسام زرد) و میزان باروری (نسبت تخمهای لقاح یافته به مجموع تخمهای جمع‌آوری‌شده) به‌ترتیب ۵۳ درصد و ۵۴ درصد بود. نسبت تخمهای لقاح یافته به تعداد تخمک‌گذاری (اجسام زرد) ۳۰ درصد بود (جدول ۱).

در آزمایش دوم از مجموع ۳۵ تخمک‌گذاری ۱۱ تخم جدا شد که هیچ یک لقاح نیافته بود. درصد جمع‌آوری تخم ۳۱ درصد بود (جدول ۲).

در آزمایش سوم در گروهی که مورد دو بار تلقیح در ابتدای سرویکس قرار گرفتند، از مجموع ۴۱ تخمک‌گذاری، ۲۳ تخم جمع‌آوری شد که از این تعداد ۱۵ تخم لقاح یافته بودند. از این تعداد ۵ عدد دارای کیفیت نامناسب برای انتقال و ۱۰ تخم دارای کیفیت عالی بودند. در گروهی که مورد تلقیح داخل رحمی به روش لاپاروسکوپی قرار گرفتند، مجموع تعداد تخمک‌گذاری ۲۳ بود که از این تعداد ۱۸ تخم جمع‌آوری شد و همه آنها لقاح یافته بودند. از این

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ - میزان جمع‌آوری تخم و باروری آنها در آزمایش اول

شماره میش	تعداد جسم زرد در هر تخمدان	تعداد تخم جمع‌آوری‌شده	تعداد تخمهای لقاح‌یافته	تعداد تخمهای قابل انتقال
۱	۲R	۱	۱	۱
	۲L	۲	۲	۲
۲	۵R	۳	۰	۰
	۱L	۱	۰	۰
۳	۴R	۳	۲	۲
	۱L	۰	۰	۰
۴	۳R	۲	۱	۱
	۱L	۱	۱	۱
۵	۲R	۰	۰	۰
	۲L	۱	۰	۰
جمع	۲۳	۱۳	۷	۷

جدول ۲ - میزان جمع‌آوری تخم و باروری آنها در آزمایش دوم

شماره میش	تعداد جسم زرد در هر تخمدان	تعداد تخم جمع‌آوری‌شده	تعداد تخمهای لقاح‌یافته	تعداد تخمهای قابل انتقال
۱	۵R	۳	۰	۰
	۳L	۰	۰	۰
۲	۲R	۰	۰	۰
	۱L	۰	۰	۰
۳	۴R	۱	۰	۰
	۵L	۰	۰	۰
۴	۳R	۳	۰	۰
	۲L	۲	۰	۰
۵	۴R	۲	۰	۰
	۶L	۰	۰	۰
جمع	۳۵	۱۱	۰	۰

جدول ۳ - میزان جمع‌آوری تخم و باروری در آزمایش سوم

	شماره میش	تعداد جسم زرد در هر تخمدان	تعداد تخمهای جمع‌آوری‌شده	تعداد تخمهای لقاح‌یافته	تعداد تخمهای قابل انتقال
تلقیح سرویکال	۱	۷R	۴	۲	۱
		۱۳L	۵	۲	۱
	۲	۵R	۳	۳	۲
		۷L	۵	۴	۴
	۳	۴R	۳	۲	۱
		*L	-	--	--
	۴	۱R	۰	۰	۰
		۴L	۳	۳	۱
جمع		۴۱	۲۳	۱۵	۱۰
تلقیح لاپاروسکوپیک	۱	۲R	۲	۲	۲
		۳L	۲	۲	۲
	۲	۳R	۱	۱	۱
		۵L	۳	۳	۳
	۳	۵R	۴	۴	۲
		۰L	۰	۰	۰
	۴	۴R	۳	۳	۳
		۳L	۳	۳	۳
جمع		۲۳	۱۸	۱۸	۱۶

R) راست، L) چپ، *) عدم محاسبه به خاطر نشت مایع شستشو از کنار بالون می‌باشد.

تعداد دو عدد دارای کیفیت نامناسب برای انتقال و ۱۶ عدد دیگر دارای کیفیت عالی بودند. بدین‌ترتیب درصد جمع‌آوری تخم در گروه تلقیح ابتدای سرویکس ۱۳±۵۷/۵ درصد و در گروه لاپاروسکوپیک ۲۳±۷۸ و میزان باروری در گروه ۱۹±۶۵ درصد و در گروه لاپاروسکوپیک ۱۰۰ درصد بود.

درصد جنینهای قابل انتقال نسبت به مجموع تخمهای جمع‌آوری شده به‌ترتیب ۲۲±۴۳/۵ درصد و ۱۹±۸۹ درصد بود (جدول ۳).

با مقایسه دو روش تلقیح در آزمایش سوم، طبق آزمون فیشر، بین روش تلقیح و میزان باروری ارتباط وجود دارد و دو روش به‌طور معنی‌داری با هم متفاوت هستند ($P<0/005$) و تلقیح داخل رحمی به روش لاپاروسکوپیک به‌طور مشخص نتیجه بهتری از روش دو بار تلقیح در ابتدای سرویکس می‌دهد. شدت همبستگی (ضریب چوپروف) بین روش تلقیح و میزان باروری ۴۷ درصد بود. آزمون نسبتها نیز این نتایج را تأیید نمود.

در آزمایش سوم تعداد فولیکولهای ایجادشده در این نژاد و با این روش همزمانی و تحریک تخمک‌گذاری (استفاده از $PGF_2\alpha$ و FSH با مقادیر ذکرشده) در مجموع ۷۳ عدد بود که متوسط فولیکول ایجادشده ۹/۱۲ بود و از این تعداد ۶ فولیکول (۰/۸ درصد) تخمک‌گذاری نکردند و به فولیکول مقاوم تبدیل شدند.

بحث

تلاشهای زیادی برای بهبود میزان باروری به‌دنبال تلقیح مصنوعی در گوسفند شده است. روش رایج تلقیح مصنوعی که در آن منی در ابتدای سرویکس و یا حتی در واژن ریخته می‌شود، کارآیی خوب و راضی‌کننده‌ای نداشته است. خصوصاً در هنگامی که از منی منجمد و یا از تلقیح در برنامه انتقال جنین استفاده شده است (۱۲).

تلقیح در واژن یا ابتدای سرویکس با منی منجمد در میشهای مرینوس اغلب باروری زیر ۲۰ درصد داشته است (۱۸). مشکل اصلی در این روش نرسیدن مقدار کافی اسپرم به رحم است که علت عمده آن وجود چینهای نامنظم در سرویکس و عدم اجازه دخول پیپت تلقیح به قدر کافی به داخل سرویکس و رحم می‌باشد. بدین‌جهت تلقیح مستقیم منی به داخل رحم مورد توجه قرار گرفته است. در بررسی حاضر در آزمایش اول (تلقیح سرویکال) درصد جمع‌آوری تخم و درصد باروری به‌ترتیب ۵۳ درصد و ۵۴ درصد و در آزمایش دوم (تلقیح سرویکال) به‌ترتیب ۳۱ درصد و ۰ درصد بود. عدم لقاح تخمها در آزمایش دوم می‌تواند بیشتر مربوط به عدم باروری قوچ و یا اشکال در تهیه محیط رقیق‌کننده منی باشد. گرچه در مشاهده میکروسکوپی منی، اسپرمها متحرک و زنده به‌نظر می‌رسیدند (اطلاعات در مجموعه حاضر نیامده است). نکته دیگری که می‌تواند مورد نظر باشد، عدم تجویز hCG یا GnRH در آزمایش دوم است. نشان داده شده است که تجویز hCG یا GnRH برای همزمان‌کردن تخمک‌گذاری و درمان فولیکولهای مقاوم مفید است و باعث افزایش جمع‌آوری تخمهای لقاح‌یافته می‌شود (۲۶ و ۱۶). در تجربه قبل نیز عدم همزمانی در تخمک‌گذاری و تشکیل فولیکولهای مقاوم را در صورت عدم تجویز hCG نشان داده شده است (۱).

در آزمایش سوم در گروهی که میشها دو بار مورد تلقیح سرویکال قرار گرفتند میزان جمع‌آوری تخم و درصد باروری تخمهای جمع‌آوری‌شده ۵۷/۵ درصد و ۶۵ درصد بود. اگرچه درصد جمع‌آوری تخمها و درصد باروری آنها در دو آزمایش اول و سوم در حد کاملاً بالا و خوبی نسبت به سایر گزارشها بود، اما با این حال در مقایسه با تلقیح لاپاروسکوپیک که در آن درصدهای مورد اشاره به‌ترتیب ۷۸ درصد و ۱۰۰ درصد بود کاملاً پایین به‌نظر می‌رسید که مؤید مطالعات قبلی می‌باشد.

در یک مطالعه Heard و همکاران میزان جمع‌آوری جنین برای سوپراوولاسیون با FSH و eCG به‌ترتیب ۷۰/۳ درصد و ۶۵/۳ درصد و میزان

www.SID.ir

Archive of SID

باروری جنین در همان وضعیت ۸۳/۷ درصد و ۸۶/۹ درصد در تلقیح لاپاروسکوپیک به‌دست آوردند (۲۶). در یک مقایسه، میزان باروری تخمها در میشهای سوپراوووله با تلقیح داخل رحمی لاپاروسکوپی بیشتر از جفتگیری طبیعی بود (به‌ترتیب ۶۴ درصد و ۴۹ درصد). در این مطالعه همچنین مشخص شد که تلقیح داخل رحمی در ۶ ساعت قبل از زمان مورد انتظار اوولاسیون بهترین نتیجه را به‌دست می‌دهد. بهترین میزان اسپرم در این تلقیح ۲۰×۱۰^۶ اسپرم بود و مقدار بیشتر از این نتیجه بهتری را به‌دست نمی‌دهد (۲۶). همچنین در مقایسه بین تلقیح لاپاروسکوپیک (۵۳-۵۲ ساعت پس از برداشت اسفنج پروژسترون و ۸۰×۱۰^۶ اسپرم در هر شاخ) و تلقیح سرویکال (۴۸ ساعت پس از برداشت اسفنج و ۴۰۰×۱۰^۶ اسپرم) در میشهای سوپراوووله، درصد جمع‌آوری تخم به‌ترتیب ۷۷/۵ درصد و ۶۴/۱ درصد و درصد باروری تخمهای جمع‌آوری‌شده به‌ترتیب ۱۰۰ درصد و ۳۸/۲ درصد بود که اختلاف آشکاری را در میزان باروری بین دو روش تلقیح نشان می‌دهد (۲۵). در تجربه‌ای McKelvey نیز باروری بیش از ۹۰ درصد با منی تازه و ۵۵ درصد با منی منجمد را به‌دنبال تلقیح لاپاروسکوپیک در میشهای سوپراوووله به‌دست آورده است (۱۷). در همین ارتباط Scudamor میزان باروری ۸۷ درصد را برای این روش تلقیح به‌دست آورده (۲۵) و Gourley در یک مطالعه گسترده با انجام تلقیح لاپاروسکوپیک در چند نژاد مختلف درصدی از باروری بین ۱۰۰-۷۰ درصد را برای منی تازه و ۷۱ درصد را برای منی منجمد به‌دست آورده است (۱۰۰×۱۰^۶-۵۰ اسپرم در هر شاخ) (۱۲).

گفته شده است که تلقیح باید زمانی انجام شود که تا رسیدن اوول به محل لقاح، توانا شدن اسپرم برای باروری حاصل شده باشد. به‌طور کلی پذیرفته شده است که اوولاسیون در میش ۳۰-۲۵ ساعت پس از شروع فحلی انجام می‌شود (احتمالاً در نژادهای با پشم ظریف این مدت طولانیتر است). بنابراین برای بهترشدن میزان باروری در تلقیح لاپاروسکوپیک باید تلقیح پیش از اوولاسیون انجام شود (۳). بهترین زمان در این مورد ۶ ساعت قبل از زمان مورد انتظار اوولاسیون بوده است (۲۶ و ۱۵) و از آنجایی که متوسط زمان اوولاسیون در میشهای سوپراوووله حدود ۴۸ ساعت (۵۴-۳۶ ساعت) پس از برداشت منبع پروژسترون است (۱۲ و ۱)، پس شاید بهترین زمان تلقیح مصنوعی لاپاروسکوپی حدود ۴۸-۳۰ ساعت و به‌طور متوسط ۴۲ ساعت پس از برداشت اسفنج باشد. در آزمایش سوم که از $PGF_2\alpha$ برای همزمانی استفاده شد، زمان شروع فحلی از ۲۲ ساعت بعد از آخرین تزریق بود. بنابراین تلقیح مصنوعی در روش سرویکال ۲۲ و ۴۸ ساعت (دو بار) و در روش لاپاروسکوپیک ۴۵-۴۴ ساعت بعد از آخرین تزریق $PGF_2\alpha$ انجام شد. نتایج به‌دست آمده می‌تواند نشان‌دهنده مناسب‌بودن این زمان تلقیح برای این نژاد باشد، که البته مشابه نتایج به‌دست آمده در مطالعات قبلی است (۲۹ و ۲۷).

هنگامی که میشهای غیرسوپراوووله مورد تلقیح قرار می‌گیرند، آغاز فحلی و در نتیجه زمان مناسب تلقیح حدود ۲۴ ساعت دیرتر خواهد بود (۳ و ۱).

Moses و همکاران دریافتند که میزان باروری با تلقیح لاپاروسکوپیک در میشهای مرینوس سورپراوووله‌نشده در ۱۴-۱۰ ساعت بعد از تعیین فحلی با تلقیح در ۶۰ ساعت بعد از برداشت اسفنج و بدون توجه به فحل‌یابی اختلاف معنی‌داری نداشت (به‌ترتیب ۶۲/۹ درصد و ۵۹/۱ درصد) (۲۱).

تعیین حداقل اسپرم متحرک مورد استفاده در تلقیح لاپاروسکوپیک برای انتقال جنین بین محققین متفاوت بوده است. Gourly و همکاران (۱۲) میزان ۵۰ تا ۱۰۰ میلیون اسپرم و Walkwer و همکاران (۲۶) ۲۰ میلیون اسپرم زنده متحرک را برای هر شاخ رحم توصیه کرده‌اند. نتیجه مطالعه حاضر با توجه به میزان باروری ۱۰۰ درصد نشان می‌دهد که ۱۰۰ میلیون اسپرم می‌تواند حداکثر میزان لازم برای تلقیح لاپاروسکوپیک در این نژاد باشد. در این مطالعه همان‌طور که معمولاً توصیه می‌شود (۲) تلقیح در هر دو شاخ صورت گرفت، گرچه هنوز بحث است که آیا تلقیح در داخل بدنه رحم نتیجه بهتری را از تلقیح در داخل یک یا هر دو شاخ دارد یا خیر (۲۲، ۱۹، ۶، ۴).

هنگامی که از تلقیح لاپاروسکوپیک برای میشهای غیرسوپراوووله استفاده می‌شود، میزان کمتری اسپرم مورد نیاز است. در این حالت توصیه می‌شود که برای نژادهای با پشم نازک و با قابلیت باروری بهتر، ۱۰ میلیون و برای نژادهای با قابلیت باروری کمتر، ۲۰ میلیون اسپرم زنده و متحرک برای هر شاخ مورد نیاز است. اگرچه بعضی از محققین میزان باروری قابل قبولی را با ۳/۵ میلیون اسپرم متحرک برای هر شاخ گزارش کرده‌اند (۱۱). Eppleston و همکاران میزان باروری ۴۰/۳ درصد و ۷۲/۸ درصد را به‌ترتیب با تلقیح لاپاروسکوپیک ۱۶ میلیون و ۶۴ میلیون اسپرم متحرک به هر شاخ در میشهای غیرسوپراوووله به‌دست آوردند (۶). Moses و همکاران (۲۱) باروری بالا و قابل قبولی را (اگرچه حداکثر نیست) از تلقیح ۵۰ میلیون اسپرم متحرک در هر شاخ در میشهای مرینوس گزارش کرده‌اند.

موفقیت تلقیح لاپاروسکوپیک در گوسفند تحت‌تأثیر عوامل مؤثر برروند کار در قبل از تلقیح و عوامل مؤثر بر تثبیت و بقا آبستنی می‌باشد. در هر برنامه تلقیح که میشهای سالم و در وضعیت مطلوب و عاری از نقایص تولیدمثل هستند و مدیریت خوبی بر آنها اعمال شده است، دانش فنی، مهارت و توانایی شخص عامل بر میزان موفقیت آن تأثیر دارد. یکی از عوامل اولیه که تلقیح‌کننده کنترل می‌نماید زمان و سبک تلقیح است. در تلقیح‌هایی که خیلی زود و یا خیلی دیر نسبت به زمان اوولاسیون انجام می‌شود، میزان موفقیت کاهش می‌یابد. زمان تلقیح در هنگامی که از اسپرم منجمد استفاده می‌شود بسیار حیاتی‌تر و حساستر است، زیرا اسپرم منجمد برای مدت کوتاهی باقی می‌ماند. تلقیح‌کننده نه تنها باید با دقت کار کند بلکه باید استرس ناشی از زمان تلقیح و دستکاریهای خشن را به حداقل برساند. روش کار باید ملایم و با برنامه‌ریزی همراه باشد. در این روش گرچه استفاده از منی تازه بهترین نتیجه را می‌دهد، ولی با استفاده از منی منجمد نیز می‌توان باروری قابل قبولی را به‌دست آورد (۱۲). محاسبه میزان منی باید براساس حداقل مقدار اسپرم زنده و متحرک باشد تا از باروری مطلوب شد. همان‌طور که مطالعه حاضر نشان داد ۱۰۰ درصد از تخمهای جمع‌آوری شده از میشهای سوپراوووله‌ای که مورد تلقیح لاپاروسکوپیک قرار گرفتند بارور بودند. میزان باروری بالایی هم (۱۰۰-۷۰ درصد) که توسط دیگران گزارش شده است نشان‌دهنده این است که این روش میزان باروری بسیار بالاتری را نسبت به روش تلقیح سرویکال (حتی دو بار تلقیح) به‌دست می‌دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مسئولین محترم سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران به‌خاطر تأمین هزینه‌های طرح (انتقال جنین در گوسفند به روش لاپاروسکوپی) و همچنین از مسئولین محترم مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور (کرج) به‌خاطر در اختیارقراردادن مکان و گوسفندان لازم تشکر می‌نمایند.

منابع

۱. حسینی‌پژوه، خ.، قراگوزلو، ف.، جعفری، ی. و تاجیک، پ. همزمانی و تحریک تخمک‌گذاری به‌منظور انتقال جنین در گوسفند مغانی در فصل تولیدمثلی و غیرتولیدمثلی. پژوهش و سازندگی، شماره ۳۷، صفحه : ۱۰۴-۱۰۲، (۱۳۷۶).

2. Ruckrell, B.C., Buschbeck, C., Cartley, C., Kroetsch, T., McCutcheon, W. and Martin, J. A transcervical technique for artificial insemination in sheep. Procc. 12th Int. Cong. Anim. Reprod. Art. Insem. 12: 1531-1533, (1992).

www.SID.ir

Archive of SID

3. Ruckrell, B.C., Buschbeck, C., Gartley, C., Kroetsch, T. and Walton, J.S. Further development and testing of a transcervical technique for artificial insemination in sheep. Theriogenology, (1994).
4. Correa, J., Bergama, B. and Gatica, R. Fertilization rate in sheep unilaterally inseminated with frozen semen. Small Rum. Res. 13: 99-101, (1994).
5. Eppleston, J. Studies on the fertility of frozen-thawed ram semen. PhD thesis. University of New Southwaies. Sydney, (1992).
6. Eppleston, J., Salmon, S., Moore, N. and Evans, G. The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to fertility of frozen thawed ram semen. Anim. Reprod. Sci. 36: 211-225, (1994).
7. Evans, G. and Armstrong, D.T. Reduction in sperm transport in ewes by superovulation treatments. J. Reprod. Fertil. 70: 47-53, (1984).
8. Evans, G., Holland, M.K., Nottle, H.B., Sharp, P.H. and Armstrong, D.T. Production of embryos in sheep using FSH preparations and laparoscopic intrauterine insemination. In Austria. Academy of Science, Canberra, 313-315, (1984).
9. Ewans, G., Maxwell, W.M.C. and Salmon, S. Artificial insemination of sheep and goat. Boston, Butterworths, (1987).
10. Fukui, Y. and Roberts, E.M. Further studies on non-surgical interuterie technique for artificial insemination in the ewe. Theriogenology, 10: 381-393, (1978).
11. Fukui, Y. and Roberts, E.M. Fertility of non surgical intrauterine insemination with frozen-pellted semen in ewes treated with prostaglandin $F_2\alpha$. Proc. Int. Gog. Sheep Breed. Western Australian Institute of Technology. Perth. 482-493, (1976).
12. Gourly, D.P. and Reise, R.L. Laparoscopic artificial insemination in sheep. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 6(3): 615-633, (1990).
13. Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, S., Sharp, P. and Buckrell, B.C. Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. Theriogenology, 33: 1231-1243, (1990)
14. Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, S., Sharp, P. and Buckrell, B.C. A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. Theriogenology, 33: 993-1010, (1990).
15. Heard, T.M. and Walker, S.K. Premature Ovulation and embryo collection in the ewe. Theriogenology, 37(1): 220, (1997).
16. Lightfoot, K.J. and Salamon, S. Fertility of ram spermatozoa frozen by pllet method. II. The effects of method of insemination on fertilization and embryonic mortality. J. Reprod. Fertil. 22: 399, (1970).
17. McKelvey, W.A.C. Studies on the establishment of pregnancy in the ewe. Index thesis for higher degrees in the universities of Great Britain and Irland. 37: 3: 1241, (1988).
18. Maxwell, W.M.C. and Hewitti, J. A comparision of vaginal-cervical and intrauterine insemination of sheep. J. Agr. Sci. Cambridge, 106: 191-193, (1986).
19. Maxwell, W.M.C. Artificial insemination of ewes with frozen thawed semen at a synchronized oestrus. 2. Effect of dose of spermatozoa and site of insemination on fertility. Anim. Reprod. Sci. 14: 83-89, (1986).
20. Mattner, P.E., Entwistle, K.W. and Martin, I.C.A. Passage survical and fertility of sheep frozen ram semen in the genital tract of the ewe. Aut. Biol. Sci. 22: 177-181, (1969).
21. Moses, D., Martinez, A.G., Irio, G., Valcarcel, A., Ham, A., Pessi, H., Castanon, R., Macia, A. and De Lasheras, M.A. A large scale programe in laparoscopic intrauterine insemination with frozen thawed semen in Australian merino sheep in Argentine Patagonia. Theriogenology, 48: 651-657, (1977).
22. Rerkins, N.R., Hill, J.R. and Pedrana, R.G. Laparoscopic insemination of frozen-thawed semen into one or both uterine horn without regard to ovulation site in synchronized Merino ewes. Theriogenology, 46: 541-545, (1996).
23. Ritar, A.J., Ball, P.D.O. and May, P.J. Artificial insemination of Cashmer goat: Effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment. Method and time of insemination. Semen freezing proccess number of motile spermatozoa and age of female. Reprod. Fertil. Devel, 2: 377-384, (1990).
24. Scudamore, C.L. Intravaginal sponge insertion technique. Veterinary Record, 123 (21): 554, (1988).
25. Scudamore, C.L., Robinson, J.J., Aitken, R.P., Kennedy, D.G., Irland, S. and Robertson, I.S. Laparoscopy for intrauterine insemination and embryo recovery in superovulated ewes at a commercial embryo transfer unit. Theriogenology, 35: 329-337, (1991).
26. Walker, S.K., Smith, D.H., Fredsham, A., Asham, R.J. and Semark, R.F. The use of synthetic gonadotropin relasing hormone treatment in the collection of sheep embryos. Theriogenology, 31: 741-753, (1989).
27. Ware, C.B., Vrosby, T.F. and Gordon, I. Influence of progestagen or prostaglandin on the synchronization of superovulation in sheep treated with anterior pituitary extract. Irish Veterinary J. 40: 13-16, (1986).
28. Windsor, D.P., Szell, A.Z., Buschbeck, C., Edward, A.Y., Milton, T.J.B. and Buckrell, B.C. Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. Theriogenology, 41: 147-153, (1994)
29. Zanwar, S.G. and Deshpand, B.R. The 10th Int. Congr. Anim. Reprod. A. I. Illinois, USA, Vol. II, Brief communications, 254, (1994).

www.SID.ir

Archive of SID

Intrauterine laparoscopic artificial insemination and cervical insemination in superovulated ewes for embryo transfer

Hosseini-Pajoh, Kh.[1], Tajik, P.[2*], Gharagoozloo, F.[2]

[1]*Scientific and Industrial Research Organization Tehran - Iran.*

[2]*Department of Clinical, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.* [*]*Correspondence and Reprint Request.*

In order to study efficacy of cervical AI (once and twice inseminations) and laparoscopic intrauterine insemination, in egg recovery rate and fertilization rate, three experiments were done. In each of the 1st and 2nd experiments, 5 moghani ewes were inseminated in the external oss of cervix. Ewes had been synchronized by vaginal sponges and superovulated by injections of 800 or 1200 IU of eCG. Insemination was done at 35-40 hours after sponge removal (the times of experiments and the ewes were different). In the first experiment, every ewe was inseminsted with 0.2 to 0.3 ml of semen diluted by skimed milk and in the secon one, every ewe was inseminated with the same volume of semen diluted by tris buffer each contained 200-300 $\times 10^6$ live motile sperm cells. The maximum interval between obtaining semen and insemination was 3 hours. In the first experiment, every ewe was injected 100 IU eCG immidiately after insemination. In the third experiment 8 Ghezel X Ciucy ewes were synchronized by $PGF_2\alpha$ and superovulated by FSH, and divided into two groups. Bothgroups were inseminated by a semen diluted by tris-buffer and contained 100×10^6 sperm cells/ml. The first group were inseminated cervicaly with 0.3 ml of diluted semen twice, at 42 and 48 h after the last injection of FSH considering heat detection. In the 2nd group, laparoscopic intrauterine insemination was performed by 0.1 ml of diluted semen into each uterine horn at 44-45 h after the last injection of FSH. In bouth groups, 60 micro gram of GnRH was injected immidiatly after insemination (in the first group after the first insemination). Laparotomy was performed on all of the ewes 6 day after insemination, and uterine horns were flushed for recovery of the embryos. In the first experiment, 13 eggs were recovered from 23 ovulations (recovery rate=57%), of the 7 were fertilized (54%). In the 2nd experiment, 11 eggs were recovered in 35 ovulations (31% recovery rate) and even one egg was not fertilized (0% fertilization rate). In the first group among the 3rd experiment (twice cervical inseminations), 23 eggs were recovered from 41 ovulations (58% recovery rate) in which 14 were fertilized (65% fertilization rate) and 10 were suitable for embryo transfer. In the 2nd group of this experiment (laparoscopic insemination), 18 eggs were recovered from 23 ovulations (78% recovery rate) and all were fertilized (100%) in which 11 were suitable for embryo transfer. In conclusion these experiments indicate that cervical insemination may not be a suitable method in supervulated ewes. In contrast, intrauterine insemination by laparoscopy is an effective method and even in comparision with twice cervical inseminations, it is significantly more effective. Correlation rate (Chooprov index) between insemination method and fertilization rate in the 3rd experiment was 47%.

Key words : Intrauterine, Laparoscopy, Ewes, Embryo transfer.

www.SID.ir