فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۷، جلد ۱۲، شماره ۴، پائیز ۹۸، صفحه ۱ تا ۱۲
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

بررسی سیتولوژیکی ترشحات دستگاه تناسلی در مراحل مختلف سیکل استروس گاومیش خوزستان

معین مقصودی نژاد[۱]، صالح طباطبائی وکیلی[۲]، مرتضی ممویی[۳]
۱-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران.
۲-دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران. tabatabaei@ramin.ac.ir
۳-استاد گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران.

تاریخ دریافت:۹۸/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: به نظر می‌رسد که سیمای سلولی دستگاه تناسلی حیوان تحت تأثیر مراحل و فازهای مختلف سیکل استروس قرار بگیرد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تغییرات سیتولوژی(ایمنی سلولی و پوششی) ترشحات دستگاه تناسلی در مراحل مختلف چرخه استروس گاومیش ماده خوزستان بود.

روش کار: دستگاه‌های تناسلی گاومیش‌های ماده بالغ غیرآبستن و بدون عارضه مشخص از کشتارگاه صنعتی دام اهواز جمع-آوری شد. سیکل استروس براساس ظاهر مورفولوژیکی جسم زرد به مراحل مت‌استروس، اوایل دای‌استروس، اواخر دای‌استروس و پرواستروس به علاوه استروس طبقه‌بندی شد. نمونه‌برداری از ترشحات قسمت‌های مختلف دستگاه تناسلی انجام گردید و با گیمسا رنگ‌آمیزی شدند.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده نشان داد اغلب فراسنجه‌های سیتولوژیکی(ایمنی سلولی و پوششی) ترشحات دهانه داخلی و خارجی گردن رحم و هم چنین ترشحات سطحی بدنه رحم بین مراحل و فازهای چرخه استروس دارای اختلاف آماری معنی-داری نبودند($P>0/05$). درصد ماکروفاژ ترشحات دهانه خارجی گردن رحم در مرحله لوتئال سیکل استروس به‌طور معنی‌داری بیشتر از میزان این سلول در مرحله فولیکولار بود($P<0/05$).

نتیجه¬گیری: به‌طور کلی از تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت که درصد سلول‌های دفاعی و پوششی ترشحات گردن رحم و رحم در مراحل مختلف سیکل جنسی گاومیش ماده خوزستان اغلب یکسان می‌باشد. هرچند، با ارزیابی درصد ماکروفاژهای ترشحات دهانه خارجی گردن رحم می‌توان فاز لوتئال را از فولیکولار تشخیص داد.

واژه‌های کلیدی: ترشحات، سلول‌ها، گاومیش، مجرای تولیدمثلی.

مقدمه

گاومیش یک حیوان بومی ایران در شمال، شمال غرب و جنوب کشور است. برخی از دلایل اصلی کاهش جمعیت گاومیش را می‌توان به عواملی مانند: صنعتی شدن، افزایش تقاضا برای گوشت گاومیش و عدم جایگزینی حیوانات کشتار شده، استفاده نکردن از راه‌کارهای اصلاح نژادی و افزایش آمیزش داخل گونه‌ای که می‌تواند عملکرد پایین صفات تولیدی و تولید مثلی را تحت تأثیر قرار دهد، نسبت داد. هم چنین ضعف در معرفی و تبلیغ فرآورده‌های گاومیش در مقایسه با گاو، باعث کاهش قابل توجه تعداد گاومیش در ایران در این چند دهه گذشته شده است(۳۰). گاومیش رودخانه‌ای در ایران، عمدتاً یک حیوان شیری است که از اهمیت اقتصادی قابل توجهی برخوردار است. میزان بالای چربی شیر گاومیش، آن را به یک منبع مناسب جهت فرآورده‌های شیری تبدیل کرده است(۱۳). گاومیش‌هایی که در جنوب کشور پرورش داده می‌شوند، در مقایسه با گاومیش‌های آذربایجان جثه بزرگ‌تری دارند. گردن حیوان نسبتاً باریک و

www.SID.ir

Archive of SID

طویل می باشد. در نواحی جنوب کشور، گاومیش به‌صورت گله‌های بزرگ نگهداری می‌شود، حتی در مواردی تعداد گله به ۵۰رأس می‌رسد. در خوزستان از گاومیش در امور کارهای زراعی کم‌تر استفاده می‌کنند، بلکه صرفاً از گاومیش در جهت تولید شیر و گوشت استفاده می‌گردد(۳۱). سیکل جنسی حیوانات به‌وسیله نوسانات فیزیولوژیک دوره‌ای سیستم هیپوتالاموس، هیپوفیز- تخمدانی تنظیم می‌شود که آن نیز تحت تأثیر فاکتورهای محیطی و تخمدانی تنظیم می‌شود. سیکل جنسی شامل مراحل پرواستروس(مرحله رشد فولیکولی و رشد آندومتریوم)، استروس(مرحله پذیرش جنسی و تخمک‌گذاری)، در گاومیش تخمک‌گذاری در مرحله متاستروس انجام می‌شود(مشابه گاو)، مرحله متاستروس(مرحله تشکیل و رشد جسم زرد)، مرحله دی‌استروس(مرحله فعالیت جسم زرد که با ایجاد آبستنی کاذب یا حقیقی یا شیرواری می‌تواند فعالیت خود را ادامه دهد)، می‌باشد(۲).

دستگاه تناسلی پستانداران ماده به‌ویژه گاو و گاومیش دارای سیستم ایمنی منحصر بفردی است که باعث حفاظت بخش‌های مختلف آن در مقابل عوامل بیماری‌زا می‌گردد.متخصصین کلینیکال پاتولوژی بیش از ۳۰ نوع مختلف از عوامل بیماری‌زای باکتریایی و ویروسی را تشخیص داده‌اند که می‌توانند با نفوذ در این دستگاه و در حالت‌های مختلف فیزیولوژیکی به‌ویژه در یک چرخه فحلی و یا دوره بعد از زایمان، باعث بروز بیماری‌های مختلف گردند(۳۸). مکانیسم‌هایی که از استقرار باکتری‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب در دستگاه تناسلی ممانعت می‌نمایند، شامل سدهای فیزیکی اسفنکتر فرج و گردن رحم و نیز مکانیسم‌های دفاعی طبیعی بافت‌هایی است که به طور مشخص تحت تأثیر مستقیم عوامل هورمونی درون‌ریز هستند(۷). آلودگی باکتریایی رحم ممکن است طی جفت‌گیری، تلقیح مصنوعی و یا بعد از زایمان ایجاد شود(۱۱،۲۷). نوتروفیل‌ها(سلول‌های چند هسته‌ای)، مونوسیت‌های خون و ماکروفاژهای بافتی از مهم‌ترین عوامل فاگوسیتوز در آلودگی‌های میکروبی می‌باشند. به‌طوری که فاگوسیتوز حاصل از لوکوسیت‌های رحمی به‌ویژه نوتروفیل‌ها آغاز کننده دفاع رحم در برابر عفونت‌های باکتریایی می‌باشند(۲۷، ۲۱). احتمالاً فعالیت لوکوسیت‌های پلی‌مورفونوکلئور در داخل رحم تحت تأثیر مرحله‌ی سیکل فحلی قرار داشته و در استروس بیشتر از دای‌استروس است(۲۴). فعالیت تخمدان‌ها نقش مهمی در مقاومت رحم در مقابل عفونت‌های باکتریایی و یا ریشه‌کن کردن آن‌ها دارد(۳۰). تهاجم نوتروفیل‌ها به پارینواپی تلیوم و حفره داخلی رحم در اواخر پرواستروس تا روزهای سوم الی چهارم بعد از استروس صورت می‌گیرد و این تهاجم همراه با افزایش مقاومت آندومتر در برابر عفونت می‌باشد و در روزهای سوم تا پنجم بعد از استروس تهاجم لوکوسیت‌های بدون دانه به خصوص لنفوسیت‌ها در فضای بافتی لایه عمقی پارین و زیر مخاط آندومتر رحم رخ می‌دهد. تهاجم سلول‌های ائوزینوفیلی از مرحله استروس تا اواسط دوره جنسی ممکن است اتفاق بیفتد ولی این یک پدیده ثابت نبوده و ممکن است دیده نشود(۲۹). ایمنی اکتسابی شامل دو پاسخ مؤثر، ایمنی هومورال و ایمنی سلولی در برابر پاتوژن‌ها می‌باشد. ایمنی هومورال شامل تولید و ترشح ایمونوگلوبولین‌ها توسط لنفوسیت های B می‌باشدکه از طریق گردش خون بدن و مایعات بافتی انتقال می‌یابد. ایمنی سلولی شامل واکنش ایمنی است که توسط گروه‌های مختلفی از لنفوسیت‌های T انجام می‌شود. پاسخ ایمنی علیه آنتی‌ژن صورت می‌گیرد و این یک ویژگی بزرگ و مشخص است(۱۵). مکانیسم‌های دفاعی رحم در برابر میکروارگانیسم‌های آلوده به چندین شکل می‌باشد:آناتومیکی(ساختاری) از طریق پوشش آندومتر با اپیتلیوم ستونی ساده یا مطبق کاذب، شیمیایی توسط ترشحات موکوس از غدد

www.SID.ir

Archive of SID

آندومتر، ایمونولوژیکی از طریق عمل سلول‌های التهابی پلی‌مورفونوکلئور(چند هسته‌ای) و آنتی‌بادی هومورال، اما میزان تعامل آن‌ها هنوز مشخص نیست(۱۴). ایمونوگلوبولین‌ها در ترشحات رحم گاو یافت شده و نقش حفاظتی آن‌ها در برابر عوامل بیماری‌زا به‌طور گسترده گزارش‌شده است(۳۵، ۱۴).آلودگی‌های باکتریایی رحم ممکن است در طول جفت‌گیری و یا تلقیح رخ دهد(۲۱). هم چنین در گاو-میش، آلودگی‌های باکتریایی واژن و دیگر اندام‌های تناسلی خارجی ممکن است در طی غلتیدن در گل‌ولای رخ دهد(۱۰). مکانیسم ایجاد مقاومت آندومتر در فاز فولیکولار ناشناخته است ولی احتمالاً افزایش تعداد لوکوسیت‌های رحم در مرحله فعلی نقش مهمی را در پاکسازی عوامل عفونی وارد شده به رحم در این زمان ایفا می‌کند(۲۳، ۳). در مرحله مزبور باز شدن گردن رحم و افزایش انقباضات میومتر نیز به پاکسازی فیزیکی رحم و خروج میکروارگانیسم‌ها کمک می‌نماید (۲۴). در فاز لوتئال که رحم تحت تأثیر پروژسترون قرار دارد توانایی دفاعی رحم به دلایل زیر کاهش می‌یابد: ۱- pH رحم پایین بوده و برای فعالیت باکتری‌ها مناسب است. ۲- نفوذپذیری بافت پوششی رحم در برابر باکتری‌ها کاهش یافته، لذا سیستم دفاعی رحم کمتر تحریک می‌شود(۱۸). ۳- مهاجرت لوکوسیت‌های خون به رحم با تأخیر انجام شده و فعالیت آن‌ها نیز کاهش می‌یابد(۳،۱۸). ۴- تکثیر لنفوسیت‌ها توسط پروژسترون مهار می‌شود(۲۰). ۵- ترشحات رحمی در این مرحله خاصیت سم‌زدایی ندارند(۱۸). افزایش مقاومت رحم به عفونت باکتریایی در حضور غلظت بالای استروژن ممکن است ناشی از کم بودن غلظت پروژسترون در آن زمان و لذا کاهش آثار زیان‌آور آن برروی آندومتر باشد(۳۲). سلول‌های اپی تلیال در دستگاه تولید مثلی جنس ماده نه‌تنها توانایی تشخیص عوامل عفونی را دارند، بلکه قادر به پاسخ‌گویی به عفونت با تولید ترکیبات ضدمیکروبی، شیمیایی و سیتوکین‌ها می‌باشند. در میان ترکیبات ضد-میکروبی، دفنسین‌ها(defensins)، یک گروه محافظت شده از پپتیدهای کاتیونی است که طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های ضد باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها را نشان می‌دهد(۱۷). دو زیر مجموعه اصلی دفنسین‌عبارتند از الفا و بتا دفنسین که آلفا دفنسین توسط نوتروفیل‌ها و بتادفنسین توسط سلول‌های اپی تلیال و کراتینوسیت-هاتولید می‌شوند(۱۹، ۱۷). هدف از این آزمایش، بررسی ایمنی‌شناسی ترشحات دستگاه تناسلی در مراحل مختلف چرخه استروس گاومیش ماده خوزستانی بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری دستگاه‌های تناسلی گاومیش

برای پژوهش حاضر، دستگاه‌های تناسلی گاومیش-های ماده کشتار شده در کشتارگاه صنعتی دام شهرستان اهواز جهت انتخاب مورد بررسی قرار گرفت. دستگاه‌های تناسلی بالغ، سالم و غیرآبستن انتخاب و در درون کیسه‌های پلاستیکی در داخل یونولیت‌های حاوی یخ خشک سریع به آزمایشگاه فیزیولوژی دام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان واقع در ۳۵ کیلومتری شمال شرقی اهواز انتقال داده شدند. دستگاه‌های تناسلی با تخمدان‌های مشکوک، آنستروس،دارای ساختارهای غیرطبیعی مثل کیست‌های تخمدانی و مواردی هم‌چون رحم‌های عفونی، آبستن، تازه زایمان کرده و در حال جمع شدن و غیرطبیعی حذف شدند. در نهایت تعداد ۲۰ نمونه برای هر مرحله سیکل استروس(در کل ۸۰ دستگاه تناسلی) انتخاب شدند.

تعیین مراحل سیکل استروس و نمونه برداری

براساس ظاهر مورفولوژیکی جسم زرد، چرخه استروس به مراحل متاستروس(روز ۱ تا ۴)، اوایل دای‌استروس(روز ۵ تا ۱۰)، اواخر دای‌استروس(روز ۱۱ تا ۱۷) و پرواستروس به علاوه استروس(فاز فولیکولی)

www.SID.ir

Archive of SID

(روز ۱۸ تا ۲۱) طبقه‌بندی شد(۴۰). به‌طور خلاصه روش تعیین مراحل مختلف سیکل استروس گاومیش به‌صورت زیر بود: مت‌استروس(روزهای ۴-۱) فاصله بین تخمک‌گذاری و زمانی است که اپی تلیوم در طول نقطه پارگی فولیکول رشد می‌کند. در اوایل دی-استروس(روز ۱۰-۵)، جسم زرد کاملاً توسعه یافته، عروق خونی اطراف آن قابل مشاهده بوده، رأس آن قرمز یا قهوه‌ای است و دیگر قسمت‌ها خاکستری رنگ می‌باشد. اواخر دی‌استروس(روز ۱۷-۱۱)، زمانی شروع می‌شود که رنگ قرمز یا قهوه‌ای ناپدید شود و کل رنگ جسم زرد قرمز روشن یا خاکستری باشد. در پرو-استروس به علاوه استروس(روز ۲۱-۱۸)، جسم زرد پس‌رفت کرده، کوچک شده، ظاهری روشن و سفت پیدا می‌کند. با استفاده از سواپ استریل از ترشحات قسمت‌های مختلف دستگاه تناسلی شامل دهانه خارجی گردن رحم(به سمت واژن)، دهانه داخلی گردن رحم(به سمت رحم) و بدنه رحم گسترش بر روی لام تمیز تهیه گردید و پس از خشک شدن در معرض هوا، با استفاده از الکل متانول تثبیت شده و با پس از رنگ-آمیزی گیمسا مورد ارزیابی شمارش تفریقی سلول‌ها قرار گرفت.

تحلیل آماری

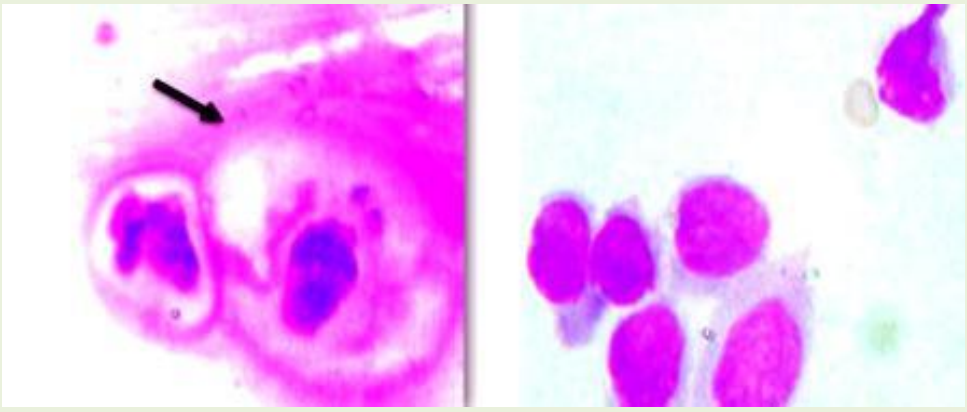
داده‌های حاصل در قالب طرح کامل تصادفی توسط نرم افزار آماری SPSS(ویرایش ۲۰) مورد آنالیز قرار گرفتند. جهت ارزیابی درصد سلول‌های موجود در ترشحات قسمت‌های مختلف دستگاه تناسلی گاومیش در مراحل سیکل استروس از تحلیل واریانس یک طرفه(ANOVA) و آزمون مقایسه‌ای چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

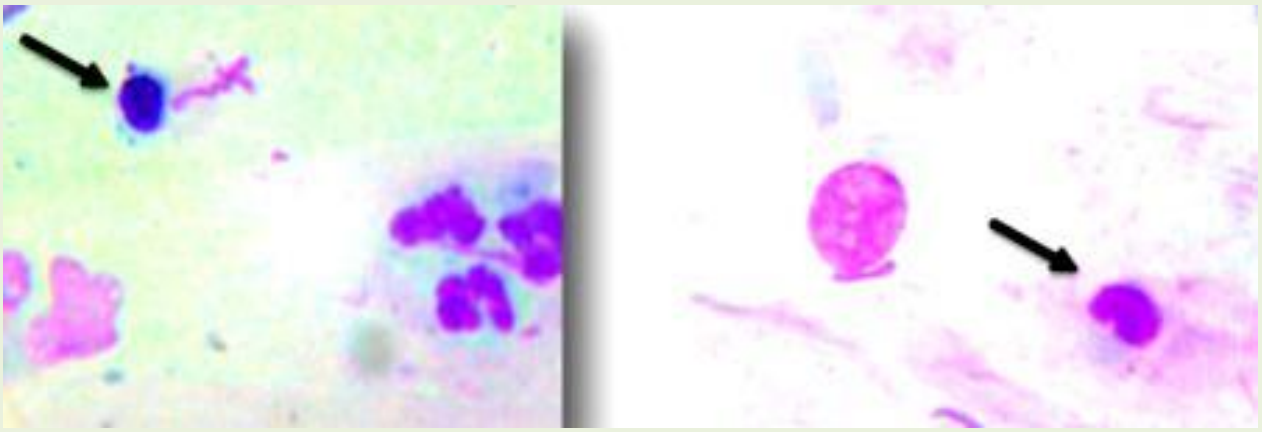
نتایج حاصل از تغییرات سیتولوژی(ایمنی سلولی و پوششی) ترشحات دهانه خارجی گردن رحم، دهانه داخلی گردن رحم و بدنه رحم طی مراحل مختلف سیکل استروس گاومیش ماده خوزستانی در جداول ۱ تا ۳ ارائه شده است. با توجه به نتایج به دست آمده، درصد سلول‌های پوششی، سلول‌های پوششی واکوئل-دار بزرگ، نوتروفیل، لنفوسیت، ماکروفاژ، ائوزینوفیل و بازوفیل ترشحات دهانه خارجی و داخلی گردن رحم و نیز بدنه رحم بین مراحل چرخه استروس(مت-استروس، اوایل دای‌استروس، اواخر دای‌استروس و پرواستروس به علاوه استروس)، اختلاف معنی‌داری نداشتند($P>0/05$)(اشکال ۱ تا ۳). درجدول ۴، تغییرات سیتولوژیکی ترشحات دهانه خارجی گردن رحم گاومیش‌های ماده خوزستانی طی مراحل لوتئال و فولیکولار(به ترتیب مربوط به روزهای ۱۷-۱ و ۲۱-۱۸) سیکل استروس نشان داده شده است. در آنالیز آماری این داده‌ها، فقط درصد ماکروفاژ، طی فازهای لوتئال و فولیکولار دارای اختلاف آماری معنی داری بود، به طوری که درصد ماکروفاژهای ترشحات دهانه خارجی گردن رحم در مرحله لوتئال به‌طور معنی‌داری بیشتر از فاز فولیکولار سیکل استروس بود($P<0/05$). تغییرات سیتولوژیکی ترشحات دهانه داخلی گردن رحم و نیز بدنه رحم تحت تأثیرمراحل لوتئال و فولیکولار سیکل استروس قرار نگرفتند($P>0/05$)(جداول ۵ و ۶).

www.SID.ir

Archive of SID

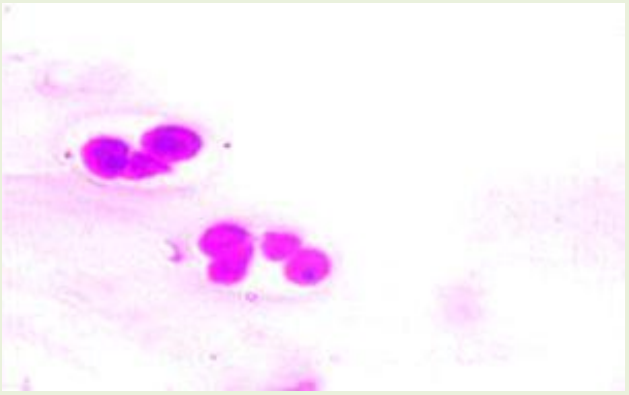


شکل ۱-گسترش ترشحات بدنه رحم(راست) و دهانه خارجی گردن رحم(چپ)(رنگ‌آمیزی گیمسا، بزرگنمایی ۱۰۰۰×). سلول‌های پوششی سلول پوششی بزرگ واکوئل‌دار (فلش)



ماکروفاژ (فلش) لنفوسیت (فلش)

شکل ۳-گسترش ترشحات دهانه خارجی (راست) و داخلی گردن رحم (راست)(رنگ‌آمیزی گیمسا، بزرگنمایی ۱۰۰۰×).



نوتروفیل‌ها

تصویر ۳. گسترش ترشحات دهانه داخلی گردن رحم (رنگ‌آمیزی گیمسا، بزرگنمایی ۱۰۰۰×).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱-درصدمیانگین (±SE)سلول‌های ایمنی و پوششی ترشحات دهانه خارجی گردن رحم طی مراحل سیکل استروس در گاومیش خوزستانEC : سلول پوششی، LVEC (سلول بزرگ واکوئل‌دار).

	EC	LVEC	نوتروفیل	لنفوسیت	ماکروفاژ	ائوزینوفیل	بازوفیل
مت‌استروس	۹۳/۵۱±۱/۷۰	۰/۸۴±۰/۴۰	۳/۱۵±۰/۷۲	۲/۰۲±۰/۸۰	۰/۳۳±۰/۳۳	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۱۶±۰/۱۰
اوایل دای‌استروس	۹۵/۰۲±۱/۰۰	۰/۳۸±۰/۲۲	۱/۹۵±۰/۵۳	۲/۱۵±۰/۶۰	۰/۲۹±۰/۲۱	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۲۱±۰/۱۱
اواخر دای‌استروس	۹۴/۳۶±۰/۹۲	۰/۳۶±۰/۱۵	۱/۷۹±۰/۴۳	۲/۹۶±۰/۴۳	۰/۴۵±۰/۲۲	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۸±۰/۰۸
پرواستروس+ استروس	۹۳/۹۶±۱/۵۸	۰/۳۰±۰/۲۳	۲/۶۰±۰/۸۷	۳/۰۵±۰/۹۲	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۱۰±۰/۱۰

در هر ستون، اختلاف آماری معنی‌داری بین میانگین‌ها یافت نشد (P>۰/۰۵).

جدول ۲-درصدمیانگین(±SE) سلول‌های ایمنی و پوششی ترشحات دهانه داخلی گردن رحم طی مراحل سیکل استروس در گاومیش خوزستانEC : سلول پوششی، LVEC (سلول بزرگ واکوئل‌دار).

	EC	LVEC	نوتروفیل	لنفوسیت	ماکروفاژ	ائوزینوفیل	بازوفیل
مت‌استروس	۹۲/۴۲±۱/۷۰	۰/۵۰±۰/۳۵	۳/۴۹±۰/۶۸	۲/۹۸±۰/۶۸	۰/۳۲±۰/۱۸	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۲۹±۰/۱۵
اوایل دای‌استروس	۹۳/۳۵±۱/۰۰	۰/۴۷±۰/۲۰	۱/۸۱±۰/۵۰	۳/۷۵±۰/۴۷	۰/۴۶±۰/۲۶	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۱۸±۰/۱۲
اواخر دای‌استروس	۹۲/۵۱±۱/۶۴	۰/۶۹±۰/۲۷	۳/۱۳±۰/۶۰	۳/۴۸±۰/۸۹	۰/۱۱±۰/۱۱	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۸±۰/۰۸
پرواستروس+ استروس	۹۱/۶۴±۱/۵۴	۰/۴۸±۰/۲۱	۳/۰۲±۰/۸۵	۴/۱۹±۰/۸۱	۰/۵۲±۰/۲۲	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۱۶±۰/۱۱

در هر ستون، اختلاف آماری معنی‌داری بین میانگین‌ها یافت نشد (P>۰/۰۵).

جدول ۳- درصدمیانگین (±SE) سلول‌های ایمنی و پوششی ترشحات بدنه رحم طی مراحل سیکل استروس در گاومیش خوزستانEC: سلول پوششی، LVEC (سلول بزرگ واکوئل‌دار).

	EC	LVEC	نوتروفیل	لنفوسیت	ماکروفاژ	ائوزینوفیل	بازوفیل
مت‌استروس	۹۴/۳۹±۱/۲۳	۰/۰۰±۰/۰۰	۳/۲۵±۰/۷۶	۲/۰۲±۰/۶۲	۰/۳۳±۰/۳۳	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰
اوایل دای‌استروس	۹۴/۲۲±۱/۰۳	۰/۰۰±۰/۰۰	۲/۸۵±۰/۴۵	۲/۹۳±۰/۶۴	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰
اواخر دای‌استروس	۹۵/۱۲±۰/۹۶	۰/۰۰±۰/۰۰	۲/۰۲±۰/۵۳	۲/۸۶±۰/۴۸	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰
پرواستروس+ استروس	۹۶/۰۸±۰/۸۵	۰/۰۰±۰/۰۰	۱/۷۸±۰/۵۶	۲/۱۳±۰/۴۵	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰

در هر ستون، اختلاف آماری معنی‌داری بین میانگین‌ها یافت نشد (P>۰/۰۵).

جدول ٤-میانگین (±SE) سلول‌های ایمنی و پوششی ترشحات دهانه خارجی گردن رحم طی فازهای سیکل استروس در گاومیش خوزستان

	EC	LVEC	نوتروفیل	لنفوسیت	ماکروفاژ	ائوزینوفیل	بازوفیل
فاز لوتئال	۹۴/۳۰±۰/۷۱	۰/۵۳±۰/۱۶	۲/۲۹±۰/۳۴	۲/۳۸±۰/۳۶	۰/۳۶±۰/۱۴[a]	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۱۵±۰/۰۶
فاز فولیکولار	۹۳/۹۶±۱/۵۸	۰/۳۰±۰/۲۳	۲/۶۰±۰/۸۷	۳/۰۵±۰/۹۲	۰/۰۰±۰/۰۰[b]	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۱۰±۰/۱۰

EC: سلول پوششی، LVEC (سلول بزرگ واکوئل‌دار). در هر ستون، میانگین‌های با حروف نامشابه اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵-میانگین (±SE) سلول‌های ایمنی و پوششی ترشحات دهانه داخلی گردن رحم طی فازهای سیکل استروس در گاومیش خوزستانEC : سلول پوششی، LVEC (سلول بزرگ واکوئل‌دار).

	EC	LVEC	نوتروفیل	لنفوسیت	ماکروفاژ	ائوزینوفیل	بازوفیل
فاز لوتئال	۹۲/۷۶±۰/۷۹	۰/۵۵±۰/۱۶	۲/۸۱±۰/۳۶	۳/۴۰±۰/۳۹	۰/۳۰±۰/۱۱	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۱۸±۰/۰۷
فاز فولیکولار	۹۱/۶۴±۱/۵۴	۰/۴۸±۰/۲۱	۳/۰۲±۰/۸۵	۴/۱۹±۰/۸۱	۰/۵۲±۰/۲۲	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۱۶±۰/۱۱

در هر ستون، اختلاف آماری معنی‌داری بین میانگین‌ها یافت نشد (P >۰/۰۵).

جدول ٦-میانگین (±SE) سلول‌های ایمنی و پوششی ترشحات بدنه رحم طی فازهای سیکل استروس در گاومیش خوزستانEC: سلول پوششی، LVEC (سلول بزرگ واکوئل‌دار).

	EC	LVEC	نوتروفیل	لنفوسیت	ماکروفاژ	ائوزینوفیل	بازوفیل
فاز لوتئال	۹۴/۵۷±۰/۶۱	۰/۰۰±۰/۰۰	۲/۷۱±۰/۳۴	۲/۶۱±۰/۳۴	۰/۱۱±۰/۱۱	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰
فاز فولیکولار	۹۶/۰۹۴±۰/۸۵	۰/۰۰±۰/۰۰	۱/۷۸±۰/۵۶	۲/۱۳±۰/۴۵	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰

در هر ستون، اختلاف آماری معنی‌داری بین میانگین‌ها یافت نشد (P >۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

سیستم تناسلی نشخوارکنندگان تحت تغییرات اساسی طی سیکل استروس قرار می‌گیرد که مبنایی برای تشخیص مراحل مختلف سیکل استروس می‌تواند باشد. مطالعه سیتولوژیکی دستگاه تناسلی از جمله روش‌های شناسایی مراحل سیکل استروس در حیوانات مختلف محسوب می‌شود(۹). ارزیابی سیتولوژیکی ترشحات گردن رحم راه‌کاری برای تشخیص آندومتریت تحت بالینی، برنامه‌ریزی درمانی و پیش‌بینی وضعیت باروری پس از پایان دوره انتظار اختیاری(فاصله زایش تا آبستنی مجدد) گاوهای شیری نیز می‌باشد(۳۹). اولین سیستم دفاعی رحم در مقابل عفونت باکتریایی، عمل بیگانه‌خواری توسط گلبول-های سفید رحم(به طور عمده نوتروفیل‌ها) است. نوتروفیل‌ها اولین خط دفاعی رحم برای مقابله با عوامل پاتوژن بوده و در اوایل پس از زایش جمعیت آن‌ها در ترشحات رحمی بیشتر می‌شود(۳۹). در اغلب گونه‌ها، تحت برتری استروژن(فاز فولیکولار)، دستگاه تناسلی مقاومت خیلی بالایی در برابر عفونت دارد. در حالی که تحت غالبیت پروژسترون(فاز لوتئال)، حساسیت به عفونت تولیدمثلی افزایش می‌یابد(۸، ۶). در تحقیقی، با نمونه‌برداری از مخاط گردن رحم گاو به روش سواپ، اختلاف معنی‌داری در درصد سلول‌ها بین مراحل مختلف سیکل استروس یافت نشد که مشابه با نتایج پژوهش حاضر در گاومیش خوزستان است(۱). در گاو شیری گزارش شده است که کاهش پروژسترون در پرواستروس و احتمالاً افزایش جریان خون باعث افزایش مهاجرت نوتروفیل‌ها به لومن دستگاه تولید مثلی می‌شود. بعد از استروس، مخاط واژن توده‌های لوکوسیت‌ها را نشان می‌دهد(۵). با این حال در گاومیش خوزستانی، با نمونه‌برداری به روش سوآپ، میزان نوتروفیل‌های ترشحات دستگاه تناسلی تحت تأثیر مراحل سیکل استروس قرار نگرفت. در تحقیقی دیگر، درصد پلی‌مورفونوکلئورها از زمان فحلی تا روز ۴ سیکل استروس گاو، بیشتر از سایر مراحل سیکل بود(۱۶). نوسانات هورمون‌های استروئیدی خون در طول چرخه استروس ممکن است بر فعالیت لوکوسیت رحم تأثیر بگذارد. افزایش غلظت پروژسترون خون گاو،موجب مهار فعالیت فاگوسیتیک نوتروفیل‌های رحم شد(۳۶). در دای‌استروس، چیرگی پروژسترون ممکن است موجب مهار سنتز پروتئین‌های ایمنی بدن در لومن رحم که تکثیر لنفوسیت‌ها را آغاز

www.SID.ir

Archive of SID

می‌کنند، شود(۱۲). برخلاف این مشاهدات در گاو، غالب بودن پروژسترون در دوره دای‌استروس و نیز کل فاز لوتئال گاومیش خوزستان در تحقیق حاضر، با کاهش سیستم ایمنی گردن و بدنه رحم همراه نبود. در مطالعه دیگر و هم‌سو با این نتایج ، هیچ یافته‌ای مبنی بر این که فعالیت فاگوسیتیکی نوتروفیل‌های گردش خون گاو تحت تأثیر چرخه استروس قرار گرفته باشد، حاصل نشد(۳۶). در پژوهش قبلی ما بر روی گاومیش آذربایجانی که درصد سلول‌های دفاعی صرفاً در ترشحات دهانه خارجی گردن رحم و فقط در قالب دو فاز کلی لوتئال و فولیکولار سیکل استروس مورد ارزیابی قرار گرفت، تفاوت معنی‌داری برای درصدکل سلول‌های پوششی و ایمنی سلولی ترشحات بین دو فاز فوق یافت نشد(۹). تفاوت مشاهدات حاضر در گاومیش خوزستانی با یافته‌های پژوهش فوق در گاومیش آذربایجانی، مربوط به درصد ماکروفاژهای ترشحات دهانه خارجی گردن رحم است که در تحقیق اخیر، درصد آن در فاز لوتئال به‌طور معنی‌داری بیشتر از فولیکولار بود. بر خلاف سایر گونه‌های بررسی شده، به نظر می‌رسد که سیستم دفاعی دستگاه تولیدمثل گاومیش در تمام مراحل سیکل استروس در حد بالا حفظ شود(۹). احتمال دارد هورمون‌های استروژن و پروژسترون با غلظت‌های متفاوت با توجه به مراحل مختلف چرخه تولید مثل، نقش مهمی در تنظیم سطح ایمنی و پاکسازی عفونت رحمی داشته باشند(۲۸). کاهش پروژسترون در پرواستروس و احتمالاً افزایش جریان خون رحم عاملی برای افزایش مهاجرت نوتروفیل‌ها به لومن دستگاه تولید مثل بیان شده است(۱۵). تصور می‌شود پروژسترون فاز لوتئال با کاهش سنتز ایکوزانوئیدها، از جمله پروستاگلندین‌ها و لوکوترین‌ها بر عملکرد سیستم ایمنی رحم تأثیر منفی داشته باشد(۲۰). پروژسترون عاملی برای سرکوب پاسخ‌های پرولیفراتیو لنفوسیت‌های گردش خون گاو نیز شناخته شده است(۳۳). با این حال، مکانیسم اصلی عدم کاهش ایمنی سلولی مخاط دستگاه تناسلی گاومیش خوزستان طی فاز لوتئال در تحقیق حاضر و گاومیش آذربایجان در تحقیق قبلی نامعلوم است(۹). در پژوهش حاضر معلوم شد که اکثریت سلول‌های دفاعی ترشحات دهانه خارجی گردن رحم در هر دو فاز فولیکولار و لوتئال، نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها هستند. هم‌چنین، درصد ماکروفاژها در فاز لوتئال بیشتر از فاز فولیکولار سیکل استروس گاومیش خوزستان بود. ماکروفاژها نقش بسیار مهمی در تولید فسفاتاز و سیتوکین‌ها در فاز لوتئال دارند. هم‌چنین در عمل لانه-گزینی موفق نیز مشارکت دارند. از سوی دیگر، ماکروفاژها در فاگوسیتوز سلول‌های غیرطبیعی آندومتر و حذف پاتوژن‌ها دخالت دارند. بنابراین، تغییرات هورمون‌های جنسی در مراحل مختلف سیکل استروس تأثیر چشمگیری بر فعالیت و تراوشماکروفاژها دارد(۳۴). مطالعات در خصوص بررسی تغییرات سلول‌های پوششی ترشحات دستگاه تناسلی به خصوص گردن رحم و بدنه رحم در مراحل مختلف سیکل استروس بسیار محدود است. در تحقیقی، با نمونه-برداری از ترشحات گردن رحم گاو در مراحل مختلف سیکل استروس،کم‌ترین درصد سلول‌های پوششی مربوط به مرحله مت‌استروس بود. اما درصد سلول‌های پوششی بزرگ واکوئل‌دار اختلاف معنی‌داری بین مراحل سیکل استروس نداشت(۵). در مطالعه حاضر، درصد سلول‌های پوششی و پوششی بزرگ واکوئل‌دار قسمت‌های مختلف دستگاه تناسلی گاومیش خوزستان تحت تأثیر مراحل سیکل استروس قرار نگرفتند. در بررسی تغییرات سلول‌های دفاعی رحم و واژن موش، بیشترین درصد سلول‌های رحم مربوط به مرحله استروس بود. در حالی که اختلاف درصد این سلول‌ها در واژن حیوان بین مراحل سیکل استروسمعنی‌دار نبود(۲۵). تغییرات هورمونی در فازهای مختلف سیکل

www.SID.ir

Archive of SID

استروس بر مهاجرت نوتروفیل‌ها به مخاط گردن رحم گاو تأثیر دارد، طوری که درصد نوتروفیل‌ها طی مرحله مت‌استروس به طور معنی‌داری به بیشترین میزان خود رسید. در مقابل، درصد سلول‌های پوششی بزرگ واکوئل‌دار تحت تأثیر غلظت پروژسترون خون قرار نگرفت. پروژسترون موجب مهار سیستم ایمنی و مستعد شدن رحم به عفونت‌های غیراختصاصی می‌شود(۳۹) .با مطالعه بر روی میش، درصد سلول‌های پوششی، پوششی بزرگ واکوئل‌دار، نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها تحت تأثیر وجود یا عدم وجود جسم زرد تخمدانی قرار نگرفتند(۴) که مشابه با نتایج مطالعه ما در گاومیش خوزستان است. به‌طور کلی از تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت که ایمنی سلولی و پوششی ترشحات گردن رحم و رحم در مراحل و فازهای مختلف سیکل جنسی تقریباً یکسان بوده، ضمن این که دستگاه تناسلی گاومیش ماده خوزستانی در مراحل لوتئال سیکل استروس با افت سیستم ایمنی سلولی مواجه نمی‌شود، بلکه درصد ماکروفاژهای دهانه خارجی گردن رحم افزایش یافت. هم‌چنین، تشخیص مراحل مختلف سیکل استروس با بررسی سیتولوژیکی ترشحات دستگاه تناسلی گاومیش خوزستانی مقدور نمی‌باشد. هرچند، با در نظر گرفتن میزان ماکروفاژهای ترشحات دهانه خارجی گردن رحم، فاز لوتئال را از فولیکولار می‌توان تمییز داد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از پشتیبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان در اجرای این تحقیق تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

۱-احمدی، د. م. ر.، نظیفی، م.ر.، تفتی، س.، خداکرم، ع.، صفایی، ب. ۱۳۸۳. بررسی مقایسه ای تغییرات یاخته ای ترشحات گردن و مخاط رحم گاو در دو روش سوآب و آسپیراسیون. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۵۹، شماره ۴، ۳۱۷-۳۱۵.

۲-شهروز، م.، مشمولیان، م. ۱۳۸۲. مطالعه هیستولوژیکی و هیستومورفومتری رحم گاومیش در مراحل مختلف دوره جنسی. مجله دامپزشکی. دانشگاه تهران. دوره ۵۸، شماره ۱، ۵۹-۵۳.

۳-هورشتی، پ.، بلورچی، م. ۱۳۷۵. تکنیک‌های تشخیصی و درمانی در تولید مثل دام. تألیف: زمیانس، ریموند. چاپ دوم، انتشارات نوربخش، تهران، صفحات ۷۴-۷۲ .

4.Ahmadi, M.R., Nazifi, S. (2006). Evaluation of reproductive status with cervical and uterine cytology in fat-tailed sheep. Comp. Clin. Pathol, 15; 161-164.

5.Ahmadi, M.R., Nazifi, S., Ghaisari, H.R. (2006). Comparison of hormonal changes of estrous cycle with cytology of cervical mucosa and hematological parameters in dairy heifers. Comp. Clin. Pathol, 15; 94-97.

6.Ahmadi, M.R., Nazifi, S., Gheisari, H.R. (2000). Cytology changes in heifers, cervical mucosa at different phases of the estrus cycle. In Proceedings: 14th international congress animal reproduction, Stockholm, Sweden; 52.

7.Arthur, G.H., Noakes, D.E., Pearson, H. (1996). Veterinary reproduction and obstetrics. W.B. saunders company Ltd., PP: 5-27, 667-674.

8.Ayen, E., Hasanzadeh, S., Abdollahvand, M. (2002). Alternations in mucosa membrance of vagina during different stages of pregnancy, estrus and di-estrus in cow. J. Vet. Med. Univ. Tehran, 57; 15-19.

9.Ayen, E., Hasanzadeh, SH., Tabatabaei, S. (2012). Defensecells profile of cervical mucous during follicular and luteal phases of estrus cycle in river buffalo. Vet. Res. Forum, 3(1); 45-48.

10. Azawi, O.I. (2006). Clinical, bacterio logical and pathological studies of uterine infections in Iraqi buffaloes. Doctoral dissertation, Ph.D. thesis, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq.

11. Azawi, O. I. (2008). Postpartum uterine infection in cattle. Anim. Reprod. Sci, 105(3); 187-208.

12. Chacin, M.F.L., Hansen, P.J., Drost, M. (1990). Effects of stage of the estrous cycle and steroid treatment on uterine immunoglobulin content and poly morpho nuclear leukocytes in cattle. Theriogenology, 34; 1169-1184.

www.SID.ir

Archive of SID

13. Dalir-Naghadeh, B., Seifi, H.A., Asri-Rezaei, S., Pilevary, N. (2006). Post-parturient haemoglobinuria in Iranian river buffaloes: a preliminary study. Comp. Clin. Pathol, 14(4); 221-225.

14. Dhaliwal, G. S., Murray, R. D., Dobson, H., Montgomery, J., Ellis, W. A. (1996). Presence of antigen and antibodies in serum and genital discharges of cows from dairy herds naturally infected with Leptospira interrogans serovar hardjo. Res. Vet. Sci., 60; 157-167.

15. Dhaliwal, G. S., Murray, R. D., Woldehiwet, Z. (2001). Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. Anim. Reprod. Sci., 67; 135-152.

16. Faundez, R., Duszewska, A.M., Klucinski, W. (1994). Occurrence of leukocytes and epithelial cells in the lumen of the reproductive tract during the ovarian cycle. In Proceedings: 18th world Buiatrics congress and 26th congress of the Italian Association of Buiatrics, Bologna, Italy, 1; 305-308.

17. Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nature reviews immunology, 3(9); 710-720.

18. Gunnink, J.W. (1973). Thesis, University of Utrecht. 143-160. Qouted by: Paisley, LG, Mickelsen, WB. And Anderson, PB. 1986. Theriogenology, 25(3); 353-381.

19. Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Wehkamp, K., Schwichtenberg, L., Schröder, J. M. (2004). Differential gene induction of human β-defensins (hBD-1,-2,-3, and-4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. J. Invest. Derm., 123(3); 522-529.

20. Herath, S., Fischer, D.P., Werling, D., Williams, E.J., Lilly, S.T., Dobson, H. (2006). Expression and function of toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. Endocrinol, 147; 562-570.

21. Hussain, A.M., Daniel, R.C.W., O'Boyle, D. (1990). Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. Theriogenology, 34(2); 291-302.

22. Jainudeen, M. R. (1986). Reproduction in water buffalo. Current Therapy in Theriogenology, 25(3); 343-353.

23. Jones, T.C., Hunt, R.D., King, N.W. (1997). Veterinary pathology. 6th. Williams and Wilkins Co, Baltmore, United States America, 1154-1184.

24. Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. (2007). Pathology of domestic Animals, 3,5th ed., Academic Press Inc., Edinburg, 466-470.

25. Kaushice, C., Frauendorrif, E., Rossoll, R.M., Richardson, J.M., Wira, C.R. (1998). Influence of the estrous cycle on the presence and distribution of immune cells in the rat reproductive tract. Am. J. Reprod. Immunol, 39(3); 209-216.

26. Kluciński, W., Targowski, S.P., Winnicka, A., Miernik-Degórska, E. (1990). Immunological induction of endometritis-model investigations in cows. Transbound. Emerg. Dis, 37; 148-153.

27. Lewis, G.S. (1997). Uterine health and disorders. J. Dairy Sci., 80(5); 984-994.

28. Lewis, G.S. (2003). Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. Reprod. Biol. Endocrin, 1(1); 117.

29. Morrow, D.A. (1986). Reproduction in water buffalo, Current therapy in Therioonology. 2th ed. 443-449.

30. Paisley, L.G., Mickelsen, W., Anderson, P.B. (1986). Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: a review. Theriogenology, 25(3); 353-381.

31. Pour Azary, M., Pirmohammadi, A., Manafi-azar, R.Q. (2004). Breeding of buffalo in west azarbaijan of Iran. Philippines of the 7th World Buffalo Congress, 35-537.

32. Roth, J.A., Kaeberle, M.L., Apple, L.H., Hachreinerr, R.F. (1983). Association of increased estradiol and progesterone blood values with altered bovine polymorphonuclear leucocyte function. American J. Vet. Res., 44; 247-253.

33. Segerson, E. C., Gunsett, F.C. (1993). Interference with the cytolytic activity of interleukin-2-treated lymphocytes by bovine uterine luminal protein. Biol. Reprod, 48; 1036-1041.

34. Shahrooz, R., Razi, M., Babai, A. (2013). Histochemical study of river buffalo's uterine endometrium in follicular and luteal phases. Iran. J. Vet. Res, 14(4); 320-326.

35. Taha, M.B., Azawi, O.I. (2003). A preliminary study of endometritis in Iraqi buffaloes. Iraq J. Vet. Sci., 17; 201-208.

36. Vandeplassche, M. (1984). Stimulation and inhibition of phagocytosis in domestic animals. In 10. international congress on animal reproduction and artificial insemination. University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois. USA, 475-477.

www.SID.ir

Archive of SID

37. Watson, E. D. (1985). Opsonising ability of bovine uterine secretions during the oestrous cycle. Vet. Res, 117; 274-275.
38.W.H.O. (2001). Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. World Health Organisation, Genevo.
39. Yavari, M., Haghkhah, M., Ahmadi, M.R., Gheisari, H.R., Nazifi, S. (2009). Comparison of cervical and uterine cytology between different classification of postpartum endometritis and bacterial isolates in Holstein dairy cows. Inter. J. Dairy Sci., 4(1); 19-26.
40. Yilmaz, O., Yazici, E., Kahraman, A., Ozenc, E., Ucar, M. (2014). The relationship between ovarian follicle population and follicle size during different stages of estrous cycle in Anatolian water buffaloes (*Bubalus bubalis*). Revue. Med. Vet, 165; 111-115.

www.SID.ir

Cytological Study of Genital Secretions at Various Stages of Estrous Cycle in Khuzestan Buffalo

M. Maghsodinejad[1], **S.Tabatabaei Vakili[2]**, M. Mamouei[3]

1.M.Sc. Animal Physiology, Khuzestan Agricultural and Natural Resources University, Ahvaz, Iran

2.Associate Professor, Animal Science Department, Khuzestan Agricultural and Natural Resources University, Ahvaz, Iran. tabatabaei@ramin.ac.ir

3.Professor, Animal Science Department, Khuzestan Agricultural and Natural Resources University, Ahvaz, Iran.

Received:2019.17. 6 **Accepted: 2019.22.10**

Abstract

Inroduction & Objective: It seems that the cellular appearance of the animal's reproductive system to be affected by the stages and phases of the estrous cycle.The aim of this study was to evaluate the cytological variations (cellular immunity and epithelial cells) of genital secretions at different stages of estrous cycle in female Khuzestan buffalo.

Materials and Methods: Reproductive organs of the adult, non-pregnant and apparently healthy female buffaloes were collected from the slaughterhouse of Ahvaz. According to the morphological appearance of the corpus luteum, the estrous cycle was classified to metestrous, early diestrous, late diestrous and proestrous plus estrous phases. Samples were collected from secretions of different parts of the genital tract and stained with Giemsa method.

Results: The results showed that the percentage of most of the cytological parameters (immune and epithelial cells) of the internal and external cervical discharge as well as superficial secretion of the uterus body were not statistically differ between the stages and phases of the estrous cycle ($P>0.05$). The percentage of macrophage in external os secretions of cervix in the luteal phase of the estrous cycle was significantly higher than that of the follicular phase ($P<0.05$).

Conclusion: Generally, from the present study in female Khuzestan buffalo it can be concluded that the most of immune and epithelial cell percentages of cervix and uterine at different stages of estrous cycle was similar. However, by evaluation the percentage of macrophages in external os secretion of cervix, the luteal phase of estrous cycle can be distinguished from the follicular phase.

Key word: Buffalo, Cells, Reproductive Tract, Secretion.

www.SID.ir