



JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

اثر تزریق فلونیکسین مگلو مین بر نرخ باروری و تغییرات سرمی پروژسترون در تلیسه های هلشتاین

مهدی روستایی^{۱*}، جعفر یدی^۲، سعید خلیج زاده^۱

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، گروه علوم دامی، ساوه، ایران

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، گروه دامپزشکی، ساوه، ایران

* نویسنده مسئول: hamedroostaie@gmail.com

دوره سوم، شماره اول، بهار ۱۳۹۱

صفحات ۳۹-۳۵

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی اثر سه تزریق فلونیکسین مگلو مین بعد از تلقیح بر نرخ باروری و تغییرات عیار سرمی پروژسترون در تلیسه های هلشتاین انجام گرفت. تلیسه های هلشتاین (n = ۳۲) با میانگین وزن ۳۵۷ ± ۵ کیلو گرم و سن حدود ۱۵ ماه به وسیله پروتکل Ovsynch همزمان سازی فحلی و سپس تلقیح اجباری شدند. تلیسه ها به صورت تصادفی در دو گروه کنترل (n = ۱۶)، و تیمار فلونیکسین مگلو مین (n = ۱۶)، قرار گرفتند. به تلیسه های گروه تیمار فلونیکسین مگلو مین به میزان ۱/۱ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم از وزن بدن در بعد از ظهر روز ۱۵، صبح روز ۱۶ و بعد از ظهر روز ۱۶ بعد از تلقیح، به صورت داخل عضلانی تزریق شد و به تلیسه های گروه کنترل سرم فیزیولوژیک در همین زمانها تزریق شد. به منظور بررسی میزان باروری در روزهای ۳۰ و ۶۰ پس از تلقیح سونوگرافی رکتال صورت گرفت. همچنین به منظور بررسی تغییرات میزان پروژسترون، قبل از تزریقات، در میان دوره و پس از پایان تزریقات از تلیسه های هر دو گروه خون گیری به عمل آمد. نرخ باروری در گروه تیمار فلونیکسین مگلو مین در روز ۳۰ برابر با ۶۲/۵% و در گروه کنترل برابر با ۲۵% بود ($P < ۰/۰۵$) و در روز ۶۰ در گروه تیمار فلونیکسین مگلو مین ۵۶% و در گروه کنترل ۲۵% بود ($P > ۰/۰۵$). میانگین غلظت پروژسترون پلاسمای تلیسه های تیمار فلونیکسین مگلو مین ($۲/۶۲ \pm ۰/۱۶۶$ -ng/ml) نسبت به گروه کنترل ($۱/۸۷ \pm ۱۱$ -ng/ml) در پایان تزریقات بالا تر بود ولی از نظر آماری معنی دار نبود. در تلیسه ها اثر سودمند ۳ تزریق فلونیکسین مگلو مین به طور محتمل به واسطه اثر آنتی لوتولایتیک آن می باشد که ترشح پروستاگلاندین $F2\alpha$ را مهار کرده و باعث افزایش قدرت زنده ماننی جنین گاو می شود.

واژه های کلیدی: فلونیکسین مگلو مین، نرخ باروری، پروژسترون، پروستاگلاندین $F2\alpha$ ، آنتی لوتولایتیک



JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 3(1)35-39, 2012

Effect of Flunixin Meglumine injection on conception rate and plasma progesterone changes in Holstein heifers

Roostaie, M.^{1*}, Yadi, J.², Saeed Khalajzadeh, S.¹

1- Department of Animal Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

2- Department of Veterinary, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

* Corresponding author: hamedroostaie@gmail.com

Abstract

The objective of this study was to examine the effects of administration of Flunixin Meglumine on conception rates and plasma progesterone (P4) changes in Holstein heifers and inhibition of PGF_{2α} synthesis just before luteolysis. 32 Holstein heifers (15-month-old, BW: 357±5kg) were synchronized utilizing Ovsynch protocol and artificially inseminated. The heifers were assigned randomly to a treatment group (n=16) and a control group (n=16). The treatment group were injected intramuscularly three times on days 15.5, 16 and 16.5 post insemination with 1.1 mg/kg bodyweight Flunixin Meglumine whereas control group received placebo. Blood samples were collected on days 15.5, 16 and 16.5 post insemination for analysis of plasma P4 concentrations. Pregnancy was diagnosed on days 30 and 60 by transrectal ultrasonography. On day 30, 10 of the treated heifers were pregnant compared with 4 of the control heifers (P<0.05); on day 60, 9 of the treated heifers were still pregnant compared with 4 of the control heifers (P>0.05). Mean plasma progesterone concentrations on day 16.5 in treated heifers (2.62±0.66 ng/ml-1) was higher than control group (1.87±1 ng/ml-1) but this improvement was not statistically significant (P>0.1). The results of this study support the hypothesis that Flunixin Meglumine is able to inhibit the uterine synthesis of PGF_{2α} and increase the survival of early embryos.

Key words: Flunixin Meglumine, PGF_{2α}, conception rate, progesterone, Ovsynch

(۱۷). داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی داروهایی هستند که تولید پروستاگلاندین های مرتبط با ایجاد پاسخ های التهابی را متوقف می کنند (۱۸). فلونیکسین مگلو مین یک داروی ضد التهاب غیر استروئیدی قوی است که به وسیله ممانعت از آنزیم سیکلواکسیژناز از تبدیل آراشیدونیک اسید به پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ جلوگیری می کند (۱). تزریق درون عضلانی به وسیله فلونیکسین مگلو مین غلظت متابولیت پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ (PGFM)، سرم گاوهای غیر شیرده را برای حداقل ۱۲ ساعت کاهش می دهد (۶). هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر سه تزریق فلونیکسین مگلو مین بعد از تلقیح بر نرخ باروری و تغییرات عیار سرمی پروژسترون در تلیسه های هلشتاین بود.

مواد و روش کار

این تحقیق در تابستان ۱۳۹۰ و در یک مجتمع تولید شیر و گوشت واقع در ورامین به انجام رسید. از ۳۲ رأس تلیسه هلشتاین (وزن $357 \pm 5/52$ ، سن ۱۵ ماه) برای این طرح استفاده شد. برای تمام حیوانات در هر گروه آزمایشی جیره مشابه به صورت جیره کاملاً مخلوط، بر اساس پایه CNCPS، تنظیم شده به وسیله نرم افزار CPM، فراهم می شد. تلیسه ها روزانه ۲ بار تغذیه می شدند. دمای بدن و ضربان قلب تلیسه ها برای عدم وجود تفاوت معنی دار اندازه گیری شده و همه حیوانات از طریق توشه رکتال برای تعیین وضعیت تخمدان و صحت و سلامت دستگاه تناسلی توسط دامپزشک گله مورد معاینه قرار گرفتند.

تلیسه ها به وسیله ۲ تزریق GnRH (CinnaRelin®, ScioGen Ltd, Iran) به میزان ۱۰۰ mg و پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ (Lutalyse®, Pfizer, USA), $F_{2\alpha}$ به ۲۵ mg با فاصله ۷ روز که متعاقب آن تلیسه ها دوز دیگری از GnRH را ۴۸ ساعت پس از پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ دریافت کردند (Ovsynch) همزمان سازی فحلی شده و ۱۶ ساعت بعد تلقیح اجباری شدند. تمامی تلقیح ها توسط تکنسین

از دست رفتن آبستنی به واسطه مرگ های جنینی مشکلی اساسی است که هر ساله ضربه اقتصادی جبران ناپذیری را به صنعت پرورش گاوهای شیری و گوشتی وارد می کند. لفاح در ۹۰ تا ۱۰۰ درصد گاو ها به وسیله جفت گیری یا تلقیح مصنوعی اتفاق می افتد (۱۰). اما نرخ باروری (Conception rate) پایین نشان دهنده مرگ اوایل جنینی در این حیوانات می باشد. در نشخوار کنندگان فیدبک مثبت بین پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ رحمی و اکسی توسین موجب تحلیل جسم زرد می شود (۴)، اما حفظ جسم زرد و ادامه ترشح پروژسترون برای برقرار ماندن آبستنی این حیوانات ضروری است (۸). مشخص شده است که نا هماهنگی بین مادر و جنین، فاکتوری است که باعث از دست رفتن آبستنی و مرگ جنین می شود (۵). گزارشات نشان داده است که میزان قابل توجهی از تلفات جنینی در نتیجه غیر همزمانی توسعه جنین و توسعه محیط رحم رخ می دهد (۱۳). تحقیقات نشان داده است که اکثر مرگ های جنینی در گاو به واسطه ناتوانی جنین در تولید میزان کافی از اینترفرون-تاو (INF- τ)، برای آغاز شناسایی آبستنی توسط مادر (Maternal recognition of pregnancy)، رخ می دهد (۱۶). بدون میزان کافی از INF- τ ، رحم شروع به آزاد سازی پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ می کند که باعث تحلیل جسم زرد و کاهش تولید پروژسترون می شود (۱۴). جنین های با رشد آهسته شاید قادر به ترشح مقادیر کافی از INF- τ ، در زمان حیاتی تحلیل جسم زرد (روزهای ۱۵ تا ۱۷ آبستنی) نباشند، یعنی هنگامی که ترشح پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ باید تقلیل یابد تا از جسم زرد حمایت شود (۲). دو فاکتور تعیین کننده نرخ سنتز و ترشح پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ ، در دسترس بودن آراشیدونیک اسید و اندوپروکسید سنتازها می باشند (۱۵). اندوپروکسید سنتازها تحت عنوان سیکلواکسیژنازها (COX-1,2) مشهور هستند، که سیکلواکسیژناز-۱، ایزوفرم ساختمانی و سیکلواکسیژناز-۲، ایزوفرم القاء پذیر می باشد

آزمون ناپارامتریک کای-اسکور (chi-square) و اثر تیمارها بر میزان هورمون پروژسترون به وسیله آزمون t دو نمونه مستقل نرم افزار آماری SPSS، تجزیه و تحلیل شد، سطح معنی دار بودن آزمون برابر ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

در روز ۳۰ آبستنی ۱۰ رأس از تلیسه های تیمار فلونیکسین مگلو مین (۶۲/۵٪)، در قیاس با ۴ رأس از تلیسه های گروه کنترل (۲۵٪)، آبستن بودند ($P < 0/05$). در روز ۶۰ آبستنی ۹ رأس از تلیسه های گروه فلونیکسین مگلو مین (۵۶٪)، در قیاس با ۴ رأس از تلیسه های گروه کنترل (۲۵٪) آبستن بودند ($P > 0/05$). برای نرخ تلفات جنینی روز ۳۰ تا ۶۰ بین دو گروه از نظر آماری تفاوت معنی دار مشاهده نشد (جدول-۱).

در میزان غلظت پروژسترون پلازما در روز ۱۵/۵ (قبل از تیمار)، ۱۶ (میان دوره) و ۱۶/۵ (پایان دوره) بین دو گروه تفاوت معنی داری وجود نداشت ($P > 0/1$) هرچند که میزان پروژسترون گروه تیمار فلونیکسین مگلو مین نسبت به گروه کنترل در پایان دوره یعنی روز ۱۶/۵ بالاتر بود (جدول-۲).

تلقیح و اسپرم های یکسان تأیید شده، انجام شده و روز تلقیح مصنوعی به عنوان روز صفر تعیین شد. تلیسه ها به صورت تصادفی در دو گروه تیمار ($n=16$)، و کنترل ($n=16$)، جای داده شدند، تلیسه های گروه تیمار ۳ بار به صورت داخل عضلانی به میزان ۱/۱ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم از وزن بدن در بعد از ظهر روز ۱۵، صبح روز ۱۶، و بعد از ظهر روز ۱۶ به فاصله ۱۲ ساعت فلونیکسین مگلو مین (Flunex[®], Razak, Iran) دریافت کردند و به گروه تلیسه های کنترل سرم فیزیولوژیک تزریق شد. نرخ باروری، درصد تلیسه هایی که به وسیله اولتراسونوگرافی در روزهای ۳۰ و ۶۰ پس از تلقیح مصنوعی آستن تشخیص داده شدند (6 to 8 MHz, linear-array transrectal real-time ultrasonography) تعریف شد. برای تعیین میزان غلظت پروژسترون پلازما قبل از تزریقات، در میان دوره و پس از پایان تزریقات از تلیسه های هر دو گروه از ورید میانی دم به میزان ۱۰ سی سی خون گیری به عمل آمده و نمونه های خون در دمای ۴°C ذخیره شده و در ۳۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سرم حاصل تا آنالیز در دمای ۲۰°C- نگهداری شده و سپس به وسیله کیت الیزا میزان پروژسترون اندازه گیری شد. آنالیز آماری: اثر تیمارها بر روی نرخ باروری با استفاده از

جدول ۱- مقایسه نرخ باروری (CR)، نرخ مرگ جنینی بین گروه تیمار و کنترل

P value	گروه کنترل	گروه فلونیکسین مگلو مین	
	۱۶	۱۶	تعداد کل تلیسه
	۴	۱۰	تلیسه های آستن
۰/۰۳۳	^a ۲۵	^b ۶۲/۵	نرخ باروری روز ۳۰ (%)
۰/۰۷۲	۲۵	۵۶	نرخ باروری روز ۶۰ (%)
	۰	۱	تعداد مرگ جنین (روز ۳۰ تا ۶۰)
۰/۵۱۲	۰	۱۰	مرگ جنینی (%)

a, b: در هر ردیف اعدادی که با حروف متفاوت نشان داده شده اند، دارای اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ می باشند ($P < 0/05$)

جدول ۲- میانگین (± انحراف معیار) غلظت پروژسترون (P4) پلازما بین دو گروه تیمار و کنترل

روز ۱۶/۵ (ng/ml ⁻¹)	روز ۱۶ (ng/ml ⁻¹)	روز ۱۵/۵ (ng/ml ⁻¹)	
۱/۸۷±۱	۱/۹۳±۱/۱۷	۲/۶۲±۰/۹	گروه کنترل
۲/۶۲±۰/۶۶	۱/۸۹±۰/۸۹	۲/۳۵±۱/۳۶	گروه فلونیکسین مگلو مین

بحث و نتیجه گیری

در تلیسه های شیری نرخ لقاح نزدیک به ۱۰۰ درصد است و تقریباً ۴۰ درصد از تلفات جنینی بین روزهای ۸ تا ۱۷ آبستنی رخ می دهد (۱۶). بنابراین هر کوششی برای کاهش مرگ جنین در اوایل دوره بارداری می تواند منجر به نرخ آبستنی بالاتر در گاوها شود. فلونیکسین مگلومین یک داروی ضد التهاب قوی و جلوگیری کننده از سیکلواکسیژناز است که از این طریق از تبدیل آراشیدونیک اسید به پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ جلوگیری می کند (۱). تزریق داخل عضلانی این دارو غلظت ۱۵- کتو- دی هیدرو پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ (PGFM) یعنی متابولیت پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ را برای حداقل ۱۲ ساعت کاهش می دهد (۶). در تحقیقی فلونیکسین مگلومین از افزایش غلظت PGFM ایجاد شده به وسیله اکسی توسین در روز ۵ بعد از تلقیح مصنوعی در گاو جلوگیری کرد (۷). همچنین خوراندن گرانول های فلونیکسین مگلومین به مدت ۹ روز که شروع تیمار از روز ۱۵ چرخه فحلی بود تعداد پالس های PGFM را کاهش داده و به صورت معنی داری طول سیکل فحلی را افزایش داد (۱۲). در یک تحقیق تاثیر داروی ضد التهاب غیر استروئیدی ایبوپروفن لیسینات (مهارکننده سیکلواکسیژناز) در هنگام انتقال جنین بر روی ۱۰۰ رأس تلیسه فریژین ایتالیایی مورد مطالعه قرار گرفت. بعد از انتقال جنین ها به تلیسه ها، به نیمی از آن ها به میزان ۵ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم از وزن بدن به صورت داخل عضلانی ایبوپروفن تزریق شده و به نیمی دیگر از تلیسه ها سرم فیزیولوژیک تزریق شد و باعث بهبود قابل توجهی در نرخ آبستنی حیوانات تیمار ایبوپروفن لیسینات مشاهده شد ($P < 0.05$) (۳).

در تحقیقی دیگر تزریق درون عضلانی گاوهای گوشتی به وسیله فلونیکسین مگلومین به میزان ۱/۱ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم از وزن بدن در روز ۱۴ پس از تلقیح مصنوعی باعث افزایش نرخ آبستنی و کاهش PGFM آنها نسبت به گروه کنترل شد (۱۱). نتیجه این تحقیقات از این فرضیه که فلونیکسین مگلومین از ترشح رحمی پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$

جلوگیری کرده و قابلیت زنده مانن گاو را افزایش می دهد حمایت می کند. نرخ آبستنی با لاتر در گروه تیمار فلونیکسین مگلومین بیان کننده این نکته است که ۳ تزریق فلونیکسین به فاصله ۱۲ ساعت در حوالی زمان تحلیل جسم زرد در گاو توانایی نجات جنین گاو از مرگ را دارد که این اثر می تواند در نتیجه کاهش سنتز پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ باشد، که در غیر این صورت می توانست باعث تحریک و راه اندازی فرایند تحلیل جسم زرد شود. ثابت شده است که جنین های با رشد ضعیف و نا کافی در هنگامی که جسم زرد باید حمایت شود تا از تحلیل آن جلوگیری شود مقادیر کم و غیر قابل کشف از $INF-\tau$ را تولید می کنند و آشکار شده که برخی از جنین ها از نظر توسعه به قدری ضعیف هستند که غلظت $INF-\tau$ در مایع رحمی غیر قابل اندازه گیری می باشد (۹). اینترفرون τ رها سازی ضربانی وابسته به اکسی توسین، پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ را از اندومترיום رحم کاهش داده و بنابراین موجب افزایش طول عمر جسم زرد میشود (۱۵). در تحقیقات انجام شده قبلی نیز ضد التهاب های غیر استروئیدی ایبوپروفن و فلونیکسین مگلومین توانسته بودند که اثرات نامطلوب پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ بر جنین گاو را کاهش دهند (۳ و ۱۱). رژیم دارویی به کار رفته در این تحقیق می تواند از سنتز پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ جلوگیری کرده یا آن را کاهش داده باشد و تحلیل جسم زرد را به تأخیر انداخته و بدین وسیله یک زمان اضافی را برای جنین هایی که توسعه آهسته دارند فراهم کرده باشد تا میزان کافی از $INF-\tau$ را برای برقراری MRP تولید کنند.

در نتیجه گیری کلی میتوان گفت ۳ تزریق فلونیکسین به فاصله ۱۲ ساعت در حوالی زمان تحلیل جسم زرد در گاو توانایی کاهش مرگ جنینی در تلیسه ها را دارد، که این اثر می تواند در نتیجه جلوگیری از ترشح پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ ، از رحم و تخمدان باشد. ممکن است پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ به طور مستقیم نیز در این دوره زمانی اثر سمی برای جنین داشته باشد که نیازمند مطالعات بیشتر است.

References

1. Anderson, K. L., Neff-Davis, C. A., Davis, L. E., Bass, V. D. (1990) Pharmacokinetics of flunixin meglumine in lactating cattle after single and multiple intramuscular and intravenous administrations. *American Journal of Veterinary Research* 51: 1464-1467.
2. Binelli, M., Thatcher W.W., Mattos, R., Baruselli, P.S (2001) Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 56: 1451-1463.
3. Elli, M., Gaffuri, B., Frigerio, A., Zanardelli, M., Covini, D., Can diani, M., Vignali, M. (2001) Effect of a single dose of Ibuprofen lysinate before embryo transfer on pregnancy rates in cows. *Reproduction* 121:151-154
4. Flint A.P.F., Stewart H.J., Lamming G.E., Payne J.H (1992) Role of oxytocin receptor in the choice between cyclicity and gestation in ruminants. *J. Reprod. Fertil.* 45 (Suppl): 53-58.
5. Green, M.P., Hunter, M.G., Mann, G.E. (2005) Relationship between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 88: 179-189.
6. Guilbault, L. A., Thatcher, W. W., Drost, M., Haibel, G. K. (1987) Influence of a physiological infusion of prostaglandin F2 α into postpartum cows with partially suppressed endogenous production of prostaglandins. 1. Uterine and ovarian morphological responses. *Theriogenology* 27: 931-946.
7. Lemaster, J. W., Seals, R. C., Hopkins, F. M., Schrick, F. N.(1999) Effects of administration of oxytocin on embryonic survival in progestogen supplemented cattle. *Prostaglandins* 57:259-268.
8. Mann, G. E., Lamming, G. E. (1995) Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 104: 1-5.
9. Mann, G. E., Lamming, G. E. (2001) Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121:175-180.
10. Maurer, R. R., Chenault, J. R. (1983) Fertilization failure and embryonic mortality in parous and nonparous beef cattle. *J. Anim. Sci.* 56:1186-1189
11. Merrill, M. L., Ansotegui, R. P., Burns, P. D., MacNeil, M. D., Geary, T. W. (2007) Effects of flunixin meglumine and transportation stress on pregnancy establishment in beef cows. *J. Anim. Sci.* 85:1547-1554.
12. Odensvik, K., Gustafsson, H., Kindahl, H. (1998) The effect on luteolysis by intensive oral administration of flunixin granules in heifers. *Animal Reproduction Science* 50: 35-44
13. Pope W.F. (1998) Uterine asynchrony: a cause of embryonic loss. *Biol. Reprod.* 39: 999-1003.
14. Thatcher, W. W., Guzeloglu, A., Mattos, R., Binelli, M., Hansen, T. R., PRU, J. K. (2001) Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology* 56: 1435-1450.
15. Thatcher, W. W., Meyer, M. D., Danet-Desnoyers, G. (1995) Maternal recognition of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 49 (Suppl.) 15-28.
16. Thatcher, W. W., Staples, C. R., Danet-Desnoyers, G., Oldick, B., Schmitt, E.P. (1994) Embryo health and mortality in sheep and cattle. *Journal of Animal Science* 72 (Suppl. 3) 16-30.
17. Vane, J.R., Botting, R.M. (1996) Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand. J. Rheumatol.* 102 (Suppl.) 9-21.
18. Vane, J. R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.* 231:232-235.