Archive of SID

DOI: 10.22092/vj.2017.111696

شماره ۱۱۶ پاییز ۱۳۹۶

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی مراحل چرخه فحلی در موش‌های Balb/c

• **نوید داداش‌پور دواچی (نویسنده مسول)**
بخش تحقیق، پرورش و تولید حیوانات آزمایشگاهی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

• **روزبه فلاحی**
بخش تحقیق، پرورش و تولید حیوانات آزمایشگاهی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

• **علیرضا یوسفی**
بخش تحقیق، پرورش و تولید حیوانات آزمایشگاهی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

• **محمد علی منصوری**
بخش تحقیق، پرورش و تولید حیوانات آزمایشگاهی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵-۰۳-۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۰۴-۲۳

Email: navid.d.davachi@gmail.com

چکیده

در جوندگان چرخه تولید مثل با نام چرخه فحلی شناخته می‌شود. این چرخه برخلاف سایر پستانداران اهلی، در جوندگان بسیار کوتاه مدت است. طول کوتاه چرخه فحلی این حیوانات را به مدلی مناسب برای مطالعات دستگاه تولید مثل، ارزیابی تاثیر عوامل بیرونی از جمله داروها، و تنش‌های تغذیه‌ای تبدیل نموده است. باتوجه به اهمیت شناخت دقیق ویژگی‌های چرخه تولید مثل در موش‌ها به ویژه در سویه‌های همخون از جمله Balb/c که در قیاس با سویه‌های غیرهمخون نرخ تولید نتاج پایین‌تری را نشان می‌دهند، هدف از طراحی مطالعه پیش رو ارایه روشی ساده و قابل اطمینان به منظور ارزیابی وضعیت چرخه تولید مثل این حیوانات می‌باشد. در موش و رت شناسایی مراحل مختلف چرخه فحلی بر اساس نسبت انواع مختلف سلول‌های مشاهده شده در تراوشات واژن صورت می‌گیرد. به منظور اجرای آزمایش ۵ سر موش Balb/c و ۵ سر موش NMRI مورد ارزیابی روزانه قرار گرفتند. مدت نمونه گیری ۲۰ روز در نظر گرفته شد. در طول دوره آزمایش موش‌ها به صورت نامحدود به آب و غذا دسترسی داشتند. چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی در طول دروه آزمایش رعایت می‌شد. نمونه‌ها در بین ساعت ۹ الی ۱۱ صبح با استفاده از سرم فیزیولوژی جمع‌آوری و پس از تثبیت شدن با استفاده از رنگ کریستال ویولت، رنگ آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار می‌گرفتند. داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که انواع سلول‌ها و نسبت آنها در طول ۴ مرحله چرخه فحلی به ترتیب شامل: ۱) مرحله پرواستروس با ۲ نوع سلول شامل سلول شاخی و سلول اپیتلیال می‌شود، ۲) مرحله استروس با یک نوع سلول که شامل سلول‌های شاخی می‌باشند قابل شناسایی است، ۳) مرحله مت-استروس با ۲ جمعیت سلولی شامل سلول شاخی و لوکوسیت قابل شناسایی است، ۴) دی-استروس با یک جمعیت سلولی مشتمل از سلول‌های لوکوسیت قابل شناسایی می‌باشد.

کلمات کلیدی: استروس، جوندگان، چرخه فحلی، واژن

www.SID.ir

Archive of SID

● Veterinary Researches & Biological Products No 116 pp: 274-279

Evaluation of Balb/c mice estrous cycle stages

By: Dadashpour Davachi N., (Corresponding Author), Department of Research, Breeding and Production of Laboratory Animals, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; Fallahi R., Department of Research, Breeding and Production of Laboratory Animals, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; Yousefi A.R., Department of Research, Breeding and Production of Laboratory Animals, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; Mansouri M.A., Department of Research, Breeding and Production of Laboratory Animals, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Email: : navid.d.davachi@gmail.com

Received: 2016-06-20 Accepted: 2016-07-13

Reproductive cycle in rodents is known as estrous cycle. In rodents, the duration of the estrous cycle is shorter than other mammals. The shortened estrous cycle made rodents as a suitable animal model to evaluate the impact of drug treatment, nutritional effect, and stress on reproductive cycle. In bread mouse like BALB/c showed significant decrease in case of reproductive efficiency. The aim of the present study was to find simple and reliable method for detection of different stages of estrous cycle in rodents, especially in mice. One of the proposed methods in estrous cycle monitoring would be the conventional vaginal sampling. In the present study, this method has been modified. To conduct the study we use 10 mice. Mice had ad libitum accessed to water and food. The light cycle was 12:12 (L/D). All the samples were collected between 9-11 A.M. Sampling was performed using 100 µL sampler and physiological slain solution. Results of the present study revealed that a combination of three different cell types were detectable during Pro-estrous (nuclear epithelial cells, cornified epithelial cells), Estrous (cornified epithelial cells), Met-estrous (cornified epithelial cells, and leucocytes), and Di-estrous (leucocytes).

Key words: Estrus; Rodents; Estrous Cycle; Vagina

مقدمه

تعیین مراحل چرخه فحلی به عنوان روشی کارآمد برای انتخاب موش آماده جفتگیری به منظور ایجاد آبستنی با زمان مشخص، ایجاد آبستنی کاذب و یا رد یابی مراحل مختلف چرخه فحلی به عنوان یکی از معیارهایی که ممکن است مسیر تحقیقات را تحت تاثیر قرار دهد، از اهمیت بسزایی برخوردار است. در موش چرخه فحلی به ۴ مرحله مجزا (پرو-استروس، استروس، مت-استروس، و دی-استروس) تقسیم می‌شود. این مراحل هر ۴ یا ۵ روز تکرار می‌شوند. عواملی مانند آبستنی، آبستنی کاذب، یا انستروس از جمله شرایطی هستند که منجر به اختلال در چرخه فحلی می‌شود (۲). تغییراتی که در چرخه فحلی موش به وقوع می‌پیوندد در فیزیولوژی و آناتومی این حیوانات قابل شناسایی است. این تغییرات را می‌توان به واسطه روش‌های متعدد از جمله ارزیابی سیتولوژی[1] واژن (۲)، اندازه‌گیری شدت جریان الکتریسیته، ارزیابی تغییرات بیوشیمیایی ادرار، و مشاهده تظاهرات خارجی واژن مورد ارزیابی قرار داد (۱). ارزیابی سلول‌های واژن به عنوان یکی از دقیق‌ترین روش‌های شناسایی مراحل مختلف چرخه فحلی موش در نظر گرفته می‌شود. روش ارزیابی تغییرات سلولی واژن زمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد که تعیین دقیق هر یک از مراحل ۴ گانه چرخه فحلی لازم است. در روش ارزیابی شدت جریان الکتریکی، لایه سلولی اپیتلیالی واژن در خلال مرحله پرو-استروس مقاومت بالاتری در مقابل عبور شدت جریان الکتریکی در مقایسه با سایر مراحل چرخه فحلی را از خود بروز می‌دهد. یکی از محدودیت‌ها این روش عدم توانایی آن در مشخص نمودن سایر مراحل چرخه است. روش ارزیابی تظاهرات خارجی واژن به عنوان سریع ترین روش در شناسایی مراحل مختلف چرخه فحلی به حساب می‌آید. از مزیت‌های ارزیابی ظاهری واژن کاهش خطر القا آبستنی کاذب یا ایجاد آسیب فیزیکی به مخاط واژن به حساب می‌آید. موش‌هایی که در مرحله پرو-استروس و یا استروس باشند آماده جفتگیری بوده و پس از جفتگیری می‌توانند آبستنی یا آبستنی کاذب ایجاد نمایند. طبق گزارش‌های منتشر شده از آزمایشگاه Jackson، گروه علوم تولید مثل بیش از ۹۰٪ از موش‌های انتخاب شده در مرحله پرو-استروس یا استروس با موفقیت بعد از یک شب جفتگیری آبستن می‌شوند (۱). فراگرفتن ارزیابی چرخه فحلی با استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

از روش ارزیابی ظاهری و یا روش ارزیابی سلولی واژن نیازمند تمرین است. در این مقاله روشی ساده بدون نیاز به وارد نمودن وسیله نمونه برداری به داخل واژن به همراه فایل ویدیویی مربوط ارایه شده است.

مواد و روش‌ها

آماده سازی مواد مورد نیاز

به منظور تهیه نمونه استریل از واژن موش آب دوبار تقطیر را اتوکلاو نموده و درب آن با پارافیلم به خوبی مسدود شده، در دمای اتاق نگهداری می‌شود. به منظور رنگ آمیزی نمونه‌ها از رنگ کریستال ویولت ۰.۱٪ استفاده شد. در روز نمونه گیری با افزودن ۰.۹ گرم NaCl به ۱۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر محلول نمکی مورد نیاز برای نمونه برداری تهیه می‌شد.

موش

موش‌های سویه BALB/c و NMRI در قفس‌های پلی‌کربنات به صورت انفرادی نگهداری می‌شدند و چرخه نوری به صورت ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی درنظر گرفته شد. ساعت آغاز روشنایی ۶ صبح و ساعت آغاز تاریکی ۶ بعد از ظهر تنظیم شده بود. همچنین آب و غذا به صورت نامحدود در اختیار تمام موش‌ها قرار داشت. سن موش‌های بالغ بین ۹ تا ۱۳ هفته و حداقل وزن آنها ۳۰ گرم و حداکثر وزن ۳۵ گرم در نظر گرفته شده بود.

تعیین مرحله چرخه فحلی

در ابتدا با استفاده از ارزیابی نظاهرات بیرونی واژن مرحله تقریبی چرخه فحلی مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس با استفاده از ارزیابی سلولی واژن مرحله شناسایی شده مورد رد یا تایید قرار می‌گرفت.

روش ارزیابی ظاهری مراحل مختلف چرخه فحلی موش‌ها

به منظور تعیین مرحله چرخه فحلی، موش‌ها از ناحیه دم به صورتی که دست‌های موش میله‌های قفس را گرفته بودند مهار می‌شدند (شکل ۱). باز شدن واژن هر موش ماده براساس معیارهایی که توسط Champlin (۴) توضیح داده شده است، مورد ارزیابی قرارگرفت. تصاویر به وسیله دوربین دیجیتال ثبت و برای هر موش جداگانه نگهداری شد. در مرحله پرو-استروس تظاهرات بیرونی واژن به صورت متورم، مرطوب، و صورتی رنگ بروز می‌نماید. منفذ واژن باز شده و اغلب دارای لبه‌ها یا تاخوردگی‌های طولی می‌باشد. زمانی که موش وارد مرحله استروس می‌شود رنگ واژن به صورتی کمرنگ تبدیل می‌شود، میزان رطوبت آن کمتر، و مقدار تورم آن نیز کاهش می‌یابد. مت-استروس به واسطه بسته شدن واژن، عدم وجود تورم در ناحیه واژن و رنگ متمایل به زرد قابل تشخص است. در مرحله دی-استروس مقدار بازشدگی واژن بسیار کوچک و تقریبا بسته، بدون هیچ گونه تورم بافتی قابل شناسایی می باشد.

روش ارزیابی سلولی واژن

سرسمپلر ۱۰۰ میکرولیتری را به سمپلر متصل نموده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نمکی آماده شده آسپیره می‌شد. موش را مطابق روشی که در شکل یک نشان داده شده است مهار نموده و سپس بدون اینکه نوک سر سمپلر وارد واژن موش شود اقدام به پیپت نمودن محلول نمکی در نزدیکی منفذ واژن می‌شد. دفعات پیپت نمودن ۴ الی ۵ دفعه درنظر گرفته شده بود. پس از آن محتوای موجود در سرسمپلر برروی لام تخلیه می‌شد. پس از آن به نمونه اجازه داده می‌شد که در دمای اتاق خشک شود (۱). برای مشاهده فایل تصویری کلیک نمایید.

شکل ۱. نحوه مهار کردن موش به منظور ارزیابی وضعیت واژن و تخمین مرحله چرخه فحلی

www.SID.ir

Archive of SID

رنگ آمیزی نمونه‌های سلولی واژن ومشاهده آنها

به منظور رنگ آمیزی محلول رنگ کریستال ویولت را در ظرف مخصوص رنگ آمیزی تخلیه نموده و پس از آن به آرامی لام را وارد آن نموده و به مدت یک دقیقه اجازه شناور شدن نمونه در رنگ داده می‌شد. پس از گذشت یک دقیقه لام وارد ظرف آب دوبار تقطیر شده و به مدت یک دقیقه شستشو می‌شود، سپس مجداد این مرحله در ظرف دیگر تکرار می شود (زمان شستشو، یک دقیقه). پس از اتمام مراحل شستشو لام‌ها در دمای اتاق خشک می‌شدند. پس از خشک شدن کامل لام، با استفاده از روغن صدر و با تنظیم عدسی شی ×۱۰۰ میکروسکوپ به ارزیابی وضعیت سلولی نمونه‌ها پرداخته می‌شد.

نتایج

وضعیت سلولی

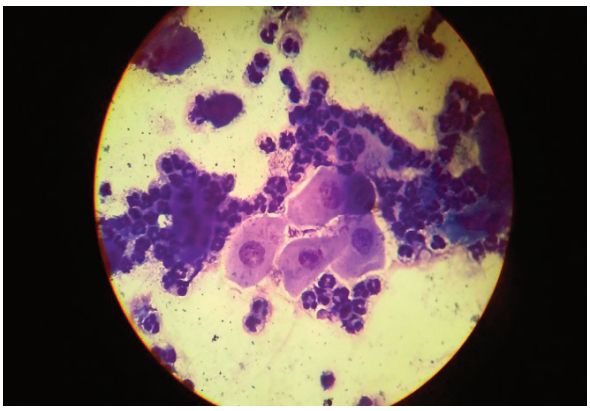
سه جمعیت متفاوت سلولی در نمونه‌های حاصل از واژن قابل شناسایی می‌باشند که شامل ۱) سلول‌های اپیتلیال هسته دار ، ۲) سلول‌های شاخی اپیتلیال، و ۳) لوکوسیت‌ها می‌باشند. سلول‌های هسته‌دار اپیتلیال دارای سیتوپلاسم کم رنگ‌تر و هسته‌ای نسبتا پررنگ‌تر که بیضی شکل می‌باشند، قابل شناسایی است (شکل ۲). سلول‌های مسطح شاخی اپیتلیال با ویژگی رنگ پذیری یکنواخت و ظاهری چند وجهی قابل تشخصی هستند. این سلول‌ها فاقد هسته می‌باشند (شکل ۳). جمعیت سوم سلولی قابل شناسایی لوکوسیت‌های چندهسته‌ای هستند که با ظاهری کروی و هسته‌هایی به رنگ بسیار تیره و اندازه‌ای کوچکتر از سایر جمعیت‌های سلولی موجود در نمونه واژنی قابل شناسایی هستند (شکل ۴).

تعیین مرحله چرخه فحلی

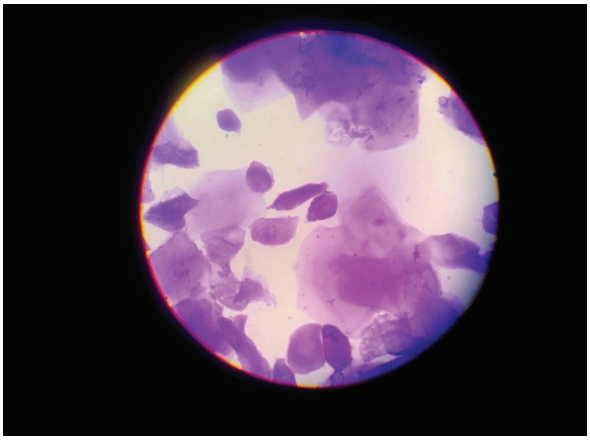
نسبت تقریبی انواع سلول‌های مشاهده شده در نمونه‌های واژن را می‌توان به عنوان ابزاری دقیق در تعیین مرحله چرخه فحلی دانست. در زمان پرو-استروس حضور سلول‌های اپیتلیال هسته‌دار شاخص تعیین این مرحله از چرخه فحلی می‌باشد. در زمان استروس تنها یک جمعیت سلولی که شامل سلول‌های شاخی بدون هسته هستند، قابل تشخیص می‌باشد. در زمان مت-استروس لوکوسیت‌های با هسته تیره جمعیت غالب سلولی می‌باشند. گاها امکان مشاهده سلول‌های شاخی اپیتلیال در نمونه‌های واژنی به همراه لوکوسیت‌ها نیز وجود دارد (شکل ۵). در زمان دی-استروس ممکن است به ندرت سلول‌های شاخی به همراه جمعیت کثیری از سلول‌های لوکوسیت مشاهده شوند. وجه تمایز بین مت-استروس و دی-استروس حضور تعداد کمی سلول‌های هسته‌دار اپیتلیالی در زمان دی-استروس می‌باشد (شکل ۶).

بحث

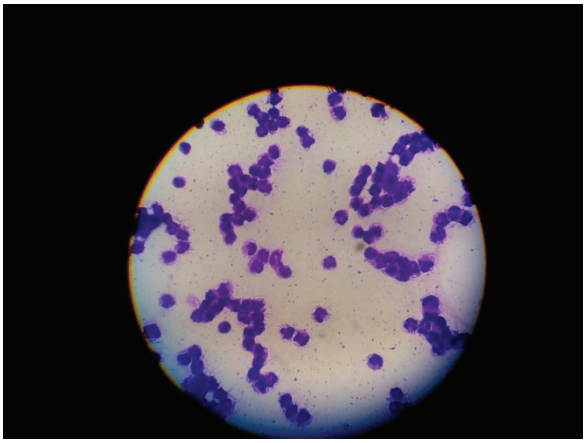
تغییرات در ترکیب و جمعیت سلولی نشان دهنده تغییرات بنیادی در وقایع تراوشات درون ریز هورمون‌های تولید مثلی و تغییرات در محور هیپوفیز-هیپوتالاموس-تخمدان است. مرحله پرواستروس چرخه فحلی منطبق بر مرحله فولیکولی چرخه تولید مثلی انسان است و به واسطه افزایش پیش از رهایش تخمک در هورمون -۱۷بتا استرادیول به وقوع



شکل ۲. سلول‌های هسته دار اپیتلیال (مرکز تصویر) به همراه سلول‌های لوکوسیت موجود در نمونه سلولی واژن



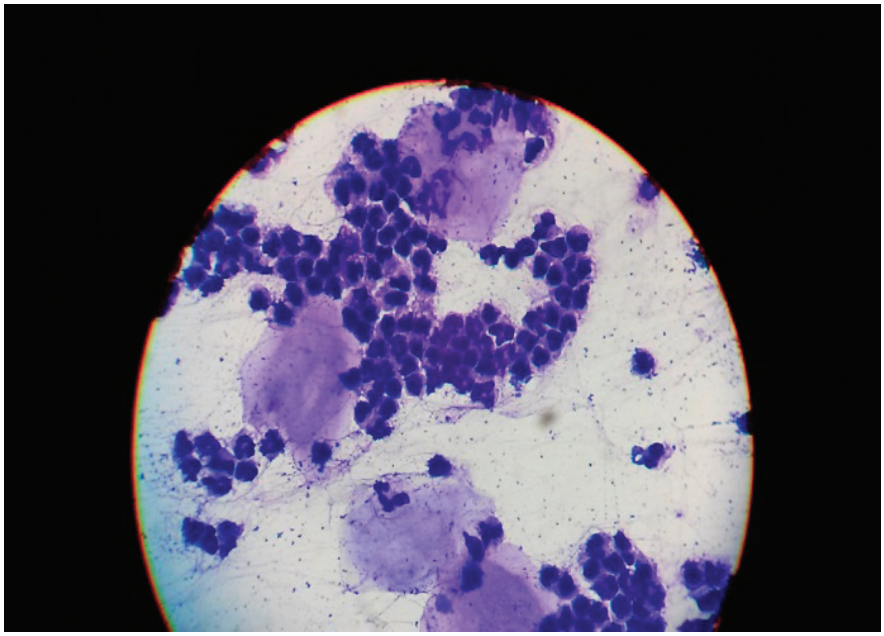
شکل ۳. سلول‌های شاخی اپیتلیال موجود در نمونه سلولی واژن (مرحله استروس)



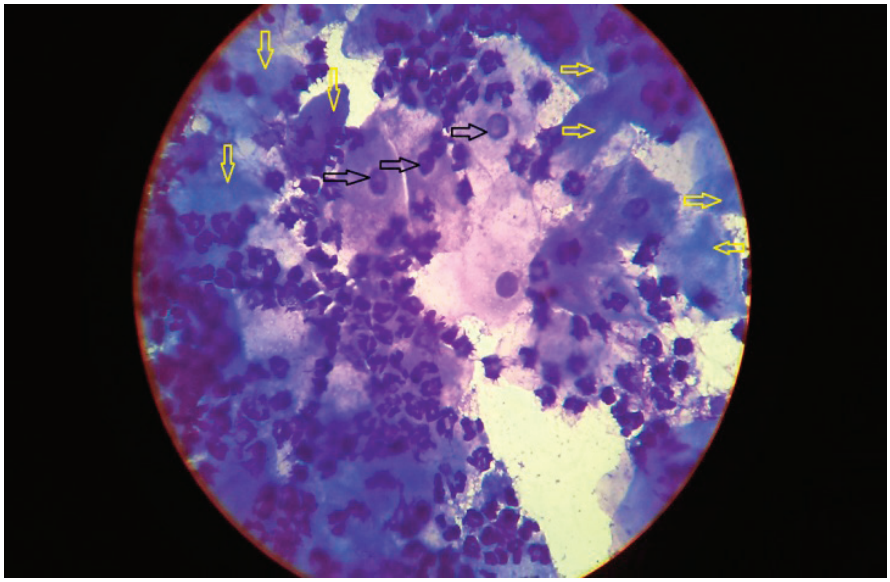
شکل ۴. جمعیت لوکوسیت‌های موجود در نمونه سلولی واژن

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵. جمعیت غالب لوکوسیت به همراه تعداد کمی سلول شاخی نشان دهنده مرحله مت-استروس



شکل ۶. جمعیت غالب لوکوسیت به همراه تعداد کمی سلول اپیتلیال هسته دار و تعداد نسبتا بیشتر سلول شاخی نشان دهنده مرحله دی-استروس

می‌پیوندد، همچنین این افزایش همراه با افزایش جزیی در مقدار هورمون پرولاکتین می‌باشد. افزایش در مقدار هورمون -۱۷ بتا استرادیول به صورت غیرمستقیم محرک آزادسازی هورمون آزاد کننده گونادوتروپین[۳] از نرون‌های موجود در هیپوتالاموس به حساب می‌آید و در نهایت منجر به تاثیر بر هیپوفیز پیشین و تحریک آن برای آزادسازی هورمون لوتئینه کننده (LH[۴]) می‌شود. در نمونه‌های واژنی که از حیوانات در مرحله پرو-استروس تهیه شده است سلول‌های اپیتلیال هسته‌دار جمعیت غالب به حساب می‌آیند. افزایش نهایی (پیک[۵]) در سطح هورمون FSH منجر به

www.SID.ir

Archive of SID

ایجاد پیام نهایی برای رهایش تخمک و ورود به مرحله استروس می‌شود. در زمان استروس سطح -۱۷بتا استرادیوال کاهش می‌یابد و پرولاکتین به بیشنه خود می‌رسد. ویژگی جمعیت سلولی در این مرحله شامل غالبیت سلول‌های شاخی اپیتلیال می‌باشد. ورود به مرحله مت-استروس همزمان با افزایش ادامه یابنده در سطح هورمون پروژسترون به وقوع می‌پیوندد. این مرحله با مرحله لوتئال چرخه تولید مثل انسان قابل مقایسه است. در نهایت ورود به مرحله دی-استروس در موش پس از پایان مت-استروس به وقوع می‌پیوندد، در این مرحله سطح پروژسترون به بیشینه خود می‌رسد. این مرحله مطابق با مرحله نهایی فاز لوتئال است. پس‌رفت جسم زرد منجر به کاهش فوری در سطح پروژسترون می‌شود. در مرحله دی-استروس جمعیت غالب سلولی مشتمل بر لوکوسیت‌ها است. پراکنش سلول‌های شاخی کاهش یافته و سلول‌های هسته دار اپیتلیال قابل شناسایی می‌شوند که این اتفاقات بلافاصله پیش از آغاز ورود به پرو-استروس به وقوع می‌پیوندد (۱ و ۲).

به طور کلی این روش ساده می‌تواند به عنوان روشی به منظور تخمین روزانه نوسانات هورمونی در موش و تعیین مرحله چرخه فحلی محسوب شود. چناچه رعایت تمام استانداردهای ذکر شده در این مقاله سرلوحه کار قرار بگیرد هیچ گونه خللی در روند طبیعی چرخه فحلی حیوان مشاهده نخواهد شد. نکات زیر به منظور حفظ سلامت دستگاه تولید مثل موش لازم می‌باشد: نمونه گیری نباید بیش از یکبار در روز صورت بگیرد. از ورود هرنوع وسیله ای به داخل واژن خودداری شود، در غیر این صورت بروز واکنش‌های التهابی غیرقابل اجتناب می‌باشد که منجر به افزایش حضور لوکوسیت‌ها و سایر جمعیت‌های سلولی شود که در نهایت تفسیر نتایج را بامشکل مواجه خواهد نمود. ماده‌هایی که در کولونی‌های ماده صرفا نگهداری می‌شوند ممکن است که دچار توقف در چرخه فحلی شوند و نشانه‌هایی از دی-استروس طولانی را از خود نشان دهند (۵).

پاورقی

1- Cytology
2- crystal violet
3- Gonadotropin-releasing hormone
4- luteinizing hormone
5- (Peak)

منابع مورد استفاده

1- Achiraman, S., Archunan, G., SankarGanesh, D., Rajagopal, T., Rengarajan, R.L., Kokilavani, P., Kamalakkannan, S., Kannan, S., 2011. Biochemical Analysis of Female Mice Urine with Reference to Endocrine Function: A Key Tool for Estrus Detection. *Zoological Science* 28, 600-605.

2- Allen, E., 1922. The oestrous cycle in the mouse. *American Journal of Anatomy* 30, 297-371.

3- Bernard, R.T., Hall, J., 1995. Failure of the estrous cycle and spermatogenesis to respond to day length in a subtropical African rodent, the pouched mouse *(Saccostomus campestris)*. *Biol Reprod* 52, 1291-1295.

4- Champlin, A.K., Dorr, D.L., Gates, A.H., 1973. Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. *Biol Reprod* 8, 491-494.

5- McLean, A.C., Valenzuela, N., Fai, S., Bennett, S.A., 2012. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp,* e4389.

www.SID.ir