

بررسی تغییرات سطوح سرمی هورمون های استروئیدی به همراه ریلاکسین جهت تشخیص آبستنی در هفته پنجم آبستنی در سگ

محمد شجاعی خواه^۱، قادر نجفی^{۲*}

چکیده

اندازه‌گیری مقادیر هورمون ریلاکسین سرمی به‌عنوان نشانگری اختصاصی برای تشخیص آبستنی در سگ‌های ماده شناخته می‌شود که حدود ۲۴ تا ۳۰ روز پس از تخمک‌گذاری قابل تشخیص است. در مقابل، سطح پروژسترون به دلیل افزایش آن در هر دو حالت بارداری و غیربارداری، نمی‌تواند به‌تنهایی نشان‌دهنده وضعیت بارداری باشد. سونوگرافی ابزار ارزشمندی است، اما آزمایش‌های ریلاکسین به همراه اندازه‌گیری هورمون‌های استروئیدی نظیر استروژن و پروژسترون می‌تواند جایگزینی عملی باشد. این مطالعه تحقیقی مقطعی با هدف بررسی همبستگی سطوح هورمونی و وضعیت آبستنی سگ‌ها در هفته چهارم و پنجم پس از جفت‌گیری انجام شد. ۲۰ قلاده سگ ماده از نژادهای مختلف انتخاب و نمونه‌های خونی برای اندازه‌گیری هورمون‌ها جمع‌آوری شد. افزایش معنی داری در سطح ریلاکسین (۳۹.۴٪)، پروژسترون (۱۶۳.۲٪) و استروژن (۶۶.۴٪) از هفته چهارم به پنجم مشاهده شد ($p < 0.001$). این افزایش‌ها در گروه آبستن به وضوح بیشتر از گروه‌های دیگر بود و سطح سرمی ریلاکسین به اوج قابل تشخیص (تا ۴۵ نانوگرم بر میلی لیتر) رسید. هفته پنجم به‌عنوان نقطه طلایی برای سنجش قطعی آبستنی توصیه می‌شود، زیرا در این زمان حساسیت و ویژگی سنجش به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافته و احتمال منفی کاذب کاهش می‌یابد.

واژگان کلیدی: هورمون، ریلاکسین، تشخیص آبستنی، سگ

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۹/۴

مقدمه

با توجه به خطر انقراض بسیاری از گونه‌ها، استفاده از ریلاکسین برای تشخیص آبستنی در حیوانات مختلف، از جمله گربه سانان و فیل‌ها، اهمیت دارد. این روش همچنین در مطالعه تولید مثل گونه‌های در خطر انقراض

کاربرد دارد و ابزاری مفید برای تحقیقات حفاظت از گونه‌ها محسوب می‌شود. با در اختیار داشتن مواد شیمیایی مناسب برای آزمایش ایمنی شناسی، تعیین ریلاکسین در مایعات بدن به ابزاری قدرتمند برای محافظت کنندگان و زیست‌شناسان تبدیل شده است که در حال تحقیق در مورد تولیدمثل انواع مختلف گونه‌های در معرض خطر و کیمیا می‌باشند (۱). از دهه ۱۹۶۰ غلظت ریلاکسین در خون سگ‌ها و سایر گونه‌ها برای شناسایی آبستنی مفید شناخته شده است. این روش‌ها شامل آزمایش‌های ایمنی شناسی رادیویی، ایمنی شناسی آنزیمی و آزمایش‌های سریع ایمنی مهاجرتی هستند که در گونه‌های خشکی زی مانند گرگ‌ها، شیرها، فیل‌ها، کرگدن‌ها و پانداها و همچنین در گونه‌های دریایی مانند فوک‌ها و دلفین‌ها به کار رفته‌اند. همچنین، بهبود تکنیک‌هایی مانند استخراج خالص سازی برای تحلیل ریلاکسین در نمونه‌های غیرخونی (مانند ادرار، مدفوع، بزاق، بازدم، پوست و چربی زیر پوستی) ضروری است. این نمونه‌ها باید به صورتی کم‌تهاجمی تر و با استرس کمتر جمع‌آوری شوند تا بتوانند برای اهداف پایه و کاربردی، به ویژه در راستای حفاظت از گونه‌های در معرض خطر یا انقراض، مورد استفاده قرار گیرند (۲).

ریلاکسین یک پلی‌پپتید است که نشان داده شده است بر بافت‌های تولید مثلی پستانداران، به ویژه "انبساط دهانه رحم و انقباض رحم" تأثیر می‌گذارد (۳) منبع سنتز

۱. دانش آموخته دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران
* ۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران
Gh.Najafi@iau.ac.ir

ریلاکسین در بین گونه‌ها متفاوت است، اما مکان‌های غالب، جسم زرد، جفت و رحم هستند (۴). بسته به گونه، تشخیص ریلاکسین در خون محیطی همیشه به ماده‌های باردار محدود نمی‌شود. با این حال، در سگ خانگی به عنوان یک هورمون خاص بارداری شناخته شده است (۵-۷). محل سنتز در سگ ماده مشخص شده است (۸-۱۰) و در درجه اول به جفت نسبت داده می‌شود، اگرچه این هورمون را می‌توان در تخمدان و رحم نیز ردیابی کرد. این بافت‌های اخیر ممکن است مناطقی باشند که تحت تأثیر رسوب پاراکرین ریلاکسین قرار می‌گیرند. یک مطالعه بالینی روی سگ‌های خانگی با استفاده از روش الیزا (روش سنجش ایمنی مرتبط با آنزیم ریلاکسین سگ، شرکت سین‌بیوتیکس، سن دیگو، کالیفرنیا، ایالات متحده آمریکا) که به صورت تجاری در دسترس است، تشخیص این هورمون را در خون محیطی مادر، ۲۵ روز پس از تخمک‌گذاری گزارش کرد (۳).

ریلاکسین می‌تواند بین آبستنی و آبستنی کاذب به ویژه در گونه‌هایی با دوره‌های آبستنی طولانی تمایز ایجاد کند. مطالعات نشان داده‌اند که ریلاکسین در سرم و ادرار برخی گونه‌ها قابل شناسایی است. اندازه‌گیری متابولیت‌های هورمونی در ادرار یا مدفوع، روشی عملی‌تر برای مدیریت پرورش و حفظ گونه‌ها است. راه حل دیگر، حفظ ذخایر ژنتیکی موجود از طریق پرورش در اسارت به عنوان ابزاری برای جلوگیری از انقراض است. اندازه‌گیری هورمون‌های تولید مثل در گردش برای اکثر گونه‌های حیات وحش غیرعملی است؛ تعیین متابولیت‌های هورمونی در ادرار یا مدفوع رویکردی عملی‌تر است. برای کمک به مدیریت پرورش، یکی از ابزارهای مهم، توانایی تشخیص و نظارت بر آبستنی است (۹).

متأسفانه، اندازه‌گیری پروژسترون‌ها اغلب برای تشخیص آبستنی در برخی گونه‌ها مانند فیل‌ها، کرگدن‌ها و پانداها

غول‌پیکر، نتایج مفیدی ندارد. این امر به دلیل تغییرات غلظت در مراحل مختلف آبستنی و فاز لوتئال غیرآبستن در این گونه‌ها است. به عنوان مثال، ریلاکسین در سگ‌ها می‌تواند بین آبستنی واقعی و آبستنی کاذب تمایز ایجاد کند؛ بنابراین، اندازه‌گیری ریلاکسین ممکن است به عنوان یک روش مناسب برای تشخیص موفقیت آبستنی در گونه‌های در خطر انقراض مطرح شود (۹). برخلاف برخی دیگر از گونه‌های جانوری که در آنها جفت در سنتز هورمون در اواخر بارداری نقش دارد، پروژسترون فقط از جسم زرد در ماده سگ‌ها منشأ می‌گیرد (۲۲، ۲۳). غلظت سرمی پروژسترون در دوران بارداری موضوع مقالات مختلفی بوده است که در ۵۰ سال گذشته منتشر شده است (۵، ۲۰). با این حال، اکثر مطالعات انجام شده تاکنون فقط تعداد محدودی از ماده سگ‌ها را بررسی کرده و بر نژادهای خاص تمرکز داشته‌اند. واکنش‌های مناسب ایمونواسی امکان برآورد غلظت‌های ریلاکسین در سرم و همچنین تعیین وضعیت آبستنی و نتایج آن را فراهم کرده است. علاوه بر این، ریلاکسین در سرم و ادرار نیز شناسایی شده است. با این حال، تغییرات شدید زمانی بین جفت‌گیری و زایمان، همراه با عواملی مانند کاشت تاخیری، آبستنی کاذب و جذب جنین‌های مکرر، استفاده از داده‌های ریلاکسین را در برخی گونه‌ها به عنوان نشانگر خاص آبستنی غیرممکن کرده است (۹).

هورمون ریلاکسین به عنوان یک سیگنال اختصاصی برای آبستنی در گونه‌های گربه‌سانان شناخته می‌شود. به منظور تولید آنتی‌بادی خاص برای گربه‌سانان، توالی‌های DNA و پروتئینی از یوز و گربه خانگی تعیین شده و پپتیدهایی برای تولید آنتی‌بادی انتخاب گردیده است. همچنین، میزان بیان mRNA ریلاکسین و گیرنده آن (RXFP1) در رحم، تخمدان و جفت گربه‌های خانگی آبستن و یوزها اندازه‌گیری شده است (۹).

شده است. علاوه بر این، تغییراتی در غلظت I-IGF نیز در طول دوران آبستنی سگ ها مشاهده شده است (۸). هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی و دستیابی به یک روش مطمئن و تقریباً زود هنگام برای تشخیص قطعی آبستنی بر اساس ارزیابی میزان تغییرات هورمون های اختصاصی باروری نظیر ریلاکسین و نیز غیر اختصاصی آبستنی نظیر هورمون های استروئیدی استروژن و پروژسترون در پایان نیمه اول و تقریباً شروع نیمه دوم آبستنی یعنی در هفته های چهارم و پنجم آبستنی می باشد که بیشترین میزان درصد خطای تشخیص به واسطه برخی موارد پاتولوژیک مثل وقوع آبستنی کاذب و پیومترا و نیز وقوع جسم زرد مقاوم در این گونه دامی در درمانگاه های تخصصی دیده می شود. همچنین می توان بر اساس یافته های بالینی این روش برای موارد مدیریتی، تغذیه و نیز بهداشتی توله های متولد شده و نگهداری مادر برنامه ریزی کرد.

مواد و روش کار

این مطالعه از نوع تحلیلی - مقطعی (Cross-sectional analytical study) بوده و با رویکردی کمی با هدف بررسی همبستگی میان سطوح هورمونی و وضعیت آبستنی سگ ها در یک مقطع مشخص (هفته چهارم و پنجم پس از جفت گیری) طراحی گردید. کلیه امور آزمایشگاهی در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه انجام گرفت. در طی مراحل نمونه گیری مصوبات کمیته اخلاق و اصول کار با حیوانات رعایت گردید. این پژوهش با شناسه اخلاق IR.IAU.URMIA.REC.1404.029 مصوب گردیده است.

حیوانات مورد مطالعه

این پژوهش با استفاده از ۲۰ قلاذه سگ ماده با دامنه سنی ۶-۲ سال و با میانگین وزنی ۵۰-۳۰ کیلوگرم که از تغذیه و

نتایج تحقیقات نشان می دهد که جفت گربه به عنوان منبع اصلی تولید ریلاکسین در دوران آبستنی شناخته شده است، در حالی که میزان بیان این هورمون در سایر بافت ها به طور قابل توجهی پایین است. همچنین، گیرنده ریلاکسین (RXFP۱) عمدتاً در بافت رحم و جفت گربه ها شناسایی شده است، که این امر نشان دهنده این است که این بافت ها هدف اصلی اثرات ریلاکسین هستند. در تخمدان ها، رنگ آمیزی ریلاکسین نشان می دهد که این هورمون با رگ های خونی در ارتباط است و نقش آن در فرآیند واسکولاریزاسیون (رگزایی) تأیید گردیده است (۱۲). بررسی های بافت شناسی حاکی از آن است که هورمون ریلاکسین (RLN) از طریق گیرنده های خود (RXFP۱ و RXFP۲) اثرات خاص گونه ای را در دوران آبستنی اعمال می کند. به علاوه، تأثیرات لوتئوتروپیک احتمالی این هورمون از طریق تحریک ترشح پرولاکتین (PRL) نیز مطرح شده است. در سگ های اهلی (Canis lupus familiaris)، سطح پرولاکتین (PRL) در سرم سگ های ماده آبستن به طور قابل توجهی پس از ظهور ریلاکسین (RLN) در گردش خون افزایش می یابد. همچنین، یک ارتباط عملکردی احتمالی بین سیستم های ریلاکسین و پرولاکتین در تنظیم ترشح پروژسترون نیز مورد بررسی قرار گرفته است (۱۷).

مطالعات انجام شده نشان می دهد که در طول دوران آبستنی سگ ها، واسطه های التهابی تغییرات چشمگیری را تجربه می کنند. این تغییرات التهابی شامل افزایش غلظت پروتئین های فاز حاد مانند CRP و فیبرینوژن، افزایش تعداد نوتروفیل ها و مونوسیت ها، و فعال شدن تولید گرانولوسیت ها، مونوسیت ها و لنفوسیت ها در سطح خون می باشد. ارزیابی تغییرات غلظت پروتئین های فاز حاد (APPs) و گلبول های سفید (WBC) به عنوان معیاری برای تشخیص آبستنی در سگ های ماده آبستن در نظر گرفته

اختصاصی استروژن و پروژسترون مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. در سرم های نمونه های خونی مقادیر هورمون های استروژن و پروژسترون و ریلکسین براساس روش الایزا با کیت های اختصاصی اندازه گیری شد. تمامی مراحل کالیبراسیون کنترل های مثبت و منفی و نیز محاسبه غلظت ها بر اساس منحنی استاندارد به دقت اجرا شد.

پارامترهای مورد مطالعه

پارامترهای مطالعه شامل سطح سرمی ریلکسین، پروژسترون، استروژن و متغیرهای مشتق شده شامل نسبت پروژسترون به استروژن، همچنین متغیرهای کیفی شامل نوع آبستنی (آبستن، غیرآبستن، کاذب)، نژاد، سابقه جفت گیری بودند.

گروه بندی

گروه بندی براساس داده های بالینی، سابقه جفت گیری، نتایج سونوگرافی ترانس ابدومینال در روزهای ۲۵ تا ۳۵ پس از جفت گیری و در موارد لزوم مشاهده توله زایی انجام شد. مواردی با رفتارهای شبه آبستنی، فقدان رویت جنین در سونوگرافی و سطح پایین ریلکسین در سرم در گروه "آبستنی کاذب" قرار گرفتند. موارد فاقد حاملگی با سطح ریلکسین منفی و عدم علائم فیزیولوژیک در گروه غیرآبستن طبقه بندی شدند. در این مطالعه، سندرم آبستنی کاذب (Pseudopregnancy) ناشی از تداوم فاز لوتئال و ترشح پروژسترون در غیاب لقاح تعریف شده است. در این حالت رفتار و فیزیولوژی سگ ماده مشابه سگ آبستن ظاهر می شود اما فاقد تشکیل واقعی جنین و جفت است. هر کیت الایزا مطابق با دستورالعمل فنی سازنده و شامل کالیبراسیون از طریق منحنی استاندارد پنج نقطه ای اجرا شد. کنترل های مثبت و منفی داخلی همراه با نمونه ها اجرا شدند و نمونه ها دوبار تست شدند. کیت ها از شرکت معتبر

شرایط نگهداری مناسب برخوردار بوده اند، با توجه به عملیاتی (pilot sample) انجام گردید. ۲۰ قلابه سگ ماده شامل ۱۰ سگ از نژاد سرابی، ۲ سگ از نژاد دوگوارآنتینو، ۱ سگ از نژاد ژرمن شپرد، ۱ سگ از نژاد عراقی، ۲ سگ از نژاد پیتبول، ۱ سگ از نژاد قدیر جانی، ۲ سگ از نژاد آکیتا ژاپنی و ۱ سگ از نژاد رتویلر بودند. انتخاب بر اساس معیارهای ورود از جمله سلامت بالینی، سابقه جفت گیری و وزن/سن مشابه صورت گرفت. از نظر آماری، حجم نمونه برای محاسبات اولیه تفاوت معنی دار بین گروه ها کفایت دارد.

خونگیری و سنجش هورمونی

خونگیری از ورید سفالیک در شرایط آرام، بدون بیهوشی، در دو نوبت (روزهای ۲۱-۲۸ و ۳۵-۴۲) انجام شد. نمونه ها پس از سانتریفیوژ، در لوله های SST نگهداری و به آزمایشگاه مرجع ارسال شدند. پیش از سنجش، نمونه ها یخ زدایی و مجدداً سانتریفیوژ شدند تا دقت نتایج افزایش یابد. نمونه گیری در ساعات اولیه صبح انجام شد تا از نوسانات طبیعی هورمون ها در طول روز کاسته شود. در طول انجام مطالعه، از لوله جمع آوری نمونه خون بدون ماده ضدانعقاد استفاده شد تا سرم خالص به دست آید. حداقل ۵ میلی لیتر خون از ورید سفالیک اخذ شد. خون جمع آوری شده ظرف ۳۰ دقیقه پس از نمونه گیری سانتریفیوژ شد. از چرخه های مکرر انجماد و ذوب نمونه خودداری شد؛ زیرا این کار میتواند بر پایداری هورمون ها تاثیر بگذارد. آماده سازی برای آزمون الایزا پیش از آزمایش نمونه های فریز شده را در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵^ه (یخچال) برای چند ساعت یا در دمای اتاق به مدت کوتاهتر ۳۰-۲۰ دقیقه جهت یخ زدایی گرفتند. نمونه ها پس از یخ زدایی مجدداً پنج دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند تا از وجود ذرات معلق احتمالی جلوگیری شود. برای هر نمونه از کیت های الایزای

دوم آبستنی (هفته پنجم) نسبت به زمان پایان نیمه اول (هفته چهارم) افزایش یافته بودند ولی شاخص نسبت پروژسترون به استروژن طی زمان مورد بررسی کاهش یافته بود. به بیان دقیق تر، نتایج جدول ۱ نشان دهنده تغییرات سطوح هورمونی در سگ ها قبل و بعد از جفت گیری است. سطح سرمی ریلاکسین قبل از جفت گیری با میانگین ۱۲/۷ نانوگرم بر میلی لیتر و انحراف معیار ۱۰/۶ نانوگرم بر میلی لیتر گزارش شده، در حالی که پس از جفت گیری این میانگین به ۱۷/۷ نانوگرم بر میلی لیتر و انحراف معیار به ۱۶/۳ نانوگرم بر میلی لیتر افزایش یافته است، که نشان دهنده افزایش قابل توجه در این هورمون بوده است. پروژسترون نیز افزایش مشابهی را نشان می دهد؛ میانگین آن از ۲/۸۸ به ۶/۷ نانوگرم بر میلی لیتر و استروژن از ۲/۲ به ۱۶/۸ نانوگرم بر میلی لیتر افزایش یافته است. نسبت پروژسترون به استروژن نیز در این دوره تغییر کرده و از ۱/۷۹ به ۱/۲۵ نانوگرم بر میلی لیتر کاهش یافته که ممکن است نشان دهنده تغییرات در تعادل هورمونی در طول دوره آبستنی باشد.

نتایج تحلیل آماری در جدول ۲ نشان دهنده تفاوت های معنی دار در سطوح هورمونی سگ ها قبل و بعد از هفته چهارم و پنجم است. برای سطح سرمی ریلاکسین، P -value برابر با ۰/۰۴ است که نشان دهنده یک اختلاف میانگین معنی دار به میزان ۵ از ۱۲/۷ نانوگرم بر میلی لیتر به ۱۷/۷ نانوگرم بر میلی لیتر می باشد. در مورد پروژسترون، P -value برابر با ۰/۰۰۱ است و اختلاف میانگین ۴/۷ از ۲/۸۸ نانوگرم بر میلی لیتر به ۶/۷ نانوگرم بر میلی لیتر را نشان می دهد. همچنین برای استروژن، P -value نیز ۰/۰۰۱ بوده و اختلاف میانگین ۶/۱۴ از ۲/۲ نانوگرم بر میلی لیتر به ۱۶/۵ نانوگرم بر میلی لیتر مشاهده شده است.

Bioactiva, Germany با حساسیت بالا تهیه شدند. سه گروه عملکردی در مطالعه وجود داشت: سگ های آبستن (بر اساس توله زایی یا سونوگرافی مثبت)، غیر آبستن، و آبستنی کاذب. این گروه بندی از لحاظ بالینی و تشخیصی معادل کنترل داخلی محسوب می شود. هرچند گروه شاهد کلاسیک (سگ های بدون سابقه جفت گیری) در مطالعه حضور نداشت.

روش تجزیه و تحلیل آماری

همه داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار یا میانگین و بازه (حداقل - حداکثر) گزارش گردید. برای تمام تحلیل های آماری SPSS (Version 25) استفاده شد. غلظت هورمون های استروژن، پروژسترون و نیز ریلاکسین در دو نوبت ارزیابی هفته چهارم و پنجم به تفکیک در نتایج گروه سگ های آبستن و غیر آبستن با استفاده از تحلیل واریانس یکطرفه مقایسه شدند. رقم معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه اطلاعات مربوط به ۲۰ سگ در زمان های پایان نیمه اول (هفته چهارم) و شروع نیمه دوم آبستنی (هفته پنجم) تجزیه و تحلیل شدند. در این پژوهش از ۲۰ قلابه سگ ماده، تعداد ۱۲ قلابه سگ (۶۰٪) آبستن شدند. از نظر نژادی ۱۰ قلابه سگ (۵۰٪) از نژاد سرابی و ۱۰ قلابه سگ بعدی از نوع بقیه نژادها بودند. تاثیر هر کدام از هورمون ها بر آبستنی و حاملگی سگ ها بر اساس مدل رگرسیون ارزیابی شد که از بین همه هورمون ها استروژن و پروژسترون تاثیر معنی دار داشتند ولی بقیه متغیرها معنی دار نبودند. متغیرهای مخدوش گر را در این مطالعه می توان به سن سگ، حاملگی قبلی مرتبط دانست.

بر اساس اطلاعات جدول ۱ همه مقادیر هورمون های استروئیدی و شاخص سرمی ریلاکسین در زمان شروع نیمه

مقادیر هورمون های استروئیدی و شاخص سرمی ریلاکسین در زمان شروع نیمه دوم آبستنی (هفته پنجم) نسبت به زمان پایان نیمه اول (هفته چهارم) افزایش داشته اند ولی شاخص نسبت استروژن به پروژسترون کاهش یافته بود و این افزایش یا کاهش بین شاخص ها از نظر آماری معنی دار نبود. یعنی می توان گفت که تغییرات شاخص های هورمونی ربطی به نژاد سگ ها ندارد و مقادیر تغییرات در نژادهای مختلف یکسان است.

تحلیل رگرسیون در جدول ۶ نشان می دهد که تنها دو متغیر استروژن قبل و پروژسترون قبل به طور معنی داری بر پیش بینی وضعیت آبستنی تأثیر دارند. نتایج نشان می دهند که استروژن قبل با مقدار P برابر با $0/03$ و پروژسترون قبل با مقدار P برابر با $0/046$ به عنوان عوامل مؤثر شناسایی شده اند. این نتایج به وضوح نشان دهنده اهمیت هورمون های مذکور در تشخیص آبستنی در سگ ها هستند و می توانند به عنوان شاخص های بیولوژیکی کلیدی در این زمینه مورد استفاده قرار گیرند. از آنجا که هر دو هورمون اثر منفی بر پیش بینی آبستنی دارند، این امر نشان دهنده این است که افزایش سطح این هورمون ها ممکن است با کاهش احتمال بارداری مرتبط باشد.

سگ ها را تأیید کرده اند. در مطالعه Einspanier و همکاران (۶)، سطح ریلاکسین از روز ۲۴ پس از تخمک گذاری قابل تشخیص بود، که یافته ما در هفته پنجم (روزهای ۲۸-۳۵) آن را تکمیل می کند. همچنین، عدم وجود ریلاکسین در سگ های غیرآبستن و دارای آبستنی کاذب نیز با مشاهدات Steinetz و همکاران (۱۶) انطباق دارد.

در قیاس با این مطالعات، داده های ما نشان دادند که میزان ریلاکسین در سگ های آبستن از $12/7$ به $17/7$ نانوگرم بر میلی لیتر افزایش یافت ($P=0/004$)، در حالی که در سگ های غیرآبستن هیچ افزایش معنی داری گزارش نشد. یافته های مشابهی توسط Özyurtlu و همکاران (۱۳) گزارش شده که در آن فقط سگ های آبستن دارای نتیجه مثبت در تست کیفی

بر اساس اطلاعات جدول ۲ و نتیجه آزمون تی زوجی برای مقایسه اختلاف داده های کمی قبل و بعد از ارزیابی، همه مقادیر هورمون های استروئیدی و شاخص سرمی ریلاکسین در زمان شروع نیمه دوم آبستنی (هفته پنجم) نسبت به زمان پایان نیمه اول (هفته چهارم) افزایش معنی داری داشته اند. بطوریکه سطح سرمی ریلاکسین $39/4\%$ و سطح هورمون پروژسترون $163/2\%$ و هورمون استروژن 664 افزایش یافته بودند.

بر اساس اطلاعات جدول ۳ و نتیجه آزمون تی زوجی برای مقایسه اختلاف داده های کمی قبل و بعد از ارزیابی، مقدار نسبت پروژسترون به استروژن در زمان شروع نیمه دوم آبستنی (هفته پنجم) نسبت به زمان پایان نیمه اول (هفته چهارم) افزایش معنی دار داشته است به طوریکه از رقم $1/79$ یا $30/2\%$ کاهش به رقم $1/25$ کاهش یافته بود و این کاهش از نظر آماری نیز معنی دار بود.

بر اساس داده های ارائه شده در جدول ۴، تغییرات معنی داری در سطح سرمی هورمون ها و نسبت پروژسترون به استروژن بین سگ های آبستن و غیر آبستن وجود دارد. به طور خاص، در گروه آبستن قبل از هفته چهارم، میانگین سطح ریلاکسین، استروژن و پروژسترون به طور قابل توجهی بالاتر از گروه غیر آبستن بعد از هفته پنجم است ($p < 0.01$). این نتایج نشان دهنده نقش مهم هورمون های فوق در تشخیص آبستنی در سگ ها هستند و تأکید می کنند که تغییرات هورمونی در مراحل اولیه آبستنی می تواند به عنوان یک نشانگر بیولوژیکی مؤثر برای شناسایی وضعیت آبستنی در سگ ها مورد استفاده قرار گیرد. همچنین، نسبت پروژسترون به استروژن نیز در این مدت تغییرات معنی داری را نشان می دهد که می تواند به درک بهتر از دینامیک هورمونی در دوران آبستنی کمک کند.

بر اساس اطلاعات جدول ۵ و نتیجه آزمون تی مستقل برای تغییرات شاخص های هورمونی قبل و بعد از ارزیابی،

جدول ۱. شاخص های توصیفی متغیرهای کمی مورد مطالعه در ۲۰ قلاده سگ ماده در زمان های پایان نیمه اول (هفته چهارم) و شروع نیمه دوم آبستنی (هفته پنجم)

متغیرها (ng/ml)	کمترین	بیشترین	میانگین	انحراف معیار
سطح سرمی ریلاکسین (قبل هفته چهارم)	۰/۵	۳۰	۱۲/۷	۱۰/۶
سطح سرمی ریلاکسین (بعد هفته پنجم)	۰/۴	۴۵	۱۷/۷	۱۶/۳
پروژسترون (قبل هفته چهارم)	۰/۷	۷	۲/۸۸	۱/۶۵
پروژسترون (بعد هفته پنجم)	۰/۴	۱۴/۵	۷/۶	۶/۲
استروژن (قبل هفته چهارم)	۰/۳	۴/۳	۲/۲	۱/۴۶
استروژن (بعد هفته پنجم)	۰/۳	۳۷	۱۶/۸	۱۵/۵
نسبت پروژسترون به استروژن (قبل هفته چهارم)	۰/۶	۴/۵۳	۱/۷۹	۰/۹
نسبت پروژسترون به استروژن (بعد هفته پنجم)	۰/۳۲	۴/۳۳	۱/۲۵	۱/۲

جدول ۲. مقایسه نتایج مقادیر سطح سرمی متغیرها در ۲۰ قلاده سگ ماده در زمان های پایان نیمه اول (هفته چهارم) و شروع نیمه دوم آبستنی (هفته پنجم)

سطح سرمی متغیرها (ng/ml)	زمان	میانگین	انحراف معیار	اختلاف میانگین ها	درصد اختلاف	P-value
ریلاکسین	قبل هفته چهارم	۱۲/۷	۱۰/۶	۵	۳۹/۴	۰/۰۰۴
	بعد هفته پنجم	۱۷/۷	۱۶/۳			
پروژسترون	قبل هفته چهارم	۲/۸۸	۱/۶۵	۴/۷	۱۶۳/۲	۰/۰۰۱
	بعد هفته پنجم	۷/۶	۶/۲			
استروژن	قبل هفته چهارم	۲/۲	۱/۴۶	۱۴/۶	۶۶۴	۰/۰۰۱
	بعد هفته پنجم	۱۶/۸	۱۵/۵			

جدول ۳. مقایسه نسبت پروژسترون به استروژن در ۲۰ قلاده سگ ماده در زمان های پایان نیمه اول (هفته چهارم) و شروع نیمه دوم آبستنی (هفته پنجم)

متغیرها	زمان	میانگین	انحراف معیار	اختلاف میانگین ها	درصد اختلاف	P-value
نسبت پروژسترون به	قبل هفته چهارم	۱/۷۹	۰/۹۹	۰/۵۴	۳۰/۲	۰/۰۰۹
استروژن	بعد هفته پنجم	۱/۲۵	۱/۲			

جدول ۴. مقایسه مقادیر میانگین هورمون های ریلاکسین، استروژن و پروژسترون به تفکیک نوع آبستنی در ۲۰ قلاده سگ ماده در زمان های پایان نیمه اول (هفته چهارم) و شروع نیمه دوم آبستنی (هفته پنجم)

سطح سرمی متغیرها (ng/ml)	زمان	نوع آبستنی	میانگین	انحراف معیار	P-value
ریلاکسین	قبل هفته چهارم	آبستن	۲۰/۷	۴/۷	۰/۰۰۱
	بعد هفته پنجم	غیر آبستن	۰/۷۵	۰/۲۸	
	قبل هفته چهارم	آبستن	۲۹/۰۳	۱۰/۳	۰/۰۰۱
	بعد هفته پنجم	غیر آبستن	۰/۶۱	۰/۱۴	
استروژن	قبل هفته چهارم	آبستن	۳/۲۴	۰/۷۳	۰/۰۰۱
	بعد هفته پنجم	غیر آبستن	۰/۵۷	۰/۲۱	
	قبل هفته چهارم	آبستن	۲۷/۷	۹/۷	۰/۰۰۱
	بعد هفته پنجم	غیر آبستن	۰/۴۸	۰/۱۵	
پروژسترون	قبل هفته چهارم	آبستن	۳/۹	۱/۲	۰/۰۰۱
	بعد هفته پنجم	غیر آبستن	۱/۲	۰/۲۸	
	قبل هفته چهارم	آبستن	۱۱/۹	۳/۸	۰/۰۰۱
	بعد هفته پنجم	غیر آبستن	۱/۰۴	۰/۳۲	
نسبت پروژسترون به استروژن	قبل هفته چهارم	آبستن	۱/۲۹	۰/۵	۰/۰۰۴
	بعد هفته پنجم	غیر آبستن	۲/۵	۱/۱	
	قبل هفته چهارم	آبستن	۰/۵	۰/۲۵	۰/۰۰۱
	بعد هفته پنجم	غیر آبستن	۲/۴	۱/۱	

جدول ۵. مقایسه نتایج مقادیر تغییرات شاخص های هورمونی به تفکیک نوع نژاد در ۲۰ قلاده سگ ماده در زمان های پایان نیمه اول (هفته چهارم) و شروع نیمه دوم آبستنی (هفته پنجم)

سطح سرمی متغیرها (ng/ml)	نژاد	میانگین	انحراف معیار	P-value
ریلاکسین	سرایی	۴/۱	۱/۶	۰/۵۶
	سایر	۵/۹	۲/۶	
پروژسترون	سرایی	۴/۲	۱/۵	۰/۶۷
	سایر	۵/۲	۱/۷	
استروژن	سرایی	۱۳/۹	۴/۷	۰/۸۴
	سایر	۱۵/۳	۴/۵	
نسبت استروژن به پروژسترون	سرایی	-۰/۶	۰/۳	۰/۷۳
	سایر	-۰/۴۵	۰/۲	

بحث

تشخیص بارداری در سگها می تواند بر اساس تغییرات رفتاری، فیزیکی یا هورمونی یا معاینه بالینی دقیق شامل لمس یا تصویربرداری از محتویات رحم باشد اما هورمون های سرمی به ویژه ریلاکسین به عنوان یک نشانگر اختصاصی آبستنی در سگها شناخته می شود و در حدود روز ۲۴ الی ۳۰ پس از تخمک گذاری در سرم قابل اندازه گیری است. با اینکه سونوگرافی یک روش معمول است، اندازه گیری سرمی ریلاکسین همراه با استروژن و پروژسترون می تواند یک روش غیرتهاجمی، قابل دسترسی، اقتصادی و قابل تکرار در محیط های کلینیکی فاقد تجهیزات تصویربرداری پیشرفته باشد. پروژسترون در هر دو حالت آبستن و غیرآبستن در فاز لوتئال بالا باقی می ماند و قابل اعتماد نیست. استروژن نیز به تنهایی تغییرات یکنواختی ندارد. اما در ترکیب با ریلاکسین، میزان استروژن و پروژسترون قدرت افتراقی بیشتری پیدا می کند. بنابراین تشخیص قطعی فقط با سنجش توأم سه هورمون امکان پذیر است (۱۶، ۲۳).

در مطالعه حاضر، یافته های به دست آمده در ارتباط با تغییرات سطوح سرمی هورمون های ریلاکسین، استروژن و پروژسترون در هفته پنجم آبستنی سگها، به طور قابل توجهی با نتایج مطالعات پیشین همخوانی دارد. بررسی ها

نشان دادند که افزایش معنادار ریلاکسین در هفته پنجم، هم راستا با مطالعات Steinetz و همکاران (۱۶) و Einspanier و همکاران (۶) است که نقش شاخص و اختصاصی این هورمون برای تشخیص بارداری در ReproCHEK بودند و در سگ های دارای آبستنی کاذب، ریلاکسین غیرقابل شناسایی باقی ماند. این داده ها اعتبار یافته های ما را مبنی بر نقش کلیدی ریلاکسین در شناسایی دقیق آبستنی تأیید می کند. در مورد پروژسترون، داده های ما افزایش معنی زدار این هورمون را از ۲/۸۸ به ۶/۷ نانوگرم بر میلی لیتر در هفته پنجم نشان دادند ($p=0/001$). اما برخلاف ریلاکسین، مطالعاتی نظیر Kustritz و همکاران (۱۱) و Holst و همکاران (۸) تأکید دارند که سطح بالای پروژسترون پس از فحلی در هر دو حالت آبستنی و غیرآبستنی باقی می ماند و به تنهایی قابل اعتماد نیست. پژوهش ما نیز این نکته را تأیید می کند که اگرچه پروژسترون افزایش نشان می دهد، اما باید در کنار سایر شاخص ها مانند ریلاکسین و نسبت پروژسترون به استروژن بررسی شود.

یکی از نکات جدید مطالعه ما، ارزیابی نسبت پروژسترون به استروژن به عنوان شاخصی دینامیکی برای تشخیص بهتر مراحل آبستنی بود که از ۱/۷۹ به ۱/۲۵ کاهش معنی دار یافت (کاهش ۳۰.۲ درصد). این یافته با گزارش های

Sridevi و همکاران (۱۵) است که نشان دادند تست های ریلاکسین در بیش از ۶۶ درصد از سگ ها از روز ۲۴ به بعد مثبت شدند. این اطلاعات نه تنها یافته های ما را تقویت می کند بلکه بر ضرورت استفاده هم زمان از چند نشانگر هورمونی برای افزایش دقت تشخیصی آبستنی تأکید دارد. در مجموع، مطالعه ما تأیید می کند که ترکیب ریلاکسین با سایر شاخص های هورمونی، به ویژه در هفته پنجم، ابزار قدرتمند و قابل اعتمادی برای تشخیص بارداری در سگ های ماده خواهد بود.

در پژوهش حاضر، هفته پنجم به عنوان نقطه طلایی برای سنجش قطعی آبستنی توصیه شده است. در هفته چهارم، میزان ریلاکسین در برخی سگ ها هنوز در آستانه تشخیص بود و احتمال منفی کاذب وجود داشت. اما در هفته پنجم، حساسیت و ویژگی سنجش به طور قابل توجهی افزایش یافت. بنابراین، هفته پنجم به عنوان نقطه طلایی برای سنجش قطعی توصیه می شود. به بیان دیگر، اندازه گیری سریالی (قبل و بعد از هفته چهارم) هورمون های ریلاکسین، پروژسترون و استروژن می تواند ابزاری قابل اعتماد برای تشخیص قطعی بارداری در سگ ها باشد. به ویژه، افزایش معنی دار ریلاکسین، پروژسترون و استروژن در هفته پنجم همراه با کاهش نسبت پروژسترون به استروژن، نشانگرهای خوبی برای تأیید بارداری هستند. در صورت نیاز می توان از پروژسترون و استروژن در هفته چهارم نیز به عنوان پیش بینی کننده های آماری قابل اطمینان بهره برد.

برای تحلیل آینده نگر و ارزیابی دقیق تر ریسک وقوع آبستنی در جمعیت های مختلف یا بین نژادها، پیشنهاد می شود از مدل های رگرسیون لجستیک و تحلیل منحنی ROC با محاسبه AUC استفاده شود. طراحی مطالعه باید شامل حجم نمونه بزرگ تر و چند مرکزی باشد تا تعمیم پذیری یافته ها تأیید گردد. همچنین، ارزیابی

Nowak و همکاران (۱۲) همخوانی دارد که تغییرات تعادل هورمونی را در دوران بارداری، مؤثر در تنظیم رشد جفت دانسته اند. برخلاف مطالعات پیشین که بیشتر بر سطوح مطلق هورمون ها تمرکز داشتند، ما بر اهمیت نسبی سطوح هورمونی نیز تأکید کردیم.

بررسی های دیگری نیز مانند مطالعه Carlson و همکاران (۴) که در کایوت ها انجام شد، نشان دادند که کیت های ReproCHEK می توانند از روز ۲۳ آبستنی، ریلاکسین را تشخیص دهند. این موضوع اهمیت استفاده از این کیت ها در حیوانات وحشی یا در موقعیت هایی که سونوگرافی در دسترس نیست، را تقویت می کند. مطالعه ما نیز تأیید می کند که در سگ های خانگی، هفته پنجم بارداری، بهترین زمان برای تشخیص دقیق آبستنی است. نتایج مطالعه حاضر همچنین با یافته های Bauman و همکاران (۱) در مورد استفاده از کیت های تشخیص آبستنی در گرگ ها و روباه ها همسو است. در مطالعه آنان مشخص گردید که تست ریلاکسین برای حیوانات با سابقه جفت گیری بیش از ۲۵ روز، دقت بالایی دارد. یافته ما در سگ های خانگی نیز همین بازه زمانی را به عنوان "نقطه طلایی" برای تشخیص بارداری معرفی می کند.

در بررسی Günzel-Apel و همکاران (۷) در سگ های ژرمن شپرد نیز مشاهده گردید که سطوح پایین ریلاکسین و پرولاکتین با بروز مرگ جنینی و سلامت پایین جفت در سگ های دارای سیکل کوتاه مرتبط بود. مطالعه ما اگرچه مستقیماً پرولاکتین را ارزیابی نکرد، اما سطوح پایین تر ریلاکسین در سگ های غیرآبستن نیز ممکن است نشانه ای از کاهش سلامت باروری باشد که با این یافته ها همخوانی دارد.

در نهایت، یافته های ما مبنی بر تفاوت معنی دار در سطوح ریلاکسین، استروژن و پروژسترون میان سگ های آبستن و غیرآبستن، مشابه نتایج Steinetz و همکاران (۱۷) و

pregnancy in the marmoset monkey. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 2009; 1160(1): p. 140-146.

7. Günzel-Apel AR, Zabel S, Bunck CF, Dieleman SJ. Concentrations of progesterone, prolactin and relaxin in the luteal phase and pregnancy in normal and short-cycling German Shepherd dogs. *Theriogenology*; 2006; 66(6-7): p. 1431-1435.

8. Holst BS, Gustavsson MH, Johannisson A, Hillström A. Inflammatory changes during canine pregnancy. *Theriogenology*; 2019; 125: p. 285-292.

9. Klonisch T, Kauffold J, Steger K, Bergmann M, Leiser R, Fischer B, Hombach-Klonisch S. Canine relaxin-like factor: unique molecular structure and differential expression within reproductive tissues of the dog. *Biology of reproduction*; 2001; 64(2): p. 442-450

10. Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Froehlich C, Kauffold J, Steger K, Steinetz BG, Fischer B. Canine preprorelaxin: nucleic acid sequence and localization within the canine placenta. *Biology of Reproduction*; 1999; Mar 1;60(3):551-7.

11. Kustritz MVR. Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog. *Theriogenology*; 2005; 64(3): p. 755-765.

12. Nowak M, Gram A, Boos A, Aslan S, Ay SS, Önyay F, Kowalewski MP. Functional implications of the utero-placental relaxin (RLN) system in the dog throughout pregnancy and at term. *Reproduction*; 2017; 154(4): p. 415-431.

13. Özyurtlu N, AY SS, Alacam E. Evaluation of vaginal smears, and progesterone and relaxin levels in pregnant, and overt and covert pseudopregnant bitches. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*; 2006; 30(5): p. 465-470.

14. Sherwood OD. Relaxin. In "The Physiology of Reproduction," 2nd ed. (E. Knobil and JD Neill, Eds.).

15. Sridevi P, Umamageswari J. Reliability and usefulness of relaxin assay kit for pregnancy diagnosis in female dog. *The Indian Journal of Animal Reproduction*; 2016; 37.(۲)

16. Steinetz BG, Brown JL, Roth TL, Czekala N. Relaxin concentrations in serum and urine of endangered species: correlations with

پروتئین‌های التهابی مانند CRP یا IL-6 می‌تواند به افزایش دقت در افتراق آبستنی کاذب کمک کند. توسعه کیت ترکیبی سه مارکری نیز برای استفاده بالینی سریع ضروری است. علاوه بر این، انجام مطالعه طولی (Longitudinal) با پایش تغییرات هورمونی از هفته دوم تا انتهای آبستنی می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را فراهم کند.

قدردانی و تشکر

از کلیه همکاران و پرسنل آزمایشگاهی که در انجام این

پژوهش ما را یاری کردند بویژه آقای دکتر عبدالرضا

رستگاریا و آقای مهندس سیامک چراغیان صمیمانه تشکر و

قدردانی می‌نمایم.

فهرست منابع

1. Bauman JE, Clifford DL, Asa CS. Pregnancy diagnosis in wild canids using a commercially available relaxin assay; 2008; Wiley Online Library.

2. Bergfelt DR, Steinetz BG, Lasano S, West KL, Campbell M, Adams GP. Relaxin and progesterone during pregnancy and the post-partum period in association with live and stillborn calves in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *General and Comparative Endocrinology*; 2011; Feb 1;170(3):650-6.

3. Buff S, Fontbonne A, Lopez P, Rauer M, Crevat D. Circulating relaxin concentrations in pregnant and nonpregnant bitches: evaluation of a new enzymeimmunoassay for determination of pregnancy. *Journal of Reproduction and fertility. Supplement*; 2001; Jan 1;57:187-91.

4. Carlson DA, Gese EM. Relaxin as a diagnostic tool for pregnancy in the coyote (*Canis latrans*). *Animal Reproduction Science*; 2007; 101(3-4): p. 304-312.

5. Concannon PW, Hansel W, Visek WJ. The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biology of reproduction*; 1975; Aug 1;13(1):112-21.

6. Einspanier A, Lieder K, Husen B, Ebert K, Lier S, Einspanier R, Unemori E, Kemper M. Relaxin supports implantation and early

physiologic events and use as a marker of pregnancy. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 2005; May;1041(1):367-78.

17. Steinetz BG, Goldsmith LT, Lust G. Plasma relaxin levels in pregnant and lactating dogs. *Biology of reproduction*; 1987; 37(3): p. 719-725.

18. Steinetz BG, Goldsmith LT, Harvey HJ, Lust G. Serum relaxin and progesterone concentrations in pregnant, pseudopregnant, and ovariectomized, progestin-treated pregnant bitches: detection of relaxin as a marker of pregnancy. *American journal of veterinary research*; 1989; Jan 1;50(1):68-71.

19. Steinetz BG, Goldsmith LT, Lust G. Plasma relaxin levels in pregnant and lactating dogs. *Biology of reproduction*; 1987; Oct 1;37(3):719-25.

20. Tibold A, Thuróczy J. Progesterone, oestradiol, FSH and LH concentrations in serum of progesterone-treated pregnant bitches with suspected luteal insufficiency. *Reprod. Domest. Anim*; 2009; 44 (Suppl. S2), 129–132.

21. Tsutsui T, Stewart RD. Determination of the source of relaxin immunoreactivity during pregnancy in the dog. *Journal of Veterinary Medical Science*; 1991; Dec 15;53(6):1025-9.

22. Tsutsui T. Effects of ovariectomy and progesterone treatment on the maintenance of pregnancy in bitches. *Jpn. J. Vet. Sci*; 1983;45, 47–51.

23. Verstegen-Onclin K, Verstegen J. Endocrinology of pregnancy in the dog: a review. *Theriogenology*; 2008; Aug 1;70(3):291-9.

