

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

معین مقصودی نژاد^۱، صالح طباطبائی وکیلی^۲، مرتضی مموی^۳

۱- دانش آموخته 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 سیتولوژیکی (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 مت استروس، اوایل دای استروس، اواخر دای استروس و پرواستروس به علاوه استروس طبقه‌بندی شد. نمونه‌برداری از ترشحات قسمت‌های مختلف دستگاه تناسلی انجام گردید و با گیمسا رنگ آمیزی شدند.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده نشان داد اغلب فراسجده‌های 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

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 بزرگ تری دارند. گردن حیوان نسبتاً باریک و

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 راه کارهای 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

نوتروفیل‌ها (سلول‌های چند هسته‌ای)، مونوسیت‌های خون و ماکروفاژهای بافتی از مهم‌ترین عوامل فاگوسیتوز در آلودگی‌های میکروبی می‌باشند. به طوری که فاگوسیتوز حاصل از لوکوسیت‌های رحمی به ویژه نوتروفیل‌ها آغاز کننده دفاع رحم در برابر عفونت‌های باکتریایی می‌باشند (۲۷، ۲۱). احتمالاً فعالیت لوکوسیت‌های پلی‌مورفونوکلیور در داخل رحم تحت تأثیر مرحله‌ی سیکل فحلی قرار داشته و در استروس بیشتر از دای استروس است (۲۴). فعالیت تخمدان‌ها نقش مهمی در مقاومت رحم در مقابل عفونت‌های باکتریایی و یا ریشه‌کن کردن آن‌ها دارد (۳۰). تهاجم نوتروفیل‌ها به پارینوایی 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 لنفوسیت‌های B می‌باشد که 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 میکروارگانیزم‌های آلوده به چندین شکل می‌باشد: آناتومیکی (ساختاری) از طریق پوشش آندومتر با اپیتلیوم ستونی ساده یا مطبق کاذب، شیمیایی توسط ترشحات موکوس از غدد

طویل می‌باشد. در نواحی جنوب کشور، گاو میش به صورت گله‌های بزرگ نگهداری می‌شود، حتی در مواردی تعداد گله به ۵۰ رأس می‌رسد. در خوزستان از گاو میش در امور کارهای زراعی کم‌تر استفاده می‌کنند، بلکه صرفاً از گاو میش در جهت تولید شیر و گوشت استفاده می‌گردد (۳۱). سیکل جنسی حیوانات به وسیله نوسانات فیزیولوژیکی 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 آندومتر یوم)، استروس (مرحله پذیرش جنسی و تخمک‌گذاری)، در گاو میش تخمک‌گذاری در مرحله متاستروس انجام می‌شود (مشابه گاو)، مرحله متاستروس (مرحله تشکیل و رشد جسم زرد)، مرحله دی استروس (مرحله فعالیت جسم زرد که با ایجاد آبستنی کاذب یا حقیقی یا شیر-واری می‌تواند فعالیت خود را ادامه دهد)، می‌باشد (۲). دستگاه تناسلی پستانداران ماده به ویژه گاو و گاو-میش 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 به ویژه 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 (۲۷، ۱۱).

پاسخ گویی به عفونت با تولید ترکیبات ضد میکروبی، شیمیایی و سیتوکین ها می باشد. در میان ترکیبات ضد-میکروبی، دفسین ها (defensins)، یک گروه محافظت شده از پپتیدهای کاتیونی است که طیف گسترده ای از فعالیت های ضد باکتری ها، قارچ ها و ویروس ها را نشان می دهد (۱۷). دو زیر مجموعه اصلی دفسین عبارتند از الفا و بتا دفسین که آلفا دفسین توسط نوتروفیل ها و بتا دفسین توسط سلول های اپی تلیال و کراتینوسیت-ها تولید می شوند (۱۹، ۱۷). هدف از این آزمایش، بررسی ایمنی شناسی ترشحات دستگاه تناسلی در مراحل مختلف چرخه استروس گاو میش ماده خوزستانی بود.

مواد و روش ها

جمع آوری دستگاه های تناسلی گاو میش

برای پژوهش حاضر، دستگاه های تناسلی گاو میش-های ماده کشتار شده در کشتارگاه صنعتی دام شهرستان اهواز جهت انتخاب مورد بررسی قرار گرفت. دستگاه های تناسلی بالغ، سالم و غیر آبدستن انتخاب و در درون کیسه های پلاستیکی در داخل یونولیت های 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. دستگاه های تناسلی با تخمدان های مشکوک، آنستروس، دارای ساختارهای غیر طبیعی مثل کیست های تخمدانی و مواردی هم چون رحم های عفونی، آبدستن، تازه زایمان کرده و در حال جمع شدن و غیر طبیعی 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

بر اساس ظاهر مورفولوژیکی جسم زرد، چرخه استروس به مراحل مت استروس (روز ۱ تا ۴)، اوایل دای استروس (روز ۵ تا ۱۰)، اواخر دای استروس (روز ۱۱ تا ۱۷) و پرواستروس به علاوه استروس (فاز فولیکولی)

آندومتر، ایمونولوژیکی از طریق عمل سلول های التهابی پلی مورفونوکلئور (چند هسته ای) و آنتی بادی هومورال، اما میزان تعامل آن ها هنوز مشخص نیست (۱۴). ایمونوگلوبولین ها در ترشحات رحم گاو یافت شده و نقش حفاظتی آن ها در برابر عوامل بیماری زا به طور گسترده گزارش شده است (۳۵، ۱۴). آلودگی های باکتریایی رحم ممکن است در طول جفت گیری و یا تلقیح رخ دهد (۲۱). هم چنین در گاو-میش، آلودگی های باکتریایی واژن و دیگر اندام های تناسلی خارجی ممکن است در طی غلتیدن در گل ولای رخ دهد (۱۰). مکانیسم ایجاد مقاومت آندومتر در فاز فولیکولار ناشناخته است ولی احتمالاً افزایش تعداد لوکوسیت های رحم در مرحله فعلی نقش مهمی را در پاکسازی عوامل عفونی وارد شده به رحم در این زمان ایفا می کند (۲۳، ۳). در مرحله مزبور باز شدن گردن رحم و افزایش انقباضات میومتر نیز به پاکسازی فیزیکی رحم و خروج میکروارگانیسم ها کمک می نماید (۲۴). در فاز لوتئال که رحم تحت تأثیر پروژسترون قرار دارد توانایی دفاعی رحم به دلایل زیر کاهش می یابد: ۱- pH رحم پایین بوده و برای فعالیت باکتری ها مناسب است. ۲- نفوذپذیری بافت پوششی رحم در برابر باکتری ها کاهش یافته، لذا سیستم دفاعی رحم کمتر تحریک می شود (۱۸). ۳- مهاجرت لوکوسیت های خون به رحم با تأخیر انجام شده و فعالیت آن ها نیز کاهش می یابد (۳، ۱۸). ۴- تکثیر لئوسیت ها توسط پروژسترون مهار می شود (۲۰). ۵- ترشحات رحمی در این مرحله خاصیت سم زدایی 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 زیان آور آن بر روی آندومتر باشد (۳۲). سلول های اپی تلیال در دستگاه تولید مثلی جنس ماده نه تنها توانایی تشخیص عوامل عفونی را دارند، بلکه قادر به

(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 اپی‌تلیوم 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 پس رفت کرده، کوچک شده، ظاهری روشن و سفت پیدا می‌کند. با استفاده از سواپ استریل از ترشحات قسمت‌های مختلف دستگاه تناسلی شامل دهانه خارجی کردن رحم (به سمت واژن)، دهانه داخلی کردن 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.

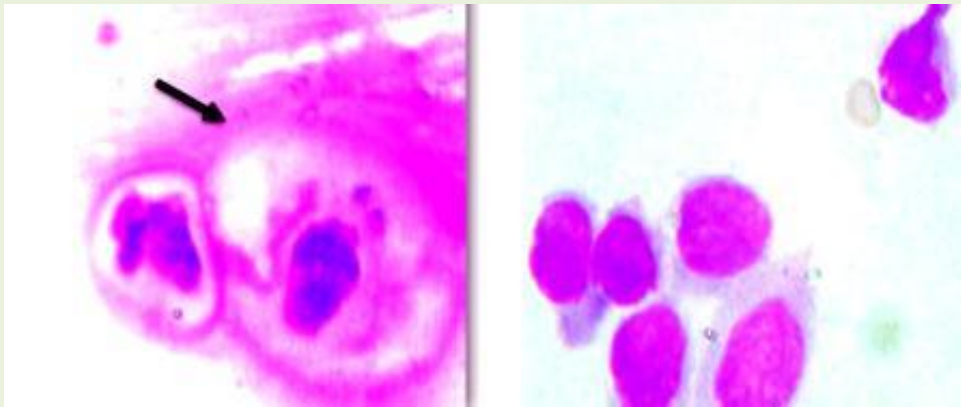
تحلیل آماری

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

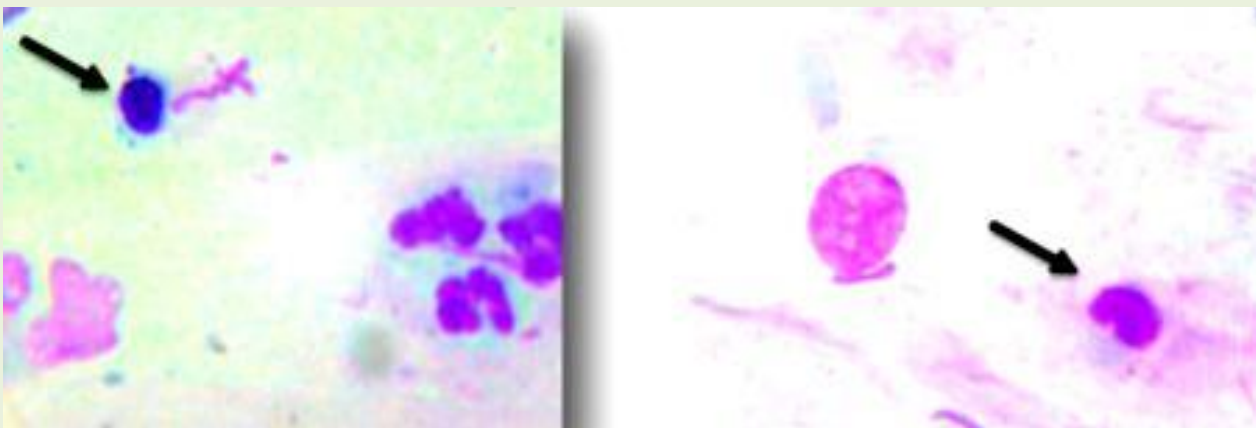
دانکن در سطح معنی داری ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از تغییرات سیتولوژی (ایمنی سلولی و پوششی) ترشحات دهانه خارجی کردن رحم، دهانه داخلی کردن 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 کردن رحم و نیز بدنه رحم بین مراحل چرخه استروس (مت-استروس، اوایل دی‌استروس، اواخر دی‌استروس و پرواستروس به علاوه استروس)، اختلاف معنی داری نداشتند ($P > 0/05$) (اشکال ۱ تا ۳). در جدول ۴، تغییرات سیتولوژیکی ترشحات دهانه خارجی کردن 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 کردن رحم در مرحله لوتئال به‌طور معنی داری بیشتر از فاز فولیکولار سیکل استروس بود ($P < 0/05$). تغییرات سیتولوژیکی ترشحات دهانه داخلی کردن رحم و نیز بدنه رحم تحت تأثیر مراحل لوتئال و فولیکولار سیکل استروس قرار نگرفتند ($P > 0/05$) (جداول ۵ و ۶).



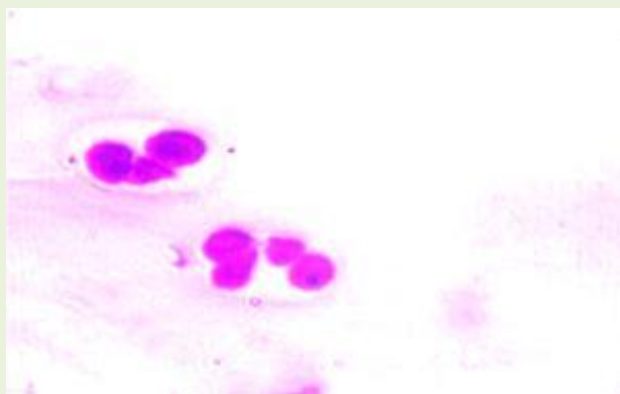
شکل ۱- گسترش ترشحات بدنه رحم (راست) و دهانه خارجی گردن رحم (چپ) (رنگ آمیزی گیمسا، بزرگنمایی ۱۰۰۰×). سلول‌های پوششی سلول پوششی بزرگ و اکونل‌دار (فلش)



لنفوسیت (فلش)

ماکروفاژ (فلش)

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



نوتروفیل‌ها

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

جدول ۱- درصد میانگین ($\pm SE$) سلول های ایمنی و پوششی ترشحات دهانه خارجی گردن رحم طی مراحل سیکل استروس در گاومیش خوزستان EC: سلول پوششی، LVEC (سلول بزرگ واکوتل دار).

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

در هر ستون، اختلاف آماری معنی داری بین میانگین ها یافت نشد ($P > 0.05$).

جدول ۲- درصد میانگین ($\pm SE$) سلول های ایمنی و پوششی ترشحات دهانه داخلی گردن رحم طی مراحل سیکل استروس در گاومیش خوزستان EC: سلول پوششی، LVEC (سلول بزرگ واکوتل دار).

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

در هر ستون، اختلاف آماری معنی داری بین میانگین ها یافت نشد ($P > 0.05$).

جدول ۳- درصد میانگین ($\pm SE$) سلول های ایمنی و پوششی ترشحات بدنه رحم طی مراحل سیکل استروس در گاومیش خوزستان EC: سلول پوششی، LVEC (سلول بزرگ واکوتل دار).

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

در هر ستون، اختلاف آماری معنی داری بین میانگین ها یافت نشد ($P > 0.05$).

جدول ۴- میانگین ($\pm SE$) سلول های ایمنی و پوششی ترشحات دهانه خارجی گردن رحم طی فازهای سیکل استروس در گاومیش خوزستان

فاز لوتتال	EC	LVEC	نوتروفیل	لنفوسیت	ماکروفاژ	اُئوزینوفیل	بازوفیل
فاز لوتتال	۹۴/۳۰ \pm ۰/۷۱	۰/۵۳ \pm ۰/۱۶	۲/۲۹ \pm ۰/۳۴	۲/۳۸ \pm ۰/۳۶	۰/۳۶ \pm ۰/۱۴ ^a	۰/۰۰ \pm ۰/۰۰	۰/۱۵ \pm ۰/۰۶
فاز فولیکولار	۹۳/۹۶ \pm ۱/۵۸	۰/۳۰ \pm ۰/۲۳	۲/۶۰ \pm ۰/۸۷	۳/۰۵ \pm ۰/۹۲	۰/۰۰ \pm ۰/۰۰ ^b	۰/۰۰ \pm ۰/۰۰	۰/۱۰ \pm ۰/۱۰

EC: سلول پوششی، LVEC (سلول بزرگ واکوتل دار). در هر ستون، میانگین های با حروف نامشابه اختلاف معنی داری دارند ($P < 0.05$).

جدول ۵- میانگین (\pm SE) سلول های ایمنی و پوششی ترشحات دهانه داخلی گردن رحم طی فازهای سیکل استروس در گاومیش خوزستان EC: سلول پوششی، LVEC (سلول بزرگ واکوئل دار).

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

در هر ستون، اختلاف آماری معنی داری بین میانگین ها یافت نشد ($P > 0.05$).

جدول ۶- میانگین (\pm SE) سلول های ایمنی و پوششی ترشحات بدنه رحم طی فازهای سیکل استروس در گاومیش خوزستان EC: سلول پوششی، LVEC (سلول بزرگ واکوئل دار).

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

در هر ستون، اختلاف آماری معنی داری بین میانگین ها یافت نشد ($P > 0.05$).

بحث و نتیجه گیری

با نمونه برداری از مخاط گردن رحم گاو به روش سوآپ، اختلاف معنی داری در درصد سلول ها 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 نوتروفیل ها به لومن دستگاه تولید مثلی می شود. بعد از استروس، مخاط واژن توده های لوکوسیت ها را نشان می دهد (۵). با این حال در گاومیش خوزستانی، با نمونه برداری به روش سوآپ، میزان نوتروفیل های ترشحات دستگاه تناسلی تحت تأثیر مراحل سیکل استروس قرار نگرفت. در تحقیقی دیگر، درصد پلی مورفونوکلئورها از زمان فحلی تا روز ۴ سیکل استروس گاو، بیشتر از سایر مراحل سیکل بود (۱۶). نوسانات هورمون های استروئیدی خون در طول چرخه استروس ممکن است بر فعالیت لوکوسیت رحم تأثیر بگذارد. افزایش غلظت پروژسترون خون گاو، موجب مهار فعالیت فاگوسیتیک نوتروفیل های رحم شد (۳۶). در دای استروس، چیرگی پروژسترون ممکن است موجب مهار سنتز پروتئین های ایمنی بدن در لومن رحم که تکثیر لنفوسیت ها را آغاز

سیستم تناسلی نشخوار کنندگان تحت تغییرات اساسی طی سیکل استروس قرار می گیرد که مبنایی برای تشخیص مراحل مختلف سیکل استروس می تواند باشد. مطالعه سیتولوژیکی دستگاه تناسلی از جمله روش های شناسایی مراحل سیکل استروس در حیوانات مختلف محسوب می شود (۹). ارزیابی سیتولوژیکی ترشحات گردن رحم راه کاری برای تشخیص آندومتریس تحت بالینی، برنامه ریزی درمانی و پیش بینی وضعیت باروری پس از پایان دوره انتظار اختیاری (فاصله زایش تا آبستنی مجدد) گاوهای شیری نیز می باشد (۳۹). اولین سیستم دفاعی رحم در مقابل عفونت باکتریایی، عمل بیگانه خواری توسط گلبول های سفید رحم (به طور عمده نوتروفیل ها) است. نوتروفیل ها اولین خط دفاعی رحم برای مقابله با عوامل پاتوژن بوده و در اوایل پس از زایش جمعیت آن ها در ترشحات رحمی بیشتر می شود (۳۹). در اغلب گونه ها، 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 تولید مثلی افزایش می یابد (۸، ۶). در تحقیقی،

نیز شناخته شده است (۳۳). با این حال، مکانیسم اصلی عدم کاهش ایمنی سلولی مخاط دستگاه تناسلی گاو میش خوزستان طی فاز لوتئال در تحقیق حاضر و گاو میش 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 گاو میش 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 تراوش ماکروفاژها 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 واکوئل دار اختلاف معنی‌داری بین مراحل سیکل استروس نداشت (۵). در مطالعه حاضر، درصد سلول‌های پوششی و پوششی بزرگ واکوئل دار قسمت‌های مختلف دستگاه تناسلی گاو میش 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 استروس معنی‌دار نبود (۲۵). تغییرات هورمونی در فازهای مختلف سیکل

می‌کنند، شود (۱۲). برخلاف این مشاهدات در گاو، غالب بودن پروژسترون در دوره دای استروس و نیز کل فاز لوتئال گاو میش 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 گاو میش 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 درصد کل سلول‌های پوششی و ایمنی سلولی ترشحات بین دو فاز فوق یافت نشد (۹). تفاوت مشاهدات حاضر در گاو میش خوزستانی با یافته‌های پژوهش فوق در گاو میش 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 گاو میش 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

جنسی تقریباً یکسان بوده، ضمن این که دستگاه تناسلی گاو میش 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 گاو میش 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.

- 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. Ayan, E., Hasanzadeh, S., Abdollahvand, M. (2002). Alternations in mucosa membrane of vagina during different stages of pregnancy, estrus and di-estrus in cow. J. Vet. Med. Univ. Tehran, 57; 15-19.
9. Ayan, E., Hasanzadeh, S.H., Tabatabaei, S. (2012). Defense cells 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, bacteriological 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.

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 گاو میش 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

منابع

- ۱- احمدی، د.م. ر.، نظیفی، م.ر.، تفتی، س.، خداکرم، ع.، صفایی، ب. ۱۳۸۳. بررسی مقایسه‌ای تغییرات یاخته‌ای ترشحات گردن و مخاط رحم گاو در دو روش سوآب و آسپیراسیون. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۵۹، شماره ۴، ۳۱۷-۳۱۵.
- ۲- شهرزاد، م.، مشمولیان، م. ۱۳۸۲. مطالعه هیستولوژیکی و هیستومورفومتری رحم گاو میش در مراحل مختلف دوره جنسی. مجله دامپزشکی. دانشگاه تهران. دوره ۵۸، شماره ۱، ۵۳-۵۹.
- 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., Ghaisari, H.R. (2000). Cytology changes in heifers, cervical

- 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.

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, Geneva.

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.



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

M. Maghsodinejad¹, S.Tabatabaei Vakili², M. Mamouei³

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

Introduction & 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.