Sari Agriculture Sceinces and Natural Resources University

Research on Animal Production, Vol.14, No. 41, Autumn 2023 p: 1-12

OPEN ACCESS

"Research Paper"

The Effect of Injection of GnRH Dissolved in Aluminum Hydroxide Gel Nanoparticles or Propyleneglycol on Estrus Synchronization, Ovulation Induction and Fertility Outcome after Artificial Insemination in Mehraban Ewes

Roghayeh Mohammadan Mosammam[1], Abbas Farahavar[2], Morteza Yavari[3] and Hasan Aliarabi[4]

1- Graduated M.Sc. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2-Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, (Corresponding author: a.farahavar@basu.ac.ir; farahavar@gmail.com)
3- Assistant Professor, Department of clinical science, Faculty of Paravterinary, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
4- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
Received: 1 January, 2023 Accepted: 18 May, 2022

Extended Abstract

Introduction and Objective: The banning of equine chorionic gonadotropin (eCG) application for estrus synchronization by ethics committee for protection of animal rights, has caused the development of alternative protocols. One of the alternative protocols based on a short-term progesterone treatment and single dose injection of GnRH after termination of progesterone treatment. Half-life of GnRH is very short and it is rapidly degraded by peptidases and cleared by glomerular filtration. One of the suggested approaches is to prolong the action of GnRH and protect it against peptidases. Propyleneglycol and aluminum-hydroxide-gel nanoparticles absorb protein compounds and reduce their release rate. Therefore, the aim of this study was to compare the effect of GnRH dissolved in aluminum-hydroxide-gel nanoparticles or propyleneglycol on estrus synchronization, ovulation induction and fertility outcome after artificial insemination in Mehraban ewes.

Material and Methods: In the breeding season total of 67 non-pregnant ewes (with weight average of 57.72±5.33 Kg, aged 2-4 years and BCS 3-3.5) were selected and treated by progesterone impregnated sponge for a 7 days period. All of ewes were received 5 mg $PGF_2\alpha$ (Dynoprost) with sponge removal and were divided into four treatments, randomly. Each ewe in T_1 was received 400 IU eCG (i.m) immediately after removing the sponge. Ewes in T_2 and T_3 were received 50 µg of GnRH (s.c) dissolved in aluminum-hydroxide-gel and propyleneglycol 36 h after removing the sponge, respectively. Each ewe in T_4 was received 50 µg of GnRH (i.m) dissolved in distilled water 56 h after removing the sponge. All of the ewes were inseminated laparoscopically at 56 h after removing the sponge. During insemination, ewes with estrus signs were determined and uterine status were scored by uterine tone. Blood plasma estradiol (E_2) concentration was evaluated at 36 and 56 after removing the sponge. Ovulation rate and plasma progesterone (P_4) concentration was measured 11 days after insemination. Conception rate, fecundity and prolificacy were calculated after parturition.

Results: Percentage of estrus, estrus quality, occurrence of ovulation, ovulation rate, and plasma P_4 concentration were similar among groups. Plasma E_2 concentration in T_1 was significantly higher 36 after removing the sponge ($P<0.05$) but, it was similar among groups at 56 after removing the sponge. Conception rate with regards to ovulated ewes was higher in T_3 compared to T_2 ($P<0.05$). Conception rate with regards to inseminated ewes, lambing rate and fecundity were higher in T_3 compared to other groups although these differences were not statistically significant.

Conclusion: Slowing and extending the release of GnRH by dissolving in propyleneglycol or aluminum-hydroxide-gel nanoparticles induces estrus and ovulation similar to eCG. However, propyleneglycol has better efficiency in synchronizing the animals for artificial insemination.

Keywords: Fertility, Gonadotropin releasing hormone, Nano-alum, Slow-release, Vaccine adjutant

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-09-08]

[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.41.1.6]

[DOI: 10.61186/rap.14.41.1]

OPEN ACCESS
CC BY NC

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

"مقاله پژوهشی"

مقایسه اثر تزریق GnRH حل شده در نانو ذرات ژل هیدروکسید آلومینیوم و پروپیلن گلیکول بر همزمان‌سازی چرخه فحلی، القاء تخمک‌ریزی و بازده تولیدمثلی پس از تلقیح مصنوعی در گوسفند نژاد مهربان

رقیه محمدیان مصمم[۱]، عباس فرح‌آور[۲]، مرتضی یاوری[۳] و حسن علی عربی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۲- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، (نویسنده مسوول: a.farahavar@basu.ac.ir;farahavar@gmail.com)
۳- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده پیرا دامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۴- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۳
صفحه: ۱ تا ۱۲

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: منع استفاده از گنادوتروپین جفت اسبی (eCG) در همزمان‌سازی فحلی از طرف کمیته اخلاق حمایت از حقوق حیوانات، باعث توسعه برنامه‌های جایگزین شده است. یکی از این برنامه‌های جایگزین استفاده از تیمار کوتاه‌مدت پروژسترون و تزریق تک دوز هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) هنگام قطع تیمار پروژسترونی است. نیمه عمر GnRH بسیار کوتاه است و سریعاً پس از تزریق توسط پپتیدازها تجزیه و یا توسط گلومرول‌ها دفع می‌شود. یکی از رهیافت‌های پیشنهادی طولانی اثر کردن GnRH و حفظ آن در برابر پپتیدازها است. پروپیلن گلیکول و نانو ذرات ژل هیدروکسید آلومینیوم ترکیبات پروتئینی را جذب و سرعت رهش آن‌ها را کاهش می‌دهند. بنابراین هدف این پژوهش مقایسه اثر تزریق GnRH حل‌شده در ژل نانوهیدروکسید آلومینیوم و پروپیلن گلیکول بر همزمان‌سازی چرخه فحلی، القاء تخمک‌ریزی و بازده تولیدمثلی پس از تلقیح مصنوعی در گوسفند نژاد مهربان بود.

مواد و روش‌ها: در فصل تولیدمثلی تعداد ۶۷ رأس میش بالغ غیرآبستن (با میانگین وزنی۵/۳۳±۵۷/۷۲ کیلوگرم، سن ۲-۴ سال و نمره بدنی ۳/۵-۳) انتخاب و با اسفنج پروژسترونی برای یک دوره کوتاه مدت ۷روزه تیمار شدند. همه میش‌ها هنگام برداشت اسفنج ۵ میلی‌گرم $PGF_2\alpha$ (دینوپروست) دریافت و سپس به‌طور تصادفی به چهار تیمار تقسیم شدند. در تیمار ۱ هر رأس میش در زمان برداشت اسفنج ۴۰۰ واحد بین‌المللی eCG (به‌صورت عضلانی) نیز دریافت کرد. در تیمار ۲ و ۳ هر رأس میش ۳۶ ساعت پس از برداشت اسفنج به‌ترتیب ۵۰ میکروگرم GnRH حل شده در ژل نانوهیدروکسید آلومینیوم و یا پروپیلن گلیکول (به‌صورت زیرجلدی) دریافت کرد. در تیمار ۴ هر رأس میش ۵۶ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج ۵۰ میکروگرم GnRH حل شده در آب مقطر (به‌صورت عضلانی) دریافت کرد. همه میش‌ها ۵۶ ساعت پس از برداشت اسفنج به‌روش لاپاراسکوپی تلقیح شدند. در زمان تلقیح، تعداد میش‌های فحل ثبت و وضعیت فحلی بر اساس تونوسیته رحم درجه‌بندی شد. غلظت استرادیول (E_2) پلاسما ۳۶ و ۵۶ ساعت پس از برداشت اسفنج اندازه‌گیری شد. غلظت پروژسترون (P_4) پلاسما و میزان تخمک‌ریزی نیز ۱۱ روز پس از تلقیح تعیین شد. میزان گیرایی، باروری و زایش گله نیز پس از زایمان محاسبه شد.

یافته‌ها: درصد بروز فحلی، کیفیت فحلی، درصد وقوع تخمک ریزی، تعداد تخمک‌های آزاد شده به‌ازای هر میش و غلظت P_4 پلاسما بین تیمارها مشابه بود. در تیمار ۱ غلظت E_2 پلاسما ۳۶ ساعت بعد از برداشت اسفنج بیشتر بود ($p<0/05$) اما، ۵۶ ساعت بعد از برداشت اسفنج بین تیمارها تفاوتی نداشت. در تیمار۳ درصد گیرایی نسبت به میش‌های تخمک‌ریزی کرده به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار ۲ بود ($p<0/05$). درصد گیرایی نسبت به میش‌های تلقیح شده، درصد باروری و برەزایی در تیمار ۳ بیشتر از سایر تیمارها بود اگرچه این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری کلی: آهسته رهش کردن GnRH با حل کردن آن در پروپیلن گلیکول و یا نانوذرات ژل هیدروکسید آلومینیوم مشابه eCG باعث بروز فحلی، تخمک‌ریزی می‌شود اما پروپیلن گلیکول کارایی بهتری در همزمان‌سازی حیوان برای تلقیح مصنوعی دارد.

واژه‌های کلیدی: آهسته رهش، باروری، نانوآلوم، هورمون آزادکننده گنادوتروپین، یاور واکسن

مقدمه

در سال‌های اخیر محققین به‌دنبال حذف گنادوتروپین سرم اسب (eCG) در پروتوکل‌های همزمان‌سازی فحلی هستند چرا که فشار اجتماعی بسیار زیادی از طرف کمیته اخلاق حمایت از حقوق حیوانات برای تولید eCG وجود دارد (Kamani et al., 2020; Manteca Vilanova et al., 2019; Masoumi et al., 2018) منع استفاده از eCG می‌تواند به‌شدت برنامه‌های همزمان‌سازی فحلی در خارج از فصل و تلقیح مصنوعی گوسفند و بز را تحت‌تأثیر قرار دهد چرا که هنوز هیچ فرآورده دیگری با فعالیت مشابه وجود ندارد. بنابراین نیاز به یک ترکیب جایگزین و یا پروتکل‌های جایگزین، به‌شدت در دنیا احساس می‌شود (Gonzalez-Bulnes et al., 2020). امروزه استفاده از آگونیست‌های هورمون آزاد کننده گونادوتروپین (GnRH) در پروتکل‌های همزمان‌سازی به‌عنوان جایگزین eCG پیشنهاد شده است. گزارش شده‌است که نتایج استفاده از تزریق GnRH به‌همراه آنالوگ‌های پروستاگلاندین اف-۲ آلفا ($PGF_2\alpha$) در برنامه‌ی همزمان‌سازی میش، از نظر بروز فحلی و همزمان شدن نمو فولیکولی مشابه با نتایج در میش‌های دریافت‌کننده‌ی eCG بود (Martinez-Ros and Gonzalez-Bulnes, 2019). در فصل تولیدمثلی نرخ فحلی و تخمک‌ریزی در صورت استفاده از تزریق GnRH در یک برنامه همزمان‌سازی، مشابه با این نرخ در یک پروتکل حاوی eCG بود (حدود ۸۵-۹۵ درصد)، ولی در فصل غیر تولیدمثلی کارایی آن بسیار پایین (۳۵-۴۸ درصد بروز فحلی) بود (Martinez-Ros and Gonzalez-Bulnes, 2019; Santos-Jimenez et al., 2020). گزارش شده است که در پروتکل‌های مبتنی بر $PGF_2\alpha$ و GnRH، تزریق تک‌دوز GnRH در زمان فحلی نمی‌تواند به‌اندازه کافی باعث رشد و بلوغ فولیکول تخمک‌ریزی کننده شود (Baird, 1983). هورمون GnRH پس از تزریق به‌سرعت توسط پپتیدازها تجزیه و در فیلتراسیون گلومرولی تصفیه می‌شود و به‌دلیل کوتاه بودن نیمه‌عمر آن (تقریباً ۴-۲ دقیقه)، اثر تحریکی مستمری بر رشد فولیکول‌ها ندارد

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-09-08]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.41.1.6]
[DOI: 10.61186/rap.14.41.1]

(Kumar and Sharma, 2014). علاوه بر این، تزریق GnRH باعث آزادسازی سریع هورمون لوتئینه کننده (LH) می‌شود و پالس‌های LH که برای بلوغ فولیکول و بروز علایم فحلی ضروری است در میش‌های دریافت کننده GnRH دیده نمی‌شود (Baird, 1983). برای حل این مشکل فرضیه‌های مختلفی توسط محققین مطرح شده است. یکی از این فرضیه‌ها آهسته رهش کردن آگونیست‌های GnRH و افزایش قابلیت ماندگاری آنها در بدن پس از تزریق است (Santos-Jimenez et al., 2020). نشان داده شده است که با تزریق GnRH حل شده در پروپیلن‌گلیکول ۳۶ ساعت پس از خارج‌سازی سیدر، پاسخ تخمدانی‌ای مشابه با میش‌های دریافت‌کننده eCG حاصل می‌شود، به‌طوری‌که ۷۵ درصد میش‌ها در فاصله زمانی ۳۶ تا ۴۸ ساعت پس از خارج‌سازی سیدر فحل می‌شوند. همچنین فاصله زمانی تخمک‌ریزی‌ها کاهش و تولید پروژسترون توسط جسم زرد بهبود می‌یابد (Santos-Jimenez et al., 2020).

روش‌های مختلفی برای کاهش سرعت رهاسازی داروها و گنادوتروپین‌ها از محل تزریق وجود دارد (Bazybek et al., 2022). برای کاهش سرعت رهاسازی هورمون‌های پپتیدی از حلال‌هایی از قبیل پلی‌ونیل‌پیرولیدون (PVP)، کربوکسی متیل سلولوز، اسید هیالورونیک و پروپیلن گلیکول استفاده شده است (Tríbulo *e*t al., 2012). احتمال می‌رود با حل کردن GnRH در حلال‌های مذکور نتایج مشابهی حاصل شود، اما به‌دلایلی همچون عدم کارایی کامل، ویسکوزیته زیاد، قابلیت حل شدن پایین و یا هزینه بالا، استفاده از هرکدام از این ترکیبات با محدودیت‌هایی همراه می‌باشد (Shirodkar et al., 1990). همچنین هنوز کارایی نتایج مطالعات اخیر، در سطح مزرعه و هنگام تلقیح مصنوعی در زمان ثابت (FTAI) آزموده نشده است.

امروزه استفاده از نانوتکنولوژی کمک شایانی به تکنولوژی‌های کمک تولیدمثلی به‌ویژه در دارو رسانی کرده است (Gonzalez-Bulnes et al., 2020). استفاده از یک ماده در مقیاس نانوی آن می‌تواند منجر به تغییر کارکردهای آن ماده گردد. فرض بر این است که ترکیب نمودن هورمون‌ها با نانوذرات مناسب می‌تواند دوز مصرفی هورمون را کاهش داده و یا نیمه‌عمر آن‌را افزایش دهد و یا این‌که جذب دارو توسط سلول‌ها را تسهیل نموده و از درجه سمیت آنها بکاهد (Hashem and Gonzalez-Bulnes, 2020). نشان داده شده است که استفاده از GnRH حل شده در نانوذرات کیتوزان در زمان فحلی در بزها، نرخ تخمک‌ریزی و تولید جنین را افزایش می‌دهد و از طرف دیگر دوز استفاده از GnRH تا ۷۵ درصد کاهش می‌یابد (Hashem and Sallam, 2020). ژل هیدروکسید آلومینیوم به‌عنوان ادجوانت در فرمولاسیون برخی واکسن‌ها مانند دیفتری، کزاز و یا آنتروتوکسمی کاربرد دارد. این ترکیب پروتئین‌ها را به‌خوبی جذب نموده و سرعت رهاسازی آن‌ها را کاهش می‌دهد (Shirodkar et al., 1990). علاوه بر این، سلامت این ماده از نظر سازمان غذا و داروی ایالات متحده امریکا برای استفاده در انسان و حیوان مورد تأیید قرار گرفته است (Heimlich et al., 1999). از ژل هیدروکسید آلومینیوم برای جذب هورمون‌های گونادوتروپینی و کاهش سرعت رهاسازی آن‌ها به‌طور موفقیت‌آمیزی برای القای سوپراوولاسیون در خرگوش و گاو استفاده شده و گزارش شده است که کارآیی آن در کنترل سرعت رهاسازیِ FSH بالاتر از PVP، کربوکسی متیل سلولوز، اسید هیالورونیک و پروپیلن گلیکول است. علاوه بر این، ژل هیدروکسید آلومینیوم به وفور در دسترس بوده و همچنین ترکیبات پپتیدی به‌راحتی در آن حل می‌شوند (Kumar and Sharma, 2014). تحقیقات نشان داده‌اند که قدرت جذب پروتئین‌ها و پپتیدها توسط ژل هیدروکسید آلومینیوم در فرم نانو بالاتر و التهاب ایجاد شده در ناحیه تزریق نیز کمتر از فرم غیر نانوی آن است (Amini et al., 2017). بنابراین ممکن است نانوهیدروکسید آلومینیوم نسبت به نوع غیرنانوی آن در جذب هورمون‌های پپتیدی و کاهش سرعت رهاسازی آن مؤثرتر باشد، اما مستندات علمی در این زمینه بسیار کم است. هدف از این پژوهش، مقایسه اثر تزریق GnRH حل شده در ژل نانو هیدروکسید آلومینیوم و یا پروپیلن گلیکول بر القای تخمک‌ریزی و بازده تولیدمثلیِ پس از تلقیح مصنوعی، در گوسفندان همزمان‌سازی شده‌ی فحلی بود.

مواد و روش‌ها

ساخت نانو ذرات ژل هیدروکسید آلومینیوم

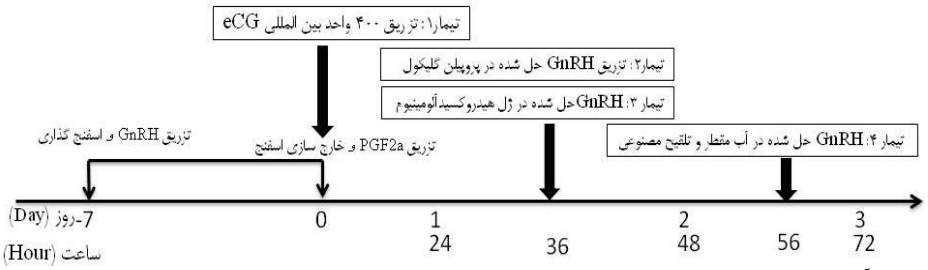
نانو ذرات ژل هیدروکسید آلومینیوم در آزمایشگاه شیمی دانشگاه بوعلی‌سینای همدان توسط فرآیند سل–ژل و روش پایین به بالا تهیه گردید (Amini et al., 2017). برای این‌منظور ابتدا هیدروکسید سدیم ۰/۰۴ مولار به‌تدریج به محلول ۳/۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ($AlCl_3.6H_2O$, Merck) اضافه و محلول حاصل برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق توسط مگنت مغناطیسی هم زده شد. میزان pH محلول حاصل توسط هیدروکسید سدیم ۰/۰۱ مولار در محدوده ۷ تنظیم و برای شستن و حذف کلرید سدیم، ژل حاصل با آب مقطر شستشو داده شد. برای این‌منظور ژل تهیه شده ۵ بار سانتریفیوژ (۳۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲۵ دقیقه) و محلول رویی دور ریخته شد. در مرحله پایانی ژل شستشو شده توسط آب دوبار تقطیر رقیق و برای پخش کردن اندازه ذرات توسط هموژنایزر اولتراسونیک میله‌ای (مدل HD3200، Bandelin، Germany) با توان ۱۰۰ درصد (۱۰۰۰ وات) برای مدت ۱۵ دقیقه اولتراسونیک شد. اندازه ذرات توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM، شرکت آریا الکترون اپتیک، ایران) تعیین شد. همچنین اندازه ذرات هیدرودینامیکی، میزان پتانسیل زتا و میزان شاخص پراکندگی اندازه ذرات (PDI) توسط دستگاه زتاسایزر (Malvern، England) که مبتنی بر تکنیک‌های پراکندگی دینامیک نور (DSL) است تعیین گردید. پس از تأیید اندازه نانو ذرات ژل هیدروکسید آلومینیوم، استوک‌هایی با غلظت ۵ میلی‌گرم آلومینیوم در هر میلی‌لیتر آماده و تا زمان استفاده (حداکثر تا یک ماه) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پروپیلن گلیکول با نام ۱،۲–پروپاندیول از شرکت مرک (Germany) تهیه شد. پروپیلن گلیکول و نانو ذرات ژل هیدروکسید آلومینیوم تهیه

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-09-08]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.41.1.6]
[DOI: 10.61186/rap.14.41.1]

شده، قبل از ترکیب با GnRH در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه اتوکلاو و به‌صورت سترون بسته‌بندی شدند.

طرح آزمایشی و تلقیح مصنوعی

طرح آزمایشی این پژوهش توسط کمیته اخلاق حمایت از حقوق حیوانات دانشگاه بوعلی‌سینا بررسی و با کد اخلاق IRBASU.REC1400/62 مورد تصویب قرار گرفت. در فصل تولیدمثلی تعداد ۶۷ رأس میش بالغ غیرآبستن نژاد مهربان با میانگین وزنی ۵۷/۷۲±۵/۳۳، سن ۲-۴ سال (با توزیع سنی تقریباً برابر) و وضعیت بدنی ۳/۵-۳ از گله آموزشی- تحقیقاتی دانشگاه بوعلی‌سینا انتخاب گردید. همه میش‌های انتخاب شده تا پایان آزمایش در شرایط مدیریتی و آب و هوایی مشابه نگهداری شدند و دسترسی آزاد به آب سالم و خنک داشتند و از نظر تغذیه‌ای نیز از پس‌چر گندم استفاده کردند. تیمارهای آزمایشی این پژوهش در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- تیمارهای آزمایشی: در تیمار ۱ بلافاصله پس از برداشت اسفنج، میش‌ها ۴۰۰ واحد بین‌المللی eCG به‌صورت عضلانی دریافت کردند. در تیمار ۲ و تیمار ۳ به‌ترتیب ۵۰ میکروگرم GnRH حل شده در ژل نانوهیدروکسید آلومینیوم یا پروپیلن گلیکول ۳۶ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج به‌صورت زیرپوستی به میش‌ها تزریق شد. در تیمار ۴ ابتدا ۵۰ میکروگرم GnRH در آب مقطر سترون حل و ۵۶ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج، به‌صورت عضلانی به میش‌ها تزریق شد. همه میش‌ها ۵۶ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج به‌روش لاپاراسکوپی تلقیح مصنوعی شدند.

Figure 1. Experimental groups: Each ewe in T_1 was received 400 IU eCG (i.m) immediately after removing the sponge. Ewes in T_2 and T_3 were received 50 µg of GnRH (s.c) dissolved in aluminum-hydroxide-gel and propyleneglycol 36 h after removing the sponge, respectively. Each ewe in T_4 was received 50 µg of GnRH (i.m) dissolved in distilled water 56 h after removing the sponge. All of the ewes were inseminated laparoscopically 56 h after removing the sponge.

برای همزمان‌سازی چرخه فحلی از پروتکل کوتاه‌مدت بر پایه تیمار پروژسترونی استفاده شد (Martemucci and D'Alessandro, 2011). در ابتدای آزمایش به هر رأس میش ۵۰ میکروگرم GnRH (با نام تجاری رینوگناد حاوی ۵۰ میکروگرم گنادورولین استات در هر میلی‌لیتر، شرکت رویان دارو، ایران) به‌صورت عضلانی تزریق و سپس اسفنج آغشته به ۶۰ میلی‌گرم مدروکسی پروژسترون استات (Spine ،Hipra) برای مدت ۷ روز در واژن آنها قرار داده شد. در روز خارج‌سازی اسفنج‌ها، ۱ میلی‌لیتر $PGF_2\alpha$ (معادل ۵ میلی‌گرم دینوپروست، France) به هر رأس میش تزریق و سپس به چهار تیمار تقسیم شدند. میش‌های تیمار ۱ بلافاصله پس از برداشت اسفنج، ۴۰۰ واحد بین‌المللی گنادوتروپین جفت اسبی (eCG، هیپرای اسپانیا) به‌صورت عضلانی دریافت کردند. در تیمار ۲ ابتدا یک میلی‌لیتر گنادورولین استات (معادل ۵۰ میکروگرم GnRH) به نسبت ۱ به ۴ با ژل نانوهیدروکسیدآلومینیوم رقیق گردید، به‌طوری که غلظت نهایی آلومینیوم در آن به ۳ میلی‌گرم آلومینیوم در هر میلی‌لیتر رسید. ترکیب مذکور برای مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد، سپس ۳۶ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج به‌صورت زیرپوستی به میش‌ها تزریق گردید. در تیمار ۳ ابتدا یک میلی‌لیتر گنادورولین استات (معادل ۵۰ میکروگرم GnRH) به نسبت ۱ به ۴ در پروپیلن‌گلیکول حل و ۳۶ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج، به‌صورت زیرپوستی به میش‌ها تزریق شد. ترکیب ذکر شده نیز یک ساعت قبل از تزریق آماده گردید. در تیمار ۴ ابتدا یک میلی‌لیتر گنادورولین استات (معادل ۵۰ میکروگرم GnRH) به نسبت ۱ به ۴ در آب مقطر سترون حل و ۵۶ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج، به‌صورت عضلانی به میش‌ها تزریق شد. غلظت ژل نانو هیدروکسید آلومینیوم مورد استفاده در این پژوهش بر اساس غلظت استفاده شده از فرم غیرنانوی آن در تحقیقات قبلی انتخاب گردید. یک روز پس از خارج‌سازی اسفنج‌ها ۲ قوچ تیزر به داخل گله رها و وضعیت فحلی گله بررسی گردید. علاوه بر آن، وضعیت و کیفیت فحلی هر میش هنگام تلقیح مصنوعی با ارزیابی تونوسیته عضلات شاخ‌های رحمی و درجه‌بندی رنگ آن به‌روش لاپاراسکوپی تعیین گردید (Fierro et al., 2011). برای این‌منظور ۳ درجه کیفیت در نظر گرفته شد. کیفیت عالی: که در آن شاخ‌های رحمی کاملاً پرخون، به‌رنگ صورتی و شبیه به رنگ سالمون بودند، همچنین قوام و تون عضلانی در شاخ‌های رحمی زیاد بوده به‌طوری که در برابر فشار نسبتاً آرام پیپت تلقیح لاپاراسکوپی مقاومت و به آسانی سوزن پیپت تلقیح به آن نفوذ می‌کرد. کیفیت خوب: که در آن شاخ‌های رحمی صورتی رنگ بوده ولی دارای قوام و تونوس عضلانی نسبتاً ضعیفی بودند، به‌طوری که در برابر فشار آرام پیپت تلقیح لاپاراسکوپی جابجا می‌شد و سوزن پیپت تلقیح لاپاراسکوپی با کمی تلاش به آن نفوذ می‌کرد. کیفیت ضعیف: که در آن شاخ رحمی کاملاً رنگ‌پریده و سفید بود؛ همچنین قوام و تونوس عضلانی بسیار ضعیف بود، به‌طوری که شاخ رحمی بدون مقاومت همراه پیپت تلقیح حرکت می‌کرد و نفوذ سوزن به داخل شاخ رحمی دشوار بود و به‌عنوان عدم فحلی در نظر گرفته شد. همه میش‌ها ۵۶ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج با استفاده از اسپرم یک قوچ افشار-برولا که باروری آن قبلاً به اثبات رسیده

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-09-08]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.41.1.6]
[DOI: 10.61186/rap.14.41.1]

بود به‌روش لاپاراسکوپی، تلقیح داخل رحمی شدند. برای این‌منظور از دو انزال به فاصله ۱۰ دقیقه از هم استفاده شد. منی اولیه از لحاظ کیفی بررسی شد. مجموع حجم انزال اول و دوم ۲/۵ سی‌سی بود. برای ارزیابی حرکت موجی، قطره‌ای از منی تازه انزال شده روی لام گرم قرار داده شد و با میکروسکوپ نوری اسکور حرکت موجی تعیین شد. علاوه بر این، قطره‌ای از منی توسط رقیق‌کننده رقیق و با میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۱۰۰ برابر) میزان تحرک و زنده‌مانی ارزیابی شد. برای تعیین غلظت نمونه نیز مقداری از منی به نسبت ۱ به ۲۰۰ با آب مقطر رقیق و به کمک لام هموسیتومتر و با میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۴۰۰ برابر) تعیین غلظت شد. حرکت موجی با اسکور ۴، زنده‌مانی بالای ۹۵ درصد و جنبایی پیشرونده بالای ۸۰ درصد بود. منی پس از ارزیابی اولیه، توسط رقیق‌کننده‌ی تجاری تریلادیل (Minitube، Germany) به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق گردید و غلظت نهایی آن به ۱۰۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر رسانده شد (Fierro et al., 2011). منی رقیق شده تا زمان تلقیح، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و به مزرعه تحقیقاتی منتقل شد. منی رقیق شده حداکثر ۱۰ ساعت پس از اخذ تلقیح شد. برای تلقیح مصنوعی، ابتدا میش‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت از آب و خوراک محروم شدند. سپس هر میش بر روی کریدل مقید و پس از ضدعفونی، دو سوراخ توسط تروکار در طرفین خط شکمی و نزدیک به پستان ایجاد شد و محوطه شکمی توسط گاز CO2 باز گردید. شاخ‌های رحمی با استفاده از تلسکوپ لاپاراسکوپی (لنز ۳۰ درجه اشتورز، آلمان) متصل به منبع نور سرد (المپیوس، ژاپن) رویت و پس از بررسی کیفیت فحلی، ۰/۵ سی‌سی اسپرم گرم شده (در دمای ۳۰ درجه) توسط پیپت تلقیحِ لاپاراسکوپی آسپیره گردید و سپس به دو بخش تقسیم شد و هر بخش به یک شاخ رحمی میش تلقیح گردید. برای تلقیح همه گوسفندها از تکنسین کاملاً با تجربه استفاده شد. پس از اتمام عملیات تلقیح، محل تروکار توسط اسپری اکسی‌تتراسایکلین (شرکت داروسازی وتاک) ضدعفونی گردید.

ارزیابی میزان تخمک‌ریزی

یازده روز پس از تلقیح مصنوعی، میزان تخمک‌ریزی به‌روش لاپاراسکوپی و از طریق معاینه تخمدان‌ها و شمارش تعداد اجسام زرد تعیین شد (Fierro et al., 2011). برای این‌منظور، میش‌ها پس از محرومیت از آب و خوراک (به‌مدت ۱۸ ساعت)، بر روی تخت لاپاراسکوپی مقید و پس از ایجاد دو سوراخ در طرفین خط شکمی و نزدیک به پستان، تخمدان‌ها به‌کمک دوربین لاپاراسکوپی از میان لیگامنت نگهدارنده تخمدان (مزوواریوم) خارج گردید. سپس هر تخمدان به‌کمک گرسپر لاپاراسکوپی (صبا تجهیزان ایرانیان، برند Optica، Italy) ثابت شد و تعداد اجسام زرد تخمدان‌های راست و چپ شمارش شد. سپس تعداد میش‌های تخمکریزی کرده و تعداد تخمک‌های آزاد شده به‌ازای هر میش محاسبه شد.

اندازه‌گیری استرادیول و پروژسترون پلاسما

به‌منظور اندازه‌گیری غلظت استرادیول (E_2)، ۳۶ و ۵۶ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج، از میش‌های هر تیمار از طریق ورید وداج نمونه خون جمع‌آوری شد. خون‌های گرفته شده به داخل لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA تخلیه و پلاسمای آن‌ها به‌کمک سانتریفوژ (۲۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه) جدا و تا زمان اندازه‌گیری غلظت هورمون‌ها، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. همچنین ۱۱ روز پس از تلقیح مصنوعی از میش‌ها دارای جسم زرد خون‌گیری و به داخل لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA تخلیه و پلاسمای آن‌ها به‌کمک سانتریفوژ (با شرایط ذکر شده برای استرادیول) جدا و به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد تا غلظت پروژسترون (P_4) آن‌ها اندازه‌گیری شود. هورمون‌های E_2 و P_4 به‌روش الایزای رقابتی، با استفاده از دستگاه الایزاریدر (Bio Tek, USA) و بر اساس دستورالعمل کیت‌های تجاری (ایده‌آل تشخیص آتیه، ایران) اندازه‌گیری شد. حداقل میزان قابل اندازه‌گیری برای E_2، ۸/۳ پیکوگرم در میلی‌لیتر و ضریب تغییرات درون سنجش ۴/۰۱ درصد بود. حداقل میزان قابل اندازه‌گیری برای P_4، ۰/۱۲ نانوگرم در میلی‌لیتر و ضریب تغییرات درون سنجش ۴/۵ درصد بود.

عملکرد تولید مثلی

چهل‌وپنج روز پس از تلقیح مصنوعی، همه میش‌های تلقیح شده با استفاده از دستگاه اولتراسونوگرافی مجهز به پروب کانوکس ۳/۵ مگاهرتزی به‌روش شکمی معاینه و میش‌های آبستن و تعداد جنین‌ها تشخیص داده شد. همچنین در پایان آبستنی، تعداد میش‌های زایش کرده و تعداد دوقلویی بره‌ها ثبت و عملکرد تولیدمثلی توسط روابط زیر محاسبه شد: نرخ گیرایی = تعداد میش آبستن در سونوگرافی ۴۵ روزگی به تعداد میش تلقیح شده × ۱۰۰؛ نرخ بره‌زایی = تعداد میش‌های زایمان کرده به تعداد میش تلقیح شده × ۱۰۰؛ درصد مرگ و میر جنینی پس از ۴۵ روزگی = تعداد بره‌های متولد شده به تعداد جنین‌های تشخیص داده شده در سونوگرافی ۴۵ روزگی × ۱۰۰؛ درصد فکاندیتی = تعداد بره‌های متولد شده به تعداد میش‌های تلقیح شده × ۱۰۰؛ درصد دوقلوزایی = تعداد زایش دوقلویی به تعداد میش‌های زایمان کرده × ۱۰۰؛ درصد تزاید گله = تعداد بره‌های متولد شده به تعداد میش‌های زایمان کرده × ۱۰۰.

تجزیه و تحلیل آماری

همه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۴) تجزیه و تحلیل گردید. داده‌های مربوط به غلظت استروژن به‌روش طرح کاملاً تصادفی با اندازه‌گیری‌های تکرار شده در زمان و با استفاده از رویه MIXED، داده‌های مربوط به غلظت پروژسترون بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از رویه GLM و داده‌های مربوط به درصد فحلی، تخمک‌ریزی، میزان گیرایی در ۴۵ روزگی به‌روش غیرپارامتری و وریه Freq آنالیز شدند. همچنین داده‌های مربوط به فکاندیتی، تزاید گله و تعداد تخمک‌ریزی با استفاده از وریه Npar1way Wilcoxon آنالیز گردید. اختلاف میانگین‌ها با احتمال خطای کمتر از ۵ درصد توسط آزمون دانکن با هم مقایسه شد.

نتایج و بحث

تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانوذرات ژل هیدروکسیدآلومینیوم در شکل ۲ نشان داده شده است. اندازه ذرات ژل هیدروکسیدآلومینیوم در محدوده نانو مقیاس (مطابق تعریف نانو مقیاس در استاندارد ۱-۸۰۰۰۴-ISO) می‌باشد.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-09-08]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.41.1.6]
[DOI: 10.61186/rap.14.41.1]

میانگین اندازه نانوذرات ژل هیدروکسیدآلومینیوم ۲۰/۱۸±۴/۷۷ نانومتر محاسبه شد. اندازه هیدرودینامیکی نانوذرات ژل هیدروکسید آلومینیوم در این پژوهش نیز ۱۷۹/۱ نانومتر و میزان شاخص پراکندگی (PDI) برابر با ۰/۰۸۵ بود. همچنین در pH= ۷ میزان پتانسیل زتا ۴۸/۷+ میلی‌ولت بود. اندازه هیدرودینامیکی نانوذرات در مقایسه با اندازه‌های به دست آمده از تصاویر SEM بزرگ‌تر است. در واقع نتایج این دو آنالیز به طور مستقیم، قابل مقایسه نیستند. زیرا قطر هیدرودینامیکی در محلول‌های کلوئیدی آبی شامل لایه‌های محلول (مولکول‌های آب و یون‌ها) می‌شود. همچنین ممکن است در حالت محلول انبوهه‌های کوچکی تشکیل شوند که منجر به افزایش اندازه قطر هیدرودینامیکی در مقایسه با اندازه نانوذرات در آزمون SEM گردد (Amini et al., 2017).

مکانیسم‌های مختلفی که توسط آن ژل هیدروکسید آلومینیوم می‌تواند پروتئین‌ها را جذب نماید پیشنهاد شده است. در این‌مورد نیروی الکترواستاتیک سطحی ژل هیدروکسید آلومینیوم نقش مهمی بازی می‌کند. نقطه ایزوالکتریک ژل هیدروکسید آلومینیوم ۱۱/۴ است و در pH فیزیولوژیک دارای بار مثبت بوده و پروتئین‌ها را که دارای بار منفی هستند به‌خوبی جذب می‌کند. پروتئین‌های جذب شده می‌توانند به‌مرور با پروتئین‌های میان‌بافتی جایگزین شده و رها شوند (Callahan et al., 1991; Chang et al., 1997). در آزمایشی در گاوهای سوپراوولاسیون شده نشان داده شد که تزریق هورمون محرک فولیکول (FSH) حل شده در ژل آلومینیوم هیدروکسید، باعث کاهش سرعت آزادسازی FSH می‌گردد؛ به‌طوری‌که ۱۲ ساعت پس از تزریق، غلظت آن در خون به پیک رسیده و پس از آن تا ۹۶ ساعت رهاسازی آن به‌طور مستمر ادامه می‌یابد و تحریک تخمدان برای تخمک‌ریزیِ چندتایی با تزریق تک دوز FSH حل شده در ژل هیدروکسید آلومینیوم رخ می‌دهد (Kimura, 2016). ژل هیدروکسید آلومینیوم در فرم نانو به‌دلیل کوچک بودن اندازه ذرات آن و بالا بودن سطح تماس واکنشی، نسبت به شکل غیر نانوی آن ظرفیت بالایی در جذب آنتی‌ژن‌های پروتئینی دارد (He et al., 2015; Li et al., 2014). در این پژوهش میزان پتانسل زتای ژل هیدروکسید آلومینیوم در فرم نانو ۴۸/۷mv+ بود که همسو با نتایج پژوهش‌های پیشین است (Amini et al., 2017). گزارش شده است که ژل هیدروکسید آلومینیوم در فرم نانو پتانسیل زتای بیشتری (>۳۰mv) نسبت به فرم غیرنانو (<۳۰ mv) دارد و باعث می‌شود که دافعه الکترواستاتیک به‌اندازه کافی قوی باشد تا از تجمع ذرات جلوگیری کند (Amini et al., 2017). شاخص پراکندگی اندازه ذرات نیز پارامتر مهمی است که نشان‌دهنده میزان یکنواختی اندازه ذرات ساخته‌شده است. همچنین نزدیک بودن شاخص پراکندگی اندازه ذرات به صفر (که مقدار آن در این پژوهش ۰/۰۸۵ بود) نشان‌دهنده میزان یکنواختی مناسب نانوذرات مذکور است. این ویژگی‌ها از عوامل مؤثر بر قابلیت جذب پروتئین توسط نانوذرات هیدروکسید آلومینیوم است. در این پژوهش ملاک ارزیابی تأثیر GnRH حل شده در ژل نانو هیدروکسید آلومینیوم، تغییرات هورمون‌های استرادیول و پروژسترون، تون عضلات صاف رحمی، نرخ تخمک‌ریزی و میزان گیرایی پس از تلقیح مصنوعی بود.

جدول ۱- مقایسه اثر تزریق GnRH حل شده در نانو ذرات ژل هیدروکسید آلومینیوم و پروپیلن گلیکول و یا eCG بر درصد بروز فحلی و کیفیت آن بر اساس تونوسیته رحم

Table 1. The effect of injection of GnRH dissolved in aluminum-hydroxide-gel nanoparticles, propyleneglycol oeCG on estrus occurrence and estrus quality according to uterine tonicity.

تیمارها [1] Treatments[1]	تعداد میش همزمان شده Number of synchronized ewes	تعداد میش فحل (درصد) Number of ewes with signs of estrus (%)	تعداد میش بدون علائم فحلی (درصد) Number of ewes without signs of estrus	کیفیت فحلی بر اساس نمره شاخ‌های رحمی Estrus quality according to uterine horns scores	
				عالی (درصد) Excellent (%)	خوب (درصد) Good (%)
1	15	(86.67) 13	(13.13) 2	(53.33) 8	(33.40) 5
2	18	(100) 18	(00.00) 0	(66.67) 12	(33.34) 6
3	16	(100) 16	(00.00) 0	(75.00) 12	(25.00) 4
4	18	(88.89) 16	(11.10) 2	(44.454) 8	(44.45) 8
P value		0.2164	0.2164	0.2709	0.6941

تیمار ۱: تزریق ۴۰۰ واحد بین‌المللی eCG به‌صورت عضلانی بلافاصله بعد از خارج‌سازی اسفنج؛ تیمار ۲ و۳: به‌ترتیب تزریق ۵۰ میکروگرم GnRH حل شده در ژل نانوهیدوروکسید آلومینیوم و ۵۰ میکروگرم GnRH حل شده در پروپیلن گلیکول به‌صورت زیر جلدی ۳۶ ساعت بعد از خارج‌سازی اسفنج؛ تیمار ۴: تزریق ۵۰ میکروگرم GnRH حل شده در آب مقطر به‌صورت عضلانی ۵۶ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج. حروف غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (p<۰/۰۵).

Treat 1: Injection of 400 IU eCG (i.m) immediately after removing the sponge. Treat 2 and 3 injection of 50 µg of GnRH (s.c) dissolved in aluminum hydroxide gel or propyleneglycol 36 h after removing the sponge, respectively. Treat 4: injection of 50 µg of GnRH (i.m) dissolved in distilled water 56 h after removing the sponge. Different letters in each column indicate significant differences between treatments (p<0.05).

نتایج مربوط به میزان بروز فحلی و کیفیت آن در جدول ۱ نشان داده شده است. تیمارهای دریافت کننده GnRH حل شده در ژل نانوهیدروکسید آلومینیوم، پروپیلن گلیکول، آب مقطر و eCG از نظر میزان بروز علایم فحلی مشابه بودند (P>۰/۰۵). اگر چه نرخ بروز فحلی در تیمارهای دریافت کننده GnRH حل شده در ژل نانوهیدروکسید آلومینیوم و پروپیلن گلیکول از نظر عددی بالاتر بود، اما از نظر آماری تفاوتی معنی‌داری با سایر تیمارها نداشت. همسو با این پژوهش، سانتوز و همکاران (Santos-Jimenez et al., 2020) گزارش کردند که نرخ بروز فحلی پس از استفاده از GnRH حل شده در پروپیلن گلیکول مشابه با میش‌های دریافت کننده eCG است. تعداد میش‌هایی که بر اساس ارزیابی تونوسیته شاخ‌های رحمی دارای فحلی با کیفیت عالی بودند (جدول ۱) در تیمار پروپیلن گلیکول بیشتر از سایر تیمارها بود، ولی از نظر آماری تفاوت

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-09-08]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.41.1.6]
[DOI: 10.61186/rap.14.41.1]

معنی‌دار نبود. در مورد استفاده از GnRH حل شده در ژل نانوهیدروکسید آلومینیوم بر بروز علائم فحلی شواهد علمی وجود ندارد. در نشخوارکنندگان در فاز فولیکولی استرادیول ترشح‌شده از فولیکول‌های در حال رشد باعث بروز رفتار فحلی و تغییرات اندوکرینی مربوط به آن می‌شود. افزایش ترشح استرادیول در زمان فحلی و نزدیک به زمان تخمک‌ریزی باعث بروز علایم فحلی، افزایش تون عضلات صاف میومتریوم و شاخ‌های رحمی می‌شود (Fierro et al., 2011).

جدول ۲- مقایسه اثر تزریق GnRH حل شده در نانو ذرات ژل هیدروکسید آلومینیوم و پروپیلن گلیکول و یا eCG بر درصد تخمک ریزی و غلظت پروژسترون پلاسما (میانگین± S.E.M).

Table 2. The effect of injection of GnRH dissolved in aluminum-hydroxide-gel nanoparticles, propyleneglycol oreCG on ovulation rate and plasma progesterone concentration (Mean ± S.E.M).

پروژسترون (نانوگرم در میلی‌لیتر) Progestrone (ng/ml)	نرخ تخمک‌ریزی Ovulation rate	میش‌های تخمک‌ریزی کرده (درصد) Ovulated ewes (%)	تعداد تخمک‌های آزاد شده Number of released oocytes	میش‌های تخمک‌ریزی کرده Number of Ovulated ewes	تعداد میش همزمان شده Number of Synchronized ewes	تیمارها [1] Treatments[1]
8.03±1.84	1.07	93.33	15	14	15	1
5.58±1.68	1.12	88.89	18	16	18	2
8.17±1.56	1.00	66.67	10	10	16	3
6.04±2.04	1.15	22.72	15	13	18	4
0.5253	0.6057	0.1751				P value

تیمار ۱: تزریق ۴۰۰ واحد بین‌المللی eCG به‌صورت عضلانی در زمان خارج‌سازی اسفنج؛ تیمار ۲ و۳: به‌ترتیب تزریق ۵۰ میکروگرم GnRH حل‌شده در ژل نانوهیدورکسید آلومینیوم و ۵۰ میکروگرم GnRH حل‌شده در پروپیلن گلیکول به‌صورت زیرجلدی ۳۶ ساعت بعد از خارج‌سازی اسفنج؛ تیمار ۴: تزریق۵۰ میکروگرم GnRH حل‌شده در آب مقطر به‌صورت عضلانی ۵۶ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج. حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (p<۰/۰۵).

Treat 1: Injection of 400 IU eCG (i.m) with sponge removal. Treat 2 and 3 injection of 50 µg of GnRH dissolved in aluminum hydroxide gel or propyleneglycol 36 h post sponge removal (hpsr) respectively. Treat 4: injection of 50 µg of GnRH dissolved in distilled water 56 hpsr. Different letters in each column indicate significant differences between treatments (p<0.05).

نتایج مربوط به درصد میش‌های تخمک‌ریزی کرده، تعداد تخمک‌های آزاد شده به‌ازای هر میش (نرخ تخمک‌ریزی) و غلظت پروژسترون پلاسما ۱۱ روز بعد از تلقیح مصنوعی در جدول ۲ نشان داده شده است. از نظر درصد میش‌های تخمک‌ریزی کرده و تعداد تخمک‌های آزاد شده به‌ازای هر میش در بین تیمارها اختلافی وجود نداشت (P>۰/۰۵) اما درصد تخمک‌ریزی در تیمار eCG از نظر عددی بیشتر از سایر تیمارها بود. همسو با این پژوهش، سانتوز و همکاران (Santos-Jimenez et al., 2020) گزارش کردند که پس از استفاده از GnRH حل شده در پروپیلن‌گلیکول، درصد میش‌های تخمک‌ریزی کرده مشابه با میش‌های دریافت کننده eCG است. با وجود این، در پژوهشی حل کردن هورمون محرک فولیکول (FSH) در ژل هیدروکسید آلومینیوم و تزریق زیرجلدی و یا عضلانی آن باعث تحریک تخمدان و سوپراوولاسیون در گاو شد و تعداد تخمک‌ریزی‌ها و جنین‌های تولید شده با تزریقات مکرر و معمول FSH برای القای سوپراوولاسیون برابر بود (Kimura, 2016)، که نشان می‌دهد ژل هیدروکسید آلومینیوم قادر است طول مدت اثر یک هورمون پپتیدی را افزایش دهد. در این پژوهش تیمار میش‌ها با GnRH میزان تخمک‌ریزی را نسبت به تیمار دریافت کننده eCG اکاهش نداد. برخلاف نتایج این پژوهش خان و همکاران (Khan et al., 2003) نشان دادند که تزریق hCG در زمان جفت‌گیری میش‌ها، باعث افزایش نرخ تخمک‌ریزی می‌شود. سرژ LH قبل از تخمک‌ریزی برای رشد فولیکول غالب و بلوغ تخمک درون آن ضروری است. استفاده از hCG و LH اگزوژن می‌تواند رشد و بلوغ فولیکول‌های بزرگ تخمدان را سبب شود که این کار را از طریق اتصال به رسپتورهای خود روی سلول‌های گرانولوزا انجام می‌دهد و این عمل LH مستقل FSH است. علاوه بر این، فاز پایانی رشد فولیکول از طریق تزریق LH بدون آن‌که باعث لوتینه شدن زودهنگام شود امکان‌پذیر است (Kumar and Sait, 2011). در گوسفند و بز سرژ LH ۲۴ ساعت قبل از تخمک‌ریزی رخ می‌دهد تا رشد نهایی فولیکول را سبب شود (Campbell et al., 2007). بنابراین سرژ القاشده توسط تزریق GnRH اگزوژن در زمان فحلی ممکن است باعث رشد نهایی فولیکول شده باشد و یا این‌که باعث القای تخمک‌ریزی شود. در مورد نحوه پاسخ تخمدان به استفاده از GnRH حل شده در ژل نانوهیدروکسید آلومینیوم مستند علمی برای مقایسه نتایج یافت نشد. بنابراین با توجه به این‌که تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشده است می‌توان نتیجه گرفت که حل کردن GnRH در نانوذرات ژل هیدروکسیدآلومینیوم می‌تواند همانند سایر تیمارها باعث القای تخمک‌ریزی شود.

غلظت پروژسترون در این پژوهش بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان نداد اما میانگین عددی آن در تیمارهای دریافت کننده eCG و GnRH حل شده در پروپیلن گلیکول بالاتر از تیمار دریافت کننده GnRH حل شده در ژل هیدروکسید آلومینیوم و یا آب مقطر بود. افزایش پروژسترون پلاسما پس از تزریق GnRH به افزایش تعداد جسم زرد (تخمک‌ریزی) و بهبود عملکرد جسم زرد مربوط است (Khan et al., 2007). با توجه به این‌که در این پژوهش تعداد جسم زرد بین تیمارها تفاوتی نداشت بنابراین ممکن است تزریق eCG و GnRH حل شده در پروپیلن گلیکول عملکرد اجسام زرد را به‌طور جزئی بهبود داده باشد. در گوسفند ترشح LH برای رشد طبیعی جسم زرد ضروری است. علاوه بر این، حفظ عملکرد جسم زرد به‌طور کامل به LH وابسته است (Khan et al., 2007). بر خلاف نتایج این پژوهش، در مطالعه‌ای نشان داده شد که در بزهای تیمار شده با GnRH نسبت به گروه تیمار شده با GnRH حل شده در نانوذرات کیتوزان، غلظت پروژسترون بیشتری داشتند (Hashem and Sallam, 2020). این تفاوت در غلظت پروژسترون احتمالاًبه دوز و کینتیک رهاسازی GnRH از ترکیب استفاده شده برای کند کردن رهش مربوط است. یوتاکا و همکاران (Yutaka et al., 2001) نشان دادند که میش‌های تیمار شده با ۳۰۰ واحد hCG چهار روز بعد از تلقیح مصنوعی (در اوایل فاز لوتئال)، غلظت

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-09-08]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.41.1.6]
[DOI: 10.61186/rap.14.41.1]

پروژسترون بالاتری نسبت به میش‌های تیمار شده با سه دوز مکرر ۱۰۰ واحدی (روزهای ۳، ۴ و ۵ بعد از تلقیح) از hCG داشته‌اند و این نشان می‌دهد که افزایش غلظت پروژسترون وابسته به دوز است. بنابراین کاهش غلظت پروژسترون در تیمار ۲ ممکن است به کند شدن رهش GnRH در اثر حل شدن آن در ژل نانوهیدروکسید آلومینیوم باشد.

جدول ۳- مقایسه اثر تزریق GnRH حل شده در نانو ذرات ژل هیدروکسید آلومینیوم و پروپیلن گلیکول و یا eCG بر غلظت استرادیول پلاسما (بر حسب پیکوگرم در میلی‌لیتر).

Table 3. The effect of injection of GnRH dissolved in aluminum-hydroxide-gel nanoparticles, propyleneglycol or eCG on plasma estradiol concentration (Pg/ml).

کل دوره Total Time	۵۶ ساعت بعد از خارج‌سازی اسفنج 56 h post sponge removal	۳۶ ساعت بعد از خارج‌سازی اسفنج 36 h post sponge removal	تیمار [1] Treatmens[1]
56.92[a]	52.52	59.74[a]	1
42.21[b]	44.94	41.43[b]	2
45.33[ab]	44.09	46.97[ab]	3
45.73[ab]	49.78	41.96[b]	4
3.58	3.91	3.43	SEM
			P Value
0.0074	0.6045	0.0162	تیمار (Treatment)
0.8442		-	زمان (Time)
0.4460		-	تیمار×زمان (Treatment×Time)

تیمار ۱: تزریق ۴۰۰ واحد بین¬المللی eCG به¬صورت عضلانی بلافاصله بعد از خارج¬سازی اسفنج؛ تیمار ۲ و۳: به‌ترتیب تزریق ۵۰ میکروگرم GnRH حل شده در ژل نانوهیدورکسید آلومینیوم و ۵۰ میکروگرم GnRH حل شده در پروپیلن گلیکول به‌صورت زیرجلدی ۳۶ ساعت بعد از خارج ¬سازی اسفنج؛ تیمار ۴: تزریق۵۰ میکروگرم GnRH حل¬ شده در آب مقطر به¬صورت عضلانی ۵۶ ساعت پس از خارج ¬سازی اسفنج. حروف غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی¬دار بین تیمارها است (P<0/05) SEM: خطای استاندارد میانگین¬ها.

Treat 1. Injection of 400 IU eCG (i.m) immediately after removing the sponge. Treat 2 and 3 injection of 50 µg of GnRH (s.c) dissolved in aluminum hydroxide gel or propyleneglycol 36 h after removing the sponge. respectively. Treat 4: injection of 50 µg of GnRH dissolved in distilled water 56 hpsr. Different letters in each column indicate significant differences between treatments (P<0.05), SEM: Standard error of means.

.

نتایج مربوط به غلظت استروژن در جدول ۳ نشان داده شده است. غلظت استروژن تحت تأثیر تیمار قرار گرفت (P<۰/۰۵) اما، اثر زمان و اثر متقابل تیمار × زمان معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). غلظت استروژن در تیمار دریافت کننده eCG در ۳۶ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود (P<۰/۰۵) اما، ۵۶ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج تفاوت معنی‌داری بین تیمارها وجود نداشت (P>۰/۰۵). افزایش مشاهده شده در غلظت استرادیول به تحریک استروئیدسازی تخمدان توسط eCG مربوط است. زیرا eCG بلافاصله بعد از خارج‌سازی اسفنج تزریق گرید و طبیعی است که تا ۳۶ ساعت بعد از تزریق، تخمدان توسط آن تحریک شده است. از طرف دیگر eCG نسبت به سایر هورمون‌های گنادوتروپینی به‌دلیل گلیکوزیلاسیون زیاد، نیمه‌عمر بالایی دارد و تحریک مستمر بر رشد و بلوغ فولیکولی اعمال می‌کند (Kimura, 2016). ترشح استرادیول در مرحله پیش‌از تخمک‌ریزی نقش مهمی در بیان و سیگنالینگ فاکتورهای ترشح شده از اویداکت و رحم دارند. این فاکتورها برای رشد و نمو رویان در روزهای اولیه تشکیل و برقراری آبستنی ضروری هستند (Gonzalez-Bulnes et al., 2005). نتایج تحقیقات نشان داده‌اند که در پروتکل‌های همزمان‌سازی فحلی که به‌کمک PGF2α و GnRH انجام می‌شود، تزریق GnRH بعد از تزریق دوم PGF2α باعث تکمیل فرایند رشد و نمو فولیکول و تخمک‌ریزی می‌شود اما، تزریق زود هنگام GnRH، یعنی ۲۴ ساعت بعد از القای لوتئولایزیس و یا زودتر از آن، باعث می‌شود فولیکول تخمک‌ریزی کننده به‌طور کامل رشد نکند که نتیجه آن اختلال در تولید استرادیول در مرحله پیش‌از تخمک‌ریزی است (Gonzalez-Bulnes et al., 2005; Martemucci and D'Alessandro, 2011; Olivera-Muzante et al., 2013). در فاز فولیکولی سرژ LH به‌طور خودبه‌خودی ۱۴ الی ۱۸ ساعت پس از شروع فحلی رخ می‌دهد که معمولاً دو ساعت بعد از سرژ GnRH است (Pierson et al., 2003). بنابراین گوسفندهایی که GnRH اگزوژن را قبل از سرژ GnRH آندوژن دریافت کرده‌اند ممکن است که سرژ LH آن‌ها پیش افتد. معمولاً ۴۸ ساعت پس از آغاز سرژ LH ترشح استرادیول به‌سرعت کاهش می‌یابد و بعد از ۱۶ ساعت به سطحی می‌رسد که به‌سختی قابل تشخیص است به‌طورکلی نتیجه استرادیول این پژوهش همسو با نتایج مطالعاتی است که پروتکل‌های هم‌زمان‌سازی آن‌ها شامل GnRH بوده است (Hashem et al., 2015; Riaz et al., 2012).

نتایج مربوط به عملکرد تولیدمثلی در جدول ۴ نشان داده شده است. درصد گیرایی در ۴۵ روزگی نسبت به میش‌های تخمک‌ریزی کرده، در تیمار دریافت کننده GnRH حل شده در پروپیلن گلیکول به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار GnRH حل شده در نانوهیدروکسیدآلومینیوم بود (P<۰/۰۵). درصد گیرایی در ۴۵ روزگی نسبت به میش‌های تلقیح شده بین تیمارها تفاوت معنی‌داری از نظر آماری نشان نداد، اما از نظر عددی در تیمار دریافت کننده GnRH حل شده در پروپیلن گلیکول بیشتر از تیمار دریافت‌کننده نانوهیدروکسیدآلومینیوم بود. درصد بره‌زایی، مرگ و میر جنینی پس از ۴۵ روزگی، فکاندیتی و تزاید گله بین تیمارها مشابه بود (P>۰/۰۵). برای تلقیح مصنوعی در زمان ثابت کاهش پراکندگی زمان تخمک‌ریزی از اهمیت بالایی برخوردار است. تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که مهم‌ترین عاملی که بازدهی تلقیح مصنوعی در زمان ثابت را تحت تأثیر قرار می‌دهد کاهش فاصله زمانی

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-09-08]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.41.1.6]
[DOI: 10.61186/rap.14.41.1]

وقوع تخمک‌ریزی در بین میش‌ها است (Blaschi et al., 2014; Deligiannis et al., 2005; Santos - Jimenez et al., 2020). گزارش شده است که پس از استفاده از GnRH حل شده در پروپیلن گلیکول فاصله زمانی تخمک‌ریزی‌ها کاهش می‌یابد، به‌طوری‌که ۶۲/۵ درصد از آنها ۷۲ تا ۷۶ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج تخمک‌ریزی می‌کنند و علاوه بر آن مهم‌ترین تفاوت بین GnRH حل‌شده در پروپیلن‌گلیکول با GnRH بدون حامل و eCG در پراکندگی زمان وقوع تخمک‌ریزی است. (Santos - Jimenez et al., 2020). در پژوهش حاضر برای تعیین تأثیر هریک از تیمارها، میزان آبستنی پس از تلقیح مصنوعی اندازه‌گیری شد. همه میش‌های تیمار شده با GnRH حل شده در پروپیلن گلیکول در زمان تلقیح دارای فحلی بودند (۱۰۰ درصد، جدول ۲) اما از نظر عددی درصد تخمک‌ریزی در این تیمار کمتر از سایر تیمارها بود (جدول ۳). علی‌رغم این‌که در این گروه تیماری درصد آبستنی در ۴۵ روزگی نسبت به میش‌های تلقیح شده با سایر تیمارها تفاوتی نداشت، اما به‌طور معنی‌داری درصد آبستنی نسبت به میش‌های تخمک‌ریزی کرده بیشتر از سایر تیمارها بود. این یافته نشان می‌دهد که احتمالاً تخمک‌ریزی میش‌های این گروه در فاصله زمانی نزدیک به هم رخ داده است که نتیجه آن میزان آبستنی بیشتر در پس از تلقیح است.

جدول ۴- مقایسه اثر تزریق GnRH حل شده در نانو ذرات ژل هیدروکسید آلومینیوم و پروپیلن گلیکول و یا eCG بر میزان گیرایی و عملکرد تولید مثلی [1]

Table 4. The effect of injection of GnRH dissolved in aluminum–hydroxide–gel nanoparticles, propyleneglycol or eCG on conception rate and reproductive performance.

P value	4	3	2	1	فراسنجه‌های باروری Fertility Parameters[2]
	18	15	18	15	تعداد میش تلقیح شده، Number of inseminated ewes
	13	10	16	14	تعداد میش‌های تخمکریزی کرده، Number of ovulated ewes
0.4875	$(\frac{9}{18})$ 50.00	$(\frac{9}{15})$60.00	$(\frac{6}{18})$ 33.33	$(\frac{7}{15})$ 46.67	درصد گیرایی در ۴۵ روزگی نسبت به میش‌های تلقیح شده Conception rate with regards to inseminated ewes at d-45
0.0386	$(\frac{9}{13})$ 69.23^{ab}	$(\frac{9}{10})$ 90.00^{a}	$(\frac{6}{16})$ 37.50^{b}	$(\frac{7}{14})$ 50.00^{b}	درصد گیرایی در ۴۵ روزگی نسبت به میش‌های تخمک‌ریزی کرده Conception rate with regards to ovulated ewes at d-45
0.5000	$(\frac{8}{18})$ 44.44	$(\frac{9}{15})$ 60.00	$(\frac{6}{18})$ 33.33	$(\frac{7}{15})$46.67	درصد برەزایی، Lambing percentage
0.4134	$(\frac{1}{9})$ 11.11	$(\frac{0}{9})$00.00	$(\frac{0}{6})$ 00.00	$(\frac{0}{7})$00.00	درصد از دست رفتن آبستنی پس از ۴۵ روزگی Pregnancy loss after d-45
	11	9	6	7	تعداد جنین‌های تشخیص داده شده در ۴۵ روزگی Number of detected fetuses at d-45
	10	9	6	7	تعداد کل بره متولد شده، Number of lambs born
0.5595	$(\frac{1}{11})$ 18.18	$(\frac{0}{9})$00.00	$(\frac{0}{6})$00.00	$(\frac{0}{7})$00.00	درصد مرگ و میر جنینی پس از ۴۵ روزگی Percentage of fetuse mortality after d-45
0.4184	$(\frac{10}{18})$ 55.55	$(\frac{9}{15})$ 60.00	$(\frac{6}{18})$ 33.33	$(\frac{7}{15})$ 46.66	درصد باروری، Fecundity
0.1957	$(\frac{8}{8})$ 125.0	$(\frac{9}{9})$ 100.0	$(\frac{6}{6})$ 100.0	$(\frac{7}{7})$ 100.0	درصد زایش، Prolificacy

۱. تیمار ۱: تزریق ۴۰۰ واحد بین‌المللی eCG به‌صورت عضلانی در زمان خارج‌سازی اسفنج؛ تیمار ۲ و ۳: به‌ترتیب تزریق ۵۰ میکروگرم GnRH حل شده در ژل نانوهیدورکسید آلومینیوم و ۵۰ میکروگرم GnRH حل‌شده در پروپیلن گلیکول به‌صورت زیر جلدی ۳۶ ساعت بعد از خارج‌سازی اسفنج؛ تیمار ۴: تزریق ۵۰ میکروگرم GnRH حل شده در آب مقطر به‌صورت عضلانی ۵۶ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج. حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

۲. درصد برەزایی = تعداد میش‌های زایمان کرده به تعداد میش تلقیح شده × ۱۰۰؛ درصد زایش گله = تعداد برەهای متولد شده به تعداد میش‌های زایمان کرده × ۱۰۰؛ درصد باروری = تعداد برەهای متولد شده به تعداد میش‌های تلقیح شده × ۱۰۰؛ درصد گیرایی = تعداد میش آبستن بعد از سونوگرافی در ۴۵ روزگی به تعداد میش تلقیح شده × ۱۰۰؛ درصد مرگ و میر جنینی پس از ۴۵ روزگی = تعداد برەهای متولد شده به تعداد جنین‌های تشخیص داده شده بعد از سونوگرافی در ۴۵ روزگی × ۱۰۰. حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

1. Treat 1: Injection of 400 IU eCG (i.m) immediately after removing the sponge. Treat 2 and 3 injection of 50 µg of GnRH (s.c) dissolved in aluminum hydroxide gel or propyleneglycol 36 h after removing the sponge, respectively. Treat 4: injection of 50 µg of GnRH (i.m) dissolved in distilled water 56 h after removing the sponge. . Different letters in each rows indicate significant differences between treatments (P<0.05).

2. Lambing percentage = the number of ewes gave birth to the number of inseminated ewes × 100; Percentage of prolificacy = the number of lambs born to the number of ewes gave birth × 100; Percentage of fecundity = the number of lambs born to the number of inseminated ewes × 100; Conception rate = the number of pregnant ewes to the number of inseminated ewes × 100 after ultrasound at 45 days; Percentage of fetuses mortality after 45 days = the number of lambs born to the number of detected fetuses × 100 after ultrasound at 45 days.

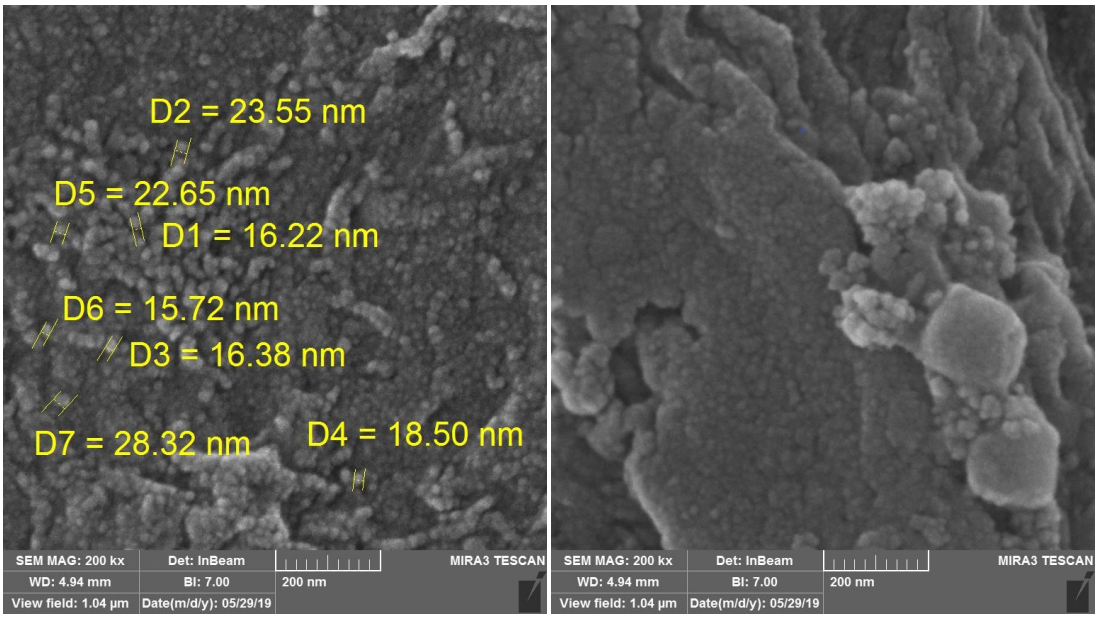
در این پژوهش امکان تعیین تعداد رویان‌ها در قبل از ۴۵ روزگی آبستنی فراهم نشد. در گوسفند تقریباً ۲۰-۲۵ درصد رویان‌ها قبل از ۴۵ روزگی از دست می‌رود درحالی‌که میزان از دست رفتن آن بعد از ۴۵ روزگی تا پایان آبستنی خیلی کم است (حدود ۱۱ درصد). به‌نظر می‌رسد که علت اصلی از دست رفتن رویان‌ها در روزهای اولیه به میزان ناکافی پروژسترون در خون مادر مربوط است، زیرا مرحله رویانی خیلی حساس‌تر از مرحله جنینی است و ممکن است در این دوره جفت عملکرد ضعیفی داشته باشد.

سمیر و همکاران (Samir et al., 2016) مشاهده کردند که ۷۰ درصد بزهایی که رویان‌های خود را از دست می‌دهند دارای یک کاهش تند در غلظت پروژسترون خون در روزهای ۷ و ۲۱ روزگی آبستنی هستند درحالی‌که آن‌هایی که کمتر رویان خود را از دست می‌دهند سطح پروژسترون خون آن‌ها کافی حفظ شده است. این یافته‌ها اهمیت حفظ کافی تولید پروژسترون در روزهای اولیه فاز لوتئال را نشان می‌دهد. غلظت کافی پروژسترون در آنژیوژنز رویان و جفت در حال رشد و بهبود فرایند لانه‌گزینی نقش دارد (Samir et al., 2016).

در این پژوهش نیز تفاوتی بین تیمارها در میزان مرگ جنینی پس از ۴۵ روزگی مشاهده نشد اما میزان آن در تیمار دریافت کننده GnRH حل شده در آب مقطر به بالاتر بود. علت این عدم معنی‌داری ممکن است به کم بودن تعداد گوسفندهای مورد استفاده در این پژوهش باشد.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-09-08]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.41.1.6]
[DOI: 10.61186/rap.14.41.1]

در مورد کارایی ترکیبات مختلف در دارورسانی به‌ویژه ترکیباتی که در مقیاس نانو هستند مطالعات زیادی صورت گرفته است، اما هنوز کارایی آنها بر دینامیک فولیکولی به‌خوبی مورد مطالعه قرار نگرفته است. اگرچه میزان فحلی و تخمک‌ریزی در میش‌های دریافت کننده GnRH حل‌شده در نانو ذرات ژل هیدروکسید آلومینیوم با سایر تیمارها تفاوتی نداشت، اما درصد آبستنی این تیمار نسبت به میش‌های تلقیح شده در ۴۵ روز بعد از تلقیح، از نظر عددی کمتر از سایر تیمارها بود. درصد آبستنی این تیمار ۴۵ روز بعد از تلقیح نسبت به میش‌های تخمک‌ریزی کرده نیز به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار دریافت کننده GnRH حل‌شده در پروپیلن گلیکول بود. این یافته نشان می‌دهد که GnRH حل‌شده در نانو ذرات ژل هیدروکسید آلومینیوم نتواست همانند GnRH حل‌شده در پروپیلن گلیکول بر میزان آبستنی پس از تلقیح در زمان ثابت مؤثر باشد. احتمالاً علت این نتایج متناقض به تفاوت کینتیک رهاسازی GnRH حل شده در پروپیلن گلیکول و نانوذرات هیدروکسیدآلومینیوم مربوط است.



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانوذرات ژل هیدروکسید آلومینیوم. میانگین اندازه ذرات ۷۷/۴±۱۸/۲۰ نانومتر است

Figure 2. Scanning electron microscope (SEM) image of aluminum hydroxide nanoparticles. Mean particles sizes are 20.18±4.77 nm

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی این پژوهش نشان داد که تزریق GnRH (بدون در نظر گرفتن نوع حلال آن) بعد از خارج‌سازی اسفنج، می‌تواند مشابه eCG باعث القاء فحلی و تخمک‌ریزی شود. همچنین تزریق GnRH حل شده در پروپیلن گلیکول می‌تواند نرخ آبستنی را پس از تلقیح در زمان ثابت افزایش دهد که نشان‌دهنده همزمان شدن زمان تخمک‌ریزی است اما، تحقیقات بیشتری در مورد تأثیر ژل نانوهیدروکسید آلومینیوم به‌عنوان حامل GnRH هنگام همزمان‌سازی فحلی بر فعالیت تخمدان و باروری در میش ضروری است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با مساعدت مالی دانشگاه بوعلی سینا همدان تحت قرارداد شماره ۱۰۵۳۱۴۰۰ انجام شده است.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع

Amini, Y., Moradi, B., & Fasihi-Ramandi, M. (2017). Aluminum hydroxide nanoparticles show strong activity to stimulate Th-1 immune response against tuberculosis. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 45(7), 1331-1335. 10.1080/21691401.2016.1233111.

Baird, D. T. (1983). Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in the sheep and human. *Reproduction*, *69*(1), 343-352. 0022-4251/83/050343-10S02-00/0.

Bazybek, N., Wei, Y., & Ma, G. (2022). Advances in encapsulating gonadotropin-releasing hormone agonists for controlled release: a review. *Journal of Microencapsulation*, 39(5), 452-466. 10.1080/02652048.2022.2100934.

Blaschi, W., Lunardelli, P. A., Marinho, L. S., Max, M. C., Santos, G. M., Silva-Santos, K. C., ... & Seneda, M. M. (2014). Effects of progestagen exposure duration on estrus synchronization and conception rates of crossbreed ewes undergoing fixed time artificial insemination. *Journal of veterinary science*, 15(3), 433-437. 10.4142/jvs.2014.15.3.433.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-09-08]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.41.1.6]
[DOI: 10.61186/rap.14.41.1]

Callahan, P. M., Shorter, A. L., & Hem, S. L. (1991). The importance of surface charge in the optimization of antigen–adjuvant interactions. *Pharmaceutical research*, *8*, 851-858. 10.1023/A:1015843210358.

Campbell, B. K., Kendall, N. R., & Baird, D. T. (2007). The effect of the presence and pattern of luteinizing hormone stimulation on ovulatory follicle development in sheep. *Biology of reproduction*, 76(4), 719-727. 10.1095/biolreprod.106.053462.

Chang, M. F., White, J. L., Nail, S. L., & Hem, S. L. (1997). Role of the electrostatic attractive force in the adsorption of proteins by aluminum hydroxide adjuvant. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 51(1), 25-29.

Deligiannis, C., Valasi, I., Rekkas, C. A., Goulas, P., Theodosiadou, E., Lainas, T., & Amiridis, G. S. (2005). Synchronization of ovulation and fixed time intrauterine insemination in ewes. *Reproduction in domestic animals*, 40(1), 6-10. 10.1111/j.1439-0531.2004.00534.x.

Fierro, S., Olivera-Muzante, J., Gil, J., & Viñoles, C. (2011). Effects of prostaglandin administration on ovarian follicular dynamics, conception, prolificacy, and fecundity in sheep. *Theriogenology*, 76(4), 630-639. 10.1016/j.theriogenology.2011.03.016.

Fukui, Y., Itagaki, R., Ishida, N., & Okada, M. (2001). Effect of different hCG treatments on fertility of estrus-induced and artificially inseminated ewes during the non-breeding season. Journal of Reproduction and Development, 47(4), 189-195. 10.1262/jrd.47.189.

Gonzalez-Bulnes, A., Menchaca, A., Martin, G. B., & Martinez-Ros, P. (2020). Seventy years of progestagen treatments for management of the sheep oestrous cycle: Where we are and where we should go. *Reproduction, Fertility and Development*, *32*(5), 441-452. 10.1071/RD18477.

Gonzalez-Bulnes, A., Veiga-Lopez, A., Garcia, P., Garcia-Garcia, R. M., Ariznavarreta, C., Sanchez, M. A.,... & Flores, J. M. (2005). Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology*, 63(9), 2523-2534. 10. 1016/ j. theriogenology.2004. 10.013.

Hashem, N. M., El-Zarkouny, S. Z., Taha, T. A., & Abo-Elezz, Z. R. (2015). Oestrous response and characterization of the ovulatory wave following oestrous synchronization using PGF2α alone or combined with GnRH in ewes. *Small Ruminant Research*, 129, 84-87. 10.1016/j.smallrumres. 2015.06.003.

Hashem, N. M., & Sallam, S. M. (2020). Reproductive performance of goats treated with free gonadorelin or nanoconjugated gonadorelin at estrus. *Domestic Animal Endocrinology*, 71, 106390. 10.1016/j.domaniend.2019.106390.

Hashem, N. M., & Gonzalez-Bulnes, A. (2020). State-of-the-art and prospective of nanotechnologies for smart reproductive management of farm animals. *Animals*, *10*(5), 840. 10.3390/ani10050840.

He, P., Zou, Y., & Hu, Z. (2015). Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 11(2), 477-488. 10.1080/21645515. 2014.1004026.

Heimlich, J. M., Regnier, F. E., White, J. L., & Hem, S. L. (1999). The in vitro displacement of adsorbed model antigens from aluminium-containing adjuvants by interstitial proteins. *Vaccine*, 17(22), 2873-2881. 10.1016/S0264-410X(99)00126-7.

Kamani, A., Khodaei- motlagh, M., Kazemi, M., and Moradi, M.H. (2020). Effect of Pregnant Mare Serum Gonadotropine (Pmsg) and Gonadotropin-Releasing Hormone (Gnrh) Combination on Estrous Synchronization in Farahani Ewes. *Research on Animal Production*, 11(27), 82-87 (In Persian). 10.29252/rap.11.27.82.

Khan, T. H., Beck, N. F., & Khalid, M. (2007). The effects of GnRH analogue (buserelin) or hCG (Chorulon) on Day 12 of pregnancy on ovarian function, plasma hormone concentrations, conceptus growth and placentation in ewes and ewe lambs. *Animal reproduction science*, 102(3-4), 247-257. 10.1016/j.anireprosci.2006.11.007.

Khan, T. H., Hastie, P. M., Beck, N. F., & Khalid, M. (2003). hCG treatment on day of mating improves embryo viability and fertility in ewe lambs. *Animal reproduction science*, 76(1-2), 81-89. 10.1016/S0378-4320(02)00194-X.

Kimura, K. (2016). Superovulation with a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel: a novel superovulation method for cattle. *Journal of reproduction and development*, 62(5), 423-429. 10.1262/jrd.2016-066.

Kumar, P., & Sait, S. F. (2011). Luteinizing hormone and its dilemma in ovulation induction. *Journal of human reproductive sciences*, 4(1), 2. 10.4103/0974-1208.82351.

Kumar, P., & Sharma, A. (2014). Gonadotropin-releasing hormone analogs: Understanding advantages and limitations. *Journal of human reproductive sciences*, *7*(3), 170. 10.4103/0974-1208.142476.

Li, X., Aldayel, A. M., & Cui, Z. (2014). Aluminum hydroxide nanoparticles show a stronger vaccine adjuvant activity than traditional aluminum hydroxide microparticles. *Journal of controlled release*, *173*, 148-157. 10.1016/j.jconrel.2013.10.032.

Manteca Vilanova, X., De Briyne, N., Beaver, B., & Turner, P. V. (2019). Horse welfare during equine chorionic gonadotropin (eCG) production. *Animals*, 9(12), 1053. 10.3390/ani9121053.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-09-08]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.41.1.6]
[DOI: 10.61186/rap.14.41.1]

Martemucci, G., & D'Alessandro, A. G. (2011). Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF2α, GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time. *Animal reproduction science*, 123(1-2), 32-39. 10.1016/j.anireprosci.2010.11.007.

Martinez-Ros, P., & Gonzalez-Bulnes, A. (2019). Efficiency of CIDR-based protocols including GnRH instead of eCG for estrus synchronization in sheep. *Animals*, 9(4), 146. 10.3390/ani9040146.

Masoumi, R., Shahmoradi, M., Rostami, B. and Bagherinia Amiri, M. (2018). Evaluation of Reproductive Performance of Afshari Ewes with a Short Estrus Synchronization Program in Non Breeding Season. *Research On Animal Production*, 9(21), 80-85 (In Persian). 10.29252/rap.9.21.80.

Olivera-Muzante, J., Gil, J., Viñoles, C., & Fierro, S. (2013). Reproductive outcome with GnRH inclusion at 24 or 36 h following a prostaglandin F2α-based protocol for timed AI in ewes. *Animal reproduction science*, *138*(3-4), 175-179. 10.1016/j.anireprosci.2013.02.013. .

Pierson, J. T., Baldassarre, H., Keefer, C. L., & Downey, B. R. (2003). Influence of GnRH administration on timing of the LH surge and ovulation in dwarf goats. *Theriogenology*, 60(3), 397-406.

Riaz, H., Sattar, A., Arshad, M. A., & Ahmad, N. (2012). Effect of synchronization protocols and GnRH treatment on the reproductive performance in goats. *Small Ruminant Research*, *104*(1-3), 151-155. 10.1016/j.smallrumres.2011.10.008.

Samir, H., Karen, A., Ashmawy, T., Abo-Ahmed, M., El-Sayed, M., & Watanabe, G. (2016). Monitoring of embryonic and fetal losses in different breeds of goats using real-time B-mode ultrasonography. *Theriogenology*, *85*(2), 207-215. 10.1016/j.theriogenology.2015.09.039.

Santos-Jimenez, Z., Guillen-Gargallo, S., Encinas, T., Berlinguer, F., Veliz-Deras, F. G., Martinez-Ros, P., & Gonzalez-Bulnes, A. (2020). Use of propylene-glycol as a cosolvent for GnRH in synchronization of estrus and ovulation in sheep. *Animals*, 10(5), 897. 10.3390/ani10050897.

Santos-Jimenez, Z., Martinez-Herrero, C., Encinas, T., Martinez-Ros, P., & Gonzalez-Bulnes, A. (2020). Comparative efficiency of oestrus synchronization in sheep with progesterone/eCG and progesterone/GnRH during breeding and non-breeding season. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(7), 882-884. 10.1111/rda.13698.

Shirodkar, S., Hutchinson, R. L., Perry, D. L., White, J. L., & Hem, S. L. (1990). Aluminum compounds used as adjuvants in vaccines. *Pharmaceutical research*, 7, 1282-1288. 10.1023/A:1015994006859.

Tríbulo, A., Rogan, D., Tríbulo, H., Tríbulo, R., Mapletoft, R. J., & Bó, G. A. (2012). Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology*, *77*(8), 1679-1685. 10.1016/j.theriogenology.2011.12.013.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-09-08]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.41.1.6]
[DOI: 10.61186/rap.14.41.1]