نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۰؛ ۱۵(۱): ۳۵-۴۲.

بررسی الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های موجود در ترشحات رحمی و ارتباط آن با ساختارهای تخمدانی و میزان استروئیدهای سرم خون شتر یک‌کوهانه

نجمه داودیان*[۱]، علی کدیور[۲]، مهدی صائب[۳]

۱. پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۳. استاد بازنشسته، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز- ایران.

دریافت: ۸ آذرماه ۹۸ **پذیرش:** ۹ شهریورماه ۹۹

چکیده

پژوهش حاضر با اهداف کسب اطلاعات بیشتری در خصوص محتوای پروتئینی ترشحات رحم شتر یک‌کوهانه طراحی گردید. به این منظور، نمونه‌گیری از ۵۰ شتر ماده بالغ در کشتارگاه صورت گرفت. از هر شتر ماده، خون سیاه‌رگی، تخمدان و ترشحات رحمی جمع‌آوری شد. پروتئین‌های موجود در ترشحات رحم نیز با روش لوری اندازه‌گیری شد و وزن مولکولی باندهای پروتئینی با الکتروفورز ارزیابی گردید. در بررسی وزن مولکولی باندهای به‌دست آمده در الکتروفورز ترشحات رحم شتر یک‌کوهانه، مشخص شد که پروتئین‌های مشترکی در ترشحات رحم مشاهده می‌شوند. پروتئین با وزن مولکولی در حدود ۷۰ کیلو دالتون در ترشحات رحم شتر، در محدوده پروتئین آلبومین قرار داشته و باند پروتئینی با وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون به احتمال ممکن است یوتروفرین باشد، همچنین باند ۱۴-۱۳ کیلو دالتونی مشاهده شده نیز به احتمال می‌تواند در محدوده پروتئین مهارکننده پلاسمین که فعالیت پروتئولیتیکی در رحم را کنترل می‌کند، قرار گیرد، همچنین در ترشحات رحمی شترهایی که پروژسترون بالای ۱ ng/ml داشتند علاوه بر باندهای مشترک، دو پروتئین با وزن مولکولی حدود ۴۴ و ۲۳ کیلو دالتون نیز مشاهده شد که به نظر می‌رسد اختصاص به مرحله لوتئال داشته باشند. باند مشاهده شده حدود ۲۳ کیلو دالتون نیز در محدوده ۲۲-۱۹ کیلو دالتون قرار گرفته و مشابه با پروتئین‌های retinol binding acidic وابسته به پروژسترون است. در شتر یک‌کوهانه؛ اگرچه میزان کل پروتئین‌های موجود در ترشحات رحم دارای ارتباط معنی‌دار با غلظت استرادیول و پروژسترون سرم نبود، با این حال حضور دو باند پروتئینی که فقط در ترشحات شترهای دارای پروژسترون بالای ۱ ng/ml مشاهده شد و نشان می‌دهد که ممکن است در مرحله تشکیل جسم زرد ماهیت پروتئین‌های موجود در ترشحات رحم تغییر کند.

واژه‌های کلیدی: ترشحات رحمی، الکتروفورز، پروتئین، استروئیدها، شتر یک‌کوهانه.

مقدمه

رحم در شتر یک‌کوهانه دارای دو شاخ و بدنه به نسبت کوتاه است و شکلی شبیه به T یا Y دارد. اندازه رحم به سن و سابقه تولید مثلی حیوان بستگی دارد. شاخ رحم چپ همیشه بلندتر و ضخیم‌تر از شاخ رحم راست است. این اختلاف اندازه شاخ‌ها حتی در رحم جنین هم دیده می‌شود. تمامی آبستنی‌ها در شاخ چپ اتفاق می‌افتد و با افزایش سن و تعداد زایمان‌ها، بلندتر و ضخیم‌تر بودن شاخ چپ نمایان‌تر می‌شود (۱۹ و ۲۴). تون و قوام رحم بسته به وضعیت تخمدانی شتر متغیر است. در معاینه رکتال، رحم به‌طور طبیعی در فاز فولیکولار تخمدانی، طی فحلی و در حضور یک یا تعداد بیش‌تری فولیکول بالغ، دارای قوام سفت و منقبض است در حالی که در فاز لوتئال دارای قوام شل است (۱۹). سطح داخلی شاخ‌های رحم توسط اندومتریوم چین‌داری پوشیده شده است که ممکن است صاف تا به‌طور کامل چین‌خورده باشد (۲۴).

ترشحات رحم به‌عنوان یک محیط اولیه برای رویان در اولین مراحل رشد محسوب شده و در تولید مثل پستانداران نقش بسیار مهمی دارد. محیط رحم به‌سرعت در حال تغییر بوده و این تغییرات در ترکیب ترشحات رحم طی چرخه فحلی منجر به آماده‌سازی یک محیط

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: najmeh179@gmail.com

بسیار اختصاصی برای رشد رویان شده و دارای نقش حیاتی در بقای رویان است. مایع موجود در لوله رحمی برای ظرفیت‌پذیر کردن اسپرم و مراحل اولیه تکامل رویان ضروری است. در شرایط طبیعی، رحم توسط مکانیسم‌های دفاعی موضعی و سیستمیک محافظت می‌شود که هر دو تحت تأثیر هورمون‌های استروئیدی (استرادیول و پروژسترون) قرار دارند. به‌طور کلی گفته می‌شود که رحم، زمانی که تحت تأثیر استروژن باشد در مقایسه با زمانی که تحت غالبیت پروژسترون قرار دارد، نسبت به عفونت مقاوم‌تر است (۱۹). غالبیت استرادیول در زمان فحلی موجب ورود تعداد نسبتاً زیادی نوتروفیل و سلول‌های سفید خونی جوان به‌داخل گردش خون وارد می‌شود و همچنین سبب افزایش میزان خون‌رسانی دستگاه تناسلی می‌گردد (۱۹)؛ علاوه بر بخش سلولی، سیستم ایمنی ذاتی رحم هم شامل پروتئین‌هایی از قبیل کمپلمان‌ها و لاکتوفرین است که موجب افزایش فاگوسیتوز و در نتیجه لیز میکروب‌ها و هم‌چنین مهار رشد باکتری‌ها می‌شوند (۱۱).

نشان داده شده است که ترشحات واژن گاومیش در اواخر فاز لوتئال در مقایسه با فاز فحلی دارای فعالیت آنزیمی بیشتری است (۷) و همچنین در مقایسه با سرم تعداد باندهای پروتئینی بیش‌تری در مایعات رحم دیده می‌شود که نشان‌دهنده این واقعیت است که پروتئین‌های موجود در مایعات رحم یک مایع تراوشی ساده از سرم نیستند، بلکه حاوی پروتئین‌هایی هستند که توسط سلول‌های خود رحم تولید شده‌اند. در خوک نشان داده شده است که در طول چرخه فحلی، ترشحات رحم دچار تغییرات کمی و کیفی می‌شوند و علاوه بر این در این‌گونه تعدادی پروتئین نیز در رحم حضور دارند که توسط خود رحم تولید می‌شوند (۳). با توجه به آن که پروتئین‌های موجود در رحم به‌عنوان آنزیم، حاملین هورمون‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی و همین‌طور به‌عنوان مولکول‌های پیغام بر آبستنی عمل می‌کنند اهمیت بالایی در تولید مثل دارند (۱۰). مطالعات در گاو نیز نشان‌دهنده این است که اگرچه بخش پروتئینی مایعات رحم از سرم تأمین می‌شود، ولی مقدار بسیار کمی پروتئین‌های اختصاصی رحم نیز وجود دارند که میزان آن‌ها در وضعیت‌های مختلف تولید مثلی متفاوت است (۲۰).

بررسی محتوای پروتئینی مجرای رحم در مراحل متفاوت چرخه فحلی موجب افزایش دانش در خصوص اهمیت پروتئین‌های موجود در رحم، مکانیسم‌های کنترل تولید و ترشح آن‌ها و فاکتورهای اثرگذار بر فعالیت آن‌ها می‌شود و در نهایت می‌تواند دانش ما را در چگونگی کارآیی تولید مثلی افزایش دهد. تاکنون تلاش‌های زیادی در راستای تعیین ترکیبات موجود در ترشحات رحم صورت گرفته است. اولین بار در سال ۱۹۷۴ اقدام به جداسازی پروتئین‌های رحم در گاو شد (۲۰). پیش از این یوتروگلوبین در خرگوش (۵) و اسید فسفاتاز در خوک (۱۸) از ترشحات رحم استخراج شد. اسید فسفاتاز که یک گلیکوپروتئین بوده و بخش مهمی از ترشحات رحم در خوک را تشکیل می‌دهد، تحت تأثیر پروژسترون خارجی ترشح شده و حاوی آهن است. یوتروگلوبین یک گلیکوپروتئین است که مهم‌ترین بخش محتویات رحم خرگوش را تشکیل می‌دهد و با پروژسترون باند می‌شود (۴). بیشتر پروتئین‌های موجود در رحم از سرم خون منشأ می‌گیرند با این‌حال در اوایل آبستنی پروتئین‌های تولید شده توسط رحم به مایع مجرای رحم وارد می‌شوند (۹). حضور پروتئین‌های اختصاصی فاز لوتئال در گاومیش نشان‌دهنده ارتباط پروتئین‌ها با مرحله چرخه تولید مثلی و نقش پروژسترون در تغییرات الگوی پروتئینی ترشحات رحم است (۲۲). تغییرات در میزان پروتئین‌های رحم در گاو به استرادیول منسوب شده است. اعتقاد بر این است که غلظت بالای استرادیول در زمان فحلی موجب تغییر در تعداد سلول‌های سفید خون و نوتروفیلی نسبی و ورود تعداد زیادی سلول‌های سفید جوان به خون می‌شود (۱۹).

اولین اقدام در تشخیص پروتئین‌ها و بررسی عملکرد آن‌ها را می‌توان تعیین وزن مولکولی آن‌ها دانست. در گاو مشخص شده است که پروتئین‌های با وزن مولکولی ۲۱۰ و ۲۷۹ کیلو دالتون فقط در زمان فحلی دیده می‌شوند، ولی پروتئین‌های با وزن مولکولی ۳۸، ۶۷، ۷۵ و ۳۳۰ کیلودالتون در زمان فحلی و برخی مراحل دیگر چرخه قابل مشاهده هستند (۲). در گاومیش پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا در فاز لوتئال بیش از فاز فولیکولار هستند که ممکن است نشان‌دهنده وابستگی ترشح آن‌ها به پروژسترون باشد (۲۲). در گاو مشخص شده است که استرادیول موجب افزایش حضور واسطه‌های التهابی در

رحم و سنتز پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۳۸ کیلو دالتون می‌شود (۲). همین‌طور کاهش پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۳۳۰ کیلو دالتون در فاز فحلی نشان می‌دهد که بالا بودن مداوم استرادیول در پلاسما اثر مهارکننده روی آزادسازی این پروتئین در رحم دارد (۲). در حال حاضر مطالعه‌ای در زمینه بررسی پروتئین‌های موجود در ترشحات رحمی در شتر موجود نیست، لذا در مطالعه حاضر، وزن مولکولی پروتئین‌های موجود در ترشحات رحمی شتر یک‌کوهانه و همچنین ارتباط این پروتئین‌ها با ساختارهای تخمدانی و میزان استروئیدهای موجود در سرم، بررسی شد.

مواد و روش کار

تهیه نمونه‌ها در کشتارگاه نجف آباد اصفهان و در فصل زمستان در ماه‌های بهمن و اسفند هم‌زمان با اوج فعالیت تولید مثلی و رشد فولیکولی شتر یک‌کوهانه صورت گرفت. نمونه‌گیری از ۵۰ شتر ماده بالغ بالای ۴ سال غیر آبستن صورت گرفت. تعیین بالغ و نابالغ بودن شتر بر اساس حضور جسم زرد یا جسم سفید روی تخمدان آن‌ها بود و تنها نمونه‌هایی استفاده شد که مربوط به شترهای دارای دستگاه تولید مثلی به‌طور کامل سالم بودند.

از هر شتر ماده در حین نحر شدن ۱۰ میلی‌لیتر نمونه خون سیاه‌رگ گردنی در لوله آزمایش بدون ماده ضد انعقاد جمع‌آوری شد و ۲۰ دقیقه در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد اجازه انعقاد داده شد و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه انتقال داده شد. در آزمایشگاه، نمونه‌ها ۳۰ دقیقه در دور ۱۴۰۰ سانتریفیوژ شده و سرم جدا شد و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد (۱۳).

بلافاصله پس از باز کردن لاشه شتر، تخمدان‌ها از لاشه خارج شده و پس از مشخص کردن سمت راست و چپ تخمدان‌ها با استفاده از بستن لیگاتور روی یکی از آن‌ها، تخمدان‌ها در محلول سالین هپارینه یا نرمال سالین ۰/۹ درصد به آزمایشگاه انتقال داده شدند. قطر همه فولیکول‌های روی هر تخمدان با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد.

هم‌زمان رحم شترهای مذکور جمع‌آوری شده و پس از بررسی رحم‌ها، تنها رحم‌هایی که دارای قوام مناسب بوده و دارای هیچ‌گونه ناهنجاری ظاهری نبودند، برای مطالعه انتخاب شدند و پس از جداسازی از بافت‌های اطراف در ناحیه گردن رحم لیگاتور زده شد، سپس در ناحیه بدنه رحم با استفاده از تیغ اسکالپل یک شکاف ایجاد شد. در داخل رحم سطح اندومتریوم برای تشخیص هر نوع ناهنجاری بررسی شد. نمونه‌هایی که دارای التهاب، پرخونی یا چرک بودند حذف شدند، سپس مقداری از ترشحات موجود در رحم، به آرامی با کورت یا سرنگ استریل جمع‌آوری شده و به لوله‌های اپندورف ۲ میلی لیتر انتقال داده شده و روی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد و سپس در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (۲).

در بررسی داخل مجرای رحم برای جمع‌آوری مایعات موجود، مشخص شد که از مجموع ۵۰ رحم سالم نمونه‌گیری شده ۲۰ رحم حاوی هیچ‌گونه ترشحاتی نبودند و سطح اندومتریوم کاملاً براق و بدون مایعات بود. تعداد ۳۰ رحم حاوی ترشحات بود. از این تعداد ترشحات ۱۳ مورد آن‌ها کاملاً شفاف بود درحالی‌که در ۱۷ مورد، ترشحات دارای رنگ قرمز بودند و در عین حال در سطح اندومتریوم هیچ‌گونه آثاری از التهاب و پرخونی مشاهده نشد.

غلظت استرادیول سرم با کیت ایمیونوتک (ساخت فرانسه، با حساسیت ۲۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر و ضرایب تغییرات سنجش یک نمونه در دفعات مختلف (درون‌سنجی) و سنجش نمونه‌های مختلف (میان‌سنجی) به‌ترتیب ۹/۷ و ۱۰/۲ درصد و میزان بازیابی ۸۵/۵ تا ۱۰۹ درصد) به‌وسیله روش سنجش با مواد رادیواکتیو اندازه‌گیری شد.

غلظت پروژسترون سرم با کیت ایمیونوتک (ساخت فرانسه، با حساسیت ۰/۰۵ نانوگرم در میلی‌لیتر و ضرایب تغییرات سنجش یک نمونه در دفعات مختلف (درون‌سنجی) و سنجش نمونه‌های مختلف (میان‌سنجی) به‌ترتیب ۵/۸ و ۹ درصد و میزان بازیابی ۸۵ تا ۱۱۰ درصد به‌وسیله روش سنجش با مواد رادیواکتیو اندازه‌گیری شد.

برای تعیین پروتئین تام نمونه‌ها از روش لوری استفاده شد. در این روش حلقه‌های فنلی موجود در پروتئین‌ها، در حضور یک محلول اکسیدکننده و در محیط قلیایی کمپلکس رنگی ایجاد می‌کند و شدت رنگ نمونه با غلظت پروتئین در نمونه متناسب است، سپس با استفاده از منحنی استاندارد مقدار پروتئین نمونه‌ها محاسبه می

شود (۱۴).

به‌منظور تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها از ژل الکتروفورز با غلظت ۱۰ درصد استفاده شد. ژل الکتروفورز از دو بخش، ژل پایینی جداکننده با ارتفاع زیاد برای جدا کردن باندهای پروتئینی و دیگری ژل بالایی متراکم‌کننده با ارتفاع خیلی کم برای متراکم کردن باندهای پروتئینی تشکیل شده است. نمونه‌های مجهول به اندازه‌ای رقیق شدند که غلظت مناسب برای الکتروفورز به‌دست بیاید که این کار بر اساس اندازه‌گیری غلظت پروتئین با روش لوری انجام شد. زمانی که غلظت پروتئین‌ها به ۱ میکروگرم در هر میکرولیتر رسید، نمونه‌ها به میزان مساوی با بافر بروموفنل بلو به عنوان نشان‌گر مخلوط شده و به‌مدت یک دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند، به این منظور که پروتئین‌ها ساختمان پروتئین‌ها دچار تغییر شود، سپس در هر چاهک ۲۰ میکرولیتر نمونه به صورت موازی با مارکر استاندارد پروتئینی روی ژل قرار داده شدند. شدت جریان روی ۲۵ میلی‌آمپر و ولتاژ روی ۱۱۰- ۱۰۸ تنظیم گردیده و ۱۵۰ دقیقه زمان در نظر گرفته شد (پایا پژوهش پارس EPS-7601).

برای رنگ‌آمیزی ژل از کوماسی بلو و برای رنگ‌بری از محلول متانول ۲۰ درصد و استیک اسید ۱۰ درصد و آب مقطر استفاده شد و باندهای ایجاد شده بررسی شده و بر اساس میزان حرکت نمونه‌ها در ژل و ضخامت باندها قضاوت شد.

به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری و بررسی هم‌بستگی اندازه فولیکول‌ها و میزان هورمون‌ها و همچنین ارتباط میان ترشحات رحمی با ساختارهای تخمدانی و هورمون‌ها از آزمون Pearson's Correlations استفاده شد. میانگین غلظت پروتئین ترشحات رحمی در گروه‌های مختلف با آزمون one-way ANOVA مقایسه شدند. در تمامی آزمون‌ها سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ لحاظ شد.

نتایج

در بررسی آماری ارتباط میان حضور یا عدم حضور ترشحات رحم با حضور یا عدم حضور جسم زرد روی تخمدان و همین‌طور با غلظت استرادیول و پروژسترون سرم اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد؛ اگرچه بیشتر شترهایی که دارای ترشحات قرمز رنگ بودند دارای جسم زرد در تخمدان نیز بودند (۶۳/۶ درصد) و گروهی که دارای ترشحات شفاف بودند به نسبت کمتری جسم زرد در تخمدان‌شان مشاهده شد (۴۲/۸ درصد)، با این حال اختلاف میان دو گروه معنی‌دار نبود.

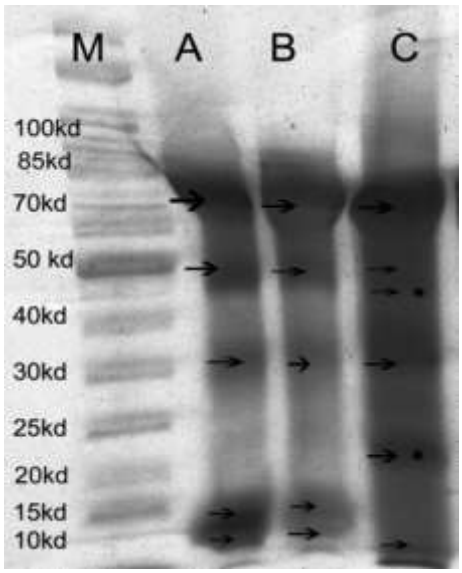
تمام شترهایی که دارای ترشحات رحمی بودند (ترشحات قرمز رنگ یا شفاف) حداقل یک فولیکول بزرگ بالای ۱۰ میلی‌متر روی تخمدانشان بود (به جز یک نفر شتر دارای ترشحات قرمز رنگ و یک نفر شتر دارای ترشحات شفاف که فولیکول بزرگ نداشتند)؛ با این حال اختلاف میان حضور فولیکول‌های بزرگ روی تخمدان شترهای دارای ترشحات رحمی قرمز رنگ، شترهای دارای ترشحات رحمی شفاف و شترهای بدون ترشحات رحمی معنی‌دار نبود.

میانگین (±SE) غلظت استروژن سرم در گروه شترهای دارای ترشحات شفاف (۹۸/۵۴±۲۷/۰۷) بیش از میانگین (±SE) غلظت استروژن سرم در گروه شترهای دارای ترشحات قرمز رنگ (۷۵/۸۶±۲۱/۷۱) بود؛ با این حال اختلاف میان دو گروه معنی‌دار نبود. از سوی دیگر میانگین (± SE) غلظت پروژسترون سرم نیز در گروه شترهای دارای ترشحات شفاف (۱/۳۳±۰/۹۵) بیش از آن در گروه شترهای دارای ترشحات قرمز رنگ (۰/۰±۸۴/۲۹) بود با این حال اختلاف میان دو گروه بر اساس پروژسترون نیز معنی‌دار نبود، همچنین هیچ ارتباط معنی‌داری میان میانگین (±SE) غلظت پروتئین تام موجود در ترشحات رحم با غلظت استروژن و پروژسترون سرم مشاهده نشد.

میانگین (±SE) غلظت پروتئین تام ترشحات رحم در شترهای دارای پروژسترون سرم زیر ۱ng/ml و شترهای دارای پروژسترون سرم بالای ۱ng/ml اختلاف معنی‌دار نشان نداد، همچنین در شترهای با پروژسترون سرم زیر ۱ng/ml، میانگین (±SE) غلظت پروتئین تام با استرادیول سرمی بالای ۴۰pg/ml و زیر ۴۰pg/ml ارتباط معنی‌دار نداشت (جدول ۱).

در بررسی نتایج وزن مولکولی پروتئین‌ها با الکتروفورز مشخص شد که تقریباً در تمامی نمونه‌ها، تعدادی باندهای با وزن‌های مولکولی متفاوت به‌صورت مشترک مشاهده شد (تصویر ۱). در بررسی نتایج الکتروفورز پروتئین‌های موجود در ترشحات رحم، باندهای

پروتئینی در محدوده وزن مولکولی ۸۰-۱۲ کیلو دالتون مشاهده گردید. در تمامی نمونه‌های ترشحات رحمی که میزان پروژسترون در سرم شترها نیز زیر ۱ ng/ml بود، باندهای با وزن مولکولی در حدود ۷۰ کیلو دالتون، ۴۸ کیلو دالتون، ۳۰ کیلو دالتون، ۱۶-۱۵ کیلو دالتون و ۱۴-۱۳ کیلو دالتون مشاهده گردید. تمامی باندهای گفته شده در شترهایی که استروژن سرم آن‌ها بالای ۴۰ pg/ml (گروهB) و یا کمتر از ۴۰ pg/ml (گروه A) بود، مشاهده شد. در شترهایی که میزان پروژسترون سرم بالای ۱ ng/ml (گروه C) بود، علاوه بر باندهای گفته شده یک باند در حدود ۲۳-۲۲ کیلو دالتون و یک باند در حدود ۴۴ کیلو دالتون مشاهده شد.



شکل ۱- باندهای پروتئینی ترشحات رحمی شتر یک‌کوهانه. ستون A مربوط به شتر دارای پروژسترون زیر ۱ng/ml و استرادیول زیر ۴۰pg/ml است. ستون B مربوط به شتر دارای پروژسترون زیر ۱ng/ml و استرادیول بالای ۴۰pg/ml است و ستون C مربوط به شتر دارای پروژسترون بالای ۱ng/ml می‌باشد. باندهای مشابه با پیکان و دو باند اختصاصی فاز لوتئال با ستاره مشخص شده است. ستون M مارکر استاندارد پروتئینی را نشان می‌دهد.

جدول ۱- میانگین (±SE) غلظت پروتئین تام ترشحات رحم و وزن مولکولی باندهای پروتئینی آن در شتر یک‌کوهانه

وضعیت هورمونی سرم	تعداد نمونه‌ها	میانگین (±SE) پروتئین تام mg/ml	حدود وزن مولکولی باندهای پروتئینی مشاهده شده (کیلو دالتون)
سطح پروژسترون >۱ng/ml	۱۰	۳۴/۵۲ ± ۱/۰	۷۰، ۴۸، ۴۴، ۳۰، ۲۲-۲۳، ۱۵-۱۶، ۱۳-۱۴
سطح پروژسترون <۱ng/ml استرادیول <۴۰pg/ml	۱۰	۶/۳۵ ± ۱/۰	۷۰، ۴۸، ۳۰، ۱۵-۱۶، ۱۳-۱۴
سطح پروژسترون <۱ng/ml استرادیول >۴۰pg/ml	۱۰	۴۷/۱۲ ± ۰/۰	۷۰، ۴۸، ۳۰، ۱۵-۱۶، ۱۳-۱۴

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که در شتر یک‌کوهانه ممکن است در مرحله تشکیل جسم زرد ماهیت پروتئین‌های موجود در ترشحات رحم تغییر کند و پروتئین‌های جدیدی در رحم تشکیل شوند. در این مطالعه ترشحات رحم شتر بدون رقیق شدن، مستقیماً جمع‌آوری شده و برای آزمایش‌ها استفاده شد. در بررسی وزن مولکولی باندهای به‌دست آمده در الکتروفورز ترشحات رحم شتر مشخص شد که علی‌رغم بالا یا پایین بودن استرادیول و پروژسترون سرم، پروتئین‌های مشابهی در ترشحات رحم مشاهده می‌شوند. پروتئین با وزن مولکولی در حدود ۷۰

کیلو دالتون در ترشحات رحم شتر، در محدوده پروتئین آلبومین قرار دارد و به نظر می‌رسد که پروتئین آلبومین در ترشحات رحمی شتر حضور دارد. آلبومین یک منبع آمینواسیدی برای تنظیم فشار اسمزی کلوئیدی بافت است که در انتقال محدوده وسیعی از مولکول‌ها و یون‌ها نقش دارد (۲۳). آلبومین سرم به‌عنوان یک بخش از پروتئین-های رحم در گاو و گاومیش نشان داده شده است. در ترشحات رحمی گاومیش پروتئین اصلی آلبومین با وزن مولکولی ۶۶ کیلودالتون است و یازده پروتئین با وزن‌های مولکولی متفاوت که توسط خود رحم تولید می‌شوند نیز در ترشحات حضور دارند که دو مورد از آن‌ها اختصاصی فاز لوتئال هستند (۲۲). در گاو نشان داده شده است که میزان آلبومین مایعات رحم در تمام مراحل چرخه کمتر از سرم است که نشان می‌دهد آلبومین به‌راحتی به مجرای رحم منتقل نمی‌شود (۱). در خوک نشان داده شده است که طی چرخه تولید مثلی، پروتئین‌های رحم در محدوده ۴۵/۷-۱۳ کیلو دالتون، هم به‌صورت کمی و هم به‌صورت کیفی تغییر می‌کنند و در فاز لوتئال چرخه بیشتر هستند (۱۸). در پژوهش حاضر در ترشحات رحمی شترهایی که پروژسترون بالای ۱ ng/ml داشتند؛ علاوه بر باندهای مشترک، دو پروتئین با وزن مولکولی حدود ۴۴ و ۲۳ کیلو دالتون نیز مشاهده شد که به نظر می‌رسد اختصاص به مرحله لوتئال داشته باشند، همچنین در ترشحات رحمی شترها هیچ پروتئینی در محدوده بالاتر از ۸۰ کیلو دالتون مشاهده نشد.

در گاومیش باند ۱۹/۲ کیلو دالتون دارای وزن مولکولی مشابه با پروتئین‌های retinol binding acidic وابسته به پروژسترون در محدوده ۲۲-۱۹ کیلو دالتون است که در خوک مشخص شده است. این پروتئین‌ها در انتقال ویتامین A به جنین نقش دارند (۶). در ترشحات رحمی شتر در مطالعه حاضر نیز یک پروتئین در حدود ۲۳ کیلو دالتون در شترهای دارای جسم زرد تشخیص داده شد.

وزن مولکولی uteroferrin که یک اسید فسفاتاز اختصاصی است، در خوک (۱۲)، گاو (۲۱) و مادیان (۱۶) در محدوده ۴۰-۳۰ کیلو دالتون گزارش شده است و همچنین باند ۳۸ کیلودالتونی در گاومیش نیز یوتروفرین است (۲۲). در شتر نیز یک باند پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۳۰ کیلو دالتون مشاهده شد که ممکن است یوتروفرین باشد.

در خوک باند ۱۴/۳ کیلو دالتونی مهارکننده پلاسمین است که فعالیت پروتئولیتیکی در رحم را کنترل می‌کند (۸) که به نظر می‌رسد با باند ۱۴-۱۳ کیلو دالتونی در ترشحات رحمی شتر مطابقت دارد. در گاو مشخص شده است که پروتئین‌های با وزن مولکولی ۳۸، ۶۷، ۷۵، و ۳۳۰ کیلو دالتون در فاز فحلی و برخی مراحل دیگر چرخه قابل مشاهده هستند، ولی پروتئین‌های با وزن مولکولی ۲۱۰ و ۲۷۹ کیلو دالتون فقط در فاز فحلی دیده می‌شوند؛ به‌عبارت دیگر تعدادی باندهای پروتئینی مشابه در تمام مراحل چرخه دیده می‌شوند در حالی که تعدادی باند مشخص نیز مشاهده می‌شود که اختصاص به مرحله فحلی دارد (۲).

در گاو نشان داده شده است که در تمام مراحل چرخه فحلی به‌خصوص پیش فحلی و فحلی، پروتئین تام موجود در ترشحات رحم بیش از پروتئین تام موجود در سرم است (۱). در میش‌های تخمدان‌برداری شده گزارش شده است که در زمان فحلی میزان پروتئین تام مایعات رحم افزایش می‌یابد، ولی طی ۶-۴ روز بعد کم می‌شود (۱۷). این افزایش در میزان پروتئین ممکن است به‌دلیل افزایش جریان خون به‌سمت رحم در این مراحل باشد یا به‌دلیل اثر استرادیول در افزایش قابلیت نفوذ مویرگ‌ها در اندومتریوم باشد (۲۵). گلوبولین آلفا ۱ در مرحله فحلی در گاو در حداکثر است که ممکن است به دلیل اثر استرادیول بر بافت رحمی باشد (۱). گلوبولین آلفا ۱ یک پروتئین فاز حاد است. با توجه به آن که رحم در زمان فحلی نسبت به مرحله لوتئال سیستم دفاعی قوی‌تری دارد (۱۵)، بنابراین افزایش این پروتئین در زمان فحلی در گاو منطقی و قابل پیش‌بینی است. در گاو میزان گلوبولین آلفا ۲ نیز در فحلی و پیش‌فحلی بیش از سرم بوده است که به‌دلیل افزایش قابلیت نفوذ رحم در این مراحل است که البته تحت تأثیر هورمون‌های استروئیدی است. نشان داده شده است که ایمونوگلوبولین‌های رحم در زمان پیش فحلی افزایش می‌یابند در حالی‌که در زمان فحلی کاهش می-یابند (۱ و ۱۵) مقدار کم گاماگلوبولین‌های ۱و ۲ در زمان دای استروس به‌منظور حفظ بقای رویان در نتیجه کاهش دادن پاسخ ایمنی موضعی و پیش‌گیری از پس زدن رویان

است. میزان این گاماگلوبولین‌ها در رحم کمتر از سرم است که نشان‌دهنده کمتر تولید شدن آن‌ها در رحم یا انتقال کمتر آن‌ها از خون به رحم است (۱).

به‌طور خلاصه در ترشحات رحمی شتر یک‌کوهانه هیچ پروتئینی در محدوده بالاتر از ۸۰ کیلو دالتون مشاهده نشد. پروتئین با وزن مولکولی در حدود ۷۰ کیلو دالتون، در محدوده پروتئین آلبومین قرار دارد و به نظر می‌رسد که پروتئین آلبومین در ترشحات رحمی شتر حضور دارد. یک پروتئین با وزن مولکولی در حدود ۲۳ کیلو دالتون در شترهای دارای جسم زرد تشخیص داده شد که دارای وزن مولکولی مشابه با پروتئین‌های retinol binding acidic وابسته به پروژسترون در محدوده ۲۲-۱۹ کیلو دالتون است که در انتقال ویتامین A به جنین نقش دارد. یک باند پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۳۰ کیلو دالتون مشاهده شد که ممکن است یوتروفرین باشد، همچنین باند ۱۴-۱۳ کیلودالتونی که مشابه با باند ۱۴/۳ کیلو دالتونی مهارکننده پلاسمین در خوک است که فعالیت پروتئولیتیکی در رحم را کنترل می‌کند. حضور دو باند پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۴۴ و ۲۳ کیلو دالتون که فقط در ترشحات شترهای دارای پروژسترون بالای ۱ ng/ml مشاهده شد، نشان می‌دهد که ممکن است در مرحله تشکیل جسم زرد ماهیت پروتئین‌های موجود در ترشحات رحم تغییر کند و پروتئین‌های جدیدی در رحم تشکیل شوند هر چند میزان کل پروتئین‌های موجود در ترشحات رحم دارای ارتباط معنی‌دار با غلظت استرادیول و پروژسترون سرم نبود، همچنین حضور ترشحات رحمی قرمز رنگ دارای ارتباط معنی‌دار با غلظت استروئیدها و وضعیت تخمدانی نبود و تاکنون گزارشی از این ترشحات در دسترس نیست.

منابع

1. Alavi-Shoushtari, S.M; Asri-Rezaie, S. and Abshenas, J; A study of the uterine protein variations during the estrus cycle in the cow: A comparison with the serum proteins. Anim Reprod Sci; 2006; 96: 10-20.
2. Alavi-Shoushtari, S.M; Asri-Rezaie, S. and Abshenas, J; A study of the uterine protein variations during the estrus cycle in the cow: molecular weights determination. Anim Reprod Sci; 2008; 105: 302-310.
3. Basha, S.M.M; Bazer, F.W. and Roberts, R.M; The secretion of a uterine specific, purple phosphatase by cultured explants of porcine endometrium: dependency upon the state of pregnancy of the donor animal. Biol Reprod; 1979; 20: 431-40.
4. Beato, M. and Baier, R; Binding of progesterone to the proteins of the uterine luminal fluid. Identification of uteroglobulin as the binding protein. Biochim Biophys Acta; 1975; 392: 346-356.
5. Beier, H.M; Uteroglobulin, a hormone sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. Biochim Biophys Ada; 1986; 160: 289-291.
6. Clawitter, J; Trout, W.E; Burke, M.G; Araghi, S. and Roberts, R.M; A novel family of progesterone-induced, retinolbinding proteins from uterine secretions of the pig. J Biol Chem; 1990; 265: 3248–3255.
7. Eltohamy, M.M; Zakaria, A.D. and Taha, N.A; Changes in the contents of buffalo cervical mucus during different phases of the estrous cycle. Anim Reprod Sci; 1990; 22: 203–11.
8. Fazleabas, A.T; Bazer, F.W. and Roberts, R.M; Purification and properties of a progesterone induced plasmin/trypsin inhibitor from uterine secretions of pig and its immunochemical localization in the pregnant uterus. J Biol Chem; 1982; 257: 6886–6897.
9. Fischer, B. and Beier, H.M; Uterine environment in early pregnancy. In: Sreenan J.M., Diskin M.G. (Eds), Embryonic Mortality in Farm Animals. Martinus. Nijhoff. Publishers. Dordrecht; 1986; pp: 93–109.
10. Godkin, J.D; Bazer, F.W. and Roberts, R.M; Ovine trophoblast protein 1, an early-secreted blastocyst protein, binds specifically to uterine endometrium

and affects protein synthesis. Endocrinology; 1984; 114: 120–30.

11. Hansen, P.J; Immunology of reproduction. In: Hafez, B., & Hafez, E.S.E. (Eds.), Reproduction in Farm animal, seventh ed. Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia; 2000; pp: 345.
12. Ketcham, C.M; Baumbach, G.A; Bazer, F.W. and Roberts, R.M; The type 5 acid phosphatase from spleen of patients with hairy cell leukemia. Purification, properties, immunological characterization and comparison with porcine uteroferrin. J Biol Chem; 1985; 260: 5768–76.
13. Leory, J.L.M.R; Vanholder, T; Delaghe, J.R; Opsomer, G; Van Soom, A; Bols, P.E.J. and Kruif, A.D; Metabolic and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. Anim Reprod Sci; 2004; 80: 201-211.
14. Lowry, O.H; Rosebrough, N.J; Farr, A.L. and Randall, R.J; Protein measurement with the Folin phenol reagents. J Biol Chem; 1951; 193: 265-275.
15. Lynette, B.C. and Bandurant, R.H; Immunity to bovine reproductive infections. Vet Clin N Am Food Anim Pract; 2001; 17(3): 504-583.
16. Mc-Dowell, K; Sharp, D.C; Zavy, M.T; Fazleabas, A; Roberts, R.M. and Bazer, F.W; Partial characterization of equine uteroferrin-like protein. J Reprod Fertil Suppl; 1982; 32: 329-34.
17. Miller, B.C. and Moore, N.W; Endometrial protein secretion during early pregnancy in entire and ovariectomised ewes. J Reprod Fertil; 1983; 68(1): 137-144.
18. Murray, F.A; Bazer, F.W; Wallace, H.D. and Warnick, A.C; Quantitative and qualitative variation in the secretion of protein by the porcine uterus during the estrous cycle. Biol Reprod; 1972; 7: 314-320.
19. Noakes, D.E; Parkinson, T.J. and England, G.C; 2001 Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics; eighth ed. W.B. Saunders; London; 2001; pp: 812.
20. Roberts, G.P. and Parker, J.M; Macromolecular components of the luminal fluid from the bovine uterus. J Reprod Fertil; 1974; 40: 291-303.
21. Roberts, R.M. and Bazer, F.W; The functions of uterine secretions. J Reprod Fert; 1988; 82: 875-92.
22. Roy, S.C; Suganthi, R.U. and Ghosh, J; Changes in uterine protein secretion during luteal and follicular phases and detection of phosphatases during luteal phase of estrous cycle in buffaloes (Bubalus bubalis). Theriogenology; 2006; 65: 1292-1301.
23. Thomas, J.S; Overview of plasma proteins. In: Feldman, B.F; Zinkl, J.G; Jain, N.C; Schalm's Veterinary Hematology; fifth ed; Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia; 2000; pp: 891-909.
24. Tibary, A. and Anouassi, A; Theriogenology in camelidae, Anatomy, physiology and artificial breeding. First edition, United Arab Emirates; 1997; pp: 172-188.
25. Wingfield, D.N.S. and Rickeits, S.W; Results of concurrent bacteriological and cytological examination of the endometrium of the mare. J Reprod Fertil Suppl; 1982; 32: 181-185.

Vol.15/No.2
Spring-Summer 2021

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2021; 15(1): 35-42

Electrophoretic pattern of uterine secretion's proteins and their relationship to ovarian structures and serum steroids in camelus dromedaries

Najmeh Davoodian[1]; Ali Kadivar[2]; Mehdi Saeb[3]

1. Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Retired professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz- Iran.

Received: 29 November 2019 ***Accepted:*** 31 August 2020

Summary

The present study was carried out to provide more information about proteins in uterine secretions in the camelus dromedarius. Camel ovaries, blood samples and uterine secretions from 50 sexually mature non-pregnant camels (C. dromedarius) were collected at slaughter. The total protein values of uterine secretions were determined by Lowry method and electrophoresis of proteins on polyacrylamide gel was carried out. Significant fractions of camel uterine proteins were determined. Standard molecular weight comparison revealed that the major protein in uterine fluid had a relative molecular weight of 70 KD and could be albumin. The nearly 30 KD band could be uteroferin and 13-14 KD band corresponded with 14 KD basic polypeptide of a member of plasmin/trypsin inhibitors. On the other hand, the nearly 44 and 23 KD bands were luteal-stage specific. Interestingly the nearly 23 KD luteal phase specific band in this study corresponds with the range of progesterone dependent retinol binding acidic proteins. Although camel uterine proteins are shown to be irrelevant of serum steroids, but the presence of two luteal phase specific bands showed that proteins in uterine secretions may change when the corpus luteum present.

Keywords: Uterine secretions, Protein, Electrophoresis, Steroids, Camelus dromedaries.

* Corresponding Author E-mail: najmeh179@gmail.com