نقش GnRH بر بلوغ تخمک و تکامل رویان‌های تولید شده داخل آزمایشگاه در گونه گاو

آیدین رحیم طایفه[1]، فرید حیدری[2*]، فرامرز قراگوزلو[3]، مجید محمد صادق[4]

۱ـ دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار ـ ایران.

۲ـ گروه بیوتکنولوژی دام و آبزیان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران ـ ایران.

۳ـ گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران ـ ایران.

۴ـ گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار ـ ایران.

*نویسنده مسئول: heidari@nigeb.ac.ir

دریافت مقاله: ۱ اسفند ۸۹ ، پذیرش نهایی: ۲۰ مرداد ۹۰

چکیده

تاثیر GnRH در تنظیم و کنترل تولید مثل در دام ماده و نر بخوبی نشان داده شده است ولی مطالعات اندکی در مورد تاثیر موضعی آن بر فرایند فولیکولوژنز، بلوغ تخمک و تکامل رویان صورت گرفته است. در این تحقیق تاثیر مقادیر مختلف این هورمون در فرایند بلوغ تخمک و تکامل رویان مورد ارزیابی قرار گرفته است. برای انجام این تحقیق تعداد ۱۶۰۸ عدد تخمک نابالغ که به روش آسپیریشن از تخمدان‌های کشتارگاهی استحصال شده بود به تفکیک داخل محیط‌های IVM، IVF و IVC که حاوی ۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ نانوگرم از GnRH به ازای هر میلی لیتر از محیط بود، قرار داده شد. نتایج نشان داد که به رغم اثر این هورمون بصورت موضعی در تخمدان گاو، تاثیر مقادیر ذکر شده در فرایند بلوغ، لقاح و تکامل از نظر آماری معنی دار نیست ولی تعداد سلول‌های تروفکتودرم در گروه IVC بطور معنی‌دار در محیط‌های حاوی GnRH افزایش یافت ($p<0/05$).

پژوهشنامه دامپزشکی، ۱۳۹۰، دوره ۷، شماره تکمیلی، ۵۷-۴۹.

واژه‌های کلیدی: GnRH، IVM، IVF، IVC، تخمک، زیگوت، رویان، بلوغ تخمک، تقسیم تسهیم، تکامل رویان، توده سلولی داخلی، توده سلولی خارجی.

مقدمه

قابلیت تولید و نگهداری رویان در بسیاری از گونه‌های دامی از جمله اسب، گاو، گوسفند و بز مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته است و با توجه به پیشرفت‌های فراوانی که در این زمینه حاصل

In vitro quantitative and qualitative analyses of different concentrations of GnRH on cattle embryos

Rahim Tayefeh, A.[1*], Heidari, F.[2], Gharagozloo, F.[3], Mohammad Sadegh, M.[4]

[1]*Garmsar Branch, Islamic Azad University, garmsar-Iran.*

[2]*Department of Animal Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology(NIGEB),Tehran-Iran.*

[3]*Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University,Tehran-Iran.*

[4]*Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar-Iran.*

Abstract

Although GnRH effects in regulating and controlling the animal reproduction have been well-documented, studies considering the effects of topical process, folliculogenesis, oocyte maturation and embryo development are almost lacking. We evaluated the effects of different concentration of GnRH on the process of oocyte maturation and embryo development. Collected immature oocytes (1608 cells) placed in IVM, IVF and IVC media, supplemented by 0, 800, 1000 and 1500ng of GnRH. The results demonstrated that despite the topical effects of GnRH on bovine ovaries, it did not have a significant role on fertilization and development. IVF media containing 1000ng of GnRH showed an increase in cleavage rate. Moreover, by incorporating 800ng and 1000ng of GnRH to IVC, blastocyst rate and the number of trophectoderm cells were increased ($p<0/05$). ***Vet. Res. Bull. 7, Supplementary issue:49-57, 2012.***

Keywords: GnRH, IVM, IVF, IVC, Oocyte, Zygote, Embryo, Oocyte maturation, Cleavage, Blastocyst, Embryo development, Inner cell mass, Trophectoderm.

شده است به نظر می‌رسد در آینده از این تکنیک به منظور تولید کنترل شده و آسان رویان، تسریع در بهبود ژنتیکی گله‌ها، ذخیره منابع ژنتیکی و ایجاد خلوص نژادی استفاده شود. آزمایشگاه‌های کمی در جهان وجود دارند که قادر به تولید رویان جهت انتقال هستند ولی با عنایت به مزایای فراوان تولید آزمایشگاهی رویان از جمله کاهش فاصله نسل‌ها و استفاده بهینه از دام‌های برتر، محققین زیادی جهت بهبود راندمان تولید، نگهداری و انتقال رویان تلاش می‌کنند. نشان داده شده است که میزان آبستنی متعاقب انتقال رویان‌های آزمایشگاهی خواه به صورت تازه، خواه پس از انجماد در مقایسه با رویان‌های دامی کمتر است و همچنین رویان‌های آزمایشگاهی در مقایسه با رویان‌های تولید شده در دام نسبت به آسیب‌های انجماد حساس‌تر هستند.

محققین نشان داده اند که تغییر در سیستم کشت و تولید رویان در آزمایشگاه می‌تواند باعث بهبود میزان آبستنی متعاقب انتقال و زنده مانی رویان‌ها پس از انجماد شود. در این میان می‌توان به افزودن برخی مواد به محیط کشت از جمله فاکتور رشد اپیدرمی، فاکتور رشد شبه انسولین اشاره کرد.

هورمون GnRH دکاپپتیدی به وزن مولکولی ۱۱۸۳ دالتون، حاوی ۱۰ اسید آمینه و نیمه عمر ۴ تا ۷ دقیقه است و بعنوان مهم‌ترین هورمون تولید مثلی دام مطرح است (۳).

در ابتدا این هورمون به عنوان هورمون هیپوتالاموسی تحریک کننده هیپوفیز برای آزاد سازی LH شناسایی شد و به این دلیل نام LH-RH را به آن دادند، سپس با شناسایی خاصیت آزاد کنندگی FSH توسط این هورمون، نام هورمون آزاد کننده گنادوتروپین را برای آن برگزیدند (۸). به نظر می‌رسد علاوه بر عملکرد اصلی این هورمون در تنظیم فعالیت تولید مثلی، در فرآیندهای تولید رویان به صورت موضعی نیز نقش داشته باشد (۱۸). جالب است که در چندین گونه پستاندار مقادیری از GnRH فرا هیپوتالاموسی در بافت‌هایی نظیر تخمدان، جفت، اویداکت و بیضه نیز شناسایی شده است که همانند GnRH هیپوتالاموسی است (۱۴). لازم به ذکر است که این هورمون در سایر بافت‌ها به صورت اتوکراین و پاراکراین عمل کرده و فعالیت‌های استروژنزرا کنترل می‌کند و در مرگ سلولی نیز نقش دارد (۳).

با توجه به تاثیر GnRH در فرایند فولیکولوژنز و تولید رویان، در این تحقیق سعی کردیم تا تاثیر مقادیر مختلف این هورمون را در بهبود راندمان تولید رویان‌ها داخل آزمایشگاه مورد بررسی قرار دهیم، همچنین به دلیل نقش اساسی که میزان موفقیت در تولید آزمایشگاهی رویان برای موفقیت در سایر تکنیک‌های تولید مثلی از جمله همانند سازی و تولید حیوانات تراریخته دارد، نتایج حاصل از این تحقیق را می‌توان به منظور بهبود در راندمان این تکنیک‌ها نیز بکار برد.

مواد روش کار

جمع آوری تخمک:

تخمدان‌ها هرچه سریعتر پس از کشتار دام از بافت‌های اضافی جدا شده و داخل فلاسک حاوی سالین استریل و آنتی بیوتیک (پنی سیلین ۱۰۰IU/ml و استرپتومایسین ۱۰۰mg/ml) ۳۷ درجه ریخته شدند.

حداکثر ظرف ۴ ساعت تخمدان‌ها به آزمایشگاه آورده و به دقت با سالین استریل حاوی آنتی بیوتیک شستشو داده شدند.

پس از شستشو، تخمدان‌ها داخل بشر ریخته و داخل بن ماری ۳۸ درجه قرار داده و مایع داخل فولیکول‌های ۸-۲ mm از سطح تخمدان‌ها آسپیره و داخل فالکن ۵۰ml (Nunclon) حاوی محیط آسپیریشن ریخته شدند.

محیط آسپیریشن:

M199 HEPES (Gibco 12340030) تکمیل شده با 4mg/ml BSA (Sigma A-7030)، 1µg/ml gentamicine (Sigma G-1397)، 2µg/ml heparin (Sigma H-8514) بود.

پس از اتمام آسپیریشن حدود ۱۰ دقیقه زمان داده شد تا تخمک‌ها و زواید مایع فولیکولی ته نشین شدند، سپس به کمک پیپت پاستور رسوب ته فالکون به داخل پلیت خط کشی شده ریخته و تخمک‌ها زیر استریو میکروسکوپ (Nikon) جمع آوری شدند.

پس از جمع آوری، تخمک‌ها داخل محیط شستشو قرار گرفته (محیط آسپیریشن فاقد هپارین) و در حین شستشو (۴بار) تخمک‌های با کیفیت انتخاب شدند (تخمک‌های حاوی حداقل ۴ لایه سلول کومولوس، سیتوپلاسم یکنواخت و قهوه‌ای تیره) (تصویر ۱).

پس از انتخاب، تخمک‌ها یکبار نیز داخل محیط بلوغ شستشو داده و در دسته‌های ۱۰تایی داخل قطرات ۱۵۰µl از محیط بلوغ قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۹ درجه و ۵درصد CO2 گذاشته شدند.

محیط بلوغ تخمک:

M199 bicarbonate (Gibco 11043023) تکمیل شده با 10% (Sigma F-2442)FCS، 1µg/ml gentamicin (Sigma G-1397)، 20µg/ml Na pyrovate (Sigma P-3662)، E2 (Sigma E-4389)، 1µg/ml، 100ng/ml EGF (Sigma E-4127) و GnRH (Sigma L-9761) بود.

لقاح تخمک و اسپرم:

پس از گذشت ۲۴ ساعت از بلوغ، تخمک‌های بالغ شده(بر اساس فاصله گرفتن سلول‌های کومولوس از یکدیگر) پس از ۴ بارشستشوداخل محیط شستشوی لقاح (TALP Fukui 1990 HEPES)، در دسته‌های ۵ تایی داخل قطرات ۵۰µl از محیط لقاح (Fert-TALP Lu et al., 1987) قرار داده شدند.

تهیه اسپرم:

حدود ۱ ساعت قبل از گذاشتن تخمک‌های بالغ داخل محیط IVF، پایت اسپرم را داخل آب ۳۷ درجه گذاشته و پس از گذشت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه پایت بریده، داخل یک فالکن حاوی ۵cc محیط شستشوی اسپرم (sperm TALP) قرار داده و با دور ۱۰۰۰rpmi به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد.

پس از اتمام سانتریفیوژ مایع رویی خالی، ۲cc محیط شستشوی اسپرم به آرامی روی ته نشین ایجاد شده ریخته و با زاویه ۴۵ داخل انکوباتور قرار گرفت.

پس از گذشت ۱ ساعت ۱cc از سطح محیط برداشته و داخل ویال ریخته شد.

شمارش اسپرم:

برای شمارش اسپرم ۱۰µl از ویال با ۹۰µl آب داخل یک ویال دیگر پیپتاژ شد، حدود ۱۰µl از آن بین لام هموسایتومتر و لامل قرار گرفت و ۴ خانه کناری و خانه وسط مربع وسطی زیر میکروسکوپ شمرده شد.

طبق فرمول زیر غلظت اسپرم محاسبه شد:

تعداد اسپرم به ازای هر میلی لیتر = N x D x ۵۰۰۰

تعداد اسپرم شمرده شده در ۵ خانه = N

فاکتور رقت که ۱۰ بود = D

سپس رقت ۵ میلیون اسپرم به ازای هر میلی لیتر از محیط تهیه و حدود ۱۰µl از آن به قطرات محیط لقاح افزوده شد که در این حالت غلظت اسپرم ۱ میلیون به ازای هر میلی لیتر از محیط شده است.

کشت رویان:

پس از گذشت ۲۴ ساعت از لقاح، زیگوت‌ها به مدت ۲ دقیقه با دور ۲۵۰۰ داخل محیط شستشوی کشت رویان (1972 .,et al HEPES SOF Tervie) ورتکس شدند تا سلول‌های کومولوس کاملا حذف شدند. سپس زیگوت‌های برهنه شده داخل محیط شستشوی کشت رویان ۴ بار شستشو داده، در دسته‌های ۱۰ تا ۳۰ تایی داخل محیط کشت رویان (SOF) قرار گرفته و داخل انکوباتور ۳۹ درجه و ۵٪ CO2 گذاشته شدند که هر ۲۴ تا ۴۸ ساعت محیط کشت رویان‌ها جهت تامین انرژی و پروتئین مورد نیاز رویان‌ها تعویض شد.

آزمایش ۱:

در این آزمایش ۴ غلظت ۱۵۰۰ng/ml و ۱۰۰۰، ۸۰۰، ۰ از GnRH داخل محیط IVM افزوده شد و پس از ۶ دوره تکرار اثر آن‌ها بر میزان بلوغ هسته توسط رنگ آمیزی هقس مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایش ۲:

در این آزمایش ۴ غلظت ۱۵۰۰ng/ml و ۱۰۰۰، ۸۰۰، ۰ از GnRH داخل محیط IVF افزوده شد و پس از ۶ دوره تکرار اثر آن‌ها بر cleavage rate پس از گذشت ۴۸ ساعت از لقاح و همچنین rate blastocyst و کیفیت رویان‌ها در روز ۸ با استفاده از رنگ آمیزی افتراقی پروپیدیوم یداید و هقس مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایش ۳:

در این آزمایش ۴ غلظت ۱۵۰۰ng/ml و ۱۰۰۰، ۸۰۰، ۰ از GnRH داخل محیط IVC افزوده شد و پس از ۶ دوره تکرار اثر آن‌ها بر cleavage rate، blastocyst rate و کیفیت رویان‌ها در روز ۸ با استفاده از رنگ آمیزی افتراقی پروپیدیوم یداید و هقس مورد بررسی قرار گرفت.

رنگ آمیزی هقس:

برای ارزیابی دقیق بلوغ هسته، تخمک‌ها به مدت ۱-۲ دقیقه داخل محیط حاوی ۳۰۰µg/ml از آنزیم هیالورونیداز (Sigma H-4272) قرار گرفتند، سپس داخل فالکن ۱۵ml حاوی ۵۰۰µl از PBS با دور ۲۵۰۰ ورتکس شدند، سپس تخمک‌های برهنه پس از ۴ بار شستشو داخل PBS، داخل اتانول حاوی ۱۰µg/ml از رنگ هقس (Benzimide H-33342 sigma Bis) روی یخ قرار گرفتند.

پس از گذشت ۱۵ دقیقه تخمک‌ها روی لام فیکس شدند و با میکروسکوپ فلورسنت (Nikon) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جدول۱- تاثیر مقادیر مختلف GnRH بر میزان بلوغ تخمک.

غلظت GnRH	تعداد تخمک	تعداد تخمک بالغ	میزان بلوغ
۰نانوگرم (۶)	۱۲۷	۱۰۴	٪۸۰/۲۱
۸۰۰نانوگرم (۶)	۱۲۹	۱۰۳	٪۷۹/۸۶
۱۰۰۰نانوگرم (۶)	۱۲۷	۱۰۳	٪۸۰/۱۸
۱۵۰۰نانوگرم (۶)	۱۳۴	۱۰۷	٪۷۹/۰۴

جدول ۳- تاثیر GnRH در محیط IVF بر کیفیت رویان.

غلظت GnRH	تعداد بلاستوسیست	تعداد توده سلولی داخلی±S.E	تعداد توده سلولی خارجی S.E±	تعداد کل سلول‌ها S.E±	نسبت توده سلولی داخلی به خارجی S.E±
۰نانوگرم(۶)	۲۰	۴۶/۲±۱/۱	۸۷/۹±۲/۴	۱۳۴±۳	۰/۵۳±۰/۰۲
۸۰۰نانوگرم(۶)	۲۳	۴۳/۶±۱	۹۲±۲/۱	۱۳۵/۶±۲/۵	۰/۴۸±۰/۰۲
۱۰۰۰نانوگرم(۶)	۲۳	۴۴/۸±۱/۱	۸۸/۹±۲/۸	۱۳۳/۷±۳/۱	۰/۵۱±۰/۰۲
۱۵۰۰نانوگرم(۶)	۱۹	۴۴/۷±۱/۴	۸۸/۶±۲/۸	۱۳۳/۳±۳/۴	۰/۵۱±۰/۰۲

جدول ۵- تاثیر GnRH در محیط IVC بر کیفیت رویان.

غلظت GnRH	تعداد بلاستوسیست	تعداد توده سلولی داخلی S.E±	تعداد توده سلولی خارجی S.E±	تعداد کل سلول‌ها S.E±	نسبت توده سلولی داخلی به خارجی S.E±
۰نانوگرم(۶)	۱۸	۴۸/۹±۱/۵	۸۴/۶±۲/۱	۱۳۳/۴±۲/۵	۰/۵۹±۰/۰۳
۸۰۰نانوگرم(۶)	۲۷	۴۶±۱/۱	۹۹/۱±۱/۵	۱۴۵/۱±۱/۸	۰/۴۷±۰/۰۱
۱۰۰۰نانوگرم(۶)	۲۱	۴۵/۵±۱/۶	۹۷/۲±۱/۲	۱۴۲/۷±۲/۲	۰/۴۷±۰/۰۱
۱۵۰۰نانوگرم(۶)	۱۹	۴۶/۱±۱/۳	۹۶/۷±۱/۵	۱۴۲/۷±۱/۹	۰/۴۸±۰/۰۲

رنگ آمیزی افتراقی توسط پروپیدیوم یداید و هقس:

در روز ۸ پس از لقاح بلاستوسیست‌ها داخل محیط حاوی تریتون ۰/۵% و پروپیدیوم یداید (P-4170 Sigma) (۵۰µg/ml) به مدت ۲۰ ثانیه قرار گرفتند، سپس داخل اتانول حاوی هقس (۲۵µg/ml) روی یخ گذاشته شدند.

پس از گذشت ۳۰ دقیقه بلاستوسیست‌ها روی لام فیکس شدند و با میکروسکوپ فلورسنت (Nikon) مورد ارزیابی قرار گرفتند که رنگ صورتی معرف توده سلولی خارجی و رنگ آبی معرف توده سلولی داخلی بود (۱۱).

طراحی آزمایش و آنالیز آماری:

در مورد موارد شمارش سلولی ابتدا آزمون Normality انجام شد و با توجه به معنی دار بودن در تمامی موارد جهت انجام آزمون آماری بین گروه‌های شمارش سلول از آزمون ANOVA

جدول ۲ ـ تاثیر GnRH در محیط IVF بر تقسیم و تکامل رویان.

غلظت GnRH	تعداد تخمک	تعداد تخم تقسیم شده	تعداد بلاستوسیست	میزان تخم تقسیم شده	میزان بلاستوسیست
۰نانوگرم(۶)	۱۳۴	۸۴	۲۷	٪۶۲/۴	٪۱۸/۳۶
۸۰۰نانوگرم(۶)	۱۴۰	۹۷	۲۹	٪۶۸/۱	٪۲۰
۱۰۰۰نانوگرم(۶)	۱۴۳	۱۰۴	۲۷	٪۷۲/۱	٪۱۷/۱۵
۱۵۰۰نانوگرم(۶)	۱۳۱	۸۶	۲۵	٪۶۵	٪۱۸/۹۳

جدول ۴ ـ تاثیر GnRH در محیط IVC بر تقسیم و تکامل رویان.

غلظت GnRH	تعداد تخمک	تعداد تخم تقسیم شده	تعداد بلاستوسیست	میزان تخم تقسیم شده	میزان بلاستوسیست
۰نانوگرم(۶)	۱۳۵	۸۴	۲۷	٪۶۲/۳۷	٪۱۹/۷۲
۸۰۰نانوگرم(۶)	۱۳۷	۸۸	۳۴	٪۶۲/۶	٪۲۴/۴۸
۱۰۰۰نانوگرم(۶)	۱۳۱	۸۴	۳۳	٪۶۳/۳۷	٪۲۴/۷۱
۱۵۰۰نانوگرم(۶)	۱۴۰	۸۶	۲۶	٪۶۰/۹۷	٪۱۸/۲۳

One way و در صورت معنی دار بودن از آزمون تکمیلی (LSD Post Hoc test Fisher) جهت مقایسه بین دو گروه استفاده شده است و در مورد بررسی تعداد آمبریوها از آزمون مربع کای استفاده شده است.

نتایج

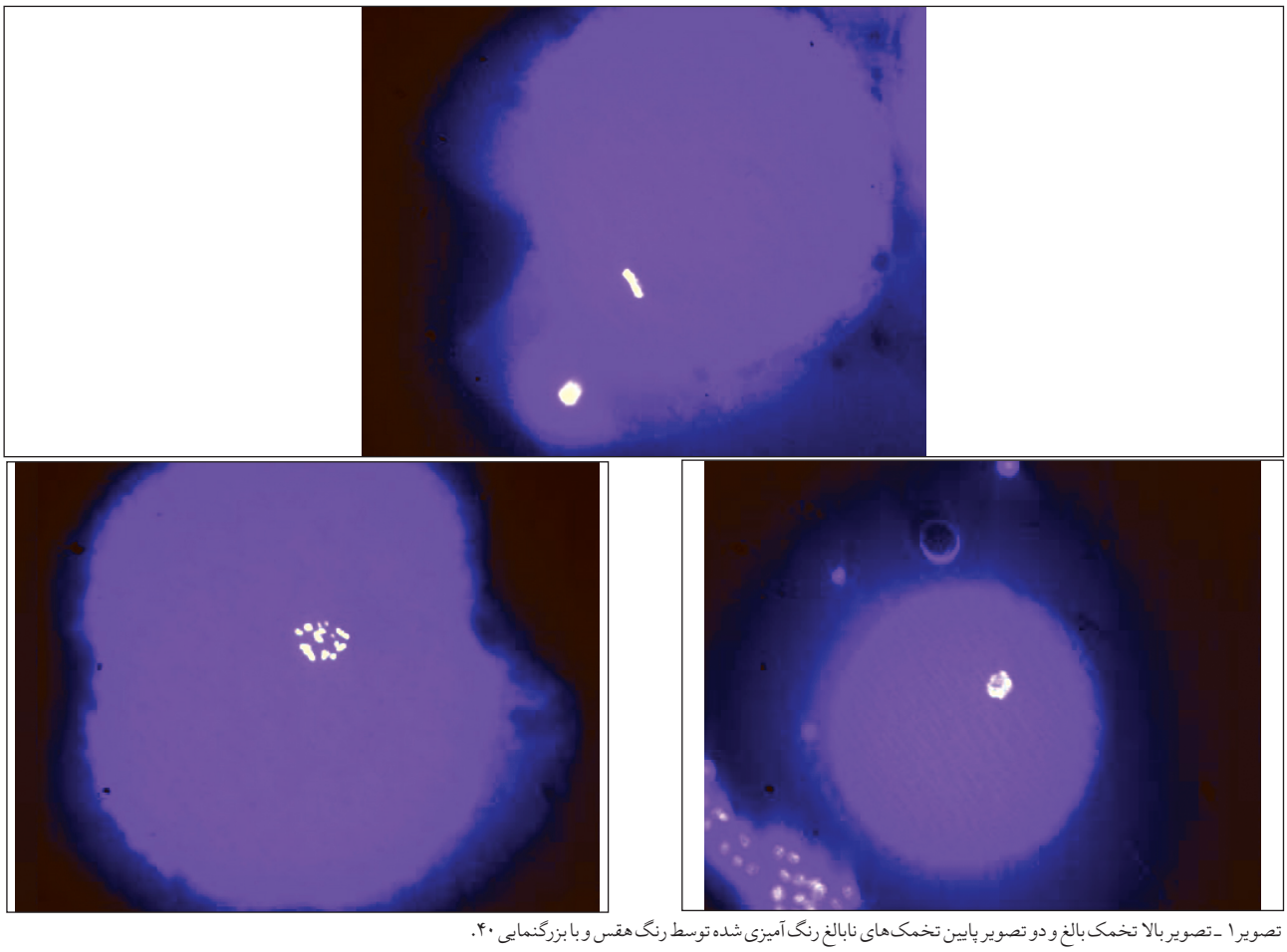
در این آزمایش تعداد ۵۱۷ عدد تخمک نابالغ در ۶ دوره تکرار داخل محیط IVM حاوی غلظت‌های ۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ نانوگرم از GnRH قرار داده شد که میزان بلوغ در جدول ۱ آورده شده که از نظر آماری تفاوت معنی داری مشاهده نشده است ($p>0/05$).

ارزیابی بلوغ تخمک‌ها بر اساس رنگ آمیزی هقس صورت گرفته است (تصویر ۱).

آزمایش دوم:

در این آزمایش تعداد ۵۴۷ عدد تخمک در ۶ دوره تکرار داخل محیط IVF حاوی غلظت‌های ۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ نانوگرم از GnRH قرار گرفت که میزان تقسیم و تکامل رویان‌ها در جدول ۲ آورده شده که از نظر آماری نتایج معنی داری حاصل نشده است ($p>0/05$) ولی بصورت چشمی cleavage rate در گروه ۸۰۰ng و خصوصا ۱۰۰۰ng افزایش یافته است.

برای ارزیابی کیفیت رویان از رنگ‌آمیزی افتراقی PI و Hoechst استفاده شده و تعداد سلول‌های ICM، TE و total در جدول ۳ آورده شده است که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار مشاهده نشده است ($p>0/05$).



تصویر ۱ ـ تصویر بالا تخمک بالغ و دو تصویر پایین تخمک‌های نابالغ رنگ آمیزی شده توسط رنگ هقس و با بزرگنمایی ۴۰.

آزمایش ۳ :

در این آزمایش تعداد ۵۴۳ عدد تخمک در ۶ دوره تکرار مورد بررسی قرار گرفت و غلظت‌های ۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ نانو گرم از GnRH به محیط IVC افزوده شد که میزان تقسیم و تکامل رویان‌ها در جدول ۴ آورده شده است که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده است ($p>0/05$) ولی بصورت چشمی blastocyst rate در گروه ۸۰۰ng و ۱۰۰۰ng افزایش یافته است.

برای ارزیابی کیفیت از رنگ آمیزی افتراقی PI و Hoechst استفاده شده و تعداد سلول‌های ICM، TE و total در جدول ۵ آورده شده است که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های حاوی GnRH و فاقد آن مشاهده شد ($p<0/05$).

بحث

ترکیبات مختلفی جهت افزایش میزان بلوغ تخمک و تکامل رویان به محیط‌های IVM، IVF، IVC افزوده شده است.

در این میان EGF نقش بسیار مهمی بر بلوغ، بیوسنتز پروتئین، expantion سلول‌های کومولوس، cleavage rate، blastocyst rate داشته است (۲).

FSH نیز نقش کلیدی را خصوصا بر بلوغ هسته بر عهده داشته است (۱).

همچنین VEGF بر بلوغ، تقسیم سلولی و تکامل رویان موثر بوده است (۱۰).

PDGF و انسولین بیشتر باعث تشویق بلوغ هسته شده است تا بلوغ سیتوپلاسم که با افزودن رتینول این فرایند تسریع نیز شده است (۷).

در تحقیقی تاثیر GHRH بر بلوغ هسته و سیتوپلاسم تخمک در گاو بررسی شده است که هیچ تاثیری بر بلوغ هسته نداشته و جالب است که تاثیر منفی نیز بر بلوغ سیتوپلاسم داشته است که محقق معتقد است که علت آن حضور رسپتوری خاص روی غشای پلاسمایی است (۶).

در میان ترکیبات افزوده شده به محیط IVF، PGE و PGF نقش مهمی را بر ظرفیت پذیری اسپرم و لقاح بر عهده داشته

است(۵).

در میان ترکیبات افزوده شده به محیط IVC، IGF-1 نقش مهمی بر کیفیت و تکامل رویان ها داشته است (۲۲).

PDGF-± و PDGF-^{2} نیز بعد از مرحله ۸ سلولی بر تکامل رویان ها موثر بوده است(۲۱).

EGF و FGF بصورت همیار بر تکامل رویان ها موثر بوده اند(۱۷).

BST نیز از طریق کاهش آپوپتوز سلولی (از ۱۴% به ۲.۷%)، افزایش گلوکز، اگزوسیتوز لیپیدها، تراکم میتوکندری ها نقش به سزایی بر تکامل رویان ها داشته است(۱۵).

همچنین انسولین ۱ mg/ml از طریق افزایش نفوذ گلوکز و اسیدهای آمینه به داخل سلول نقش مهمی بر تکامل رویان داشته است (۱۹).

در مورد GnRH با وجود نقش بسیار مهم این هورمون در کنترل دستگاه تناسلی، تحقیقات محدودی خصوصا در گاو صورت گرفته است.

در خصوص نقش این هورمون برلقاح در تحقیقی مقدار 800 نانوگرم از GnRH به محیط IVF در گاو افزوده که باعث افزایش قابل ملاحظه ای بر cleavage rate شده است که علت آن را به واسطه حضور رسپتورهایش روی سلول های کومولوس مطرح کرده اند (۱۲).

در مطالعه ای دیگر روی گاو که چند سال بعد انجام شد جالب است که هیچگونه اثر سودمندی بر cleavage rate مشاهده نشده است و ضمنا رسپتورهای GnRH را نیز نتوانسته اند روی اسپرم و سلول های کومولوس شناسایی کنند(۲۴).

در انسان GnRH و رسپتورهایش، در زمان لانه گزینی و مراحلی از فاز لوتئال شناسایی شده است(۹) و در موش نیز رسپتورهایش در رحم شناسایی شده است که احتمالا این هورمون بصورت پاراکرین در دینامیسم آندومتر و لانه گزینی نقش داشته است(۴).

محققین دیگر توانسته اند رسپتورهای این هورمون را در مراحل مختلف تکامل در موش شناسایی کنند که این موضوع نیز کمک شایانی به تایید ارتباط بین رویان و لوله تناسلی از طریق سیستم GnRH کرده است(۲۷).

از این میان می توان به شناسایی رسپتور های این هورمون روی بلاستومرهای مرولای متراکم (۲۵) و توده سلولی داخلی و خارجی اشاره کرد که در این آزمایش میزان mRNA و بیان پروتئین در مرحله بلاستوسیست نسبت به مرحله مرولا افزایش معنی داری یافته است(۲۶).

برخی از محققین معتقدند که نقش GnRH بر تکامل رویان به واسطه افزایش hCG است(۲۶).

در مطالعات کلینیکی روی گاو نر نیز مشخص شده که پالس های GnRH اغلب باعث افزایش باروری شده است که نشان از نقش اساسی این هورمون در دستگاه تناسلی است (۱۳).

جالب است که افزودن آگونیست های GnRH به محیط IVC در موش بر تکامل رویان ها در کشت انفرادی رویان ها موثر بوده ولی در کشت گروهی هیچ اثری نداشته است که علت آن را پوشانده شدن اثرات آگونیستی GnRH توسط فاکتورهای اندوژنوس ترشح شده توسط رویان ها در کشت گروهی مطرح کرده اند(۲۳).

در خوک نکته جالب این است که افزودن آگونیست های GnRH به محیط IVC اثری بر تکامل رویان نداشته و فقط باعث افزایش سلول های تروفکتودرم شده است (۲۰).

از نظر مولکولی میزان mRNA رسپتورهای این هورمون در مراحل مختلف تکامل توسط تکنیک real-time PCR در موش بررسی شده است که میزان آن ها در مرحله ۲ سلولی افزایش، ۲ سلولی تا مورولا کاهش، بعد از early blastocyst افزایش و در مرحله expanded blastocyst به حداکثر میزان خود رسیده است (۱۲).

در تحقیقی ارزشمند توسط محققین آنتاگونیست های GnRH به محیط IVC در موش افزوده که باعث کاهش تکامل رویان شده است و علت آن را شکستن ساختار میتوکندری ها، کاهش فاکتورهای رشد ضد مرگ سلولی، کاهش فاکتور رشد اپیدرمی و کاهش فاکتور رشد شبه انسولین در بلاستوسیست ها مطرح کرده اند(۱۶).

ما در آزمایش اول مقادیر ۱۵۰۰ng و ۱۰۰۰، ۸۰۰، ۰ از GnRH را به محیط IVM افزودیم و همانطور که اشاره شد تفاوت معنی داری بر بلوغ هسته تخمک بر اساس رنگ آمیزی Hoechst مشاهده نشد و در مطالعات صورت گرفته توسط دیگر محققین نیز تفاوت معنی داری بر بلوغ هسته مشاهده نشده است.

شاید علت معنی دار نشدن نتایج، کافی نبودن غلظت افزوده شده از این هورمون به محیط IVM بوده است.

شاید اصلا گیرنده ای برای شناسایی این هورمون روی

سلول‌های کومولوس حضور نداشته باشد شاید EGF موجود در محیط IVM به واسطه اثر بر سلول‌های کومولوس و ترشح GnRH سبب بلوک شدن گیرنده‌های GnRH شده باشد.

شاید این هورمون اثر خود را در مراحل بعدی نظیر انجماد و لانه گزینی نشان خواهد داد.

در مورد آزمایش دوم جالب است در آزمایشی که توسط Funston,R.N. در سال ۱۹۹۵ انجام شده، cleavage rate بطور قابل ملاحظه ای افزایش یافته و حتی گیرنده‌های این هورمون نیز در سطح سلول‌های کومولوس شناسایی شده ولی در آزمایشی که توسط Rota و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام شده تفاوت معنی داری بین گروه‌های تیمار مشاهده نشده و هیچ گیرنده ای نه در سطح سلول‌های کومولوس و نه در اسپرم شناسایی نشده است.

در آزمایش ما نیز از نظر آماری تفاوت معنی داری حاصل نشد ولی بصورت مشاهده ای افزایشی در cleavage rate خصوصا در گروه ۱۰۰۰ng مشاهده شد.

شاید اگر تعداد نمونه‌ها را افزایش می‌دادیم نتایج معنی دار می‌شد ولی به دلیل عدم دسترسی به تعداد نمونه بیشتر به همین میزان اکتفا کردیم.

از دلایل دیگر می‌توان به نبود غلظت مناسب این هورمون و یا نبود گیرنده ای برای این هورمون در سطح اسپرم و سلول‌های کومولوس اشاره نمود.

در مورد آزمایش سوم نیز لازم به ذکر است که تاکنون تاثیر این هورمون در محیط IVC در گاو بررسی نشده و تنها چند مقاله در موش و خوک موجود است که این هورمون در موش در کشت انفرادی بر blastocyst rate تاثیر به سزایی داشته و در خوک نیز باعث افزایش سلول‌های تروفکتودرم شده است. در آزمایش ما نیز از نظر آماری در گروه‌های حاوی GnRH در مقابل گروه فاقد GnRH افزایش سلول‌های تروفکتودرم مشاهده شد و در مورد blastocyst rate تفاوت معنی داری مشاهده نشد ولی بصورت چشمی افزایشی بر blastocyst rate در گروه‌های ۸۰۰ng و ۱۰۰۰ng مشاهده شد که در این مورد نیز شاید با افزایش تعداد نمونه از نظر آماری نیز معنی دار می‌شد، شاید اصلا گیرنده ای برای GnRH در سطح بلاستومرهای گاو وجود نداشته باشد و یا شاید غلظت‌های مورد استفاده کافی نبوده است.

البته جالب است که بعضی اثرات در مراحل ذکر شده قابل مشاهده نیستند مانند افزایش مقاومت رویان‌ها در مقابل برودت و زنده مانی آن‌ها متعاقب انتقال به دام گیرنده که شاید GnRH اثرات خود را در این مراحل نشان میدهد که نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه است.

نتیجه‌گیری و پیشنهاد

در آزمایش ما GnRH افزوده شده داخل محیط IVM، IVF و IVC بر maturation rate، cleavage rate و blastocyst rate بی اثر بود و تنها GnRH افزوده شده به محیط IVC باعث افزایش سلول‌های تروفکتودرم شد که احتمالا در لانه گزینی می‌تواند نقش داشته باشد و جالب است که بعضی اثرات در مراحل IVM، IVF و IVC قابل مشاهده نیستند مانند مقاومت رویان‌ها در مقابل انجماد، لانه گزینی و بقای آن‌ها متعاقب انتقال به دام گیرنده که شاید اثرات GnRH در این مراحل قابل شناسایی باشند که نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه است.

Reference

1. Alves, J.D.R., Oliveira, M.A.L., Lima, P.F., Caldas, J.G.L., Santos-Filho, A.S., Barreto, M.B.P. (2001) High concentration of FSH-p on the in vitro maturation of Bos indicus oocytes, *Ciencia Rural*, **31:**645-649.
2. Anas, M.K.I., Terada, T. (1999) In vitro nuclear maturation and developmental potential of bovine oocytes cultured with EGF and wortmannin. Biology of Reproduction. p:179.
3. Arthur, G.H., Pearson, H., Parkinson, T. (1996) Veterinary reproduction and obstetrics, (7^{th} ed.)WB Sanders Company Limited, USA.
4. Asirvatham, A.L., Johnson,G.A., Belden,E.L., Van Kirk, E.A., Moss, G.E., Murdoch, W.J. (1994) Immunization of mice against a synthetic N-terminal extracellular domain gonadotropin-releasing hormone receptor peptide. *Am Journal Reproduction Immunology*, **32:**95-100.
5. Baptista, M.C., Marques, C.C., Pereira, R.M., Vasques, M.I., Horta, A.E.M. (2000) Effects of prostaglandins onbovine sperm capacitation and fertilization in vitro. *Theriogenology*, **53:** 416.
6. Beker, A.R.C.L., Izadyar, F., Colenbrander, B.,

Bevers, M.M. (2000) Effect of growth hormone releasing hormone (GHRH) and vasoactive intestinal peptide (VIP) on in vitro bovine oocyte maturation. *Theriogenology*, **53:**1771-1782.

7. Bortolotto, E.B., Goncalves, P.B.D., Neves, J.P., Costa, L.F.S., Maciel, M.N., Montagner, M.M., Farias, A.M., Stranieri,P. (2001) Platelet-derived growth factor, retinol and insulin in the regulation of bovine oocyte nuclear maturation and their consequent effect in the embryonic development. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia, **53:**191-197.
8. Brebion, P., Belloc, P., Brioison, M., Elite, L. (1990) Ewe pretreated with a GnRH antagonist yield more usable embryos following FSH , In sixth meeting European association for embryo transfer, Lyon. p.12.
9. Casan, E.M., Raga, F., Kruessel, J.S., Wen, Y., Nezhat, C.,Polan,M.L.(1998) Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone expression in cycling human endometrium of fertil patients. *Fertilization Steril*, **70:**102-106.
10. Einspanier, R., Muller, K., Bieser, B., Kosmann, M., Schams, D. (1999) Differential expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in bovine ovarian follicles and first effects of VEGF applied during in vitro maturation of oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility, Abstract Series*, **23:** 7.
11. Fischer-Brown, A., Block, J., Hansen, J. (1998) Differential staining of trophectoderm and inner cell mass in combination with tunnel analysis of bovine embryos, University of Florida. *Theriogenology*, **54:** 121-126 .
12. Funston, R.N., Seidel, G.E. (1995) Gonadotropin-releasing hormone increases cleavage rates of bovine oocytes fertilized in vitro. *Biology Reproduction*, **53:**541-545.
13. Gordon, I. (1996) Laboratory Production of Cattle Embryos, CABI publishing .
14. Hsueh, A.J.W., Jones, P.B.C. (1981) Extrapituitary actions of gonadotropin releasing hormone. *Endocrinology*, **2:**437-455.
15. Izadyar, F., Colenbrander, B., Bevers,M.M. (1996c) In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Molecular Reproduction and Development*, **45:**372-377.
16. Kawamura, K., Fukuda, J., Kumagal, J., Shimizu, Y., Kodawa, H., Nakamura, A., Tanaka, T. (2005) Gonadotropin-Releasing Hormone I Analog Acts as an Anti-apoptotic Factor in Mouse Blastocysts. *Theriogenology*, **57:** 142-157.
17. Lee, E.S., Fukui,Y. (1995) Effect of various growth factors in a defined culture medium on in vitro development of bovine embryos matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, **44:** 71-83.
18. Lindner, G.M., Wright, R.W. (1983) Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, **20:** 407-416.
19. Matsui, M., Takahashi, Y., Hishinuma, M., Kanagawa, H. (1995a) Stimulatory effects of insulin on the development of bovine embryos fertilized in vitro. *Journal of Veterinary Medical Science*, **57:** 331-336.
20. Nam, D.H., Lee, S.H., Kim, H.S., Lee, G.S., Jeong, Y.W., Kim, S., Kim, J.H., Kang, S.K., Lee, B.C., Hwang, W.S. (2005) The role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its receptor in development of porcine preimplantation embryos derived from in vitro fertilization. *Theriogenology*, **63:**190-201.
21. Poole, E.M., Richardson, M.E., Baird, M.V. (1995) The effects of EGF, IGF-I and PDGF-alpha on the ability of the bovine embryo to circumvent the 8-cell developmental block in vitro. *Journal of Animal Science*, **73:** 221.
22. Prelle, K., Boxhammer, K., Stojkovic, M., Wolf, E. (1999b) Effects of insulin-like growth factor-I and its analogues on IGF-I binding protein gene expression in preimplantation bovine embryos. *Theriogenology*, **51:** 189.
23. Raga, F., Casan, E.M., Kruessel, J., Wen, Y., Musoles, F.B., Polan, M.L. (2006) The Role of Gonadotropin-Releasing Hormone in Murine Preimplantation Embryonic Development. *Theriogenology*, **58:** 132-151.
24. Rota, A., Penzo, N., Vincenti, L. (2000) Effect of

gonadotropin-releasing hormone on cleavage rate and embryo development of bovine oocytes fertilized in vitro, In: Proceedings 16th Meeting European Embryo Transfer Association, Santander. p. 198 .

25. Santos, M.J., Mercader, A., Frances, A., Portoles, E., Remohi, J., Pellicer, A., Simon, C. (1996) Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin-1 system during embryonic development. *Biology Reproduction*, **54:** 563-574.
26. Seshagiri, P.B., Terasawa, E., Hearn, J.P. (1994) The secretion of gonadotropinreleasing hormone by peri-implantation embryos of the rhesus monkey, comparison with the secretion of chorionic gonadotropin. *Human Reproduction*, **9:** 1300-1307.
27. Tazuke, S.I., Guidice, L.C. (1996) Growth factors and cytokines in endometrium, embryonic development and maternal: embryonic interactions. *Semin Reproduction Endocrinology*, **14:** 231-243.