بررسی نقش هورمون GnRH در مراحل مختلف تکوین آزمایشگاهی رویان گاو

آیدین رحیم طایفه[۱]، فرید حیدری[۲*]، فرامرز قراگزلو[۳]، پژمان میرشکرایی [۴]، ناصر فرخی[۵]، بهار نیری فسایی[۶] و جعفر خضری[۲]

[۱] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، مرکز ملی موش تراریخت

[۲] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه بیوتکنولوژی حیوانات

[۳] تهران، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم بالینی

[۴] مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، گروه علوم درمانگاهی

[۵] شاهرود، دانشگاه شاهرود، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت واصلاح نباتات

[۶] تهران، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۲

چکیده

تأثیر هورمون GnRH در تنظیم و کنترل تولید مثل در حیوان ماده و نر در مطالعات کلینیکی به خوبی نشان داده شده است ولی با توجه به نقش بسیار مهم این هورمون در سیستم تناسلی حیوان، مطالعات اندکی در مورد اثر آن روی فرآیند فولیکولوژنز ، بلوغ تخمک ، لقاح تخمک و اسپرم و تکامل رویان صورت گرفته است. هدف از این تحقیق بررسی تأثیر مقادیر مختلف این هورمون در فرآیند لقاح و تکامل رویان بوده است. در این تحقیق تعداد ۱۰۹۱ عدد تخمک استحصال شده به روش آسپیراسیون ، به تفکیک داخل محیطهای لقاح و کشت جنین حاوی غلظتهای ۸۰۰ ، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ نانوگرم GnRH به ازای هر میلی لیتر محیط کشت قرار گرفته و با گروه شاهد مقایسه شدند. در آزمایش اول و دوم بر اساس آنالیز میکروسکوپی از نظر ظاهری افزایش میزان تقسیم و بلاستوسیست در گروههای تیمار(خصوصاً در گروههای حاوی مقادیر ۸۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم GnRH به ازای هر میلی لیتر محیط کشت)نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ولی از نظر آماری تفاوت معنی دار بین گروههای تیمار و شاهد مشاهده نشد و همچنین افزایش قابل ملاحظه در تعداد کل سلولها و توده سلولی خارجیدر گروههای تیمار نسبت به گروه شاهد مشاهده شد($p<۰/۰۵$) .

واژه های کلیدی : هورمون GnRH ، لقاح آزمازشگاهی، کشت آزمایشگاهی، میزان تقسیم زیگوت، میزان بلاستوسیست.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۵۸۰۳۱۴ ، پست الکترونیکی: heidari@nigeb.ac.ir

مقدمه

قابلیت تولید و نگهداری رویان در بسیاری از گونه های حیوانی از جمله اسب ، گاو ، گوسفند و بز مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته است . با توجه به پیشرفتهای فراوانی که در این زمینه حاصل شده است به نظر می رسد در آینده از این تکنیک به منظور تولید کنترل شده و آسان رویانها، تسریع در بهبود ژنتیکی گله ها، ذخیره منابع ژنتیکی و ایجاد خلوص نژادی استفاده شود .

آزمایشگاههای کمی در جهان وجود دارند که قادر به تولید رویان جهت انتقال به حیوان باشند 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 در تلاشند (۵ و ۲۰). مطالعات اخیر نشان داده است که میزان آبستنی متعاقب انتقال رویانهای تولید شده داخل آزمایشگاه به رحم حیوان در مقایسه با رویانهای تولید شده در بدن حیوان کمتر است ، همچنین این رویانها نسبت به انجماد حساس ترند(۱۲).

محققین نشان داده اند که تغییر در اجزای سیستم کشت می تواند باعث بهبود زنده مانی رویانهای منجمد شده و میزان آبستنی پس از انتقال به رحم حیوان شود. در این میان می توان به افزودن برخی مواد به محیط کشت از جمله فاکتور رشد اپیدرمی و فاکتور رشد شبه انسولین اشاره کرد(۱ و ۲۸).

هورمون GnRH دکاپپتیدی به وزن مولکولی ۱۱۸۳ دالتون ، حاوی ۱۰ اسید آمینه و نیمه عمر ۴ تا ۷ دقیقه است و به عنوان مهم ترین هورمون تولید مثلی حیوان مطرح است (۲). در ابتدا این هورمون به عنوان هورمون هیپوتالاموسی تحریک کننده هیپوفیز برای آزاد سازی هورمون LH شناسایی شد و به این دلیل نام هورمون LH-RH به آن داده شد، سپس با تشخیص خاصیت این هورمون در آزاد کردن هورمون FSH ، نام هورمون GnRH برای آن برگزیده شد (۶).

هورمون GnRH علاوه بر عملکرد اصلی در تنظیم فعالیتهای تولید مثلی، روی فرآیندهای تولید رویان نیز به صورت موضعی نقش دارد (۱۷) . در چندین گونه پستاندار مقادیری از هورمون GnRH فرا هیپوتالاموسی در بافتهایی نظیر تخمدان ، جفت ، اویداکت و بیضه شناسایی شده است که همانند هورمون GnRH هیپوتالاموسی است(۱۳)، همچنین این هورمون در سایر بافتها به صورت اتوکرین و پاراکرین عمل کرده و فعالیتهای استروئیدوژنز را کنترل می کند و در مرگ سلولی نیز نقش دارد(۲) .

هدف از این تحقیق با توجه به موارد ذکر شده ، بهبود راندمان تولید ، نگهداری و انتقال رویانها جهت افزایش میزان آبستنی متعاقب انتقال رویانهای تولید شده داخل آزمایشگاه به رحم حیوان بوده است. همچنین با توجه به نقش اساسی میزان موفقیت در تولید آزمایشگاهی رویان بر موفقیت روی سایر تکنیکهای تولید مثلی از جمله همانند سازی و تولید حیوانات تراریخت ، می توان نتایج حاصل از این تحقیق را در جهت بهبود راندمان این تکنیکها به کار برد.

مواد و روشها

جمع آوری و بلوغ تخمک: پس از کشتار حیوان، تخمدانها از بافتهای اضافی جدا و داخل فلاسک حاوی سرم فیزیولوژی استریل ۳۰ درجه سانتی گراد و آنتی بیوتیک (پنی سیلین۱۰۰ واحد در میلی لیتر و استرپتومایسین۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر) به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از شستشوی تخمدانها (حداقل ۴ بار با سرم فیزیولوژی استریل حاوی آنتی بیوتیک) ، تخمکها از فولیکولهای ۲ تا ۸ میلی متر استحصال و داخل تیوب ۵۰ میلی لیتر حاوی محیط آسپیراسیون ریخته شدند. سپس رسوب ایجاد شده داخل تیوب ، داخل پلیت خط کشی شده ریخته شد و تخمک ها زیر استریو میکروسکوپ جمع آوری و داخل محیط شستشو (محیط آسپیراسیون فاقد هپارین)، تخمکهای با کیفیت انتخاب شدند (تخمکهای حاوی حداقل ۴ لایه سلول کومولوس، سیتوپلاسم یکنواخت و رنگ قهوه ای تیره) و در دسته های ۱۰تایی در قطرات ۵۰ میکرو لیتر از محیط بلوغ منتقل شدند و به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه دارای ۵ درصد دی اکسید کربن قرار گرفتند.

محیط آسپیراسیون: M199 HEPES (Gibco 12340030)+ BSA(Sigma A-7030) + ۴ میلی گرم به ازای هر میلی لیتر Heparin(Sigma H-8514)+ ۲ میکرو گرم به ازای هر میلی لیتر Gentamicine(Sigma G-1397) ۱ میکرو گرم به ازای هر میلی لیتر

محیط بلوغ تخمک: M199 bicarbonate (Gibco 11043023) + FCS (Sigma F-2442) +10% - Na Pyruvate (Sigma P-3662)۲۰ میکرو گرم به ازای هر میلی لیتر +E2(Sigma E-4389) ۱ میکرو گرم به ازای هر میلی لیتر +EGF(Sigma E-4127) + ۱۰۰ نانو گرم به ازای هر میلی لیتر Gentamicin(Sigma G-1397) ۱ میکرو گرم به ازای هر میلی لیتر

لقاح: قبل از لقاح آزمایشگاهی پایوت اسپرم داخل آب ۳۰ درجه قرار گرفت ، پس از گذشت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه محتوای پایوت داخل تیوب حاوی ۵ میلی لیتر محیط شستشوی اسپرم (Sperm TALP) ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. پس از حذف قسمت بالایی رسوب ، به آرامی ۲ میلی لیتر محیط شستشوی اسپرم روی رسوب ریخته شد و با زاویه ۴۵ درجه داخل انکوباتور قرار گرفت و پس از گذشت ۱ ساعت ۱ میلی لیتر از سطح محیط به داخل میکروتیوب منتقل شد.

شمارش اسپرم: رقت ۰/۱ برای شمارش اسپرم تهیه شد و حدود ۱۰ میکرو لیتر از آن بین لامل و لام هموسایتومتر قرار گرفت و سپس اسپرمها در ۴ خانه کناری و خانه مرکزی از مربع مرکزی لام زیر میکروسکوپ شمرده شدند.

طبق فرمول زیر غلظت اسپرم محاسبه شد :

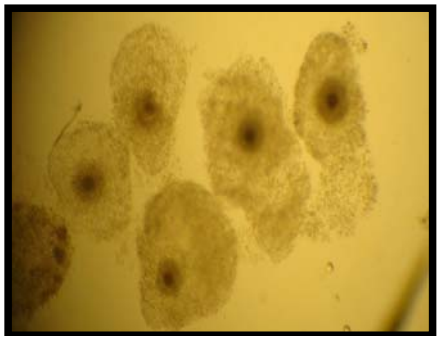
تعداد اسپرم به ازای هر میلی لیتر = $N^{*} \times D^{*} \times ۵۰۰۰۰$

* N = تعداد اسپرم شمرده شده در ۵ خانه

* D = فاکتور رقت (۱۰)

رقت ۴ میلیون اسپرم به ازای هر میلی لیتر محیط تهیه و۵ میکرو لیتر از آن به محیط لقاح افزوده شد.

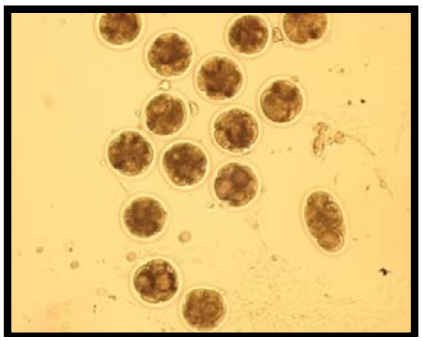
تخمکهای بالغ شده (شکل ۱) پس از ۳ بار شستشو داخل محیط شستشو (HEPES TALP) ، در دسته های ۵ تایی داخل قطرات ۵۰ میکرولیتر از محیط لقاح (Fert-TALP) منتقل شدند و به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۹ درجه و دارای ۵٪ دی اکسید کربن قرار گرفتند.



شکل۱- تخمکهای بالغ شده پس از گذشت ۲۴ساعت داخل محیط بلوغ

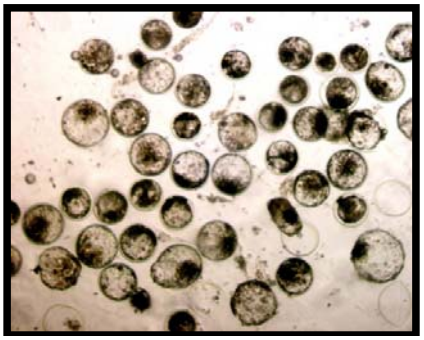
کشت رویان: زیگوتها به مدت ۲ دقیقه داخل محیط شستشو (HEPES SOF) پیپتاژ شدند. پس از ۴ بار شستشو، رویانها در دسته های ۱۰ تا ۳۰ تایی به محیط کشت رویان (SOF) منتقل شدند و داخل انکوباتور ۳۷ درجه و دارای ۵ درصد دی اکسید کربن قرار گرفتند. سپس محیط کشت رویانها ۲بار با فاصله ۷۲ ساعت تعویض شد.

آزمایش شماره ۱ : در این آزمایش غلظتهای ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ نانو گرم در میلی لیتر هورمون (Sigma L-9761) GnRH داخل محیط لقاح افزوده شدند و اثر آنها بر اساس آنالیز میکروسکوپی بعد از ۶ تکرار روی میزان تقسیم زیگوت پس از گذشت ۴۸ ساعت از لقاح (شکل۲) بررسی شد.



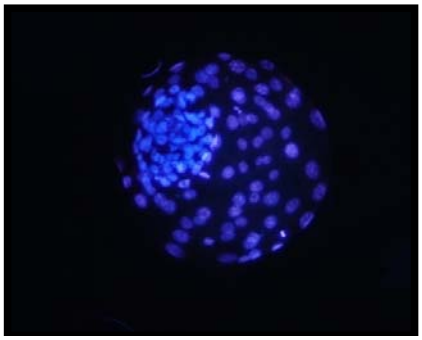
شکل۲- زیگوتهای تقسیم شده پس از گذشت ۷۲ ساعت از لقاح داخل محیط کشت

آزمایش شماره ۲ : در این آزمایش غلظتهای ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ نانو گرم در میلی لیتر هورمون GnRH داخل محیط کشت رویان افزوده شدند و اثر آنها بر اساس آنالیز میکروسکوپی پس از ۶ تکرار بر میزان بلاستوسیست (شکل۳) و کیفیت رویانها (با استفاده از رنگ آمیزی افتراقی پروپیدیوم آیداید و هقس) بررسی شد.



شکل۳- بلاستوسیست های تولید شده پس از گذشت ۸ روز از لقاح داخل محیط کشت

رنگ آمیزی افتراقی توسط رنگهای پروپیدیوم آیداید و هقس: بلاستوسیست های تولید شده ۲۰ ثانیه داخل محیط کشت حاوی ۰/۵ درصد تریتون و رنگ پروپیدیوم آیداید (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر محیط کشت)قرار گرفتند. سپس داخل اتانول ۱۰۰ درصد حاوی رنگ هقس(۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر محیط کشت) روی یخ منتقل شدند. پس از ۳۰ دقیقه بلاستوسیست ها روی لام ثابت و با میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی شدند (رنگ صورتی معرف توده سلولی خارجی و رنگ آبی معرف توده سلولی داخلی) (شکل۴) (۹).



شکل۴- بلاستوسیست رنگ آمیزی شده توسط رنگ پروپیدیوم آیداید و هقس(سلولهای TE صورتی رنگ و ICM آبی رنگ)

طراحی آزمایش و آنالیز آماری: داده های حاصل از نتایج آزمایش با نرم افزار SPSS(ver.14) آنالیز شدند. در مورد شمارش سلولی ابتدا آزمون Normality انجام شد سپس جهت انجام آنالیز واریانس میانگین گروهها از آزمون One way ANOVA و از آزمون تکمیلی (Post Hoc test) Fisher LSD جهت مقایسه بین دو گروه استفاده شد و در مورد بررسی تعداد رویانها از آزمون مربع کای استفاده شد ($p<۰,۰۵$).

نتایج

آزمایش اول : تعداد ۵۴۸ عدد تخمک در ۶ تکرار داخل محیط لقاح حاوی غلظتهای ۰ ، ۸۰۰ ، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ نانو گرم در میلی لیتر هورمون GnRH قرار گرفت و بر اساس آنالیز میکروسکوپی تفاوت معنی داری بین گروهها حاصل نشد ولی به صورت مشاهده ای افزایش روی میزان تقسیم در گروههای ۸۰۰ و ۱۰۰۰ نانو گرم در میلی لیتر هورمون GnRH در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد (جدول ۱).

جدول۱- تأثیر غلظت های مختلف هورمون GnRH افزوده شده به محیط لقاح روی میزان تقسیم

غلظت هورمون GnRH	تعداد تخمک	تعداد زیگوت های تقسیم شده	میزان تقسیم
۰ نانوگرم در میلی لیتر	۱۳۴	۸۴	٪ ۶۲,۴
۸۰۰نانوگرم در میلی لیتر	۱۴۰	۹۷	ns ٪ ۶۸,۱
۱۰۰۰نانوگرم در میلی لیتر	۱۴۳	۱۰۴	ns ٪ ۷۲,۱
۱۵۰۰نانوگرم در میلی لیتر	۱۳۱	۸۶	ns ٪ ۶۵

* بین میانگین تیمارهای ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ **نانوگرم در میلی لیتر هورمون** GnRH با نمونه شاهد تفاوت معنی داری وجود ندارد (Non significance). * تمام آزمایشات برای گروههای آزمایشی در ۶ تکرار انجام شده است.

آزمایش دوم : تعداد ۵۴۳ عدد تخمک در ۶ تکرار داخل محیط کشت حاوی غلظتهای ۰ ، ۸۰۰ ، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ نانو گرم در میلی لیتر GnRH قرار گرفت و بر اساس آنالیز میکروسکوپی تفاوت معنی داری بین گروهها حاصل نشد ولی به صورت مشاهده ای افزایش روی میزان بلاستوسیست در گروههای ۸۰۰ و ۱۰۰۰ نانو گرم در میلی لیتر هورمون GnRH در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد(جدول ۲).

جدول۲- تأثیر غلظتهای مختلف هورمون GnRH افزوده شده به محیط کشت روی میزان بلاستوسیست

غلظت هورمون GnRH	تعداد تخمک	تعداد بلاستوسیست	میزان بلاستوسیست
۰ نانوگرم در میلی لیتر	۱۳۵	۲۷	٪۱۹,۷۲
۸۰۰ نانوگرم در میلی لیتر	۱۳۷	۳۴	٪۲۴,۴۸ ns
۱۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر	۱۳۱	۳۳	٪۲۴,۷۱ ns
۱۵۰۰ نانوگرم در میلی لیتر	۱۴۰	۲۶	٪۱۸,۲۳ ns

* بین میانگین تیمارهای ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ **نانوگرم در میلی لیتر هورمون** GnRH با نمونه شاهد تفاوت معنی داری وجود ندارد(Non significance).

* تمام آزمایشات برای گروههای آزمایشی در ۶ تکرار انجام شده است.

در مورد کیفیت رویانهای تولید شده در محیطهای کشت حاوی و فاقد غلظتهای مختلف هورمون GnRH تفاوت قابل ملاحظه ای در تعداد کل سلولها و توده سلولی خارجی بین گروههای تیمار و شاهد مشاهده شد(جدول ۳).

جدول۳-تأثیر غلظتهای مختلف هورمون GnRH افزوده شده به محیط کشت روی کیفیت رویانها

غلظت هورمون GnRH	تعداد بلاستوسیست	تعداد S.E±ICM	تعداد S.E±TE	تعداد کل سلولها±S.E	نسبت ICM به S.E±TE
۰ نانوگرم در میلی لیتر	۱۸	۴۸,۹± ۱,۵	۸۴,۶±۲,۱	۱۳۳,۴±۲,۵	۰,۵۹±۰,۰۳
۸۰۰ نانوگرم در میلی لیتر	۲۷	۴۶±۱,۱	۹۹,۱±۱,۵*	۱۴۵,۱±۱,۸*	۰,۴۷±۰,۰۱
۱۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر	۲۱	۴۵,۵±۱,۶	۹۷,۲±۱,۲*	۱۴۲,۷±۲,۲*	۰,۴۷±۰,۰۱
۱۵۰۰ نانوگرم در میلی لیتر	۱۹	۴۶,۱±۱,۳	۹۶,۷±۱,۵*	۱۴۲,۷±۱,۹*	۰,۴۸±۰,۰۲

* بین میانگین تیمارهای ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ **نانوگرم در میلی لیتر هورمون GnRH** با نونه شاهد در سطح ۹۵ درصد تفاوت معنی داری از نظر تعداد توده سلولی خارجی و کل سلولها وجود دارد ($p<0,05$).

* تمام آزمایشات برای گروههای آزمایشی در ۶ تکرار انجام شده است.

بحث

ترکیبات مختلفی جهت افزایش میزان بلوغ تخمک و تکامل رویانهای حیوانات مختلف به محیطهای بلوغ، لقاح و کشت افزوده شده است. در این میان می توان به تأثیرEGF و VEGF روی بلوغ تخمک ، تقسیم و تکامل رویان (۱ و ۸)، PGE و PGF روی ظرفیت پذیری اسپرم و لقاح (۴)،IGF-1 روی کیفیت و تکامل رویان (۲۲)، PDGF-α و PDGF-β روی تکامل رویانها بعد از مرحله ۸ سلولی (۲۱)، EGF و FGF بصورت همیار روی تکامل رویان (۱۶)اشاره کرد. همچنین BST از طریق کاهش آپوپتوز سلولی (از ۱۴ درصد به ۲/۷ درصد)، افزایش گلوکز، اگزوسیتوز لیپیدها، تراکم میتوکندریها (۱۴)،

انسولین از طریق افزایش نفوذ گلوکز و اسیدهای آمینه به داخل سلول روی تکامل رویان مؤثر است(۱۸).

در سال ۱۹۹۴ گیرنده های هورمون GnRH در رحم موش شناسایی شدند و نویسنده معتقد بود که این هورمون به صورت پاراکرین در دینامیسم آندومتر و لانه گزینی نقش داشته است(۳). در همین سال گیرنده های این هورمون روی توده سلولی داخلی و خارجی شناسایی شدند (۲۶). در سال ۱۹۹۵ میزان mRNA رسپتورهای این هورمون در مراحل مختلف تکامل رویانهای موش توسط تکنیک real-time PCR بررسی شد که میزان آن در مرحله ۲ سلولی افزایش ، ۲ سلولی تا مورولا کاهش ، بعد از Early Blastocyst افزایش و درمرحله Expanded Blastocyst به حداکثر میزان خود رسید(۱۰). در سال ۱۹۹۶ نیز رسپتورهای این هورمون در مراحل مختلف تکامل در موش شناسایی شد و این موضوع باعث تأیید ارتباط بین رویان و لوله تناسلی از طریق هورمون GnRH شد(۲۵و۲۷).

در سال ۲۰۰۵ تأثیر آنتاگونیست های هورمون GnRH روی تکامل رویانهای موش بررسی شد که باعث کاهش تکامل رویانها شد و نویسنده علت آن را شکستن ساختار میتوکندریها، کاهش فاکتورهای رشد ضد مرگ سلولی، کاهش فاکتور رشد اپیدرمی و کاهش فاکتور رشد شبه انسولین در بلاستوسیستها مطرح کرد(۱۵).

در سال ۲۰۰۶ تأثیر آگونیست های هورمون GnRH روی تکامل رویانهای موش بررسی شد که روی تکامل رویانها در کشت انفرادی مؤثر و در کشت گروهی غیر مؤثر بود و نویسنده علت غیر مؤثر بودن آن را پوشانده شدن اثرات آگونیستی هورمون GnRH توسط فاکتورهای اندوژنوس ترشح شده توسط رویانها مطرح کرد(۲۳).

در سال ۱۹۹۸ هورمون GnRH و رسپتورهایش ، در زمان لانه گزینی و مراحلی از فاز لوتئال در انسان شناسایی شد(۷) و برخی از محققین معتقدند که نقش این هورمون روی تکامل رویانها به واسطه افزایش هورمون hCG است(۲۶) .

در سال ۲۰۰۵ نیز هورمون GnRH باعث افزایش سلولهای تروفکتودرم رویانهای خوک شد (۱۹).

لازم به ذکر است با توجه به نقش بسیار مهم هورمون GnRH در کنترل سیکل تناسلی گاو ، تحقیقات محدودی در زمینه تأثیر این هورمون روی لقاح و تکامل رویان صورت گرفته است. در سال ۱۹۹۵ غلظتهای ۳۲ ،۱۶۰ و ۸۰۰ نانو گرم در میلی لیتر هورمون GnRH داخل محیط لقاح افزوده شد و میزان تقسیم در گروه حاوی ۸۰۰ نانو گرم در میلی لیتر هورمون GnRH به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافت و همچنین گیرنده های این هورمون در سطح سلولهای کومولوس شناسایی شدند(۱۰). در سال ۲۰۰۰ آزمایش مشابه انجام شد و تفاوت قابل ملاحظه ای بین گروههای تیمار و شاهد مشاهده نشد و همچنین گیرنده ای در سطح سلولهای کومولوس و اسپرم شناسایی نشد(۲۴). در این تحقیق انتخاب غلظتها بر مبنای تحقیقات مشابه در سالهای ۱۹۹۵ و ۲۰۰۰ بوده است و غلظتهای بالاتر از ۸۰۰ نانو گرم در میلی لیتر هورمون GnRH (۸۰۰ ، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰) داخل محیط لقاح و کشت مورد بررسی قرار گرفته است که در آزمایش اول تفاوت معنی داری بین گروهها حاصل نشد ولی به صورت مشاهده ای افزایش روی میزان تقسیم در گروههای ۸۰۰ و ۱۰۰۰ نانو گرم در میلی لیتر هورمون GnRH در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد.

در آزمایش دوم از نظر آماری افزایش قابل ملاحظه تعداد کل سلولها و توده سلولی خارجی بین گروههای تیمار و شاهد مشاهده شد و همچنین به صورت مشاهده ای افزایش میزان بلاستوسیست در گروههای حاوی ۸۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر GnRH در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد ولی از نظر آماری معنی دار نبود و لازم به ذکر است که تاکنون تأثیر این هورمون روی رویانهای گاو

بررسی نشده و تنها تحقیقات محدودی روی موش و خوک صورت گرفته است.

نتیجه گیری و پیشنهاد

در این مطالعه هورمون GnRH به طور قابل ملاحظه ای باعث افزایش تعداد کل سلولها و توده سلولی خارجی شد و آنالیز میکروسکوپی نشان دهنده تأثیر این هورمون روی تکامل رویانها می باشد.

با توجه به تأثیر احتمالی این هورمون بر مقاومت رویانها در مقابل انجماد ، لانه گزینی و زنده مانی آنها بعد از انتقال به حیوان گیرنده نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه است.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه آقایان دکتر مرتضی دلیری، دکترمهدی شمس آرا، دکتر مجتبی دشتی زاد، مهندس احسان هاشمی، دکتر سعید امین زاده اعضای محترم هیئت علمی گروه دام و آبزیان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ابراز می دارند.

منابع

1-Anas,M.K.I. and Terada,T. (1999) In vitro nuclear maturation and developmental potential of bovine oocytes cultured with EGF and wortmannin, Biology of Reproduction P:179.

2-Arthur,G.H., Pearson,H., Parkinson,T. (1996) Veterinary reproduction and obstetrics , 7th edition , WB Sanders Company Limited .

3-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.

4-Baptista,M.C., Marques,C.C., Pereira,R.M., Vasques,M.I. and Horta,A.E.M. (2000) Effects of prostaglandins onbovine sperm capacitation and fertilization in vitro, Theriogenology 53: 416.

5-Bousquet,D., Twagiramungu,H., Morin,N., Brisson,C., Carboneau,G., Durocher,J.(1999) In vitro embryoproduction in the cow: An effective alternative to the conventional embryoproduction approach, Theriogenology 51: 59–70.

6-Brebion,P., Belloc,J.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 .

7-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.

8-Einspanier,R., Muller,K., Bieser,B., Kosmann,M. and 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, Journalof Reproduction and Fertility, Abstract Series 23: 7.

9-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 .

10-Funston,R.N., Seidel,G.E. (1995) Gonadotropin-releasing hormone increases cleavage rates of bovine oocytes fertilized in vitro , Biology Reproduction 53:541–545 .

11-Gordon,I. (1996) Laboratory Production of Cattle Embryos , CABI publishing .

12-Greve,T., Avery,B., Callesen,H.(1993) Viability of in-vivo and in-vitro produced bovine embryos, Department of Reproduction Royal Veterinary and Agricultural University Frederiksberg C, Denmark, Reproduction in Domestic Animals 28:164-169.

13-Hsueh, A.J.W., Jones, P.B.C. (1981) Extrapituitary actions of gonadotropin releasing hormone , Endocrinology 2:437–455.

14-Izadyar,F., Colenbrander,B. and 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.

15-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.

16-Lee,E.S. and 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.

17-Lindner,G.M., Wright,R.W. (1983) Bovine embryo morphology and evaluation , Theriogenology 20: 407–416.

18-Matsui,M., Takahashi,Y., Hishinuma,M. and Kanagawa,H. (1995a) Stimulatory effects of insulin on the development of bovine embryos fertilized in vitro, Journalof Veterinary Medical Science 57:331–336.

19-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 .

20- Peterson,A.J., Lee, R.S-F. (2003) Improving successful pregnancies after embryotransfer, Theriogenology 59: 687–697.

21-Poole,E.M., Richardson,M.E. and 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. and 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. and Polan,M.L. (2006) The Role of Gonadotropin-Releasing Hormone in Murine Preimplantation Embryonic Development, Theriogenology 58: 132-151.

24-Rota,A., Penzo,N. and Vincenti,L. (2000a) 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.

28-V.Makarevich,A., Kubovičová,E., Hegedušová, Z., Pivko,J., Louda,F.(2012) Post-thaw culture in presence of insulin-like growth factor I improves the quality of cattle cryopreserved embryos, Zygote 20:97-102.

Gonadotropin-Releasing Hormone efficacy on different developmental stages of embryo in bovine

Rahim Tayefeh A.[1] , Heidari F.[2], Gharagozlo F.[3] , Mirshokraei P.[4] , Farrokhi N.[5] , Nayeri Fasaei B.[6] and Khezri J.[2]

[1] National Center of Transgenic Mice, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology(NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

[2] Animal Biotechnology Dept., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology(NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

[3] Clinical Sciences Dept., Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

[4] Clinical Sciences Dept., School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

[5] Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, I.R. of Iran

[6] Microbiology Dept., Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

In vitro embryo production(IVEP) has been used for both research and production purposes in cattle. Through analysis of IVEP, detailed mechanisms involved in natural embryo production can be revealed and further the embryo transfer techniques and transgenesis can be facilitated. Although Gonadotropin-Releasing Hormone effects in regulating and controlling the animal reproduction in clinical studies have been well-documented, studies considering the effects of topical process, folliculogenesis, oocyte maturation, fertilization and embryo development are almost lacking. In this study, The effects of different concentrations of Gonadotropin-Releasing Hormone on the process of fertilization and embryo development was evaluated.Collected oocytes (1091 cells) placed in in vitro fertilization media and in vitro culture media, supplemented by 0.8, 1 and 1.5 μg/ml of GnRH. Based on microscopic analysis, The cleavage rate and blastocyst rate increased in the in vitro fertilization media and in vitro culture media containing of Gonadotropin-Releasing Hormone but this increased was not statistically. Moreover, by incorporating of GnRH to in vitro culture media, the number of trophectoderm and total cells were increased ($p<0.05$) .

Keywords : GnRH, IVF, IVC, Cleavage rate, Blastocyst rate.