نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۳۹۸؛ ۱۳(۲): ۱۳-۲۲.

مقایسه تأثیر دو برنامه متفاوت تزریق هورمون FSH بر تعداد و قابلیت تکوینی تخمک استحصال شده با رهیافت ترانس‌واژینال در گونه گاو

نیما صادقی بروجن[۱،۲]، ابوالفضل شیرازی[۳،۴،۵*]، ناصر شمس اسفندآبادی[۶]، محمد حسین نصر اصفهانی[۷]، جمشید جلیل‌نژاد حلاجیان[۸]، مهدی صفاهانی لنگرودی[۲]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی فناوری تولیدمثل در دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. دامپزشک، شرکت کشت و دامداری فکا، اصفهان- ایران.
۳. استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشکده فناوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران- ایران.
۴. پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۵. استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۶. دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۷. استاد، گروه بیوتکنولوژی تولیدمثل، مرکز تحقیقاتی بیوپزشکی تولیدمثل موسسه رویان اصفهان، اصفهان- ایران.
۸. مهندس علوم دامی، شرکت کشت و دامداری فکا، اصفهان- ایران.

دریافت: ۲۵ آبان‌ماه ۹۷ **پذیرش:** ۷ بهمن‌ماه ۹۷

چکیده

توانایی تکوین یک تخمک تا حد زیادی وابسته به فاز رشد فولیکول دربرگیرنده آن است. در این مطالعه تأثیر ۲ برنامه تحریک هورمونی پیش از استحصال تخمک از طریق واژن، بر توان تکوین تخمک بررسی شد. در این پژوهش تعداد ۱۲۰ راس تلیسه هلشتاین با میانگین سنی ۱۱ ماه، در ۲ گروه ۶۰ تایی تحت ۲ پروتکل تیمار هورمونی قرار گرفتند. برنامه اول به صورت ۲ تزریق هورمون محرک فولیکولی (FSH) در یک روز به فاصله ۱۲ ساعت در مجموع ۱۰۰ میلی گرم و برنامه دوم به صورت ۶ تزریق FSH در ۳ روز متوالی به فواصل ۱۲ ساعت در مجموع ۳۰۰ میلی گرم بود. تخمک‌های استحصال شده پس از ارزیابی مورفولوژی، تحت فرآیند بلوغ، لقاح و کشت در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند و میزان تسهیم و تولید بلاستوسیست ارزیابی شد. تعداد تخمک استحصال شده به ازای هر راس دام در گروه ۲ تزریق و ۶ تزریق FSH به ترتیب ۳/۹۳±۰/۲۵ و ۷/۲۷±۰/۶۱ بود که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۰۱) درصد تخمک‌های درجه A در دوگروه ۲ (۶۶/۹۷±۳/۵۷) و ۶ (۷۳/۴۸±۳/۰۱) تزریق FSH با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵). میزان تسهیم پس از لقاح در گروه ۲ تزریق (۶۵/۷±۳/۶۵) و ۶ تزریق (۷۴/۲۷±۳/۵۸) FSH از لحاظ آماری با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند (P>۰/۰۵). میزان تولید بلاستوسیست در گروه ۲ تزریق و ۶ تزریق FSH به ترتیب ۳۸/۰۲±۳/۱۸ و ۵۰/۳۲±۳/۵۷ بود که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند (P=۰/۰۱۱). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تزریق طولانی مدت هورمون FSH (به مدت سه روز) موجب رشد بیش‌تر فولیکول و در نتیجه کسب کفایت بیشتر تخمک و ظرفیت پذیر شدن آن برای تکوین می‌گردد و همین امر موجب گردید که میزان تولید بلاستوسیست در گروهی که با ۶ تزریق هورمون FSH تیمار شده بود در مقایسه با گروه ۲ تزریق افزایش معنی‌داری داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: تخمک، بلاستوسیست، اووم پیک آپ، هورمون درمانی، لقاح آزمایشگاهی.

مقدمه

در میان فنآوری‌های زیستی تولیدمثلی، تولید جنین در شرایط آزمایشگاه به عنوان یکی از مهم‌ترین راه‌کارهای نوین به منظور تسریع در بهبود پتانسیل ژنتیک جمعیت دامی محسوب می‌گردد. کیفیت تخمک یکی از فاکتورهای مهم در میزان باروری در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی است. با توجه به محدودیت در تعداد تخمک‌های استحصالی از گاوهای با توان ژنتیکی بالا، انجام مطالعات

www.SID.ir

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: a.shirazi@avicenna.ac.ir

گسترده به منظور افزایش بازده تولید جنین در شرایط آزمایشگاهی در گاوهای دهنده تخمک ضروری است. نتایج پژوهش‌های پیشین نشان دهنده آن است که بلوغ در شرایط آزمایشگاهی یکی از فاکتورهای محدود کننده در روند آزمایشگاهی تولید جنین است. به گونه‌ای که پس از انتخاب دقیق یک جمعیت یک‌نواخت از تخمک‌های حاصل از تخمدان‌های کشتارگاهی، تنها ۳۵٪ از این جمعیت بلوغ کامل سیتوپلاسمی را به‌دست آورده و دارای کفایت لازم برای تولید یک بلاستوسیست باکیفیت است (۲۲)، این در حالی است که اگر تخمک‌ها در شرایط درون تنی بالغ گردند و سپس در شرایط آزمایشگاهی لقاح و تکوین یابند، پتانسیل تکوین تخمک‌ها افزایش دو برابری خواهد داشت (۲۱).

در روند فولیکوژنز و رشد تخمک زمانی که قطر فولیکول در بر گیرنده آن به حدود ۳ میلی‌متر می‌رسد، رشد تخمک کامل می‌شود. هرچند تخمک‌ها در این مرحله توان بالغ شدن در شرایط آزمایشگاهی و در پی آن توانایی لقاح و تشکیل بلاستوسیست را دارا هستند، اما در شرایط درون تنی در خلال رشد فولیکول غالب تا مرحله تخمک‌گذاری، تخمک توان تکاملی خود را به‌دست می‌آورد (۲). در این مرحله از رشد، فولیکول و تخمک درون آن مراحل ظرفیت پذیر شدن و یا پیش بلوغ را طی می‌کنند و این وضعیت پویا تا اندکی قبل از سرج LH ادامه دارد (۲۲).

توانایی تکوین تخمک برای رسیدن به مرحله بلاستوسیست با مرحله رشد فولیکول در ارتباط است. بدین منظور استفاده از پروتکل‌هایی برای هم‌زمان سازی موج‌های رشد فولیکولی و تحریک رشد و افزایش قطر آن‌ها توسط داروهای گنادوتروپینی قبل از استحصال تخمک از طریق واژن (Ovum pick up: OPU) به عنوان راه‌کاری برای بهبود کارآیی تکنیک تولید جنین در شرایط آزمایشگاهی است (۱، ۵، ۷ و ۹).

میزان پاسخ به تحریک‌های هورمونی به نوع هورمون استفاده شده، میزان هورمون و مدت زمان انجام تیمار هورمونی وابسته است (۹، ۱۰ و ۲۲). از دلایل دیگر تفاوت در میزان پاسخ به تحریک‌های هورمونی می‌توان به طبیعت حیوان و شرایط محیطی همانند تغذیه،وضعیت تولید مثلی، فصل، سن، نژاد و وضعیت تخمدان در زمان تیمار اشاره کرد (۱۹).

پروتکل‌های تحریک هورمونی شامل استفاده از هورمون‌های برونزاد همچون FSH (۴)، GNRH (۲۶) و ECG (۶)، به منظور حمایت از رشد فولیکول‌های کوچک است (۲، ۴ و ۷). در مطالعات قبلی استفاده از رژیم‌های حاوی FSH نسبت به سایر هورمون‌ها نتایج مطلوب‌تری را در پی داشته است. در این مطالعات .تزریق FSH بین ۴ تا ۱۴ تزریق با فواصل ۱۲ تا ۲۴ ساعت و نیز بازه‌های زمانی مختلف پرهیز از مصرف هورمون (Coasting Period) بررسی شده است (۴، ۵، ۹ و ۱۰). در مطالعات مختلف به منظور حذف اثر سرکوبگر فولیکول غالب بر فولیکول‌های تابع از روش‌هایی همچون تخلیه مکانیکی فولیکول غالب Dominant Follicle Retrieval (DFR) (۳)، تزریق گنادورلین و تجویز هم‌زمان استرایول و پروژسترون (۱۶) استفاده شده است.

میزان بالای تنوع در پروتکل‌های تحریک تخمدانی و همچنین غیرقابل پیش‌بینی بودن پاسخ دام‌ها به تحریکات تخمدانی از جمله فاکتورهای محدود کننده در استفاده از رژیم‌های هورمونی تحریک تخمدان در دام‌های دهنده تخمک است، با وجود این نشان داده شده است که اِعمال پروتکل‌های تحریک هورمونی، در زمان شروع موج جدید فولیکولی منجر به افزایش پاسخ به تحریک تخمدانی می‌گردد (۲۲)؛ لذا در این مطالعه برآن شدیم تا به بررسی اثر ۲ نوع پروتکل تحریک هورمونی شامل ۲ و ۶ تزریق FSH هم‌زمان با شروع موج جدید فولیکولی در گاو هلشتاین روی کفایت تکوین تخمک‌های استحصال شده از طریق واژینال به دنبال لقاح در شرایط آزمایشگاه بپردازیم.

www.SID.ir
نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران

مواد و روش کار

تمامی مواد و محیط‌های استفاده شده در این مطالعه به ترتیب از شرکت سیگما (St. Louis, MO, USA) و گیبکو (Grand Island, NY, USA) تهیه شده است. در صورت استفاده از سایر شرکت‌ها به صورت موردی ذکر شده است.

تعداد ۱۲۰ راس تلیسه بالغ هلشتاین در دو گروه تیمار ۲ و ۶ تزریق FSH (هر گروه ۶۰ راس تلیسه) با میانگین سن ۱۱ ماه (۱۲-۱۰ ماه) در بازه زمانی ۶ ماهه نخست سال ۹۶ تحت تیمارهای تحریک هورمونی قرار گرفتند و از هر راس یک مرتبه از روش ترانس واژینال عمل استحصال تخمک انجام شد. جیره غذایی براساس برآورده کردن احتیاجات نگه‌داری با ۷۴٪ علوفه و ۲۶٪ کنسانتره تنظیم شد.

گروه تیماری دو تزریق FSH : در این گروه تعداد ۶۰ راس تلیسه در ابتدا با ۲ تزریق پروستاگلاندین به فاصله ۱۴ روز به میزان ۲ میلی‌لیتر (هر تزریق ۵۰۰ میکروگرم کلوپرستونول) هم‌زمان‌سازی شدند. پس از تزریق دوم، فحل یابی انجام و روز ایستافحلی به عنوان روز شروع پروتکل در نظر گرفته شد. در روز ششم سیکل استروس با سوزن متصل به پمپ خلاء و پایش اولتراسوند از طریق واژن اقدام به برداشت فولیکول غالب (تا ۳ عدد از بزرگ‌ترین فولیکول‌ها) شد؛ سپس در روز ۸ سیکل فحلی (۲ روز پس از برداشت فولیکول بالغ) دو تزریق FSH (فالتروپین) به فاصله ۱۲ ساعت (در مجموع به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم) انجام شد. ۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق FSH، از طریق ترانس واژینال اقدام به استحصال تخمک گردید.

گروه تیماری شش تزریق FSH: دراین گروه تیماری از ۶ تزریق FSH با میزان ثابت (فالتروپین در مجموع ۳۰۰ میلی‌گرم به صورت عضلانی) استفاده شد. در این گروه تعداد ۶۰ راس تلیسه همانند گروه قبل هم‌زمان سازی شده و مشابه روش قبل متعاقب برداشت فولیکول غالب، تزریق هورمون آغاز و به مدت ۳ روز (هر روز ۲ تزریق به فاصله ۱۲ ساعت) ادامه یافت. ۲ روز پس از آخرین تزریق هورمون FSH (روز ۱۲ سیکل استروس) با روش ترانس واژینال اقدام به استحصال تخمک گردید.

تخمک‌ها از فولیکول‌های بزرگ‌تر از ۵ میلی‌متر با روش اولتراسونوگرافی ترانس واژینال استحصال شدند. در این مطالعه از دستگاه اولتراسوندExago و پروب واژینال کانوکس ۷/۵ مگاهرتز استفاده شد. پس از مقید کردن دام قبل از استحصال تخمک بی‌حسی اپیدورال خلفی (۳ سی‌سی لیدوکائین) اعمال شد. محیط واژن قبل از OPU با نرمال سالین شست و شو گردید.تخمک‌های استحصال شده در یک لوله مخروطی ۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط H-TCM غنی شده با ۰/۰۳ درصد BSA، ۰/۲ میلی‌مولار سدیم پیروات، ۱۰۰۰ IU هپارین و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسین جمع آوری می‌شدند. میزان خلأ اعمال شده با پمپ ۸۰ میلی‌متر جیوه معادل ۲۰ سی سی مایعات اسپیره شده در دقیقه بود. متعاقب OPU محتویات لوله جمع آوری تخمک پس از جداسازی تخمک‌ها و شست و شو در محیط H-TCM در زیر استریومیکروسکوپ بر اساس دو فاکتور تعداد لایه‌های سلول‌های کومولوس و یک‌نواختی سیتوپلاسم ارزیابی شدند. مجموعه تخمک و سلول‌های کومولوس (Cumulus oocyte complex: COC) بر اساس تعداد لایه‌های کومولوس و وضعیت سیتوپلاسم درجه بندی (A، B وC) گردید. تقسیم COCs شامل گروه‌های زیر است: A: تخمک‌های با بیش از ۴ لایه از سلول‌های کومولوس و وضعیت سیتوپلاسم یک‌نواخت، گروه B: .تخمک‌های با ۱ تا ۴ لایه سلول‌های کومولوس و سیتوپلاسم گرانوله و تقریبا یک‌نواخت و گروه C: .تخمک‌های فاقد لایه کامل سلول‌های کومولوس و سیتوپلاسم غیریک‌نواخت بود (۱۴)؛ سپس تخمک‌ها در محیط H-TCM حاوی ۱۰٪ FBS، ۳ مرتبه شست و شو داده شده و سپس در محیط بلوغ و شرایط انکوباسیون CO2 ۵ درصد و رطوبت

www.SID.ir
نشریه علوم دامگاهی ایران

حداکثر به مدت ۲۲ ساعت کشت داده شدند. محیط بلوغ شامل TCM 199 همراه با ۱۰٪ FBS، ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر هورمون FSH، ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر هورمون LH، ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر هورمون استرادیول، ۰/۲ میلی مولار سدیم پیروات و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسین بود.

در این مطالعه از نی‌های مایع منی منجمد یک گاو هلشتاین با باروری بالا -که به صورت تجاری موجود بود- استفاده شد. پس از ذوب مایع منی در آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اسپرم‌های متحرک با روش swim-down جدا سازی شدند. بدین منظور از محیط تجاری Pure sperm با دو رقت ۴۰ و ۸۰ درصد به شکل دو ستون یک میلی لیتری استفاده شد. پس از ذوب، منی روی ستون‌ها تخلیه گردیده و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۸۰۰ rpm سانتریفیوژ شد، سپس اسپرم‌های جداسازی شده با غلظت نهایی ۱×۱۰^{۶} در میلی‌لیتر به قطره‌های لقاح افزوده شدند. برای انجام لقاح آزمایشگاهی حداکثر تا ۱۰ عدد از COCهای بالغ به قطره‌های ۵۰ میکرولیتری محیط لقاح (محیط TALP) پوشیده شده با روغن مینرال منتقل شدند. مجموعه اسپرم و تخمک‌ها برای مدت ۲۰ ساعت در شرایط ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 و رطوبت ماکزیمم انکوبه شدند. پس از گذشت ۲۰ ساعت از لقاح، زیگوت‌های احتمالی از توده سلول‌های کومولوس و اسپرم‌های چسبیده شده، برهنه شدند و پس از شست و شو، تخمک‌های دژنره شده یا در حال دژنراسیون حذف و سپس زیگوت‌های احتمالی در قطره ۲۰ میکرولیتری محیط کشت SOF (حداکثر ۶ عدد زیگوت در هر قطره) پوشیده شده با روغن مینرال در شرایط رطوبت ماکزیمم، دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 و ۵ درصد O_2 کشت داده شدند. محیط پایه SOF مطابق با محیط طراحی شده ترویت و همکاران (۱۹۷۲) تهیه شد (۲۵).

تمامی زیگوت‌های احتمالی برای سه روز در محیط SOF فاقد سرم و سپس به مدت ۴ روز در محیط SOF حاوی سرم در شرایط رطوبت ماکزیمم، دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 و ۵ درصد O_2 کشت داده شدند. پیشرفت جنین‌ها به‌صورت میزان تسهیم در روز سوم و بلاستوسیست در روز هفتم، ثبت شد.

در تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ و آزمون Independent Samples T Test با لحاظ کردن $P<۰/۰۵$ به عنوان اختلاف معنی‌دار استفاده شد.

نتایج

همان‌گونه که در جدول ۱ نشان داده شده است تعداد فولیکول‌های آسپیره شده با اندازه مساوی یا بزرگ‌تر از ۵ میلی‌متر در ۲ گروه تیماری ۲ و ۶ تزریق FSH به ترتیب ۳۶۴ و ۸۹۴ بود. میانگین تعداد فولیکول‌های آسپیره شده به ازای هر راس دام دهنده در گروه ۶ تزریق FSH به طور معنی‌داری از گروه ۲ تزریق FSH بالاتر بود (P=۰/۰۰۰۱). میانگین تعداد تخمک استحصال شده به ازای هر راس دام دهنده نیز در گروه ۶ تزریق FSH به صورت معنی‌دار بالاتر از گروه ۲ تزریق بود (P=۰۰۰۱)؛ لیکن بازده استحصال تخمک نسبت به تعداد فولیکول‌های آسپیره شده در گروه ۲ تزریق FSH به صوزت معنی‌داری از گروه ۶ تزریق بالاتر بود (P<۰/۰۰۱).

همان‌گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود درصد تخمک‌های با درجه A در گروه ۶ تزریق FSH از گروه ۲ تزریق FSH بالاتر و درصد تخمک‌های درجه C در گروه ۶ تزریق FSHاز گروه ۲ تزریق FSH پایین‌تر بود، هر چند این اختلافات معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

به منظور ارزیابی قابلیت تکوین تخمک‌های استحصال شده، تخمک‌ها پس از بلوغ آزمایشگاهی وارد فرآیند لقاح آزمیشگاهی شدند و سپس به مدت ۷ روز مراحل تکوین خود در محیط آزمایشگاه را طی کردند. همان‌گونه که در

www.SID.ir
نشریه علوم دامگاهی دامپزشکی ایران

جدول ۳ مشاهده می‌شود میزان تسهیم در دو گروه ۲ و ۶ تزریق FSH با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵)؛ لیکن درصد تولید بلاستوسیست در روز ۷ تکوین جنینی در گروه ۶ تزریق FSH به طور معنی‌داری از گروه ۲ تزریق FSH بالاتر بود (P=۰/۰۱۱).

جدول ۱- میانگین±انحراف معیار تعداد فولیکول‌های (≤۵ میلی‌متری) آسپیره شده و تخمک‌های استحصالی به دنبال تزریق FSH

گروه	تعداد تلیسه	تعداد فولیکول آسپیره شده	تعداد فولیکول آسپیره شده به ازای هر تلیسه	تعداد تخمک استحصال شده	تعداد تخمک استحصال شده به ازای هر تلیسه	میزان استحصال تخمک به فولیکول (درصد)
۲ تزریق FSH	۶۰	۳۶۴	۶/۰۷±۰/۳۴ [a]	۲۳۶	۳/۹±۰/۲۵ [a]	۶۵/۹±۲/۴۳ [a]
۶ تزریق FSH	۶۰	۸۹۴	۱۴/۹±۰/۸۹ [b]	۴۳۶	۷/۳±۰/۶۱ [b]	۴۹/۲±۳/۱۴ [b]

a,b در هر ستون اعداد با حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

جدول ۲- میانگین±انحراف معیار مورفولوژی تخمک‌های استحصال شده در دو تیمار اعمال شده

تیمار	تعداد تخمک	تعداد تخمک درجه A (٪)	تعداد تخمک درجه B (٪)	تعداد تخمک درجه C (٪)
۲ تزریق FSH	۲۳۶	۱۶۹ (۶۷/۰±۳/۵۷)	۵۲ (۲۲/۷±۲/۶۷)	۱۵ (۹/۰۴±۲/۹۱)
۶ تزریق FSH	۴۳۶	۳۲۰ (۷۳/۵±۳/۰۱)	۹۰ (۲۰/۶±۲/۷۵)	۲۶ (۴/۴±۰/۸۷)

جدول ۳- میانگین±انحراف معیار میزان تسهیم و بلاستوسیست تخمک‌های استحصال شده با دو روش تیمار هورمونی

تیمار	تعداد تخمک	تعداد جنین تسهیم شده (٪)	تعداد بلاستوسیست (٪)
۲ تزریق FSH	۲۳۶	۱۶۸ (۶۵/۷±۳/۶۵)	۱۰۲ (۳۸/۰±۳/۱۸) [a]
۶ تزریق FSH	۴۳۶	۳۴۳ (۷۴/۳±۳/۵۸)	۲۳۹ (۵۰/۳±۳/۵۷) [b]

a,b در هر ستون اعداد با حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

بحث

دراین مطالعه مقایسه تعداد دفعات تجویز هورمون FSH، ۲ و ۶ تزریق، بر توان تکوین تخمک پس از لقاح آزمایشگاهی مشخص کرد که تخمک‌های به دست آمده در گروه ۶ تزریق، پس از بلوغ در شرایط آزمایشگاهی، از توانایی تکوین بالاتر در مقایسه با تخمک‌های به‌دست آمده از تجویز ۲ تزریق هورمون FSH بهره‌مند است؛ از سویی دیگر نشان داده شد که تزریق ۶ نوبت هورمون FSH در مقابل ۲ نوبت تزریق، تعداد فولیکول‌های مساوی یا بزرگ‌تر از ۵ میلی‌متر را افزایش می‌دهد (تعداد فولیکول‌های آسپیره شده، جدول ۱). علاوه بر این تزریق ۶ نوبت هورمون FSH منجر به افزایش تعداد تخمک استحصال شده و میزان استحصال تخمک به فولیکول در مقایسه با ۲ تزریق هورمون FSH گردید، هر چند که تعداد دفعات تزریق هورمون FSH، ۶ تزریق در مقایسه با ۲ تزریق، تأثیری بر درجه‌بندی تخمک‌های استحصال شده از لحاظ مورفولوژی نداشت (جدول ۲)؛ لیکن تزریق ۶ نوبت هورمون FSH در مقایسه با ۲ نوبت تأثیر معنی‌داری بر درصد بلاستوسیست‌های به‌دست آمده داشته است (جدول ۳).

کفایت تخمک به منظور حمایت از تکوین جنین توسط سلول‌های سوماتیک احاطه کننده تخمک تنظیم می‌گردد. این سلول‌های سوماتیک در اصل توسط گنادوتروپین‌ها در طی فولیکوژنز تنظیم می‌گردند. در مطالعات نشان داده شده که تزریق FSH اگزوژن قبل از OPU کفایت تکوین تخمک گاوی را بهبود می‌بخشد (۲۴)، علاوه بر این مطالعات انجام شده در موش و انسان نشان داده که استفاده از هورمون ECG و یا FSH قبل از

www.SID.ir
نشریه علوم و فناوری زیستی ایران

استحصال تخمک موجب بهبود کفایت تکوین تخمک در طی مراحل قبل از لانه‌گزینی و نیز رسیدن به مراحل پایانی آبستنی می‌شود (۱۷ و ۱۹).

تغیرات در تکوین فولیکول و عمل‌کرد آن به واسطه تأثیر بر سلول‌های کومولوس منجر به تأثیر بر کیفیت و توان تکاملی تخمک می‌گردد (۲۳). در مطالعات انجام شده نشان داده شده است که استفاده از هورمون FSH به شدت موجب تنظیم بیان ژن در سلول‌های کومولوس می‌گردد. در میان این ژن‌ها دو دسته از ژن‌ها شامل ژن‌های دخیل در ارتباطات سلولی و ژن‌های دخیل در پاسخ‌های ضد التهابی بیش از سایر ژن‌ها تحت تأثیر قرار می‌گیرند. این‌گونه به نظرمی‌رسد که این دسته از ژن‌ها در کسب کفایت تکوین تخمک تأثیرگذار باشند (۲۳).

در طی امواج رشد فولیکولی و در فاز غالبیت، فولیکول غالب توانایی تکوین سایر فولیکول‌ها را به واسطه ترشح فاکتورهای مهاری سرکوب می‌کند (۴، ۹ و ۲۲). در مطالعه حاضر اسپیراسیون فولیکول غالب، در روز ۶ بعد از فحلی منجر به حذف اثر مهاری فولیکول غالب بر فولیکول‌های تابع و همچنین موجب آغاز موج فولیکولی جدید می‌گردد. لذا انتظار می‌رود که تخمک‌های استحصالی در روز ۱۰ بعد از فحلی، ۴ روز پس از برداشت فولیکول غالب، بیشتر در فاز رشد بوده علاوه بر این که اثر مهاری فولیکول غالب بر آن‌ها نیز برداشته شده است.

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که تیمارهای هورمونی از طریق تأثیر بر رشد فولیکول روی پتانسیل تکوینی تخمک تأثیر گذاشته و موجب افزایش کفایت تکوین تخمک در طی رشد فولیکول می‌گردد (۱، ۵ و ۲۲). مطالعات انجام شده از سوی پژوهشگران مختلف نیز نشان دهنده افزایش میزان بلاستوسیست به دنبال تحریک تخمدان توسط FSH است. در پژوهشی ۸ تزریق FSH در مقایسه با ۴ تزریق با فواصل ۱۲ ساعت میزان بلاستوسیست بیشتر را به دنبال داشت (۷). علاوه بر ذخیره مولکولی، ارگانل‌ها و توزیع قطرات چربی تخمک‌های استحصال شده از فولیکول‌های تحریک شده توسط گنادوتروپین الگویی شبیه به تخمک‌های بالغ شده در شرایط درون‌تنی را دارند.

آخرین مرحله بلوغ تخمک و تخمک‌گذاری به وسیله پپتیدهای شبه EGF تنظیم می‌گردد که خود با افزایش گنادوتروپین‌ها تحریک می‌گردد. پیام‌رسان EGFR در فولیکول‌های تخمدانی تنظیم می‌گردد و کسب توانایی سیگنالینگ سلول‌های سوماتیک نقطه عطف تکوینی مهم برای تخمک‌هاست(۲۰). در مطالعات انجام شده در گونه گاو اگرچه تخمک‌های به‌دست آمده از فولیکول‌های آنترال کوچک به پپتیدهای شبه EGF پاسخ می‌دادند، اما میزان پاسخ‌گویی در تخمک‌های به‌دست آمده از فولیکول‌های آنترال بزرگ به دنبال استفاده از هورمون FSH بیشتر بود علی‌رغم آن که میزان بیان EGFR بین دو گروه کنترل و FSH تفاوتی نداشت (۲۳).

در پژوهشی ۱۴ تزریق با ۸ تزریق FSH با فواصل ۱۲ ساعت مقایسه شد . بلاستوسیست‌های حاصل از دام تیمار شده با ۱۴ تزریق قابلیت انجمادپذیری بیشتر را نشان دادند (۷). از سویی مشخص شده است که به منظور افزایش کفایت تکوینی در تخمک می‌توان فرآیندی از تمایز فولیکولی یا فرآیند غالبیت فولیکولی و یا مراحل اولیه آترزی را القا کرد (۵). افزایش جزیی در زمان فاز رشد فولیکولی و القای آترزی در فولیکول‌ها، نه تنها منجر به کاهش پتانسیل تکوینی در تخمک‌های جمع آوری شده نگردیده، بلکه کاهش سرعت رشد فولیکولی پس از یک دوره هورمون درمانی در طی Coasting period، فاصله زمانی درنظر گرفته شده بین اتمام هورمون‌تراپی تا زمان انجام OPU، موجب افزایش کفایت تکوینی تخمک و میزان تولید جنین به ازای هر تخمک در شرایط آزمایشگاهی می‌گردد (۱۱، ۲۱ و ۲۲).

در مطالعات قبلی دوره ۳۳ و ۴۸ ساعت پرهیز از مصرف هورمون FSH قبل از OPU مقایسه شد و به ترتیب میزان بلاستوسیست ۲۰٪ و ۴۳٪ گزارش شد (۷).

www.SID.ir
نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران

در همین راستا و به منظور ایجاد توان حداکثری تکوین در تخمک‌های استحصال شده، بهتر است میزان هورمون FSH قبل از استحصال تخمک مشابه با شرایط درون‌تنی، کاهش یابد.

در مطالعه حاضر با توجه به در نظر گرفتن یک دوره ۴۸ ساعته پرهیز از مصرف هورمون قبل از انجام OPU، در هر دو تیمار ۲ تزریق و ۶ تزریق انجام گرفت؛ لیکن تحریک ۳ روزه تخمدان با ۶ تزریق گنادوتروپین فرصت بیشتری را در اختیار فولیکول برای رشد و تکوین در قیاس با تیمار ۲ تزریق، قرار می‌دهد (جدول ۳)؛ لذا تخمک‌های استحصالی در تیمار ۲ تزریق در مقایسه با ۳ روز تحریک هورمونی، ۶ تزریق، توان تکوینی کمتری دارند.

به دنبال تجویز ۶ تزریق هورمون FSH (به مدت ۳ روز متوالی) فولیکول‌ها در مقایسه با ۲ تزریق هورمون (به مدت ۱ روز) فاز رشد بیشتری را طی کرده و به دنبال آن تخمک‌های استحصال شده از فولیکول‌های رشد یافته‌تر، وارد مراحل ظرفیت پذیری تخمک شده و توان تکوینی بیشتری را کسب می‌کنند؛ نتیجه این امر منجر به افزایش میزان تولید بلاستوسیست از این تخمک‌ها می‌گردد. در همین راستا مطالعات انجام شده حاکی از کفایت تکوینی بیشتر تخمک‌های به دست آمده از فولیکول‌های بزرگ‌تر در مقایسه با تخمک‌های به‌دست آمده از فولیکول‌های کوچک‌ترند (۵، ۱۴، ۱۵ و ۲۲).

منابع

1- Angulo, L; Guyader-Joly, C; Auclair, S; Hennequet-Antier, C; Papillier, P; Boussaha, M; Fritz, S; Hugot, K; Moreews, F; Ponsart, C. and Humblot, P.; An integrated approach to bovine oocyte quality: from phenotype to genes. Reprod Fertil Dev.; 2016; 28(9): 1276-1287.

2- Baruselli, P. S; Sa Filho, M. F; Ferreira, R. M; Sales, J. N. D. S; Gimenes, L. U; Vieira, L. M; Mendanha, M. F. and Bó, G. A.; Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. Reprod Domest Anim.; 2012; 47: 134-141.

3- Bergfelt, D. R; Lightfoot, K. C. and Adams, G. P.; Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. Theriogenology; 1994; 42(6): 895-907.

4- Blondin, P; Bousquet, D; Twagiramungu, H; Barnes, F. and Sirard, M. A.; Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. Biol Reprod.; 2002; 66(1): 38-43.

5- Blondin, P; Vigneault, C; Nivet, A. L. and Sirard, M. A.; Improving oocyte quality in cows and heifers-What have we learned so far. Anim Reprod; 2012; 9(3): 281-289.

6- Bordignon, V; Morin, N; Durocher, J; Bousquet, D. and Smith, L. C.; GnRH improves the recovery rate and the *in vitro* developmental competence of oocytes obtained by transvaginal

www.SID.ir

71(5): 836-848.

12- Gardner, D.K.; Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. Theriogenology; 1998; 49(1): 83-102.

13- Gordon, I. and Lu, K.H.; Production of embryos *in vitro* and its-impact on livestock production. Theriogenology; 1992; 33(1): 77-87.

14- Hendriksen, P.J.M; Vos, P.L.A.M; Steenweg, W.N.M; Bevers, M.M. and Dieleman, S.J.; Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. Theriogenology; 2000; 53(1): 11-20.

15- Humblot, P; Holm, P; Lonergan, P; Wrenzycki, C; Lequarré, A.S; Joly, C.G; Herrmann, D; Lopes, A; Rizos, D; Niemann, H. and Callesen, H.; Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. Theriogenology; 2005; 63(4): 1149-1166.

16- Ko, J.C.H; Kastelic, J.P; Del Campo, M.R. and Ginther, O.J.; Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. J Reprod Fertil.; 1991; 91(2): 511-519.

17- Mikkelsen, A.L. and Lindenberg, S.; follicular aspiration from superstimulated heifers; Theriogenology; 1997; 48(2): 291-298.

7- Dadarwal, D; Honparkhe, M; Dias, F. C. F; Alce, T; Lessard, C. and Singh, J.; Effect of superstimulation protocols on nuclear maturation and distribution of lipid droplets in bovine oocytes. Reprod Fertil Dev.; 2015; 27(8): 1137-1146.

8- De Loos, F; Van Beneden, T; Kruip, T. A. M. and Van Maurik, P.; Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. Mol Reprod Dev.; 1992; 31(3): 208-214.

9- Durocher, J; Morin, N. and Blondin, P.; Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. Theriogenology; 2006; 65(1): 102-115.

10- Eppig, J. J; Wigglesworth, K. and Pendola, F. L.; The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. Proceedings of the National Academy of Sciences; 2002; 99(5): 2890-2894.

11- Ferreira, E.M; Vireque, A.A; Adona, P.R; Meirelles, F.V; Ferriani, R.A. and Navarro, P.A.A.S.; Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. Theriogenology; 2009;

www.SID.ir
نشریه علوم دامپزشکی ایران

blastocyst quality. Mol Reprod Dev.; 2002; 61(2): 234-248.

22- Sirard, M.A; Richard, F; Blondin, P. and Robert, C.; Contribution of the oocyte to embryo quality. Theriogenology; 2006; 65(1): 126-136.

23- Sugimura, S., Kobayashi, N., Okae, H., Yamanouchi, T., Matsuda, H., Kojima, T., Yajima, A., Hashiyada, Y., Kaneda, M., Sato, K. and Imai, K.; Transcriptomic signature of the follicular somatic compartment surrounding an oocyte with high developmental competence. Scientific reports; 2017; 7(1): 6815.

24- Sugimura, S., Kobayashi, S., Hashiyada, Y., Ohtake, M., Kaneda, M., Yamanouchi, T., Matsuda, H., Aikawa, Y., Watanabe, S., Nagai, T. and Kobayashi, E.; Follicular growth-stimulated cows provide favorable oocytes for producing cloned embryos. Cellular Reprogramming (Formerly" Cloning and Stem Cells"); 2012; 14(1): 29-37.

25- Tervit, H.R; Whittingham, D.G. and Rowson, L.E.A.; Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. J Reprod Fertil.; 1972; 30(3): 493-497.

26- Vos, P.L.A.M; de Loos, F.A.M; Pieterse, M.C; Bevers, M.M; Taverne, M.A.M. and Dieleman, S.J.; Evaluation of transvaginal OPU and follicular Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. Reproduction; 2001; 122(4): 587-592.

18- Nedambale, T.L; Dinnyes, A; Groen, W; Dobrinsky, J.R; Tian, X.C. and Yang, X.; Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. Theriogenology; 2004; 62(3-4): 437-449.

19- Pan, H., O'Brien, M.J., Wigglesworth, K., Eppig, J.J. and Schultz, R.M.; Transcript profiling during mouse oocyte development and the effect of gonadotropin priming and development in vitro. Developmental biology; 2005; 286(2): 493-506.

20- Ritter, L.J., Sugimura, S. and Gilchrist, R.B.; Oocyte induction of EGF responsiveness in somatic cells is associated with the acquisition of porcine oocyte developmental competence. Endocrinology; 2015; 156(6): 2299-2312.

21- Rizos, D; Ward, F; Duffy, P; Boland, M.P. and Lonergan, P.; Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus in vivo: implications for blastocyst yield and

www.SID.ir

fluids at consecutive times relative to preovulatory LH surge in eCG/PG treated cows. Theriogenology; 2001; 55: 433.

www.SID.ir

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2019; 13(2): 13-22.

Comparison of two different times period of FSH therapy on oocyte recovery rate and their developmental competence collected through transvaginal aspiration in bovine species

Sadeghi Boroujen, N. [1, 2]; Shirazi, A. [3, 4, 5*]; Shams-Esfandabadi, N. [6]; Nasr-Esfahani, M.H. [7]; Jalilnezhad Hallajian. J. [8]; Safahani-Langroudi, M.[2]

1. PhD Student of Biotechnology of Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.
2. Doctor of Veterinary medicine, FKA Agriculture and Animal Husbandry, Isfahan- Iran.
3. Professor, Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran- Iran.
4. Professor, Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.
5. Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.
6. Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.
7. Professor, Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan- Iran.
8. Animal Science Engineering, FKA Agriculture and Animal Husbandry, Isfahan- Iran.

Received: 16 November 2018 ***Accepted:*** 27 January 2019

Summary

Oocyte quality is one of the most important factors in embryo production through *in vitro* fertilization (IVF). Developmental competence of an oocyte is highly depended on the follicular microenvironment. In this study, the effect of 2 hormonal superstimulation regimes (2 doses and 6 doses of FSH) on developmental competence of oocytes, obtained by ovum pick up (OPU) procedure, was evaluated in cattle species. A total of 120 Holstein heifers with an average age of 11 months were divided into 2 groups of 60 animals. The animals in each group received either 2 or 6 equal doses of FSH (each dose= 50 mg) at 12h interval. The FSH treatment was started 2 days after dominant follicle ablation. The ablation of dominant follicle (s) was done 6 days after synchronized estrous. After OPU, 48 h after the end of FSH therapy, the aspirated oocytes were evaluated morphologically and considered for *in vitro* maturation, IVF, and subsequent embryo culture. In days 3 and 7, cleavage and blastocyst rates were evaluated. The mean numbers of aspirated follicles were 6.07±0.3 and 14.9±0.9, and retrieved oocytes were 3.93 ± 0.5 and 7.27 ± 0.6, in treated animal with 2 and 6 doses of FSH, respectively, which was significantly different between two groups (P=0.0001). The difference in proportion of grade A oocytes in 2 (66.97±3.57) and 6 (73.48±3.01) doses of FSH groups was insignificant (P>0.05). The rate of cleavage in animals treated with 2 and 6 doses of FSH was 65.67 ± 3.65 and 74.27 ± 5.38, respectively, which was not significant between two groups (P>0.05). Blastocyst rate in the 6 dose FSH group (50.32±3.57) was significantly higher than that of 2 dose FSH group (38.02 ± 3.18) (P=0.011). The results of this study demonstrated that 6 doses FSH in compare to 2 doses FSH prior to OPU resulted in more aspirable follicles with higher developmental competence oocytes.

Keywords: Oocyte, Blastocyst, Ovum pick up, Hormone therapy, *in vitro* fertilization.

* Corresponding Author E-mail: a.shirazi@avicenna.ac.ir

www.SID.ir