دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

اثر فاکتور رشد شبه انسولین- یک بر قابلیت تکوین رویان های گاوی تولید شده از اووسیت های تحت تنش گرمایی در محیط کشت آزمایشگاهی

م. ژندی[۱]، آ. توحیدی[۲]، ا. زارع شحنه[۳]، م. خدایی مطلق[۴]، ح. دلدار[۵] و ا. اخلاقی[۶]

۱- استادیار دانشگاه تهران (نویسنده مسوول)
۲ و ۳- دانشیار و استاد دانشگاه تهران
۴- استادیار دانشگاه اراک
۵- استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۶- استادیار دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۲۶

چکیده

هدف از انجام این پژوهش، ارزیابی اثر فاکتور رشد شبه انسولین- یک (IGF-1) در محیط کشت آزمایشگاهی بر قابلیت تکوین رویان های گاوی تولید ش«ده از اووسیت‌های تحت تنش گرمایی بود. اووسیت‌های نابالغ به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند و ۱۲ ساعت اول دوره بلوغ آزمایشگاهی را در ۳۸/۵ یا ۴۱ (گروه تنش گرمایی) درجه سانتی گراد و ۱۲ ساعت دوم را در ۳۸/۵ درجه سانتی گراد سپری کردند. بعد از بلوغ و لقاح آزمایشگاهی، زایگوت‌های احتمالی در هر گروه به طور تصادفی به دو گروه تقسیم و در حضور ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور رشد شبه انسولین- یک نوترکیب انسانی یا بدون آن کشت داده شدند. نتایج نشان داد که تسهیم تحت تأثیر IGF-1 و تنش گرمایی قرار نگرفت، در حالی‌که تشکیل بلاستوسیست به طور معنی‌داری به‌وسیله IGF-1 در حضور و یا عدم حضور تنش گرمایی افزایش یافت. همچنین، تنش گرمایی مقدار تشکیل بلاستوسیست را در مقایسه با گروه شاهد (۳۸/۵ درجه سانتی گراد و بدون IGF-1) کاهش داد. تعداد سلول‌های تروفکتودرم و توده سلول درونی و کل سلول‌ها به طور معنی‌داری به وسیله IGF-1 در حضور و یا عدم حضور تنش گرمایی افزایش یافت. همچنین، تعداد بلاستومرهای تانل مثبت نیز به طور معنی‌داری به‌وسیله IGF-1 در حضور و یا عدم حضور تنش گرمایی کاهش یافت. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که IGF-1 می‌تواند قابلیت تکوین رویان‌های گاوی تولید شده از اووسیت‌های تحت تنش گرمایی را بهبود بخشد. به نظر می‌رسد که IGF-1 قابلیت تکوین رویان گاو را از راه افزایش تعداد کل سلول و کاهش مرگ برنامه ریزی شده سلولی بهبود می‌بخشد.

واژه های کلیدی: تنش گرمایی، فاکتور رشد شبه انسولین- یک، گاو، رویان، اووسیت

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

مقدمه

تاکنون مطالعات مختلف نشان داده است که عملکرد گاوهای شیری طی ماه‌های گرم سال کاهش می یابد (۳۰). مرگ و میر رویانی یکی از عوامل مهم و تأثیر گذار بر عملکرد تولید مثلی در گاوهای شیری پر تولید است (۴۰). هنگامی که گاوها از شروع فحلی تا زمان تلقیح مصنوعی (۲۸) و یا در روز اول بعد از فحلی (۴) در معرض تنش گرمایی قرار می‌گیرند، تکوین رویانی در آنها کاهش می‌یابد. همچنین، گزارش شده است که اووسیت گاو نسبت به اثرات مخرب تنش گرمایی بسیار حساس است ولی رویان قابلیت تحمل گرمایی خود را طی تکوین به دست می‌آورد (۶ و ۲۵). در چندین مطالعه، گزارش شده است که اعمال تنش گرمایی بر اووسیت طی دوره بلوغ آزمایشگاهی آن موجب کاهش مقدار تکوین رویان گاو می‌شود (۵، ۳۱ و ۳۲). بنابراین، مبارزه با آثار مخرب تنش گرمایی در طی فصول گرم در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری، یکی از راهبردهای اصلی برای بهبود بازده تولید مثلی در گاوهای شیری در این مناطق است. استفاده از روش‌های آزمایشگاهی برای مطالعه اثر تنش گرمایی بر اووسیت و رویان، یافتن سازوکارهایی که به‌وسیله آن تنش گرمایی اثرات خود را اعمال می‌کند را ممکن می‌سازد. در این زمینه، چندین عامل وجود دارند که دارای اثرات محافظت کننده از سلول در مقابل اثرات مخرب تنش بر قابلیت تکوین رویان هستند که یکی از مهم‌ترین آنها IGF-1 است (۱۳). اثر IGF-1 بر قابلیت تکوین رویانی در بعضی از گونه‌ها از جمله خرگوش (۱۲)، موش (۱۶) و گاو (۱۳) مورد مطالعه قرار گرفته است. بر طبق بررسی‌های انجام گرفته، اثر مطالعات پیشین به شکلی انجام شده است که ایجاد تنش و استفاده از عامل محافظت کننده از سلول در شرایط آزمایشگاهی به طور همزمان بر اووسیت و یا رویان اعمال شده بودند (۱۳، ۳۱ و ۳۲). در مطالعه حاضر، این فرضیه مورد آزمون قرار گرفت که آیا حضور IGF-1 در طی دوره کشت آزمایشگاهی رویان قادر به بهبود قابلیت تکوین آزمایشگاهی رویان‌های گاوی تولید شده از اووسیت‌های تحت تنش قرار گرفته، هستند. بنابراین، هدف از انجام این مطالعه تعیین اثر IGF-1 بر قابلیت تکوین رویان‌های گاوی تولید شده از اووسیت‌های تحت تنش قرار گرفته بود.

موارد و روشها

مواد شیمیایی و محیط ها

مواد شیمیایی از کمپانی‌های Sigma (St. Louis, Mo, USA) و Gibco (Grand Island, NY, USA) خریداری شد. مواد خریداری شده از سایر شرکت‌ها در متن مقاله مورد اشاره قرار می‌گیرند.

تولید رویان برون تنی

برای تولید رویان برون تنی نیاز به اووسیت بود که از تخمدان‌های گاوهای کشتار شده استفاده شدند. تخمدان‌ها از کشتارگاه جمع‌آوری و در سرم فیزیولوژیک حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

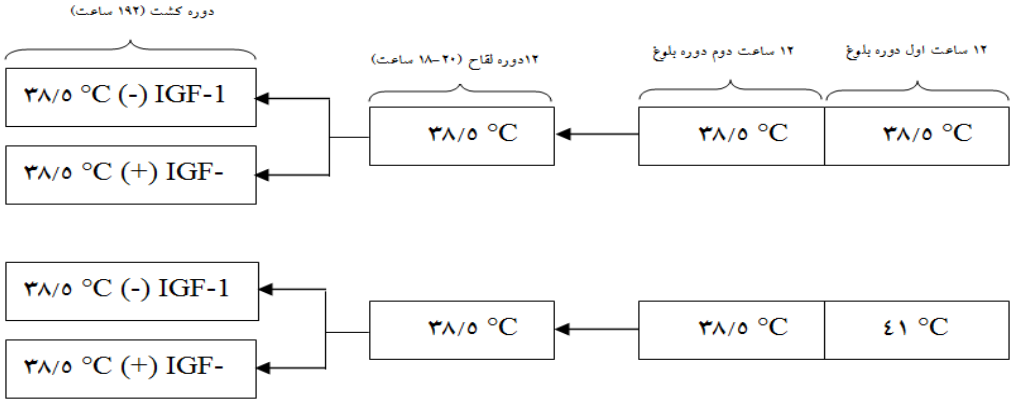
واحد بین‌المللی پنی‌سیلین جی در دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتی گراد و طی مدت ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه، توده‌های کومولوس- اووسیت ازفولیکول‌هایی با قطر ۲ تا ۸ میلی‌متر آسپیره شدند. در مرحله بعد، تنها توده‌های کومولوس- اووسیتی که دارای سیتوپلاسم یکنواخت و حداقل ۳ لایه سلول کومولوس متراکم اطراف آن بودند، انتخاب شدند. محیط آسپیره کردن شامل H-TCM غنی شده با ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA و ۵۰ واحد بین المللی در میلی‌لیتر هپارین بود. همچنین، محیط کشت بلوغ شامل TCM-199 غنی شده با ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر FSH، ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر LH، ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر استرادیول ۱۷- بتا و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA بود. برای شروع کشت، ابتدا توده‌های کومولوس- اووسیت در محیط کشت بلوغ بدون هورمون و سپس محیط کشت بلوغ دارای هورمون شستشو داده شدند (به صورت انتقال قطره به قطره) و سپس در قطره‌های محیط بلوغ و زیر روغن معدنی به مدت ۲۴ ساعت در شرایط اتمسفری ۵ درصد CO_2 (حجمی/ حجمی) و حداکثر رطوبت کشت داده شدند. دوره ۲۴ ساعت بلوغ به این صورت بود که قبل از انجام بلوغ، توده‌های کومولوس- اووسیت به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. توده‌های کومولوس- اووسیت یکی از گروه‌ها، ۱۲ ساعت اول و ۱۲ ساعت دوم دوره بلوغ را در دمای ۳۸/۵ درجه سانتی گراد سپری کردند و توده‌های کومولوس- اووسیت در گروه دیگر (گروه تنش گرمایی)، ۱۲ ساعت اول دوره بلوغ را در ۴۱ درجه سانتی گراد و ۱۲ ساعت دوم را در ۳۸/۵ درجه سانتی گراد سپری کردند (شکل ۱). پس از اتمام دوره بلوغ، توده‌های کومولوس- اووسیت از محیط بلوغ خارج شده و در محیط لقاح شستشو داده شدند (۲۷)، سپس در قطرات محیط لقاح حاوی هپارین (۰/۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) همراه با اسپرم‌های ذوب شده از یک گاو نر برای انجام لقاح برای مدت ۲۰-۱۸ ساعت در شرایط اتمسفری ۵ درصد CO_2 و حداکثر رطوبت قرار گرفتند. پس از انجام لقاح برون تنی، برای جدا کردن سلول‌های کومولوس و اسپرم‌های اضافی، زایگوت‌های احتمالی به مدت ۳ دقیقه ورتکس شدند. پس از ورتکس کردن و شستشوی زایگوت‌های احتمالی در محیط کشت، زایگوت‌های هر گروه به طور تصادفی به دو گروه برای سپری کردن دوره کشت آزمایشگاهی تقسیم شدند (شکل ۱). یکی از گروه‌ها در محیط SOF دارای ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر IGF-1 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) و گروه دیگر در محیط SOF بدون IGF-1 برای مدت هشت روز و در شرایط اتمسفری ۵ درصد O_2، ۵ درصد CO_2 و ۹۰ درصد N_2 و دمای ۳۸/۵ درجه سانتی گراد و حداکثر رطوبت کشت داده شدند (شکل ۱).

رنگ آمیزی تانل

تست تانل برای تعیین مقدار قطعه قطعه شدن DNA در طی مراحل پایانی آبشار آپوپتوزیس انجام می‌شود. کیت تعیین مرگ سلولی از کمپانی رش (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) تهیه شد.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

برای تست تانل، بلاستوسیست‌های تشکیل شده از محیط کشت رویان برداشت شدند و در PBS دارای ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PVP (PBS-PVP) شستشو داده شدند و در ۴ درصد (وزنی/ حجمی) پارافرمالدئید در PBS در ۴ درجه سانتی گراد تثبیت و ذخیره شدند. تست تانل با نفوذ پذیر کردن بلاستوسیست‌ها به‌وسیله ۰/۱ درصد تریتون X-100 حاوی ۰/ درصد (وزنی/ حجمی) سدیم- سیترات در PBS برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق آغاز شد. بلاستوسیست‌ها برای یک ساعت در ۱ دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در تاریکی با مخلوط واکنش تانل انکوبه شدند. سپس بلاستوسیست‌ها در PBS-PVP شستشو داده شدند و به قطرات PBS-PVP حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروپیدیوم آیودید برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند و بعد از شستشو در PBS-PVP در قطره ای از گلیسرول روی لام قرار گرفتند و لامل روی آن قرار گرفت (۳۱). اسلایدها با میکروسکوپ فلورسنت (Olympus, BX 51) مشاهده شدند. در هر بلاستوسیست تعداد کل هسته‌ها و تعداد هسته‌های تانل مثبت ثبت شدند.



شکل ۱- طرح کلی پژوهش. توده‌های کومولوس- اووسیت، ۱۲ ساعت اول دوره بلوغ را در ۳۸/۵ یا ۴۱ درجه سانتی گراد و ۱۲ ساعت دوم را در ۳۸/۵ درجه سانتی گراد سپری کردند. پس از دوره بلوغ و لقاح برون تنی، زایگوت‌های احتمالی در هر گروه در حضور و یا عدم حضور IGF-1 کشت داده شدند.

رنگ‌آمیزی افتراقی رویان

در پایان دوره کشت رویان، تعداد سلول‌های تروفکتودرم و توده سلول درونی در بلاستوسیست‌های حاصل در هر چهار گروه به‌وسیله رنگ آمیزی افتراقی (۳۹)، مورد ارزیابی قرار گرفت. برای رنگ آمیزی، در ابتدا بلاستوسیست‌ها برای مدت ۳۰ ثانیه در ۵۰۰ میکرولیتر از محلول ۱ درصد تریتون X-100 و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروپیدیوم آیودید قرار گرفتند و سپس به سرعت به ۵۰۰ میکرولیتر از اتانول مطلق و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رنگ هوخست برای مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. بلاستوسیست‌های تثبیت و رنگ آمیزی شده

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

در قطـــره‌ای از گلیســـرول روی لام قـــرار گرفتنـــد و بـــا میکروســـکوپ فلورســـنت (Olympus, BX 51) مـورد ارزیـابی قـرار گرفتند.

آنالیز آماری

داده‌های به دست آمـده بـه‌وسـیله روش GLM و با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 مورد آنالیز قرار گرفتند (۳۳). بـرای انجـام مقایسـه میانگین از تست شف اسـتفاده شـد. داده‌هـای درصدی قبـل از آنـالیز بـا اسـتفاده از تبـدیل Arcsin بـه صـورت نرمـال درآورده شـدند. داده‌های حاصل بـه صـورت میـانگین حـداقل مربعات ± اشتباه اسـتاندارد میـانگین (SEM) ارائه شده‌اند. مـدل آمـاری مـورد اسـتفاده بـه صورت زیر بود:

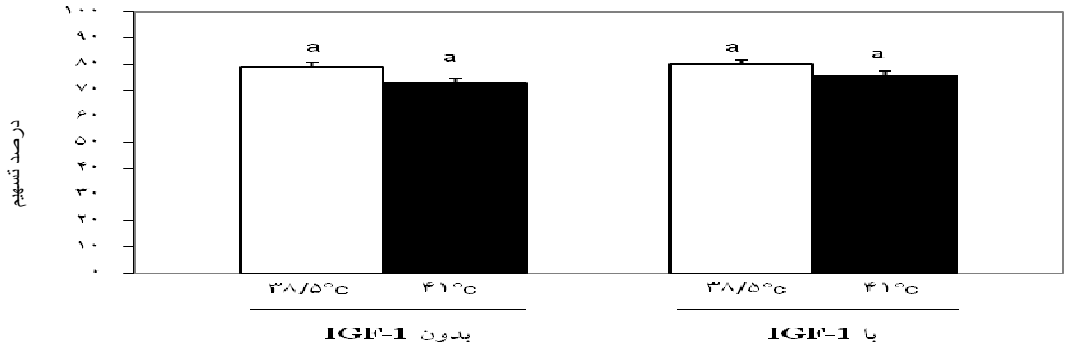
$$Y_{ijkl}= \mu+H_i+I_j+R_k+HJ_{ij}+HR_{ik}+IR_{jk}+HIR_{ijk}+e_{ijkl}$$

که در آن، μ: میانگین، H_i: رژیم تنش گرمایی ($i = ۳۸/۵$ یا $۴۱C^{\circ}$)، I_j: مقدار IGF-1 (ng/ml ۱۰۰ یـا ۰ =j)، R_k: اثـر تکـرار آزمـایش، HI_{ij}: برهمکنش رژیم تنش گرمایی و مقـدارIGF-1، HR_{ik}: برهمکنش رژیم تنش گرمـایی و تکـرار آزمـایش، HIR_{ijk}: بـرهمکنش رژیـم تـنش گرمایی، مقدار IGF-1 و تکرار آزمـایش و e_{ijk}: اثر عوامل باقیمانده است.

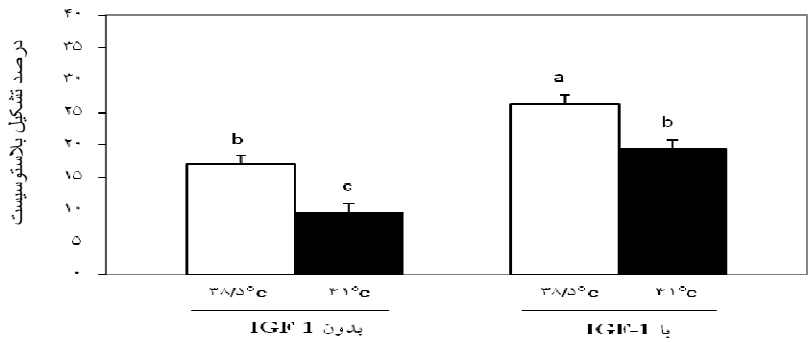
نتایج و بحث

در این آزمایش مقدار تسهیم (شکل ۲) به وسیله تیمارهای گوناگون تحت تأثیر قرار نگرفت، در حالی که مقدار تشکیل بلاستوسیست تحت تأثیر تیمارهای گوناگون قرار گرفت ($P<۰/۰۵$). همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، مقدار تشکیل بلاستوسیست به‌وسیله IGF-1 در حضور و یا عدم حضور تنش گرمایی افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). تعداد سلول‌های توده درونی (شکل ۴)، تروفکتودرم (شکل ۵) و تعداد کل سلول ها (شکل ۶) به وسیله IGF-1 در حضور و یا عدم حضور تنش گرمایی افزایش یافتند ($P<۰/۰۵$). همچنین، تعداد بلاستومرهای تانل مثبت (شکل ۷) به‌وسیله IGF-1 در حضور و یا عدم حضور تنش گرمایی کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). به هرحال، IGF-1 میزان تشکیل بلاستوسیست ($P<۰/۰۵$)، تعداد سلول‌های توده درونی، تروفکتودرم، تعداد کل سلول‌ها و درصد بلاستومرهایی که تانل مثبت ($P<۰/۰۵$) بودند را مستقل از تنش گرمای کاهش داد. برهمکنش بین تنش گرمایی و IGF-1 معنی دار نبود.

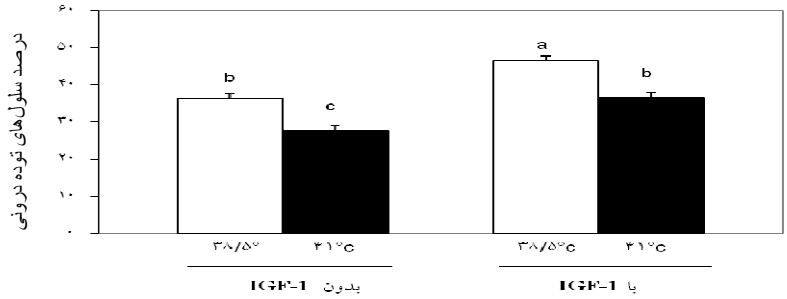
[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-12]



شکل ۲- مقدار تسهیم (حداقل مربعات خطا ± اشتباه استاندارد میانگین) در تیمارهای مختلف ستون‌های دارای حروف متفاوت، بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

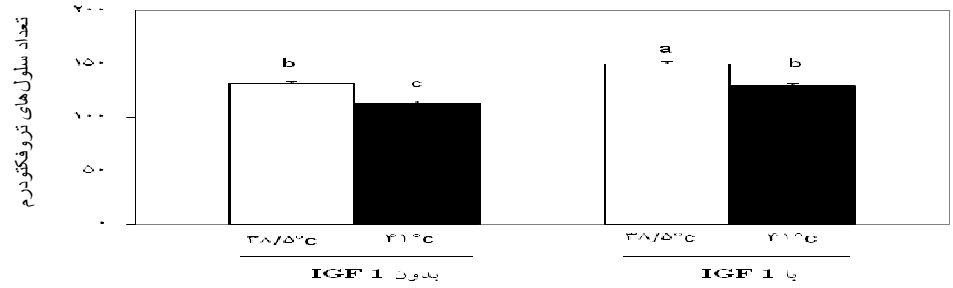


شکل ۳- مقدار تشکیل بلاستوسیست (حداقل مربعات خطا ± اشتباه استاندارد میانگین) در تیمارهای مختلف ستون‌های دارای حروف متفاوت، بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

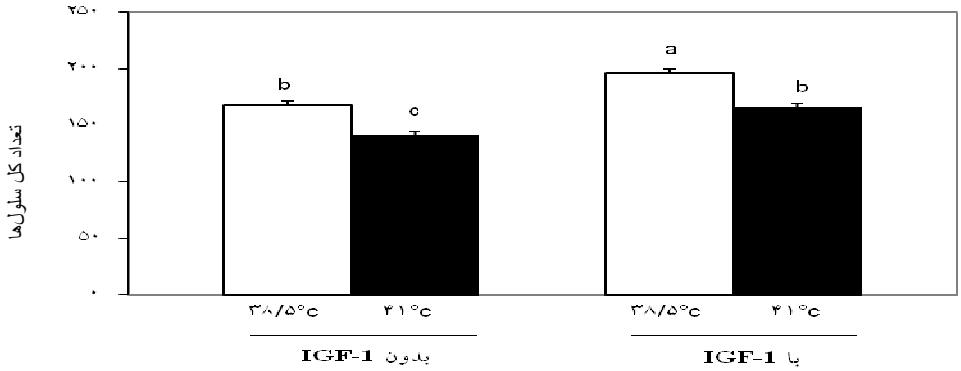


شکل ۴- تعداد سلول‌های توده درونی (حداقل مربعات خطا ± اشتباه استاندارد میانگین) در تیمارهای مختلف ستون‌های دارای حروف متفاوت، بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

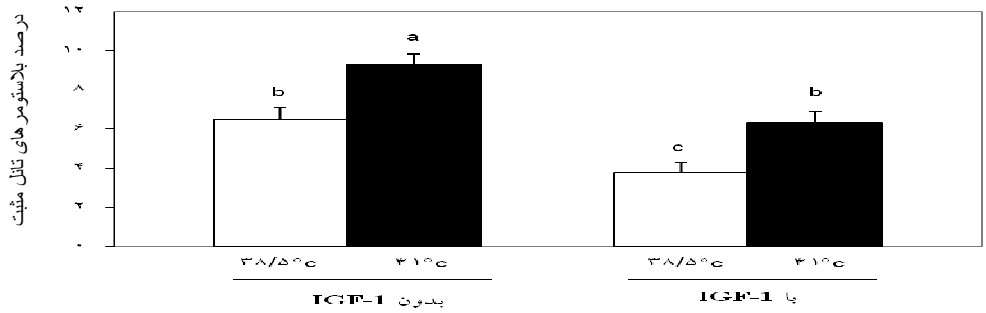
[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-12]



شکل ۵- تعداد سلول‌های تروفکتودرم (حداقل مربعات خطا ± اشتباه استاندارد میانگین) در تیمارهای مختلف ستون‌های دارای حروف متفاوت، بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.



شکل ۶- تعداد کل سلول‌ها (حداقل مربعات خطا ± اشتباه استاندارد میانگین) در تیمارهای مختلف ستون‌های دارای حروف متفاوت، بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.



شکل ۷- مقدار بلاستومرهای تانل مثبت (حداقل مربعات خطا ± اشتباه استاندارد میانگین) در تیمارهای مختلف ستون‌های دارای حروف متفاوت، بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

در مطالعه حاضر، تنش گرمایی و IGF-1 نتوانستند مقدار تسهیم را تغییر دهند. این نتایج با بعضی از یافته های (۵ و ۱۴) مطابقت دارد اما با بعضی دیگر از مطالعات (۳۱ و ۳۲) مطابقت نداشت. این عدم یکنواختی در بین مطالعات احتمالاً به علت تفاوت ژنوتیپی، تکنیک مورد استفاده و عوامل ناشناخته است. داده‌های این پژوهش نشان می‌دهد که تعداد

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

کمی از اووسیت‌های تحت تنش قرار گرفته قادر به تکوین تا مرحله بلاستوسیست هستند. مطالعات پیشین نشان داد که تنش گرمایی طی دوره بلوغ برون تنی دارای اثرات مخرب بر قابلیت تکوین رویان گاو است (۵، ۱۴ و ۳۸). اگرچه سازوکارهای درگیر در این اثرات کاملاً مشخص نیست، اما نتایج به دست آمده ممکن است که نتیجه لقاح یک اووسیت آپوپتوتیک بوده باشد (۳۱ و ۳۲). همچنین، گزارش شده است که تعداد کمی از اووسیت‌های تحت تنش گرمایی متحمل متراکم شدن بعد از لقاح می‌شوند و این مورد ممکن است تا حدی توضیح دهد که چرا اووسیت های کمتری به مرحله بلاستوسیست تکوین پیدا می‌کنند (۵). از سوی دیگر، مقدار تشکیل بلاستوسیست به‌وسیله IGF-1 در حضور و یا عدم حضور تنش گرمایی افزایش یافت. در گاو، IGF-1 اضافه شده (۲ تا ۲۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) به محیط کشت رویان موجب افزایش نسبت رویان‌هایی شد که در روز ۵ بعد از لقاح به مراحل مورولا (۲۰ و ۲۱) و بلاستوسیست (۳، ۲۲ و ۳۵) می رسند. به نظر می رسد که اثر IGF-1 بر قابلیت تکوین رویان گاو از راه گیرنده IGF-1 میانجیگری می شود (۲۰). به علاوه، به نظر می‌رسد که IGF-1 بعد از مرحله ۲ تا ۴ سلولی عمل می‌کند، زیرا افزودن IGF-1 به محیط کشت بلوغ، نسبت اووسیت‌های گاوی که به مرحله بلاستوسیست می‌رسند را افزایش نداد (۱۷). در موش، IGF-1 (۳۰ تا ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) درصد زایگوت‌های لقاح یافته در شرایط درون تنی و رویان‌های دو سلولی که به مرحله بلاستوسیست می‌رسند را افزایش داد (۱۰ و ۲۴). سایر گونه‌ها که در آنها IGF-1، تکوین رویانی تا رسیدن به مرحله بلاستوسیست را تحریک کرده است شامل گاومیش (۲۳)، خرگوش (۱۸) و انسان (۱۵) است.

داده‌های این پژوهش نشان می‌دهد که IGF-1 می‌تواند تعداد سلول‌های توده سلول داخلی، تروفکتودرم و تعداد کل سلول‌ها را در حضور و یا عدم حضور تنش گرمایی افزایش دهد. این نتایج با نتایج مطالعات پیشین که IGF-1 تعداد کل سلول‌ها (۳ و ۱۷) و تعداد سلول‌های توده درونی (۱۱، ۱۵ و ۳۶) را افزایش داد، مطابقت دارد. به هرحال، افزایش تعداد کل سلول‌ها در مطالعه حاضر به افزایش تعداد سلول‌های توده درونی و تروکتودرم نسبت داده می‌شود. گزارش شده است که IGF-1 قادر به گذشتن از سلول‌های تروفکتودرم و رسیدن به توده سلول درونی است (۱۱) و به نظر می‌رسد که IGF-1 قادر به تنظم متابولیسم در سلول‌های توده درونی و تروفکتودرم در رویان موش است (۱۵). چندین سازوکار ممکن وجود دارد که IGF-1 می‌تواند به وسیله آنها تعداد سلول در رویان‌هایی که به مرحله بلاستوسیست تکوین پیدا کرده‌اند را افزایش دهد. اولین سازوکار: IGF-1 یک میتوژن معروف است (۱، ۸ و ۳۷) و می‌تواند میزان تکثیر بلاستومرها را افزایش دهد. سازوکار دوم: IGF-1 می‌تواند برداشت انرژی به‌وسیله رویان‌های گاو را افزایش دهد.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

رویان گاو در طی مراحل اولیه تکوین وابسته به پیروات و گلوتامین است اما سوبسترای اصلی انرژی مورد مصرف در حدود زمان متراکم شدن رویان به گلوکز تغییر می‌کند (۲۹).

در پژوهش حاضر، IGF-1 تعداد بلاستومرهای تانل مثبت را در حضور و یا عدم حضور تنش گرمایی کاهش داد. پیشتر، اثرات ضد آپوپتوتیک IGF-1 در رویان‌های قبل از لانه گزینی ثابت شده بود (۷، ۱۲ و ۱۳). گزارش شده است که مهار آپوپتوزیس به‌وسیله IGF-1 به‌وسیله غیر فعال شدن پروتئین‌های پیش- آپوپتوتیک صورت می‌گیرد که از طریق فعال شدن مسیر PI3K/AKt میانجیگری می‌شود (۹). کاهش در شاخص تانل به‌وسیله IGF-1 در حضور و یا عدم حضور تنش گرمایی می‌تواند تا حدودی به‌وسیله افزایش تعداد کل سلول‌ها در بلاستوسیست توضیح داده شود.

اثرات محافظتی IGF-1 می تواند منجر به افزایش زنده مانی بلاستوسیست های گاو برای ایجاد و حفظ آبستنی در طی تنش گرمایی در گاوهای شیری شود. در طی تابستان، گاوهای شیرده که بلاستوسیست‌هایی را دریافت کردند که قبلاً با ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر IGF-1 کشت داده شده بودند، دارای میزان آبستنی بالاتری در مقایسه با گاوهایی بودند که رویان‌هایی را دریافت کردند که در محیط کشت آنها IGF-1 وجود نداشت (۲). پنتالیون و کی (۲۶) توضیح دادند که IGF-1 و انسولین، مقدار جذب گلوکز در بلاستوسیست موش را افزایش می‌دهند و IGF-1 نسبت به گلوکز ۱۰۰۰ برابر قوی‌تر است. رونوشت‌های IGF-1 در اویدوکت گاو در طی چرخه فحلی یافت شده که حداکثر مقدار آن بعد از تخمک ریزی است (۳۴). همچنین، در همان مطالعه، IGF-1 در سلول‌های اپیتلیال اویدوکت گاو مکان‌یابی شد (۳۴). افزودن سوماتواستاتین به محیط کشت سلول‌های اپیتلیال اویدوکت، آزاد شدن IGF-1 در محیط را افزایش داد (۱۹). این موضوع که اویدوکت IGF-1 تولید می‌کند بدین معنی است که این بافت منبعی از IGF-1 برای تنظیم احتمالی تکوین اولیه رویانی است. به نظر می‌رسد که هر تغییری در ترشح IGF-1 در اویدوکت گاو به‌وسیله سوماتوتروپین (همانند bST) ممکن است که تحمل گرمایی رویان در گاوهای در معرض تنش گرمایی را افزایش دهد.

به طور کلی، نتایج این آزمایش نشان دادند که IGF-1 می‌تواند تکوین رویان‌های گاوی تولید شده از اووسیت‌های تحت تنش گرمایی قرار گرفته را بهبود ببخشد. این اثرات مفید IGF-1 با افزایش در تعداد کل سلول‌ها و کاهش در تعداد بلاستومرهای تانل مثبت همراه بود. این نتایج نشان می‌دهد که دستکاری سیستم IGF-1 ممکن است که تکوین رویانی در ماده گاوهای در معرض تنش گرمایی را بهبود ببخشد.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

منابع

1. Bahr, C. and B. Groner. 2005. The IGF-1 receptor and its contributions to metastatic tumor growth-novel approaches to the inhibition of IGF-1R function. Growth Factors. 23: 1-14.
2. Block, J., M. Drost, R.L. Monson, J.J. Rutledge, R.M. Rivera, F.F. Paula-Lopes, O.M. Ocon, C.E. Krininger, J. Liu and P.J. Hansen. 2003. Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of *in vitro* produced embryos to heat-stressed, lactating cows. Journal of Animal Science. 81: 1590-1602.
3. Byrne, A.T., J. Southgate, D.R. Brison and H.J. Leese. 2002. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. Molecular Reproduction and Development. 62: 489-495.
4. Ealy, A.D., M. Drost and P.J. Hansen. 1993. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. Journal of Dairy Science. 76: 2899-2905.
5. Edwards, J.L., A.N. Bogart, A.L. Rispoli, A.M. Saxton and F.N. Schrick. 2009. Developmental competence of bovine embryos from heat-stressed ova. Journal of Dairy Science. 92: 563-570.
6. Edwards, J.L. and P.J. Hansen. 1997. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. Molecular Reproduction and Development. 46: 138-145.
7. Fabian, D., G. Il'kova, P. Rehak, V. Czikkova Baran and J. Koppel. 2004. Inhibitory effect of IGF-I on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured *in vitro*. Theriogenology. 61: 745-755.
8. Foulstone, E., S. Prince, O. Zaccheo, J.L. Burns, J. Harper, C. Jacobs, D. Church and A.B. Hassan. 2005. Insulin-like growth factor ligands, receptors and binding proteins in cancer. Journal of Pathology. 205: 145-153.
9. Gallaher, B.W., R. Hille, K. Raile and W. Kiess. 2001. Apoptosis: live or die-hard work either way Hormone and Metabolic Research. 33: 511-519.
10. Gląbowski, W., R. Kurzawa, B. Wiszniewska, T. Bączkowski, M. Marchlewicz and P. Brelik. 2005. Growth factors effects on preimplantation development of mouse embryos exposed to tumor necrosis factor alpha. Reproductive Biology. 5: 83-99.
11. Harvey, M. and P.L. Kaye. 1992. Insulin-like growth factor-I stimulates growth of mouse preimplantation embryos *in vitro*. Molecular Reproduction and Development. 31: 195-199.
12. Herrler, A., C.A. Krusche and H.M. Beier. 1998. Insulin and insulin-like growth factor-1 promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. Biology of Reproduction. 59: 1302-1310.
13. Jousan, F.D. and P.J. Hansen. 2004. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. Biology of Reproduction. 71: 1665-1670.
14. Ju, J.C., S. Jiang, J.K. Tseng, J.E. Parks and X. Yang. 2005. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. Theriogenology. 64: 1677-1689.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

15. Lighten, A.D., G.E. Moore, R.M.L. Winston and K. Hardy. 1998. Routine addition of human insulin-like growth factor-1 ligand could benefit clinical *in vitro* fertilization culture. Human Reproduction. 13: 3144-3150.
16. Markham, K.E. and P.L. Kaye. 2003. Growth hormone, insulin-like growth factor-1 and cell proliferation in the mouse blastocyst. Reproduction. 125: 327-336.
17. Makarevich, A.V. and M. Markkula. 2002. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. Biology of Reproduction. 66: 386-392.
18. Makarevich, A.V., A. Sirotkin, P. Chrenek, J. Bulla and L. Hetenyi. 2000. The role of IGF-I, cAMP/protein kinase A and MAP-kinase in the control of steroid secretion, cyclic nucleotide production, granulosa cell proliferation and preimplantation embryo development in rabbits. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 73: 123-133.
19. Makarevich, A.V. and A. Sirotkin. 1997. The involvement of the GH/IGF-I axis in the regulation of secretory activity by bovine oviduct epithelial cells. Animal Reproduction Science. 48: 197-207.
20. Matsui, M., Y. Takahashi, M. Hishinuma and H. Kanagawa. 1997. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) is mediated through the IGF-I receptor. Theriogenology. 48: 605-616.
21. Matsui, M., Y. Takahashi, M. Hishinuma and H. Kanagawa. 1995. Insulin and insulin like growth factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized *in vitro*. The Journal of Veterinary Medical Science. 57: 1109-1111.
22. Moreira, F., F.F. Paula-Lopes, P.J. Hansen, L. Badinga and W.W. Thatcher. 2002. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of *in vitro* derived bovine embryos. Theriogenology. 57: 895-907.
23. Narula, A., M. Taneja and S.M. Totey. 1996. Morphological development, cell number, and allocation of cells to trophectoderm and inner cell mass of *in vitro* fertilized and parthogenetically developed buffalo embryos: the effect of IGF-I. Molecular Reproduction and Development. 44: 343-351.
24. O'Neill, C. 1997. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. Biology of Reproduction. 56: 229- 237.
25. Paula-Lopes, F.F., Y.M. Al-Katanani, A.C. Majewski, L.R. McDowell and P.J. Hansen. 2003. Manipulation of antioxidant status fails to improve fertility of lactating cows or survival of heat-shocked embryos. Journal of Dairy Science. 86: 2343-2351.
26. Pantaleond, M. and P.L. Kaye. 1996. IGF-I and insulin regulate glucose transport in mouse blastocysts via IGF-I receptor. Molecular Reproduction and Development. 44: 71-76.
27. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, M.L. Leibfried-Rutledge, E.S. Critser, W.H. Eyestone and N.L. First. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology. 25: 591-600.
28. Putney, D.J., J.R. Malayer, T.S. Gross, W.W. Thatcher, P.J. Hansen and M. Drost. 1988. Heat stress-induced alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptuses and uterine endometrium. Biology Reproduction. 39: 717-28.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

29. Rieger, D., M.N. Loskutoff and K.J. Betterridge. 1992. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro*. Journal of Reproduction and Fertility. 95: 585-595.
30. Roth, Z. 2008. Heat stress, the follicle and its enclosed oocyte: Mechanisms and potentioal strategies to improve fertility in dairy cows. Reproduction in Domestic Animals. 43: 238-244.
31. Roth, Z. and P.J. Hansen. 2004a. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. Biology of Reproduction. 71: 1898-1906.
32. Roth, Z. and P.J. Hansen. 2004b. Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. Biology of Reproduction. 71: 2072-2078.
33. SAS Institute. 2003. SAS/STAT User's Guide. Version 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC.
34. Schmidt, A., R. Einspanier, W. Amselgruber, F. Sinowatz and D. Schams. 1994. Expression of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in the bovine oviduct during the oestrous cycle. Experimental and clinical endocrinology. 102: 364-369.
35. Sirisathien, S. and B.J. Brackett. 2003. TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I. Molecular Reproduction and Development. 65: 51-56.
36. Sirisathien, S., H.J. Hernandez-Fonseca and B.J. Brackett. 2003. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. Animal Reproduction Science. 77: 21-32.
37. Siddle, K., B. Urso, C.A. Niesler, D.L. Cope, L. Molina, K.H. Surinya and M.A. Soos. 2001. Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors. Biochemical Society Transactions. 29: 513-525.
38. Sugiyama, S., M. McGowan, N. Phillips, M. Kafi and M. Young. 2007. Effects of increased ambient temperature during IVM and/or IVF on the *in vitro* development of bovine zygotes. Reproduction in Domestic Animals. 42: 271-274.
39. Thouas, G.A., N.A. Korfiatis, A.J. French, G.M. Jones and A.O. Trounson. 2001. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. Reproductive Biomedicine Online. 3: 25-29.
40. Vanroose, G., A. De Kruif and A. Van Soom. 2000. Embryonic mortality-pathogen interactions. Animal Reproduction Science. 60-61: 131-143.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

Effect of Insulin Like Growth Factor-1 on Developmental Competence of Bovine Embryos Produced From Heat-Stressed Oocytes in *in vitro* Culture Medium

M. Zhandi[1], A. Towhidi[2], A. Zare-Shahneh[3], M. Khodaei Motlagh[4], H. Deldar[5] and A. Akhlaghi[6]

1- Assistant Professor, University of Tehran (Corresponding author)
2 and 3- Associate Professor and Professor University of Tehran
4- Assistant Professor, University of Arak
5- Assistant Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
6- Assistant Professor, University of Shiraz

Abstract

The goal of this study was to assess the effect of Insulin like growth factor-1 (IGF-1) during *in vitro* culture on developmental competence of bovine embryos produced from heat-stressed oocytes. In this experiment, immatured oocytes were randomly assigned into two groups and matured at 38.5 or 41 °C for the first 12 hours of maturation followed by 12 hours at 38.5 °C. After *in vitro* maturation and fertilization, putative zygotes in each group were randomly allocated and cultured in the presence or absence of 100 ng/ml human recombinant (hr)-IGF-1. The results showed that cleavage rate was not affected by IGF-1 and heat stress, whereas blastocyst formation rate was significantly increased by IGF-1 in the presence and/or absence of heat stress. In addition, heat stress decreased blastocyst formation rate compared to the control (38.5 °C without IGF-1) group. The number of trophectoderm cells, inner cell mass and total cell number were significantly increased by IGF-1 in the presence and/or absence of heat stress. In addition, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)-positive nuclei were significantly decreased by IGF-1 in the presence and/or absence of heat stress. Results of this experiment demonstrated that IGF-1 can improve developmental competence of bovine embryos produced from heat-stressed oocytes. It seems that IGF-1 improve bovine embryo developmental competence via increasing of total cell number and decreasing of apoptosis.

Keywords: Heat stress, IGF-1, Bovine, Embryo, Oocyte

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-12]