

اثرات فاکتور مهار کننده لوسمیایی بر تکامل جنین موش در مرحله پیش لانه‌گزینی در شرایط آزمایشگاهی

چکیده:

مقدمه و هدف: مطالعات اخیر نشان داده است که جنین‌های پستانداران در مرحله پیش از لانه‌گزینی در معرض مخلوطی از فاکتورهای رشدی قرار دارند که به وسیله سلول‌های فولیکول، سلول‌های پوششی لوله رحم و رحم ترشح می‌شوند. گیرنده‌های مربوط به فاکتورهای فوق در سطح جنین نیز به اثبات رسیده است. کشت آزمایشگاهی جنین‌های انسان و حیوانات مختلف در محیط‌های کشت فاقد فاکتورهای رشد باعث ایجاد مشکلات زیادی در تکامل جنین هم در کوتاه مدت و هم بلند مدت می‌شود. یکی از فاکتورهای فوق، فاکتور مهار کننده لوسمیایی می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق تعیین اثرات فاکتور فوق بر میزان تکامل جنین موش در مرحله پیش لانه‌گزینی جنین در شرایط آزمایشگاه بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی موش‌های ماده از نژاد ان‌ماری ۸-۶ هفته، به ترتیب با تزریق ۱۰ واحد هورمون PMSG و ۴۸ ساعت بعد تزریق ۱۰ واحد هورمون گنادوتروپین جفتی انسان به صورت داخل صفاقی جهت تحریک تخمک‌گذاری آماده شدند. سپس ۴۸ ساعت پس از جفت‌گیری با موش‌های نر، جنین‌های دو سلولی آنها جمع‌آوری شده و در دو گروه کنترل و تیماری به مدت ۷۲ ساعت در داخل انکوباتور کشت داده شدند. محیط کشت گروه کنترل محیط HTF و گروه تیماری محیط HTF به اضافه ۱۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر فاکتور مهار کننده لوسمیایی بود. در طی زمان کشت جنین‌ها از نظر تکاملی در زیر میکروسکوپ معکوس ارزیابی شدند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری تی دانشجویی تحلیل گردید.

یافته‌ها: میزان مورولاها و بلاستوسیست‌های به دست آمده در گروه تیماری در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود، هر چند که این افزایش از نظر آماری معنی‌داری نبود. لیکن درصد بلاستوسیست‌های خارج شده از لایه شفاف در گروه تیماری به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود.

نتیجه‌گیری: فاکتور مهار کننده لوسمیایی تأثیر چندانی بر تکامل جنین در مراحل اولیه تکامل تا قبل از مورولا ندارد، اما اثرات مثبتی بر سرعت تبدیل مورولا به بلاستوسیست و خروج بلاستوسیست‌ها از زونا دارد.

واژه‌های کلیدی: فاکتور مهار کننده لوسمیایی، جنین پیش لانه‌گزینی، موش

دکتر ایرج امیری*
مریم پروینی**
دکتر علی امینی***
دکتر رضا محمودی****

*دکترای آناتومی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
**کارشناس ارشد زیست‌شناسی تکوینی، دانشگاه رازی کرمانشاه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی
***دکترای آناتومی، دانشیار دانشگاه رازی کرمانشاه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی
****دکترای آناتومی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

تاریخ وصول: ۱۳۸۷/۳/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۸/۱۴

مؤلف مسئول: دکتر رضا محمودی

پست الکترونیک: rmahmoudi40@yahoo.com

مقدمه

پیچیدگی‌های کشت همزمان موجب شده است که این روش زیاد مورد استقبال قرار نگیرد. یکی دیگر از راههای تسهیل کشت جنین، غنی‌سازی محیط‌های کشت با فاکتورها و سیتوکین‌هایی می‌باشد که ترشح آنها به وسیله سلول‌های پوششی لوله رحم به اثبات رسیده است. اگرچه مطالعات و تجربیات آزمایشگاهی متعددی در این مورد گزارش شده است (۷-۱۲)، لیکن قبل از استفاده همگانی از این فاکتورها، انجام مطالعات دقیق‌تر جهت مشخص نمودن نقش هر کدام از فاکتورهای فوق بر روی جنین حایز اهمیت می‌باشد. از جمله فاکتورهایی که در لوله رحم و رحم در دوران قبل از لانه‌گزینی یا زمان لانه‌گزینی ترشح می‌شوند؛ فاکتور تحریک کننده کلنی -۱، اینترلوکین -۶ و فاکتور مهار کننده لوسمیایی^(۱) می‌باشند که ترشح آنها به وسیله سلول‌های پوششی به اثبات رسیده است و بیان گیرنده‌های آنها در جنین پیش لانه‌گزینی نیز نشان دهنده وجود همکنش‌هایی بین جنین و سلول‌های پوششی تولید مثلی در طی هفته اول دوره جنینی می‌باشد (۱۴ و ۱۳، ۲).

فاکتور مهار کننده لوسمیایی یک سیتوکین از خانواده اینترلوکین - ۶ می‌باشد که احتمالاً نقش حساسی را در تکامل جنین و لانه‌گزینی آن ایفا می‌کند (۱۴ و ۱۵). مطالعات نشان داده‌اند که فاکتور مهار

امروزه این مطلب به خوبی به اثبات رسیده است که در پستانداران در زمان حاملگی در مرحله پیش از لانه‌گزینی جنین، فاکتورها و سیتوکین‌های مختلفی به صورت موضعی به وسیله سلول‌های پوششی لوله رحم و رحم ترشح می‌شوند که این فاکتورها باعث ایجاد شرایط مناسب برای رشد و تکامل جنین‌های پیش لانه‌گزینی می‌شوند (۱-۴). از طرف دیگر ثابت شده است که جنین نیز در پاسخ به فاکتورهای فوق، فاکتورهایی از خود ترشح می‌کند که آنها نیز به نوبه خود موجب ترشح فاکتورهای جدیدی از سلول‌های پوششی می‌گردند و در واقع در این زمان یک گفتگوی فعال بین جنین و سلول‌های پوششی مجاری تناسلی مادر وجود دارد که جهت بقا، رشد، تکامل و لانه‌گزینی جنین بسیار مهم و ضروری می‌باشد (۵ و ۶). با توجه به این که امروزه کشت جنین پستانداران در آزمایشگاه به منظور تحقیقات بیولوژیکی، درمان ناباروری به ویژه در مورد انسان یا حفظ گونه‌های کمیاب حیوانات که نسل آنها در معرض انقراض قرار دارد در حال انجام می‌باشد، لذا ایجاد شرایط مناسب و مشابه بدن برای کشت جنین بسیار اهمیت دارد. استفاده از کشت همزمان سلول‌های پوششی لوله رحم با جنین، یکی از راههای تسهیل بررسی تکامل جنین در محیط آزمایشگاه می‌باشد، ولی فقدان محیط کشت مناسب و همچنین

1-Leukemia Inhibitory Factor(LIF)

مواد و روش‌ها

برای تهیه جنین‌های دو سلولی موش تحریک تخمک‌گذاری در موش‌های سفید ماده نژاد ان‌ماری^(۱) با سن بین ۶ تا ۸ هفته با تزریق داخل صفاقی ۱۰ واحد هورمون PMSG^(۲) و ۴۸ ساعت بعد ۱۰ واحد هورمون گنادوتروپین جفتی انسان انجام گرفت و بلافاصله پس از تزریق گنادوتروپین جفتی انسان هر موش ماده برای جفت‌گیری در کنار یک موش نر از همان نژاد قرار گرفت. صبح روز بعد موش‌های ماده از نظر پلاک واژینال مورد معاینه قرار گرفتند و موش‌هایی با پلاک واژینال مثبت پس از شناسایی در قفس جداگانه‌ای نگهداری شدند. ۴۸ ساعت پس از تزریق گنادوتروپین جفتی انسان، موش‌هایی پلاک مثبت به روش نخاعی کردن گردن کشته شده و لوله‌های رحم، پس از تمیز کردن چربی‌های اطرافشان، به کمک پنس و قیچی استریل برداشته شده و به دیش محتوی محیط HEPES-HTF (شرکت ایروین^(۳)) به اضافه ۴ میلی‌گرم آلبومین سرم گاوی منتقل شدند. سپس در زیر میکروسکوپ استریو با تزریق مقداری از همان محیط کشت از ناحیه اینفاندیبولوم به داخل لوله رحم، جنین‌ها از سوی دیگر آن خارج شدند (عمل فلاشینگ). تمام جنین‌های دو سلولی با ظاهر سالم

کننده لوسمیایی، تکامل بلاستوسیست موش را در شرایط آزمایشگاهی (۱۰ و ۸)، میزان خروج از لایه شفاف^(۱) را در بلاستوسیست افزایش می‌دهد و همچنین میزان حاملگی را برای جنین‌های گاوی کشت داده شده در آزمایشگاه بعد از انتقال به حیوانی که از آن اووسیت گرفته شده نیز افزایش می‌دهد (۱۰). همچنین گزارش شده است که بیان فاکتور مهار کننده لوسمیایی در اندومتريوم جهت لانه‌گزینی جنین موش کاملاً ضروری می‌باشد (۶ و ۲). مطالعه‌ای دیگر نشان داده است که غنی نمودن محیط کشت با فاکتور مهار کننده لوسمیایی در غلظت‌های ۲۰-۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر، هیچ تأثیری بر شکل‌گیری میزان بلاستوسیست انسانی در شرایط آزمایشگاهی ندارد (۱۱). در مقابل مطالعه‌ای دیگر نشان داده است که محیط کشت جنینی حاوی ۱۰۰۰ واحد بر میلی‌لیتر از فاکتور مهار کننده لوسمیایی، تعداد جنین‌های هشت سلولی در حال تکامل و نیز بلاستوسیست‌های خارج شده از لایه شفاف را در شرایط آزمایشگاهی افزایش می‌دهد (۱۲). با توجه به نتایج ضد و نقیض به دست آمده از مطالعات فوق، به نظر می‌رسد که انجام مطالعات بیشتر در این مورد ضروری می‌باشد. در مطالعه حاضر سعی شده است که اثرات فاکتور مهار کننده لوسمیایی بر تکامل جنین موش در مرحله پیش لانه‌گزینی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گیرد.

1-Hatching
2-NMRI
3-Pregnant Mare Serum Gonadotropin(PMSG)
4-Irvin Scientific Co

جمع‌آوری و پس از چند بار شستشو در قطراتی از محیط کشت، به صورت تصادفی به دو گروه کنترل و تیماری تقسیم شدند.

پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید و در کمیته اخلاق این دانشگاه به تصویب رسید.

در این پژوهش از محیط کشت HTF^(۱) خریداری شده از شرکت ایروین به عنوان محیط کنترل استفاده شد. HTF نخستین بار در سال ۱۹۸۵ بر اساس آنالیز ترکیبات قندی و نمکی مایع لوله رحم انسان ساخته شد (۱۶). محیط فوق یک محیط ساده متشکل از آب و ترکیبات قندی و نمکی و فاقد هر گونه فاکتورهای رشد یا سیتوکین‌ها می‌باشد. جهت کشت جنین‌های گروه کنترل به محیط پایه مقدار ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی نیز اضافه شد. در گروه تیماری به محیط پایه علاوه بر آلبومین سرم گاوی مقدار ۱۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر فاکتور مهار کننده لوسمیایی اضافه شد.

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده به غیر از آنهایی که در متن مشخص شده است از شرکت سیگما خریداری شد.

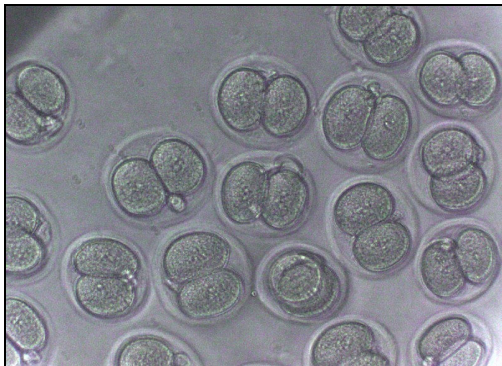
هر بار پس از جمع‌آوری جنین‌های ۲ سلولی از لوله رحم، جنین‌های به ظاهر سالم به طور تصادفی به دو گروه ۲۰-۱۵ عددی تقسیم شد که هر گروه در داخل قطراتی از محیط‌های کشت که در زیر روغن

مینرال آماده شده بودند، به مدت ۷۲ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد گاز دی‌اکسید کربن کشت داده شدند. تکامل جنین‌های هر دو گروه از مرحله دو سلولی تا مرحله بلاستوسیستی، هر ۱۲ ساعت بررسی شد و تغییرات مورفولوژیکی حاصل در آنها یادداشت گردید. جمع‌آوری و کشت جنین‌های دو سلولی در هر گروه مجموعاً ۸ بار تکرار گردید و هر بار تعداد جنین‌هایی که به ترتیب ۷۲، ۴۸، ۳۶، ۲۴ ساعت پس از آغاز کشت به مرحله ۸ سلولی، مورولا و بلاستوسیست رسیده بودند و آنهایی که ۶۰ و ۷۲ ساعت بعد از کشت از لایه شفاف^(۲) خارج شده بودند ثبت شد و درصد آنها تعیین گردید. سپس با کمک نرم‌افزار SPSS^(۳) میانگین این درصدها پس از ۸ بار تکرار کشت به دست آمد و تفاوت آنها با استفاده از آزمون تی^(۴) مقایسه و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

تعداد جنین‌های دو سلولی سالم (تصویر ۱) که وارد مطالعه در گروه‌های کنترل و تیماری شدند به ترتیب ۱۳۹ و ۱۴۴ عدد بودند. نمودار ۱ میانگین درصدی از آنها را که به ترتیب ۱۲، ۲۴، ۳۶ ساعت

1-Human Tubal Fluid (HTF)
2-Zona Pellucida
3-Statistical Package for Social Sciences
4-T-test



تصویر ۱: جنین‌های موش در مراحل دو سلولی پس از جمع‌آوری از لوله رحم (میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی ۲۰ برابر)

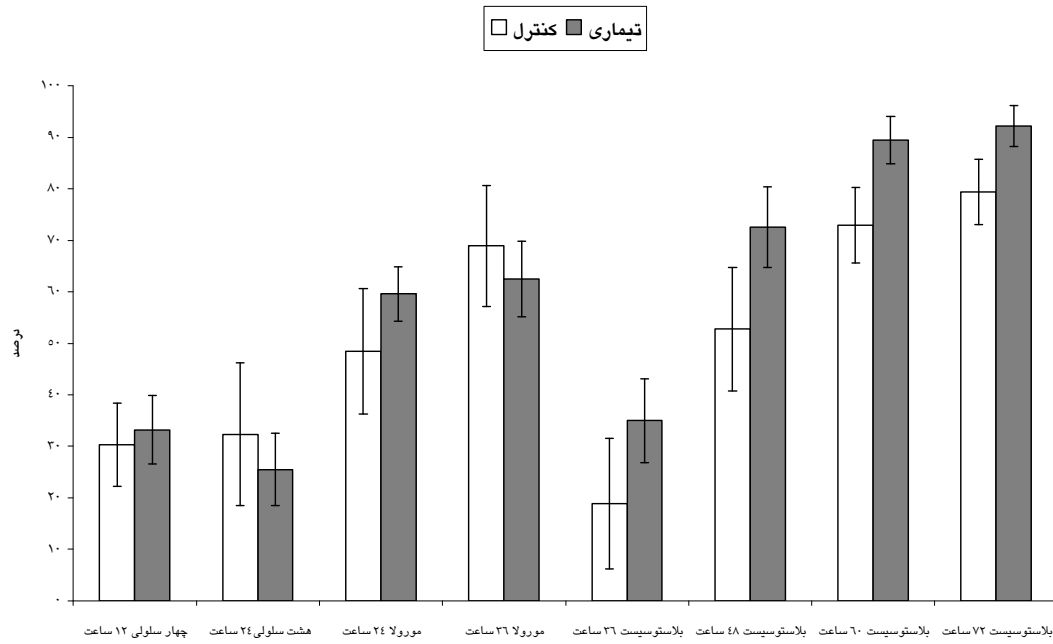


تصویر ۲: جنین‌های موش در مرحله بلاستوسیست پس از جمع‌آوری ۶۰ ساعت کشت در گروه تیماری (میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی ۴۰ برابر)

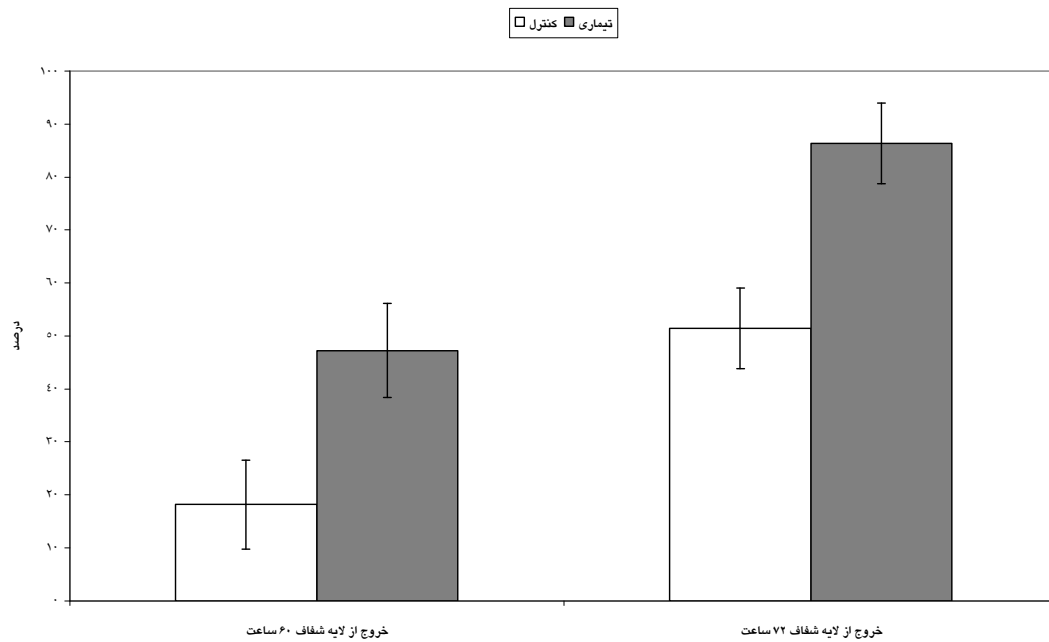


تصویر ۳: جنین‌های موش در مرحله بلاستوسیست پس از خروج از لایه شفاف در گروه تیماری ۷۲ ساعت پس از کشت (میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی ۲۰ برابر)

پس از آغاز کشت به مرحله ۴ سلولی، ۸ سلولی و مورولا رسیدند نشان می‌دهد. همان طور که در نمودار فوق مشخص است هیچ گونه تفاوت معنی‌داری بین دو گروه از نظر تکامل جنین تا مرحله مورولا مشاهده نمی‌شود. میانگین درصد بلاستوسیست‌ها (تصویر ۲) به ترتیب ۳۶، ۴۸، ۶۰ و ۷۲ ساعت پس از شروع کشت نیز در نمودار ۱ آمده است. همان طور که در نمودار فوق نشان داده شده است اگر چه درصد بلاستوسیست‌های تشکیل شده در گروه تیماری بیشتر از گروه کنترل می‌باشد، لیکن تفاوت بین آنها معنی‌دار نمی‌باشد. در نمودار ۲ میانگین درصد بلاستوسیست‌هایی را که ۶۰ و ۷۲ ساعت بعد از کشت از ناحیه شفاف خارج شده‌اند (تصویر ۳) نشان داده شده است. همان طور که در نمودار فوق آمده است از نظر خروج از لایه شفاف، گروه تیماری افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد، به طوری که ۶۰ ساعت پس از کشت به طور میانگین ۵۵ درصد از جنین‌های گروه تیماری از لایه شفاف خارج شدند در حالی که این رقم در مورد گروه کنترل تنها ۱۸/۱۷ درصد بود ($p < 0.009$). همچنین ۷۲ ساعت پس از کشت ۸۵/۵۵ درصد از جنین‌های گروه تیماری از لایه شفاف خارج شدند، در حالی که این رقم در مورد جنین‌های گروه کنترل ۴۷/۲ درصد بود ($p < 0.01$).



نمودار ۱: میانگین درصد تکامل جنین‌ها از دو سلولی تا بلاستوسیت، در ساعت‌های مختلف پس از کشت



نمودار ۲: میانگین درصد خروج از لایه شفاف، پس از ۶۰ و ۷۲ ساعت کشت

بحث و نتیجه گیری

فاکتور مهار کننده لوسمیایی یک سیتوکین از خانواده اینترلوکین ۶ می باشد که ثابت شده است که در دوره حاملگی به ویژه در زمان لانه گزینی به صورت موضعی به وسیله سلول های پوششی لوله رحم و رحم ترشح می شود و به نظر می رسد که وجود آن برای رشد و تکامل جنین های پیش لانه گزینی ضروری می باشد (۲۰-۱۷). هدف از انجام این تحقیق تعیین اثرات فاکتور فوق بر میزان تکامل جنین موش در مرحله پیش لانه گزینی جنین در شرایط آزمایشگاه بود.

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که فاکتور مهار کننده لوسمیایی تأثیر مهمی در سرعت خروج بلاستوسیست ها از زونا دارد که این امر می تواند کمک مهمی در امر لانه گزینی باشد. یافته فوق با نتایج مطالعاتی که از راه های گوناگون نقش فاکتور مهار کننده لوسمیایی را در تکامل جنین حیوانات مختلف بررسی کرده اند قابل مقایسه و تطبیق می باشد، فری و همکاران^(۱) (۱۹۹۲) گزارش کردند که اگر فاکتور مهار کننده لوسمیایی در مرحله مورولا به محیط کشت افزوده شود، شکل گیری بلاستوسیست گاو و میزان خروج از لایه شفاف آن را حدود ۴ برابر افزایش می دهد (۱۱) همچنین میشل و همکاران^(۲) (۱۹۹۴) نشان دادند که فاکتور مهار کننده لوسمیایی نو ترکیب انسانی، شکل گیری بلاستوسیست موش را افزایش داده و فراگمنته شدن جنین را حتی در مرحله دو سلولی کاهش می دهد (۸). همچنین تسایی و

همکاران^(۳) (۱۹۹۹) نیز تأثیر مثبت فاکتور مهار کننده لوسمیایی را بر تکامل جنین پیش لانه گزینی موش نشان دادند (۱۰). لاورانوس و همکاران^(۴) (۱۹۹۵) نشان دادند که محیط کشت جنینی حاوی ۱۰۰۰ واحد بر میلی لیتر از فاکتور مهار کننده لوسمیایی، تعداد جنین های هشت سلولی در حال تکامل و نیز بلاستوسیست های خارج شده از لایه شفاف را در شرایط آزمایشگاهی افزایش می دهد (۱۳). همچنین رانگسیویوت و همکاران^(۵) (۲۰۰۸) نشان دادند که فاکتور مهار کننده لوسمیایی اثرات مثبتی بر میزان تشکیل بلاستوسیست و تعداد کل سلول ها در آن دارد (۲۰). در مقابل یافته های فوق، برخی از مطالعات دیگر نتایج متناقضی ارائه نموده اند. یورسیکووا و همکاران^(۶) (۱۹۹۵) نشان دادند که غنی نمودن محیط کشت با فاکتور مهار کننده لوسمیایی در غلظت های ۲۰-۵ نانوگرم بر میلی لیتر، هیچ تأثیری بر شکل گیری میزان بلاستوسیست انسانی در شرایط آزمایشگاهی نداشت (۱۲).

همچنین مطالعات مولکولی نشان داده اند که سلول های پوششی رحم در زمان لانه گزینی فاکتور مهار کننده لوسمیایی بیان می کنند و از طرف دیگر مشخص شده است که بلاستوسیست نیز در این زمان، mRNA مربوط به گیرنده فاکتور مهار کننده

1-Fry et al
2-Michell et al
3-Tsai et al
4-Lavranos et al
5-Rungsiwut et al
6-Juriscova et al

لوسمیایی را بیان می‌کند که این مسئله نشان دهنده وجود یک همکنش سیگنال کننده بین اندومتريوم و جنین می‌باشد که برای لانه‌گزینی اهمیت زیادی دارد (۱۴ و ۲۰). مطالعه استوارت و همکاران^(۱) (۱۹۹۲) نشان داد که موش فاقد ژن عملکردی فاکتور مهار کننده لوسمیایی، عقیم می‌باشد، زیرا بلاستوسیت‌های آن قادر به لانه‌گزینی نمی‌باشند (۱۷). در مقابل در مطالعه‌ای دیگر، سطح mRNA برای رسپتور فاکتور مهار کننده لوسمیایی در تخمک موش و جنین‌های آن در مراحل اولیه کلیواژ غیر قابل تشخیص بود (۵) که این امر می‌تواند توجیهی بر یافته مطالعه حاضر مبنی بر عدم تأثیر فاکتور مهار کننده لوسمیایی بر تکامل اولیه جنین در مرحله قبل از مورولا باشد.

در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غنی‌سازی محیط‌های کشت جنین‌های دو سلولی حاصل از موش نژاد ان‌ماری با غلظت ۱۰۰۰ واحد بر میلی‌لیتر از فاکتور مهار کننده لوسمیایی تأثیری بر تکامل جنین در مراحل اولیه کلیواژ تا مرحله مورولا ندارد، لیکن موجب افزایش تشکیل بلاستوسیت و خروج آنها از لایه شفاف می‌شود که این نتایج با یافته‌های قبلی که اثرات مطلوب فاکتور مهار کننده لوسمیایی را بر تکامل پیش لانه‌گزینی اثبات می‌کردند، مطابقت دارد (۱۰ و ۷، ۹). این غلظت از فاکتور مهار کننده لوسمیایی، می‌تواند میزان خروج از لایه شفاف را به طور چشمگیری افزایش دهد، اما از نظر شکل‌گیری بلاستوسیت، هر چند افزایشی در درصد

تشکیل بلاستوسیت‌ها طی ۴۸، ۶۰ و ۷۲ ساعت پس از کشت مشاهده شد، اما این افزایش از نظر آماری در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نبود. همان طور که گفته شد امکان‌پذیر نبود که اثر قابل مشاهده مثبت یا منفی از فاکتور مهار کننده لوسمیایی در تکامل اولیه جنین (دو سلولی تا مورولا) پیدا شود که دلیل اصلی این امر، می‌تواند نیازمندی‌های متفاوت جنین در مراحل مختلف تکامل جنینی باشد، به طوری که در داخل مجاری تناسلی نیز وجود فاکتور مهار کننده لوسمیایی در نیمه دوم هفته اول زندگی جنینی یعنی در زمانی که جنین از مرحله مورولا گذشته و به بلاستوسیت تبدیل شده و آماده لانه‌گزینی می‌باشد تأیید شده است.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از دکتر مهری آزادبخت و همچنین کلیه کارکنان آزمایشگاه تحصیلات تکمیلی دانشگاه علوم پزشکی همدان تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

1-Stewart et al

The Effects of Leukemia Inhibitory Factor on Development of Mouse Preimplantation Embryo

Amiri I,
Parvini M,
Amini A,
Mahmoudi R

*Associate Professor of Anatomy, Infertility Center, Fatemeh Hospital, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

** MSc in Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran

*** Associate Professor of Anatomy, Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran

**** Assistant Professor of Anatomy, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

KEYWORDS:

Leukemia Inhibitory Factor(LIF),
Preimplantation Embryo,
Mouse

Received: 17/3/1387

Accepted: 14/8/1387

Corresponding Author: Mahmudi R
Email: rmahmoudi40@yahoo.com

ABSTRACT:

Introduction and Objective: Recent studies have demonstrated that mammalian preimplantation embryos are exposed to a mixture of many different growth factors and cytokines, expressed by the follicles, oviducts and endometrium. Receptors for many of these growth factors have also been shown to be expressed by preimplantation embryos. In vitro culture of human and animal's embryos in conventional media lacking growth factors can result in suboptimal growth and a variety of short-term and long-term developmental abnormalities. One of these factors is Leukemia Inhibitory Factor (LIF). The aim of this study was to evaluate the effects of LIF on the mouse preimplantation embryo development.

Materials & Methods: Six to eight weeks old NMRI mice were superovulated by injection of 10IU PMSG and 10IU HCG 48h later. The mated mice were killed 48 hours after HCG injection, oviducts were flushed and two-cell embryos were collected and divided randomly to two groups (control and treatment). Control medium was HTF and treatment medium was HTF+1000u/ml LIF. In each group the embryos were cultured in an incubator at 37°C with 5% CO₂ for 72h. The state of embryo development was evaluated in 12 hours interval using inverted microscope.

Results: There was not any significant difference in the rate of morolla and blastocyst formation after 36 hours. In comparing hatching rates, 60 and 72 hours after culture, there were significant difference between control and treatment groups ($p < 0.008$).

Conclusion: LIF doesn't provide obvious stimulation in the early mouse embryo development until morolla stage. However, it has positive effects on preimplantation blastocyst growth, differentiation and hatching.

REFERENCES:

- 1.Kane MT, Morgan PM, Coonan C. Peptide growth factors and preimplantation development. *Hum Reprod Update* 1997; 3:137-57.
- 2.Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL. Uterine expression of leukemia inhibitory coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:11408-12.
- 3.Teruel M, Smith R. Effect of embryo density and growth factors on in vitro preimplantation development of mouse embryos. *Acta Physiol Pharmacol Therap Latinoam* 1997; 47:87-96.
- 4.Desai N, wason J, Goldfarb J. Assessment of growth factor effects on post thaw development of cryopreserved mouse morula to the blastocyst stage. *J Human Reproduction* 2000; 15: 410- 8.
- 5.Richter KS. The importance of growth factors for preimplantation embryo development and inviter culture. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008; 20(3): 292-304.
- 6.Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edwards DR, Schultz GA. Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukaemia inhibitory factor and epidermal growth factor. *J Development* 1995; 121: 1005-14.
- 7.Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 3115-20.
- 8.Michell MH, Swanson RJ, Hodgen GD, Oehninger S. Enhancement of in vitro murine embryo development by recombinant leukemia inhibitory factor. *J Soc Gynecol Invest* 1994; 1: 215-9.
- 9.Grupen CG, Nagashima H, Nottle MB. Role of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on porcine oocyte maturation and embryonic development in vitro. *J Reproductive Fertility and Development* 1997; 9 :571-5.
- 10.Tsai HD, Chang CC, Hsieh YY, Lo HY, Hsu LW, Chang SC. Recombinant human leukemia inhibitory enhances the development of preimplantation mouse embryo in vitro. *Fertil Steril* 1999; 71: 722-5.
- 11.Fry RC, Batt PA, Fairclough RJ, Parr RA. Human leukemia inhibitory factor improves the viability of bovine embryos. *Biol Reprod* 1992; 46: 470-4.
- 12.Juriscova A, Ben-Chetrit A, Varmuza SL, Casper RF. Recombinant human leukemia inhibitory factor does not enhance in vitro human blastocyst formation. *Fertil Steril* 1995; 64: 999-1002.
- 13.Lavranos TC, Rathjen PD, Seamark RF. Trophic effects of myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF) on mouse embryos. *Reprod Fertil* 1995; 105: 331-8.
- 14.Lass A, Weiser W, Munafo A, Loumaye E. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fertil Steril* 2001; 76: 1091-6.
- 15.Robb L, Dimitriadis E, Li R, Salamonsen LA. Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: cytokines with key roles in implantation. *J Reprod Immunol* 2002; 57: 129-41.
- 16.Quinn P, Kerin J, Warnes GM. Improved pregnancy rats in human in vitri fertilization with the use of media based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 1985; 44: 493-8.
- 17.Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F. Blastocyst implantation depends on marenanal expression of leukemia inhibitory factor. *J Nature* 1992: 359: 76-7.
- 18.Serafini P, Rocha AM, Osório CT, Da Silva I, Motta EL, Baracat EC. Endometrial leukemia inhibitory factor as a predictor of pregnancy after in vitro fertilization. *Int J Gynaecol Obstet* 2008; 102(1): 23-7.
- 19.Ding T, Song H, Wang X, Khatua A, Paria BC. Leukemia inhibitory factor ligand-receptor signaling is important for uterine receptivity and implantation in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Reproduction* 2008;135(1): 41-53.
- 20.Rungsiwiwut R, Rungarunlert S, Numchaisrika P, Pruksananonda K, Techakumphu M, Virutamasen P. Effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on the quality of in vitro produced mouse blastocysts and subsequent derivation of embryonic stem (ES) cells. *J Med Assoc Thai* 2008; 91(5): 608-14.