تحديد واقي البرودة الأمثل لأجنة الأبقار المنتجة مخبرياً

حسان أحمد مهدي[1] وسليمان سلهب[2] ومروان الحلبي[3]

الملخص

أجريت الدراسة في مخبر التقانات الحيوية، إدارة بحوث الثروة الحيوانية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية بهدف تحديد واقي البرودة الأمثل لتجميد أجنة الأبقار المنتجة مخبرياً بطريقة التجميد التقليدية (البطيء) أو السريع. استعمل الغليسرول 10%، والبروبانيدول 10%، و DMSO 10% كواقيات من البرودة في طريقة التجميد البطيء. كما استعمل الغليسرول بتركيز 20% والبروبانيدول بتركيز 20% + 20% سيروماً بقرياً والغليسرول بتركيز 20% + 20% سيروماً بقرياً، في محلول الـ M-PBS لتجميد الأجنة بطريقة التجميد السريع. أظهرت النتائج أن الغليسرول تعدُّ أفضل واق من البرودة، إذ أعطى أعلى (P<0.05) نسبة للأجنة الحية بعد التجميد والإذابة مقارنةً بالبروبانيدول والـ DMSO عند تجميد أجنة الأبقار المنتجة مخبرياً بالطريقة العادية وكانت نسبة الأجنة الحية والصالحة للنقل بعد الإذابة مباشرةً 52.38 ±2.38 مقارنةً مع 38.73±2.82 و33.61± 2.17 بالتتالي (P< 0.05). كما أعطى الخليط (الغليسرول 20% والبروبانيدول 20%) في وسط التجميد (M-PBS+ 20% CS)، معدلات بقاء للأجنة أعلى (P< 0.05) من الغليسرول 20% (54.65± 1.23 مقارنةً مع49.01 ±2.27، على التتالي) في طريقة التجميد السريع Vitrification. يستنتج من الدراسة الحالية أن استعمال الغليسرول بتركيز 10% بطريقة التجميد البطيء في تجميد أجنة الأبقار المنتجة في المختبر أعطى أفضل النتائج. وأن الخليط (الغليسرول 20% و البروبانيدول 20%) أنتج معدلات بقاء للأجنة بعد التجميد والإذابة أعلى من الغليسرول 20% في طريقة التجميد السريعة vitrification.

الكلمات المفتاحية: التجميد بالطريقة البطيئة، التجميد بالطريقة السريعة، الغليسرول، البروبانيدول، ثنائي ميتيل أوكسيد الكبريت Dimethylsolfoxide (DMSO)، معدل بقاء الأجنة.

[1] الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، إدارة بحوث الثروة الحيوانية، ص.ب،5391، قرحتا، ريف دمشق، سورية.
[2] قسم الانتاج الحيواني، كلية الزراعة، ص.ب. 30621، جامعة دمشق، سورية.
[3] قسم النسج والتشريح والجنين، كلية الطب البشري، جامعة دمشق، سورية.

Determination of the best cryoprotectant for embryo freezing produced in *vitro*

Muhdi, H. A.[(1)] ; S. A. Salhab[(2)] and M. Halaby[(3)]

ABSTRACT

This study was carried out in biotechnology laboratory, Animal Wealth Research Administration, General Commission for Agricultural Research. The aim of study was determine the best cryoprotectant for freezing of cattle embryos produced in vitro, and the survival rate of frozen-thawed embryos. We used different cryoprotectants (Glycerol 10%, Propanidiol 10%, DMSO 10%) for freezing the embryos in slow freezing method. And the mix (20% Gly, 20% Proh) in freezing medium (M-PBS + 20% CS) for freezing the embryos with vitrification.

It showed that glycerol 10% produced higher percentage (P< 0.05) of survival rate for embryos frozen-thawed by conventional freezing method comparing with 1, 2 propanidiol 10% and DMSO 10%, (52.38±2.38 vs. 38.73±2.82, 33.61±2.17 respectively). And the mix (20% Gly, 20% PROH) in freezing medium (M-PBS + 20% CS) produced higher survival rates (P< 0.05) than 20% Gly (54.65±1.23 vs. 49.01±2.27, respectively) in vitrification method.

In conclusion, Glycerol at concentration 10% was considered the best cryoprotectant in freezing bovine embryos by using slow freezing method. And the mix (20% Gly, 20% Proh) produced higher survival rates (P< 0.05) than 20% Gly in vitrification method.

Key words: Vitrification, Freezing, Glycerol, Propanidiol, DMSO, Survival rate.

[(1)]General Commission for Scientific Agricultural researches, Animal Wealth Research Administration, Syria.

[(2)]Dept. Anim. Prod. Fac. Agric. P.O.Box, Damascus Univ. Damascus, Syria.

[(3)]Dept. Histology, Anatomy and Embryology. Fac Medicine. Damascus Univ. Damascus, Syria.

المقدمة

تحفظ الأجنة عند الكائنات الثديية بشكل روتيني باستخدام التجميد العميق (Kuwayama، 2005). لكن عملية التجميد تسبب أضراراً كبيرة للأجنة، إما بتشكيل بللورات ثلجية أو زيادة تركيز الأملاح داخل الخلايا وحدوث ظاهرة التجفاف وما يرافقها من تغيرات تؤدي إلى نزع الماء من الخلايا خلال عملية التجميد (Patterson، 2002؛ Hyttel وزملاؤه، 1986).

هناك طريقتان لتجميد الأجنة: الطريقة التقليدية أو التجميد البطيء slow freezing والأخرى طريقة التجميد السريع vitrification. يُحدث التجميد البطيء أضراراً مختلفة للأجنة، حيث تتشكل بلورات ثلجية داخلية وخارجية تُحدث أضراراً مختلفة لقنوات الاتصال بين خلايا الطبقة المغذية Trophoblast (Tb)، وفي أغلفة المتقدرات الحيوية وأعرافها، وفي الأغشية والبلاسما النووية، وتكسر الغلاف الشفيف، وأضرار سيتوبلاسمية. وهذا يقود لانخفاض العدد الكلي للخلايا الحية بعد إزالة التجميد، وتراكم البقايا الخلوية في الفراغ المحي، وموت خلايا الكتلة الداخلية (kaidi وزملاؤه، 2001). واستخدمت طريقة التجفيد (vitrification) (تبريد عالي السرعة باستخدام تراكيز مرتفعة من واقيات البرودة التي تترافق مع معدل تبريد عال) لتجميد الأجنة وللتغلب على ظاهرة قلة حيوية الأجنة بعد عملية التجميد حيث تمنع تشكيل البللورات الثلجية (Massip وزملاؤه، 1995).

تستخدم العديد من المواد كواقيات من البرودة للأجنة، مثل الغليسرول (Neronov وزملاؤه، 2005)، داي ميثيل سولف أوكسيد (DMSO)، ايثلين غليكول، 1، 2 بروبانيدول، سكروز، لاكتوز، فركتوز. كما تصنف واقيات البرودة في نوعين: نفوذة (تدخل إلى خلايا الأجنة) مثل الغليسيرول وDMSO وايثلين غليكول و1، 2 البروبانيدل. وغير نفوذة (لاتدخل إلى خلايا الأجنة) مثل السكروز واللاكتوز والغلوكوز (JLTA، 1995؛ Ali وزملاؤه، 2009). و تستخدم لحماية الأجنة من الآثار الضارة المرافقة للتجميد، لكنها تسبب ضرراً خلوياً للأجنة من خلال الصدمة الحلولية، ولهذا السبب فإنّ واقيات البرودة تضاف إلى أوساط تجميد الأجنة ثم تزال بعد انتهاء عملية التجميد في خطوات متعاقبة (Kaidi وزملاؤه، 2001).

استخدم Bouyssou وChupin (1982) الغليسرول والـ DMSO في تجميد أجنة الأبقار حيث أعطى الغليسرول أفضل معدل بقاء للأجنة مقارنةً مع الـ DMSO بعد تنمية الأجنة المجمدة والمذابة مدة 24 ساعة في الحاضنة. واستخدم Aoyagi (1996) الوسط PBS مع الغليسرول بنسبة 10% والبروبانيدول بنسبة 10%، وحصل على نسبة بقاء للأجنة بعد التجميد والإذابة أعلى في الغليسرول مقارنةً بالبروبانيدل. واستخدم

Emiliani وزملاؤه (2000) البروبانيدول 1.5 مولاً والغليسرول 1.5 مولاً، وكانت نسبة البقاء حية للأجنة في الغليسرول متقاربة مع البروبانيدول، نظراً إلى استخدامهم وسط التجميد mHepes buffered EBBS المزود بالألبومين البقري BSA 0.5%. وحصل Kaidi وزملاؤه (2001) على معدل بقاء الأجنة حية عالية عند استخدامهم الغليسرول بتركيز (1.36 مولاً + 0.25 مول سكروز) في الوسط Embryo transfer freezing medium (Sigma ،ETF).

حصل Tan (2004) على معدل بقاء للأجنة 100% بعد التجميد بالطريقة السريعة حين استخدم وسط التجميد 15% ايثلين غليكول +15% بروبانيدول. وحصل Fry وزملاؤه (2003) على نسبة بقاء للأجنة بعد التجميد والإذابة 90% باستخدام طريقة Cryologic Vitrification Method (CVM) حيث جمدت الأجنة على سطح صلب يحتوي السائل الآزوتي -196°م.

تنخفض نسبة بقاء الأجنة الحية survival rate ونسب تحررها من غلاف الزونا (Hatching rate) بعد زرع الأجنة المجمَّدة والمذابة في الحاضنة مدة 72 ساعة، ويمكن أن يكون الانخفاض في نسبة التحرر من غلاف الزونا ناتجاً عن انخفاض في عدد الخلايا الملاحظ عند الأجنة المجمدة والمذابة بعد 48 أو 72 ساعة من الزرع في الحاضنة (Montag وزملاؤه، 2000). كما يمكن أن يكون السبب هو الموت الخلوي (Necrosis) خلال التجميد أو بعده (Kaidi وزملاؤه، 2001). أو أن يكون سبب انخفاض عدد الخلايا ناتجاً عن تباطؤ انقسام الخلايا الجنينية بعد التجميد (Takagi وزملاؤه، 1996).

أشار Shojiro وزملاؤه (2005) أن وسط التجميد بالطريقة السريعة Glycero والمؤلف من 20% غليسرول، و20% إيثلين غليكول، و0.3 مول سكروز في وسط DPBS كان أفضل من وسط التجميد المؤلف من 20% إيثلين غليكول، و20% داي ميثيل سولف أوكسيد DMSO، و20% سيروم الأبقار في الوسط TCM-199)، ووجدوا أن أجنة الأبقار المنتجة في المخبر والمجمدة بطريقة التجميد السريع مع أداة مؤلفة من كيس بلاستيكي صغير للحفاظ عليها تعطي معدلات بقاء للأجنة أعلى مقارنة بطريقة التجميد العادية. وأشار Shojiro وزملاؤه (2006) أن استخدام طريقة العروة البلاستيكية أعطت معدلات بقاء أعلى للأجنة المجمدة بالطريقة السريعة مقارنةً بالأجنة المجمدة بطريقة التجميد البطيء. أشار Mousa وزملاؤه (2005) أن طريقة التجميد السريع باستخدام قشات Open pulled straw (OPS) لتحميل الأجنة وتجميدها تسمح لها أن تمر بسرعة عبر نطاقات درجات الحرارة الحرجة، كما تقلل الآثار الضارة للتجميد.

تحتوي الأجنة المجمَّدة بطريقة التجميد البطيء عدداً أقل من الخلايا بالنسبة للأجنة المجمدة بطريقة التجميد السريع بعد عدة أيام من الإذابة و الزرع. وقد عُزي سبب الانخفاض الملحوظ في عدد خلايا الطبقة المغذية Trophoblast (Tb) بعد التجميد إلى أن طبقة الخلايا المغذية حساسة للتجميد أكثر من كتلة الخلايا الداخلية ICM لأن نفوذ الماء إلى خلايا Tb ربما يزيد قابليتها لتشكيل البلورات الثلجية الناتجة عن عملية التجميد (Kaidi وزملاؤه، 2001) في حين أشار Renard (1985) أن تخرب العديد من خلايا الطبقة المغذية Tb يكون مساوياً لعدد الخلايا المتحللة من كتلة الخلايا الداخلية ICM بعد 12 ساعة من التجميد والإذابة على أجنة الأبقار المنتجة داخل الجسمIn vivo. وقد لاحظ Iwasaki وزملاؤه (1994) نقصاناً في عدد الخلايا الجنينية الكلي وموت خلايا الكتلة الجنينية الداخلية ICM بعد عملية التجميد.

ونظراً إلى عدم وجود دراسات محلية في هذا المجال، فإن هذه الدراسة هدفت إلى تحديد واقي البرودة الأفضل في تجميد أجنة الأبقار المنتجة مخبرياً، وتقييمها شكلياً بعد الإذابة مباشرة باستخدام طريقتي التجميد البطيء والسريع.

مواد البحث وطرائقه

أجريت الدراسة في مخبر التقانات الحيوية – إدارة بحوث الثروة الحيوانية – الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية وذلك خلال المدة الممتدة من 2008 حتى 2010:

إنتاج الأجنة مخبرياً:

جُمعت 1195 بويضة ذات سيتوبلاسما داكنة ومنتظمة ومتجانسة ومحاطة كلياً بخلايا ركامية متراصة ومتجانسة من 162 مبيضاً من المسلخ. وضعت البويضات في الوسط TCM المضاف إليه هرمون FSH بتركيز (0.05 وحدة دولية/مل)، والمصل البقري بتركيز 10% (C8056، Sigma) مدة 24 ساعة في الحاضنة (Co48 Innova، UK) درجة حرارتها الداخلية 39 م° ومزودة بغاز CO_2 بتركيز 5% وفي جو رطب.

نُقلت البويضات الناضجة بعد 24 ساعة إلى وسط الإخصاب TALP المزود بالهيبارين (10 ميكروغرام/مل) مدة 18 ساعة. استخدمت قشات مجمدة من أجل الإخصاب في المختبر. أذيبت أربع قشات 0.25 مل من السائل المنوي المجمد في كل تجربة، وحُضِّرت النطاف بطريقة التعويم Swim up. ثم وضعت البويضات الناضجة (15-20) بويضة في 250 ميكرولتراً من الوسط TALP للإخصاب بعد غسيلها مرتين في الوسط TCM-199. وضعت الجرعة المحسوبة للنطاف في كل حفرة من طبق بتري التي تحتوي على البويضات (250 ميكرولتراً) حتى الحصول على تركيز نهائي للنطاف مقداره (1×10^6 نطفة /مل). وتركت البويضات مع النطاف مدة 18 ساعة في حاضنة CO_2 5% في درجة حرارة 39 م° في جو مشبع بالرطوبة بهدف الإخصاب.

نقلت البويضات المخصبة إلى الوسط SOF المضاف إليه السيروم البقري بنسبة 5% (Sigma، C8056)، ووضعت في حاضنة CO_2 بتركيز 5% حرارتها 39 م° مدة سبعة أيام من أجل متابعة التطور الجنيني إلى مرحلة الأرومة الأولية (Blastocyst). وجرى الحصول على 215 جنيناً جُمّدَ منها 63 جنيناً بطريقة التجميد البطيء و152 جنيناً بطريقة التجميد السريع.

1. طريقة التجميد البطيء:

1. 1. تحضير وسط التجميد (M-PBS + 10% غليسرول، أو 10% Dimethyl Sulpha Oxide،DMSO، أو10% البروبانيدول):

أُضيف إلى محلول الفوسفات الواقي (PBS) (Sigma، P5493) 36 ملغ/لتر بيروفات الصوديوم و1 غ/لتر غلوكوز، و33 ملغ/لتر بنسلين (وسط PBS المعدل M-PBS). ثمّ أخذ 80 مل من الوسط M-PBS وأضيف إليها 20 مل من السيروم البقري (JLTA، 1995). جرت فلترة الوسط M-PBS المضاف إليه 20 مل من السيروم بواسطة فلتر 0.22 ميكرومتر ثم قسم إلى عشرة أنابيب.

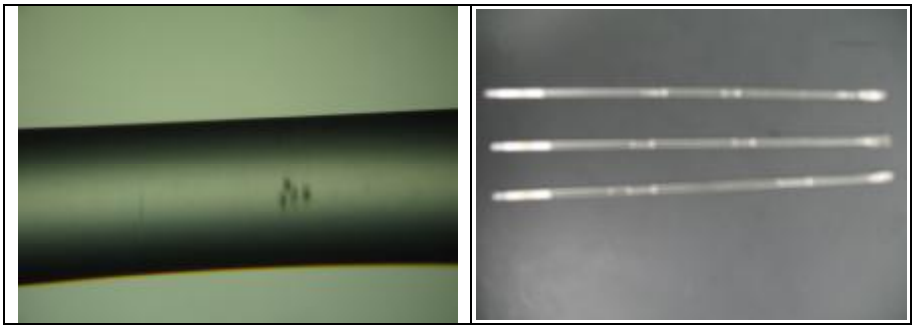
أضيف إلى الأنبوب الذي يحتوي 9 مل من الوسط (M-PBS + 20% سيروماً بقرياً) 1 مل من الغليسرول للحصول على نسبة 10% من الغليسرول. وحُضر البروبانيدول والداي ميثيل سولف أوكسيد DMSO بالطريقة نفسها للحصول على تركيز قدره 10% DMSO أو 10% بروبانيدول.

حُضّرت ثلاثة تراكيز من الغليسرول (3.3%، 6.7%، 10%). وحُضّرَ 1 مول من السكروز بإذابة 34.23غ من السكروز ثم استكمل الحجم إلى 100 مل بواسطة الوسط M-PBS.كما حُضّرت تراكيز مختلفة من محلول الإذابة (6 % غليسرول + 0.3 مول سكروز، 3% غليسرول + 0.3 مول سكروز، 0.3 مول سكروز)، حُضّرت محاليل التجميد والإذابة للبروبانيدول والداي ميثيل سولف أوكسيد DMSO بطريقة تحضير الغليسرول نفسها حسب المرجع (JLTA، 1995).

1. 2. خطوات تجميد الأجنة:

أجريت عملية التجميد باستخدام الغليسرول، أو البروبانيول، أوDMSO كواقيات من البرودة. كررت التجربة ثلاث مرات حيث جُمِّد 63 جنيناً بعمر 7 أيام بعد الإخصاب، ووضعت في وسط التجميد غليسرول 10% (n=21)، أو بروبانيدول 10% (n=18)، أو DMSO 10% (n=24). بقيت الأجنة في درجة حرارة الغرفة مدة عشر دقائق في وسط التجميد في الوسط M-PBS المضاف إليه السيروم البقري بنسبة 20%. ثم نقلت إلى تراكيز مختلفة من واقيات البرودة 3.3%، 6.7% غليسرول مدة 5 دقائق لكل تركيز، ثم نقلت الأجنة إلى التركيز النهائي لكل مجموعة (10% غليسرول، أو 10% بروبانيدول،

أو10% DMSO). جرت تعبئة الأجنة في قشات 0.25 مل مع وسط التجميد. وأغلقت القشات حرارياً بعد تعبئتها بالأجنة، عُلمت القشات حسب واقي البرودة (الصورة 1).

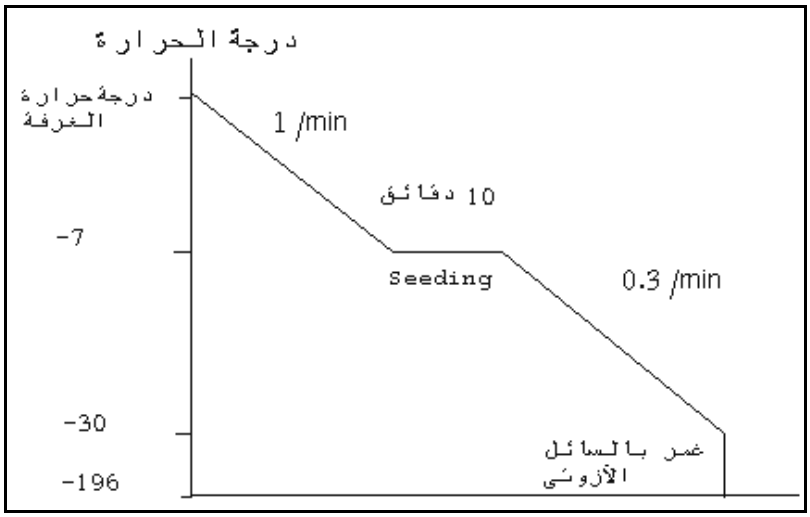


الصورة (1) تعبئة الأجنة في القشات

جمدت الأجنة باستخدام جهاز التجميد المبرمج (Nicool M 521، IMV ، France). (الصورة 2). إذ وضعت القشات في آلة التجميد وضبط التبريد بمعدل 1 °م/دقيقة من درجة حرارة الغرفة حتى درجة الحرارة -7 م°. ثم جرت عملية تحريض تشكل البلورات الثلجية Seeding باستخدام حامل معدني مغمور في السائل الآزوتي، وذلك بملامسته لطرفي القشات (الصورة 3)، ثم أغلق غطاء حافظة القشات حتى مرحلة استقرار درجة الحرارة (5-10 دقائق) عند الدرجة -7 °م، ثم جُمّدت القشات بمعدل 0.3 °م/دقيقة حتى الدرجة -30 °م، ثم غمرت في السائل الآزوتي -196°م مدة 48 ساعة (الشكل 1).

الصورة (2) جهاز تجميد الأجنة

الصورة (3) إجراء عملية الــ Seeding

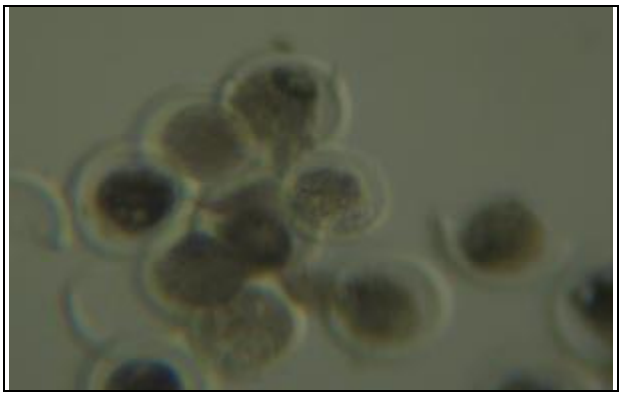


الشكل (1) منحنى تجميد الأجنة

1. 3. استعادة حيوية الأجنة وتقييمها:

أُجريت عملية تذويب القشات؛ وذلك بوضعها في حمام مائي 37 م° مدة 30 ثانية. ثم فُرّغت محتويات كل قشة في طبق بتري ونقلت بعد ذلك إلى طبق بتري آخر يحوي غليسرولاً تركيزه 6% و0.3 مول سكروز مدة خمس دقائق في درجة حرارة الغرفة، ثم إلى التركيز الثاني 3% غليسرول و0.3 مول سكروز مدة خمس دقائق، وأخيراً في السكروز 0.3 مول مدة 5 دقائق، ثم إلى الوسط SOF +5% سيروماً بقرياً.

وُضعت الأجنة في الحاضنة مدة ثلاث ساعات لتستعيد شكلها، ثم قُيّمت الأجنة شكلياً إلى أجنة غير قابلة للنقل وأجنة قابلة للنقل حسب تجانس خلاياها وعدم احتوائها على انقسامات خلوية شاذة، وكانت بنية الغلاف الشفيف سليمة وغير مشقوقة والخلايا متماسكة وغير مبعثرة (الصورة 4) (JLTA، 1995).



الصورة (4) الأجنة بعد التجميد

2. طريقة التجميد السريع (Vitrification):

جُمّد 152 جنيناً في مرحلة الأرومة الأولية (Blastocyst) بعمر 7 أيام بطريقة التجميد السريع، قسمت إلى 89 جنيناً في وسط التجميد الأول، و63 جنيناً في وسط التجميد الثاني. تألف وسط التجميد الأول من الوسط (M-PBS+ 20% سيروماً بقرياً) والغليسرول بتركيز 20%، والبروبانيدول بتركيز 20%، والوسط الثاني (M-PBS+ 20% سيروم بقري) الذي يحوي فقط الغليسرول بتركيز 20%، حيث جمعت الأجنة في أطباق بتري تحتوي على الوسط SOF المضاف إليه السيروم البقري 10% (JLTA، 1995).

2. 1. طريقة تحضير أوساط التجميد:

حُضّر وسط التجميد حسب (JLTA، 1995) وأضيف إليه 20% من السيروم البقري، جرت فلترة الأوساط باستخدام فلتر دقيق 0.22 ميكرومتراً. وتم اتزان المحاليل في درجة حرارة الغرفة (22 -30 م°).

2. 2. طريقة الخطوات التدريجية للتجميد بالطريقة السريعة في درجة حرارة الغرفة (22-30 م°):

وُضعت الأجنة في وسط التجميد الأول مدة خمس دقائق في وسط التجميد الذي يحوي 10% غليسرول، مدة خمس دقائق في وسط التجميد الذي يحوي (10% غليسرول +

10% البروبانيدول)، مدة دقيقة واحدة في وسط التجميد الذي يحوي (20% غليسرول + 20% البروبانيدول).

وضعت الأجنة في وسط التجميد الثاني مدة خمس دقائق في وسط التجميد الذي يحوي 10% غليسرول، وخمس دقائق في وسط التجميد الذي يحوي 20% غليسرول. عُبِّئت الأجنة في قشات 0.25 مل مع وسط التجميد أغلقت القشات حرارياً بعد تعبئتها بالأجنة، عُلّمت القشات حسب واقِي البرودة، ومن ثم غمرت في السائل الآزوتي -196 م°.

2. 3. استعادة حيوية الأجنة وتقييمها:

بعد تخزين الأجنة مدة 48 ساعة، أذيبت القشات الحاملة للأجنة في ماء دافئ 37 °م مدة 30 ثانية. وفرغت محتويات كل قشة في طبق بتري، ونقلت إلى محاليل الإذابة (0.5 مولاً و0.25 مولاً من محلول السكروز) وبقيت الأجنة في كل محلول 5 دقائق.

نقلت الأجنة إلى وسط التحضين، وبقيت فيه مدة خمس دقائق، وبعدها غُسلت ثلاث مرات في الوسط TCM-199 أضيف إليه 10% سيروماً بقرياً، ووضعت في طبق رباعي الحجرات تحتوي كل حجرة 0.5 مل من الوسط SOF في حاضنة درجة حرارتها 38.5 م° في جو رطب ونسبة غاز Co2 5%. مدة 3 ساعات، ثم أخرجت من الحاضنة وقيمت الأجنة شكلياً إلى أجنة صالحة للنقل وأخرى غير صالحة للنقل (JLTA، 1995).

التحليل الاحصائي:

حُلّلت البيانات إحصائياً باستخدام برنامج SAS الإصدار 6.11 لعام 1995 واستخدم اختبار Duncan لمقارنة المتوسطات على مستوى (P< 0.05). حُدّد واقي البرودة الأمثل في تجميد الأجنة، ونسبة بقاء الأجنة الحية الصالحة للنقل بعد الإذابة مباشرة بطريقتي التجميد البطيء والسريع باستخدام النموذج الخطي العام General Linear Model وفق القياسات المتكررة Repeated measurement.

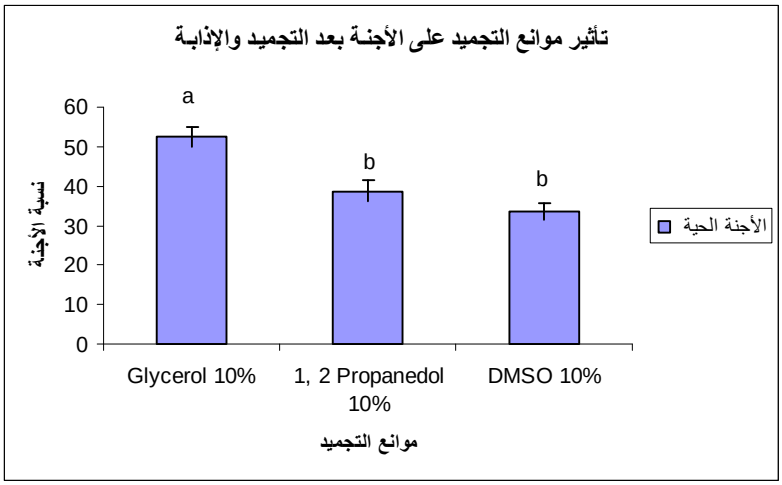
النتائج

أشارت نتائج الدراسة (الجدول 1 والشكل 2) إلى وجود فرق معنوي في فعالية واقيات البرودة (الغليسرول، والبروبانيدول، وثنائي ميتيل أكسيد الكبريت DMSO) في حماية الأجنة والمحافظة على حيويتها بعد التجميد والإذابة. فقد تبيّن أن الغليسرول كان الأفضل فيها إذ سمح في الحصول على نسبة 52.38± 2.38 من الأجنة والمحافظة عليها خلال عمليات التجميد والإذابة، في حين كان معدل بقاء الأجنة حية 38.73± 2.82 و33.61±2.17 عند استخدام البروبانيدول والـDMSO، على التوالي، ودون وجود فرق معنوي بينهما.

الجدول (1) نسبة الأجنة الحية بعد التجميد والإذابة بطريقة التجميد العاديــة (SE ± Mean) وفق واقيات البرودة

وسط التجميد	عدد الأجنة الكلي	عدد الأجنة الحية	نسبة الأجنة الحية بعد التجميد والإذابة%
الغليسرول 10%	21	11	2.38 ± [a]52.38
البروبانيدول10 %	18	7	2.82 ± [b]38.73
%10 DMSO	24	8	2.17± [b]33.61

تشير الأحرف المختلفة في العمود الواحد إلى وجود فرق معنوي (P< 0.05) بين النسب.



الشكل (2) تأثير واقيات البرودة على نسبة بقاء الأجنة بعد التجميد والإذابة في المختبر

ولوحظ وجود فرق معنوي في معدل بقاء الأجنة باستخدام طريقة التجميد السريع فـي الوسط (20% البروبانيدول + 20% غليـسرول) مقارنــةً بالوسـط 20% غليـسرولا (1.23±54.65مقارنةً مع 49.01 ±2.27) (الجدول 2).

الجدول (2) نسبة الأجنة الحية بعد التجميد والإذابة بطريقة التجميد الـسريع (SE ± Mean) باستخدام واقيات برودة مختلفة.

التجميد السريع	عدد الأجنة الكلي	عدد الأجنة الحية	نسبة الأجنة الحية بعد التجميد والإذابة%
غليسرول 20%+ بروبانيدول 20%	89	49	1.23± [a]54.65
غليسرول 20%	63	30	2.27± [b]49.01

تشير الأحرف المختلفة في العمود الواحد إلى وجود فرق معنوي (P < 0.05) بين النسب.

المناقشة

1. طريقةالتجميد البطيء:

أشارت نتائج الدراسة (الجدول 1) إلى وجود فرق معنوي بين كفاءة واقيات البرودة المستخدمة (الغليسرول بالمقارنة بداي ميثيل سولف أوكسيد DMSO) على نسبة الأجنة الحية بعد التجميد والإذابة (52.38% مقارنةً مع 33.61%، P< 0.05). وهذا يتفق مع نتائج Bouyssou وChupin (1982) عند تجميد أجنة الأبقار بالغليسرول والـ DMSO إذ أعطى الغليسرول معدل بقاء للأجنة أعلى من الـ DMSO (56% بالمقارنة مع 31%) بعد تنمية الأجنة المجمدة والمذابة مدة 24 ساعة في الحاضنة، ومع Aoyagi (1996) الذي حصل على نسبة بقاء للأجنة بعد التجميد والإذابة باستخدام الوسط PBS مع الغليسرول بنسبة 10% والبروبانيدول بنسبة 10% (77%، و52% على التوالي، P< 0.05). ولكنها أقل مما وجده Emiliani وزملاؤه (2000) الذين استخدموا البروبانيدول 1.5 مولاً والغليسرول 1.5 مولاً وكانت نسبة البقاء للأجنة في الغليسرول 75%، أمّا في البروبانيدول فكانت 88% وهي أعلى مما وجد في هذه الدراسة نظراً إلى استخدامهم وسط التجميد mHepes buffered EBBS المزود بالألبومين البقري BSA 0.5%. ومتقاربة مع نتائج Miyamoto وIshibashi (1986) اللذين استخدما الغليسرول بتراكيز مختلفة وكانت نسبة الأجنة الحية الصالحة للنقل 58% بتركيز 1.5 مولاً/لتر من الغليسرول، بينما حصلوا على أفضل نسبة بقاء للأجنة 80% عند استخدامهم الغليسرول بتركيز 2 مول، وعلى نسبة 18% عند استخدامهم الـ DMSO بتركيز 2 مول، وحصلوا على نسبة 70% عند استخدامهم البروبيلين غليكول. ومتقاربة مع نتائج Dinnyes وزملاؤه (1996) عند استخدامهم الغليسرول بتركيز(1.36 مولاً + 0.25 مول سكروز) في الوسط PBS +20% Fetal calf serum (FCS)، وحصلوا على نسبة بقاء للأجنة بعد التجميد والإذابة 57% بعد 72 ساعة من إزالة التجميد. وأقل مما وجد Kaidi وزملاؤه (2001) من معدل بقاء الأجنة حية 90% عند استخدامهم الغليسرول بتركيز(1.36 مولاً + 0.25 مول سكروز) في الوسط Embryo transfer freezing medium (Sigma ، ETF). كما كانت أقل مما وجده Rall وPolge (1984) حيث حصلا على معدل 75.4% لبقاء الأجنة بعد التجميد والإذابة.

استخدم Poitras وزملاؤه (1994) الغليسرول بنسبة 10% عند أجنة الفرس فحصلوا على معدل بقاء للأجنة بعد التجميد والإذابة في مرحلة التويتة والكيس الأصلي قدرها 48%. وحصل Le Gal وزملاؤه (1993) عندما استخدم الغليسرول بتراكيز مختلفة على نسبة بقاء لأجنة الماعز (الجسم التوتي) في المختبر بعد التجميد والإذابة قدرها 35%.

وحصل Willadsen وزملاؤه (1978) على معدل بقاء للأجنة بعد التجميد والإذابة تراوح بين 60-80%. عند استخدامهم الـ DMSO في وسط PBS بوصفه واقياً من البرودة حصل Mandelbaum وزملاؤه (1987) على معدل بقاء للأجنة مقاربة لما وجد في هذه الدراسة (31%) بعد تجميدها بالبروبانيدول، ولكن عند إضافة السكروز مع البروبانيدول حصلوا على معدل بقاء أعلى للأجنة قدرها 61%.

يقل استهلاك الغلوكوز والبيروفيت بعد التجميد من قبل الخلايا الجنينية بسبب انخفاض عدد خلايا الطبقة المغذية (Kaidi وزملاؤه، 2001). وأشار Gardner وزملاؤه (1996) إلى حدوث انخفاض في استهلاك المواد الغذائية واستقلابها من قبل الأجنة الحية بعد التجميد والإذابة بسبب التغيّر في نفاذية الجدر الخلوية.

2. طريقة التجميد السريع:

أشارت نتائج الدراسة (الجدول 2) إلى وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) في معدل بقاء الأجنة عندما جُمدت باستخدام وسطين مختلفين بالطريقة السريعة وأذيبت بعد 48 ساعة. فكان معدل بقاء الأجنة بعد التجميد والإذابة 54.65% و49.01%، على التوالي عند استخدام (20% البروبانيدول + 20% غليسرول) بالمقارنة مع 20% غليسرول. وهذا أقلّ مما وجده Donnay وزملاؤه (1998) إذ بلغ معدل بقاء الأجنة بعد 72 ساعة من التجميد والإذابة 67% عند استخدامهم لوسط التجميد (25% غليسرول + 25% ايثلين غليكول). وأقلّ من معدل بقاء الأجنة الذي وجده Kaidi وزملاؤه (2001) وقدره 80%.

كما أن معدل بقاء الأجنة في هذه الدراسة كان أقل من المعدل الذي توصل إليه Kuwayama وزملاؤه (1992) والمقدر بنحو 87% بعد 24 ساعة من الإذابة. وDinnyes وزملاؤه (1995) 81% بعد 48 ساعة من الإذابة. وMahmoudzadeh وزملاؤه (1994) المقدر بنحو 69% بعد 72 ساعة من الإذابة. وVajta وزملاؤه (1995) 84% بعد 24 ساعة من إذابة الأجنة ويعزى هذا التفاوت الملاحظ في نسبة بقاء الأجنة إلى الاختلافات في نوعية الأجنة واختلاف واقيات البرودة المستخدمة واختلاف تراكيزها.

استخدم Dinnyes وزملاؤه (1996) الغليسرول وسطاً للتجميد بتركيز 6.5 مول، و6% BSA، وPBS وحصلوا على معدل بقاء الأجنة قدره 72% و 81% بعد 72 ساعة و24 ساعة على تجميدها. في حين حصل Tan (2004) على معدل بقاء للأجنة 100% بعد التجميد بالطريقة السريعة حيث استخدم وسط التجميد 15% ايثلين غليكول +15% بروبانيدول. وحصل Fry وزملاؤه (2003) على نسبة بقاء للأجنة بعد التجميد والإذابة قدرها 90% باستخدام طريقة Cryologic Vitrification Method (CVM) حيث جمدت الأجنة على سطح صلب يحتوي السائل الآزوتي -196 م°.

بيّنت هذه الدراسة أن استخدام خليط من واقيات البرودة (20% غليسرول + 20% بروبانيدول) كان أفضل من استخدام الغليسرول (20%) وحده في نسبة بقاء الأجنة بعد التجميد والإذابة، في حين أشار Szell وزملاؤه (1989) أن تجميد الأجنة لم ينجح بالطريقة السريعة في الخليط (10% غليسرول + 40% ايثلين غليكول)، في حين كان الخليط (25% غليسرول+ 25% إيثلين غليكول) أفضل. وفي دراسات أخرى تم الحصول على معدلات بقاء أعلى للأجنة في أوساط تجميد احتوت 40% ايثلين غليكول (Mahmoudzadeh وزملاؤه، 1995). أكد Vajta وزملاؤه (1996) العمل في درجة حرارة 4^{o} م أو في درجة حرارة الغرفة مدة قصيرة لمنع تعرض الأجنة لأي صدمة. وقد أظهر Agca وزملاؤه (1994) أن درجة الحرارة يجب أن تكون ملائمة عند استخدام الإيثلين غليكول والغليسرول.

أشار Shojiro وزملاؤه (2005) أن وسط التجميد بالطريقة السريعة المؤلف من 20% غليسرول، و20% إيثلين غليكول، و0.3 مول سكروز في وسط DPBS كان أفضل من وسط التجميد المؤلف من 20% إيثلين غليكول، و20% داي ميثيل سولف أوكسيد DMSO، و20% سيروم الأبقار في الوسط TCM-199)، ووجدوا أن أجنة الأبقار المنتجة في المخبر والمجمدة بطريقة التجميد السريع مع أداة مؤلفة من كيس بلاستيكي صغير للحفاظ عليها تعطي معدلات بقاء للأجنة أعلى مقارنة بطريقة التجميد العادية. وأشار Shojiro وزملاؤه (2006) أن استخدام طريقة العروة البلاستيكية أعطت معدلات بقاء للأجنة المجمدة بالطريقة السريعة مقارنةً بالأجنة المجمدة بطريقة التجميد البطيء (94%، مقارنةً مع 66%).

استخدم Pill Park وزملاؤه (1999) شبكات دقيقة لحفظ الأجنة عند التجميد بدلاً من القشات البلاستيكية، فوجدوا أن معدل بقاء الأجنة المجفدة على قيد الحياة بعد 24 و48 ساعة والمخزنة في الشبكات الدقيقة (100% مقارنةً مع 73.3%). ولم تختلف عن الأجنة المجفدة والمحفوظة في قشات بلاستيكية، فكان معدل بقاء الأجنة على قيد الحياة بعد 24 و48 ساعة (100% مقارنةً مع 84.4%).

يُستنتج من الدراسة الحالية أفضلية استخدام الغليسرول بتركيز (10%) في وسط التجميد (M-PBS+ 20% FCS)، بطريقة التجميد البطيء slow freezing في تجميد أجنة الأجنة الأبقار المنتجة في المختبر. وقد أعطى الغليسرول 10% نسب بقاء للأجنة بعد التجميد والإذابة أعلى من البروبانيدول 10% والـ DMSO 10%.

كما أعطى الخليط (الغليسرول 20% والبروبانيدول 20%) في وسط التجميد (M-PBS+ 20% FCS)، معدلات بقاء للأجنة أعلى من الغليسرول 20% في طريقة التجميد السريع.

REFERENCES

Agca, Y., R. L. Monson, D. L. Northey, O. Abas-Mazni, and J. J. Rutledge. 1994. Post-thaw survival and pregnancy rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification. Theriogen. 41: 154.

E, Ali., S. E. Bailey, M. Toner, and T. L. Toth. 2009. Successful Cryopreservation of Mouse Oocytes by Using Low Concentrations of Trehalose and Dimethylsulfoxid. Biology of Reproduction. 80: 70–78.

Aoyagi, Y. 1996. Cryopreserving Bovine embyos with a composition comprising 4% Ethylene glycol, 4% propanediol, and bovine albumin having a lipid content of 2.5 ug or more. Patent. 5: 504.

Bouyssou. B., and D. Chupin. 1982. Two-step freezing of cattle blastocysts with dimethylsulfoxyde (DMSO) or glycerol. Theriogen. 17(2): 159-166.

Dinnyes, A., G. A. Wallace, and W. F. Rall. 1995. Effect of genotype on the efficiency of mouse embryo cryopreservation by vitrification or slow freezing methods. Mol Reprod Dev. 40: 429-435.

Dinnyes, A., C. Carolan, P. Lonergan, A. Massip and P. Mermillod. 1996. Survival of frozen or vitrivied bovine blastocysts produced in vitro in synthetic oviduct fluid. Theriogen. 46: 1425-1439.

Donnay, I., P. H. Auquier, S. Carolan, P. Lonergan, P. Mermillod, and A. Massip. 1998. Vitrification of in vitro produced bovine blastocyst: methadological studies and developmental capacity. Animal Reproduction Science. 52: 93-104.

Emiliani, S., M. Van der Bergh, A. Vannin, J. Biranane, and Y. Englert. 2000. Comparison of ethylene glycol, 1,2 propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. Human Reproduction. 15(4): 905-910.

Fry, R., C.Earl, K. Fry, and W. Lindernans. 2003. Pregnancy rates in the field after the transfer of bovine IVP embryos vitrified by the cryologic vitrification method. Theriogen. 59: 446. (Abstract).

Gardner, D. K., M. Pawelczynski, and A. Trounson. 1996. Nutrient uptake and utilization can be used to select viable day 7 bovine blastocysts after cryopreservation. Mol Reprod Dev. 44: 472-475.

Hyttel, P., H. Lehn-Jensen, and T. Greve. 1986. Ultrastructure of bovine embryos frozen and thawed by a two-step freezing method. Acta Anat. 125:27-31.

Iwasaki S, Y. Yoshikane, X. Li, S. Watanabe, and T. Nakahara. 1994. Effects of freezing of bovine preimplantation embryos derived from oocytes fertilized in vitro on survival of their inner cell mass cells. Mol Reprod. 37:272–275.

JLTA, Japan Livestock Technology Association. 1995. Manual of Bovine embryo transfer: Cryopreservation of Bovine embryos.

Kaidi, S., S. Bernard, P. Lambert, A. Massip, F. Dessy, and I. Donnay. 2001. Effect of Conventional Controlled-Rate Freezing and Vitrification on Morphology and Metabolism of Bovine Blastocysts Produced In Vitro. Biology of Reproduction. 65: 1127–1134.

Kuwayama, M., S. Hamano, and T. Nagai. 1992. Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro. J. Reprod. Fertil. 96, 187–193.

Kuwayama, M., 2005. Evidence-based embryo cryopreservation. J Mamm Ova Res. 22: 28-32.

Le Gal, F., G. Vallet and B. Leboeut. 1993. In vivo and in vitro survival of goat embryos after freezing with ethylene glycol or glycerol. Theriogen. 40: 771-777.

Mahmoudzadeh, A. R., A. Van Soom., M. T. Ysebaert, and A. de Kruif. 1994. Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of in vitro produced cattle embryos. Theriogen. 42:1389–1397.

Mahmoudzadeh, A.R., A. Van Soom, P. Bols, M.T. Ysebaert, and A. de Kruif. 1995. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced in vitro: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. J Reprod Fertil. 103: 33–39.

Mandelbaum, J., A.M. Junca, M. Plachot, M.O. Alnot1, S. Alvarez, C. Debache, J. Salat-Baroux and J. Cohen. 1987. Human embryo cryopreservation, extrinsic and intrinsic parameters of success. Human Reproduction. 2(8): 709-715.

Massip, A., P. Mermillod, and A. Dinnyes. 1995. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: Implication for their cryopreservation. Human Reproduction. 10: 3004-3011.

Miyamoto, H., and T. Ishibashi. 1986. Liquid nitrogen vapour freezing of mouse embryos. j Repro Fert. 78: 471-478.

Montag, M., B. Koll, P. Holmes, and H. van der Ven. 2000. Significance of the number of embryonic cells and the state of the the zona pellucida for hatching of mouse blastocysts in vitro versus in vivo. Biol Reprod. 62:1738-1744.

Moussa, M., I. Bersinger, P. Doliges, F. Guignot, G. Duchamp, M.Vdament, P.Mermillod, and J. Bruyas. 2005. In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: Slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. Theriogen. 64: 1619-1632.Neronov, A., P. Giurov, M. Cholakova, M. Dimttrova, and E. Nikolova. 2005. Cryoprotection of porcine cornea: a scanning electron microscopy study. Vet. Med. Czech. 50: (5): 219–224.

Partidge, R. J., A. E. Wrathall, and H. J. Leese. 1995. Glucose uptake and lactate production by single frozen-thawed bovine embryos produced in vivo or by in vitro fertilization. J Reprod Fert. 13: 41.

Patterson, J. D., 2002. Use of unique freezing technique in the freezing of bovine embryos. Thesis. Texas Tech University.

Pill Park, S., E. Y. Kim, D. I. Kim, N. H. Park, Y. S. Won, S. H. Yoon, K. S. Chung and J. H. Lim. 1999. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. Human Reproduction. 14(11): 2838-2843.

Poitras, P., P. Guay, D. Vaillancourt, N. Zidane and M. Bigras-Poulin. 1994. In vitro Viability of Cryopreserved Equine Embryos Following Different Freezing Protocols. Can J Vet Res. 58: 235-241.

Rall, W. F., and C. Polge. 1984. Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. J Reprd Fert. 70: 285-292.

Renard J.P. 1985. La conservation de lembryon de mammifere. Paris, France: Universite Pierre et Marie Curie, Paris VI. Thesis.

SAS. 1995. Users Guide: Statistics, Version 6. 11. 1995. SAS. Inst. INC.

Shojiro, K., M. Miyuki, and U. Shuji. 2005. Survivability of Vitrified Bovine Embryos Produced in Vitro Using Nylon Thread. Science Links Japan. 24: 68-72. (Abstract)

Shojiro, K., M. Miyuki, and U. Shuji. 2006. Survivability of Vitrified Bovine Embryos Produced in Vitro Using Nylon Thread (2) Developmental method of vitrification solution diluted in a straw. Science Links Japan. 25: 99-103. (Abstract)

Szell, A., J.N. Shelton, and K. Szell. 1989. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. Cryobiology. 26: 297–301.

Takagi, M., I. Sakonju, and T. Suzuki. 1996. Effects of cryopreservation on DNA synthesis in the inner cell mass of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants. J Vet Med Sci. 58:1237-1238.

Tan, Justin. 2004. Vitification of human oocytes and bovine oocytes and embryos. Presented to the ISEF Judging Committee. Canada.

Vajta, G., P. Holm, T. Greve, H. Callesen. 1995. Direct in-straw rehydration after thawing of vitrified in vitro produced bovine blastocysts. Vet Rec. 137: 672.

Vajta, G., P. Holm, T. Greve, and H. Callesen. 1996. Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. Anim Reprod Science. 45: 191–200.

Willadsen, S., C. Polge and L. E. A. Rowson. 1978. The viability of deep-frozen cow embryos. J Repro Fert. 52: 391-393.

Received	**2010/09/13**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2011/02/22**	**قبول البحث للنشر**