مجلة جامعة بابل / العلوم / العدد (3) / المجلد (14) : 2007

تنضيج واخصاب بويضات الجرذان خارج الجسم بأستعمال تقنية الانابيب الزجاجية المبتكرة

عبد الصمد عليوي **حسن رحيم عبد زيد** **عبد مجيد رشيد عواد**

كلية العلوم–جامعة بابل كلية العلوم–جامعة الكوفة المستشفى البيطري–النجف الاشرف

الخلاصة

أوضحت نتائج هذه الدراسة ان البويضات المستحصلة من الجرذان المختبرية من السلالة CDوالمنضجة في خارج الجسم بأستعمال التقنية المبتكرة عام 1998 اظهرت نموا واضحا حتى ظهور الطور الاستوائي الثاني فيها وبنسبة بلغت (83.3%) اما اعلى نسبة اختراق للنطف بلغ (80%) عند تركيز (6–8×10 ^{5})نطفة/مل,في حين بلغ اعلى معدل للبويضات المخصبة والتي اظهرت الجسم القطبي الثاني (32%)عند نفس هذا التركيز. ومن هنا يستنتج ان لتنضيج واخصاب بويضات الجرذان بأستخدام التقنية المبتكرة نتائج مضاهية للطريقة الاعتيادية والمعتمدة على حاضنة ثاني اوكسيد الكاربون والاطباق الزجاجية.

Abstract

Result of this study showed that the collected oocytes from lab CD-strains rats which were matured and fertilized by using the new technical method that used at (1998)had been grown to the second metaphase happened at a percentage (83.3%)while the high percent of sperm penetration reach(80%)at a concentration (6-8x10^5)sperm/ml.On the other hand the average of fertilized oocytes was being (32%)at the same concentration.

Conclusion observed that the new technique method presents a good equivalent results for the maturation& fertilization of rat oocytes in vitro when compared with classic method that was used CO2 incubator supplemented with Petri dishes.

المقدمة

مذ اول تطبيق لعملية الاخصاب الخارجي في الارنب بواسطة Chang (1959) توالت عملية اجراء تنضيج واخصاب بويضات اللبائن خارج الجسم, وامتدت لتشمل الهامستر الذهبي (Chang& Yanagamchi, 1963)والفأر (Whittingham, 1968)والجرذ (Toyoda&chang, 1968) والقط (Sojka and Hamner,Jennings, 1970) وخنزير غينيا (Yanagamachi, 1972) والخنزير (Harms&smidt, 1970)والابقار (Enright, 1982) والانسان(Edwards,Bavister and Steptoe, 1969)اذ جرت معظم هذه الاختبارات بأستخدام تقنية واحدة هي الحاضنة المجهزة بنسبة معينة من غاز ثاني أوكسيد الكاربون,واطباق زجاجية,واوساط زرعية متعددة (Thibault,1977).

تعد الجرذان بكافة سلالاتها من صنف اللبائن ومن رتبة القوارض,حيث انها تتصف بقدرتها على قرض الاشياء (Johnson *et al*, 1969). وقد دخلت هذه الفصيلة وبسلالاتها المتعددة في مضمار العمليات المختبرية المتضمنة اجراء اختبارات تنضيج واخصاب بويضاتها في خارج الجسم منذ حوالي الاربعين عاما. الا انه ورغم تنوع الاوساط التي زرعت فيها هذه البويضات وكذلك تنوع اطوار الغاز والمعالجات الفسيولوجية كافة, فأن الاسلوب الوحيد الذي كانت تنضج فيه هذه البويضات هو بأستخدام الحاضنة الحرارية المجهزة بطور غاز (5%)ثاني أوكسيد الكاربون,والذي اعطى تباينا كبيرا في مستوى الاخصاب خارج الجسم للجرذ ان (Evans &Armstrong, 1984).

لقد شمل التقدم العلمي والتقني في العقدين الماضيين من القرن العشرين تطورا كبيرا في مجال استحداث وتنمية افكار واساليب تزيد من نسب تنضيج واخصاب بويضات الكائنات الحية في خارج الجسم, ومؤخرا كانت واحدة من هذه الاساليب المطورة في هذا المجال,هي التقنية البديلة او المبتكرة في العراق وفي

جامعة الكوفة والتي يطلق عليها تقنية الانابيب الزجاجية المحضنة في الماء بواسطة Hassan (2000). اذ ان هذه التقنية البديلة اثبتت نجاحا واضحا في مجال تنضيج واخصاب بويضات الابقار والجمال كل على حدة وفي خارج الجسم, وذلك لما لها من امتيازات شملت الكيفية التي نصبت بها الانبوبة الزجاجية واستخدام الحمام المائي الهزاز والوسط الزراعي السائل وطور الغاز المرشح.

ان الهدف الاساس من الدراسة الحالية هو مصمم لمعرفة كفأة هذه التقنية في تنضيج واخصاب بويضات الجرذان خارج الجسم من جهة ومن جهة اخرى هو لمقارنة نمو وتطور هذه البويضات بأستخدام هذه التقنية مقارنة بتقنية الحاضنة الجافة ذات الطور الغازي المعتمد حاليا.

المواد وطرائق العمل

التنضيج خارج الجسم:استحصلت الحويصلات الناضجة وشبه الناضجة من مبايض سبعة من الاناث ذات عمر (28) يوما. بعد ذلك نقلت هذه الحويصلات الى وسط جمع الحويصلات ليبوفتز 15 -L Leibovitz tissue c0m0 (مؤسسة جبكوا,امريكا)وهو وسط جاهز ومزود بمصل دم العجول بنسبة (10%)والمضادات الحيوية بكمية (100) وحدة بنسلين /مل و(50) ملغم ستربتوماسين/مل, اذ حضنت الحويصلات في الوسط في حمام مائي هزاز ضمن انابيب سعة (50)مل, وبدرجة حرارة (37 ْم وبتجهيز طور غاز (5%) من ثاني أوكسيد الكاربون. ولم تضف الهرمونات في هذه التجربة.وبعد حوالي (18–20)ساعة من الانماء والنضج استخلصت البويضات من داخل الحويصلات وكان عددها (30)بويضة,اذ عرضت للوسط الزرعي نفسه ولكن بأضافة هرمونات المحرضة للمناسك وبتركيز(10 $^{-7}$)مولاري.بعدها سجلت النتائج ونقلت البويضات الى وسط معلق النطف لاجل الاخصاب.

<u>الاخصاب خارج الجسم</u>:تم جمع النطف من ارحام اناث الجرذ التي تمر بالدورة الشبقية وذلك بعد الجماع مباشرة ووفقا لما ذكره Shalgi وجماعته (1981).وقد خفف تركيز النطف بأستخدام وسط اخصاب الجرذان المبتاع جاهزا(Kaplan &Kraicer, 1978) وحدد تركيزه ليكون (6–8×10 ^{5})/مل. بعد ذلك حضنت عدة عينات من معلق النطف بحجم (200) مايكرومل في انابيب زجاجية موضوعة في الحمام المائي بدرجة (37 ْم ومجهزة بطور غازي (5%) ثاني أوكسيد الكاربون في الهواء.بعد حضن النطف لمدة ثلاث ساعات تضاف لكل انبوبة زجاجية (8–10)بويضات حيث يتم اول تفلج بعد حوالي(20–30)ساعة من البدء بعملية الاخصاب.وقد تم تقييم النتائج بأستخدام توزيع –ت ,t-test للمقارنة واختبار النسبة المئوية.

النتائج

يبين الجدول رقم (1)ان نسبة نضج البويضات بأستخدام التقنية المبتكرة كانت(83.3%)بعد (18–20)ساعة من الحضن.في حان كان اول ظهور للدور الاستوائي الاول بعد(5)ساعات.اما تكسر نواة البويضة فقد حصل بعد حوالي ساعتين,اما الجسم القطبي الاول فقد ظهر في نفس الوقت الذي ظهر به الطور الاستوائي الثاني وهو(12–13)ساعة.وبدا واضحا ان نسبة البويضات الناضجة في الطور الاستوائي تزداد كلما زادت مدة الحضن عن (18)ساعة.

الجدول رقم (1):يبين مراحل نمو ونضج بويضات الجرذان في خارج الجسم بأستخدام التقنية المبتكرة.

الفترة الزمنية(ساعة)	عدد البويضات	عدد البويضات المضمحلة	تكسر النواة البويضية	الدور الاستوائي الاول	الدور الاستوائي الثاني	الجسم القطبي الاول
2	30	2	28	–	–	–
5	28	1	–	27	–	–
12	27	1	–	1	25	–
15	26	–	–	–	1	25
18	26	1	–	–	–	25

اما بالنسبة لاخصاب البويضات المنفلجة في الزجاج فقد اوضحت النتائج ان التركيز المثالي من النطف المكيفة لتخصيب بويضات الجرذان المنضجة خارج الجسم هو ($10 \times 8-6$ ^{5})لكل مل مقارنة بالتركيز الادنى او الاكثر من هذا التركيز .وبعد تمام الاخصاب وجد ان نسبة البويضات الملقحة والتي خصبت في خارج الجسم وبأستخدام نفس التقنية كان حوالي (32%).اذ ظهر الجسم القطبي الثاني في هذه البويضات وبعد(24)ساعة من عملية الحضن,علما ان اعلى مستوى لاختراق النطف للبويضات المنضجة في الزجاج عند التركيز المذكور اعلاه كان(80%)والجدول (2)يبين اهم تلك النتائج

الجدول (2)يوضح اخصاب بويضات الجرذان في الزجاج بأستخدام التقنية الجديدة بعد(24)ساعة.

	البويضات المستحصلة	نسبة البويضات المنضجة	البويضات الملقحة	البويضات ذات الجسم القطبي الثاني	عدد البويضات المنفلجة
العدد	30	35/25	25/20	25/8	25/1
النسبة	(%100)	(%83.3)	(% 80)	(% 32)	(% 4)
الوقت(ساعة)	0.5-0	20-18	21	24	30

المناقشة

اوضحت النتائج المستحصل عليها في اعلاه,ان التقنية المبتكرة امست تعطي حلولا متشابهه ان لم تكن افضل لتلك التي تم التوصل اليها بأستخدام الحاضنة ذات الاطباق البلاستيكية وبدا ذلك جليا من خلال النتائج التي تم التوصل اليها,اذ ان اعلى نسبة لتكسر نواة البيضة وظهور الدور الاستوائي الاول والدور الاستوائي الثاني وكذلك الجسم القطبي الاول حصلت في أوقات هي نفسها التي تم التوصل اليها بواسطة Niwa وجماعته (1976)وبأستخدامه الحاضنة المجهزة بغاز ثنائي أوكسيد الكاربون,وهذا يدل ان النضج النووي للبويضة يمكن ان يتم تحفيزه خارج الجسم بالجرذان وبواسطة التقنية ذات الانابيب الزجاجية,ولعل من العوامل الفسلجية والنسيجية الاخرى المشاركة في هذا المضمار هو اختيار حويصلات ناضجة او في طريقها الى اطلاق البويضات,وذلك يعني ان البويضة تستطيع ان تستأنف انقسامها الاختزالي عند وصولها الى اقصى حجم لها

في الجريبة الغازية,يصحبها عادة انخفاض واضح في الفعالية التناسخية النووية للبويضة (Niwa &Chang, 1975).

اضافة الى ذلك,ساهمت المعاملة الهرمونية بهرمونات معرضة المناسل في تنضيج الجريبات, اذ انه ساعد تنضيج هذه الجريبات وتحفيز الاباضة,وكما اوضح ذلك مسبقاHsueh& Jones(1981)على الجرذان.

اما فيما يخص عملية الاخصاب الخارجي فقد بدت النسبة المستحصل عليها اليوم متشابهه,وتفوق بقليل عما توصل اليهDekel& Shalgi (1987)في دراستهم على الجرذان وفي نفس الفترة المحددة.فقد كانت اهم العوامل المساهمة في هذا المضمار هي استخدام نطف مكيفة داخل رحم اناث الجرذان,وذلك لما للرحم من بيئة حيوية وعوامل عضوية في احداث اكبر نسبة من تكيف النطف (Kaplan& Kraicer, 1978).اضافة الى ذلك ساهمت المعاملة الهرمونية في وسط تنضيج البويضات الى اعطاء وتقبل اكبر ما يمكن من تلك البويضات للاختراق الحاصل بواسطة النطف,وهذا مطابق لما اوضحه Armstrong& Evans (1948).كما ان عدم تفلج عدد كبير من البويضات المخصبة يعود الى معاملتها في الزجاج مذ تنضيجها ومرورا بتكييفها وانتهاءا بأخصابها (Vanderhyden& Armstrong,1986,Vandehyden *et al*, 1988)

ان الاستنتاج الذي امكننا التوصل اليه في هذه الدراسة هو ان الطريقة المبتكرة بواسطة (Hassan,2000)بأمكانها ان تنجح او نجحت بالفعل في اعطاء اعلى نسبة من النضج والاخصاب,وذلك لما لها من مميزات,فهي جرت بأستعمال وسط ذي تجانس حراري افضل من الحاضنة,كما انها تكون في حالة حركة مستمرة مما يمنع مكونات الوسط الزرعي من الترسب وكذلك امكن تنضسج اكبر عدد ممكن من البويضات بوساطة التقسيم المتعدد فضلا عن تميز هذه التقنية بنظام تبادل هوائي كفو

References

Chang, M.C.(1959).Fertilization of rabbit ova in vitro .Nature , lond.184,466.

Dekel, N .and R. Shalgi(1987). Fertilization in vitro of rat oocytes undergoing maturation in response to a Gn RH analogue. J. Repord. Fert. 80, 531-35.

Edwards, R.G., B.D. Bavister and P.C.Steptoe (1969).Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro .Nature, lond. 221-632.

Enright, W.(1982).Studies related to the maturation and fertilization of ovarian oocytes in the cow. M.Agr.Sc. Thesis.N.U.I., Dublin..

Evans, G.and D.T. Armstrong(1984). Reduction in fertilization rate in vitro of oocytes from immature rats induced to superovulate. J. Reprod. Fert. 70, 131.

Hamner, C.E., L.L. Jennings, and N.J. Sojka(1970). Cat spermatozoa require capacition. J. Reprod. Fert. 23, 477.

Harms, E.& D. Smidt.(1970). Untersuchungen zur in- vitro Befruchtung follikularer und tubaler Eizellen von schwein. Berl. Munch. Tierarztl. Wschr. 83, 269.

Hassan, A.U. (2000). Maturation & Fertilization of oocytes in vitro. M. Sc. Thesis. Kufa University, Iraq.

Hsueh, A. J . W. & P. B. C jones (1981). Extrapituitary action of GnRH. Endocrine Rev. 2, 437-461.

Johnson, W.,C. Delaney, E. Williams and T. Cole (1969)Principles of zoology (1 st edn) pp:342 Hott, Rinehart and Winston Inc,USA.

Kaplan, R.&P. Kraicer (1978).Effect of elevated calcium concentration on fertilization of rat oocytes in vitro. Gamete Res. 1-281-285

Niwa, K.&M.C. Chang (1975). Fertilization of rat eggs in vitro at varios times before and after ovulation with special reference to fertilization of ovarian oocytes matured in culture. J. Reprod. Fert. 43,435-451

Niwa, K.,M. Miyaka, A. Iritani, and Y. Nishikawa (1976).Fertilization of rat oocytes cultured in vitro from various stages of maturation. J. Reprod. Fert. 47,105-106

Shalgi, R., R. Kaplan, R. Nobel, and P.Kracier (1981).The male factor in fertilization of rat eggs in vitro. J. Exp. Zool. 217,499-402

Thibault, C. (1977). Hammond memorial lecture. J. Reprod. Fert. 51,1-15

Toyoda, Y.&M. Chang (1968).Sperm penetration of rat eggs in vitro after dissolution of zona pellucida by chymotrypsin. Natur, lond. 220,589.

Vandarhyden, B.C.&D.T. Armstrong (1988).Decreased embryonic survival of in vitro fertilized oocytes in rat is due to retardation of preimplantation development.J. Reprod. Fert. 83,851-857.

Vanderhyden, B.C., A. Rouleau, E.A. Walton and D.T. Armstrong (1986) Increased mortality during early embryonic development after in vitro fertilization of rat oocytes. J.Reprod. Fert. 77,401-409.

Whittingham, D.G. (1968). Fertilization of moues eggs in vitro. Jap. J. Anim. Rep. 16,147.

Yanagimachi, R. (1972). Fertilization of guinea pig eggs in vitro. Anat. Rec. 174-9.

Yanagimachi, R and M.C. Chang (1963). Fertilization of hamster eggs in vitro. Nature, lond. 200-281.