



الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الزراعة

قسم الإنتاج الحيواني

تأثير تزجيج بويضات الغنم باستخدام طريقة القشات المملوطة
المفتوحة OPS في الكفاءة التطورية الجنينية مخبرياً

The effect of vitrification of *ovine* oocytes using open pulled
straws (OPS) in the *in vitro* embryonic development

أطروحة أعدت لاستكمال متطلبات الحصول على درجة الماجستير في الهندسة الزراعية
تخصص: إنتاج حيواني - تقانات حيوية حيوانية

إعداد

م. محمد شلطف

إشراف

د. مجد الجمالي

د. محمد الصالح

تصريح

أصرح بأن هذا البحث (تأثير تزجيج بويضات الغنم باستخدام طريقة القشبات الممطوطة المفتوحة OPS في الكفاءة التطورية الجنينية مخبرياً) لم يسبق أن قدم للحصول على أية شهادة، ولا هو مقدم حالياً للحصول على أي شهادة أخرى.

المرشح: محمد شلطف

Declaration

This is hereby declared that this (**The effect of vitrification of ovine oocytes using open pulled straws (OPS) in the in vitro embryonic development**) has not been accepted for any degree or it is not submitted to any other degree.

Candidate

Mohammad Shaltaf

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الأطروحة (تأثير تزجيج بويضات الغنم باستخدام طريقة القشّات الممطوطة المفتوحة OPS في الكفاءة التطورية الجنينية مخبرياً) هو نتيجة بحث علمي قام به المرشح الطالب محمد شلطف تحت إشراف كل من الدكتور محمد الصالح (المشرف العلمي) مدرس في قسم الإنتاج الحيواني، كلية الزراعة -جامعة دمشق والدكتور مجد الجمالي (المشرف المشارك) مدرس في كلية الصيدلة -جامعة دمشق، وإن أية مراجع أخرى كرت في هذا العمل موثقة في نص الأطروحة وحسب ورودها في النص.

المشرفان

المرشح	الدكتور	الدكتور
محمد شلطف	محمد الصالح	مجد الجمالي

Certificate

It is hereby certified that the work described in this thesis "**The effect of vitrification of ovine oocytes using open pulled straws (OPS) in the in vitro embryonic development**" is the result of the authors own investigation under supervision of Dr. Mohammed ALSaleh (main supervisor) Prof at the Department of Animal Production in the Faculty of Agriculture, Damascus University and Dr. Majd Aljamali (assistant supervisor) Prof in the Faculty of Pharmacy, Damascus University. In addition, any other references mentioned in this work are documented in the text of other treatise.

Supervisors

Candidate	Prof. Dr	Prof. Dr
Mohammad shaltaf	mohammed saleh	Majd Aljamali

قائمة المصطلحات الانكليزية

المصطلحات الانكليزية	المصطلحات العربية
Age of doners	عمر المانحات
Anaphase (Ana)	طور الصعود
Apoptosis	الموت الخلوي
Artificial insemination (AI)	التلقيح الصناعي
Aspiration	السفط
Blastocyst	الكيسة الأريمية
Bovine Serum Albumin (BSA)	ألبومين المصل البقري
Buffer	دائرة
Chilling injury	أذيات البرودة
Cortical granules (C G)	حبيبات قشرية
Cryoloop	طريقة تجميد
Cryopreservation	حفظ بالبرودة
Cryoprotectants (CPAs)	واقيات برودة
Cryotop	طريقة تجميد
Culture media	وسط زراعة
Cumulus cells	خلايا ركامية
Cumulus expansion	تمدد الركام
Cumulus Oocyte Complexes (COCs)	معقد الرُّكْمَة البيضية
Cumulus oophorus	رُكْمَة مَبِيضِيَّة
Cyclic Adenosine Monophosphate	أدنيوزين أحادي الفوسفات الحلقي
Dimethyl sulphoxide (DMSO)	ثنائي ميتيل اكسيد الكبريت
Dissecting the intact follicle	تشطيب الجريب السليم

Embryonic stem cells	خلايا جذعية جنينية
equine chorionic gonadotropin (eCG)	موجهة المناسل المشيمائية الخيلية
Ethylene glycol (EG)	إيثيلين غلايكول
Fetal Calf Serum (FCS)	المصل الجنيني للعجول
First Polar body	الجسم القطبي الأول
Follicular stimulating hormone (FSH)	هرمون منبه للجريبات المبيضية
Follicle Size	حجم الجريب
Fracture damage	ضرر التكسير
Germinal vesicle (GV)	حويصلة منتشة
Germinal vesicle breakdown (GVBD)	مرحلة تهدم الحويصلة المنتشة
Gonadotropin Hormone	هُرْمُونٌ مُوجِّهٌ لِلْغُدَدِ التَّنَاسُلِيَّةِ
Hormones	هرمونات
human chorionic gonadotropin (hCG)	هرمون موجهة المناسل المشيمية البشرية
Hatching rate	معدل الفقس
Hyaluronic acid	حامض الهيالورونيك
Ice crystal formation	تشكل البلورات الجليدية
<i>In Vitro</i> Maturation (IVM)	إنضاج مخبري
<i>In Vitro</i> fertilization (IVF)	إخصاب مخبري
Luteinizing hormone (LH)	هُرْمُونٌ مُلَوِّتِن
Metaphase- II (MII)	الطور التالي الثاني من الانقسام المنصف
Metaphase-I (MI)	طور الانقسام التالي الأول
Nuclear transfer	النقل النووي
Oocyte Diameter	قطر الخلية الببيضية

Ooplasm	سايتوبلازم الخلية البيضية
Open pulled straw (OPS)	القشاش الممطوطة المفتوحة
Osmolytes	الحالات التناضحية
Osmotic stress	الإجهاد التناضحي
Ovine	غنم
Ovum pick-up (OPU)	إلتقاط الخلية البيضية
Perivitelline space	الحيز المحيط بالمح
Phosphate buffer saline (PBS)	ملح الدرع الفوسفاتي
Primary oocyte	الخلية البيضية الأولية
Prophase	الطور الابتدائي الأول
Season	فصل
Serum	مصل
Stereomicroscope	مجسام
Survival rate	معدل البقاء
Telophase	الطور النهائي
Traditional freezing	تجميد تقليدي
Vitrification	ترجيح

فهرس المحتويات

ii	تصريح
iii	شهادة
i	فهرس المحتويات
1	المخلص
2	Abstract
3	أولاً-المقدمة
5	ثانياً-الدراسة المرجعية
5	1-طرائق الحصول على الخلايا البيضية
5	1-1-من الحيوانات الحية
6	2-1-من الحيوانات المذبوحة في المسلخ
7	4-1-معايير تقييم الخلايا البيضية
11	2-الإضافات المهمة لإنضاج الخلايا البيضية مخبرياً
11	1-المصل Serum
12	2-الهرمونات Hormones
13	3-متطلبات الإنضاج المخبري
14	4-العوامل المؤثرة في إنتاج الأجنة مخبرياً
14	الموسم Season
15	قطر الجريب والخلية البيضية Follicle Size and Oocyte Diameter
15	عمر المانحات Age of Doners
15	أوساط الزراعة Culture Media
16	5-الحفظ بالتبريد Cryopreservation
17	5-1-طرائق تجميد الخلايا البيضية والأجنة
17	5-1-1-التجميد التقليدي traditional freezing
17	5-1-2-التزجيج vitrification
18	5-2-استبعاد تكون الجليد
20	5-3-تزجيج الرُّكمة البيضية COCs
21	5-4-تأثير عملية التجميد في الأجنة المنتجة داخل الرحم وخارجه
22	5-5-مزايا التزجيج ومساوئه
25	5-6-معدل التبريد والإذابة
26	5-7-تطور محاليل التزجيج
28	5-8-التزجيج باستخدام القشّات المملوطة المفتوحة OPS
29	5-9-واقبات البرودة Cryoprotectants
30	5-10-الأضرار الرئيسية للخلايا البيضية المزججة Main damages to vitrified oocytes
31	أنواع أضرار التبريد Type of cryoinjuries
31	أذيّات البرودة Chilling injury
32	تشكل البلورات الجليدية Ice crystal formation
32	ضرر التكسير Fracture damage
33	الإجهاد التناضحي Osmotic stress
34	5-11-الحفظ بالبرودة للخلايا البيضية مقارنة بالأجنة
34	-الاختلاف في الحجم
35	-الاختلاف في محتوى الماء
35	-الاختلاف في عدد الخلايا
36	ثالثاً- أهداف البحث ومبرراته

37	رابعاً-مواد البحث وطرائقه
37	1-حيوانات التجربة
38	2- جمع المبايض
39	3-جمع الرُّكُم البيضيةCOCs
40	4-المجموعات التجريبية
42	5- التحليل الإحصائي
43	خامساً- النتائج
46	سادساً- المناقشة
48	سابعاً- الاستنتاجات
48	ثامناً- التوصيات
49	تاسعاً- المراجع
49	المراجع العربية
49	References

فهرس الجداول

- جدول (1). معايير بـلتسفيـل لاختيار الخلايا البيضية البقرية.....9
- جدول (2) التركيز النهائي لمحلول التزجيج، زمن تعريض الرُّكـمة البيضية لهما قبل التزجيج، وبحسب وجود السكروز في محلولةالإذابة.....46
- جدول (3) . معدل بقاء (%) الخلايا البيضية الغنمية غير الناضجة والمزججة بطريقة OPS بعد إذابتها في وسط يحتوي السكروز أو خال منه.....50

فهرس الصور

- 41 الصورة (1): الإناث المذبوحة في المسلخ كمصدر للخلايا البيضية
- 42 الصورة (2): استخراج المبايض
- 42 الصورة (3): حفظ المبايض تمهيداً لعملية التشطيب
- 43 الصورة (4): مبيض يحتوي على العديد من الجريبات
- 43 الصورة (5): تشطيب المبايض
- 44 الصورة (6): الخلية البيضية من الدرجة الأولى
- 50 الصورة (7): الركمة البيضية بعد التزجيج/الإذابة
- 51 الصورة (8): خروج السائتوبلازم من خلية بيضية MI متضررة
- 51 الصورة (9): تكسر المنطقة الرائقة في خلية بيضية MI متضررة
- 51 الصورة (10): خلية بيضية ناضجة MII ويظهر فيها الجسم القطبي الأول
- 51 الصورة (11): خلية بيضية غير ناضجة MI ويظهر فيها بقاء الخلايا الركامية بعد الانضاج

الملخص

هدفت الدراسة الحالية إلى 1- تقييم تأثير تركيز المزججين ثنائي ميثيل أكسيد الكبريت DMSO والايثيلين غلايكول EG، 2- مقارنة زمني التعرض النهائي لهما (20 و 40 ثا)، 3- تقييم تأثير إضافة السكرور (0.5 M) إلى وسط الإذابة في معدل بقاء الخلايا البيضية غير الناضجة بعد التزجيج بطريقة القشات الممطوطة المفتوحة OPS. حضنت الرُّكُم البيضية خارج الرحم ضمن شروط مثالية للحصول على خلايا بيضية ناضجة. قُيِّمت الفروق بين المجموعات التجريبية باختبار X^2 .

أظهرت النتائج انخفاض معدل البقاء بدرجة كبيرة ($P<0.05$) مع زيادة تركيز المزججات. لم تُؤد زيادة زمن التعرض أو إضافة السكرور إلى وسط الإذابة إلى التخفيف من الآثار السلبية للتزجيج/الإذابة. يُستنتج أن لكل من محلول التزجيج (25%) وزمن التعرض (40 ثا) تأثيراً إيجابياً في معدل بقاء الخلايا البيضية الغنمية غير الناضجة.

الكلمات المفتاحية:

التزجيج , الغنم, القشات الممطوطة المفتوحة OPS, الرُّكُم البيضية COCs.

Abstract

The aims of the present study were to 1) evaluate the effect of 2 vitrificants concentrations (Dimethyl sulphoxide: DMSO and Ethylene glycol: EG). 2) compare 2 exposure time (20 and 40 sec). 3) assess the effect of adding sucrose (0.5M) to thawing medium on survival rate of *ovine* immature oocyte following vitrification with the open pulled straw: OPS method. After thawing, the Cumulus oocyte complexes: COCs were incubated *in vitro* under optimized condition to obtain M II oocytes. Differences among treatment groups for survival rates were subjected to chi-square test.

The results indicated that the survival rate significantly ($P < 0.05$) decreased as the concentration of VS increased. However, neither increasing the exposure time nor adding 0.5M sucrose to thawing medium did not alleviate ($P > 0.05$) the negative effects of vitrification/ thawing. In conclusion, both the vitrification solution (25% v/v of EG+ DMSO) and exposure time (40 sec) had a positive effect on the survival rate of *ovine* immature oocytes.

Key words:

Vitrification, *Ovine*, open pulled straw (OPS), cumulus oocyte complexes COCs.

أولاً-المقدمة

يعد الغنم من أوائل المجترات التي استؤنست وتأقلمت مع بيئات مناخية متنوعة في العالم ويعد العواس العرق الوحيد المنتشر في الجمهورية العربية السورية. تتميز غنم العواس إضافة إلى صفاتها الإنتاجية الجيدة بتأقلمها مع بيئات المراعي الفقيرة في المناطق الجافة وشبه الجافة التي لا تصلح للزراعة بشكل عام. تشير الدراسات إلى أن أفراد هذا العرق تمتلك طاقات إنتاجية كامنة ومتعددة كما تتميز بمقاومة عالية للأمراض المحلية، وتحمل كبير للظروف البيئية والغذائية والمناخية، كما أنها تستجيب للتحسين الوراثي (طليمات، 1996).

ساعدت التقانات الحيوانية الحديثة كثيراً في رفع الكفاءة التناسلية والقدرة الإنتاجية لدى كثير من الحيوانات الزراعية ومنها الغنم. يعد استخدام التلقيح الصناعي A.I الأداة الأولى والرئيسية التي ساعدت على نشر العوامل الوراثية لذكور مختبرة وعالية الإنتاج، كما أصبح من الممكن وباستخدام تقانة إنتاج الأجنة سواء داخل الرحم أم خارجه ومن ثم نقلها تعظيم الاستفادة من الطاقة الوراثية للألمات عالية الإنتاج وزيادة عدد المواليد المنتجة منها سنوياً.

إن حفظ الخلايا البيضية/ الأجنة مجمدة في الآزوت السائل يسهل كثيراً من تطبيق التقانات آفة الذكر، كما يجعلها متاحة دائماً للاستخدام في تقانات أخرى كتقانة النقل النووي nuclear transfer وأبحاث الخلايا الجذعية الجنينية embryonic stem cells.

من المؤكد أن حفظ الخلايا البيضية أو الأجنة في الآزوت السائل يخفض قليلاً من حيويتها نتيجة تكون البللورات الجليدية إلا أنه يمكن التخفيف من الآثار السلبية لعملية التجميد من خلال موازنة الخلايا البيضية أو الأجنة ضمن وسط يحتوي تراكيز مرتفعة تدريجياً من واقيات البرودة. تساعد هذه

الواقيات الخلايا عند غمسها في الآزوت السائل على تشكيل تركيب يشبه ببنيته الزجاج بحيث لا تتكون البلّورات الجليدية ضمنها أو أنها - أي البلّورات الجليدية - لا تبلغ الحجم الضار وهذا هو جوهر تقانة الحفظ بالتزجيج vitrification. تتوقف في مثل هذه "الحالة الزجاجية" عمليات التتّكس الفيزيائية والكيميائية طول فترة التخزين. وظّفت طرائق عدة في تزجيج الخلايا البيضية وأجنة الحيوانات والإنسان على حد سواء (Gordon، 2003)، تتشابه جميعها باستخدام تراكيز مرتفعة من واقيات البرودة وتتباين فيما بينها بمتطلباتها التقنية، وحوامل الأجنة. تعد طريقة القشة الممطوطة المفتوحة (OPS) Open Pulled Straw إحدى وسائل تزجيج الخلايا البيضية والأجنة وأبسطها، وقد استخدمت بنجاح كبير عند مختلف الأنواع الحيوانية، كما أن نتائج استخدامها تتشابه إلى حد كبير مقارنة بالطرائق الأكثر تعقيداً التي تتطلب تجهيزات مخبرية مكلفة. طُبقت هذه التقانة أول مرة على أجنة البقر (Vajta وزملاؤه، 1998)، وأثبتت فعاليتها بعد ذلك على أجنة المعز (-EL Gayar و Holtz، 2001)، والخلايا البيضية للغنم (Isachenko وزملاؤه، 2001) وأجنة حيوانات أخرى. يتحدد معدل التبريد الأعظمي في تقنيات التجميد التقليدي باستخدام القشات الفرنسية الصغيرة (0.25 مم) بحدود 2000°س/د أما في طريقة التزجيج باستخدام OPS فيمكن الوصول إلى معدلات تبريد أسرع تصل إلى أكثر من 20000°س/د. تتضمن هذه الطريقة تحميل الأجنة والخلايا البيضية في قشات صغيرة سبق أن تمت تحميتها ومطها لتصل إلى نصف قطر وسماكة القشة الأساسيين ثم قطعها من المنتصف بأداة حادة لنحصل على قشتين ممطوطين.

ثانياً-الدراسة المرجعية

يعد إنتاج الأجنة خارج الرحم أحد أهم التقانات التناسلية المساعدة وقد حصل Brackett وزملاؤه (1980) على حمل ناجح عند بقرة ناتج عن إخصاب خلية بيضية خارج الرحم *In Vitro* Fertilization (IVF) تطورت فيما بعد إلى جنين. تتضمن عملية إنتاج الأجنة خارج الرحم جمع الخلايا البيضية من المبايض وإنضاجها وإخصابها خارج الرحم والسماح لها بالنمو والوصول إلى مرحلة التويئة أو الكيسة الأريمية blastocyst لتنتقل بعد ذلك، أو تحفظ في الآزوت السائل لأغراض أخرى (Gordon، 2003).

1-طرائق الحصول على الخلايا البيضية

1-1-من الحيوانات الحية

تستخدم الأمواج فوق الصوتية من خلال المهبل لجمع الخلايا البيضية بطريقة إلتقاط الخلية البيضية (OPU) Ovum Pick up. بعد المعاملة الهرمونية- عندما يكون نضج الخلايا البيضية كافياً - يتم الحقن بهرمون المشيمي البشري hCG، الذي يعمل بدوره كمثيل لهرمون LH لإيصال الجريبات للمرحلة النهائية للنضج، يتم استرداد الخلايا البيضية من المبيض باستخدام إبرة سحب تخترق جدار المهبل للوصول إلى المبيض عن طريق التوجيه بمساعدة الأمواج فوق الصوتية. تسحب الخلايا البيضية من خلال الإبرة، وينقل السائل الحاوي على الخلايا البيضية إلى المختبر لتقييمها وانتقاء الصالح منها. يعد جمع الخلايا البيضية بهذه الطريقة مرتين في الأسبوع أفضل من جمعها مرة واحدة أسبوعياً لأن ظهور الجريب السائد في الحالة الثانية ربما يؤدي إلى تدهور للجريبات، وقد

أمكن جمع 10 خلايا بيضية من كل بقرة مانحة نتج عنها 2.5 جنين صالح للنقل (Mermillod، 2002).

1-2- من الحيوانات المذبوحة في المسلخ

تُجمع المبايض من الحيوانات المذبوحة في المسلخ عادة خلال نصف ساعة من الذبح على أن توضع في محلول فيزيولوجي مثل ملح الدرع الفوسفاتي (PBS) Phosphate Buffer Saline مضافاً إليه مضادات حيوية ستربتومايسين وبنسلين أو جنتاميسين مع مراعاة نقل المبايض إلى المختبر في درجة حرارة تقريباً 39°س ضمن حافظة خلال مدة لا تزيد عن ساعتين من بدء الذبح ليتم الحصول على الخلايا البيضية.

تُجمع الخلايا البيضية من مبايض إناث الحيوانات المذبوحة بطرائق عدة كتشطيب الجريب السليم Dissecting the intact follicle، والنقطيع، والسفط aspiration. تتفوق طريقة التشطيب على الطرائق الأخرى من حيث عدد الخلايا البيضية المجموعة (Martino وزملاؤه، 1994). أشار Hamano و Kawayama (1993) أن الخلايا البيضية المسحوبة من المبايض بطريقة التشطيب تمتلك قدرة أكبر على الإنضاج والإخصاب عند البقر من الطرائق الأخرى. بينما أشار EL Gaafary و Abdel Ghaffar (1994) أن معدل إنضاج الخلايا البيضية للجاموس خارج الرحم كان أكبر في حالة الجمع بواسطة السفط منه في حالة الجمع بتشطيب سطح المبيض.

4-1- معايير تقييم الخلايا البيضية

لا شك في أن الخلايا البيضية التي تستخرج من مبايض إناث مذبوحة في المسلخ تكون متباينة في مراحل تطورها أو تدهورها، وبالرغم من وجود تباينات كبيرة في نوعية الخلايا البيضية في النواحي البيولوجية والكيميائية الحيوية، إلا أن المعيار الأكثر رواجاً في مخابر الأجنة يعتمد اعتماداً مطلقاً على الناحية الشكلية، إذ تمتاز الخلية البيضية المثالية بتجانس الساييتوبلازم، وسلامة الخلايا الركامية cumulus cells المحيطة بها والتي يجب في حالة الخلايا البيضية الجيدة أن لا تقل عن ثلاث طبقات متتالية. بالرغم من اختلاف رتب المعايير الشكلية المتبعة في تقييم الخلايا البيضية من مختبر لآخر إلا أنها تتفق إلى حد كبير في المضمون، ولعل أشهر معايير التصنيف المعتمدة هي معايير بلتسفييل (جدول1).

جدول 1- معايير بلتسفييل لاختيار الخلايا البيضية البقرية

الرتبة	خصائص الركام	خصائص الساييتوبلازم
جيدة	متراس مع وجود ركام كامل أو عدة طبقات ركامية، الخلايا الحبيبية تلتصق مع الركام	منتظم، كثيف، محبب بدقة
متوسطة إلى رديئة	تكون سميكة تلتصق عادة مع الخلايا الحبيبية، لا يرى الساييتوبلازم بوضوح، الركام متراس مع وجود عدة طبقات تغطي كل أو نصف المنطقة الرائقة على الأقل	تتراوح من منتظمة، كثيفة، محببة بدقة إلى وجود حبيبات متوسطة الحجم
مرفوضة	ممتدة جزئياً أو كلياً أو متبعثرة، لا يوجد هيكل خلوي كما لا توجد خلايا ركامية، ما عدا الخلايا البيضية الصغيرة والكبيرة التي يكون فيها الركام متغير (أسود أو بني فاتح)، لا يحوي الإكليل المشع على الركام، خلايا بيضية معراة	حبيبات خشنة أو متمازجة في مناطق فاتحة جدا أو قاتمة جدا، الساييتوبلازم متغير اللون (بني فاتح أو أسود)، شكل الخلية البيضية متغير كثيراً

2-إنضاج الخلايا البيضية مخبرياً

يعد إنضاج الخلايا البيضية أهم مرحلة في برامج إنتاج الأجنة خارج الرحم، إذ أنها تتطلب توفر ظروف خاصة ومحددة من الحرارة، والغازات، والرطوبة. تعد درجة الحرارة 39°س، و CO₂ (5%)، ومدة إنضاج قدرها 24-27 ساعة كفيلاً بإيصال حوالي 90% من الخلايا البيضية المحضنة إلى مرحلة الطور التالي الثاني (M-II) Metaphase-II. يعتمد إنضاج الخلايا البيضية على مسارين يتعلق أولاهما بالإنضاج الساييتوبلازمي، أما المسار الثاني فيختص بإنضاج النواة وهو الإنضاج النووي (Mermillod وزملاؤه، 2006).

تحدث في الخلايا البيضية أثناء الإنضاج الساييتوبلازمي تغيرات شكلية وترتيب محدد في مكونات ساييتوبلازم الخلية البيضية تمهيداً لتكوين البداءتين النوويتين الذكرية والأنثوية، وفيها تهاجر الحبيبات القشرية cortical granules باتجاه ساييتوبلازم الخلية البيضية ooplasm إذ تخزن هذه الحبيبات خلال مراحل نمو الخلايا البيضية لتطلق مكمونها الإنزيمي في الحيز المحيط بالمح perivitelline space، بعد اختراق النطفة المنطقة الرائقة، تقوم تلك الإنزيمات بإحداث تغيير في نفاذيتها مما يحول دون اختراق نطف أخرى ودخولها إلى الخلية البيضية (Cran، 1989). أوضح Mermillod وزملاؤه (2006) أن الدليل الوحيد المرئي على اكتمال النضج الساييتوبلازمي للخلايا البيضية هو تمدد الخلايا الركامية cumulus expansion التي تنتج حامض الهيالورينيك hyaluronic acid الذي يلعب دوراً مهماً في زيادة الفراغ الخلوي بين الخلايا الحبيبية خلال عملية الإنضاج، لذلك فإن المحافظة على تلك الطبقة من الخلايا يعد عاملاً محدداً من عوامل نجاح الإنضاج خارج الرحم. تلعب العوامل التي تفرزها الخلية البيضية oocyte secreted factors (OSF) دوراً في تمايز

الخلايا الركامية خلال أطوار نمو الجريبات كما تتيح للخلايا الركامية إمكانية التمدد خلال الإنضاج خارج الرحم (Dragovic وزملاؤه، 2005؛ Li وزملاؤه، 2000).

لا تستطيع الخلية الببيضية خلال الإنضاج السايوتوبلازمي خارج الرحم تصنيع جميع البروتينات التي تحتاجها خلال طور النمو (Schultz، 1986) بل إن جزءاً منها يتم الحصول عليه من بروتينات المصل البقري (Glass، 1971). يعد هرمون FSH المسؤول عن إبقاء مستوى الأدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي cAMP مرتفعاً داخل الخلية الببيضية سبباً ببقائها في طور السكون، وعند انخفاض مستوى الـ FSH فإن مستوى الـ cAMP ينخفض داخل الخلية الببيضية مما يسمح بالتعاقب التطوري للخلية الببيضية لبلوغ مرحلة MII (Downs وزملاؤه، 1989). عند بدء نضج الخلية الببيضية استجابة لارتفاع مستويات الهرمونات الموجهة للمناسل قبل الإباضة بقليل، فإن الخلايا الركامية تنتج حامض الهيالورينيك، وعند امتزاج الحامض مع السوائل فإن الفراغ بين الخلايا الركامية يبدأ بالتوسع (Chen وزملاؤه، 1993).

تساعد الرُّكْمَةُ الببيضية cumulus oophorus المحيطة بالخلية الببيضية على إنضاجها خارج الرحم في البقر (Fukui و Sakuma، 1980)، والنعاج (Crosby وزملاؤه، 1980)، والمعز (Martino وزملاؤه، 1995). تلعب الخلايا الحبيبية دوراً مهماً في نقل المواد الغذائية إلى الخلية الببيضية من البيئة المحيطة (Tatemoto و Horiuchi، 1995؛ Sato وزملاؤه، 1977). أظهرت نتائج Defelici و Sitacusa (1982) بأن للخلايا الحبيبية المحيطة بالخلايا الببيضية للفئران دوراً في تقليل تصلب المنطقة الراتقة خلال الإنضاج وغيابها يزيد من تصلب المنطقة الراتقة وبالتالي إعاقه اختراق النطف وانخفاض نسبة الإخصاب.

يمثل الإنضاج النووي قدرة وقابلية الخلية البيضية الأولية للوصول إلى نهاية الانقسام الاختزالي الأول (الكفاءة التنصيفية) والذي يعرف بقدرة الخلايا البيضية بلوغ مرحلة تهدم الحوصلة الجرثومية (GVBD) Germinal vesicle breakdown، وتعاقب طور الانقسام التالي الأول MI (Metaphase-I) ثم الوصول إلى طور الانقسام التالي الثاني MII وبروز الجسم القطبي الأول (Vigneron وزملاؤه، 2004a؛ 2004b).

تكون الخلية البيضية الأولية primary oocyte ضمن الجريب الأولي متوقفة في المبيض عند الطور الابتدائي الأول Prophase-I من الانقسام المنصف الأول، وفي تلك المرحلة يدعى الشكل المدور للنواة بالحوصلة الجرثومية Germinal Vesicle (GV) إذ تكون النواة محتوية على كروماتين مبعثر (Sirard، 2001؛ Mermillod و Marchal، 1999).

تنمو الخلايا البيضية خلال المراحل الأولى لتكون الجريب مجتازة تغيرات شكلية معقدة تخزن خلالها جزيئات مختلفة كالبروتينات و RNAs التي تلعب دوراً مهماً في نجاح الإخصاب ومن ثم التطور الجنيني المبكر. تكتسب الخلايا البيضية القدرة على الانقسام الاختزالي خلال المراحل الأولى من تشكل الجريب وذلك بعد بداية ظهور التجويف الجريبي (Mermillod وزملاؤه، 2006)، يلي ذلك حاجة الخلايا البيضية إلى مرحلة ضرورية من التمايز خلال المراحل المتأخرة من النمو الجريبي للوصول إلى القدرة الكاملة للإنضاج الساييتوبلازمي (Sirard، 2001).

يتضمن استئناف الانقسام الاختزالي قبل الإباضة زوال وتلاشي الغلاف النووي أو ما يسمى تهدم الحوصلة المنتشة (GVBD)، وبلوغ طور الانقسام التالي الأول MI، وبروز الجسم القطبي الأول، والوصول إلى طور الانقسام التالي الثاني MII (Masui و Clark، 1979).

تشهد الخلايا الببيضية النامية بعد ساعات قليلة من الإنضاج خارج الرحم عملية اكتمال تلاشي الغلاف النووي GVBD (Donahue، 1968) وهذه العملية تبدأ بتموج قليل للغلاف النووي، وتستمر مع زيادة نفاذية الغلاف النووي وهذا التموج ربما يرتبط مع تكاثف الصبغيات الذي يحصل خلال تلك الفترة.

يحصل تكاثف الصبغيات خلال 20 دقيقة من تحلل الغشاء النووي، وبعد 2-3 ساعات تكتمل عملية تكاثف الصبغيات لتصبح مرتبة بشكل دائري في مركز الخلية الببيضية، ويمكن بعد 6 ساعات من الإنضاج خارج الرحم تقريباً تمييز المغزل بسهولة، ويصبح واضحاً بعد 9 ساعات في الخلايا الببيضية الفأرية، وبعد 13-15 ساعة من الإنضاج خارج الرحم يلاحظ سيادة طوري الصعود Anaphase والنهائي Telophase وخلال تلك الفترة يتكون الجسم القطبي الأول First Polar Body الذي يحوي نصف الصبغيات عند نهاية الطور النهائي الـ Telophase، ويحتوي على مكونات مختلفة مثل المتقدرات الحيوية، الريبوزومات والحبيبات القشرية.

2- الإضافات المهمة لإنضاج الخلايا الببيضية مخبرياً

1-المصل Serum

يضاف المصل البقري إلى معظم الأوساط الزرعية المستعملة في إنضاج الخلايا الببيضية خارج الرحم نظراً لاحتوائه على عوامل نمو، وهرمونات، وعوامل أخرى (Totey وزملاؤه، 1993؛ Motlik وFulka، 1986). أشار O'Callaghan وزملاؤه (2000) إلى عدم تشكل الجسم القطبي الأول للخلايا الببيضية المنضجة خارج الرحم ما لم يتم إضافة ألبومين المصل البقري Bovine Serum

BSA) Albumin) والهرمونات إلى وسط الإنضاج إذ وجد أن أفضل كمية من الـ BSA يمكن إضافتها هي 6 مايكروغرام/مل.

توجد مصادر متعددة للمصل أثبتت فعاليتها في أوساط الإنضاج والزراعة مثل المصل الجنيني للعجول (FCS) Fetal Calf Serum الذي يحتوي على بعض محفزات النمو غير المعروفة كالـ Futin الذي لا يوجد في مصل الحيوانات البالغة (Allen وزملاؤه، 1982)، إضافة إلى عدم احتوائه على بعض الهرمونات والمواد المناعية التي تعيق تطور الخلايا البيضية مخبرياً (Wright وزملاؤه، 1976). تجدر الإشارة أيضاً إلى أن المصل المأخوذ من دم إناث شبة يصلح لتهيئة بيئة مشابهة للظروف الموجودة داخل الجسم (Eppig و Schroeder، 1986).

2- الهرمونات Hormones

تكمن أهمية الهرمونات المنسلية gonadotropin hormones في تأثيرها في نشاط المبايض من خلال دخولها كعامل ضروري في عملية إنتاج الخلايا البيضية القابلة للإخصاب. لوحظ عند الارتفاع الكبير لهرمون الـ LH قبل الإباضة حصول تغير في تركيز العديد من الستيروئيدات التي تساعد على إنضاج الخلية البيضية (Apa وزملاؤه، 1995). تعد موجة هرمون الـ LH الإباضية التي تسبق الإباضة ضرورية لاستئناف الانقسام الاختزالي للخلايا البيضية (Moor وزملاؤه، 1980). يُضاف منشطي المناسل (FSH، و LH) والاستراديول إلى الأوساط الزرعية من أجل زيادة معدل إنضاج الخلايا البيضية خارج الرحم (Fukui وزملاؤه، 1982). لوحظ أن تلك الهرمونات تساهم في استئناف عملية الإنضاج داخل الجسم، كما أنها تلعب دوراً مهماً في عملية تصنيع

البروتينات التي تحتاجها الخلية البويضية خلال عملية الإنضاج، والإخصاب، والانقسامات الخلوية اللاحقة (Warnes وزملاؤه، 1977)، إضافة إلى تأثيرها في تمدد الخلايا الركامية (Gordon، 1994). النسبة المثلى الواجب إضافتها إلى الأوساط الزرعية الخاصة بالإنضاج من هرموني الـ LH:FSH هي 1:2 (Avery وزملاؤه، 1998).

3-متطلبات الإنضاج المخبري

لاشك أن إنضاج الخلايا البويضية وإخصابها خارج الرحم يتطلب توفير بعض الظروف الفيزيائية، والكيميائية، والبيولوجية المشابهة إلى حد كبير تلك التي تحيط بها داخل الجسم (Vajta وزملاؤه، 1997)، ومن المعروف أن الخلايا البويضية عند الثدييات حساسة جداً للتغيرات البيئية، وإن تحسين الطرائق العلمية المتبعة في تقانة الإنضاج خارج الرحم (IVM) يعد أمراً ضرورياً للحصول على خلايا بويضية ناضجة لها القدرة على الإخصاب والتطور الجنيني المبكر (Nagai، 2001). لوحظ أن أفضل درجة حرارة لإتمام الإنضاج خارج الرحم للخلايا البويضية في البقر تتراوح بين 38° و 39°س نظراً لكونها قريبة من درجة حرارة المستقيم (Mermillod وزملاؤه، 2006؛ Shi وزملاؤه، 1998؛ Sharma وزملاؤه، 1996). يبلغ الإجهاد التناضحي الأمثل لزرع الخلايا البويضية وإخصابها خارج الجسم هو 270-285 ميلي أوزمول (Drost، 2002).

تلعب درجة pH وسط الزراعة دوراً مهماً في الإخصاب خارج الرحم نظراً لتأثيرها المباشر في العمليات البنائية للخلية البويضية فضلاً عن تأثيرها في الفعاليات الإنزيمية، كما تؤثر في نفاذية الغشاء البلازمي وحدوث ظاهرة الإخصاب المتعدد (Verbessem وزملاؤه، 1988). تبلغ قيمة الـ

pH الخاصة بوسط الإنضاج، ووسط استعداد النطف، والإخصاب في البقر 7.4 و 7.4 و 7.8 على التوالي (Fukui، 1990)، وفي الغنم 7.3 و 7.3 و 7.7 على التوالي (Huneau وزملاؤه، 1994)، وفي المعز 7.35 و 7.3 و 7.7 على التوالي (DeSmedt وزملاؤه، 1992). استخدم على نطاق واسع غاز CO₂ بنسبة 5% في إنضاج الخلايا البيضية وإخصابها وزراعتها خارج الرحم عند مختلف الأنواع الثديية كالبقر، والخنازير، والغنم، والمعز من أجل الحفاظ على الـ pH المناسب (Hansen و Revira، 2001).

للرطوبة النسبية 95 % دوراً كبيراً في الحفاظ على مستوى الماء داخل الوسط الزراعي وعدم تبخره وبالنتيجة الحفاظ على pH الوسط الزراعي (Xu وزملاؤه، 1986). يستغرق الوقت اللازم لإنضاج الخلايا البيضية البقرية خارج الرحم 24 ساعة (Xu وزملاؤه، 1986) وهي المدة الكافية لتكوين الجسم القطبي الأول، وفي الغنم تحتاج الخلايا البيضية 25 ساعة للإنضاج (Dziuk، 1965)، وفي المعز 24-27 ساعة (Samake وزملاؤه، 2000؛ DeSmedt وزملاؤه، 1992).

4-العوامل المؤثرة في إنتاج الأجنة مخبرياً

الموسم Season

يرتبط موسم التناسل عند الغنم بالموقع الجغرافي، الظروف البيئية، والحالة الغذائية (سلهب، 2013). يؤدي الإجهاد الحراري قبل التلقيح إلى انخفاض الخصوبة لدى البقر والغنم بسبب القصور في تطور الخلية البيضية (AL-Katanani وزملاؤه، 2002؛ Rutledge وزملاؤه، 1999؛ Rocha وزملاؤه، 1998؛ Dutt، 1963).

قطر الجريب والخلية البيضية Follicle Size and Oocyte Diameter

توجد علاقة ارتباط وثيقة بين حجم الجريب والمقدرة التطورية للخلية البيضية بداخله (Kruip وزملاؤه، 2000؛ Lonergan وزملاؤه، 1994) إذ تزداد مقدرة الخلايا البيضية التطورية بازدياد حجم الجريبة في البقر (Pavlok وزملاؤه، 1992)، والغنم (Cognie وزملاؤه، 1998)، والمعز (Crozet وزملاؤه، 1995).

عمر المانحات Age of Doners

لا شك في أن استخدام الإناث صغيرة العمر كأمانات مانحة في برامج نقل الأجنة على الرغم من انخفاض المقدرة التطورية للأجنة المستحصل عليها منها يساهم إلى حد كبير في تقصير فترة الجيل ويزيد من إمكانية الاستفادة من الأمات المانحة خلال فترة حياتها (Duby وزملاؤه، 1996؛ Crozet وزملاؤه، 1995؛ Kajihara وزملاؤه، 1991؛ Betteridge وزملاؤه، 1989). تعتمد المقدرة التطورية للخلايا البيضية على عمر الأنثى المانحة والتي تكون أقل عند البكاكير بالمقارنة مع البقر التامة النمو (Camargo وزملاؤه، 2002؛ Presicce وزملاؤه، 1997).

أوساط الزراعة Culture Media

يعتمد نجاح عملية إنضاج وإخصاب الخلايا البيضية خارج الرحم على مكونات الوسط الزراعي الذي يساعد على تحفيز العمليات الحيوية داخل الخلية البيضية (Mermillod وزملاؤه، 2006). طوّرت أوساط زراعة كثيرة تتباين كثيراً فيما بينها بخصوص تركيبها الكيماوي فمنها البسيط (Trounson)

وCaro، 1984) ومنها المعقد المحتوية على البروتينات، والأحماض الأمينية، والكربوهيدرات، وعوامل نمو وهرمونات (Walf و Sokolosli، 1989).

5-الحفظ بالتبريد Cryopreservation

تعد عملية تجميد الخلايا البيضية والأجنة من التقانات التناسلية المهمة المطبقة عند الحيوانات الزراعية لما لها من ميزات فريدة في تبسيط العمل في المختبر، إذ لم تعد الحاجة ملحة لمزامنة الأمات المانحة مع نظيرتها المستقبلية. لا شك في أن أعظم فائدة من عملية التجميد تكمن في الحفاظ على جزء من المخزون الوراثي للحيوانات المرغوبة لفترات زمنية طويلة، كما تساعد في المحافظة على الموارد الوراثية للحيوانات المهددة بالانقراض (Kuwayama، 2005). واجهت عملية تجميد الأجنة لدى المجترات الصغيرة العديد من المشاكل من حيث تأثيرها في نوعية الأجنة الناتجة ومواصفاتها، إضافة إلى الأضرار التي يسببها تشكل البللورات الجليدية أو زيادة تراكيز واقيات البرودة داخل الخلايا وما يرافقه من أضرار تناضحية وأخرى سمية خلال عملية التجميد (Patterson، 2002؛ Hyttel وزملاؤه، 1986). تحفظ الأجنة أو الخلايا البيضية إما لفترة محدودة أو لفترة طويلة الأمد وتعد هذه الأخيرة الأكثر أهمية في مجال التناسل الحيواني. تحفظ الأجنة لفترات مطولة إما بتبريدها بصورة مبرمجة بطيئة أو بصورة فائقة السرعة. تتقاطع هاتان الطريقتان فيما بينهما باستخدام مواد واقية تحمي الأجنة من الأضرار الناتجة عن خفض درجات الحرارة وتتاينان فيما بينهما في نسبة استخدام هذه المواد وسرعة تخفيض درجة الحرارة. تتضمن الطريقة فائقة السرعة استخدام تراكيز عالية من واقيات البرودة وتبريد وتحمية الأجنة بسرعة فائقة.

1-5-1- طرائق تجميد الخلايا البيضية والأجنة

1-1-5- التجميد التقليدي Traditional Freezing

تخفض في هذه الطريقة درجة حرارة الوسط المحتوي على الأجنة بشكل مبرمج بمعدل 0.3 - 1 °س حتى الدرجة -32°س قبل أن تغمس في الآزوت السائل. تتعرض الأجنة خلال عملية التجميد إلى أضرار مختلفة نتيجة تشكل البلورات الجليدية داخل الأغشية الخلوية وخارجها، الأمر الذي يسبب تضرر المتقدرات الحيوية، الأغشية الخلوية والبلازما النووية، إضافة إلى أضرار هيولية وتشقق المنطقة الرائقة، وهذا يؤدي إلى تنكس كتلة الخلايا الداخلية ICM (Kaidi وزملاؤه، 2001). لوحظ بعد تجميد الأجنة بهذه الطريقة انخفاض معدل بقاء الأجنة survival rate والفقس hatching rate بعد إذابتها وزرعها لمدة 72 ساعة. يعزى الانخفاض في نسبة الفقس إلى الانخفاض في عدد الخلايا الملاحظ عند الأجنة المجمدة والمذابة (Montag وزملاؤه، 2000)، الموت الخلوي apoptosis خلال التجميد أو بعده (Kaidi وزملاؤه، 2001)، أو ناتج عن تباطؤ انقسام الخلايا الجنينية بعد التجميد (Takagi وزملاؤه، 1996).

1-5-2- التزجيج Vitrification

يرتكز تزجيج الخلايا الحية على تعريضها إلى تراكيز مرتفعة من واقيات البرودة لفترة زمنية محدودة. تسمح التراكيز المرتفعة من واقيات البرودة بزيادة لزوجة المحلول بدرجة كبيرة بحيث تؤدي عند غمسها في الآزوت السائل إلى تشكيل جسم صلب ذي بنية شبيهة بالزجاج - ومن هنا أتت التسمية "التزجيج" - إذ تغيب فيها إلى حد كبير البلورات الجليدية أو تنعدم نهائياً وذلك بحسب المادة المستخدمة في التزجيج وتركيزها وشكل الحاوية وسرعة التبريد. يمكن بهذه الطريقة التغلب على

انخفاض حيوية الأجنة والخلايا البيضوية التي تلاحظ غالباً بعد عملية التجميد بالطريقة التقليدية (Smith وزملاؤه، 2010؛ Gook و Edgar، 2007؛ Trad وزملاؤه، 1999؛ Massip وزملاؤه، 1995).

2-5- استبعاد تكون الجليد

عندما نتحدث عن فوائد التزجيج فإن أولها الذي لا يرقى إليه شك هو استبعاد مصدر رئيسي للضرر عند عملية الحفظ بالبرودة أي تكوّن البلورات الجليدية. لضمان هذه الفائدة يجب تهيئة ظروفًا صعبة تقنياً ويمكن أن تكون مؤذية، إذ لا يتحقق تزجيج أي محلول ما لم تتم زيادة التركيز المولي لمواد التزجيج بدرجة كافية بالتزامن مع خفض درجة الحرارة. فكلما كان معدل التبريد أسرع كلما كان تركيز واقي البرودة المطلوبة أقل والعكس بالعكس. من الناحية التطبيقية لا يمكن استخدام الظروف المتطرفة. على الرغم من أن استخدام تراكيز عالية جداً من واقيات البرودة يُمكن من انجاز التزجيج بمعدلات متوسطة نسبياً من تغير درجات الحرارة إلا أن هذا الإجراء سوف يعرض العينات إلى ضرر سمي وتناضحي مفرط. يتطلب إنشاء طريقة تزجيج فعّالة تحقيق توازنًا بمعنى آخر أن يخفض الضرر السمي- التناضحي بمعدلات منخفضة ما أمكن مع التزويد بالسرعة المطلوبة لعمليات التبريد والإذابة. يمكن تخفيض الضرر السمي/ التناضحي عن طريق (Vajta وزملاؤه، 2007):

- استخدام واقيات برودة ذات سمية منخفضة وعالية النفوذية (الإثيلين غلايكول أو البروبيلين غلايكول).

- استخدام اثنين أو أكثر من واقيات البرودة لتخفيض السمية النوعية لكل منهما (شريطة أن لا يكون هناك تآزر سمي بين الواقيات المختلفة).

- استخدام كلاً من الواقيات النفوذة وغير النفوذة على شكل مزيج.

- إضافة المواد الواقية على مراحل بتركيز متزايدة إلى المحلول؛ وتخفيض درجة الحرارة عند

تعرض الأجنة والخلايا البيضية إلى محاليل التزجيج النهائية (Saha وزملاؤه، 1994؛

Szell و Shelton، 1994؛ Vanderzwalmen وزملاؤه، 1989؛ Rall، 1987).

يمكن أن لا يكون دمج أفضل واقيات البرودة مع أكثر الطرق تعقيداً كافياً إذا كان التركيز النهائي المطلوب عالياً لما يترتب عليها من تأثيرات ضارة على الخلايا. كما ذكر سابقاً فإن الإجراء التطبيقي الوحيد للمحافظة على هذه التراكيز بمستوى مقبول من قبل الخلايا البيضية والأجنة هو أن نزيد معدلات التبريد والإذابة. تعد الأدوات التقليدية لطرق الحفظ بالبرودة غير كافية من أجل هذا الهدف إذ أن أقصى معدل تبريد يمكن تحقيقه عن طريق الغمس المباشر للقشات القياسية 0.25 مل في الآزوت السائل هي 2500°س/د (Palasz و Mapletoft، 1996) بسبب حجم السائل الكبير نسبياً (<5 مايكرو لتر) المطلوب من أجل تكوين عمود ثابت في القشة بدون تبعثر خلال تغيرات الضغط التي تسببها عمليات التبريد والإذابة، وبسبب السماكة النسبية للجدار البلاستيكي للقشة الذي يمثل طبقة عازلة حرارياً. تجدر الإشارة من ناحية أخرى إلى أن إذابة الأجنة المجمدة في أحد النظم المغلقة يؤدي إلى أضرار بالغة للأجنة بسبب التغيرات الحادة في الضغط داخل الحاوية المغلقة عند نقلها من الآزوت السائل إلى وسط الإذابة على درجة حرارة 38 - 39°س.

تتمثل الإمكانتان الأساسيتان لزيادة معدل التبريد والإذابة في تخفيض حجم المحلول وتقليل أو الاستبعاد الكلي للطبقة العازلة حرارياً التي تفصل المحلول المحتوي على العينة عن المادة المبردة التي هي في أغلب الأحيان الآزوت السائل كما هي الحال في أنشودة التبريد (Begin cryoloop) وزملاؤه، 2003؛ Takagi وزملاؤه، 2002؛ Oberstein وزملاؤه، 2001؛ Lane وزملاؤه، 1999). بغض النظر عن معدل التبريد العالي فإن للحجم الصغير فائدة أخرى تتمثل في تقليل فرص تكوّن البلورات الجليدية غير المتجانسة (Rall، 1987)، وتعطي فرصة لزيادة تراكيز المادة الواقية من البرودة المطلوبة من أجل إكمال ترجيح العينة بأمان. تبدو الطريقة الأكثر منطقية لتحقيق هذه الأهداف هي غمس العينة مباشرة في الآزوت السائل (Papis وزملاؤه، 2000؛ Yang و Leibo، 1999؛ Papis وزملاؤه، 1999؛ Riha، 1994؛ Landa و Tepla، 1990)، ومع ذلك لا تبدو النتيجة الفعلية جيدة كما هي الفكرة نفسها (Vajta وزملاؤه، 2007).

3-5-ترجيح الرُّكْمَة البيضية COCs

تعد عملية ترجيح الرُّكْم البيضية أفضل بديل للحفظ بالبرودة مقارنة بالخلايا البيضية الناضجة نظراً لأنها أقل عرضة للضرر في بنية الخلية البيضية لغياب مغزل الانقسام الحساس لدرجة الحرارة المنخفضة أثناء الحفظ بالبرودة (Prentice و Anzar، 2011؛ Luciano وزملاؤه، 2009). تعد عملية ترجيح الرُّكْم البيضية أساساً لبحوث وتطبيقات تجارية (Schroeder وزملاؤه، 1990) والتي كانت ناجحة في الفئران (Mahmoudi وزملاؤه، 2012؛ Eroglu وزملاؤه، 1998)، والبقرة (Anzar وزملاؤه، 2014؛ Dutta وزملاؤه، 2013)، والغنم (Moawad وزملاؤه، 2013).

Ebrahimi وزملاؤه، 2010)، والمعز (Ali وزملاؤه، 2014)، والجاموس (EL-Shahat و Hammam، 2014).

اختبرت عملية ترجيح الرُّكُم البيضية باستخدام أنواع عدة من الحاويات منها القشّات الفرنسية القياسية 0.25 mL (Dutta وزملاؤه، 2013؛ Sharma و Purohit، 2008)، والقشّات المملوطة المفتوحة OPS (Sharma و Purohit، 2008)، وطريقة Cryotop (Ebrahimi وزملاؤه، 2010) وحاملات أخرى، إذ أشارت دراسات عدة إلى إمكانية تحسين الكفاءة التطورية للرُّكُم البيضية المزججة باستخدام القشّات المملوطة المفتوحة مقارنة بالقشّات القياسية (Sharma و Purohit، 2008)، كما أنها لم تؤثر في إنضاج الخلايا البيضية أو حدوث تغير في تعبيرية المورث (Ebrahimi وزملاؤه، 2010).

4-5- تأثير عملية التجميد في الأجنة المنتجة داخل الرحم وخارجه

تختلف أجنة البقر المنتجة خارج الرحم عن نظيرتها المنتجة داخل الرحم في عدة أمور: المقدرة التطورية للأجنة، والشكل، والمقاومة للتجميد ومعدل البقاء بعد النقل. يعد تحسين طرائق حفظ الأجنة هدفاً رئيساً للدراسات الحديثة التي أشارت إلى أن التجميد السريع يمكن أن يكون مفيداً لرفع معدل البقاء (Donnay وزملاؤها، 1998). يعطي تجميد الأجنة نتائج متباينة، إذ تتضرر الأجنة خلال عمليات التجميد والإذابة، إما بتشكيل بللورات جليدية أو بزيادة تركيز واقيات البرودة داخل الخلايا وما يرافقه من تغيرات تؤدي إلى نزع الماء من الخلايا خلال عملية التجميد. كما تقلل الأضرار الناجمة عن التجميد نسبة الحمل بعد نقل الأجنة المجمدة إلى الأمهات المستقبلية (Patterson،

(2002). تتخفف قدرة الأجنة المنتجة خارج الرحم على تحمل التجميد مقارنة بنظيرتها المنتجة داخل الجسم. إذ لوحظ أن نسبة تطاول الأجنة المنتجة خارج الرحم وتحررها من المنطقة الراققة بعد التجميد والإذابة أقل من نظيرتها المنتجة داخل الرحم، ولا يزال استمرار تطور الأجنة المجمدة والمنتجة خارج الرحم بعد نقلها للألمات المستقبلية أخفض. يعزى نقص الحيوية بعد التجميد والنقل للضرر الخلوي أو الاضطراب الإستقلابي الذي يحدث خلال هذه العملية، كما أن نوعية ودرجة هذه الأضرار يمكن أن ترتبط بطريقة التجميد (Kaidi وزملاؤه، 2001؛ Donnay وزملاؤها، 1998؛ Massip وزملاؤه، 1995). يكون سايتوبلازم الأجنة المنتجة خارج الرحم داكنة وكثافتها النوعية أقل بالمقارنة مع مثيلتها المنتجة داخل الرحم، مما يرجح احتواء سايتوبلازما خلايا الأجنة المنتجة في المختبر عدداً أكبر من الحبيبات الدهنية التي تخفف الكثافة النوعية لهذه الأجنة (Leibo و Loskutoff، 1993). يمكن تجميد أجنة البقر بمرحلة 8 - 16 خلية والتي تعد حساسة للتجميد بعد إزالة الحبيبات الدهنية في السايتوبلازم قبل الانقسام (Diez وزملاؤه، 1996). يسبب تشكل جذور الأكسجين الحرة إحداث أضراراً في ليبيدات الأغشية الخلوية للأجنة المجمدة لفترة طويلة مما يؤدي إلى حدوث تغيرات في سلامة الغشاء الخلوي ونفوذيته كما هي الحال بالنسبة لمقاومة الأجنة لانخفاض الإجهاد التناضحي (Donnay وزملاؤها، 1998).

5-5-مزايا التزجيج ومساوئه

تُعَرَّض جميع طرائق الحفظ بالبرودة الأنسجة والخلايا الجنسية لبيئة لم تَعُد الحياة فيها كما أنها لا تمتلك الجينات التي تَمَكَّنُها من الحياة في مثل هذه الظروف. تقتضي طبيعة العمل بهذه الطريقة

تهيئة وضع يكون فيه الضرر أقل ما يمكن مع تطوير قدرات الدفاع والتجديد للخلايا. تتضمن أكثر آليات الضرر المعروفة التي تحدث أثناء التبريد لدرجات حرارة أقل من الصفر (بدون تدخلات خارجية لزيادة فرص الحياة) مايلي: أضرار البرودة، تشكل البلورات الجليدية وتضرر الأنسجة، ويحرّض التبريد بين +15 و -5°س على الأقل تغيرات غير عكوسة في مركبات محددة مثل القطيرات الدهنية والأغلفة الغنية بالدهون والنُّبَيَّات الدقيقة لمغزل الانقسام المنصف والفتيلي (Zenzes وزملاؤه، 2001؛ Leibo وزملاؤه، 1996؛ Martino وزملاؤه، 1996؛ Aman و Parks، 1994). تحتوي الخلايا البيضوية والأجنة من مختلف الأنواع والمراحل التطورية على كميات مختلفة من الدهون الأمر الذي يفسر اختلاف حساسيتها لأضرار التبريد. يمكن تخفيض هذه الأضرار نسبياً عن طريق:

- الإزالة الميكانيكية أو الكيميائية للقطيرات الدهنية من هيولى الخلية البيضوية (Men وزملاؤه، 2008؛ Du وزملاؤه، 2006؛ Esaki وزملاؤه، 2004).
- تمرير الخلايا البيضوية والأجنة بسرعة كبيرة جداً خلال المجال الحراري الحرج في مرحلتي التبريد والإذابة.

يُشار إلى تكوّن البلورات الجليدية في كل من الوسط المحيط مباشرة بالخلايا وداخل الخلايا على أنه المصدر الرئيسي للضرر. يمكن أن تحدث هذه الظاهرة بين -5 و -80°س (وعلى الأغلب بين -5 و -40°س) ويكون لها تأثيراً ميكانيكي على الأغلب مدمراً على معظم التراكيب الخلوية. تحاول كلا المجموعتين الرئيسيتين لطرائق الحفظ بالبرودة الناجحة أن تقلل ما أمكن من هذه التأثيرات. تعد العناصر الرئيسية في كلتي المجموعتين هي ذاتها وذلك باستخدام المواد الواقية من البرودة والتحكم

بمعدل تغيرات درجات الحرارة. إن التأثير الأكثر أهمية (لكنه ليس الوحيد) للمواد الواقية من البرودة هو تقليل تكوّن البلورات الجليدية ما أمكن عن طريق:

- نزع الماء من السيتوبلازم عن طريق التأثير التناضحي (المواد الواقية من البرودة غير النفوذة).

- تخفيض تكوّن البلورات الجليدية ونموها داخل السيتوبلازم أو في الفراغ الخارجي المحيط مباشرة بالخلايا (المواد الواقية خارج الخلايا) إلى الحد الأدنى أو منعه كلياً.

ولكن لسوء الحظ نكون باستخدام المواد الواقية من البرودة قد أدخلنا مصدراً جديداً إلى عوامل الضرر. إذ لا يوجد أيّاً من واقيات البرودة المعروفة بدون ضرر، فالواقيات النفوذة لها تأثيراً ساماً وأما غير النفوذة تُعرض الضرر التناضحي. إن حدود الضرر غير موصوفة بدقة كبيرة إلا أن معظم المواد الواقية من البرودة تظهر أضراراً سامة وأخرى تناضحية. تكون السمية نسبية بحسب تركيز المادة وزمن التعرض ويمكن تخفيضها بتخفيض درجة الحرارة، بينما يعتمد التأثير التناضحي في المحلول بشكل أساسي على التركيز وجزئياً على زمن التعرض. يمكن أن يسبب التأثير الميكانيكي للمحاليل المتصلبة والمتكسرة بين الدرجة -50 و -150°س ضرر التمزق وخصوصاً للأجسام الحيوية الكبيرة كالخلايا البيضوية والأجنة (Rall و Meyer، 1989). يمكن عند تطبيق طرائق الحفظ بالبرودة التي طُوّرت خلال العقود القليلة الماضية أن يحدث هذا النوع من الضرر بتكرار أكبر خلال الإذابة ويمكن التقليل منه بتخفيض معدل التغيرات الحرارية بصورة طفيفة في هذا المجال الحراري. من أجل نجاح الحفظ بالتبريد يجب إجراء محاولات للوصول إلى توازن مثالي كأن

نحافظ على الأضرار السمية والتناضحية بصورة منخفضة في الوقت الذي نستفيد بالصورة المثلى من تأثير واقى البرودة المانع لتكون البلورات الجليدية.

برغم كل المحاولات الكبيرة عن تحاليل العوامل الفيزيائية والكيميائية والحيوية وتطوير نماذج رياضية وتوفر أجهزة معقدة إلا أن معدلات النجاح لا تزال محدودة. يمكن القول عموماً أن حجم الجسم الحيوي ذو أهمية كبيرة فكلما كان حجم العينة أصغر كلما كانت معدلات الحياة أفضل، فمثلاً يمكن حفظ الفيروسات والبكتريا بالبرودة بطرائق بسيطة نسبياً، وقد أمكن الحصول على معدلات حياة جيدة في حال الكتل ذات الخلية الواحدة مثل معلق الزرعات وحيدة الطبقة المعاملة بالتريسين في بعض الخلايا الثديية. يأخذ الحجم أهمية خاصة حتى في حالة الأجسام الصغيرة نسبياً مثل الخلايا البيضية واللاقحات والمراحل الجنينية الأولى وهي بصورة عامة أكثر حساسية للضرر من الكيسة الأريمية. تتخفف فرص نجاح الحفظ بالبرودة بصورة كبيرة خلال فترة بسيطة بعد الفقس ومع زيادة الحجم الكلي (Vajta وزملاؤه، 2007).

5-6- معدل التبريد والإذابة

يعتمد معدل التبريد على حجم السائل الذي يجب تبريده وعلى مساحته السطحية. لذلك من الضروري اختبار المزججات في الحاويات وبنفس الحجم الذي سوف يستخدم لتزجيج الجنين. من الأهمية بمكان التنويه إلى أن العديد من المتغيرات يمكن أن تؤثر في سلوك المزجج المفترض. إذ يوجد عدة عوامل بالإضافة إلى تركيز المزجج تؤثر في كفاءة التزجيج لعل من أهمها حجم المحلول، وشكل

الحاوية. يبلغ معدل التبريد للقشاش 0.25 مل عند غمسها من درجة حرارة الغرفة بصورة مباشرة في الآزوت السائل حوالي 2500°س/د (Rall، 1987). أما معدل التخمية للقشاش 0.25 مل من - 196°س إلى 25°س فيبلغ حوالي 1000°س/د (Rall وزملاؤه، 1986). فإذا خفض الحجم إلى 1 مايكرو لتر عندئذ من الممكن زيادة معدل التبريد إلى حوالي 15000 - 30000°س/د (Vajta وزملاؤه، 1997؛ Arav و Zeron، 1997؛ Martino وزملاؤه، 1996). إذا أمكن زيادة معدلات التبريد بدرجات كبيرة فإن هذا يسمح بتخفيض التركيز المولي لمواد التزجيج دون أن يؤثر ذلك في قابلية تزجيجها عند غمسها في الآزوت السائل، وبالتالي تخفيض السمية الخلوية التي تؤثر سلباً في حيوية الأجنة. يمكن تطبيق نفس القاعدة بالنسبة لمعدلات الإحماء. تمنع معدلات الإحماء المرتفعة تكوّن ونمو نويات الجليد خلال عملية الإحماء. نتج عن استخدام معدلات إحماء بحدود 4410°س/د (عند تخمية العينة من -196°س إلى 37°س) معدلات حياة مقبولة للأجنة (Ali و Shelton، 2007).

7-5-تطور محاليل التزجيج

تتضمن المتطلبات الضرورية لعملية التزجيج تراكيز عالية من واقيات البرودة بحيث تكون غير سامة عند هذه التراكيز ومعدل تبريد سريع. الطريقة العملية المعروفة للوصول إلى معدل تبريد سريع هي الغمس في الآزوت السائل وقد اعتُمدت هذه الطريقة عالمياً كطريقة تبريد في عملية التزجيج. استخدم في تزجيج الأجنة والخلايا البيضية واقيات البرودة ذاتها التي أثبتت فعاليتها في طريقة الحفظ التقليدية. تجدر الإشارة إلى أن أكثر الواقيات المستخدمة في طريقة الحفظ التقليدية بالتبريد هي

الجليسرول وثنائي ميثيل أكسيد الكبريت. خلصت نتائج أبحاث كثيرة (Szell وزملاؤه، 1989؛ Leibo، 1984، Schneider وزملاؤه، 1983؛ Miyamoto وIshibashi، 1978؛ Whittingham وWales، 1969) إلى وجود اختلافات كبيرة بين واقيات البرودة في معدل نفاذيتها وسميتها للأجنة (Emiliani وزملاؤه، 2000؛ Ali وزملاؤه، 1993؛ Bourton، 1990). يعتمد معدل النفوذية على درجة الحرارة (Schneider وزملاؤه، 1983؛ Jackowski وزملاؤه، 1980) كما توجد اختلافات نوعية في معدل نفاذ واقيات البرودة (Szell وزملاؤه، 1989؛ Leibo، 1984؛ Schneider وزملاؤه، 1983). أصبح من الواضح مع ضرورة استخدام تراكيز عالية من واقيات البرودة في عملية التزجيج أن السمية مؤشر على درجة كبيرة من الأهمية عند اختيار أي من واقيات البرودة ملائم لهذا الغرض. لذلك يجب أن تسمح واقيات البرودة المناسبة بإنجاز عملية تزجيج الأجنة بتراكيز لا تكون سامة للأجنة خلال عمليات التبريد. بناءً على ما سبق يجب أن تتمتع واقيات البرودة المستخدمة في تزجيج الأجنة بالخصائص التالية:

- يجب أن تمكن حدوث التزجيج عندما تغمس في الآزوت السائل.
- يجب أن لا تعكس عملية التزجيج لتشكيل الجليد والتكسرات أثناء التبريد والإذابة.
- يجب أن لا تكون سامة للأجنة، إذ تتعلق السمية بزمان التعرض ودرجة الحرارة.

تتطلب الطريقة العلمية لتصميم محاليل التزجيج فهماً للمبادئ الفيزيائية الحيوية لعملية الحفظ بالبرودة. يجب أن يؤخذ بعين الاعتبار الأمور التالية:

- السمية الخلوية لواقى البرودة.
- دور أو تأثير درجة الحرارة

- التفاعل بين مختلف الجزيئات الحيوية داخل الخلية مع المزيج والإضافات الأخرى لمحلول التزجيج التي تحفز التزجيج و/أو تحمي الخلية من ضرر التبريد مثل بروتينات المصل والحالات التناضحية osmolytes للمحافظة على تكامل الغشاء والمحاليل الدائرة buffers للمحافظة على pH محلول التزجيج.

لا شك في أن تقدير مثل هذه العوامل والقوى الكيماوية والفيزيائية داخل الخلايا خلال نزع الماء والتبريد والإذابة وإعادة الماء سيكون مفيداً في تصميم مزججات فعّالة (Ali و Shelton، 2007).

8-5- التزجيج باستخدام القشّات المملوطة المفتوحة OPS

إن تعبئة وتزجيج الخلايا البيضية باستخدام القشّات المملوطة المفتوحة (OPS) يقلل من حجم محلول التزجيج في الجزء الضيق من القشة وصولاً إلى حجم 0.5 µL، إضافة إلى انخفاض مقدار العزل الحراري لجدار القشة بمعدل 10 أضعاف عندما تغمس في الآزوت السائل (Lazar وزملاؤه، 2000) ما يفيد في التخفيض الكبير أو التخلص التام من تشققات المنطقة الرائقة وهو أمر شائع الحدوث في الأجنة المجمدة بالطريقة التقليدية (Vajta وزملاؤه، 1997).

طبقت طريقة التزجيج باستخدام OPS لحفظ الخلايا البيضية لأنواع عديدة من الثدييات كالفئران (Farzad وزملاؤه، 2013؛ Cirimele، 2012؛ Liebermann، 2012)، والقطط (Mikolajewska وزملاؤه، 2012؛ Cocchia وزملاؤه، 2010)، والأرانب (Lin وزملاؤه، 2011)، والمعز (Song وزملاؤه، 2006)، والغنم (Fernandez-Reyez وزملاؤها، 2012؛ Isachenko وزملاؤه، 2001)، والبقرة (Qingwang وزملاؤه، 2003؛ Lopatarova وزملاؤه،

(2002)، والإنسان (Asrm، 2013). تؤثر المواد المستخدمة في التزجيج بشكل كبير في المقدرة التطورية للخلايا البيضية للمعز (Hai وزملاؤه، 2003)، وكان أفضل مزيج من واقيات البرودة هو (EG+DMSO) عند التزجيج باستخدام طريقة OPS (Mahmoud وزملاؤه، 2010، 2008).

9-5- واقيات البرودة Cryoprotectants

شاع استخدام واقيات البرودة في تزجيج الخلايا البيضية والتي صُنفت إلى نفوذة وغير نفوذة. من الأمثلة على واقيات البرودة النفوذة الإيثيلين غلايكول، بروبيلين غليكول، غليسيرول، وثنائي ميتيل أوكسيد الكبريت وهي ذات وزن جزيئي صغير وتعتبر بسهولة عبر غشاء الخلية (Jain و Paulson، 2006). يعد السكروز وتريهايلوز من واقيات البرودة غير النفوذة والتي تبقى في الوسط المحيط بالخلايا وتعمل نتيجة فرق الضغط التناضحي على سحب جزء من ماء الخلية مما يقلل فرص تشكل البلورات الجليدية أثناء التجميد (Guignot، 2005)، كما تعمل عند إذابة الخلايا البيضية/الأجنة على منع تدفق الماء المفرط إلى داخل الخلية، مما يقلل إنتباج الخلايا أو حتى انفجارها (Jain و Paulson، 2006). يعد الإيثيلين غلايكول من أفضل واقيات البرودة (Garg و Purohit، 2007) والذي يتمتع بنفوذية عالية إلى داخل الخلايا البيضية والتي يتم التخلص منها بسهولة بعد الإذابة، إضافة إلى أنه ينتج عنها معدلات تقسم وكيسة أريمية أعلى مع تغيرات شكلية أقل مقارنة مع ثنائي ميتيل أوكسيد الكبريت (Bhat وزملاؤه، 2013).

10-5-الأضرار الرئيسية للخلايا البيضية المزججة Main damages to vitrified oocytes

يسبب ترجيح الخلايا البيضية أضراراً بنيوية، وأخرى على المستوى الجزيئي، إذ لوحظت تغيرات شكلية وفي خيوط المغزل، وترتيب الصبغيات بعد عملية ترجيح الخلايا البيضية الغنمية (Ebrahimi وزملاؤه، 2010؛ 2012؛ Succu وزملاؤه، 2007).

تُصنف الأضرار الناتجة بعد التزجيج إلى تغيرات عكوسة وأخرى غير عكوسة. تتضمن التغيرات غير العكوسة تصلب المنطقة الرائقة الناتجة عن الإنضاج المبكر، تحرير الحبيبات القشرية. إذ أظهرت الخلايا البيضية للمعز غير الناضجة بعد التزجيج / الإذابة انخفاض في حجم الخلايا الركامية، وتشوه المنطقة الرائقة (Kharche وزملاؤه، 2005). يمكن أن يؤدي التزجيج إلى تشقق المنطقة الرائقة وتمزقها، وانكماش الساييتوبلازما، وإلى تغيرات في شكل الخلايا البيضية (Sharma وزملاؤه، 2006). أظهرت الخلايا البيضية المزججة انخفاض في معدل الإخصاب، نتيجة حدوث شذوذات صبغية (Asgari وزملاؤه، 2012). أما التغيرات العكوسة فهي تلك التي لا تسبب انخفاضاً كبيراً في حيوية الأجنة. من الأمثلة على ذلك تلك التغيرات الطفيفة التي يمكن أن تحصل في المغزل و الصبغيات والحيز المحيط بالمح (Succu وزملاؤه، 2007). أشار Bhat وزملاؤه (2014) أن تزجيج أجنة الغنم المنتجة خارج الرحم باستخدام القشات المملوطة المفتوحة أكثر فعالية من التجميد التقليدي (Green وزملاؤه، 2009). تتأثر الكفاءة التطورية للخلايا البيضية عند الغنم المزججة ب OPS بالمرحلة التطورية إذ أظهرت الخلايا البيضية بمرحلة MII مقاومة أكثر للحفظ بالبرودة مقارنة مع المراحل التطورية الأخرى لهذه الخلايا (Mo وزملاؤه، 2014). يلعب عمر الأم دوراً مهماً في معدلات إخصاب الخلايا البيضية عند البقر المزججة ب OPS إذ تفوقت الخلايا البيضية من أمات بالغة على مثيلاتها من العجلات في معدلات الإخصاب بعد الإذابة.

أشار Ali وزملاؤه (2014) أن ترجيح الرُّكْم البيضية (COCs) للمعز ب OPS أظهرت حيوية ومعدل بقاء أفضل من نظيرتها المحفوظة بالقشاش القياسية، وكذلك ارتفعت معدلات الإنضاج والكفاءة التطورية لـ COCs الجاموس المزججة ب OPS مقارنة بالقشاش القياسية (Sharma و Purohit، 2008).

بغض النظر عن الطريقة المستخدمة في التجميد، فإن معدلات الحمل الناتجة من الأجنة المجمدة/المذابة لا تزال أخفض مقارنة بالطازجة (Forman وزملاؤه، 2012).

أنواع أضرار التبريد Type of cryoinjuries

خلال الحفظ بالتبريد، تتضرر الخلايا البيضية وأجنة الثدييات بسبب وجود أشكال عديدة من الأذيات (Kusai، 2002). لذلك، يجب أن تكون شروط الحفظ مثلى وذلك لتخفيف الأذيات للحدود الدنيا والمحافظة على معدل بقاء مرتفع. تتلخص هذه الأذيات في حساسية الخلايا البيضية/ الأجنة للبرودة، وللسمية الكيميائية لواقيات البرودة، نفاذية الغشاء البلازمي للماء وواقيات البرودة CPAs، والمجال المسموح للإنتباغ والانكماش التناضحي.

أذيات البرودة Chilling injury

تحدث أذيات البرودة غالباً ما بين درجة حرارة +15°س حتى -50°س التي تعرض وبشكل جزئي تغيرات غير عكوسة في الحبيبات الدهنية، والأغشية الغنية بالدهون والأنبيبات الدقيقة لمغزل الانقسام المنصف (Martino وزملاؤه، 1996؛ Aman و Parks، 1994).

تعد أذيات البرودة أضرار شائعة الحدوث عند تطبيق تقانات التجميد البطيء، في حين يضمن التزجيج معدل تبريد عالي جداً وعبور سريع لنطاق درجة الحرارة الحرجة، وبالتالي تخفيض أذيات البرودة (Rall، 1987). تبعاً لذلك، فإن التزجيج يعد الطريقة الملائمة لحفظ الخلايا البيضية عند أنواع كثيرة من الحيوانات الزراعية كالبحر، والغنم، والخيول (Ledda وزملاؤه، 2006).

تشكل البلورات الجليدية Ice crystal formation

يعد تشكل البلورات الجليدية في الوسط المحيط بالخلايا أو داخلها مصدراً رئيسياً للضرر (Paynter، 2005)، والتي تحدث عند درجة حرارة تتراوح ما بين -5°C حتى -80°C س. يجنب التزجيج مقارنة بالتجميد البطيء الخلايا البيضية /الأجنة تشكل البلورات الجليدية من خلال تعريضها لتراكيز عالية من واقيات البرودة CPAs، ومعدلات تبريد عالية جداً (2000°C س- 20000°C س/د) عند الغمس في الآزوت السائل (Paynter، 2005).

ضرر التكسير Fracture damage

يحدث خطر أو ضرر التكسير عادةً ما بين درجة حرارة -50°C حتى -150°C س، من خلال التأثير الميكانيكي لتجميد السوائل، خصوصاً المرتبطة بالأجسام الحيوية الكبيرة مثل الخلايا البيضية و الأجنة (Rall و Meyer، 1989)، وكذلك أثناء عملية الإذابة نتيجة عبور كميات كبيرة من الماء نتيجة فرق التناضح بين الوسط داخل وخارج الخلايا في حال عدم استخدام واقيات برودة غير نفوذة

لمعادلة الإجهاد الحاصل نتيجة وجود واقيات البرودة النفوذة داخل الخلية والتي قد تسبب إنتاجها وتكسير المنطقة الراققة.

الإجهاد التناضحي Osmotic stress

خلال حفظ الخلايا بالبرودة باستخدام محاليل واقيات البرودة عالية التناضحية، تنكمش الخلايا مباشرةً ويخرج الماء استجابةً للاختلاف في الإجهاد التناضحي للمحاليل داخل وخارج الخلايا. يعد خروج الماء من الخلايا أسرع بحوالي 5000 مرة مقارنةً بالجزيئات الكبيرة والذوائب الأخرى الموجودة في السيتوبلازم ونتيجة لذلك يزداد تركيز المحلول داخل الخلية عدة مرات وفي أغلب الأحيان يكون كافياً لتحفيز التزجيج ولكن يمكن أن يكون هذا التركيز العالي ساماً (Jackowski وزملاؤه، 1980). لا تقل عملية الإذابة أهمية عن التجميد، عكس التجميد وهي هامة على حد سواء. وبما أن الخلايا البيضية والأجنة أكثر نفاذية للماء من واقيات البرودة، فإن الخلايا المجمدة تنتج أو ربما تنفجر فيما إذا وضعت في الوسط مباشرة بدون واقيات البرودة عند الإذابة. لذلك، يستخدم عادة تراكيز عالية من واقيات البرودة غير النفوذة، مثل السكروز، كواقى تناضحي لمعادلة التراكيز العالية من واقيات البرودة داخل الخلية، إذ تؤدي التغيرات في شكل الخلية إلى ضرر بنيوي وتكسر المنطقة الراققة (Wu وزملاؤه، 2006؛ Aigner وزملاؤه، 1992).

5-11-الحفظ بالبرودة للخلايا البيضية مقارنة بالأجنة

بغض النظر عن الطريقة المستخدمة للحفظ بالبرودة، فإن فرص نجاح عملية حفظ الخلايا البيضية أقل مقارنة بالأجنة في مراحل تطورها المختلفة (Prentice و Anzar، 2011) لذلك لابد من التوصل إلى إجراءات أفضل لحفظ الخلايا البيضية بالبرودة نظراً لأنها حساسة لأضرار البرودة.

- الاختلاف في الحجم

تعد الخلية البيضية أضخم خلية في جسم الثدييات. في علم البرودة، كلما كان الحجم أصغر كلما كانت نتائج الحفظ أفضل. يحدث التطور الجنيني خلال المراحل الأولى من لحظة الإخصاب وحتى مرحلة الكيسة الأريمية ضمن المنطقة الرائقة، إذ يكون الازدياد بالعدد على حساب الحجم بمعنى آخر ينتج عن كل خلية خليتين بنتين كل واحدة منهما بنصف حجم الخلية الأم تقريباً، لذلك يكون حجم الخلايا الجنينية في مرحلة الكيسة الأريمية عند تمدها 1/ 100 تقريباً من حجم الخلية البيضية (Moussa وزملاؤه، 2014). نتيجة لنسبة مساحة السطح الواسع إلى الحجم وانخفاض نفاذية الخلايا البيضية للماء، فإن هذا يجعل من المحتمل أن تحتفظ بجزء من الماء عند التجميد وهذا يؤدي إلى تشكل البلورات الجليدية داخل الخلية التي تعد مؤذية (Paynter، 2005). تعد نفاذية الغشاء البلازمي للخلايا البيضية والأجنة متغيرة خلال مراحل الإنضاج والتطور المختلفة فعلى سبيل المثال، الخلايا البيضية للبقر أقل نفوذية للماء وواقيات البرودة في كل من التويطة والكيسة الأريمية (Agca وزملاؤه، 1998). إذ يتحرك الماء، وواقيات البرودة في الخلايا البيضية/أجنة الثدييات في المراحل الأولى عبر الغشاء البلازمي ببطء بواسطة الانتشار البسيط لذلك فالتعريض

الطويل لمحاليل واقيات البرودة وعلى مرحلتين ضرورية للتخلص من ماء الخلية والسماح بدخول واقيات البرودة بشكل كافٍ. أما في التوتية والكيسة الأريمية، يحدث تحرك الماء وواقيات البرودة بسرعة عبر موصلات محكمة tight junction.

- الاختلاف في محتوى الماء

تعد الخلايا البيضية ذات محتوى ماء أعلى منه في الأجنة، حيث تعد المحاليل في جوف الكيسة الأريمية مصدر ضرر من خلال تشكل البلورات الجليدية (Hiraoka وزملاؤه، 2004؛ Son وزملاؤه، 2003).

- الاختلاف في عدد الخلايا

تستطيع الأجنة المتعددة الخلايا أن تعوض خسارة حوالي 50% من هذه الخلايا المتضررة بواسطة الخزعات وتقسيم الأجنة، في حين لا تملك الخلايا البيضية مثل هذه المقدرة على التجديد من الأذيات الخطيرة (Moussa وزملاؤه، 2014).

ثالثاً- أهداف البحث ومبرراته

نظراً لأن العديد من نعاج العواس المتميزة تستبعد أو تذبح بعد انقضاء فترة حياتها الإنتاجية التي لا تتجاوز أكثر من خمسة مواسم وهي لا تزال تحمل آلاف الخلايا البيضية في مبايضها، وبما أن هذه الخلايا البيضية تشكل مادة وراثية كامنة ورخيصة يمكن الاستفادة منها وإخصابها خارج الرحم للحصول على أجنة يمكن نقلها إلى حيوانات مستقبلية أو حفظها الذي يساعد على الاستمرار في نشر العوامل الوراثية لمثل هذه النعاج المتميزة في المستقبل. لهذا كان الإلمام بظروف جمع الخلايا البيضية وتنميتها وإخصابها خارج الرحم وبطرائق حفظها والأجنة من الخطوات المهمة والأساسية لنجاح استخدام هذه التقنية والاستفادة منها في التطبيقات العملية على الحيوانات الزراعية المنتشرة في سورية كغنم العواس، والبقر، والمعز الشامي وذلك بهدف حفظ الموارد الوراثية الحيوانية. نظراً لعدم وجود دراسات محلية في هذا المجال فقد هدفت الدراسة إلى تحديد المؤثرات التالية في معدل بقاء الخلايا البيضية بعد ترحيلها:

- 1- تأثير تركيز مزيج واقبي البرودة (EG + DMSO) و
- 2- زمن تعريض الرُّكْمَة البيضية لواقبي البرودة قبل الغمس في الآزوت السائل، و
- 3- تأثير وجود مستوى منخفض من السكرورز (واقبي برودة غير نفوذة) عند الإذابة.

رابعاً-مواد البحث وطرائقه

1-حيوانات التجربة



نُفذت الدراسة في مخبر التقانات الصيدلانية
والمناعية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية
على الرُكُم البيضية المأخوذة من مبايض
نعاج العواس المنسقة بأعمار متباينة لأسباب
مختلفة والمذبوحة في المسلخ الفني لمدينة
دمشق - الزيلطاني (الصورة 1) بمعدل مرتين
أسبوعياً خلال الفترة الممتدة من
2014/11/14 ولغاية 2015/11/10.

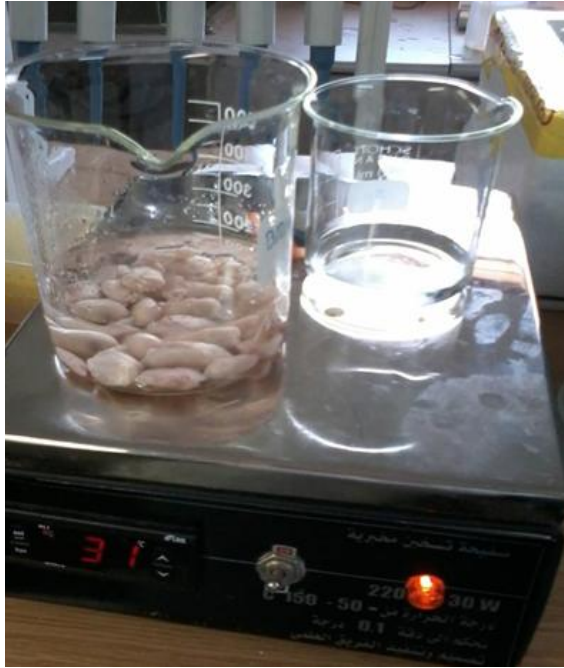
الصورة (1) الإناث المذبوحة في المسلخ كمصدر
للخلايا البيضية



الصورة (2) استخراج المبايض

2- جمع المبايض

جُمعت المبايض من النعاج بعد 10-15 دقيقة من ذبحها (الصورة 2) ضمن أنابيب فالكون (50 مل) تحتوي محلول دَرْء فوسفاتي Dulbeccos (Sigma) (PBS)phosphate buffer saline مضافاً إليه مضادات حيوية (Aldrich, 79383) وحدة دولية من (Stemcell, 07500) (Penicillin و Streptomycin / 50 مل PBS).



الصورة (3) حفظ المبايض تمهيداً لعملية

التشطيب

وُضعت أنابيب فالكون ضمن حمام مائي على الدرجة 39°س في حاوية بلاستيكية محكمة الإغلاق ثم نُقلت إلى المخبر خلال مدة لا تتجاوز الساعتين، حيث غُسلت المبايض بمحلول PBS بدرجة حرارة 39°س عدة مرات لإزالة الجلطات الدموية والشوائب العالقة عليها، ثم وُضعت في كأس يحتوي محلول دَرْء فوسفاتي على صفيحة تسخين حرارتها 39°س (الصورة 3) تمهيداً لجمع الرُّكُم البيضية منها.

3- جمع الرُّكْم البيضية COCs

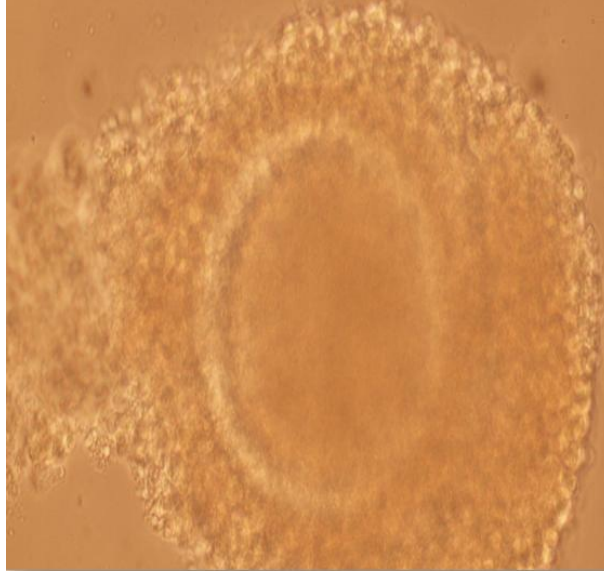
طُبِّقَت طريقة التشطيب لجمع الرُّكْم البيضية إذ شُرِّط سطح كل مبيض (الصورة 4-5) بشكل كثيف وبعده اتجاهات وعلى كامل أسطح الجريبات المبيضية باستعمال مشرط حاد، ثم غُسِلَت المبايض المشطبة لعدة مرات بمحلول الدَّرء الفوسفاتي المدفأ بدرجة حرارة 39°س واستقبلت الرُّكْم البيضية الناتجة مع السائل الجريبي في طبق بتري يحتوي بدوره على محلول دَرء فوسفاتي بدرجة حرارة 39°س و pH 7.3، مضافاً إليه 6 mL/μg من الـ BSA (Bioreba, Art No:700170) مع المضادات الحيوية (Streptomycin و Penicillin) و 20μL من الهبارين (Duopharma, (m) (SDN. BHD). أُجْري البحث عن الرُّكْم البيضية في سائل الغسيل باستخدام المِجْسام Stereomicroscope. عُرِلَت معقدات الرُّكْم البيضية من الدرجة الأولى والحاوية على أكثر من طبقتين كاملتين من الخلايا الركامية (الصورة 6) محيطة بالخلية البيضية مع تحبب سايتوبلازمي مناسب (جدول 1) باستخدام ماصة ميكروية.



الصورة (5) تشطيب المبيض



الصورة (4) مبيض يحتوي على العديد من الجريبات



الصورة (6) خلية ببيضية من الدرجة الأولى

4-المجموعات التجريبية

وُزعت الرُّكم الببيضية الغنمية ذات الدرجة الأولى على المجموعات التجريبية الموضحة في (جدول 2)، والتي أُختبر فيها:

1- تركيزان من مادتي التزجيج الايثيلين غلايكول EG وثنائي ميتيل أوكسيد الكبريت DMSO (15 و 12.5%).

2- زمنا تعرّض لمحلول التزجيج النهائي (20 ثا و 40 ثا).

3- وجود السكروز (M 0.5) في وسط الإذابة.

تمت إجراءات الموازنة والتزجيج بدرجة حرارة 39°س على صفيحة تسخين، إذ وُضعت الرُّكم الببيضية لمدة دقيقة واحدة في محلول موازنة يحتوي نصف التركيز النهائي من محلول التزجيج المكون من كل من الإيثيلين غلايكول (EG، BDH، England)، وثنائي ميتيل أوكسيد الكبريت

DMSO، (Sigma Aldrich, D2650)، في وسط الزرع RPIM-1640 (Euro Clone)، ومن ثم نُقلت إلى محلول التزجيج النهائي وترك في لمدّة 20 أو 40 ثانية بحسب مجموعات التجربة (جدول 2). حُمِلت الرُّكُم البيضية في قشّات ممطوطة مفتوحة ومن ثم غُمست في الآزوت السائل، وحُفظت فيه لمدّة لا تقل عن 3 أسابيع ريثما أُذيت وقيّمت.

أُذيت القشّات المحتوية على الرُّكُم البيضية في وسط RPIM-1640 يحتوي M 0.5 سكروز (Himedia, RM134) أو بدونه وتحت ظروف حرارية مُوحدة 39°س، تُركت الرُّكُم البيضية في الوسط الحاوي على السكروز لمدّة 5 دقائق، ثم نُقلت إلى وسط جديد خال منه. اعتُمد في تحديد معدل البقاء بعد الإذابة والإنضاج المخبري على أساس سلامة المظهر الخارجي (الصور 7-8-9) وتمدد الخلايا الركامية (Dutta وزملاؤه، 2013). أُخضعت الخلايا البيضية من جميع المجموعات التجريبية إلى ظروف إنضاج موحدة بنقلها مباشرة إلى وسط إنضاج RPIM-1640 يحتوي 10% مصل الدم البقري (FBS) (Sigma Aldrich, F-0804)، 6 ميكروغرام/مل ألبومين المصل البقري (BSA)، 20 وحدة دولية /مل من موجهة المناسل المشيمائية الخلية eCG (Laboratories Hipra, Spain)، و 10 وحدة دولية/مل من موجهة المناسل المشيمائية البشرية hCG (BBT Biotech GmbH, Germany) وحضنت فيه لمدّة 24 ساعة على الأقل في CO₂ 5% ورطوبة 90% ودرجة حرارة 39°س. قُيِّمت على إثرها الرُّكُم البيضية تحت المجهر المعكوس (Olympus, CKX41SF, Japan) بحسب تفكك الخلايا الركامية و/أو ظهور الجسم القطبي الأول إلى:

-رُّكُم بيضية أنتجت خلايا بيضية ناضجة M II (الصورة 10).

-رُكُم بيضية لم تنتج خلايا بيضية ناضجة، وظلت الخلايا البيضية فيها في مرحلة M I (الصورة 11). عُدت الخلايا البيضية في البند الأول قابلة للإخصاب، بحيث يمكن استخدامها لاحقاً لإخصابها ومتابعة تطورها الجنيني. تجدر الإشارة إلى أن معيار نجاح التزجيج في المجموعات التجريبية اقتصر على هذه النتيجة ولم يستمر لمتابعة التطور الجنيني.

جدول (2) التركيز النهائي لمحلول التزجيج، زمن تعريض الرُّكْمَة البيضية لهما قبل التزجيج، وبحسب وجود السكروز في محلولة الإذابة

المجموعات التجريبية	العدد	سكروز (مول)	زمن التعرض النهائي (ثانية)	تركيز محلول التزجيج (EG+DMSO)
1	34	0	20	%25
2	22	0.5		
3	34	0	40	
4	25	0.5		
5	36	0	20	%30
6	48	0.5		
7	39	0	40	
8	37	0.5		

5- التحليل الإحصائي

فُيِّمَت الفروق الإحصائية في معدل بقاء الخلايا البيضية الناضجة بين المجموعات التجريبية -في حال وجودها- باختبار كاي مربع X^2 باستخدام نظام التحليل الإحصائي SAS®9.2.

خامساً- النتائج

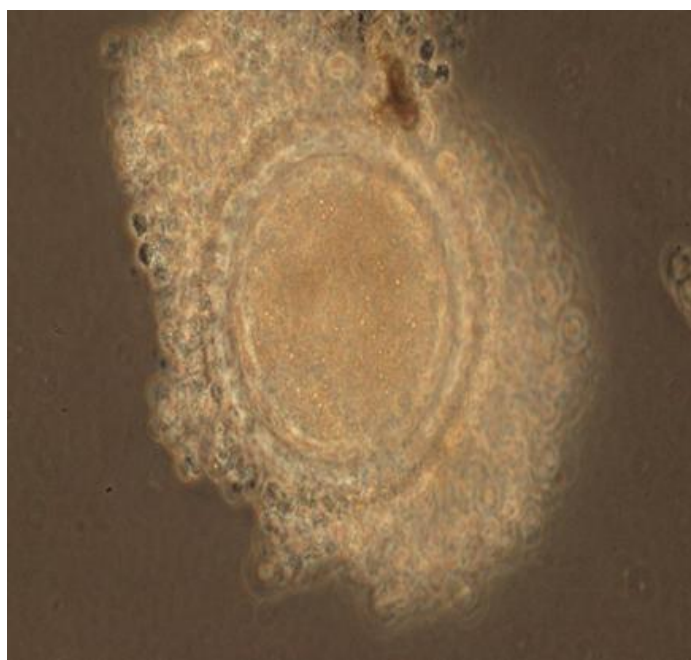
بلغت نسبة الخلايا البيضاء غير الناضجة M I التي وصلت إلى النضج في مجموعة الشاهد التي لم تتعرض لأي من محلول التزجيج 81.82%، وعند مقارنتها مع نظائرها في المجموعات التي تعرضت فيها الركم البيضاء لتراكيز مختلفة من محلولي التزجيج (vs25 و vs30)، ولفترات زمنية مختلفة (20 و 40 ثانية) خلال مرحلة التزجيج، مع الأخذ بعين الاعتبار وجود السكروز في وسط الإذابة أو عدمه، فقد لوحظ انخفاض كبير ($P<0.05$) مع زيادة تركيز محلول التزجيج إلى 30% (vs30)، وقد ساعد وجود السكروز في وسط الإذابة على تقليص ($P<0.05$) الانخفاض الحاصل في معدل البقاء بشرط زيادة زمن التعرض النهائي إلى محلول التزجيج من 20 ثا إلى 40 ثا (71.79%؛ $P>0.05$).

يبدو أن تعريض الركم البيضاء إلى محلول التزجيج vs25 لمدة 40 ثا قبل الغمس في الآزوت السائل كان الأمثل إذ حافظ معدل البقاء على مستواه المسجل في مجموعة الشاهد سواء احتوى وسط الإذابة على السكروز أم لا (82.35% و 84.00%؛ $P>0.05$). تجدر الإشارة إلى ملاحظة الأثر المفيد لإضافة السكروز إلى وسط إذابة الركم البيضاء عند تزجيجها بمحلول التزجيج ذاته (vs25) وتعريضها له لمدة 20 ثا وإن كانت هذه الزيادة ليست بالكبيرة (ارتفع معدل البقاء من 61.76% إلى 81.82% بعد إضافة السكروز؛ $P>0.05$)، لوحظ الأثر المفيد أنف الذكر للسكروز أيضاً عند تعريض الركم البيضاء إلى محلول vs30 لمدة 40 ثا إذ ارتفع معدل البقاء من 56.41% إلى 71.79%؛ ($P>0.05$) بعد إضافة 0.5 M سكروز إلى وسط الإذابة.

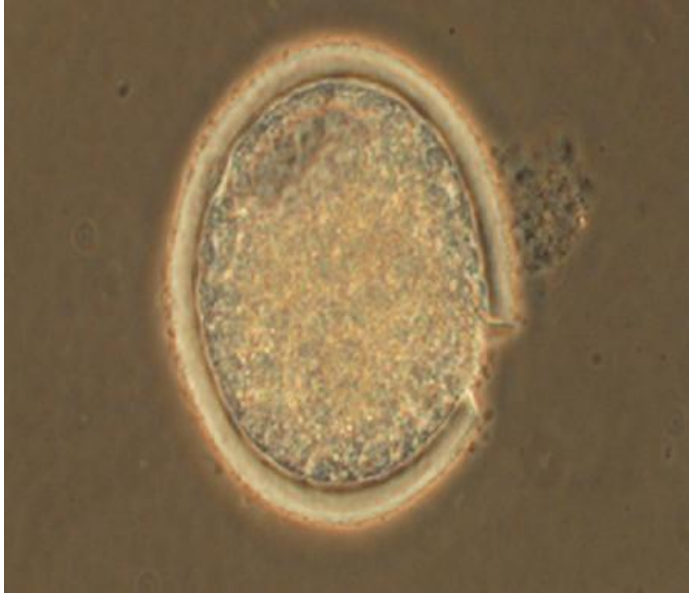
جدول (3) معدل بقاء (%) الخلايا الببيضية الغنمية غير الناضجة والمزججة بطريقة OPS بعد إذابتها في وسط يحتوي السكروز أو خال منه.

(معدل البقاء % العدد)		زمن التعرض لـ	تركيز المزججات % في
مع سكروز	بدون سكروز	VS (ثا)	محلل التزجيج VS
36(81.82) ^a		0	0
18(81.82) ^{ad}	21(61.76) ^{bc}	20	25
21(84.00) ^a	28(82.35) ^{ab}	40	
29(60.42) ^{bd}	21(58.33) ^c	20	30
28(71.79) ^{ad}	22(56.41) ^c	40	

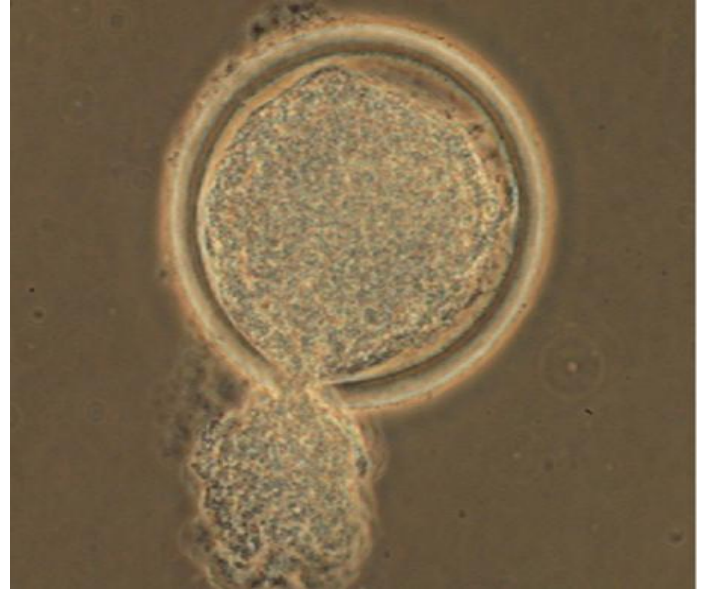
- تشير الأحرف المختلفة ضمن العمود الواحد إلى فروق معنوية ($P < 0.05$).
- لا توجد فروق إحصائية ضمن السطر الواحد ($P > 0.05$).



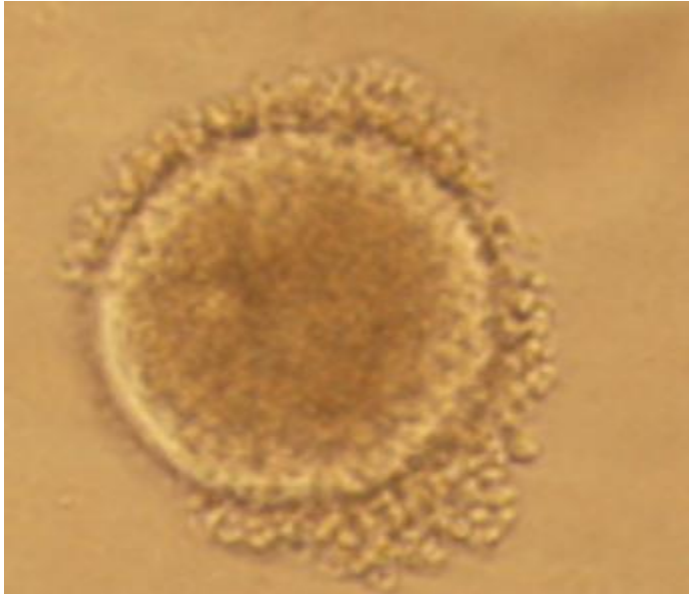
الصورة (7) الرزمة الببيضية بعد التزجيج/الإذابة



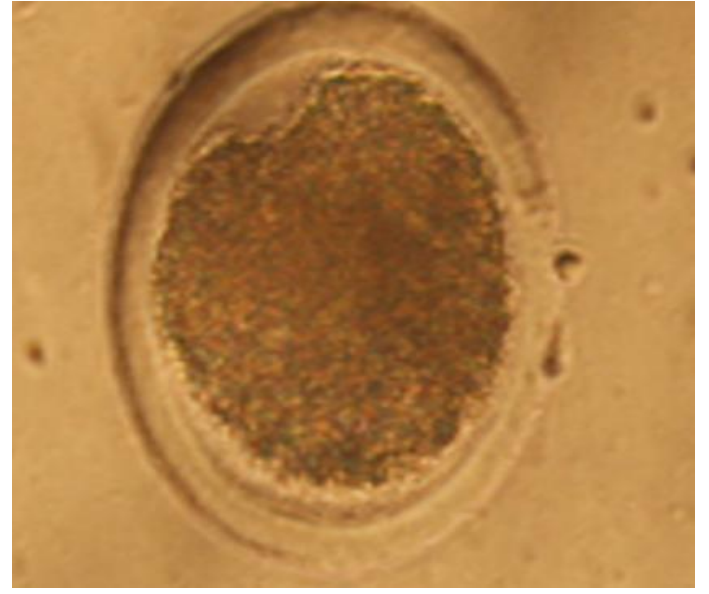
الصورة (9) تكسر المنطقة الرائقة في خلية ببيضية MI
متضررة



الصورة (8) خروج السائتوبلازم من خلية ببيضية MI
مضرة



الصورة (11) خلية ببيضية غير ناضجة ويظهر فيها بقاء
الخلايا الركامية بعد الإنضاج



الصورة (10) خلية ببيضية ناضجة MII ويظهر فيها
الجسم القطبي الأول

- المناقشة

اختيرت في الدراسة الحالية الخلايا البيضية غير الناضجة تمهيداً لترجيحها نظراً لكونها أكثر مقاومة لأضرار التزجيج من نظيرتها الناضجة لغياب مغزل الانقسام الحساس للانخفاض الكبير في درجة الحرارة (Martino وزملاؤه، 1996؛ Arav وزملاؤه، 1993؛ Lim وزملاؤه، 1999)، كما أن الخلايا الركامية المحيطة بها تلعب دوراً مهماً خلال الحفظ بالبرودة، فهي تعمل على منع تصلب الجدار الخلوي للخلية البيضية وبذلك تحميها من تأثيرات الصدمة التناضحية (Park وزملاؤه، 2001) وترفع بذلك معدلات البقاء، والتقسّم، وإنتاج الكيسة الأريمية (Zhou وزملاؤه، 2010).

يعد حفظ الخلايا البيضية الثديية في الآزوت السائل عملية معقدة جداً ويؤثر في معدل بقائها نتيجة تعرضها للعديد من الأضرار الخلوية كتمزق الغشاء البلازمي وتضرر هيكل الخلية والدنا إضافة إلى تصلب المنطقة الرائقة وحدوث اضطرابات في الوظيفة الحيوية للمتقدرات (Zander-Fox وزملاؤها، 2013؛ Asgari وزملاؤه، 2012؛ Li و Zhou، 2009؛ Succu وزملاؤه، 2007؛ Kharche وزملاؤه، 2005؛ Brevini وزملاؤه، 2005؛ Kaidi وزملاؤه، 2001؛ Pickering وزملاؤه، 1991). يشترط لنجاح تزجيج الخلايا البيضية أن توضع في وسط يحتوي تراكيز مرتفعة من المزججات النفوذة ذات التأثير السام ويمكن - بالمشاركة معها - إضافة المواد الواقية غير النفوذة التي تمارس أضراراً تناضحية. للتخفيف من الأضرار أنفة الذكر، فقد اقترحت عدة طرائق منها إضافة مزيج من المزججات النفوذة وأحياناً غير النفوذة، والتلاعب بزمان تعريض العينة الحيوية لها وكذلك سرعة خفض درجة الحرارة. ترتبط السمية بنوع المادة المزججة وتركيزها وزمان تعريض المادة الخلوية لها، وقد اختبر في الدراسة الحالية تأثير تركيز مزيج من المزججين النفوذيين DMSO و EG

ومدة التعرض لهما قبل الغمس في الآزوت السائل. يمكن القول عموماً بناءً على نتائج الدراسة الحالية أن زيادة تركيز المزججات في محلول التزجيج - مع الأخذ بعين الاعتبار زمن التعرض لها - قد خفض معدل البقاء وكان هذا التخفيض أكثر وضوحاً ($P>0.05$) مع زيادة زمن التعرض إلى 40 ثا إذ أن التراكيز المرتفعة للمزججات قد مارست تأثيراتها السمية القاتلة للخلايا (Katkov، 1998؛ Jackowski وزملاؤه، 1980)، وهذا أمر متوقع ولوحظ تكراراً ومراراً في دراسات سابقة (Hou وزملاؤه، 2005؛ Anchamparuthy وزملاؤه، 2009). أظهرت الدراسة الحالية أهمية زيادة زمن التعرض لمحلول التزجيج عندما كان تركيز المزججات منخفضاً فقد أدى ذلك بالفعل إلى ازدياد معدل البقاء في المجموعة التي إزداد فيها زمن تعريض الخلايا البيضية إلى محلول التزجيج ذي التركيز المنخفض، يمكن أن يعزى هذا التحسن إلى أهمية الوقت المطلوب لدخول المزججات إلى داخل الخلية البيضية وتجانس توزعها في السيتوبلازم البيضية (Agca وزملاؤه، 1998). تنبع أهمية زيادة زمن تعريض الخلية البيضية لمحلول التزجيج من حقيقة أنها كروية الشكل كما أنها أكبر خلايا الجسم حجماً وتتطلب بالتالي مزيداً من الوقت لضمان تجانس توزع المزججات في هيولاهها (Moussa وزملاؤه، 2014)، تتعرض الخلايا البيضية المجمدة إلى أضرار إضافية عند إذابتها نتيجة خروج المزججات منها إلى الوسط المحيط ودخول الماء وما يسببه من أضرار تناضحية (Diez وزملاؤه، 2005؛ Katkov، 1998). للتخفيف من الصدمة التناضحية تضاف المواد الواقية غير النفوذة كالسكرورز إلى وسط الإذابة. يبدو أن تركيز السكرورز المستخدم في الدراسة الحالية لم يكن ملائماً لتخفيف آثار الصدمة التناضحية على الخلايا البيضية فقد قارنا معدل البقاء survival rate للخلايا البيضية بوجود السكرورز وبدونه، ولم تظهر النتائج فروقاً إحصائية ($P>0.05$) مع

ملاحظة ارتباط التحسن البسيط مع زمن التعرض النهائي لمحلول التزجيج، ولكن مع ذلك فقد أدى إضافة M 0.5 من السكر في وسط الإذابة إلى تخفيض نسبي في الصدمة التناضحية التي تتعرض لها الخلايا البيضية أثناء الإذابة وهذا ما أدى إلى رفع معدل البقاء من 61.76% إلى 81.82% عند تعريض الخلايا البيضية لمدة 20 ثا إلى تركيز منخفض من محلول التزجيج، ومن 56.41% إلى 71.79% عند تعريض الخلايا البيضية لمدة 40 ثا إلى تركيز مرتفع من محلول التزجيج، ما يوحي بوجود تأثيرات متبادلة بين تركيز المزججات في محلول التزجيج وزمن تعريض الخلايا البيضية لها وتركيز السكر في وسط الإذابة، وهذا يتطلب مزيداً من الدراسات لأُمثلة كل من تركيز المزججات وزمن التعرض وتركيز السكر الخاصة بهذا النوع الحيواني.

سابعاً- الاستنتاجات

إن أفضل معدلات بقاء الخلايا البيضية يمكن الحصول عليها بتعريضها لمدة 40 ثا إلى محلول تزجيج يحتوي تركيزاً منخفضاً (25%) من المزججين EG و DMSO.

ثامناً- التوصيات

بالرغم من عدم ملاحظة تأثير واضح للسكر في محلول الإذابة في معدل بقاء الخلايا البيضية المزججة، إلا أن التحسن المسجل يوحي بضرورة إجراء دراسات مستفيضة بهذا الخصوص للوصول إلى التركيز المثالي من السكر في وسط الإذابة، وارتباطه بتركيز المزججات في محلول التزجيج وزمن التعرض له.

تاسعاً- المراجع

المراجع العربية

سلهب، سليمان عبد الرحمن. (2013). فيزيولوجيا التئاسل في الحيوانات الزراعية/ (ط. 1). كلية الزراعة – جامعة دمشق، 56-60.

طليمات، فرحان. (1996). موسوعة عروق الأغنام العربية، مشروع التنوع الحيوي في الدول العربية – المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد - دمشق).

References

Agca, Y., Liu, J., Peter, A., Critser, E., Critser, J. (1998). Effect of developmental stage on bovine oocyte plasma membrane water and cryoprotectant permeability characteristics. Mol Reprod Dev, 49: 408-415.

Aigner, S., Van der Elst, J., Siebzehnriibl, E., Wildt, L., Lang, N., Van Steirteghem, A. (1992). The influence of slow and ultra-rapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. Hum Reprod, 7: 857-864.

Ali, J., Shelton, J. (2007). Development of vitrification solutions. In Michael J Tucker, Juergen Liebermann, Vitrification in assisted reproduction, (PP: 45-64). Informa UK Ltd.

Ali, J., Whitten, W. K., Shelton, J. N. (1993). Effect of culture systems on mouse early embryo development. Hum Reprod, 8: 1110–1114.

Ali, R., Razzaque, W., Sharma, U., Pandey, A., Hussain, K. (2014). Survivability of caprine oocytes vitrified in conventional and open pulled straws. Turk, J. Vet. Anim. Sci, 38: 707-711.

AL-Katanani, Y. M., Paula-Lopes, F. F., Hansen, P. J. (2002). Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. J. Dairy Sci, 85: 390-396.

Allen, R. L., Bondioli, K. R., Wright, R. W. (1982). The ability of fetal calf serum. New –born calf serum and normal steer serum to promote the *in vitro* development of bovine morula. Theriogenology, 18: 185-189.

Aman, R. R., Parks, J. E. (1994). Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro*-matured bovine oocytes. Biol Reprod, 50: 103–110.

Anchamparuthy, V. M., Dhali, A., Lott, W. M., Pearson, R. E. and Gwazdauskas, F. C. (2009). Vitrification of bovine oocytes: implications of follicular size and sire on the rates of embryonic development. J Assist Reprod Genet., 26(11-12): 613–619.

- Anzar, M., Grochulski, P., Bonnet, B. (2014).** Synchrotron x-ray diffraction to detect glass or ice formation in the vitrified bovine cumulus-oocyte complexes and morulae, Plos One, 9 (12): e114801.
- Apa, R., Lazone, A., Miceli, F., Mastrandrea, M., Caruso, A., Mancuso, S., Canipari, R. (1995).** Growth hormone-releasing factors stimulates meiotic maturation in follicle and cumulus-enclosed rat oocyte. Mol. Cell. Endocr, 112: 195-201.(Abstr).
- Arav, A., Shehu, D., Mattioli, M. (1993).** Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. J Reprod Fertil, 99: 353–358.
- Arav, A., Zeron, Y. (1997).** Vitrification of bovine oocytes using modified minimum droplet size technique (MDS) is affected by the composition and concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. Theriogenology, 47: 341 (abstr).
- Asgari, V., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Azhdari, Z. T., Mosaie, M., Nasr-Esfahani, M. H. (2012).** Specific activation requirements of *in vitro*-matured sheep oocytes following vitrification-warming. Mol Reprod and Dev, 79(7): 434-444.
- Asrm, P. (2013).** Mature oocyte cryopreservation: a guideline. Fertil Steril, 99: 37-43.
- Avery, B., Hay-Schmidt, A., Hyttel, P., Greve, T. (1998).** Embryo development, oocyte. morphology and kinetics of meiotic maturation in bovine oocyte exposed to 6-dimethylamine purine prior of *in vitro* maturation. Mol. Reprod. Dev, 50: 334-344.
- Begin, I., Bhatia, B., Baldassarre, H., Dinnyes, A., Keefer, C. L. (2003).** Cryopreservation of goat oocytes and *in vivo* derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. Theriogenology, 59: 1839-1850.
- Betteridge, K. J., Smith, C., Stubbings, R. B., Xu, K. P., King, W. A. (1989).** Potential genetic improvement of cuttle by fertilization of fetal oocyte *in vitro*. J. Reprod. Fertil, 38: 87-98.
- Bhat, M. H., Sharma, V., Khan, F.A., Naykoo, N. A., Yaqoob, S. H., Vajta, G., Khan, H. M., Fazili, M. R., Ganai, N. A., Shah, R. A. (2014).** Open pulled straw vitrification and slow freezing of sheep IVF embryos using different cryoprotectants. Reproduction, Fertil and dev, Abstre.
- Bhat, M. H., Yaqoob, S. H., Khan, F. A., Waheed, S. M., Sharma, B. V., Vajta, C. G., Ganaia, N. A., Shaha, R. A. (2013).** Open pulled straw vitrification of *in vitro* matured sheep oocytes using different cryoprotectants. Small Rumin Res, v. 112, n. 1-3: 136-140.
- Bourton, P. (1990).** Levo- and dextro-2,3-butanediol and their racemic mixture: very efficient solutes for vitrification. Cryobiology, 27: 55–59.
- Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F., Dressel, M. A. (1980).** Fertilization and early development of cow oocyte. Biol Reprod. 23: 189- 205.
- Brevini, T. A., Vassena, R., Francisci, C., and Gandolfi, F. (2005).** Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes. Biol. Reprod, 72: 1218-1223.

- Camargo, L. S. A., Sa, W. F., Ferreira, A. M., Viana, H. M., Araujo, M. C. C. (2002).** Taurina no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*. *Arq Bras Med Vet Zoot*, 54: 396-404.
- Chen, L., Russell, P. T. and Larsen, W. J. (1993).** Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the pre ovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Mol, Reprod. Dev*, 34: 87-93.(Abstr).
- Cirimele, G. M. (2012).** Open pulled straw (OPS) Vitrification of *Mus musculus*, morula and blastocyst survival in two common cryopreservation medias. Degree Bachelor of Science. California Polytechnic State University, San Luis Obispo.
- Cocchia, N., Ciani, F., Russo, M., ELRass, R., Rosapane, I., Avallone, I., Tortora, G., Lorzio, R. (2010).** Immature cat oocyte vitrification in open pulled straw (OPSs) using a cryoprotectant mixture. *Cryobiology*, 60(2): 229-234.
- Cognie, Y., Benoit, F., Khatir, H., Driancourt, M. A. (1998).** Effect of follicle size and of the fecB Booroola gene on oocyte function in sheep. *J. Reprod. Fertil*, 112: 379-386.
- Cran, D. G. (1989).** Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. *J Reprod Fertil Suppl*, 38:49-62.
- Crosby, I. M., Osborn, J., Cand moor, R. M. (1980).** Fullicle cell regulation of protein synthesis and development competence in sheep oocyte: *J. Reprod, Fertil*, 62: 575-582.
- Crozet, N., Ahmad-Ali, M., Dubos, M. P. (1995).** Development competence of goat oocyte from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture. *In vitro. J. Reprod. Fertil*, 103: 293-298.
- Defelici, M., Siracusa, G. (1982).** "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocyte during *in vitro* culture. II. The effect of follicular fluid and glycosaminoglycan. *Game Res*, 12: 227-235.
- DeSmedt, V., Crozed, N., Ahmed-Ali, M., Martino, A., Cogine, Y. (1992).** *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology*, 37:1049-1060.
- Diez, C., Duque, P., Gomez, E., Hidalgo, C. O., Tamargo, C., Rodríguez, A., Fernández, L., de la Varga, S., Fernández, A., Facal, N. and Carbajo, M. (2005).** Bovine oocytes vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultra structure and developmental ability. *Theriogenology*, 64 (2): 317-333.
- Diez, C., LeBourhis, D., Heyman, Y., Renard, J. P. (1996).** Effect of partial lipid removal from *in vitro* produced bovine zygotes on further development *in vitro* and on the freezing tolerance of blastocysts. *Theriogenology*, 41: 167.
- Donahue, R. P. (1968).** Maturation of mouse oocyte *in vivo*. *J. Exp. Zool*, 169: 237-242.
- Donnay, I., Auquier, P., Kaidi, S., Carolan, C., Lonergan, P., Mermillod, P., Massip, A. (1998).** Vitrification *in vitro* produced bovine blastocytes, methodological studies and development capacity. *Theriogenology*, 52: 93-104.

- Downs, S. M.; Dained, S. A., Bornslager, E. A., Hoppe, P. C. and Eppigs, J. J. (1989).** Purines modulation of c AMP levels an c AMP phosphodiesterase. Activity. Game. Res, 23: 323-334.(Abstr).
- Dragovic, R. A., Ritter. L. J., Schultz. S. J., Amato. F, Armstrong. D. T., Gilchrist, R. B. (2005).** Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. Endocrinology, 146 (6): 2798-2806.
- Drost, M. (2002).** Training manual for embryo transfer in cattle. College of Veterinary Medicine, University of Florida, U.S.A.
- Du, Y., Kragh, P. M., Zhang, X., et al. (2006).** Sucessful vitrification of parthenogenetic porcine blastocysts produced from delipated *in vitro* matured oocytes. Reprod Fertil Dev, 18: 153.
- Duby, R. T., Damiani, P., Looney, C. R., Fissore, R. A., Robl, J. M. (1996).** Prepuberal calves as oocytes doners: promises and problem. Theriogenology, 45: 121-130.
- Dutt, R. H. (1963).** Critical period for early embryo mortality ewes exposed to high ambient temperature. J. Anim. Sci, 22:713-719.
- Dutta, D. J., Dev, H., Raj, H. (2013).** *In vitro* blastocyst development of post-thaw vitrified bovine oocytes. Vet. World, 6(10): 730-733.
- Dziuk, P. J. (1965).** Timing of maturation and fertilization of the sheep egg. Anat. Rec, 153: 211-222.
- Ebrahimi, B., Valojerdi, M. R., Eftekhari – Yazdi, P., Baharvand, H. (2010).** *In vitro* maturation, apoptotic gene expression and incidence of numerical chromosomal abnormalities following cryotop vitrification of sheep cumulus-oocyte complexes. J. Assist Reprod Genet, 27: 239-246.
- Ebrahimi, B., Valojerdi, M.R., Eftekhari-Yazdi, P., Baharvand, H. (2012).** Ultrastructural changes of sheep cumulus– oocyte complexes following different methods of vitrification. Zygote, 20(3): 103-115.
- El Gaafary, M. N., Abdel-Ghaffar, A. E. (1994).** *In vitro* oocytes maturation , fertilization and cleavage in Egyptian buffaloes. Annals of Agric. Sc. Moshtohor. Egypt, 32: 1801–1810.
- El-Gayar, M., Holtz, W. (2001).** Technical note: Vitrification of goat embryos by the open pulled straw method. J Anim Sci, 79(9): 2436- 2438.
- EL-Shahat, K. H., Hammam, A. M. (2014).** Effect of different types of cryoprotectants on developmental capacity of vitrified-thawed immature buffalo oocytes. Anim. Reprod, 11(4): 543-548.
- Emiliani, S., Van den Bergh, M., Vannin, A. S., Biramane, J., Englert, Y. (2000).** Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol, and glycerol for cryopreservation of slowcooled mouse zygotes, 4-cell embryos, and blastocysts. Hum Reprod, 15: 905–910.
- Eppig, J. J., Schroeder, A. C.(1986).** Culture systems for mammalian oocyte development and prostects. Theriogenology, 25: 97-106.

- Eroglu, A., Toth, T. L., Toner, M. (1998).** Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertil Steril*, 69: 944–957.
- Esaki, R., Ueda, H., Kurome, M., Hirakawa, K., Tomii, R., Yoshioka, H., Ushijima, H., Kawayama, M., Nagashima, H. (2004).** Cryopreservation of porcine embryos derived from *in vitro*-matured oocytes. *Biol Reprod*, 71: 432–437.
- Farzad, R. N., Mojdeh, A., HassanJahanihashemi, S. (2013).** The effect of vitrification on mouse oocyte apoptosis by cryotop method. *Iranian Biomedical Journal*, 17(4): 200-205.
- Fernandez –Reyez, F., Ducolomp, Y., Romo, S., Casas, E., Salazar, Z., Betancourt, M. (2012).** Viability, maturation and embryo development *in vitro* of immature porcine and ovine oocytes vitrified in different devices. *Cryobiology*, 64(3): 261 -266.
- Forman, E. J., Li, X., Ferry, K. M., Scott, K., Treff, N. R., Scott, R. T. (2012).** Oocyte vitrification does not increase the risk of embryonic aneuploidy or diminish the implantation potential of blastocysts created after intracytoplasmic sperm injection: a novel, paired randomized controlled trial using DNA fingerprinting. *Fertil Steril*, 98: 644–649.
- Fukui, Y. (1990).** Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev*, 26: 40-46.
- Fukui, Y., Fukushima, M., Terawaki, Y., Ono, H. (1982).** Effect of Gonadotropin, steroids and culture media on bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 18: 161-174.
- Fukui, Y., Sakuma, Y. (1980).** Maturation of bovine oocyte cultured *in vitro*: Relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biol. Reprod*, 22: 669-673.
- Grag, N., Putohit, G. N. (2007).** Effect of different cryoprotectant concentrations for ultrarapid freezing of immature goat follicular oocytes on their subsequent maturation and fertilization *in vitro*. *Anim. Reprod*, 4(3-4): 113-118.
- Glass, L. E.(1971).** Transmission of maternal proteins into oocyte. *Advances in Bio Sciences*, 6: 29-58.
- Gook, D. A., Edgar, D. H. (2007).** Human oocyte cryopreservation. *Human Reprod updata*, 13: 591-605.
- Gordon, I. (1994).** Production of cattle embryo in the laboratory. CAB International, walling ford, OXON OX108DE, U. K. 672pp.
- Gordon, I. (2003).** Laboratory production of cattle embryos, 2nd Edition, CABI Publishing UK, pp. 548.
- Green, R. E., Santos, B. F. S., Sieherle, C. C., Landim- ALvarnga, F. C., Bicudo, S. D. (2009).** Viability of OPS vitrified sheep embryos after direct transfer. *Reprod Dom Anim*, 44: 406-410.
- Guignot, F. (2005).** Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. *INRA Production Animales*, 18(1): 27-35.

- Hai, L., Rong, H. J., Mei, Z., Zhang, Z. H., Wang, J. S., Chao, L. J., Ju, Q., Ju, F. Z. A. (2003).** Effect of cryopreservation on the development capacity of goat oocyte. Chinese J. Anim and Vet. Sci, Abstr.
- Hamano, S., Kuwayama, M. (1993).** *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from ovaries individual donors: A comparison between the cutting and aspiration methods. Theriogenology, 39: 703-712.
- Hiraoka, K., Hiraoka, K., Kinutani, M., Kinutani, K. (2004).** Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. Hum Reprod, 19: 2884-2888.
- Hou, Y. P., Dai, Y. P., Zhu, S. E., Zhu, H. B., Wu, T. Y., Gong, G. C., Wang, H. P., Wang, L. L., Liu, Y., Li, R., Wan, R. and LiN. (2005).** Bovine oocytes vitrified by the open pulled straw method and used for somatic cell cloning supported development to term. Theriogenology, 64(6): 1381-1391.
- Huneau, D., Crozet, N., Ahmad-Ali, M. (1994).** Estrous sheep serum as apotent agent ovine IVF: Effect on cholesterol efflux from spermatozoa and the acrosome reaction. Theriogenology, 42: 1017-1028.
- Hyttel, P., Lehn-Jensen, H., Greve, T. (1986).** Ultrastructure of bovine embryos frozen and thawed by a two-step freezing method. Acta Anat, 125: 27-31.
- Isachenko, V., Alubart, J. L., Nawroth, F., Isachenco, E., Vajta, G., Folch, J. (2001).** The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or poth?. US National Library of Medicine National Institutes of Health. 22(3): 157-162.
- Jackowski, S., Leibo, S. P., Mazur, P. (1980).** Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized mouse ova. J Exp Zool, 212: 329-341.
- Jain, J. K., Paulson, R. J. (2006).** Oocyte cryopreservation. Fertil and Steril, 86(4): 1037-1046.
- Kaidi, S., Bernard, S., Lambert, P., Massip, A., Dessy, F., Donnay, I. (2001).** Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. Biol of Reprod, 65: 1127-1134.
- Kajihara, Y., Blacwood, E. G., Myers, M. W., Komerani, N., Goto, K., Godke, R. A. (1991).** *In vitro* maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves. Theriogenology, 35: 221-229.
- Katkov, I. I. (1998).** Cell suspensions in high concentrations of a permeable cryoprotectant : Optimization of addition and dilution protocols. Cryobiology 37, 403-404.
- Kasai, M. (2002).** Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultrarapid vitrification. Reprod Med Biol, 1: 1-9.
- Kharche, S. D., Sharma, G. T., Majumdar, A. C. (2005).** *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes vitrified at the germinal vesicle stage. Small Rumin Res, 57(1): 81-84.

- Kruip, T. A. M., Bevers, M. M., Kemp, B. (2000).** Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. *Theriogenology*, 53: 611-618.
- Kuwayama, M. (2005).** Evidence-based embryo cryopreservation. *J Mamm Ova Res*, 22: 28-32.
- Landa, V., Tepla, O. (1990).** Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. *Folia Biologica (Praha)*, 36: 153–158.
- Lane, M., Bavister, B. D., Lyons, E. A., Forest, K. T. (1999).** Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat. Biotechnology*, 17: 1234-1236.
- Lazar, L., Spak, J., David, V. (2000).** The vitrification of *in vitro* fertilized cow blastocyst by the open pulled straw method. *Theriogenology*. 54: 571-578.
- Ledda, S., Bogliolo, L., Succu, S., Ariu, F., Bebbere, D., Leoni, G. G., Naitana, S. (2006).** Oocyte cryopreservation: oocyte assessment and strategies for improving survival. *Reprod Fert Develop*, 19: 13–23.
- Liebo, S. P. (1984).** A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21: 767–790.
- Leibo, S. P., Loskutoff, N. M. (1993).** Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39: 81–94.
- Leibo, S. P., Martino, A., Kobayashi, S., Pollard, J. W. (1996).** Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Anim Reprod Sci*, 42: 45–53.
- Li, R., Norman, R. J., Armstrong, D. T. and Gilchrist, R. B. (2000).** Oocyte-secreted factor (s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol Reprod*, 63(3): 839-845.
- Liebermann, J. (2012).** Vitrification of oocytes and embryos. *Current Frontiers in Cryobiology*, 169-185.
- Lim, J. M., Ko, J. J., Hwang, W. S., Chung, H. M., Niwa, K. (1999).** Development of *in vitro* matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. *Theriogenology*, 51: 1303–1310.
- Lin, T. A., Chen, C. H., Sung, L. Y., Carter, M. G., Chen, Y. E., Du, F. (2011).** Open pulled straw vitrification differentiates cryotolerance of *in vitro* cultured rabbit embryos at the eight –cell stage. *Theriogenology*, (75): 760-768.
- Lonergan, P., Managhan, P., Rizos, D., Boland, M. P., Gordon, P. (1994).** Effect of follicular size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev*, 37: 48-53.
- Lopatarova, M., Cech, S., Havlicek, V. H., Oly, L. (2002).** Effect of vitrification in open pulled straws on survival of bovine Embryos from superovulated cows. *Actavet. Brno*, 71: 93-99.

- Luciano, A. M., Franciosi, F., Lodde, V., Perazzoli, F., Slezakova, M., Modina, S. (2009).** Cryopreservation of immature bovine oocytes to reconstruct artificial gametes by germinal vesicle transplantation. *Reprod Dom Anim*, 44: 480-488.
- Mahmoud, K. G., Scholkamy, T. H., Ahmad, Y. F., Seidel, G. E. J. R., Nawito, M. F. (2010).** Effect of different combinations of cryoprotectants on *in vitro* maturation of immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes vitrified by straw and open pulled straw methods. *Reprod .Domest. Anim*, 45(4): 565-571.
- Mahmoud, K. Gh. M., Scholkamy, T. H., Ahmad, Y. F., Seidel, G. E., Nawito, M. F. (2008).** Effect of different combinations of cryoprotectants on *in vitro* maturation of immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes vitrified by straw and open-pulled straw methods. *Reprod Dom Anim*, 45: 565-571.
- Mahmoudi, R., Rajaei, F., Kashani, I. R., Abbasi, M., Amidi, F., Sobhani, A., Amiri, I. (2012).** The rate of blastocysts production following vitrification with step-wise equilibration of immature mouse oocytes. *Iran. J. Reprod. Med*, 10(5): 453-458.
- Martino, A., Mogas, T., Palomo, M. J., Paramio, M. T. (1995).** *In vitro* maturation and fertilization of prepubertal goat oocyte. *Theriogenology*, 43(2): 473-485.
- Martino, A., Palomo, M. T., Mogas, T., Paramio, M. T. (1994).** Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 42(5): 859-873.
- Martino, A., Pollard, J. W., Leibo, S. (1996).** Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol Reprod Dev*, 45: 503–512.
- Massip, A., Mermillod, P., Dinnyes, A. (1995).** Morphology and biochemistry of *in-vitro* produced bovine embryos: Implication for their cryopreservation. *Hum Reprod*, 10: 3004-3011.
- Masui, Y., Clark, H. (1979).** Regulation of oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol*, 57: 185-282.
- Men, H., Agca, Y., Riley, L. K., Critser, J. K. (2008).** Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipation through chemically stimulated lipolysis and inhibition to apoptosis. *Theriogenology*, 66(8) 2008–2016.
- Mermillod, P., Locatelli, Y., Dalbies-Tran, R., Uzbekova, S., Baril, G., Guignot, F., Perreau, C., Poulin, N., Touze, J. L., Pennetier, S., Schmaltz, B., and Cognie, Y. (2006).** *In vitro* production of ruminant embryos: limits and perspectives. symposium COA/ INRA scientific cooperation in agriculture, tainan (Taiwan, R. O. C), November 7-10.
- Mermillod, P. (2002).** Reproduction- gamete and embryo technology/ *in vitro* fertilization. *J .Reprod and Fertil*, 1-7.
- Mermillod, P., Marchal, R. (1999).** Oocyte of domestic mammals:a model for the study of *in vitro* maturation. *Contracept Fertil Sex*, 27(6): 440-448.
- Mikolajewska, N., Muller, K., Nizanski, W., Jewgenow, K. (2012).** Vitrification of domestic cat oocytes– Effect on viability and Integrity of subcellures. *Reprod. Dom. Anim*, 47: 295-299.

- Miyamoto, H., Ishibashi, T. (1978).** The protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. *J Reprod Fertil*, 54: 427–32.
- Mo, X. H., Fu, X. W., Yuan, D. S., Wu, G. Q., Jia, B. Y., Cheng, K. R., Du, M., Zhou, Y. H., Yue, M. X., Hou, Y. P., Li, J. J. (2014).** Effect of meiotic status, cumulus cells and cytoskeleton stabilizer on the developmental competence of ovine oocytes following vitrification. *Small Rumin. Res*, 117(2-3): 151-157.
- Moawad, A. R., Zhu, J., Choi, I., Amarnath, D., Chen, W., Campbell, K. H. (2013).** Production of good-quality blastocyst embryos following IVF of ovine oocytes vitrified at the germinal vesicle stage using a cryoloop. *Reprod Fertil. Dev*, 25: 1204–1215.
- Montag, M., Koll, B., Holmes, P., van der Ven, H..(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.
- Moor, R. M., Polge, C., Willadsen, S. M. (1980).** Effects of follicular steroids on the maturation and fertilization of mammalian oocytes. *J. Embryol. Exp. Morph*, 56: 319-335.
- Motlik, and Fulka, J.(1986).** Factor affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*, 25: 87-96.
- Moussa, M., Juan, S., Xue Hong, Z., Fan Yi, Z. (2014).** Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. *Sci China Life Sci*, 57 (9): 903-914.
- Nagai, T. (2001).** The improvement of *in vitro* maturation system for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, 55(6): 1291-1301.
- O,Callaghan, D., Yaakup, H., Hyttel, P., Spicer, L. J., Boland, M. P. (2000).** Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology. Follicular fluid composition and systematic hormone concentration in ewes. *J. Reprod. Fertil*, 118: 303-313.
- Oberstein, N., O'Donovan, M. K., Bruemmer, J. E., Seidel, G. E. J. R., Carnevale, E. M., Squires, E. L. (2001).** Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology*, 55: 607–613.
- Palasz, A. T., Mapletoft, R. J. (1996).** Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol Adv*, 14: 127–149.
- Papis, K., Shimitzu, M., Izaike, Y. (2000).** Factors affecting survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*, 54: 651- 658.
- Papis, K., Shimizu, M., Izaike, Y. (1999).** The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine *in vitro* matured oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*, 51: 173.
- Park, S. E., Chung, H. M., Cha, K. Y., Hwang, W. S., Lee, E. S., Lim, J. M. (2001).** Cryopreservation of ICR mouse oocytes: improved post-thawed implantation development after vitrification using Taxol, a cytoskeleton stabilizer. *Fertil Steril*, 75: 1177–1184.

- Patterson, J. D. (2002).** Use of unique freezing technique in the freezing of bovine embryos. Thesis Texas Tech University.
- Pavlok, A., Lucas-Hahn, A., Niemann, H. (1992).** Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev*, 31:63-67.
- Paynter, S. (2005).** A rational approach to oocyte cryopreservation. *Reprod Biomed Online*, 10: 578–586.
- Pickering, S. J., Braude, P. R., and Johnson, M. H. (1991).** Cryoprotection of human oocytes: inappropriate exposure to DMSO reduces fertilization rates. *Hum Reprod*, 6: 142-143.
- Prentice, J. R., Anzar, M. (2011).** Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal genetics. *Veterinary Medicine International*, Article ID 146405, 11 pages.doi:10.4061/146405.
- Presicce, G. A., Jiang, S., Simkin, M., Zhang, L., Looney, C. R., Godke, R. A., Yang, X. (1997).** Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol Reprod*, 56: 386-392.
- Qingwang, L., sheng, Y. Y., liang, J. Z., Qiang, W. L., Hong, H. G., Cun, C. W. (2003).** Vitrified cryopreservation of bovine oocytes . *Journal of north west Sci-Tech University of Agriculture and forestry*.
- Rall, W. (1987).** Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 24: 387–402.
- Rall, W. F., Meyer, T. K. (1989).** Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology*, 31: 683–692.
- Rall, W. F., Meyer, T. K., Leibo, S. P. (1986).** Effect of warming conditions on the survival of mouse embryos cryopreserved and diluted by a one-step straw procedure. *Theriogenology*, 25: 186 (abstr).
- Revira, R. M., Hansen, P. J. (2001).** Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperature in the physiological range. *J. Reprod. Fert*, 121: 107-115.
- Riha, J. (1994).** One step vitrification method for cryopreservation of bovine embryos transferred into recipients. *Reprod. Dom. Anim*, 29: 46-54.
- Rocha, A., Randel, R. D., Broussard, J. R., Lim, J. M., Blair, R. M., Roussel, J. D., Godke, R. A., Hansel, W. (1998).** High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *bos taurus* but not in *bosindicus* cow. *Theriogenology*, 49: 657-665.
- Rutledge, J. J., Monson, R. L., Northey, D. L., Leibfrid-Rutledge, M. L. (1999).** Seasonality of cattle embryo production in temperate region. *Theriogenology*, 50: 330.(Abstr).
- Saha, S., Takagi, M., Boediono, A., et al. (1994).** Direct rehydration of *in vitro* fertilised bovine embryos after vitrification. *Vet Rec*, 134: 276–277.
- Samake, S., Amoah, E. A., Mobini, S., Gazal, O., Gelaye, S. (2000).** *In vitro* fertilization of goat oocytes during the non-breeingseason *Small Rumin. Res*, 35: 49-54.

- Sato, E., Iritani, A., Nishikawa, Y. (1977).** Factors involved in maturation of pig and cattle follicular oocyte culture *in vitro*. J. Anim. Reprod, 23: 12-18.
- Schneider, U., Mazur, P., Leibo, S. (1983).** The permeability of bovine embryos to DMSO or glycerol. Cryobiology, 20: 741 abstr.
- Schroeder, A. C., Champlin, A. K., Mobraaten, L. E., and Eppig, J. J. (1990).** Developmental capacity of mouse oocytes Biotechnology (DBT), Govt. of India for their financial cryopreserved before and after maturation *in vitro*. J Reprod Fertil, 89: 43-50.
- Schultz, R. M. (1986).** Molecular aspects of mammalian oocytes growth and maturation. In: Rossant, J., Pedersen, R. A, eds. Experimental approaches to mammalian embryonic development. Cambridge: Cambridge University Press, 195-238.
- Sharma, A., Purohit, G. N. (2008).** Vitrification of immature bubaline cumulus oocyte complexes by the open-pulled straw and conventional straw methods and their subsequent *in vitro* fertilization, Vet. med, 53(8): 427-433.
- Sharma, G. T., Kharche, S. D., Majumdar, A. C. (2006).** Vitrification of *in vitro* matured goat oocytes and the effect on *in vitro* fertilization. Small Rumin. Res, 64(1-2): 82-86.
- Sharma, G. T., Magumadar, A. C., Bonde, S. W. (1996).** Chronology of maturational events in goat oocytes cultured *in vitro*. Small. Rumin. Res, 22(1): 25-30.
- Shi, D. S., Avery, B., Greve, T. (1998).** Effects of temperature gradients on *in vitro* maturation of bovine oocytes. Theriogenology, 50: 667-674.
- Sirard, M. A. (2001).** Resumption of meiotic: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. Theriogenology, 55(6): 1241-1254.
- Smith, G. D., Serafini, P. C., Fioravanti, J., Yadid, I., Coslovsky, M. Hassun, P. et al. (2010).** Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow rate freezing or vitrification. Fertil Steril, 94: 2088-2095.
- Sokolosli, J. E., Walf, D. P. (1989).** Laboratory conditions for human *in vitro* fertilization in : Human fertilization *in vitro*, edited by Walf, D. P., Quigley, M. M., NewYork, Plenum Press, pp:128.
- Son, W. Y., Yoon, S. H., Yoon, H. J., Lee, S. M., Lim, J. H. (2003).** Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. Hum Reprod, 18: 137-139.
- Song, L., Zi, S. R., Jie, L. J., chun, S. S., Lei, Z. G. (2006).** Factors of cryoprotection effect of goat oocytes by open pulled straw vitrification. Journal of Agricultural university of Hebei. (Abstre).
- Succu, S., Leoni, G. G., Bebbere, D., Berlinguer, F., Mossa, F., Bogliolo, L., Madeddu, M., Ledda, S., Naitana, S. (2007).** Vitrification devices affect structural and molecular status of *in vitro* matured ovine oocytes. Mol. Reprod. and Dev, 74(10): 1337-1344.
- Szell, A., Shelton, J. N., Szell, K. (1989).** Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. Cryobiology, 26: 297-301.

- Széll, A., Shelton, N. J. (1994).** Survival of vitrified sheep embryos *in vitro* and *in vivo*. Theriogenology, 42: 881–889.
- Takagi, M., Sakonju, I., Suzuki, T. (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.
- Takagi, Y., Sakamoto, M., Yamaguchi, S., Ota, K., Jindo, M. (2002).** Vitrification of mouse blastocysts by the cryoloop- straw method. Theriogenology, 57: 484 abstr.
- Tatemoto, H., Horiuchi, T. (1995).** Requirement for protein synthesis during the onset of meiosis in bovine oocytes and its involvement in the autocatalytic amplification of maturation –promoting factor Mol Reprod. Dev, 41: 47-53.
- Totey, S. M., Pawshe, C. H., Singh, G. P. (1993).** *In vitro* maturation and fertilization of buffalo oocyte (*Bubalus bubalis*): effect of media, hormone, and sera. Theriogenology, 39:1153-1171.
- Trad, F. S., Toner, M., Biggers, J. D. (1999).** Effects of cryoprotectants and ice- seeding temperature on intracellular freezing and survival of human oocytes. Hum. Reprod, 14: 569-577.
- Trounson, A., Caro, A. (1984).** Research in human *in vitro* fertilization and embryo transfer. Br. Med. J, 285: 244.
- Vajta, G., Holm, P., Greve, T., Callesen, H. (1997).** Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw(OPS) method. Acta. Vet. Scand, 38: 349-352.
- Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, J. P., Booth, P. J., Jacobsen, H., Greve, T., Callesen, H. (1998).** Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos .Mol. Reprod. Dev, 51: 53-58.
- Vajta, G., Kawayama, M., Vanderzwalmen, P. (2007).** Disadvantages and benefits of vitrification. In Michael J Tucker, Juergen Liebermann, Vitrification in assisted reproduction, PP:33- 44, Informa UK Ltd.
- Vanderzwalmen, P., Touati, K., Ectors, F. J., et al. (1989).** Vitrification of bovine blastocysts. Theriogenology, 31: 270.
- Verbessem, D., Camu, F., Devroey, P., Steirteghem, A. (1988).** Pneumoperitoneum induced PH changes in follicular and Douglas fluids during laproscopic oocyte retrieval in human Hum. Reprod, 6: 751-754.
- Vigneron, C., Perreau, C., Dalbies-Tran, R., Joly, C., Humblot, P., Uzbekova, S., Mermillod, P. (2004a).** Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity. Mol Reprod.Dev, 69 (4): 457-465.
- Vigneron, C., Perreau, C., Dupont, J., Uzbekova, S., Prigent, C., Mermillod, P. (2004b).** Several signaling pathways are involved in the control of cattle oocyte maturation. Mol Reprod Dev, 69(4): 466-474.

- Warnes, G. M., Moor, R. M., Johnson, M. H. (1977).** Changes in protein synthesis during maturation of sheep oocyte. *In vivo* and *in vitro*. J. Reprod. Fertil, 49: 331-335.
- Whittingham, D. G., Wales, R. G. (1969).** Storage of two cell mouse embryos *in vitro*. Aust J Biol Sci, 22: 1065–1068.
- Wright, R. W., Anderson, G. B., Cupps, P. T.(1976).** Blastocyst expansion and hatching of bovine ova culture *in vitro*. J. Anim. Sci, 43: 170-174.
- Wu, C., Rui, R., Dai, J., Zhang, C., Ju, S., Xie, B., Lu, X., Zheng, X. (2006).** Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. Mol Reprod Dev, 73: 1454-1462.
- Xu, K. P., Greve, T., Smith, S., Hyttel, P. (1986).** Chronology changes of bovine follicular oocyte maturation *in vitro*. Acta. Vet. Scand, 27: 505-519.
- Yang, B. S., Leibo, S. P. (1999).** Viability of in vitro-derived bovine zygotes cryopreserved in microdrops. Theriogenology; 51: 178.
- Zander-Fox, D., Cashman, K. S., and Lane, M. (2013).** The presence of 1 mM glycine in vitrification solutions protects oocyte mitochondrial homeostasis and improves blastocyst development. J Assist Reprod Genet, 30: 107-116.
- Zenzes, M. T., Bielecki, R., Casper, R. F., et al. (2001).** Effects of chilling to 0°C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. Fertil and Steril, 75: 769–77.
- Zhou, X. L., Al Naib, A., Sun, D. W., Lonergan, P. (2010).** Bovine oocyte vitrification using the cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. Cryobiology, 61: 66–72.
- Zhou, G. B., and. Li, N. (2009).** Cryopreservation of porcine oocytes: recent advances. Mol Hum Reprod, 15: 279-285.