مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۲، شماره ۱، سال ۱۳۷۶

انجماد جنین خرگوش*

دکتر رضا شهیدی**

خلاصه :

تعداد ۴۹۰ جنین خرگوش در مرحله مرولا، با استفاده از روش Nieman (1985) منجمد و در ازت مایع نگهداری گردید. بعد از ذوب و استخراج گلیسرول، ۸۰ درصد جنین‌ها وضعیت خوبی داشتند. ۱۸۰ عدد از جنین‌ها بعد از ذوب در محیط‌های کشت Whiten و Australian نگهداری گردید. ۷۸ درصد از جنین‌های نگهداری شده در محیط کشت به مرحله بلاستوسیت و بالاتر رسیدند.

واژه‌های کلیدی : جنین، انجماد، ذوب، خرگوش

مقدمه :

در سال ۱۹۷۳ ویلموت و روسون از تولد اولین گوساله که از طریق انتقال جنین منجمد و ذوب شده به‌وجود آمده بود خبر دادند. گزارشات راجع به انجماد جنین و انتقال موفقیت‌آمیز آن در سایر دام‌ها مانند گوسفند، بز و اسب به‌تدریج در سال‌های بعد منتشر گردیده است (۱، ۲، ۷ و ۹). روش‌های انجماد جنین غالباً برروی جنین موش، به‌لحاظ فراوانی و همچنین ارزانی و بر روی جنین گاو، به‌علت اهمیت اقتصادی صورت گرفته و قدم به قدم تکامل یافته است (۵). البته تمام روش‌ها ماهیتی تجربی داشته و مبتنی‌بر آزمایشاتی است که برروی جنین موش انجام پذیرفته است. ولی در این میان مشخص شده است که جنین پستانداران، اساس مشابهی همانند سایر سلول‌های این رده در ارتباط با فیزیولوژی انجماد از خود نشان می‌دهند (۳ و ۸).

با اینکه در سال‌های اخیر روش‌های سریعی برای انجماد جنین ابداع شده است، ولی هنوز مراحل طولانی باید طی شود تا بتوان درصد قابل قبولی جنین سالم بعد از انجماد و ذوب به‌دست آورد. در این آزمایش، اثر انجماد با استفاده از خاصیت محافظتی گلیسیرین با غلظت اولیه ۱/۴ مول، برروی جنین خرگوش بررسی شده است.

مواد و روش کار :

تعداد ۴۹۰ جنین خرگوش در مرحله مرولا (سنی برابر ۶۸ تا ۷۰ ساعت) که از طریق

---

* - این تحقیق با هزینه دانشگاه تهران (فرصت مطالعاتی) و DAAD در کشور آلمان انجام گرفته است.

** - گروه آموزشی تغذیه و اصلاح نژاد دام دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

سوپراوولاسیون در خرگوش‌های سفید آزمایشگاهی به‌تدریج در مدت ۸ هفته ایجاد شده و از طریق شستشوی لوله اویدوکت به‌دست آمده بود (۶)، با به‌کارگیری روش زیر منجمد گردید.

روش انجماد و ذوب :

در این بررسی، از روش Nimann (1985) که برای انجماد و ذوب جنین گاو تکمیل گریده، به شرح زیر استفاده شده است :

انجماد :

۱ - برای به‌دست آوردن قدرت مقاومت در برابر انجماد، جنین را مستقیماً در محلول NBCS+PBSD ۲۰٪ همراه با ۱/۴ مول گلیسیرین غوطه‌ور می‌نمایند. نفوذ گلیسیرین به‌داخل جنین سبب می‌شود که جنین چروکیده شده، تا اندازه ۵۰ تا ۶۰ درصد کاهش حجم پیدا کند. این حالت بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه از بین رفته و جنین به حالت اولیه خود برمی‌گردد. بدین‌ترتیب جنین باید مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۱/۴ مول گلیسیرین نگهداری شود تا به‌خوبی با نفوذ گلسیرین به داخل سلول‌های مرولا در مقابل تأثیرات انجماد محافظت گردد.

۲ - تعداد یک تا ده جنین همراه با محیط نام‌برده در بالا به داخل پایت‌هایی (Paillete) به حجم ۰/۲۵ سانی‌مترمکعب کشیده می‌شود. جنین باید در پایت طوری قرار گیرد که از دو طرف توسط حباب‌های کوچکی از هوا محصور شده باشد تا از رسوب آن به‌طرفین پایت و خارج شدن از مایع محیطی جلوگیری به‌عمل آید.

۳ - با قراردادن پایت حاوی جنین در حمام الکل دستگاه انجماد، جنین دفعتاً تا حرارت ۷- درجه سانتی‌گراد سرد می‌گردد. پایت در این درجه حرارت به مدت ۱۵ دقیقه باقی مانده، بعداً با ایجاد نقطه تبلور Seeding در قسمت بالایی پایت ، نقطه شروع بر انجماد تدریجی، گذارده می‌شود.

دستگاه انجماد باید به گونه‌ای تنظیم گردد که حرارت حمام الکل با سرعت ۰/۳- درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه تا حرارت ۲۸- درجه و از آن به بعد با سرعت ۰/۱- درجه در هر دقیقه تا ۳۵- درجه سانتی‌گراد نقصان یابد.

۴ - پایت حاوی جنین می‌تواند از این درجه حرارت، مستقیماً وارد ازت مایع شده، نگهداری گردد.

در این آزمایش جنین‌های خرگوش برای مدت یک تا شش هفته در حرارت ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ذوب :

پایت های حاوی جنین به‌تدریج، یک تا شش هفته بعد از انجماد از ازت مایع خارج و مستقیماً به آب ۳۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و برای مدت ۱۰ ثانیه غوطه‌ور نگهداری شدند. بعد از ذوب با قیچی‌کردن انتهای لوله، محتوای آن را همراه با جنین‌ها به محلول PBSD با غلظت ۰/۷ مول گلیسیرین و ۰/۷ مول سو[illegible] می‌نماییم.

برای بیرون کشیدن گلسیرین از داخل جنین‌ها، باید آنها را به مدت ۵ دقیقه در این محیط نگهداری

کرد. بعد از آن، جنین‌ها را باید دوبار با محلول PBSD شستشو داد تا برای انتقال و یا تکامل در محیط‌های کشت آماده گردند.

مورفولوژی جنین‌ها در این مرحله توسط میکروسکوپ استریو مورد بررسی قرار داده شد.

تعداد ۱۸۰ جنین در دو محیط Whitten و Australian برای مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد و Co_2 پنج درصد نگهداری شدند.

نتایج :

آزمایشات مورفولوژی نشان داده که ۸۰ درصد از جنین‌ها بعد از ذوب وضعیت عالی و ۱۰ درصد وضعیت خوب داشتند. صدمات وارده به زوناپلوسیدا بسیار ناچیز بوده و تأثیری بر رشد بعدی جنین‌ها نداشت.

بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، ۷۸ درصد از جنین‌ها به مراحل بعدی، بلاستوسیت و بلاستوسیت حفره‌دار رسیدند. ۱۴ درصد نیز زوناپلوسیدا را شکافته و خارج شده بودند. فقط ۲۲ درصد از کل جنین‌ها در پایان ۴۸ ساعت دژنره گردیده بودند.

بحث :

نتایج به‌دست آمده از این آزمایش نشان می‌دهند، که اضافه‌کردن یکباره ۱/۴ مول گلیسیرین به محیط انجماد، درصد بالایی از جنین‌ها را سالم نگه می‌دارد. در عین حال این روش سهولت و سرعت زیادی را برای روند انجماد جنین فراهم می‌نماید. این روش انجماد، در جنین خرگوش برعکس جنین گاو (۴) به زوناپلوسیدا صدمات ناچیزی وارد می‌نماید.

References :

1 - Bilton, R.J. and Moore, N.W. In vitro Culture, storage and transfer of goat embryos. Aust. J. Biol. Sci. 29, 125-129, (1976).

2 - Czlonkowska, M., Boyle, M.S. and Allen, W.R. Deep freezing of horse embryos. J. Rep. Fert. 75: 485-490, (1985).

3 - Leibo, S.P., Mazur, P. and Jackowdki, S.C. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. Exp. Cell. Res. 89, 79-88, (1974).

4 - Nieman, H. Freezing of bovine embryos: Effects of transfer of one - step addition of 1.4 m. glycerol. Theriogenology 23(1) 369-379, (1985).

5 - Nieman, H. Tiefgefriren von Embryonen landwirtshaftlicher Nutatiere. Der praktische Tierarzt 9, 29-34, (1988).

6 - Schahidi, R., Doepke, H.H., Niemann, H. and Rath, D. Effect of FSH and PMSG along with HCG for induction of superovulation and embryo transfer in rabbits. 9th Iranian congress of physiology & Pharmacology. Tehran, Iran, (1989).

7 - Slade, P., Takeda, T., Squirgs, G.L., Elsden, R.P. and Seidel, G.E. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. Theriogenology 24(1): 45-58, (1985).

8 - Whittingham, D.G., Wood, M., Farrant, J., Lee, H. and Halsdy, J.A. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C. J. Rep. Fert. 56, 11-21, (1979).

9 - Willadsen, S.M. Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing. In: The freezing of Mamalian Embryos. Ciba Foundation Symposium 52, 175-182, (1977).

J. Fac. of Vet. Med. Univ. of Tehran, Vol. 52, No. 1, 1997

Cryopreservation of rabbit embryos*

Schahidi, R.**

Summary :

In order to find out the impact of the freezing procedure on rabbit embryos, series of experiments performed in which 490 rabbit embryos were frozen by Niemanns method (1985).

After thawing and removal of Glycerol, eighty percent of embryos were in good condition. 180 embryos were cultured in two different media i.e., Whitten and Australian. The 78% of cultured embryos have reached expanded blastocyst stage.

Key words : Embryo, Freezing, Thawing, Rabbit

---

* - This expriment was supported by the University of Tehran and DAAD Germany.

** - Department of Nutritiion and Animal Breeding, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.