Arab Gulf J. Scient. Res., **17** (1), pp. 181-198 (1999)

Comparison of the *in vitro* Fertilization of Ova Obtained from Two Mouse Strains (Balb/c and C57) by Three Different Methods and Cultured in Four Different Culture Media*

Ahmed R. Al-Himaidi

Zoology Department, College of Science, King Saud University, P.O. Box 2455, Riyadh 11451, Saudi Arabia

ABSTRACT. In this study a comparison was carried out between two mouse strains (Balb/c and C57) on the *in vitro* fertilization of ova obtained from females by three different methods: regular mating, pseudopregnancy and superovulation. The ova were cultured in four types of media: two commercially obtained media (M2 and M16 from Sigma Company, U.S.A.) and two laboratory prepared modified culture media, (MCM) and KSOM. Balb/c females gave more ova than C57 ones. Superovulation resulted in significantly ($P < 0.05$) more ova than any of the other two methods. C57 females gave more abnormal ova than did Balb/c ones, but their ova were more resistant to unfavourable conditions when cultured *in vitro* than those of Balb/c females. Balb/c ova obtained by regular mating developed better in MCM (73%) and in M2 media (55%) than in M16 (6%) and KSOM (5%) media. Similarly, (C57) ova obtained by the same method have developed better in MCM (55%) and M2 (50%) than in M16 (11%) and KSOM (27%) media.

* This work was supported by Grant # S-S-1-9-1417 from King Abdulaziz City for Science and Technology (KACST).

Dodds, J.W. and **Seidal, G.E.** (1984) Effects of caffeine, Ca^{++}, capacitation time and strain in *in vitro* fertilization in mice. *Gamete Res.* **10:** 353-360.

El-Seden, R. P., Nelson, L.D. and **Seidel, G.E.** (1978) Superovulation cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Therionology.* **9**:17-26.

Erbach, G.T., Lawitts, J.A., Papaioannou, V.E. and **Biggers, J.D.** (1994) Differential growth of the mouse pre implantation embryo in chemically defined media. *Biolo. Reprd.* **50:** 1027-1033.

Foote, R. and **Cohen, J.** (1987) *In vitro* fertilziation and embryo transfer in domestic animals: Application in animals and implication for humans. *In vitro Fertil and Emb. Trans.* **4:** 73-88.

Goddard, M.J. and **Pratt, H.R.** (1983) Control of events during early cleavage of the mouse embryo an analysis of the 2-cell block. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **73:** 111-133.

Langlais, J. and **Roberts, K.D.** (1985) A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.* **12**: 183-224.

McLaren, A.P. and **Michie, D.** (1956) Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine foster-mothers I. Factors affecting the implantation and survival of native and transferred eggs. *J. Exp. Biol.* **33:** 394-397.

McLaren, A. and **Michie, D.** (1958) Factors affecting vertebral variation in mice. IV. Experimental proof of the uterine basis of maternal effect. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **6:** 645-649.

Papaioannou, V.E. and **Ebert, K.M.** (1986) Development of fertilzied embryos transferred to oviducts of immature mice. *J. Reprod. Fertil.* **76:** 603-608.

Sakkas, D., Urner, F., Menezo, Y. and **Leppens, G.** (1993) Effect of glucose and fructose on fertilization, cleavage and viability of mouse embryo *in vitro. Biol. Reprod.* **49:** 1288-1292.

Whitten, W.K. and **Biggers, J.D.** (1968) Complete development *in vitro* of the pre implantation stage of the mouse in a simple, chemically defined medium. *J. Reprod. Fertil.* **17:** 399-401.

Whittingham, D.G. (1971) Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **14:** 7-21.

(Received 14/09/1998;
in revised form 27/01/1999)

المراجع العربية

البار ، محمد علي(١٩٨٧)*أخلاقيات التلقيح الصناعي نظره إلى الجذور* . مطبعة الدار السعودية ، جدة ، المملكة العربية السعودية ، ١٣٨ صفحة .

الحميدي ، أحمد راشد و الفريجي ، منصور محمد و صبح ، أيمن محمود (١٩٩٥) دراسة تقييمية لتنمية بويضات من مبايض الأبقار وإخصابها خارجياً في المملكة العربية السعودية ، *مجلة الخليج العربي للبحوث العلمية* ، ١٣(٢) : ٤٢١ - ٤٣٣ .

الحميدي ، أحمد راشد و الدوخي ، عثمان عبد الله و الغندور ، محمد حامد (١٩٩٨) *الأساسيات في عملي أجنحة الفقاريات الوصفي والتجريبي* ، مطابع جامعة الملك سعود ، الرياض ، المملكة العربية السعودية ، ٢٦٩ صفحة .

المراجع الأجنبية

Abramczuk J., Solter, D. and **Koprowski, H.** (1977) Beneficial effect of EDTA Co. development of mouse one cell embryo in chemically defined medium *Devl. Biol.* **61:** 378-383.

Ackerman, S.B., Swanson, R.J., Adams, J.P. and **Wortham, J.W.E.Jr.** (1983) Comparison of strains and culture media used for mouse *in vitro* fertilization, *Gamete Res.* **7:** 103-109.

Adams, C. (1981) *Egg transfer historical aspects In:* **Adams, C. (ed.)** Mammalian Egg Transfer by CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A., 1-17 pp.

Al-Himaidi, A.R. (1988) *In vitro Fertilization and the Effect of the Hotfoot Gene (ho/ ho) on Reproduction and Growth in the Mouse*, Ph.D. Thesise, Colorado State University, Fort Collins, Co., U.S.A., 133 p. (unpublished).

Al-Himaidi, A.R. (1993) Mouse strain variation to superovulation by human post menopausal gonadotrophins and human chorionic gonadotrophins, *Arab Gulf J. Scient. Res.* **11**(2): 253-257.

Biggers, J.D. (1987) *Pioneering mammalian embryo culture, In:* **Bavister, B.D. (ed.)** *The Mammalian Preimplation Embryos.* Plenum Press, New York, U.S.A., 1-22 pp.

Biggers, J.D., Whitten, W.K. and **Whittingham, D.G.** (1971) The culture of mouse embryo *in vitro. In:* **Daniel, J. (ed.)**, *Methods in Mammalian Embryology.* Freeman Press, San Francisco, Ca., U.S.A., 86-116 pp.

Chatot, C.L., Lewis, J.L., Torres, I. and **Ziomek, C.A.** (1990) Development of 1-cell embryo from different strains of mice in CZB medium. *Biol. Reprod.* **42:** 423-440.

Cross, P.C. and **Brinster, R.L.** (1973) The sensitivity of one cell mouse embryo to pyruvate and lactate. *Exp. Cell Res.* **77:** 57-62.

وفي البيئة M2 التجارية كان نمو السلالة Balb/c ٥٥٪ والسلالة C57 ٥٠٪ ، وهذا يرجع إلى أن البويضات في الغالب تكون ملقحة داخلياً ، وهذا أفضل من التلقيح الخارجي .

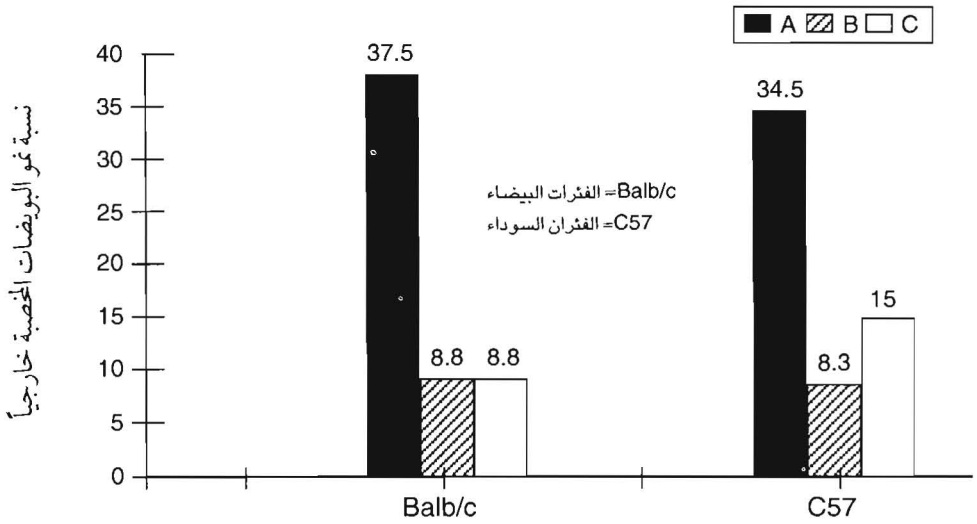
تاريخ إستلام البحث : ١٤/ ٠٩/ ١٩٩٨م

تاريخ إعداده النهائي للنشر :٢٧/ ٠١/ ١٩٩٩م

في حين أن السلالات مثل C3H X DBA, C57, SWR لم تستطع تجاوز مرحلة طور الخليتين (٠٪-٨٪) في نفس البيئة السابقة (Bigger *et al.* 1971) . ولكن التطور في تعديل بيئات تنمية الأجنة قد أدى إلى رفع نسبة نموها . فقد أوضح Abramczuk *et al.* (1977) أن إضافة المنظم (Ethylene-diamine-tetra-acitic acid, EDTA) إلى بيئة وتن (Whitten media) مهم لكي تتخطى الأجنة طور الخليتين ولا تتوقف عندها بالنسبة للسلالتين (ICR,C57B1/6) وبنسبة أقل للسلالة (Balb/c) . وهذا يتفق مع ما توصلنا إليه من نتائج في هذا البحث إذ أن إضافة المنظم (EDTA) إلى البيئة المطورة (MCM) والتي تحتوي على زيادة في نسبة اللاكتيت/ البيروفيت Lactate/Pyruvtae التي تم تحضيرها في المختبر ومقارنة ذلك مع ما توصل إليه Loutrids *et al.* (1987) حيث، استخدم بيئات أخرى كالبيئة (BWW) حيث نما ٦٣٪ من الأجنة من السلالة (CD1) إلى طور المفلجة . وفي بيئة برينستر المطورة (Brinster modified media) والمزودة بالمنظم (HEPES) فقد وصلت (٥٩٪ - ٨٦٪) من الأجنة إلى طور المفلجة (Papaioannou and Ebert 1986) مماثلة تقريباً للبيئة التجارية M2 . كذلك أوضح Ackerman *et al.* (1983) بأن إخصاب البويضات خارجياً (IVF) ونموها فيما بعد إلى طور الأربع خلايا يختلف باختلاف السلالات (CD-1,B6F1,B6CBAF1) والبيئة المستخدمة (بيئة كرب ورنجر المطورة Krebis Ringer modified media وبيئة هام ف ١٠ (Biocarbonate media or Ham's F10) ، لذلك فإن البيئة المطورة (MCM) المستخدمة في البحث الحالي قد أعطت نمواً أفضل بالنسبة للبويضات المأخوذة من إناث التلقيح العادي (٧٣٪ بالنسبة للسلالة البيضاء Balb/c و ٥٥٪ بالنسبة للسلالة السوداء C57) .

تكن هناك اختلافات بين السلالتين في الطريقة الواحدة ، وهذا يتفق مع المعدل العام لكل سلالة حسب طريقة جمع البويضات ، ولكن كان هناك اختلافاً بين السلالتين من حيث عدد البويضات غير السليمة ، إذ أظهرت النتائج أن عدد البويضات غير الناضجة فسيولوجياً في السلالة السوداء (C57) يختلف معنوياً عن السلالة البيضاء (Balb/c) ؛ خاصة البويضات التي جمعت بواسطة الحقن بالهرمونات ، وهذا يؤيد ما طرحناه في المقدمة بأن هناك بويضات تخرج من المبيض وتكون غير ناضجة من الناحية الفسيولوجية .

أما بالنسبة لعدد البويضات ، فإن العدد قد تضاعف عند جمع البويضات عن طريق التحفيز بالهرمونات ، وهذا يتفق مع المعدل العام ومع ما توصل إليه AL-Himaidi (1993) . أما بالنسبة لنمو البويضات المختلفة في البيئات المختلفة حسب نوع السلالة ، فالنتائج تشير إلى أن نمو هذه البويضات المخصبة خارجياً يعتمد على الطريقة التي تم الحصول بها على البويضات ، وكذلك على نوع البيئة المستخدمة للتنمية ، السلالة . وهذا يتفق مع ما توصل إليه Chatot *et al.* (1990) بأن النجاح في عملية زراعة أجنة الفئران من طور البويضة الملقحة حتى طور المفلجة يعتمد على السلالة ونوع البيئة المستخدمة ، فلقد قام أولئك الباحثين بتنمية بويضات ملقحة طبيعياً من أبناء الجيل الأول لإناث هجينة (C57B1/10J X SJL/J) ووجدوا أن ٧٥ ٪ من الأجنة قد نمت إلى طور المفلجة في بيئة مكونة من المحلول المتوازن لبيكربونات الصوديوم والذي يحتوي على اللاكتيت والبيروفيت والجلوكوز . بالمقابل فإن الباحثين Whitten and Biggers (1968) قد أوضحا بأن السلالات : SJL/J و C57B1/10J و 129/Rr قد أعطت نمواً منخفضاً لطور المفلجة ٣٪ ، ١٨٪ ، ١٧٪ على التوالي .



A = نمو البويضات من التلقيح الكاذب . B = نمو البويضات من التلقيح العادي . C = نمو البويضات من الحقن بالهرمونات .

الشكل ١ . رسم بياني يوضح نسبة النمو لبويضات مخصبة خارجياً والتي تم تنميتها في البيئات المختلفة المستخدمة وذلك حسب الطريقة التي تم بها جمع البويضات لسلالتين من الفئران المخبرية (Balb/c, C57) .

بوساطة التنشيط بالهورمونات . وعلى الرغم من أن السلالة البيضاء (Balb/a) قد أظهرت نمواً أفضلاً بشكل عام (انظر شكل رقم ١) ، كانت البويضات من السلالة السوداء (C57) أقل اضمحلالاً بالنسبة لمجموعة البيئات المختلفة بالمقارنة مع البويضات المضمحلة في السلالة البيضاء (٣١٪ إضمحلال للسلالة البيضاء ، ١٩٪ للسلالة السوداء) وخاصة في البويضات المأخوذة من الإناث المنشطة بالهرمونات (أنظر الجدول رقم ١) .

المناقشة

بالنسبة لعدد البويضات المتحصل عليها من إناث التجارب المختلفة ، فلم

في البيئة المطورة (MCM) و ٥٠٪ في البيئة التجارية (M2) واللتان كانتا أكثر من البيئة التجارية (M16) ١١٪ والبيئة التناضحية (KOMS) ٢٧٪ ، على التوالي (انظر الجدول رقم ٣) . ولقد كانت نسبة نمو البويضات المأخودة من إناث التقليح العادي أفضل في النمو في البيئة المطورة (MCM) والبيئة التجارية (M2) من البويضات المأخوذة بوساطة التلقيح الكاذب ومن البويضات المأخوذة

جدول (٣) . يوضح عدد البويضات التي تم استخراجها حسب التجربة وإخصابها خارجياً ثم تنميتها في البيئات المختلفة لسلالتين من الفئران (C57, Balb/c) .

الطريقة التي استخرجت فيها البويضات	مجموعة البويضات التي تم تنميها والسلالة	عدد ونسبة نمو البويضات التي تم تنميتها في البيئات المختلفة (*)			
		البيئة (CM)	البيئة (KSOM)	البيئة (M16)	البيئة (M2)
التلقيح العادي	٢٣٢ Balb/c	٤٩ (٣٦) (٧٣٪)**	٥٢ (٣) (٥٪)	٤٩ (٣) (٦٪)	٨٢ (٤٥) (٥٥٪)**
	٢٤٩ C57	٥٦ (٣١) (٥٥٪)**	٥١ (١٤) (٢٧)	٧٩ (٩) (١١٪)	٦٣ (٣٢) (٥٠٪)**
التلقيح الكاذب	٩١ Balb/c	٣٢ (٥) (١٦٪)	١٦ (١) (٦٪)	١٦ (١) (٦٪)	٢٧ (١) (٣٪)
	٧٢ C57	٢٤ (١) (٤٪)	١٩ (١) (٦٪)	١٠ (صفر) (صفر٪)	١٩ (٣) (١٦٪)
الحقن بالهرمونات (PMSG, LH)	٢٤٧ Balb/c	٦٢ (١٣) (٢٠٪)	٤٣ (صفر) (صفر٪)	٣٧ (٢) (٥٪)	٩٢ (٦) (٦٪)
	٣٧٧ C57	١٠٩ (١٦) (١٤,٦٪)	٦٧ (٥) (٧٪)	١٠٩ (١٧) (١٥٪)	١٢١ (٢٣) (١٩٪)

* الأعداد بين القوسين هي كمية البويضات التي نمت لطور الخليتين فأكثر ونسبتها .

** تختلف معنوياً في السطر والعمود الواحد مقارنة في البيئتين الاخريين (M16, KSOM) .

(P<0.005) عند مقارنتها بإناث السلالة البيضاء Balb/c ١٢ بويضة ، ٨ ,١ ٪ وبمقارنة ذلك مع الطرق الأخرى لاستخراج البويضات (انظر الجدول رقم ٢) .

وعند مقارنة نمو البويضات المخصبة خارجياً بين السلالتين ، فإن النتائج تشير بشكل عام إلى أن نمو البويضات يعتمد على السلالة وعلى الطريقة التي إستخدمت للحصول على البويضات من الإناث وكذلك على نوع البيئة المستخدمة للتنمية . فقد كانت نسبة نمو البويضات المستخرجة بواسطة التلقيح العادي من السلالة البيضاء (Ball/c) أفضل في البيئة المطورة (MCM) ٧٣٪ وفي البيئة التجارية (M2) ٥٥٪ ، وأقل بكثير في البيئة التجارية (M16) ٥٪ والبيئة التناضحية (KSOM) ٦٪ ؛ ومقارنة بالسلالة السوداء (C57) والتي بلغت ٥٥٪

جدول (٢) . يوضح مقارنة لعدد البويضات المستخرجة من سلالتين من الفئران(C57, Balb/c) بثلاث طرق مختلفة .

طريقة استخراج البويضات	السلالة	عدد الإناث	مجموع البويضات	المعدل لكل أنثى	عدد ونسبة البويضات غير السليمة
التلقيح العادي	Balb/c بيضاء	٣١	٢٩٣	٩,٤٥	٣ (٪١,٠٢)
	C57 سوداء	٣٦	٣٥١	٩,٧٥	٧ (٪١,٩٩)
التلقيح الكاذب	Balb/c بيضاء	٩	١١١	١٢,٣	٣ (٪٢,٧٠)
	C57 سوداء	١٠	١٠٤	١٠,٤	٤ (٪٣,٨٤)
الحقن بالهرمونات (PMSG, LH)	Balb/c بيضاء	٣٠	٦٦٠	**٢٢	١٢ (٪١,٨١)
	C57 سوداء	٤١	٧٠١	**١٧	٥٣ *(٪٧,٥٦)

* اختلاف ذو دلالة معنوية عن المجموعات الأخرى للسلالة الأولى (Balb/C (P<0.01).

** تختلف بشكل معنوي عن الطريقتين السابقتين ، التلقيح العادي و التلقيح الكاذب عند(P<0.005).

التحليلات الاحصائية :

لقد تم استخدام اختبار (t) للمقارنة بين متوسط عدد البويضات المستخرجة من الاناث المختلفة ، وتم استخدام مربع كاي (X^2) (2×2 Contingency Table) وتحليل المتوسطات الحسابية (ANOVA) حسب نوع السلالة ونوع البيئة المستخدمة للمعاملات المختلفة .

النتائج

لقد تم الحصول (بمجموع الطرق الثلاث المستخدمة) على ١٠٦٤ بويضة من ٧٠ أنثى بمعدل ١٥ر٢ بويضة لكل أنثى من السلالة البيضاء (Ball/c) ، في حين بلغ مجموع البويضات المتحصل عليها من السلالة السوداء (C57) ١١٥٦ بويضة من ٨٧ أنثى ، بمعدل ١٣,٣ بويضة لكل أنثى ، وكانت كمية البويضات غير السليمة المستخرجة من السلالة السوداء (C57) ٦٤ بويضة وأكثر بدرجة معنوية ($P<0,01$) من التي استخرجت من السلالة البيضاء (Balb/c) ١٨ بويضة (أنظر الجدول رقم ٢) . وبواسطة التنشيط الهرموني تم الحصول على معدل ٢٢ بويضة لكل أنثى من السلالة البيضاء ومعدل ١٧ بويضة لكل أنثى من السلالة السوداء ، وذلك أكثر من معدل البويضات المتحصل عليها بواسطة التلقيح العادي (٩ر٤٥ بويضة لكل أنثى من السلالة البيضاء و ٩,٧١ بويضة لكل أنثى من السلالة السوداء) وبالتلقيح الكاذب (١٢,٣ بويضة لكل أنثى من السلالة البيضاء ، ١٠,٤ بيوضة لكل أنثى من السلالة السوداء) . ولقد أظهرت النتائج أن كمية البويضات غير السليمة المستخرجة من الإناث السوداء (C57) عن طريق التنشيط الهرموني (٥٣ بويضة ٥٦,٧٪) كانت أكبر بشكل معنوي

استخدمت للإخصاب . (Al-Himaidi *et al.* 1988, Dodds and Seidal 1984) .

ب- البيئات التجارية (بيئات تنمية الأجنة) :

منها المحضرة مسبقاً وجاهزة للإستخدام (M16,M2) من شركة سيجما (Sigma Co., U.S.A) .

جـ- بيئة تناضحية بالبوتاسيوم

Potasium Simple Optimization Media (KSOM) :

وهي عبارة عن بيئة متعادلة التناضحية فيها كمية بوتاسيوم أكثر قليلاً من البيئة التجارية M16 ويتم تحضيرها في المختبر حسب الطريقة المذكورة في المرجع (Erbach *et al.* 1994) .

د - بيئة تنمية مطورة (MCM) Modified Culture Media :

وهي بيئة تم تحضيرها وتطويرها لدينا في المختبر من البيئات السابقة حيث تم زيادة كمية البوتاسيوم عن بيئة التناضحية (KSOM) وقللت كمية بيكربونات الصوديوم عن ذات البيئة (KSOM) . وأضيفت لكتات الكالسيوم المائية ($Ca\ Lactate\ H_2O$) والمنظم (Ethylene-diamine-tetra-acitic acid, EDTA) وذلك للتغلب على عملية توقف نمو الأجنة عند طور الخليتين . ولم تضف لكتات الصوديوم إليها (Na Lactate 60% "syrup") .

توضع البويضات المخصبة في قطرة صغيرة (١ر٠ مل) من البيئة المستخدمة في التجربة وتغطى القطرة بزيت البارافين حتى لا تجف وتوضع في الحضان (درجة حرارته ٣٧ مْ ومزود بـ ٩٥ ٪ هواء + ٥ ٪ ثاني اكسيد الكربون) ويتم مراقبة نمو الأجنة لمدة ٧٢ ساعة متتالية وتسجل النتائج .

جدول (١) . يوضح المكونات الكيميائية للبيئات المختلفة لإخصاب البويضات خارجياً وتنميتها في الفئران المعملية .

Component (g/L) المكونات (جرام / لتر)	بيئة إخصاب Fertilization media (FM)	بيئة مطورة Culture media (MCM)	بيئة تناضحية** KSOM	بيئة تجارية* M16 (Sigma Co.)	بيئة تجارية* M2 (Sigma Co.)
كلوريد الصوديوم NaCl	5.99	5.97	5.51	5.53	5.5
كلوريد البوتاسيوم KCl	0.20	0.35	0.18	0.36	0.35
فوسفات البوتاسيوم KH_2PO_4	-	0.16	0.047	0.16	0.16
فوسفات الصوديوم المائية $NaH_2PO_42H_2O$	0.058	-	-	-	-
لكتات الكالسيوم المائية Ca Lactate H_2O	-	0.45	-	-	-
فوسفات الماغنيسيوم $MgSO_4$	-	0.14	0.024	0.143	0.14
كربونات الصوديوم $NaHCO_3$	2.1	1.9	2.22	2.1	0.35
جلكوز Glucose	-	1.0	0.036	1.0	1.0
بيروفيت الصوديوم Na Pyruvate	0.055	0.03	0.022	0.036	0.03
لكتات الصوديوم Na Lactate 60% (syrap)	3 ml	-	3 ml	4.349	4.34
بنسلين Penicilin G	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075
ستربتوميسين Streptomycin SO_4	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
احمر الفينول Phenol Red	2 ml	2 ml	2 ml	0.01	0.01
كلوريد الكالسيوم المائي CaCl H_2O	-	-	0.18	0.251	0.25
الجلوتامين Glutamine (20mM)	-	-	0.5 ml	-	-
منظم EDTA	-	0.0029	0.0029	-	-
سيرم (بودره) BSA (Fraction V)	1.0	3.0	1.0	4.0	4.0
فركتوز Fructose	1.0	-	-	-	-
منظم هبس HEPES (Free acid)	-	-	-	-	4.96

* بيئات تجارية من شركة سيجما (Sigma Co.) (M16, M2) جاهزة .

** بيئة محضرة في المختبر مستقاة من المرجع Erbach *et al.* 1994 .

وحدات دولية (10 IU) لكل أنثى داخل التجويف البطني ، وبعد ٤٨ ساعة من الحقنة السابقة تم حقن الإناث مرة أخرى بواسطة هرمون التبويض Luetenzing Hormone (LH) واسمه التجاري (Chorulon) من شركة (Intervet Holland) وبكمية ١٠ وحدات دولية . وبعد ١٦ ساعة من الحقن تم تشريح الإناث واستخراج البويضات من قناة البيض ووضعت في بيئة الإخصاب .

الإخصاب الصناعي الخارجي للبويضات وتنميتها في بيئات مختلفة :

لقد جمعت البويضات من الإناث المختلفة تبعاً للسلالة حسب الطرق الثلاثة سابقة الذكر ، ثم جمعت الحيوانات المنوية من الذكور (حسب السلالة) من منطقة ذيل البربخ (الحميدي وأخرون ١٩٩٨) . وتم عمل الإخصاب الصناعي الخارجي (IVF) في الطبق في قطرة (١ ,٠ مل) من بيئة الإخصاب Fertilization Media (FM) وتغطى بزيت البارافين المعدني (Light Mineral Paraffine Oil) وتوضع في الحضان لمدة ١ - ٢ ساعة (درجة حرارة ٣٧مْ ، ومزود ٩٥٪ هواء + ٥ ٪ ثاني اكسيد الكربون) ثم بعد ذلك يتم توزيع البويضات المخصبة على بيئات التنمية المختلفة .

بيئات إخصاب وتنمية الأجنة IVF and Culture Media :

لقد تم استخدام عدة بيئات (أنظر الجدول رقم ١) لمقارنة تطور البويضات المخصبة خارجياً :

أ - بيئة الإخصاب Fertilization Media (FM) :

تم تحضيرها في المختبر حسب الطريقة الموصوفة من قبل

(Balb/c) وسلالة سوداء الفراء (C57) والتي تم إحضارهما من وحدة بيت الحيوان بكلية الصيدلية بجامعة الملك سعود بالرياض ، وتم تربيتهما في غرفة خاصة تحت درجة حرارة ٢٠ - ٢٥م° وذات منظم إضاءة (١٠ ساعات إضاءة ، ١٤ ساعة ظلام) .

طريقة الحصول على البويضات وجمعها :

لقد تم الحصول على البويضات من إناث التجربة بثلاث طرق :

١ - بويضات من التلقيح العادي (Regular Mating) :

حيث توضع مجموعة من الإناث مع ذكر (٤ إناث + ذكر) في قفص التربية ، ثم يتم فحص الإناث في اليوم التالي (والتي حصل لها تلقيح وذلك بوجود السدادة المهبلية ، Vaginal Plug) وبنفس اليوم يتم تشريحها لاستخراج البويضات من قناة البيض لوضعها في بيئة خاصة .

٢- بويضات من التقليح الكاذب (Pseudopregnancy) :

حيث يتم وضع مجموعة من الإناث مع ذكر مخصي ، ويتم فحص الإناث في اليوم التالي كالمجموعة السابقة ويتم استخراج البويضات من الإناث التي تم تلقيحها (لكن لم يحصل إخصاب للبويضات) وتوضع البويضات في بيئة خاصة .

٣- بويضات من التنشيط الهرموني (Superovulation) :

لقد تم حقن مجموعة من الإناث بواسطة هرمون مصل الفرس الحامل Pregnant Mare' Serum Gonadotrophin (PMSG) واسمه التجاري فوليقون (Folligon) من شركة انتر ڤت (Intervet Co. Holland) وبكمية ١٠

وبشكل أقل في السلالة النقية (Blb/c) . كما أجرى الباحثون (Erbach *et al.* 1994) التجربة على ستة أنواع من البيئات المتخلفة (CZB, aKH_2PO_4, SOM, mSOM, KSOM, and MTF) وذلك لتنمية بويضات ملقحة داخلياً (Zygot) ومأخوذة من سلالات فئران خليطة (CD-l,B6F1, B6CBAF1) ، فقد أوضحو بأن البيئة التناضحية مضافاً إليها البوتاسيوم Potasium Simple Optimization Media (KSOM) بنسبة أكبر (2.5 mM) تؤدي إلى نمو ٨٨٪ من طور اللاقحة إلى طور المفلجة .

يهدف هذا البحث إلى المقارنة بين سلالتين من الفئران المخبرية : سلالة سوداء (C57) وسلالة بيضاء (Balb/c) وذلك حسب نوعية البويضات المتحصل عليها بثلاث طرق مختلفة (التلقيح العادي والتلقيح الكاذب ، والتنشيط الهرموني) ثم دور العامل البيئي لإخصاب هذه البويضات وتنمية الأجنة خارجياً في أربع بيئات مختلفة (اثنتان تجاريتان مصنعتان مسبقاً (M2, M16) من شركة سيجما (Sigma Co. U.S.A) ، واثنتان محضرتان لدينا في المختبر (KSOM, MCM) وذلك للوصول إلى أنسب طريقة للحصول على البويضات وأفضل البيئات لعملية الإخصاب الصناعي ونمو الأجنة خارجياً ودور العامل الوراثي فيها .

المواد والطرق

لقد تم استخدام سلالتين من الفئران المخبرية ، سلالة بيضاء الفراء

بواسطة منشطات هرمونية (Superovulation) ، مما يعطي فرصة أكبر لخروج بويضات غير مكتملة النضوج من الناحية الفسيولوجية مع مجموعة البويضات التي قد تتوقف عن النمو فيما بعد . كما وأن العوامل الوراثية تلعب دوراً في البويضات المستخرجة من إناث مختلفة التركيب الوراثي محضرة بكميات مختلفة من الهرمونات (Al-Himaidi 1993) ، ونوعية الهرمونات المستخدمة (Elsden *et al.* 1978) ، وبالنسبة للحيوانات المنوية لابد من زيادة القدرة الإخصابية (Capacitation) لأنها في الفئران تجمع من منطقة ذيل البربخ حتى تتم عملية الإخصاب الصناعي الخارجي (Langlais and Roberts1985) وذلك باستخدام بيئة خاصة للإخصاب . أما بالنسبة لعامل البيئة فعند تنمية الأجنة خارجياً (في الفئران) ، فإنها تتوقف عند طور الخليتين كما أوضح كل من Cross and Brinster (1973), Goddard and Partt (1983), Biggers (1987) وفي دراسة عن نمو أجنة الفئران المخبرية في بيئة تجارية M16 تم استبدال الجلوكوز فيها بالفركتوز ، اتضح أن البيئة M16 لوحدها تدعم عملية الإخصاب الصناعي الخارجي في الطبق ، لكن ٦٥٪ من الأجنة تتوقف عن النمو عند طور الخليتين لكن البيئة M16-G بدون الجلوكوز والبيئة M16+F-G مضافاً إليها الفركتوز بدون الجلوكوز أعطت أجنة أكثر في طور المفلجة والتوتيه (Morula and Blastula) من البيئة M16-G بدون الجلوكوز (Sakkas *et al.* 1993) . كما أوضح الباحثون Abramczuk *et al.*(1977) بأن إضافة (Ethylene-diamine-tetra-acitic acid, EDTA) إلى بيئة وتن (Whitten Media) يزيد من نسبة نمو الأجنة وتخطيها طور الخليتين في السلالة الخليطة من الفئران المخبرية (C57B1/6,ICR)

المقدمة :

لقد إستقطبت تقنية الإخصاب الصناعي الخارجي (IVF) *in vitro* Fertilizatin ونمو الأجنة ونقلها فيما بعد إهتمام العديد من الباحثين خلال العقود الماضية وذلك منذ تكللها بالنجاح عند ميلاد أول طفلة أنبوب خلال نهاية السبعينات على يد الطبيب باتريك ستيتو ، ولقد برزت بشكل أكثر خلال ميلاد أول نعجة (دولي) عام ١٩٩٦م عن طريق عملية الاستنساخ في معهد روزلين ببريطانيا والتي أثارت الرأي العام العالمي لنجاحها .

ولاشك أن مثل هذه الإنجازات العلمية ما هي إلا نتاج سلسلة من البحوث ، وعلى الرغم من أنه حصل هناك تقدم على مستوى تقنية الإخصاب الصناعي الخارجي ونقل الأجنة ، إلا أنه لازال هناك الكثير والذي يجب تعلمه (Foote 1987) . ففي الإنسان لا تزال نسبة انغراس الجنين في جدار الرحم (المفلجة) في كثير من المراكز ١٠-٢٠٪ فقط وفي بعض المراكز المتقدمة لم تزد عن ٣٠-٣٥٪ (البار ١٩٨٧) . ويرجع عدم ارتفاع نسبة نجاح عملية الإخصاب الصناعي الخارجي (IVF) ، ثم نمو البويضات المخصبة ، ونقل الأجنة إلى عدة أسباب منها ما هو متعلق بالأمشاج المتحصل عليها (Foote *et al.* 1987, Langlais and Roberts 1985, AL-Himaidi 1988, 1993, Al-Himaidi *et al.*1995) ونوع البيئة التي تنمى فيها الأجنة خارج (Whittingham 1971 and Erbach *et al.* 1994) ومنها ما هو متعلق بالآم ومدى استعداد الرحم لاستقبال الأجنة (Adams 1981, McLaren and Michie 1956, 1958) . أما بالنسبة للعامل الأول فإن معظم الدراسات التي تجرى في مجال الإخصاب الخارجي تستخدم بويضات تم استخراجها

مقارنة بين سلالتين من الفئران المخبرية (Balb/c and C57) لعملية الإخصاب الصناعي الخارجي للبويضات ونمو الأجنة المبكر أربع بيئات تنمية مختلفة *

أحمد بن راشد الحميدي

جامعة الملك سعود - كلية العلوم - قسم علم الحيوان
ص .ب (٢٤٥٥) - الرياض ١١٤٥١ - المملكة العربية السعودية

الملخص . لقد تم في هذا البحث دراسة الاختلافات بين سلالتين من الفئران المخبرية (Balb/c and C57) لعملية الإخصاب الصناعي الخارجي *in vitro* Fertilization (IVF) لبويضات تم الحصول عليها من الإناث بثلاث طرق هي : التلقيح العادي و التلقيح الكاذب والتنشيط الهروموني . ثم تمت تنمية البويضات المخصبة خارجياً في أربع بيئات : بيئتان تجاريتان (M2, M16 من شركة سيجما Sigma Company) وبيئتان تم تطويرها في المختبر (بيئة تناضحية KSOM مستقاة من Erbach *et.al.* 1994 ؛ وبيئة تم تطويرها في المختبر MCM) .

لقد أعطت السلالة البيضاء (Balb/c) بويضات أكثر من السلالة (C57) . كما وأعطت طريقة التنشيط الهرموني بويضات أكثر مما أعطته أي من الطريقتين الأخريين . ولقد كان هذا الفرق ذو دلالة معنوية ($P < 0.05$) عن الطريقتين الأخريين . كما وأعطت السلالة السوداء (C57) بويضات غير سليمة بشكل أكثر من السلالة البيضاء (balb/c) لكنها كانت أكثر مقاومة للظروف البيئية الخارجية عند تنميتها في البيئات الخارجية .

كذلك أظهرت النتائج أن عملية الإخصاب الصناعي الخارجي للبويضات تعتمد على نوع السلالة والطريقة التي تم بها الحصول على البويضات ، وكذلك على نوع البيئة المستخدمة . فلقد كانت نسبة نمو بويضات السلالة البيضاء (Balb/c) المأخوذة عن طريق التلقيح العادي أفضل في البيئتين : المطورة MCM (٧٣٪) ، التجارية M2 (٥٥٪) مقارنة بالبيئتين الأخريين : التجارية M16 (٦٪) والتناضحية KSOM (٥ ٪) . وكذلك بالنسبة لبويضات السلالة السوداء (C57) المأخوذة بنفس الطريقة : البيئية المطورة MCM (٥٥ ٪) ، والبيئة التجارية M2 (٥٠ ٪) ، مقارنة مع البيئة التناضحية KSOM (٢٧٪) ، M16 (١١ ٪) .

* هذا البحث تم دعمه بواسطة مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية برقم : م - ص - ١ - ٩ - ١٤١٧ .