تـولید و انجمـــاد جنین گـــاو در آزمایشـــــگاه

نویسندگـــان :

دکتر حجت ا... کـریمی جشنـی*، استـادیار گـــروه آنـــاتومی دانشکده علـــوم پـــزشکی جهـــرم

دکتر محمد حسین نصر اصفهانی ، دانشیار گروه جنین شناسی پژوهشکده رویان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان

دکتر حسیـــن ایمـــانی ، استادیار گـروه آناتـــومی ، دانشکده پـزشکی ، دانشـگاه علوم پزشکی بقیـه الله (عج)

دکتر محمد مـــــردانی ، دانشیـــار گـروه آنـــاتومی ، دانشـــکده پزشکی ، دانشـــگاه علـوم پزشکی اصفهـان

دکتر حسین بهـــــاروند ، استـــــادیار گـــــروه جنین شنـــــاسی پژوهشـکده رویـــان

مجله پزشکی دانشکده علوم پزشکی جهرم ، سال سوم ، شماره سوم

چکیـده :

مقدمـه : لـــزوم کاربرد تکنولوژیهـــای جدید در زمینه شبیه سـازی و تولید حیوانـات تـرانس ژنیک به منظور افزایش تولید دام ، تولید گونه های مقاوم به بیماریها و توان شیردهی بالا و تولید پروتئین های خاص با مصـارف دارویـی در کشور ما ، تلاش محققین را به انجام مطالعـات بیشتر در این زمینه می طلبد . هدف از ایـن تحقیق ، تولید آزمایشـگاهی جنین گاو و انجمـاد آن به منظور فراهم نمودن مقدمات جهت انجـام تحقیقات بعدی است .

مـواد و روش تحقیـق : پس از بلـوغ و لقـاح آزمایشـگاهی تخمک ، جنین ها در محیط SOF به مدت ۸ روز در دمـــای ۳۹ درجـه سانتیگـراد و ۵٪ Co_2 در انکوبـاتور کشت داده شدند . سپس ۲۰۰ عدد بلاستوسیست با کیفیت بـــالا مربوط به روزهـــای ۷ و ۸ انتخـــاب و با روش انجمـــاد شیشـــه ای (۴۰٪ اتیلن گلیـــکول ، ۱۸٪ فایـــکل ،۴٪ مولارســـاکارز) منجمد شد . پس از ذوب ، جنین هـا به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند و میزان حیـات آنها براساس جنین هـای متسع شده مورد ارزیـابی قـــرار گرفت .

یافته هـــا : ۷۵٪ از تخمک هـا لقـــاح یافته و وارد مرحلـه تقسیم شدند . ۲۰٪ از تخمک هـــای لقاح یـــافته تا مـرحله بلاستوسیست پیش رفتند . ۷۰٪ از بلاستوسیست هـــای روز هفتـــم و ۶۵ ٪ از بلاستوسیست های روز هشتم پس از انجماد ـ ذوب ، مجدداً متسع شدند . جهت بررسی نتایج از آزمون مجذور کای استفاده گردید . گـــرچه میـزان درصد حیـــات بلاستوسیست ها در روز هفتم پس از انجماد در مقایسه با روز هشتم بیشتر بود ولی از نظر آماری تفاوت بین آنها معنی دار نبود .

نتیجه گیـــری : میـــزان درصد تخمک هـــای لقـــاح یافتـــه ، میـــزان درصد بلاستوسیست های رشد یافته و میـزان حیـات بلاستوسیست ها پس از انجمـــاد با یافته هـــای محققین ســـایر کشورهـــا هماهنـــگی دارد .

واژه گـــان کلیدی : بلاستوسیست ـ گـــاو ـ انجمـــاد شیشـــه ای

مقدمـــــه :

پیشرفت هـــای علمی اخیـر در رشته بیولـــوژی مولکولی ، ژنتیک و تکنولوژی تولید مثل و نیاز به افزایش مواد غذایی جمعیت روز افزون ، لزوم انجام تحقیقات برای توسعه صنعت دامداری و دامپـروری را بوجود آورده است . لـــزوم کاربـــرد تکنولوژیها ی جدید در زمینه شبیه سازی و تولید حیوانـــات ترانس ژنیک در کشور مـــا ، محققین را به انجام مطالعات بیشتر در این زمینه می طلبد .

مسئولین صنـایع دامداری با سرمـایه گذاری و هدایـت تحقیقات پایه اقدام به تولید دامهای تـرانس ژنیک نموده اند . از جمله موفقیت هـایی که در این زمینه حـــاصل شده است تولید پروتئین هـــای خاص که مصرف دارویی دارند همچنین بهبود نژاد حیوانات از نظر تولیدات گوشتی و لبنی و تولیـد

* نویسنده مسئول ، آدرس : جهرم ، خیابان استاد مطهری ، دانشکده علوم پزشکی ، تلفن : ۲۴ - ۲۳ ۱۵ ۳۳۳ Email :hojat_karimi@yahoo.co.in

تاریخ دریافت : ۸۵/۲/۱۱ ، تاریخ پذیرش : ۸۵/۲/۱۹

دامهای مقـاوم به بیماریهـا بوده است (۱و۲) استفـاده از سلولهـای بنیادی و بکارگیری تکنولوژی انتقال ژن، منجر به تولیـد دام تـرانس ژنیک می گـردد (۳) . با پیشـرفت تکنولـوژی در زمینه های مربوطه شده بـاشد . همچنین از تکنیک انجماد می توان به عنوان وسیلـه ای جهت ذخیـره ژنوم، بخصوص در گونه هایی که نسل آنها در حال انقراض می باشد استفاده کرد (۵) . انجمـاد ، روشی است که بـاعث نگهداری جنین در کوچکتـرین فضای ممکن می شود و این امر موجب صرفه جویـی در زمـان، انـرژی و هزینه هـای مربوطه می گـردد (۶) . انجماد جنین گاو به دلایل علمی و اقتصادی از اهمیت بالایی برخوردار است. تحقیقات در زمینه انجماد بیشتر بر روی گونه گاو متمرکز شده است (۷) .

معمولی ترین روش جهت نگهداری جنین گاو ، روش انجماد شیشه ای است که بـرخلاف روش انجماد آهسته، در ایـن روش شـانس تشکیل بلورهای یخ کاهش یافته، اما جنین با تغییـرات اسموتیک بسیـار شدید روبـرو می شود . همچنین در این روش به علت استفاده از غلظت هـای بالای ضدیخ، جنین با مسمومیت سلولی مواجه می گردد (۸) .

ارزیابی حیات جنین پس از انجماد هم برای انتقـال به مادر و هم برای استفاده تحقیقات آزمایشگاهی برای محققین حائـز اهمیت است. تـوان زیستـی جنیـن پس از ذوب را می توان با روشهای مختلفی ارزیابی کرد . یکی از شایعترین روشها در آزمایشـگاه، یک دوره کشت مجدد جنین به مدت ۲۴-۴۸ ساعت پس از ذوب است که با اتسـاع مجدد جنین مشخص می‌شـود (۹) . هدف از ایـن تحقیـق، تـولید آزمـایشگاهی جنین گـاو و انجمـاد آن به منظور فراهم نمودن مقدمات جهت انجام تحقیقات بعدی است.

مـواد و روش تحقیـق :

تمامی مواد شیمیایی از شرکت سیگما خـریداری شده است، در غیر این صورت نام شرکت مربوطه و شماره کـاتالوگ آن ذکر شده است. به منظور بلوغ آزمایشگاهی توده های تخمک کومولوس[1] (COC) ، با مراجعـه به کشتـارگاه صنعتی اصفهان، ۲۰ - ۱۰ دقیقه پس از ذبـح، تخمدانهـا جدا و پس از شستشوی مقدمـاتی در سـالین ۰/۹ ٪ (دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتیگـراد) به ظرف حـاوی سـالین ۰/۹٪ در همان دما منتقل و در طی مدت ۲-۱ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند . سپس با استفاده از سر سرنگ، نمره ۱۸ مایع فولیکولی، فولیکولیهـای ۸-۲ میلی متری آسپیره و در لوله هـای ته مخروطی ریختـه شد و به منظور تـه نشینی به مدت ۱۵-۱۰ دقیقـه در انکوبـاتور نگهداری و در زیـر استیومیکروسکوپ ۲۱۰۰ عدد تخمک کومولـوس با کیفیت که سیتوپلاسم یکنـواخت و گـرانوله و حداقل سه لایـه سلولهای گرانولوزا در اطراف خود داشتند انتخاب و در محیط شستشو جمـع آوری شدند . محیـط شستشـو[2] (WM) از TCM - 199 (M - 2520) کـه دارای افـزودنیهـای mg/ml ۰/۵ پنی سیلین ، mg/ml ۰/۵ استرپتومـاسین و ۲۲ میکروگرم بر میلی لیتر سدیم پیـروات و ۲۵ میلی مولار سدیم بیکربنـات است تشکیل شده است ، PH آن در حد ۷/۴ - ۷/۳ تنظیم شده و حداقل دو ساعت قبل از استفـاده در انکوبـاتور دارای ۵٪ و ماکـزیمم رطوبت در ۳۹ درجه سـانتی گـراد انکوبه شد .

بلوغ آزمایشـگاهی :

پس از جمـع آوری COC هـا در محیط شستشو ، دو بـار در همین محیط و یکبـار در محیط بلوغ[3] (MM) شستشو داده شدند. محیط بلـوغ از محیط شستشو به عـلاوه ۱ میکروگـرم بر میلی لیتر هفده بتا استـرادیـول، ۰/۱ واحد بین المللی در میلی لیتر HMG[4] ، سرم آلبومیـن گاوی ۱۰٪ FCS[5] و ۱/۳ mM ال ـ گلوتـامین سـاخته شده است. سپس COC هـا در گروههـایی ۱۰-۵ تایی به قطرات ۵۰ میکرولیتـری از محیط بلوغ در زیر روغن منتقل و در دمـای ۳۹ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO_2 و حداکثـر رطوبت به مدت ۲۴-۲۲ ساعت کشت داده شدند .

لقـاح آزمایشگاهی :

COCها دوبار در محیط لقاح (۱۰) شسته شدند و در گروههای ۱۰ تایی به قطره های ۵۰ میکرولیتری از همین محیط در زیر روغن منتقل شدند. نطفه (سمن) تازه گاو از مرکز اصلاح نژاد دام اصفهـان تهیه گردید . جهت تهیه اسپرم هـای متحرک از لایه هـای پرکول (serono - Germany) ۴۵ ٪ و ۹۰ ٪ و دور ۱۸۰۰ به مدت ۱۰ دقیقـه سـانتریفیوژ استفـاده شد . متعاقبـاً ته نشین حاصل دوبار در محیط لقاح به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از تعیین غلظت (۵ میلیون در میلی لیتر) توسط سمپلر ۱۰ میکرولیتر از اسپرم به قطره حاوی COC ها

1- cumulus oocyle complexes 2- washing medium 3- maturation mediuml
4- Human menopausal gonadotropin 5- Fetal cow serum

اضافه گردید . به این ترتیب غلظت نهایی اسپرم ها در قطرات حاوی COC به ۱ میلیون در میلی لیتر رسید . COC های تلفیح شده برای مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی گراد و ۵٪ Co_2 و حداکثر رطوبت در انکوباتور کشت داده شدند .

کشت آزمایشـگاهی :

مدت ۲۴-۱۸ پس از تلفیح ، به منظور جدا کردن اسپرمهای مرده و سلولهای گرانولوزا از تخمک های تلقیح شده ، جنین ها مدت ۲ دقیقه در محیط شستشو ورتکس شدند و سپس به محیط کشت[1] (SOF) که از مایع سنتتیک شبیه مایع لوله رحمی گوسفند ساخته شده (۱۱) در گروههای ۲۰-۱۰ عددی در هر قطره ۵۰ میکرولیتری منتقل و در شرایط ۳۹ درجه سانتی گراد و ۵٪ Co_2 و حداکثر رطوبت به مدت ۸ روز در انکوباتور کشت داده شدند .

روش انجمـاد شیشـه ای :

در این تحقیق از روش انجماد شیشه ای بر طبق پروتکل kasai که توسط Z hu و همکارانش (۱۹۹۳) تغییر داده شده استفاده گردید (۱۲) . ابتدا دو تا سه عدد جنین در محلول ۲۰٪ اتیلن گلیول (تهیه شده در محلول پایه) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شده سپس جنین ها به محلول انجمادی (۴۰٪ اتیلن گلیکول + ۱۸٪ فایکل +۰/۳ مولارساکارز در محلول پایه) منتقل شدند و پس از گذشت ۴۵- ۳۰ ثانیه به نی فریز منتقل شدند و نی فریز[2] به صورت افقی به مدت ۲ دقیقه روی بخار نیتروژن نگه داشته شد و سپس درون نیتروژن مایع غوطه ور گردید .

روش ذوب :

پس از خارج کردن نی فریز حاوی جنین از درون نیتروژن مایع و نگه داشتن آن در هوا به مدت ۶-۵ ثانیه ، نی فریز به مدت ۱۵-۱۰ ثانیه در آب با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت و سپس محتویات آن به درون دیش تخلیه شد جنین ها به محلول ۰/۵ مولارساکارز منتقل شدند و پس از گذشت ۵ دقیقه جنین ها دوبار شسته شدند و به محیط کشت منتقل و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی گراد و ۵٪ Co_2 و حداکثر رطوبت در انکوباتور کشت داده شدند .

گروههـای آزمـایش :

به منظور بررسی اثر انجماد بر حیات جنین های رشد یافته در آزمایشگاه تعداد ۲۰۰ عدد بلاستوسیست در روز ۷ و ۸ انتخاب و به روش انجماد شیشه ای منجمد شدند و پس از گذشت مدت زمان یک هفته تا یک ماه از زمان انجماد ، جنین ها ذوب و مجدداً کشت داده شدند . با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون مجذور کای ، نتایج مورد بررسی قرار گرفت .

یـافته ها :

تولید جنین آزمایشگاهی گاو ، شامل مراحل بلوغ آزمایشگاهی ، لقاح آزمایشگاهی و کشت آزمایشگاهی جنین است . در این تحقیق برای دستیابی به بلاستوسیست ، ابتدا مراحل سه گانه فوق انجام شد . بدین منظور در طی ۲۰۰ تکرار و با استفاده از حدود ۱۴۵۰۰ عدد اووسیت کشیده شده از تخمدان گاو ، مراحل فوق الذکر راه اندازی گردید . سپس طی ۳۰ تکرار حدود ۲۱۰۰ عدد اووسیت انتخاب و کشت داده شد و پس از بلوغ ، با اسپرم تلقیح شد و به مدت ۸ روز در آزمایشگاه کشت داده شد . ۷۵ ٪ از اووسیت های تلقیح شده ، لقاح یافته و وارد مرحله تسهیم شدند . ۲۰٪ از اووسیت های لقاح یافته تا مرحله بلاستوسیست پیش رفتند . جدول شماره یک ، تعداد بلاستوسیست های منجمد شده و درصد بلاستوسیست های متسع شده پس از کشت مجدد را در روزهای هفتم و هشتم نشان می دهد . اگر چه درصد جنین های متسع شده در روز هفتم بیشتر از روز هشتم است اما تفاوت معنی داری بین آنها وجود نداشت .

جدول (۱) : تعداد بلاستوسیست های منجمد شده و درصد بلاستوسیست های متسع شده پس از کشت مجدد

روز	تعداد بلاستوسیست های منجمد شده	درصد بلاستوسیست های متسع شده
هفتم	۱۰۰	٪۷۰
هشتم	۱۰۰	٪۶۵

1- synthetic oviductal fluid
2- Freeze straw

بحث:

در طی دهه هـای اخیـر ، روش هـای تـولید جنین آزمایشـگاهی گاو بهبود یـافته است . به طوری که ۲۰٪ تا ۴۰٪ از اووسیت هـای تلقیح شده به صورت روتیـن به مرحله بلاستوسیت تکامل می یـابند . بهرحال میـزان تکامل جنین تا مرحله بـلاستوسیست بین آزمایشگاه ها و سیستم هـای کشت به طور محسوسی متفـاوت است (۱۳). در تحقیق حـاضر میزان بلاستوسیست های بدست آمده از اووسیت های لقـاح یافته، ۲۰٪ است. سایـر محققین این میـزان را بین ۱۳٪ تا ۵۳٪ گـزارش نموده اند (۷ و ۹) . فـاکتورهای مختلفی بر میـزان تولید بلاستوسیست در آزمایشـگاه مؤثـرند که مهمترین آنها عبـارتند از :

۱- منبـع اووسیت: تخمدان هـای استفاده شده در این تحقیق مربوط به گـاوهای مسن، محلی و دورگـه بود که بیـانگر کیفیت پـایین اووسیت هـای بدست آمده در مقـایسه با اووسیت های سایر محققین می باشد .

۲- شـرایط بلـوغ: تحقیقـات نشان داده است که نـوع محیط بلـوغ و افـزودنیهای آن بر میـزان لقاح و درصد بـلاستوسیست مؤثـر است بگونـه ای که استفـاده از هورمـون رشد ، فـاکتور رشد اپیـدرمی، اکتیـوین و انسولیـن، میزان لقـاح را از ۷۷٪ به ۹۰٪ و میزان تولید بلاستـوسیست را از ۲۵٪ به ۵۳٪ افـزایش می دهد (۹) . در حـالی که در این تحقیق از HMG[1] و استـرادیول استفـاده شد .

۳- نـوع اسپـرم و تکنیک تهیـه اسپـرم: تحقیقـات نشان داده است که نوع اسپـرم و حتی اسپرم یک گـاو در فصول مختلف بر میـزان لقاح و تـولید بـلاستوسیست مؤثـر است (۱۰) . همچنین روش تهیه اسپـرم در میزان لقـاح مؤثر می باشد . به دلیل محدودیت هـایی در این تحقیق از اسپـرم سه گاو نـر و از روش پـرکول برای تهیه اسپـرم استفـاده شد .

۴- شـرایط لقـاح: افـزودن هپارین و کـافئین به محیط لقـاح و نـوع محیط لقـاح بر میـزان لقـاح و درصد بـلاستوسیست مؤثـر است (۹). در این تحقیـق از محیط TALP و هپـارین برای لقـاح استفاده شد .

۵- نـوع و ترکیب محیط کشت جنیـن: بـرای کشت از محیط هـای مختلف با ترکیبـات متفاوت استفاده می شود . از شایعتـرین محیط های تـرکیبی، محیط TCM-۱۹۹ و هم کشتی با سلولهـای گـرانولوزا است که همـراه بـا ۱۰٪ FCS استفـاده می شود و از شایعتـرین محیط هـای ساده محیط SOF است که همراه با اسیدهـای آمینه ضروری و غیـرضروری و FCS استفـاده می گـردد (۱۱) . در اکثر تحقیقـاتی که از SOF به عنـوان محیط کشت استفـاده شده است، از فشـار اکسیـژن ۵٪ و نیتـروژن ۹۰٪ و ۵٪ دی اکسید کـربن استفـاده شده، در حـالی که در این تحقیـق از ۵٪ دی اکسید کربن در هوا استفـاده شد . جنین در طی فرآیند انجماد ـ ذوب تحت تـأثیر فاکتورهای مختلفی در معرض آسیب قـرار می گیرد (۱۴) .

این فـاکتورها عبـارتند از :

۱) مسمومیت نـاشی از ضد یخ هـا ۲) آسیب نـاشی از حساسیت در برابر سرما ۳) تشکیل و رشد یخ داخل سلولی ۴) آسیب ناشی از شکست پرده شفاف[2] ۵) تـورم سلولی . مسمومیت ناشی از غلظت های بالای ضد یخ ها را می توان به فشار اسموتیک و آسیب هـای بیوشیمیایی نسبت داد که بستگی به میزان نفوذپذیـری و غلظت ضد یـخ دارد و نیز تحت تـأثیر مدت زمان و دمایـی است که جنین در معرض ضد یخ قـرار می گیرد (۱۵) . آسیب اسموتیـک در نتیجه تغییرات در حجم در طی اضـافه نمودن و برداشت ضد یـخ است (۸) . مسمومیت بیوشیمیـایی داخـلی ممکن است در نتیجه اثر اختصـاصی متقـابل بین ضد یخ هـا و محتویات سلـول نظیـر پـروتئین هـای DNA و غشـاهای بیولوژیـکی باشد (۸).

توان زیستی جنین پس از ذوب را می تـوان با متدهای مختلفی ارزیـابی کرد . بهترین ملاک بـرای توان زیستی، تولد گوسـاله طبیعی پس از انتقال جنین به مـادر است که امکان انجـام آن در همه آزمایشـگاهها فـراهم نیست و همچنین این روش نیز وقت گیـر بوده و گران است . اما در آزمایشـگاه، شایعتـرین روش ارزیـابی، یک دوره مجدد کشت جنین به مدت ۴۸-۲۴ سـاعت پس از ذوب است که با اتسـاع مجدد جنین هـا و خـروج آنها از پرده شفـاف مشخص می شود .

1- Human menopausal gonadotropin
2- Zona pellucid

نتـایج این تحقیق ، میـزان بلاستوسیست های متسع شده پس از کشت مجدد در روز هفتـم را ۷۰٪ و در روز هشتم را ۶۵٪ نشـان داد . محققیـن دیـگر میـزان حیـات بلاستوسیست هـا پس از ذوب و کشت مجدد را بین ۲۰٪ تـا ۹۵٪ گـزارش نموده اند (۷ و ۹ و ۱۶).

تفـاوت در میـزان حیـات بلاستوسیست ها پس از ذوب را می تـوان به تفـاوت در کیفیت جنین ها نسبت داد که خود متـأثر از نوع محیط کشتی است که بـرای تولید جنیـن در آزمایشـگاه قبل و بعد از انجماد استفاده می شود (۷و۱۷و۹) . پـایین بودن میـزان حیات بلاستوسیست های روز هشتم را احتمـالاً به تفاوت در کیفیت این جنین هـا در مقـایسه با جنین هـای روز هفتـم نسبت می دهنـد (۱۸). تحقیقـات نشان داده است که وجـود سرم در محیط کشت بـاعث تجمع غیر طبیعی قطرات چربی در سیتوپلاسم سلول جنین می شود و این امر میـزان حیات بلاستوسیست هـا را بعد از انجمـاد کـاهش می دهـد (۱۹) .

نتـایج این تحقیق حـاکی از آن است که با استفاده از تکنولـوژی تولید مثل و بهبود شرایط محیط کشت می توان درآزمایشگاه جنین دام تولید و با روش انجمادی ذخیره نمود و از این جنین هـا در آینده به عنوان ابزار تحقیقاتی در تولید سلولهای بنیـادی جنینی ، تولید حیوانـات شبیه سازی و حیوانا ت ترانس ژنیک جهت اهداف تحقیقـاتی ، تغذیـه ای و دارویـی استفـاده نمود .

تقدیـر و تشکر :

این مطالعـه بخشی از طـرح « کلونینـگ گـاو » مصوب شورای علمی پژوهشـکده رویان و دفتر جهـاد دانشگاهی (کد طرح ۲۱-۵۹۴) است . بدین وسیله نویسندگان بر خود واجب می دانند که از همـکاری بیدریغ مسئولین محتـرم پژوهشـکده رویان و مسئولین و کـارکنان مرکز بـاروری و نـاباروری اصفهان و مسئولین کشتـارگاه صنعتی اصفهان تشکر و قدردانی نمـایند .

REFERENCES : منـــــابع :

1) Wheeler. MB, Walters EM. Transgenic Technology and Application in swine. Theriogenology 2001;56:1345-1369

2) Bleck. GT, White. BR, Miller. DJ, Wheeler MB. production & Lactalbumin in the milk of transgenic pigs. J Anim sci 1998;76:3072-3078.

3) Brenig. B, Mullar. M, Brem G. Gene transferin pigs proc 4th world cong genet Apptied to live stock prod, 1990;12:41- 48.

4) Nguyen. BX, sotomaruy, Tani. T, Katoy Tsunoday. Efficient cryopreservation of bovine blastocysts drived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vetrification, Theriogenology 2000;53:1439-1448.

5) Hovatta. O, sily. R, Kraus. ZT, and et al. Gryopreservation of human ovarian tissue using dimethy1 sulphoxid and propnedio1 socrose as cryoprotectants. Human Repord 1996;11(6):1268-1272.

6) Leibo SP. Field trial one step frozen bovine embryos transferred non-surgically. Theriogenology 1983;19:139.

7) Rizos. D, ward. F, Boland. MP, Lanergand P. Effect of culture system on the yield and guality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. Theriogenology 2001;56:1-16.

8) fahy GM. Cryopotectant toxicity, Biochemical or smatic? Cryo-Lett. 1984;5:287-294.

9) Mtango. NR, varisanga. MD, Dong. YJ, Rajamahendvan R. Growth factors and growth hormon enhence in vitro embryo production and post than survival of vitrified bovine blastocysts. Theriogenology 2003;5:1393-1402.

10) parrish. jj, susko-parrish. jl, first NL. Capacition of bovin sperm by heparin. Biol Reporod. 1998;138:1171-80.

11) steeves. TE, Gardner DK. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in cultrure. Bio1 Reprod 1999:61:731-40.

12) zhu. se, kasai. M, atage H. Cryopreseration of expanded mouse blastocysts by vetrification in ethylenglycol-based solution. J Reprod Fertil 1993;98:139-145

13) Gutierrez, Adan lenergand. p, Rizos D. Effect of the in vitro culture system on the kinetus of blastocyst development. Theriogenelogy 2001;55:1117-1126.

14) Dobrinsky jr. cellular approach to cryopresrvation of embryos . Theriogenology 1996;45:17-26.

REFERENCES : منـــــابع :

15) shaha. s, suzuk t. vetrification of in vitro procluced bovine embryos at different ages using one and three-stop addtion of cryopresrvation additives. Reprod Fertil Dev 1997;9:741-746.

16) Martinez. AG,Valcarcel. A, Brogliatti G.Vitrification of in vitro production bovine embryson in vitro and in vivo evaluation. Anim Reprod sci 2002,73:11-21

17) kaidi. S, Donnay. I, Vanlangendanck. A, Massip A. camparison of two co-culture system to assess the survival of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification. Anim Repord sci 1998;52:39-50.

18) vajta. G, Hom. P, Grev T. Overall efficiency of in vitro embryo producation and vitrification in cattle. Theriogenology 1996;45:683-689.

19) Hiroyoshi H, In vitro producation pf bovine embryos and their application for embryo Transfer. Theriogenology 2003 59:675-685.

In vitro production and vitrification of bovine embryo.

Karimi jashni.H(Ph.D) Nasr esfhani.MH(Ph.D) Emani.H(Ph.D) Mardani.M(Ph.D) Baharvand.H(Ph.D)

A b s t r a c t :

Introduction: It behooves the researchers to make attempts to conduct more studies; for, it deems crucial to utilize more up - to - date technologies in some special fields as cloning and producing trans genetic animals. These methods are supposed to proliferate the production of animals which are persistent against diseases, more milk production and pharmaceutical proteins.The aim of this study was in vitro production and verification of bovine embryo for next researches.

Materials & Methods: After maturation and fertilization of oocyts, embryos Cultured in SOF medium at 39c temperature and %5 co2 in incubator for 8 day. Then 200 high quality blastocyst selected and vitrified (%40 ethylene glycol, %18 focal, 13 molar sacarose). after thawing, embryos cullored for 24 hours and viability of them assessed by re-expanded embryos.

Results: %75 of oocyts fertilized and cleavaged, %20 of fertilized oocyts recived to blastocyst stage. percentage of post - thaw re - expanded blastocysts for 7 day and 8 day was %65 and %70 respectively.

Conclusion: Even though post - thaw survival blastocyst rate on 7 day was higher than the 8 day, but difference between the two groups not significant. Rate of Fertilized oocyts, developed blastocysts and blastocysts survival after verification was as same as the other countries researchers.

key words: Bovine, Embryo, Vitrification