تأثير طرائق جمع البويضات من مبايض الأبقار في المجازر في إنضاج البويضات مختبرياً

سيف أسامة عبد الحافظ[1]*، ثائر رشيد محمد* وإحسان حمودي سعيد**

***كلية الزراعة/ جامعة الأنبار**

****كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد**

الخلاصة

صممت هذه الدراسة للمقارنة بين طريقتي جمع البويضات (التشطيب – ORCS) من مبايض الأبقار في المجازر وتأثيرهما في معدل إنضاج البويضات، جمعت مبايض الأبقار من المجزرة، واستخرجت منها البويضات بطريقة التشطيب و ORCS. واستخدم الوسط الزرعي SOF لإنضاج بويضات الأبقار (في حاضنة يتوافر فيها ثنائي أوكسيد الكاربون بنسبة 5% والرطوبة النسبية 90% ودرجة حرارة 38.5 مْ لمدة 24 ساعة). أظهرت نتائج الدراسة وجود فرق معنوي بين طريقة التشطيب لجمع البويضات مقارنة بطريقة ORCS في تأثيرها على إنضاج بويضات الأبقار في المختبر 57.76% مقارنة 43.54%. نستنتج أنه يوجد فرق بالنسبة إلى معدلات إنضاج بويضات الأبقار مختبرياً باستخدام طريقتي الجمع التشطيب مقارنة مع ORCS، ولكن هذه الطرائق تشجع في الحصول على عدد كبير من البويضات، مما يشجع بمداولتها لأغراض مختبرية (الاستنساخ وتجنيس الأجنة).

الكلمات المفتاحية: جمع البويضات، مبايض الأبقار، انضاج البويضات.

E-mail:saifosama_alhadithy@yahoo.com

Effect of recovery methods of bovine oocytes on in vitro maturation

S. O. Abd Al-Hafedh, T. R. Mohammed and Ihsan H. Al-Timimi
College of Agriculture\University of Anbar
College of Veterinary Medicine\University of Baghdad

Abstract

This study was designed to compare between two methods collecting oocytes (slicing - ORCS) and its effect on maturation of oocytes in vitro. oocytes of cows were harvested using OCRC and slicing methods from gental organs in slaughter house. used media culture SOF for maturation oocytes (at 38.5 ̊C, 5% CO_2 and 90% relative humidity for 24 hrs.). The results showed significant difference ($P<0.05$) in maturation rate between oocytes collected by slicing effect on maturation oocytes in vitro cows 57.76 % as compared with ORCS method 43.54 %. In conclusion, there is a difference for the maturation oocytes in vitro using bovine two methods slicing compared with ORCS, but these methods are encouraged to get a large number of oocytes, which encourages Bmdaolentha for vitro purposes (cloning, sexing manipulation of embryos).

Keywords: recovery methods, bovine oocytes, in vitro maturation

المقدمة

يعد عدد البويضات الناتجة ونوعيتها من كل مبيض معياراً مهماً ومساعداً في عمليات التداول والاستخدام للنضج والإخصاب والنمو ومفيدة لعمليات التجنيس والاستنساخ، كما تؤثر نوعية البويضات في التطور الجنيني المبكر وتكتسب البويضات مقدرتها على التطور خلال مرحلة تكون الحويصلات أو خلال نضج البويضات في المختبر (1). وقد استعملت العديد من الطرائق لجمع البويضات من المبايض النشطة وهنالك مصدران للمبايض: الأول من الإناث المذبوحة في المجازر والثانية من الحيوانات الحية (2). إذ ذكر (3) أن البويضات المأخوذة من المبايض بطريقة التشطيب تمتلك قدرة أكبر على النضج والإخصاب عند الأبقار. في حين أشار (4) بإن عملية

[1] **بحث مستل من رسالة الباحث الأول.**

التشطيب تتميز بكونها طريقة بسيطة وفعالة لجمع بويضات ذات نوعية جيدة في المختبر. بالإضافة إلى ذلك، أن قوة الطرد المركزي المطبقة في إجراء ORCS (oocyte recovery centrifuge slicing) كانت هي فقط مزايا الطريقة الجديدة لمقارنة بطريقة التشطيب (5). أن البويضات التي يتم أخذها من المبايض التي تجمع من المجازر هي مصدر رخيص وملائم للأغراض البحثية (6)، أما طرق جمع البويضات من الحيوانات الحية تكون مكلفة وعدد البويضات المأخوذة من المبيض قليلة جدا (7). ونظراً إلى إنّ العديد من الأبقار تذبح وهي ما تزال تحمل في مبايضها العديد من البويضات التي تعبر عن القدرة الوراثية الكامنة، وعلى هذا الأساس تم استخدام طريقة جمع بويضات حديثة هي الأول من نوعها في العراق وهي طريقة (ORCS) وتمت مقارنتها بطريقة جمع البويضات بالتشطيب وتأثيرهما في معدل إنضاج البويضات في المختبر.

المواد وطرائق العمل

أجريت الدراسة في مختبر الدراسات العليا/ فرع الجراحة والتوليد/ كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد، للفترة من 1 شباط 2016 إلى 1 حزيران 2016 ، وشملت المواد والطرائق الآتية:

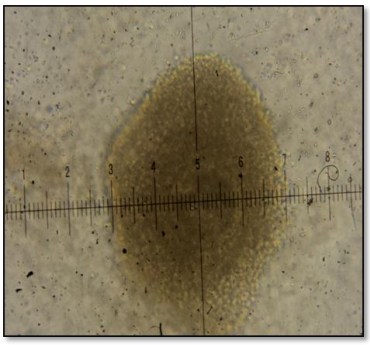
- **جمع المبايض من المجزرة:** كررت التجربة خمسة مرات جمع خلالها 38 مبيضاً من 19 بقرة، وكانت الحالة التناسلية لها غير معروفة وفي مراحل مختلفة من العمر ذبحت في مجزرة الشعلة، وتم جمع الأعضاء التناسلية الأنثوية لهذه الأبقار من المجزرة، حيث تم وضعها في صندوق تبريد يحتوي على محلول ملحي وبدرجة حرارة 33-35 مْ، وفي غضون ساعة واحدة نقلت إلى المختبر. حيث تم استئصال المبايض من الأعضاء التناسلية بواسطة مقص معقم، ونظفت المبايض بواسطة المقص من جميع الأنسجة الرابطة المحيطة بها. وغسلت جميعها أول مرة بمحلول الفوسفات الواقي (PBS، P-5493، Sigma) لإزالة الجلطات الدموية والأوساخ العالقة عليها، ثم تغسل مرتين بالوسط الزرعي Synthetic Oviduct Fluid (SOF)، ونضعها بعد ذلك في وعاء زجاجي معقم يحتوي على الوسط الزرعي SOF ويضاف إليه Nystatin،Penicillin Streptomycin. وزعت المبايض في مجموعتين: 18 مبيضاً لطريقة جمع البويضات ORCS و20 مبيضاً لطريقة جمع البويضات بالتشطيب.
- **جمع البويضات:** تم جمع البويضات بواسطة احدى الطرق التالية في كابينة تعقيم هواء:
- **ORCS:** تم ألتقاط المبايض بواسطة ملقط خاص ومعقم، ووضعت في طبق بتري يحتوي على 10 مل وسط زرعي SOF، و شطب سطح كل مبيض بواسطة مشرط جراحي، وبعد الانتهاء من تشطيب المبايض نقلت محتويات الاطباق الزجاجية الى وعاء زجاجي معقم يحتوي على الوسط الزرعي SOF ومضاف اليه Nystatin، Penicillin Streptomycin. ومن ثم نقلت الى أنابيب الاختبار ووضعت داخل جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق وبعدد دورات 1200 دورة/ دقيقة، وبعد أنتهاء مدة الطرد المركزي أهمل السائل الطافي وأخذت المحتويات المترسبة في قعر أنبوب الاختبار ووضعت بطبق بتري معقم، يحتوي على 5 مل وسط زرعي، وفحصت تحت المجهر، لأختيار البويضات التي تصلح للأنضاج المختبري، و نقلت البويضات بواسطة الماصة الميكانيكية الدقيقة لطبق بتري الذي يحتوي على الوسط الزرعي المعقم المعد لإنضاج البويضات.
- **التشطيب Slicing** : تم التقاط المبايض بواسطة ملقط خاص ومعقم، ووضعت في طبق بتري يحتوي على 10 مل وسط زرعي SOF، وشطب سطح كل مبيض بواسطة مشرط جراحي، وبعد الانتهاء من تشطيب المبايض نقلت محتويات الاطباق الزجاجية الى وعاء زجاجي معقم يحتوي على الوسط الزرعي SOF ومضاف اليه Nystatin، Penicillin Streptomycin. بعدها سحب في كل مرة 10 مل من محتويات الوعاء الزجاجي ووضعت في طبق بتري معقم لغرض عملية الفحص تحت المجهر لأختيار البويضات التي تصلح للأنضاج المختبري، ونقلت البويضات بواسطة الماصة الميكانيكية الدقيقة لطبق بتري الذي يحتوي على الوسط الزرعي المعقم المعد لإنضاج البويضات.

- **تقـويم البيـوض:** البويضـات التـي تـم جمعهـا (بواسـطة ORCS وSlicing) تـم فحصـها تحـت المجهـر المقلوبInverted microscope وصنفت البويضات وفقاً لـ (8) بأنها جيدة Good (الدرجةA)، متوسطة Fair (الدرجةB)، فقيرة Poor (الدرجةC)، على أساس الخلايا الركامية وتجانس السايتوبلازم.

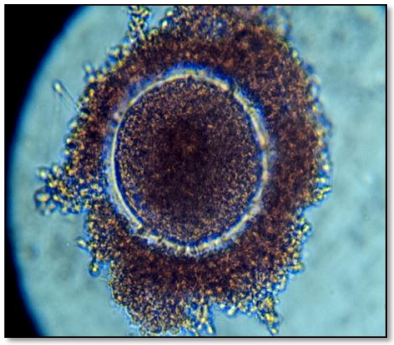
Good: البويضات محاطة بالعديد من طبقات الخلايا الركامية والسايتوبلازم متجانس.

Fair: البويضات محاطة بطبقات قليلة من الخلايا الركامية وغير مكتملة والسايتوبلازم متجانس.

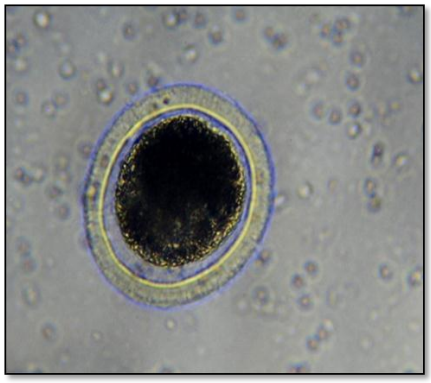
Poor: البويضات محاطة بعدد قليل من الخلايا الركامية او غير محاطة بالخلايا الركامية والسايتوبلازم غير متجانس.



A: بويضات من الدرجة الأولى



B: بويضات من الدرجة الثانية



C: بويضات من الدرجة الثالثة

- **إنضاج البويضات في المختبر:** بعد جمع وتقييم وتصنيف البويضات تم اختيار البويضات ذات النوعية الجيدة والمتوسطة. غسلت البويضات مرتين بالوسط الزرعي SOF. وحضنت البويضات بالأوساط الزرعية المناسبة بدرجة حرارة 38.5 مْ، 5 % CO2 ورطوبة نسبية 90% لمدة 24 ساعة. وبعد انتهاء مدة الإنضاج تم فحص الأطباق تحت المجهر المقلوب Inverted microscope. ويعتبر ظهور الجسم القطبي الأول دليلاً جيدا لنضوج البويضات في المختبر IVM. وتم حساب أعداد البويضات الناضجة.
- **التحليل الإحصائي:** استعمل البرنامج الإحصائي SAS- Statistical Analysis System (9) في تحليل البيانات لدراسة تأثير طرائق جمع البويضات في الصفات المدروسة وفق تصميم عشوائي كامل (CRD)، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار Duncan (10) متعدد الحدود.

النتائج والمناقشة

- **تأثير طريقة جمع البويضات على إنضاج بويضات الأبقار مختبرياً:** جمعت بطريقة ORCS 124 بويضة من 18 مبيض وبطريقة الجمع بالتشطيب 161 بويضة من 20 مبيض، نضجت منها 54 بويضة في طريقة ORCS و93 بويضة بطريقة التشطيب، حيث أظهرت نتائج الجدول (1) وجود تأثير معنوي ($P<0.05$) في النسبة المئوية للإنضاج لطريقة الجمع بالتشطيب 57.76 % (93/161) مقارنة 43.54 % (54/124) لطريقة ORCS.

جدول (1) تأثير طرائق جمع البويضات في نسب الإنضاج لبويضات الأبقار في المختبر

طريقة جمع البويضات	عدد المبايض (N)	عدد البويضات المحضنة (N)	عدد البويضات الناضجة (N)	نسبة الإنضاج %
ORCS	18	124	54	43.54 [b]
Slicing	20	161	93	57.76 [a]

تشير الأحرف المختلفة في العامود الواحد إلى وجود فرق معنوي (P<0.05) بين المتوسطات.

وقد يعزى التفوق المعنوي لطريقة التشطيب في النسبة المئوية للإنضاج مقارنة مع طريقة ORCS، إلى الأضرار التي أحدثتها طريقة ORCS بالخلايا الركامية المحيطة بالبويضة، التي لها دور مهم في عملية إنضاج البويضات المتمثل بنواتج الأيض التي تنتجها الخلايا الركامية والتي تؤثر على كفاءة البويضة وتطورها، إن إزالة عناصر تثبط تطور الجنين بالوسط الزرعي، والخلايا الركامية قد تكون مؤثرة جداً في قدرة البويضات للانقسام الاختزالي الأول، وأن المشاكل في التطور للبويضات الجرداء كانت بسبب عدم أحاطتها بالخلايا الركامية (5، 11). ولهذا فأن طريقة جمع البويضات التي تؤثر على الخلايا الركامية، ستؤدي ذلك إلى بعض التدهور في معدل الإنضاج والإخصاب وحتى في التطور الجنيني. إلا انهُ يمكن الإشارة إلى أن طريقة التشطيب، وخاصة ORCS لم تؤثر على الخلايا الركامية، على شرط الأخذ بنظر الاعتبار إلى عدد الدورات ومدة الطرد المركزي للبويضات، ودرجة حرارة جهاز الطرد المركزي. وهنا يجدر الإشارة أن طريقة التشطيب وORC يمكنها استحصال البويضات من كل الحويصلات السطحية وكذلك من نقاط اعمق للقشرة (5). على الرغم من إن هاتين الطريقتين تشجع في الحصول على عدد كبير من البويضات مختبرياً، إلا إن معدلات إنضاج بويضات الأبقار مختبرياً كانت اعلى بطريقة التشطيب مقارنة بطريقة ORCS.

المصادر

1. Krisher, R. L. (2004). Effect of macromolecule supplementation during in vitro maturation of goat oocytes on developmental potential. Mol. Reprod. Dev., 69: 338- 346.
2. Morton, K. M. (2008). Developmental capabilities of embryos produced in vitro from prepubertal lamb oocytes. Reprod. Dom. Anim.,43 (Suppl.2): 137-143.
3. Takahashi, M.; Nagai, T.; Hamano, S.; Kuwayama, M.; Okamura, N. & Okano, A. (1993). Effect of thiol compounds on in vitro development andintracellular glutathione content of bovine embryos. Biol. Reprod., 49:228-232.
4. Rao, M. M. & Mahesh, Y. U. (2010). Effect of harvesting technique and other factors on oocyte retrieval in buffalo (Bubalus bubalis). Indian J. Anim. Reprod., 31: 15-18.
5. Davachi, N. D.; Zeinoaldini, S. & Kohram, H. (2012). A novel ovine oocyte recovery method from slaughterhouse material. Small Rumin. Res.,106(2): 168-172.
6. Jamil, H.; Samad, H. A.; Qureshi, Z. I.; Rehmar, N. & Lodhi, L. A. (2008). Harvesting and evaluation of riverin Buffalo follicular oocytes. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 32 (1): 25-30.
7. Totey, S. M.; Singh, G.; Taneja, M.; Pawshe, C. H. & Talwer, G. P. (1992). In vitro maturation, fertilazition and development of follicular oocytes from Buffalo (*Bubalus babulis*). J. Reprod. Fertil., 95: 597-607.
8. Wani, N. A.; Wani, G. M.; Khan, M. Z. & Salahudin, S. (2000). Effect of oocyte harvesting technique on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. Small Rum. Res., 36: 63- 67.
9. SAS. (2012). Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.
10. Duncan, D. B. (1955). Multiple Rang and Multiple F-test. Biometrics. 11: 4-42.
11. Hashimoto, S.; Saeki, K.; Nagao, Y.; Minami, N.; Yamada, M. & Utsumi, K. (1998). Effects of cumulus cell density during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. Theriogenology, 49(8): 1451-1463.