آضافه مصل الأغنام إلى وسط الإنضاج لدراسة تأثيره على الإنضاج والإخصاب و التطور الجنيني المبكر لبويضات الاغنام المحلية مختبريا

م. محمد عبد الكريم الطائي
الجامعة المستنصرية /كلية التربية الأساسية

الخلاصة

أن هدف الدراسة هو تحديد اهمية اضافة مصل الاغنام الى وسط الانضاج ومعرفة قابلية البويضات على الانضاج , الاخصاب والتطور الجنيني المبكر, ومعرفة قابلية البويضات المحاطة بعدة طبقات من الخلايا الركامية او العارية على الانضاج و الإخصاب والتطور الجنيني المبكر , تم تقسيم البويضات الى ثلاثة مجاميع(أ , ب و ج), حيث(أ) تمثل البويضات المحاطة بـــ 3–6 طبقات من الخلايا الركامية ,(ب) محاطة بـــ (1 – 2) من الخلايا الركامية ,(ج) عارية غير محاطة باي طبقة من الخلايا الركامية , استخدم الوسط الزرعي Tissue Culture Media-199(TCM199) لإنضاج البويضات بعد ان اضيف مصل الأغنام بثلاثة مستويات(0 ,5 و10)% , لوحظ وجود فروق معنوية عند مستوى $P<0.05$ بين المجموعات الثلاثة من البويضات , فالمجموعة(أ) أعطت أعلى نسبة إنضاج , اخصاب وتطور جنيني مبكر عند مستوى 10% من مصل الاغنام 69.44 ,32 و 25 % على التوالي , بينما البويضات من المجموعة(ج) أعطت اقل قدرة على الانضاج والاخصاب 27.9 و 8.33 % في الوسط الذي اضيف اليه 10 % من مصل الاغنام , كذلك بينت النتائج ان عدم اضافة مصل الاغنام الى وسط الانضاج أي المستوى. قد خفض نسبة الانضاج للمجاميع الثلاثة 46.6 , 36.11 و6.45 % للمجاميع(ا , ب و ج) على التوالي مع فشل البويضات الناضجة في الاخصاب المختبري .

المقدمة:

انضاج البويضات مختبريا *in vitro* maturation(IVM) خطوة مهمة باتجاه الاخصاب المختبري *in vitro* fertilization(IVF) فالعديد من الباحثين درسوا

المتطلبات الضرورية للـ (IVF) لبويضات اللبائن(Wani et al., 2000 , Roa et al. , 2002 , Kharche et al . , 2005و).

ان اضافة مصادر بروتينية وهرمونات الى الوسط الخاص بالانضاج IVM يلعب دورا مهما في تتابع الاخصاب المختبري IVF ونجاح عمليات انتاج الاجنة مختبريا in vitro production (IVP) (Pawshe et al ., 1996).

منذ مدة طويلة يستخدم المصل البقري Bovine serum ومصل اجنة العجول Fetal bovine serum كاضافات الى اوساط الانضاج المختبري (Gordon , 1997) حيث لوحظت أهميته في الحفاظ على حيوية النطاق الشفافZona pellucid (zp) ومنعه من التصلب(Downs et al . , 1996).

تلعب الخلايا الركامية Cumulus cell دورا مهما في عملية تخليق البروتينات داخل البويضة اثناء طور النضوج من خلال تحديد البروتينات التي تخلق في البويضة (Crosby et al . , 1981) .

ان الهدف من اجراء هذا البحث هو لتحديد اهمية ونسب اضافة مصل الاغنام الى الاوساط الزرعية الخاصة بانضاج بويضات الاغنام المحلية مختبريا , ودراسة تاثير وجود الخلايا الركامية المحيطة بالبويضة على قابليتها التطورية مختبريا .

المواد وطرائق العمل :

جمع البويضات

جمعت مبايض النعاج من المجازر بعد 20– 30 دقيقة من الذبح , استعملت حاويات بلاستيكية خاصة للحفاظ على درجة الحرارة بين 33–35 م^{o} حيث وضعت المبايض في المحلول الفسيولوجي NaCl بتركيز 0.9 % مضافا اليه بنسلين وستربتومايسين ونقلت الى المختبر خلال 1–2 ساعة بعد الذبح (Gandolfi and Moor, 1987) .

غسلت المبايض 5 مرات في محلول PBS مضاف اليه بنسلين مع ستربتومايسين , بعدها جمعت البويضات باستعمال تقنية السحب من الجريبات المبيضية باستخدام ابرة قياس21 G مثبتة بمحقنة 5 مل تحوي على 0.1 سم^{3} من الوسط TCM-199مضافا اليه المضادات الحيوية والهيبارين, فرغت محتويات المحقنة في طبق بتري ويتم غسل البويضات في نفس الوسط السابق للتخلص من الشوائب التي ترافق البويضات المسحوبة.

انضاج البويضات مختبريا :

قسمت البويضات المجموعة الى ثلاثة مجاميع (مع ملاحظة تحبب السايتوبلازم وعدم وجود تشوهات) ا تمثل البويضات المحاطة بـــ 3–6 طبقات من الخلايا الركامية , والمجموعة ب تحوي على البويضات المحاطة بـــ 1–2 طبقة من الخلايا الركامية والمجموعة ج البويضات العارية , كل مجموعة من البويضات نقلت الى ثلاثة اوساط زرعية خاصة بالانضاج مضافا اليها مصل الاغنام بنسب 0 ,5 و 10 % حيث نقلت البويضات الى طبق بتري يحوي على 0.5 مل من الوسط الزرعي TCM-199 مضاف اليها 4Mm من $NaHCO_3$ وعدل الـــ PH الى (7.35) باضافة الـــ 20Mm HEPES مع 1ug/ml استرادايول و 10ug/ml من كل من الـــ Follicle Stimulating Hormone (FSH) و Lutinizing Hormone (LH) مع إضافة 100 IU/ml من البنسلين والستربتومايسين توضع كل 5–10 بويضات في كل قطرة من الوسط الزرعي ثم تغطى بزيت البارافين وتنقل الى حاضنة بوجود CO_2بتركيز 5%ودرجة حرارة 39 م^{o} ورطوبة 95% ولمدة 24 ساعة (Fukui et al . , 1988).

تكييف النطف :

جمعت النطف لاثنين من الاكباش المحلية باستخدام طريقة المهبل الاصطناعي وجرى تقييم السائل المنوي لاختبار كفائته , بعدها خفف السائل المنوي مع 10 مل من وسط mTALP بعد ذلك تغسل النطف حيث يعمل لها طرد مركزي بقوة 1200 دورة / دقيقة لمدة 9 دقائق وبدرجة حرارة 37 م^{o} , وعند انتهاء الغسل تم التخلص من السائل وبقيت النطف المتمركزة في قعر الانبوبة بشكل اقراص (pellet) , خففت النطف باضافة 2 مل من mTALP وتترك النطف لتسبح الى الاعلى (Swim-up) لمدة 1.5 ساعة بدرجةحرارة 37.5 م^{o} في حمام مائي, يتم سحب 0.5مل من الجز العلوي للسائل الحاوي على النطف وتخفف الى ان يصبح التركيز 1x 10^{6} نطفة / مل (Alofi Alhimaidi, and 2004) .

إخصاب البويضات مختبريا :

تزال الخلايا الركامية المحيطة بالبويضات بعد استخراجها من الحاضنة وتعزل البويضات التي يلاحظ فيها ظهور الجسم القطبي الاول كمؤشر على حصول الانضاج المختبري , يتم اضافة البويضات الناضجة الى النطف المتكيفة بمعدل 10 – 12 بويضة

لكل 1 مل من وسط الاخصاب , تنقل بعدها الى حاضنة تحوي CO_2 بتركيز 5% ورطوبة عالية ودرجة حرارة 39 م^{o} ولمدة 16 ساعة , بعدها تغسل البويضات بمحلول الـــ (PBS) للتخلص من بقايا النطف المتعلقة تفحص البويضات تحت المجهر العاكس لملاحظة عملية استحداث الاخصاب من خلال ظهور الجسم القطبي الثاني .

انقسام البويضات المخصبة:

تنقل البويضات المخصبة الى وسط TCM199 وتحضن لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 39 م^{o} في حاضنة CO_2 بترك 5% ورطوبة عالية , تفحص بعدها تحت المجهر العاكس لملاحظة درجة الانقسام والنمو الذي حدث لها .

لتحليل الإحصائي:

استخدمت طريقة مربع كاي (Chi-square) لتحليل النتائج المتعلقة بالدراسة .

النتائج:

اظهرت نتائج اضافة مصل الاغنام ضمن ثلاث مستويات 0, 5 و 10% الى الاوساط الزرعية الخاصة بانضاج البويضات مختبريا (IVM) وجود فروق معنوية عند مستوى ($P<0.05$)بين المجاميع الثلاثة من البويضات المحاطة بـــ 3–6 من الطبقات الركامية, 1–2 طبقة من الخلايا الركامية و البويضات العارية(أ, ب و ج) على التوالي جدول (1) .

جدول(1) يمثل حالة البويضات ومستوى اضافة مصل الاغنام الى الوسط الخاص بانضاج بويضات الاغنام المحلية مختبريا

حالة البويضة	اضافة الـــ SS (%)	عدد البويضات (no.)	البويضات الناضجة		البويضات المخصبة		البويضات المنقسمة	
			No.	%	No.	%	No.	%
أ	0	30	14	46.6	–	–	–	–
	5	39	24	61.5	3	12.5	–	–
	10	36	25	69.44	8	32	2	25
ب	0	36	13	36.11	–	–	–	–
	5	42	19	45,23	1	5.26	–	–
	10	40	25	62.5	6	24	1	16.6
ج	0	31	2	6.45	–	–	–	–
	5	35	5	14.28	–	–	–	–
	10	43	12	27.9	1	8.33	–	–
قيمة مربع كاي			$X^2=10.760^{**}$		$X^2=3.334^{ns}$		$X^2=2.951^{ns}$	

$(P<0.05)^{**}$, ns = عدم وجود فروق معنوية

أ- البويضات المحاطة بـــ 3-6 من الخلايا الركامية , ب – البويضات المحاطة بـــ1-2 من الخلايا الركامية , ج – البويضات العارية , SS = مصل الاغنام

فقد لوحظ وجود فروق معنوية عند مستوى ($P<0.05$) للبويضات الناضجة ضمن المجموعة(أ) 46.6 , 61.5 و 69.44 % لمستويات مصل الأغنام المضاف 0 ,5 و 10 % على التوالي مع فشل إخصاب البويضات عند المستوى 0 (بدون إضافة المصل) مع عدم استطاعة البويضات على تتابع الانقسام بعد الإخصاب عند مستوى إضافة 5 % .

أما عند المجموعة ب تبين وجود فروق معنوية عند مستوى ($P<0.05$) حيث كانت 62.5 % عند اضافة 10 % من المصل , بينما كانت 24 و 16.6 % نسب اخصاب وتتابع انقسام البويضات المخصبة عند 0 و5 % من مصل الاغنام المضاف الى وسط الانضاج على التوالي .

ايضا وجدت فروق معنوية عند مستوى($P<0.05$) بالنسبة للبويضات المنضجة من المجموعة ج حيث كانت 6.45 ,14.28 و 27.9 % لمستويات مصل الاغنام المضافة 0 , 5 و 10% على التوالي , وقابلية البويضات العارية على الاخصاب 8.33 % عند مستوى 10% من المصل المضاف .

بينت النتائج ايضا عدم قابلية المجاميع الثلاثة (أ , ب و ج) على تتابع الاخصاب بعد الانضاج عند عدم اضافة مصل الاغنام الى وسط الانضاج .

المناقشة:

اظهرت نتائج الدراسة ان البويضات المحاطة باكثر من ثلاث طبقات من الخلايا الركامية اعطت نتائج افضل في الانضاج والاخصاب والتطور الجنيني المبكر بالمقارنة مع المجموعتين(ب و ج) , و أن نسبة 10% من مصل الاغنام المضاف اعطت اعلى نسب انضاج للبويضات مع ارتفاع قابليتها على الاخصاب وتتابع التطور الجنيني المبكر بالمقارنة مع استخدام 0 و 5 % .

أن إحاطة البويضة بأكثر من طبقة من الخلايا الركامية تكون بمثابة اسناد للبويضة اثناء الانضاج المختبري مع امكانيتها بمد البويضة بالعناصر الضرورية اللازمة لاتمام انضاج سايتوبلازم ونواة البويضة , وهذا يتفق مع ماتوصل اليه Crosby et al . , 1981 من أهمية وجود الخلايا الركامية في تخليق البروتينات داخل البويضة اثناء

الانضاج المختبري , وهذا ما عكس انخفاض نسبة انضاج البويضات في المجموعة ج عند عدم اضافة مصل الاغنام 6.45 % بالمقارنة مع لمجموعة أ حيث بلغت نسبة الانضاج 46.6% عند عدم اضافة مصل الاغنام , وان انخفاض تخليق البروتينات الضرورية داخل البويضة قد ظهر تاثيره بوضوح على قابلية البويضات المنضجة مختبريا في تتابع الاخصاب المختبري , فالمجموعات الثلاثة أ , ب و ج اظهرت فشل قابليتها على اتمام الاخصاب المختبري عند عدم اضافة مصل الاغنام الى الاوساط الزرعية الخاصة بانضاج البويضات مختبريا .

اما بالنسبة لاضافة مصل الاغنام الى وسط الانضاج فقد بينت النتائج اهمية اضافته وعلى مستوى 10% كمصدر بروتيني مهم حيث اعطت افضل النتائج وعمل على تهيئة بيئة ملائمة لتطور البويضات واتمام انضاج سايتوبلازم ونواة البويضة وبالتالي زيادة قابليتها على تتابع الاخصاب مع استاناف انقسام البويضات المخصبة .

المصادر:

Alofi, A. A. and Alhimaidi, A. R. (2004). *In vitro* Maturation (IVM) and Fertilization (IVF) of Sheep Ova Cultured in Two Different Media. *J.King Saud Univ*. 16(1): 15-24.

Crosby, I. M; Osborn, J. C and Moor, R. M. (1981). Follicle cell regulation of protein synthesis and development competence in sheep oocyte. J.Reprod. Fert. 62: 575-582

Downs, S .M ; Schroeder; A .C .and Epping; J. J. (1996). Serum maintains the fertilizability of mouse oocyte matured *in vitro* by preventing hardening of the zona pellucida. Gamete Res. 15: 115-122.

Fukui , y.; Glew, A. M.; Gandolfi, f. and Moor, R . M. (1988). Ram specific effects on *in vitro* fertilization and cleavage of sheep oocyte matured *in vitro*. J. Reprod .Fert. 82: 337-340.

Gandolfi , F. and Moor R. M. (1987). Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cell .J. Reprod. Fert. 81:23-28.

Gordon, I. (1997). Controlled reproduction in sheep and goats. CAB International publishing, Wallingford, p. 309

Kharche, S .D.; Sharma, G .T .and Majumdar, A .C. (2005). *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes vitrified at germinal vesicle stage. Small Rumin. Res. 57: 81-84.

Pawshe, C. H.; Palanisamy, A.; Taneja, M.; Jain, S .K .and Totey, S .M. (1996).Comparison of various and their early embryonic development and cell numbers. Theriogenology, 46: 971-982.

Roa , B.S. ; Naidu ,K. S.; Amarnath, D.; Vagdevi ,R. ; Roa , A .S.; Brahmaiah ,K .V .and Roa, VH (2002). *In vitro* maturation of sheep oocytes in different media during breeding and non-breeding seasons. Small Rumin. Res. 43: 31-36.

Wani. N A.; Wani, G M.; Khan, M .Z and Salahudin, S. (2000). Effect of oocyte harvesting technique on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization in sheep. Small Rumin. Res. 36: 63-67.

Added Sheep Serum to Maturation Media to Study the Effects on Maturation, Fertilization and Early Embryonic Development for Locale Sheep *in Vitro*

Mohammed A. Karim AL-Taaie

Al – Mustansirya University / Collage of Basic Education /department of science

Abstract

The aim of this study is to determine the important of addition sheep serum to maturation media and know the ability of oocyte for maturation , fertilization and early embryonic development , and determent the ability of surround oocyte by many layer of cumulus cells or denuded on maturation , fertilization and early embryonic development , we divided the oocytes for three group (A ,B and C) , A which present the surround oocyte by 3 – 6 layer of cumulus cell , group B 1 – 2 from cumulus cell and group C denuded (no layer of cumulus surrounded) , we used tissue culture media -199 (TCM-199) after added sheep serum in three level (0 , 5 and 10 %) , we found significant differences ($P<0.05$) among three groups of oocyte in group A we see higher percent of maturation , fertilization and early embryonic development at level 10% from sheep serum 69.44 , 32 and 25 % respectively , but the oocyte in group C gave low ability in maturation and fertilization 27.9 and 8.33 % in media which added 10 % from sheep serum ,although the result declared that did not added sheep serum to maturation media (level 0) decreased the maturation percent 46.6 , 36.11 and 6.45 % for three group A , B and C respectively , within failed oocyte maturation *in vitro* fertilization