مجلة المثنى للعلوم الزراعية المجلد (4) العدد (1) لسنة 2016
Al-Muthanna J. for Agric. Sci., 4(1), 2016 Print ISSN: 2226-4086, Online ISSN: 2572-5149

مجلة المثنى للعلوم الزراعية
www.muthjas.com

الإنضاج المختبري لبويضات الماعز المحلي باستعمال تراكيز مختلفة من السائل الحويصلي للأغنام (SFF)

علي عبد الله زعيري السعدون /جامعة المثنى /كلية الزراعة
عبير عبد الستار الجابري/جامعة المثنى /كلية الزراعة

Article Information
Received Date 2016/12/12
Accepted Date 2017/2/16
Keywords
Goat Ovules follicular fluid Sheep

المستخلص

اجريت الدراسة في مختبر الدراسات العليا التابع لكلية الزراعة جامعة المثنى قسم الثروة الحيوانية وكان الهدف منها معرفة تأثير إضافة السائل الحويصلي للأغنام SFF بتراكيز مختلفة 0، 5، 10 و15% إلى الوسط الزرعي القياسي SMART mediaعلى النسبة المئوية للإنضاج المختبري لبويضات الماعز المحلي. تم تحضير السائل الحويصلي بعد جمع مبايض الأغنام من المجزرة وسحب السائل الحويصلي من الحويصلات المبيضية الكبيرة والمتوسطة وتصفيته وإجراء عملية Inactivation عليه وإضافة المضادات الحيوية (البنسلين والستربتومايسين)، وحفظ السائل الحويصلي للماعز بالتجميد البسيط لحين الاستعمال.تم حساب النسبة المئوية للإنضاج المختبري لبويضات الماعز واظهرت النتائج تفوق التركيز15% SFF معنويا(P<0.05) في النسبة المئوية للإنضاج المختبري 59 ± 0.5على بقية التراكيز0،5و10% وكانت 48 ± 0.5 و 47 ± 0.4 و50 ± 0.4 % على التوالي بالنسبة للبويضات التي تحتوي على ركام جرثومي. اما البويضات التي لا تحتوي على ركام جرثومي فقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية عدم وجود فروقات معنوية في النسبة المئوية للإنضاج المختبري بين تراكيز السائل الحويصلي SFF ،0 ،5 10 و15% وكانت 30 ± 0.6، 37 ± 0.6، 40 ± 0.5، 37 ± 0.6% على التوالي.

In vitro maturation of Local goat oocytes using different concentration of sheep follicular fluid

Ali Abdullah Al-Zuairi, Agric.
Abeer Abdulsattar Aljabiri, College, AlMuthanna Univ.

Abstract

Two laboratory experiments were conducted in the depart of Animal Resources, Collage of Agriculture, University of AL-Muthanna to investigate the effect of varying rates of Sheep follicular fluid (SFF) on the SMART media as a culture media for In vitro maturation (IVM). After collection from the follicles, the follicular fluid was subjected to inactivation process and supplied with antibiotics (penicillin and streptomycin), then preserved in the Refrigerator under 5°c to be used latter. IVM results showed that the concentration of 15% SFF significantly ($p<0.05$) increased the percent of IVM (59%±0.5) of the Oocyte with cumulus cells, as compared to anther concentration 0%,5% and 10% 48 ±0.5, 47 ±0.4 50 ±0.4%, respectively. Insignificant differences were detected between all concentration of SFF on the percent of IVM of the Oocyte without cumulus cells.

Corresponding author: E-mail ali.abdz@mu.edu.iq Al- Muthanna University All rights reserved

المقدمة

للثروة الحيوانية أهمية في الاقتصاد الوطني والأمن الغذائي ، فالاهتمام العلمي بهذه الثروة وتطويرها وتنميتها سوف يسهم في توفير الغذاء والكساء للسكان الذين يزدادون بشكل متصاعد ومستمر، ولأهمية الحيوانات بات من الضروري إجراء مزيد من البحوث لتسليط الضوء على تقنيات حديثة لتكاثرها وتحسينها وراثيا والتغلب على حالات عدم الاخصاب وبالتالي عدم الانجاب (Trounson وآخرون،2005).يتميز الماعز المحلي بمزايا عديدة منها مقاومة ظروف البيئة القاسية والأمراض وقابليته تحمل ظروف الرعي لمسافات طويلة إلا أنه بحاجة الى تحسين وراثي عن طريق التضريب مع سلالات أخرى متميزة وراثيا مثل الشامي والسانين اللتان تتميزان بإنتاج حليب عالٍ ونسبة خصوبة عالية (ابراهيم،1998).إن تحسين الكفاءة التناسلية هو هدف يسعى إليه

المهتمون بالإنتاج الحيواني ولتحقيق ذلك فقد استحدث الباحثون عدد من التقنيات وتسمى المساعدة على الانجاب Assisted Reproductive Technologies(ART) وتتمثل بفرط الاباضة وتزامن الشياع ونقل الأجنة والاخصاب الخارجي in vitro fertilization(IVF)، وحقن النطفة داخل سايتوبلازم البويضة Intracytoplasmic sperm injaction(ICSI)، والاستنساخ

وتجميد البويضة وتجميد السائل المنوي والتلقيح الاصطناعي وهذه التقنيات تهدف إلى معالجة المشاكل التناسلية وزيادة عدد المواليد من الحيوانات المتميزة وراثيا وتقليل مدى الجيل للإسراع في برامج التحسين الوراثي (Gordon،2004؛Wright واخرون،2008)

.ونظرا لأهمية الأوساط الزرعية في تطبيق كل من التقنيات التناسلية السابقة الذكر حرص العديد من الباحثين على ايجاد أوساط زرعية تتوفر فيها كافة العناصر الضرورية لنمو وإدامة البويضة والنطفة على حد سواء منها إضافة مصادر بروتينية مختلفة وهرمونات وسكريات وهذه كلها تهدف لإيجاد ظروف بيئية مشابهة للظروف البيئية داخل الجسم الحي (Son واخرون، 2008من هنا جاءت إضافة السائل الحويصلي إلى الأوساط الزرعية المستخدمة في إنضاج وإخصاب البويضات داخل المختبر أو استخدامه كوسط لإنضاج وإخصاب البويضات بدلاً من الأوساط الزرعية القياسية ليس لأنه مادة رخيصة وسهل الحصول عليها فقط وإنما لأنه يوفر بيئة مشابهة للبيئة داخل الجسم الحي(Gupta واخرون،2008).

المواد وطرائق العمل

1-جمع المبايض

جمعت مبايض الأغنام من مجزرة السماوة بعد الذبح مباشرة ونقلها إلى المختبر خلال وقت قياسي حوالي (ساعة واحدة) باستخدام حاويات بلاستيكية تحتوي على المحلول الفسيولوجي(0.9%) المدعم بالمضادات الحيوية (100IU\ML Penicillinو Streptomycin 100) ووضعت داخل قنينة ثرموس بدرجة حرارة 37c وبعدها تم نقلها إلى المختبر وغسلها ثلاث مرات بالمحلول الفسيولوجي الدافئ للتخلص من الدم والشوائب العالقة بالمبايض (Kruipو Dieleman،1982). وإجراء عملية تحضير السائل الحويصلي لإضافته إلى الوسط الزرعي.

2- تحضير السائل الحويصلي

جمع السائل الحويصلي من مبايض الاغنام باستخدام إبرة قياس 20ومحقنة طبية قياس 5مل من الحويصلات المبيضية المتواجدة على سطح المبايض وقد تم ترشيحه باستخدام فلتر قياس 22mm ووضعه في أنابيب اختبار وادخاله داخل حمام مائي بدرجة 45مْ لمدة 45دقيقة هذه العملية تدعى Inactivation ؛وذلك لتعطيل فعالية بعض البروتينات التي توجد في السائل الحويصلي والتي تعيق او تبطئ من عملية انضاج البويضات (Kruipو Dieleman،1982). بعدها وضع السائل الحويصلي داخل جهاز الطرد المركزي بقوة 3000 دورة في الدقيقة لمدة 15 دقيقة وذلك لإزالة الترسبات والمواد العالقة المتبقية في السائل الحويصلي، ثم إضافة السائل الحويصلي إلى الوسط الزرعي أو إضافة البنسلين والستربتومايسين إليه وتجميده لاستخدامه في وقتٍ لاحق

3- جمع البويضات

جمعت البويضات من المبايض المأخوذة من المجزرة(بالطريقة المذكورة اعلاه) بطريقة Oocyte aspiration وذلك عن طريق سحب السائل الحويصلي من الحويصلات الموجودة على سطح المبيض والتي لا يقل قطرها عن 2mm بواسطة إبرة قياس20 محقنة طبية تحتوي على 0.5مل من الوسط الزرعي مع Iu\mLمانع تخثر (Heparin) لمنع التصاق البويضات مع بعضها ، بعد سحب البويضات تم وضعها في طبق بتري وأجريت عملية جمع البويضات تحت المجهر التشريحي وباستعمال ماصة باستور محورة نقلت البويضات ثلاث مرات إلى طبق يحتوي على الوسط الزرعي لغرض غسل البويضات وازالة بقايا الخلايا العالقة بها وقدتمّ إزالة البويضات التالفة Atratic oocyte والتي ميزت كونها منكمشة ووجود فراغ واسع بينها وبين المنطقة الشفافة Zona pellucida أو تلف هذه المنطقة .

4- تصنيف البويضات

أما بالنسبة لحيوية البويضات فبعد جمع البويضات وغسلها ثلاث مرات بواسطة SMART medium تم تقديرها باستخدام صبغة Trypan blue حيث تم تشخيص البويضات التي تقبل الصبغة على إنها ميتة لأنها لا تقبلها إذا كانت حية وكذلك عزلت البويضات وصنفت حسب المظهر الخارجي (الشكلياء) على أساس طبيعية وغير طبيعية (Atratic oocyte) والتي ميزت كونها منكمشة ووجود فراغ واسع بينها وبين المنطقة الشفافة وكذلك على اساس وجود طبقة الركام الجرثومي أو عدم وجودها.

5-الانضاج المختبري

بعد أن غسلت البويضات باستخدام الوسط الزرعي SMART media قسمت الاوساط الزرعية المخصصة للإنضاج المختبري

إلى اربع مجاميع وهي مجموعة السيطرة وقد نضجت البويضات فيها باستخدام الوسط الزرعي القياسي (SMART media) بدون إضافة السائل الحويصلي ، المجموعة الأولى نضجت البويضات فيها بإضافة 5%من السائل الحويصلي إلى الوسط الزرعي القياسي ، المجموعة الثانية نضجت البويضات فيها بإضافة 10% من السائل الحويصلي إلى الوسط الزرعي القياسي والمجموعة الثالثة نضجت البويضات فيها بإضافة 15% من السائل الحويصلي الى الوسط الزرعي القياسي. حيث تمّ وضع البويضات باستخدام طبق بتري خاص In vitro-fertilization 4well ووضعت 5 بويضات في كل well يحتوي على الوسط الزرعي القياسي (SMART media) مضافاً إليه السائل الحويصلي المحضر بالتراكيز المذكورة أعلاه وتغطيتها بطبقة من زيت البارافين paraffin oil ووضعاها في حاضنة co2 5%ودرجة حرارة 38.5 ورطوبة نسبية 95% ولمدة 24 ساعة(Alsaadoon،2014).

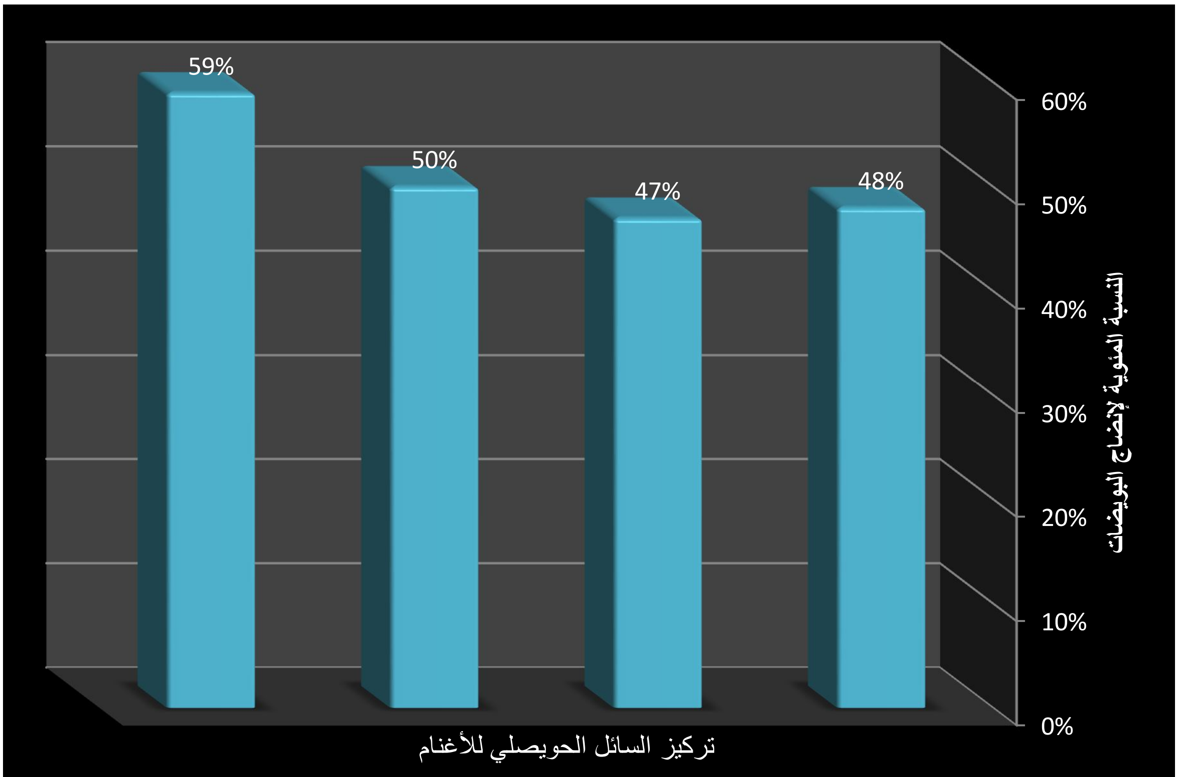
النتائج والمناقشة

النسبة المئوية للإنضاج المختبري بإضافة تراكيز مختلفة من السائل الحويصلي (SFF) 0،5،10و15% إلى الوسط الزرعي القياسي بالنسبة للبويضات التي تحتوي على ركام جرثومي إذ نلاحظ تفوق تركيز 15% معنويا (P<0.5) 59 ± 0.5% مقارنة ببقية التراكيز 0 ،5 و10% إذ كانت النسبة المئوية للإنضاج المختبري 48 ± 0.5 و 47 ± 0.4 و50 ± 0.4 %على التوالي شكل (1). ومن خلال شكل(2) يتضح عدم وجود فرق معنوي في النسبة المئوية للإنضاج المختبري بين تراكيز السائل الحويصلي وكانت النتائج 30 ± 0.6 ،37 ± 0.6، 40 ± 0.5 ، 37 ± 0.6% على التوالي. كما تفوقت مجموعة البويضات ذات الركام الجرثومي معنويا (P<0.5) في النسبة المئوية للإنضاج المختبري على مجموعة البويضات التي لا تحتوي على ركام جرثومي . قد يرجع سبب التفوق المعنوي للبويضات ذات الركام الجرثومي في النسبة المئوية للإنضاج المختبري الى الدور الفسيولوجي الكبير الذي تلعبه طبقة الركام الجرثومي فالركام الجرثومي Cumulus oophorus عبارة عن طبقات ضعيفة التماسك من الخلايا الحبيبية وتكون الخلايا الحبيبية الأقرب للطبقة الشفافة (Zp) محكمة التماسك وعلى شكل طبقات متعددة تسمى بالإكليل الشعاعي Corona radiate وتتماسك الخلايا الحبيبية للركام الجرثومي سوية بواسطة نسيج بين خلوي لزج يعتقد أنّه غني بمحتواه من حامض هايلورونك Hyloronic acid وتبقى خلايا الركام الجرثومي ممسكة بالبيضة لعدة ساعات بعد الاباضة وتلعب دورا مهما في الانضاج والاخصاب (Albertini واخرون،2001 ; ilchrist واخرون،2008). كما تدعم طبقة الركام الجرثومي الإنضاج النووي والسايتوبلازمي للبويضة من خلال ابقاء البويضة في مرحلة الحويصلة الجرثومية من خلال رفع مستوى c-AMP بين الخلايا في البويضة بنقل اشارات مثبطة خلال الفجوات المتصلة بين خلايا الركام الجرثومي (Eppigواخرون،1994 ؛Shimada)اثبتت الدراسات أن هنالك عامل يحفز الانقسام الاختزالي للبويضة ويتم افراز هذا العامل من قبل خلايا الركام الجرثومي (Downs،2001) كما إنها تعمل على دعم النضج النووي والسايتوبلازمي من خلال عملها كحلقة وصل بين البويضة ومحيطها الخارجي و يعتبر الاتصال الفيزيائي بين طبقة الركام الجرثومي والبويضة مهماً وضرورياً لنقل المواد المغذية وعوامل اساسية لتطور البويضة ودعم النضج النووي والسايتوبلازمي للبويضة (bertini اخررون،2001)واظهرت الدراسات تأثير طبقة الركام الجرثومي في فعالية التحلل السكري وكذلك نقل الأحماض الأمينية إلى البويضة (Roberts واخرون ،2002). فضلاً عن دعم طبقات الركام الجرثومي الإنضاج النووي والسايتوبلازمي للبويضة من خلال إمداد البويضة بمواد أساسية خصوصاً من الوسط الزرعي بالإضافة إلى كافة المواد التكميلية الضرورية مثل البايروفيت والأحماض الأمينية فإنها تساهم من خلال الاستقلاب الذي تقوم به هذه الخلايا عن طريق تقليل الحامض الاميني السستين وتحويله الى الحامض الاميني السستئين كما تعزز من امتصاص السستئين المهم للإنضاج النووي والسايتوبلازمي (Takahashiواخرون، 1993).

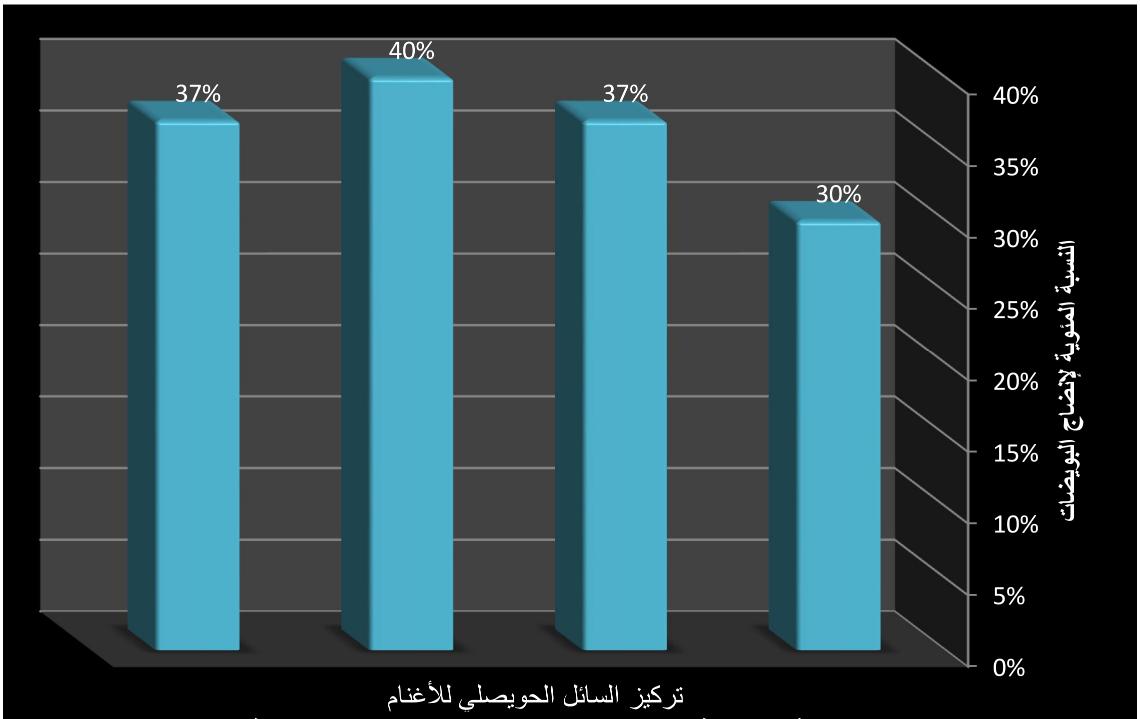
اما بالنسبة للسائل الحويصلي يعتقد ان سبب تفوق السائل الحويصلي على الوسط الزرعي القياسي او عدم وجود فرق معنوي بينه وبين الوسط الزرعي القياسي للبويضات التي لا تحتوي على ركام جرثومي في النسبة المئوية للإنضاج المختبري هي المكونات التي تكون السائل الحويصلي فهو خليط معقد التركيب مؤلف من المصل والافرازات المصنعة من الخلايا الجريبية (Wise،1987) مشتق من بلازما الدم (Gosdenواخرون،1988). يبدأ تشكيل السائل الحويصلي داخل الحويصلة في مرحلة مبكرة وتشير تقارير عدة إلى أن البروتينات الموجودة في السائل الحويصلي مستمدة من مصدرين هما الدم وطبقات الخلايا الجسدية المحيطة (خلايا القراب

والخلايا الحبيبية) وأظهرت دراسات سابقة ان معظم البروتينات وغيرها من المكونات تتجاوز بسهولة الحاجز الدموي الى داخل الحويصلة المبيضية كما أن خلايا المبيض تفرز عددا من المواد القابلة للذوبان مثل المنشطات وعوامل نمو الى السائل الحويصلي (Flocerfida واخرون،2014). ويعتبر السائل الحويصلي العامل البيئي الذي يتم فيه تغذية البويضات وتحفيزها على النضوج بسبب احتوائه على عوامل نمو ببتيدية داخل الجسم الحي (Knightواخرون،1996) .

السائل الحويصلي يحتوي على بروتينات واحماض امينية و سكريات وانزيمات وهرمونات (LH،FSH)،البرولاكتين، الاستروجين ، الاندروجين وProgestagen) والأملاح (Hafes،1987؛Smitz،1999). وهذه المكونات تلعب دوراً اساسياً في العمليات الكيميائية والحيوية والتمثيل الغذائي خلال نضج البويضة(Hafez،1987).وللسائل الحويصلي علاقة وظيفية بالبويضة إذ يديم توقف الانقسام الخيطي (الاعتيادي) ويحافظ على البويضة من التحلل كما أنّه يساعد على دفع البويضة إلى سطح الحويصلة عند الاباضة (Smitzواخرون،1999). وقد اكد Breviniواخرون(2007)أنّ السائل الحويصلي يعزز الإنضاج المختبري والإخصاب الخارجي والتطور الجنيني اللاحق



شكل 1 : النسبة المئوية للإنضاج المختبري للبويضات ذات الركام الجرثومي مع إضافة تراكيز مختلفة من SFF



شكل 2 : النسبة المئوية للإنضاج المختبري للبويضات الخالية من الركام الجرثومي مع إضافة تراكيز مختلفة من SFF

نستنتج من هذه الدراسة أن بالإمكان اضافة السائل الحويصلي الى الوسط الزرعي القياسي المستعمل في الإنضاج المختبري بدون ان يؤثر ذلك على النسبة المئوية للإنضاج المختبري بل قد يعزز كفاءة الإنضاج النووي و السايتوبلازمي للبويضات.

المصادر

ابراهيم محمد خيري . 1998 . تربية وانتاج الاغنام والماعز . الدار العربية للنشر والتوزيع . جامعة الزقازيق . جمهورية مصر العربية

Albertini F., M. Combelles, E. Benecchi, MJ. Carabatsos 2001. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. Reproduction. (121), Pp. 647-653

Alsaadoon AAZ., 2014. Effect of cryopreservation technique on oocyte and early stage embryos in sheep. A Dissertation submitted ,college of agriculture – university of Baghdad

Brevini T., F. Cillo, S. Antonini and F. Gandolfi 2007. Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. Animal Reproduction Science (98), Pp. 23-28.

Downs SM. 2001. A gap-junction-mediated signal, rather than an external paracrine factor, predominates during meiotic induction in isolated mouse oocytes. Zygote, 9:71–82.

Eppig JJ., RM. Schultz, M. O'Brien and F. Chesnel 1994. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. DevBiol. (164), Pp. 1–9

Flocerfida P., M. Aquion Marlon, B. Ocampo 2014. *In vitro* maturation of bubaline oocytes using bubaline (Swamp Buffalo) follicular fluid. European Journal of Biotechnology and Bioscience 2(1), Pp. 35-38.

Gilchrist RB., M. Lane and JG. Thompson 2008. Oocyte-secreted factors: regula-tors of cumulus cell function and oocyte quality.Hum Reprod Update. (14), Pp. 159–177.

Gordon IR. 2004. Reproductive Technologies in Farm Animals. CABI Publishing is a division of CAB International printed and bound in the UK by Cromwell press, Trowbridge.

Gosden RG., RH. Hunter, E. Telfer, C. Torrance, C. and N. Brrown 1988. physiological factor underlying the formation of ovarian follicular fluid. Journal of Reproduction and fertility. (82), Pp. 813-825

Gupta PS., HS. Ramesh, BM. Manjunatha, S. Nandi, JP. Ravindra 2008. Production of buffalo embryos using oocytes from in vitro grown preantral follicles.Zygote,(16), Pp. 57–63

Hafez ESE. 1987. Folliculogenesis, egg maturation and ovulation. In: Reproduction in Farm Animals (Ed. E. S. E.Hafez). 5th edtion. Lea & Febiger, Philadelphia. Pp.130-167.

Knight PG., S. Muttukrishna and NP. Groome 1996. Develop-ment and application of a two-site enzyme immunoassay for the determination of ‘total’ activin-A concentrations in serum and follicular fluid. J. Endocrinol. (148), Pp. 267-279.

Kruip TAM. and SJ. Dieleman 1982. Macroscopic classifica-tion of bovine follicles and its validation by micromorphologi-cal and steroid biochemical procedures. Reprod. Nutr. Dev. (22), Pp. 465-473

Roberts R., S. Franks, K. Hardy 2002. Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. Hum Reprod. (17), Pp. 2950–2956

Shimada M., T. Terada 2002. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells, a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. Mol Hum Reprod. 2002; (8), Pp. 612 618.

Smitz J. and R. Cortvrindt 1999. Oocyte invitro maturation and follicle culture: current clinical achievements and future directions. Human Reproduction. (14), Pp.145-161.

Son WY., JY. Chung, E. Demirtas, H. Holzer, C. Synvestre, W. Buckett, et al. 2008. Comparison of in-vitro maturation cycles with and without in-vivo ma-tured oocytes retrieved. Reprod Biomed Online, 17:59–67.

Takahashi M., T. Nagai, S. Hamano, M. Kuwayama, N. Okamura, A. Okano 1993. Effect of thiol compounds on in vitro development andintracellular glutathione content of bovine embryos. BiolReprod (49), Pp. 228 - 232.

Trounson AD., Dawson K., Jones, H., Hazekamp, J., Nygren, KG. and L. Hamberger 2005. The nearly days of IVF outside U.K. Hum Repred: Pp. 439-59.

Wise T. (1987). Biochemical analysis of bovin follicular fluid: albomin, total protein lysosomol enzymes, ions, steroid and ascorbic acid content in relation to follicular size, rank atresia classification and ay of oestrans cycle. J. Anim. Sci. (46), Pp. 1153-1169.

Wright VC., J. Chang, G. Jeng and M. Macaluso 2008. Assisted reproductive technologySurveillance –United States, 2005. MMWR Surveill Summ. (57), Pp.1–23.