مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2012) المجلد (28) ــ العدد 2 ــ الصفحات: 513-528

تأثير طرائق جمع البويضات من مبايض الأبقار في المسالخ في نضج البويضات، وإخصابها، وتنميتها مخبرياً

حسان أحمد مهدي[1] وسليمان سلهب[2] ومروان الحلبي[3]

الملخص

أجريت الدراسة في مخبر التقانات الحيوية، إدارة بحوث الثروة الحيوانية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية للمقارنة بين طريقتي جمع البويضات (التشطيب مقارنةً بالسحب بالإبرة) من مبايض الأبقار في المسلخ وتأثيرهما في معدل نضج البويضات، وإخصابها، وتنميتها في المختبر. جمعت مبايض الأبقار من المسلخ واستخرجت منها البويضات في المختبر بطريقة تشطيب سطح المبيض أو السحب بالإبرة. صنفت البويضات الناتجة من كل طريقة إلى أربعة أصناف وفق الحالة الشكلية للنواة، والهيولى، وعدد الخلايا الركامية المحيطة بها ومدى سلامتها. أعطت طريقة جمع بويضات الأبقار بالتشطيب عدداً أكبر (12.43±0.82 /مبيضاً) (P< 0.05) من البويضات مقارنةً بطريقة جمعها بالسحب بواسطة إبرة (3.29±0.34 /مبيضاً). وعدم وجود فرق معنوي بالنسبة إلى عدد البويضات حسب نوعيتها من الدرجة الأولى، أوالثانية، أوالثالثة بين طريقتي الجمع، أما بالنسبة إلى بويضات الدرجة الرابعة فقد لوحظ وجود فرق معنوي بين الطريقتين (14.54± 1.19، مقارنةً مع 3.57 ±2.58، P< 0.05). ولم يكن هناك فرق معنوي بين طريقتي التشطيب والسحب في معدلات النضج (69.42±3.52 مقارنةً مع 64.56±2.11)، والانقسام (40.56 ±2.05 مقارنةً مع 41.11 ±3.77)، وتشكل التويتة (15.80 ± 1.61 مقارنةً مع 18.44± 1.14)، وتشكل الكيس الأصلي (7.99 ± 0.89 مقارنةً مع 11.44 ± 2.25). واستنتج أنه لا يوجد فرق بالنسبة إلى معدلات تطور أجنة الأبقار في المختبر باستخدام طريقتي الجمع بالتشطيب أو السحب بإبرة، ولكن الطريقة الأولى تشجع في الحصول على عدد كبير من البويضات، مما يشجع بمداولتها لأغراض مخبرية (الاستنساخ، تجنيس الأجنة).

الكلمات المفتاحية: بويضات الأبقار، الإخصاب في المختبر، نضج البويضات، تنمية الأجنة، التشطيب، السحب، سورية.

[1] الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، إدارة بحوث الثروة الحيوانية، ص.ب،5391، قرحتا، ريف دمشق، سورية.
[2] قسم الانتاج الحيواني، كلية الزراعة، ص.ب. 30621، جامعة دمشق، سورية.
[3] قسم النسج والتشريح والجنين، كلية الطب البشري، جامعة دمشق، سورية.

Effect of recovery methods of bovine oocytes on in vitro maturation, fertilization and developing embryos

Muhdi, H. A.[1]; S. A. Salhab[2] and M. Halaby[3]

ABSTRACT

This study was carried out at the biotechnology laboratory– Animal Wealth Research Administration- General Commission for Agricultural Research. Bovine ovaries were collected from slaughterhouse to study the efficiency of two different oocytes recovery methods (slicing or aspiration) on maturation, fertilization, and culturing of oocytes in vitro. Bovine ovaries were collected from slaughterhouse. The oocytes were classified into four categories according to morphology of nucleous, ooplasm, number and quality of cumulus cells. Results showed that the slicing method produced more oocytes per ovary (12.43±0.82) compared with the aspiration method (3.29±0.34) (P<0.05) and there was no significant difference in oocytes quality (first, second, third) between the two methods, but the proportion of fourth grade of oocytes obtained by slicing and aspiration has a significant difference (14.54±1.19 vs. 3.57±2.58). There was no significant difference between the two methods in maturation rate (69.42±3.52 vs. 64.56±2.11 respectively), cleavage rate (40.56±2.05 vs. 41.11±3.77), morulae rate (15.80±1.61 vs. 18.44±1.14) and blastocyst rate (7.99±0.89 vs. 11.44±2.25). In conclusion, there was no significant difference between the slicing and aspiration on in vitro embryos production. However, slicing method can be used for collecting more numbers of oocytes per ovary and helpful for cloning and sexing manipulation.

Key words: Bovine oocytes, In vitro maturation (IVM), In vitro fertilization (IVF), In vitro culture (IVC), Slicing, Aspiration, Syria.

[1]General Commission for Scientific Agricultural researches, Animal Wealth Research Administration, Syria.
[2]Dept. Anim. Prod. Fac. Agric. P.O.Box, Damascus Univ. Damascus, Syria.
[3]Dept. Histology, Anatomy and Embryology. Fac Medicine. Damascus Univ. Damascus, Syria.

المقدمة المرجعية

تعدُّ كمية البويضات الناتجة ونوعيتها من كل مبيض معياراً مهماً ومساعداً في عمليات المداولة، والاستخدام للنضج، والإخصاب، والنمو، ومفيدة لعمليات التجنيس والتنسيل (Cloning). كما تؤثر نوعية البويضات في التطور الجنيني المبكر. وتكتسب البويضات مقدرتها على التطورخلال مرحلة التطور الحويصلي Folliculogenesis، أو خلال نضج البويضات في المختبر (Krisher، 2004)، وتتأثر القدرة التطورية للبويضات بمجموعة من العوامل تتضمن: حجم المبيض، ومرحلة دورة الشياع للأبقار، ونوعية البويضات، وطريقة جمعها (Jamil وزملاؤه، 2008).

تستخدم عدة طرائق لجمع البويضات من مبايض الأبقار المذبوحة في المسلخ: مثل التشطيب، والسحب، والتقطيع. وقد استخدم Martino وزملاؤه (1994) هذه الطرائق للحصول على أكبر عدد من البويضات لعمليات النضج في المختبر In vitro maturation (IVM)، والإخصاب في المختبر In vitro fertilization (IVF).

يتأثر عدد البويضات من كل مبيض بالعوامل الآتية: طريقة الجمع، وطور الشياع، وحجم المبيض وحجم الحويصلات وأعدادها، وموسم جمع البويضات (Rezk، 2005).

جمعت بويضات من نوق الابل العربي بطريقة: سحب محتويات الحويصل باستخدام إبرة مثبتة إلى محقن، أوالسحب بمضخة ساحبة، أو التشطيب بواسطة شفرات حادة (Nowshari، 2005). وذكر Hamano و Kuwayama (1993) أن البويضات المسحوبة من المبايض بطريقة التقطيع تمتلك قدرة أكبر على النضج والإخصاب عند الأبقار. وأكد El-Gaafary و Abdel-Ghaffar (1994) أن معدل نضج بويضات الجاموس في المختبر كان أكبر في حالة الجمع بواسطة السحب عنه في حالة الجمع بتشطيب سطح المبيض. ونظراً إلى أنّ العديد من الأبقار تذبح وهي ما زالت تحمل في مبايضها العديد من البويضات التي تعدُّ بمنزلة طاقة وراثية كامنة، وإلى عدم وجود مثل هذه الدراسات في سورية، فقد هدف هذا البحث إلى المقارنة بين طريقتي جمع البويضات (التشطيب مقارنة بالسحب بالإبرة) من مبايض الأبقار في المسلخ وتأثيرهما في معدل نضج البويضات وإخصابها وتنميتها في المختبر.

مواد البحث وطرائقه

أجريت هذه الدراسة في مخبر التقانات الحيوية – إدارة بحوث الثروة الحيوانية – الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية وذلك خلال المدة الممتدة من 2008 حتى 2010، وشملت المواد والطرائق الآتية:

1. تأثير طريقة جمع البويضات في عددها ونوعيتها:

1. 1. جمع المبايض من المسلخ:

كررت التجربة أربع مرات جمع خلالها 28 مبيضاً من 14 بقرة في مراحل مختلفة من العمر ذبحت في المسلخ، وحفظت جميعها في وعاء زجاجي يحوي سيروماً ملحياً (0.9% كلور الصوديوم) درجة حرارته 25-30 م°، مضافاً إليه 50 ميكروغراماً/مل من المضاد الحيوي Gentamicin (G-1264، Sigma)، ثم نقلت المبايض خلال ساعتين إلى المختبر، وغسلت جميعها عدة مرات بمحلول الفوسفات الواقي (PBS ،P-5493، Sigma) لإزالة الجلطات الدموية والأوساخ العالقة عليها، ووضعت ضمن الوعاء الزجاجي على صفيحة تسخين حرارتها 39 م° لجمع البويضات منها لاحقاً. وزعت المبايض في مجموعتين: 14 مبيضاً لطريقة جمع البويضات بالتشطيب و14 مبيضاً لطريقة جمع البويضات بالسحب.

1. 2. جمع البويضات:

فحصت المبايض مظهريا" وذلك بفحص البويضات تحت المجهر لتصنيفها حسب جودتها من حيث الشكل، إذ إن البويضة المثالية تمتاز بتجانس السيتوبلاسما، وسلامة الخلايا الركامية المحيطة بالبويضة Cumulus cells التي لا تقل عن ثلاث طبقات متتالية، وتصنف البويضات حسب هذه الطبقات إلى:

1- جيدة متراكمة الطبقاتCompact cumulus cell: تحتوي على أكثر من خمس طبقات من الخلايا الركامية، 2- متوسطة منزوعة الطبقات جزئياً Partially denuded oocytes: تحتوي من 3-5 طبقات من الخلايا الركامية، 3- سيئة متمددة الطبقات Expanded cumulus oocytes: تحتوي من 1-3 طبقة من الخلايا الركامية، 4- سيئة لا تمتلك خلايا ركامية حول الغلاف الشفاف Completely denuded oocyte(Hafez، 2000)، وجمعت البويضات منها باستخدام الطريقتين الآتيتين:

1. 2. 1. الجمع بواسطة السحب بالإبرة:

غسلت المبايض بوسط Tissue culture medium-199 (M-5017 TCM-199، Sigma) وبذلت الحويصلات المبيضية باستخدام محقنة حجمه10 مل معقمه ومثبت في نهايتها إبرة قطرها 18.5 G، وذلك باختراق الإبرة وإدخالها إلى الحويصلة، وسحب محتواها الذي فرغّ في طبق بتري يحوي وسط TCM-199،M-5017، Sigma المعقم والمزود بالمضادات الحيوية عند درجة حرارة 37 م°. ثم نقلت البويضات إلى طبق بتري مقسم إلى مربعات تحتوي الوسط TCM-199 للبحث عن البويضات تحت المكبرة لحصر عددها، وتصنيفها.

1. 2. 2. الجمع بالتشطيب:

شُرّط سطح كل مبيض بواسطة أداة تحتوي على شفرات حادة صنعت محليا" لهذا الغرض، وغسل ثلاث مرات بالسيروم الملحي فوق مصفاة ذات ثقوب صغيرة، ونقلت محتوياتها إلى طبق بتري يحوي الوسط TCM-199، وتركت مدة خمس دقائق للسماح للبويضات بالترسب في قاع الطبق.

صنفت البويضات التي جمعت بواسطة كل من الطريقتين السابقتين إلى أربعة أصناف وفق الحالة الشكلية للنواة، والهيولى، والخلايا الركامية المرافقة حسب التصنيف السابق.

2. تأثير طريقة جمع البويضات في تطور الأجنة في المختبر:

جمعت مبايض الأبقار من المسلخ واستخرجت منها البويضات في المختبر بطريقة تشطيب سطح المبيض أو السحب بالإبرة. كررت التجربة خمس مرات جرى خلالها جمع 36 مبيضاً من 18 بقرة وزعت إلى مجموعتين: 18 مبيضاً لطريقة جمع البويضات بالتشطيب و18 مبيضاً لطريقة جمع البويضات بالسحب، وذلك لدراسة تأثير طريقتي الجمع (التشطيب والسحب) في مراحل تطور أجنة الأبقار في المختبر.

2. 1. نضج البويضات في المختبر In vitro maturation (IVM):

فُحصت البويضات حسب التصنيف أعلاه تحت المكبرة على تكبير X45. وغسلت البويضات ثلاث مرات في وسط النضج TCM-199 (M-5017، Sigma)، ووضعت بويضات كل طريقة جمع في طبق رباعي الحجرات (Nunc، Roskilde، Denmark) يحوي على وسط النضج TCM (500 ميكرولتر/حجرة) والمزود بالسيروم البقري (C8056، Sigma) بنسبة 10%، وهرمون FSH (9002-68-0، Sigma) بتركيز 0.05 وحدة دولية/مل من وسط النضج، وغطيت بالزيت المعدني لمنع تبخر الوسط. ثم وضعت الأطباق في حاضنة (Innova Co48، UK) حرارتها 39 °م مزودة بغاز CO_2 تركيزه 5% ضمن جو مشبع بالرطوبة مدة 24 ساعة.

2. 2. الإخصاب في المختبر In vitro fertilization (IVF):

أُخرجت البويضات الناضجة من الحاضنة، وغسلت ثلاث مرات بالوسط TCM-199. ثمّ نقلت، وبحسب تصنيفها، إلى أطباق الإخصاب رباعية الحجرات حيث وضع في كل حجرة 250 ميكرولتراً من وسط الإخصاب Tyrode Albumin Lactate Pyruvate (TALP) المزود بالهيبارين بتركيز 10 ميكروغرام/مل مدة 18-20 ساعة في الحاضنة.

استخدمت قشات سائل منوي مجمدة من أجل الإخصاب في المختبر من ثور واحد، حصل عليها من مركز إنتاج السائل الآزوتي والمنوي في الغزلانية. أذيبت أربع قشات (0.25 مل) من السائل المنوي المجمد في ماء حرارته 38 °م مدة 30 ثانية، ووضعت

محتويات كل قشة في أنبوب مخروطي يحتوي على 1 مل من وسط التهيئة الذي أضيف إليه 100 ميكرولتر/10مل من الهيبارين بتركيز 10 ميكروغرام/مل، وتركت الأنابيب الأربعة في حاضنة CO_2 5% حرارتها 39 °م مدة ساعة. ثم سحب 900 ميكرولتر من كل أنبوب ووضعت محتويات كل أنبوبين مع بعضهما. وأجريت عملية التثفيل مدة 10 دقائق بسرعة 2000 دورة/دقيقة. ثم سحبت طبقة السائل العلوية من كل أنبوب بعد التثفيل وحسب تركيز النطاف في الرسابة المتشكلة في قعر الأنبوب.

خلطت النطاف بعناية ثم أخذ 5 ميكرولتر من محلول النطاف ووضعت في أنبوب صغير يحوي 95 ميكرولتراً من الماء المقطر، ثم وضع محلول النطاف في الحاضنة حتى يُحسب تركيز النطاف.

وضع 10 ميكرولتر من محلول النطاف في كل حجرة من حجرتي التعداد (Neubauer) لحساب تركيز النطاف، ثم تركت ثلاث دقائق حتى استقرت النطاف، جرى تعداد النطاف في خمس حجرات. مدد محلول السائل المنوي باستخدام الوسط TALP للحصول على تركيز (2×10^6 نطفة/ مل)، ثم حضنت البويضات الناضجة التي جمعت بالتشطيب والتي جمعت بالسحب بالإبرة، ووضع نحو 15- 20 بويضة في 250 ميكرولتراً من الوسط TALP للإخصاب بعد غسلها مرتين في الوسط TCM-199. ثم وضعت الجرعة المحسوبة للنطاف (250 ميكرولتراً) في كل حجرة من حجرات الطبق الرباعي حتى الحصول على تركيز نهائي للنطاف مقداره 1×10^6 نطفة /مل. وتركت النطاف مع البويضات مدة 18 ساعة في حاضنة CO_2 5% في درجة حرارة 39 م° وجو رطب.

2. 3. تنمية الأجنة في المختبر In vitro culture (IVC):

وضعت البويضات المخصبة في وسط الزرع SOF المزود بالسيروم البقري بنسبة 5% في حاضنة CO_2 تركيز 5% وحرارتها 39 °م في جو رطب وتحت طبقة من الزيت المعدني لمنع تبخر الوسط. ولسهولة متابعة تطور الأجنة، حضنت البويضات مدة 7 أيام وروقبت خلال مراحل تطورها المختلفة، وسجلت أعدادها المنقسمة، كما سجل عدد الأجنة التي وصلت إلى مرحلة الجسم التوتي Morulae، والكيس الأصلي Blastocyst.

التحليل الاحصائي:

درس تأثير طريقة جمع البويضات في عدد البويضات ونوعيتها، وتأثير طرائق جمع البويضات في تطور الأجنة في المختبر، باستخدم الموديل الخطي العام General Linear Model وفق القياسات المتكررة Repeated measurement وفق المعادلة الآتية:

$$Yij = \mu + \alpha i + Eij$$

إذ:

Yij: عدد البويضات التي جمعت من المبايض أو نوعية البويضات أو نسب البويضات الناضجة، والمخصبة، أو الأجنة الناتجة.

μ: المتوسط العام للصفات المدروسة

αi: تأثير طريقة جمع البويضات (i= 1، 2)

E_{ij}: المتبقي المرتبط مع Yij الذي من المفترض أن تكون مستقلة وموزعة طبيعياً بمتوسط صفر وتباين σ^2.

حسب تأثير طريقتي الجمع (التشطيب، السحب) في نوعية البويضات وتطورها في المختبر، على مستوى (P< 0.05)، حُلّلت البيانات إحصائياً باستخدام برنامج SAS الإصدار 6.11 لعام 1995 واستخدم اختبار Duncan لمقارنة المتوسطات.

النتـــائـــج

1. تأثير طريقة جمع البويضات في عددها ونوعيتها:

جُمعت بطريقة التشطيب 174 بويضة وبطريقة الجمع بالسحب 46 بويضة (الجدول 1). صنفت البويضات الناتجة من كلتا الطريقتين إلى أربعة أصناف (أولى، ثانية، ثالثة، رابعة).

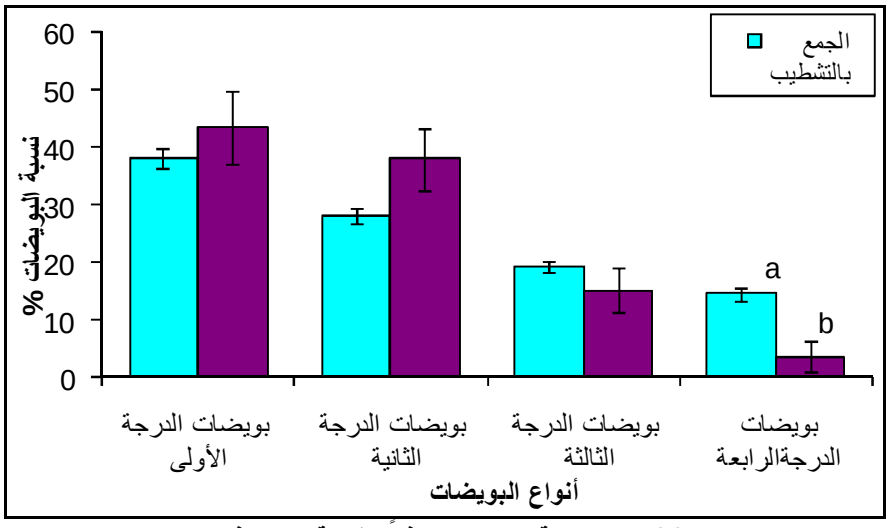
أشارت نتائج الدراسة أن طريقة جمع بويضات الأبقار بالتشطيب سمحت بجمع عدد أكبر من البويضات من كل مبيض مقارنةً بطريقة جمع البويضات بالسحب بواسطةً الإبرة. إذ بلغ متوسط عدد البويضات من كل مبيض بطريقة الجمع بالتشطيب 0.82±12.43 بويضة مقارنةً مع 0.34±3.29 بويضة بطريقة الجمع بالسحب (الجدول 1). وبلغ المتوسط العام لعدد البويضات التي جمعت من كل مبيض 7.8 بويضة.

الجدول (1) عدد البويضات ونوعيتها وفقاً لطريقة الجمع في المختبر (Mean% ± SE).

طريقة جمع البويضات	عدد البويضات/مبيض MEAN ± SE (N)	نسبة بويضات الدرجة الأولى% (N)	نسبة بويضات الدرجة الثانية% (N)	نسبة بويضات الدرجة الثالثة% (N)	نسبة بويضات الدرجة الرابعة% (N)
الجمع بالتشطيب (N)	0.82± [a]12.43 (174)	1.77±38.06 (66)	1.33± 28.21 (50)	0.96± 19.19 (33)	1.19 ± [a]14.54 (25)
الجمع بالسحب (N)	0.34± [b]3.29 (46)	6.37± 43.33 (18)	5.43± 37.98 (18)	3.84± 15.12 (8)	2.58± [b]3.57 (2)

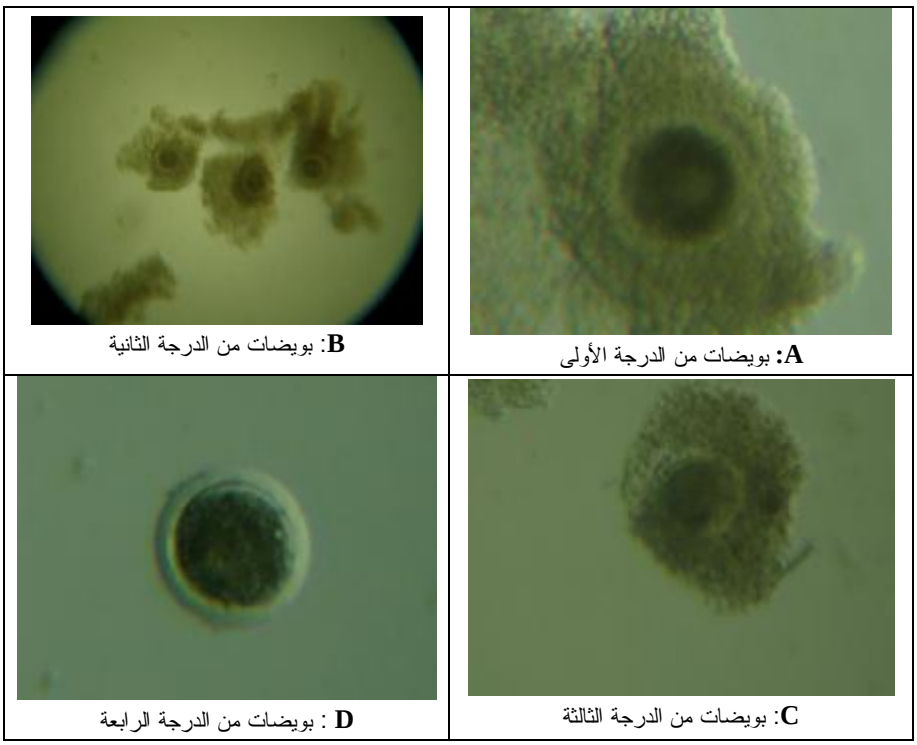
تشير الأحرف المختلفة في العمود الواحد إلى وجود فرق معنوي (P< 0.05) بين المتوسطات.

كما يتضح من الجدول (1) عدم وجود فرق معنوي في نسبة البويضات حسب نوعيتها من الدرجة الأولى، أوالثانية، أوالثالثة بين طريقتي الجمع (الشكل 1)، رغم استمرار تفوق عدد البويضات التي جمعت بطريقة التشطيب مقارنةً بنظيرتها بطريقة السحب ضمن النوعية الواحدة. إذ كانت النسبة المئوية للبويضات من الدرجة الأولى بطريقتي التشطيب والسحب 38.06 ±1.77، 43.33 ±6.37، على التوالي، وبلغت النسبة المئوية للبويضات من الدرجة الثانية بطريقتي التشطيب والسحب 28.21±1.33، 37.98±5.43، على التوالي، والبويضات من الدرجة الثالثة بطريقتي التشطيب والسحب 19.19 ±0.96، 15.12±3.84، على التوالي. أمّا بويضات الدرجة الرابعة فقد لوحظ وجود فرق معنوي (P< 0.05) بين الطريقتين (14.54± 1.19، مقارنةً مع 3.57 ±2.58).



الشكل (1) يبين نوعية البويضات وفقاً لطريقة الجمع في المختبر

يتضح من الشكلين (1) و(2) في الصورة (A) أن نسبة البويضات من الدرجة الأولى كانت هي الأعلى بغض النظر عن طريقة الجمع، تلتها البويضات ذات الهيولى المتجانسة والغامقة والخلايا الركامية غير المتراصة (الشكل 2، الصورة B)، ثم تلتها البويضات من الدرجة الثالثة (الشكل 2، الصورة C)، وكانت أقلها البويضات من الدرجة الرابعة (الشكل 2، الصورة D) نظراً إلى خلوها من الخلايا الركامية المحيطة بها.



الشكل (2) أنواع البويضات

2. تأثير طرائق جمع البويضات في تطور الأجنة في المختبر:

جُمعت بطريقة التشطيب 213 بويضة وبطريقة الجمع بالسحب 64 بويضة. نضجت منها 151 بويضة في طريقة التشطيب و41 بويضة في طريقة السحب، انقسمت منها 87، و27 بويضة في طريقتي التشطيب والسحب على التوالي، ووصل منها 34، و12 جنيناً إلى مرحلة التويتة Morula في طريقتي الجمع بالتشطيب والسحب على التوالي (الجدول 2).

الجدول (2) تأثير طرائق جمع البويضات في نسب مراحل تطور الأجنة في المختبر (Mean% ± SE).

طريقة جمع البويضات	عدد البويضات (N)	نسبة النضج % (N)	نسبة الانقسام % (N)	نسبة تشكل التويتة % (N)	نسبة تشكل الكيس الأصلي % (N)
الجمع بالتشطيب	(213)	3.52 ± a69.42 (151)	2.0± a40.56 (87)	1.61± a15.80 (34)	0.89± a 7.99 (17)
الجمع بالسحب	(64)	2.11± a64.56 (41)	a3.77± 41.11 (27)	1.14± a18.44 (12)	2.25± a11.44 (7)

تشير الأحرف المتشابهة في العمود الواحد إلى عدم وجود فرق معنوي (P> 0.05) بين المتوسطات.

يلاحظ من الجدول (2) عدم وجود فرق معنوي بين طريقتي التشطيب والسحب في نسب النضج والانقسام وتشكل التويتة، وتشكل الكيس الأصلي. فقد كانت نسبة النضج بطريقة التشطيب 69.42±3.52 مقارنةً بطريقة السحب 64.56±2.11، استطاع أن ينمو وينقسم منها 40.56 ±2.05 بطريقة التشطيب مقارنةً مع 41.11 ±3.77 بطريقة السحب، ووصل منها إلى مرحلة التويتة 15.80 ± 1.61 بطريقة التشطيب مقارنةً مع 18.44± 1.14 بطريقة السحب، وكانت نسبة تشكل الكيس الأصلي بطريقتي التشطيب والسحب 7.99±0.89 بالمقارنة مع 11.44 ±2.25 على التوالي. على أي حال بقي عدد الأجنة التي وصلت في تطورها إلى مرحلة الكيس الأصلي 17 جنيناً بطريقة التشطيب مقارنةً مع 7 أجنة بطريقة السحب ودون وجود فروق معنوية (7.99±0.89 مقارنةً مع 11.44 ±2.25).

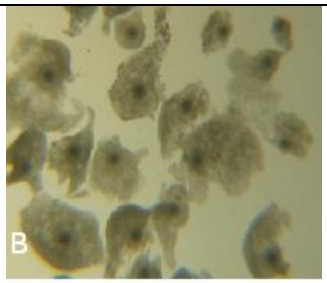
وتبيّن (الصور 3) مراحل تطور أجنة الأبقار في المختبر. إذ تتضح البويضات المحاطة بالخلايا الركامية (A)، والبويضات الناضجة (B)، والبويضات المخصبة (C)، والأجنة في مرحلة خليتين (D)، وفي مرحلة الأربع خلايا (E)، وجنين في مرحلة التويتة (F)، وفي مرحلة الكيس الأصلي (G).

المناقشة

1. تأثير طريقة جمع البويضات في عددها ونوعيتها:

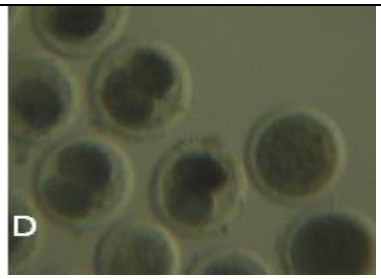
سمحت طريقة تشطيب سطح المبيض في هذه الدراسة (الجدول 1) بالحصول على عدد أكبر (P< 0.05) بنحو 3.7 أضعاف من البويضات مقارنة بطريقة السحب بإبرة الحقن من حويصلات أقطارها تراوح بين 2-8 مم، والسبب أن طريقة التشطيب تمكننا من الحصول على البويضات من الحويصلات جميعها حتى الصغيرة منها أمّا بطريقة السحب فإننا لا نستطيع سحب البويضات من الحويصلات الصغيرة لأن قطر الإبرة أكبر منها. وهذا يتوافق مع Das وزملاؤه (1996) إذ وجدوا أن عدد البويضات الناتجة من حويصلات تراوح أقطارها من 2 إلى 6 مم لكل مبيض كان أعلى (P< 0.01) بطريقة التشطيب (5.7 بويضة/مبيض) مقارنةً بطريقة التقطيع (2.6 بويضة /مبيض) أو مع طريقة السحب (1.7 بويضة /مبيض)، ومع Kumar وزملائه (1997) الذين وجدوا أن عدد بويضات الجاموس الناتجة بطريقة التشطيب كان أكبر (6.25 بويضة/مبيض) منه بطريقة التقطيع (3.1 بويضة/مبيض)، أو بطريقة السحب (2.35 بويضة /مبيض)، ومع Wani وزملائه (1999) الذين بدورهم أكدوا أن طريقة جمع البويضات بالتشطيب تعطي عدداً أكبر من البويضات (9.5 ± 0.4 بويضة/مبيض، P < 0.05) مقارنةً بطريقة السحب بالإبرة (6.8 ± 0.3 بويضة/مبيض) في الأغنام، ومع Wang وزملائه (2007) الذين حصلوا بطريقة التشطيب على 6.3 بويضة/مبيض، وعلى 2.6 بويضة/مبيض بطريقة السحب في الماعز. كما وجد Rezk (2005) أن عدد البويضات التي جمعت من كل مبيض كان أعلى معنوياً بنحو 55 % بطريقة التشطيب مقارنة بطريقة السحب.

بويضات محاطة بالخلايا الركامية

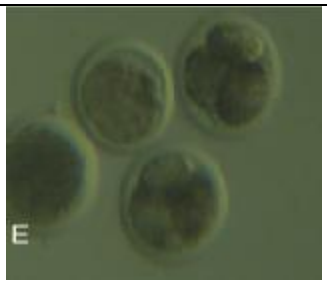


بويضات ناضجة

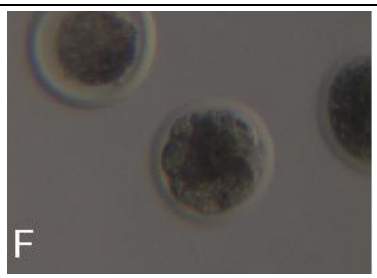
بويضات مخصبة



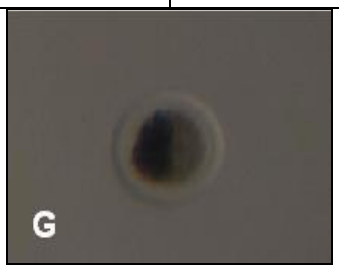
أجنة أبقار2- خلية



أجنة أبقار 4- خلية



أجنة أبقار في مرحلة التويتة



جنين أبقار في مرحلة الكيس الأصلي

الشكل (3) مراحل تطور أجنة الأبقار في المختبر.

وأوضحت النتائج أن المتوسط العام لعدد البويضات الكلي بطريقتي الجمع لكل مبيض بلغ 7.8 بويضة/مبيض. وهي مماثلة لما توصل إليه Varisanga وزملاؤه (1998) في الطريقتين (8.9 بويضة/مبيض) مخبرياً في الأبقار. وأعلى مما حصل عليه Rezk (2005) في الطريقتين (3.99 بويضة/مبيض) مخبرياً في الإبل، ومما توصل إليه Mahmoud وزملاؤه (2003) (5.3 بويضة/مبيض) مخبرياً في الإبل، ومما وجده Kumar وزملاؤه (1997) (4.68 بويضة/مبيض) مخبرياً في الجاموس، ومما وجده Shamia (2004) (2.69 بويضة/مبيض) مخبرياً، وDas وزملاؤه (1996) على (1.7 بويضة/ مبيض) مخبرياً في الجاموس. أمّا عند الأغنام فقد حصل Wani وزملاؤه (2000) مخبرياًعلى 8.6 بويضة/مبيض. وقد تعزى الاختلافات ضمن النوع نفسه إلى طريقة الجمع، وطور الشياع، وحجم المبيض وحجم الحويصلات وأعدادها.

وجد Khatir وزملاؤه (2004) في الإبل أن متوسط عدد البويضات باستخدام طريقة السحب من حويصلات حجمها 4-10 مم كان 3.5 بويضة/مبيض. وأشار Arlotto وزملاؤه (1996) أن البويضات الناتجة من حويصلات حجمها أكبر من 10-15 مم كانت أكبر(P<0.01) من البويضات الناتجة من حويصلات حجمها من 6-10 مم، التي تكون بدورها أكبر من البويضات الناتجة من حويصلات حجمها من 1-3 مم في الأبقار. وتحتوي الطبقة القشرية الخارجية للمبيض على نسبة أكبر من البويضات الصغيرة، في حين تحتوي الطبقات المحيطية من المبيض نسبة أعلى من البويضات الكبيرة.

لم تؤثر طريقة الجمع في نوعية البويضات (الدرجة الأولى، والثانية، والثالثة) (الجدول.1)، أمّا بويضات الدرجة الرابعة فقد كان عددها ونسبها أقل معنوياً (P<0.05) بطريقة السحب. وبلغت نسبة بويضات الدرجة الأولى والثانية بطريقة التشطيب 38.06% و28.21%، على التوالي، مقارنةً مع 43.33%، 37.98% بطريقة السحب بالإبرة، وهذا يتوافق مع ما توصل إليه Jamil وزملاؤه (2008) إذ بلغت نسبة بويضات الدرجة الأولى والثانية بطريقة جمع البويضات بالتشطيب 36.7 % و27.4%، على التوالي، أمّا بطريقة السحب فبلغت نسبة بويضات الدرجة الثانية 36.36% ونسبة بويضات الدرجة الأولى 9.83%. وجد Shamiah (1997) عند الجاموس أن نسبة البويضات المتطبقة (الدرجة الأولى)، والمتطبقة جزئياً (الدرجة الثانية)، والمتمددة (الدرجة الثالثة)، والعارية (الدرجة الرابعة) كانت 22.9، 36.5، 18.8، 21.8%، على التوالي بطريقة السحب.

وبصورة مخالفة لهذه الدراسة وجد Abdoon وGandil (2001) أن طريقة تشطيب سطح مبايض الجاموس سمحت بالحصول على أعداد ذات فرق معنوي بين بويضات الدرجة الثانية، والثالثة، والرابعة مقارنةً بطريقة السحب. أمّا في الأغنام فإن نسبة البويضات من الدرجة الأولى كانت أعلى بطريقة جمع البويضات بالسحب 64.4% مقارنةً بطريقة التشطيب 54.3% (Wani وزملاؤه، 2000). ويمكن أن يكون سبب هذا الاختلاف

المرحلة التي يوجد فيها المبيض في دورة الشياع (Das وزملاؤه، 1996؛ Machatkova وزملاؤه، 2004). أو وجود جسم أصفر على سطح المبيض في الأبقار (Hazeleger وزملاؤه، 1995؛ Jamil وزملاؤه، 2008؛ Dode وزملاؤه، 2001)، والجاموس (Das وزملاؤه، 1996؛ Shamiah، 2004)، والإبل (Abdoon، 2001).

في حين أشار Abdoon وGandil (2001) أن مبايض الجاموس التي تحتوي جسماً أصفرَ تمتلك عدداً أكبر ($P< 0.05$) من بويضات الدرجة الأولى مقارنةً بمبايض الجاموس التي لاتحتوي على جسم أصفر.

2. تأثير طرق جمع البويضات في تطور الأجنة في المختبر:

لم يلحظ وجود فرق معنوي بالنسبة إلى طريقتي جمع البويضات في نسب النضج، والانقسام، وتشكيل التويتة، والكيس الأصلي (الجدول 2). إذ كانت معدلات النضج في طريقتي الجمع بالتشطيب والسحب تقريباً متماثلة (69.42% مقارنةً مع 64.56%) وهذه يتوافق مع ما توصل إليه Martino وزملاؤه (1994) إذ كانت معدلات النضج في طريقتي الجمع بالتشطيب والسحب (69.3% مقارنةً مع 72%). ومع Abu Nasar وزملائه (2007) الذين حصلوا على نسبة نضج وقدرها 69.3% بطريقة التشطيب.

وقد اختلفت معدلات النضج في هذه الدراسة مع ما توصل إليه Wang وزملاؤه (2007) الذين وجدوا فرقاً معنوياً ($P< 0.05$) في معدلات النضج عند استخدام طريقة التشطيب (60.8%) مقارنةً بطريقة سحب البويضات (80%) في الماعز. وكذلك أشار EL-Gaafary وAbdel-Ghaaffar (1994) أن معدل النضج لبويضات الجاموس كان أكبر في البويضات التي استخرجت بطريقة السحب (34.3%) مقارنةً بالبويضات التي استخرجت بطريقة التشطيب (27.2%).

بلغت معدلات الانقسام ومعدلات تشكيل الكيس الأصلي في هذه الدراسة في طريقتي الجمع بالتشطيب 40.56% و7.99%، على التوالي أو بالسحب 41.11% و11.44% ،على التوالي (الجدول. 2)، بينما حصل Wang وزملاؤه (2007) على نسبة انقسام قدرها 60.4% بطريقة التشطيب و62.5% بطريقة السحب، وكانت نسبة تشكل الأكياس الأصلية بطريقتي التشطيب 13.8% والسحب 13.3%. وحصل Alm وزملاؤه (2005) على نسبة تشكل للكيس الأصلي بطريقة التشطيب بلغت 18.3%. وقد يعزى سبب انخفاض معدلات النضج، والانقسام، والتويتة، وتشكيل الكيس الأصلي في هذه الدراسة إلى نوعية البويضات التي حصل عليها من مبايض أبقار قد تعاني من مشاكلات تناسلية (تكيس المبايض، وجود أكياس مائية على سطح المبيض، التصاقات في الرحم) كانت سبباً في ذبحها، ولاسيّما أنه يمنع ذبح الإناث السليمة في المسالخ. وجد Abdoon (2001) أن نسبة النضج لبويضات الإبل (تمدد الخلايا الركامية في المرحلة M II من الانقسام

المنصف) التي وضعت في الحاضنة مدة 36 ساعة بلغت 85.4%. كما أن إطالة مدة التحضين إلى 48 أو 72 ساعة يزيد بشكل معنوي (P<0.01) في نسبة البويضات المتدهورة (21.6% مقارنةً مع 29%).

وجد Matsukawa وزملاؤه (2002) أن طريقة سحب بويضات الفرس باستخدام إبرة من حويصلات أقطارها 5-30 مم تعطي نسبة نضج 53%، ونسبة انقسام 44%، ونسبة تشكل للتويتة 33%، ونسبة كيس أصلي9%.

بلغت معدلات الانقسام، وتشكل التويتة، والكيس الأصلي في هذه الدراسة بطريقة التشطيب 40.56% و15.80%، و7.99%، على التوالي (جدول 2)، في حين حصل Wang وزملاؤه (2003) على معدل انقسام 71%، ومعدل تشكل تويتة 41%، ومعدل تشكيل كيس أصلي 35%. ويعود سبب هذا الاختلاف إلى استخدامهم طريقة ICSI (Intra cytoplasmic sperm injection) piezo لإخصاب البويضات التي حصلوا عليها بطريقة التشطيب.

بَيّنَ Grozet (2000) أن هناك علاقة ارتباط إيجابية بين قطر الجريبات، وقطر البويضة، والقدرة التنافسية للانقسام المنصف، وتطور البويضات إلى أجنة من حويصلات أقطارها 2-3 مم أو أكثر في الماعز، وبيّنوا أن معدل تشكل الكيس الأصلي كان 6% (إذا كان حجم الحويصلة 2-3 مم)، و12% (حجم الحويصلة 3.1-5 مم)، و26% (حجم الحويصلة > 5مم)، و41 % (من بويضات متحررة من حويصلاتها).

يستنتج من الدراسة الحالية أن طريقة جمع البويضات بالتشطيب سمحت بالحصول على عدد أكبر من البويضات/مبيض من أجل استخدامها في عمليات النضج، والتطور الجنيني والتجميد في المختبر. مما يجعلنا نوصي بالاعتماد عليها نظراً إلى سهولتها، وتوفيرها عدداً أكبرَ من البويضات بعد نضجها في المختبر يمكن أن تكون مفيدة من أجل مداولات مخبرية أخرى مثل التجنيس والتنسيل.

REFERENCES

Abdoon, A.S.S. and O. M. Kandil. 2001. Factor affecting number of surface ovarian follicles and oocytes yield and quality in Egyptian buffaloes. Reprod Nutr Dev. 41: 71-77.

Abdoon, A.S.S. 2001. Factors affecting follicular population, oocyte yield and quality in camels (Camelus dromedarius) ovary with special reference to maturation time in vitro. Animal Reproduction Science. 66: 71–79.

Abu Nasar, M. D., A. Rahman, R. B. Abdullah and K. W. Embong. 2007. Goat embryo development from in vitro matured oocytes of heterogeneous quality through intra cytoplasmic sperm injection technique. Biotechnology. 6(3): 373-382.

Alm, H., H. Torner, B. Lohrk, T. Viergutz, I. M. Ghoneim, W. Kanitz. 2005. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brillant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity Theriogen. 63(8):2194-205. (Abstract).

Arlotto, T., L. Schwartz, N. L. First, M. L. Leibfried-Ruthledge. 1996. Aspects of follicle and oocytes stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. Theriogen. 45: 943-956.

Das, G. K., G.C. Jain, V. S. Solanki, and V. N. Tripathi. 1996. Efficacy various collection methods for oocyte retrieval in buffalo.Theriogen. 46: 1403-1411.

Dode, M. A. N., N. C. Rodovalho, V. G. Ueno, and R. G. O. Alves. 2001. Oocyte recovering from Bos indicus females. Arch. Zootec. 50:415-418.

El Gaafary, M. N., and A. E. Abdel-Ghaffar. 1994. In vitro oocytes maturation , fertilization and cleavage in Egyptian buffaloes. Annals of Agric. Sc. Moshtohor. Egypt. 32: 1801 – 1810.

Grozet, N., M. Dahirel, L. Gall. 2000. Meiotic competence of in vitro grown goat oocytes. J. Reprod Fert. 118: 367-373.

Hafez, B., E. S. E. Hafez. 2000. Reproduction in farm animals: Micromanipulation of gametes and embryos- In Vitro Fertilization and Embryo Transfer (IVF/ET). 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins. Pp: 443-465.

Hamano, S., and M. Kuwayama. 1993. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from ovaries individual donors: A comparison between the cutting and aspiration methods. Theriogen. 39: 703-712.

Hazeleger, N. L., D. J Hill, R. B. Stubbings, and J. S. Walton. 1995. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their development potential in vitro.Theriogen. 43: 509-522.

Jamil, H., H. A. Samad, Z. I. Qureshi, N. Ur Rehman, L. A. Lodhi. 2008. Harvesting and Evaluation of Riverine Buffalo Follicular Oocytes. Turk. J Vet Anim Sci. 32(1): 25-30.

Khatir, H; Abdelhaq, A. and Ahmed, T. 2004. Production of dromedary (Camelus dromedarius) embryos by IVM and IVF and co-culture with oviductal or granulosa cells. Theriogen. 62(7): 1175-1185.

Krisher, R. L. 2004. The effect of oocyte quality on development. J. Anim. Sci. 82(l): 1-23.

Kumar, A., V. S. Solanki, S. K. Jindal, V. N. Tripathi, and G. C. Jain.1997. Ooocyte retrieval and histological studies of follicular population in buffalo ovaries. Animal Reproduction Science. 47:189-195.

Machatkova, M., K. Krausova, E. Jokesova, and k. M. Tomane. 2004. Developmental competence of bovine oocytes: Effects of follicle size and the phase of follicular wave in vitro embryo production. Theriogen. 61: 329-335.

Mahmoud, K. GH. M., K. H. El-Shahat, and W. S. El-Nattat. 2003. Chromosome configuration during in vitro maturation of dromedary camel oocytes. Vet. Med. J. 51: 411-420.

Martino, A., M. T. Palomo, T. Mogas, M. T. Paramio. 1994. Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on in vitro maturation and fertilization. Theriogen. 42: 859-873.

Matsukawa, K., S. Takahashi, T. Oikama, M. Hosoe, Y. Izaike and A. Hanada. 2002. Evaluation of Equine oocytes from preserved ovaries using intracytoplasmic sperm injection. J Mamm Ova Res. 19: 71-76.

Rezk, W. A. K. 2005. Differences between farm animals in (IVM & IVF) in vitro maturation and in vitro fertilization. Thesis.

SAS. 1995. Users Guide: Statistics, Version 6. 11. 1995. SAS. Inst. INC.

Shamiah, S. M. 1997. Some factors affecting in vitro maturation and fertilizing capacity of oocytes in some farm animals. Thesis, Faculty of Agriculture, Minufiya University, Egypt.

Shamiah, S.M. 2004. Studies on in vitro fertilization in Egyptian buffaloes. Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, Mansoura University, Egypt.

Varisanga, M. D., C. Sumantri, M. Murakami, M. Fahrudin, and T. Suzuki. 1998. Morphological classification of the ovaries in relation to the subsequent oocyte quality for IVF-produced bovine embryos.Theriogen. 50: 1015-1023.

Wang, B., H. Baldassarre, J. Pierson, F. Cote and K. M. Rao. 2003. The in vitro and in vivo development of goat embryos produced by intracytoplasmic sperm injection using tail-cut spermatozoa. Zygote. 11: 219-227.

Wang, Z.G., Z. R. Xu, S. D. Yu. 2007. Effects of oocyte collection techniques and maturation media on in vitro maturation and subsequent embryo development in Boer goat. Czech J. Anim. Sci. 52 (1): 21–25.

Wani, N.A., G.M. Wani, M.Z. Khan, M.A. Sidiqi. 1999. Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for in vitro maturation and in vitro fertilization procedures in sheep. Small Rumin. Res. 34: 71–76.

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

Received	**2010/09/13**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2010/12/28**	**قبول البحث للنشر**