مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2013) المجلد (29) ــ العدد 2 ــ الصفحات: 153-167

تأثير أوساط الإنضاج، والإخصاب، والزرع في إنتاج أجنة الأبقار مخبرياً

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

الملخَّص

أجريت الدراسة في مخبر التقانات الحيوية، إدارة بحوث الثروة الحيوانية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية بهدف المقارنة بين أوساط إنضاج البويضات، وإخصابها، وتنمية أجنة الأبقار في المختبر حتى اليوم السابع بعد الإخصاب. جمعت مبايض الأبقار من المسلخ، واستخرجت منها البويضات في المختبر بطريقة تشطيب سطح المبيض. واستخدم الوسطان TCM وSOF لإنضاج (مدة 24 ساعة في حاضنة CO_2 بتركيز 5% وحرارتها 39 م°) وتنمية بويضات الأبقار في المختبر (مدة 7 أيام في الحاضنة) في جو رطب 95%، واستخدم الهيبارين، ومزيج مكون من (البنسلين، والهيبوتورين والابينفرين) (PHE) لتهيئة النطاف في وسط الإخصاب TALP مدة 18 ساعة في حاضنة CO2 5% في جو مشبع بالرطوبة. أظهرت نتائج الدراسة عدم وجود فرق معنوي بين الوسطين TCM وSOF في نسبة إنضاج بويضات الأبقار في المختبر(59.42 ±5.57 مقارنةً مع 54.80±5.74)، وفي نسبة الانقسام (32.15 ±3.93 مقارنةً بـ 30.44 ±1.91)، وفي نسبة تشكل التويتة (15.24±2.56 مقارنةً بـ 12.71 ±1.63)، وفي نسبة تشكل الكيس الأرومي (9.56 ±0.98 مقارنةً بـ 7.77±0.82). ولم يكن هناك فرق معنوي بين نسب تطور الأجنة عند مقارنة الهيبارين و الـ PHE في وسط الإخصاب TALP إذ كانت نسبة الانقسام (39.81 ± 3.67مقارنةً بـ 37.28± 2.70)، ونسبة تشكل التويتة (18.79±1.99مقارنةً بـ 15.12±2.58)، ونسبة تشكل الكيس الأرومي (9.72 ±2.68 مقارنةً بـ 7.81 ±1.96). استنتج أنه يمكن إنضاج بويضات الأبقار في المختبر باستخدام الوسط TCM، والوسط SOF المعدل للإنضاج والمزودين بالسيروم بنسبة 10%. وأفضلية استخدام الهيبارين كمنشط لحركة النطاف في المختبر مع وسط الإخصاب TALP عوضاً عن مزيج الـ PHE الذي يحتاج تحضيره إلى زمن أطول، فضلاً عن صعوبة تخزينه لأن مكوناته تتأكسد في الضوء.

الكلمات المفتاحية: وسط الإنضاج (TCM)، وسط تنمية الأجنة مخبرياً (SOF)، وسط الإخصاب (TALP)، عامل تهيئة النطاف في المختبر (PHE)، إنتاج اجنة الأبقار مخبرياً، سورية

(1) طالب دكتوراة، ومساعد باحث أول في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، إدارة بحوث الثروة الحيوانية، ص.ب، 5391، قرحتا، ريف دمشق، سوريه.

(2) أستاذ في قسم الانتاج الحيواتي، كلية الزراعة، ص.ب. 30621، جامعة دمشق، سوريه.

(3) أستاذ في قسم النسج والتشريح والجنين، كلية الطب البشري، جامعة دمشق، سورية.

Effect of In vitro maturation, fertilization and culture media on bovine embryo production

H. A. Muhdi، H.A. ،[(1)] S. A. Salhab[(2)] and M. Halaby[(3)]

Abstract

This study was conducted at the biotechnology laboratory of Animal Wealth Research Administration, General Commission for Agricultural Research in order to compare the effect of different media on In vitro maturation (oocytes matured at 39 C° under 5% CO2 for 24 h), fertilization، and culture (7 days postfertilization) in humidified atmosphere 95% on bovine embryo production.

Bovine ovaries were collected from slaughterhouse and the oocytes were recovered by slicing the surface of the ovaries. TCM and SOF were used as maturation and culture media and heparin or PHE as capacitating agents in fertilization medium TALP. No significant differences were observed between SOF and TCM medium on the maturation rate (59.42±5.57 vs. 54.80±5.74)، cleavage rate (32.15±3.93 vs. 30.44±1.91), morula rate (15.24±2.56 vs. 12.71±1.63), and blastocyst rate (9.56±0.98 vs. 7.77±0.82). There was also no significant difference between heparin and PHE as capacitating agents in TALP medium on cleavage rate (39.81±3.67 vs. 37.28±2.70).

In conclusion، bovine oocytes can be matured in vitro by using TCM or SOF medium supplemented with 10% serum and heparin can be used as motility enhancers of spermatozoa with fertilization medium TALP instead of PHE which its preparation needs more time and difficulty of its storage because of its contents can be oxidized at exposure to light.

Keywords: Tissue culture medium (TCM), Synthetic oviduct fluid (SOF), Tyrode Albumin Lactate Pyruvate (TALP), Penicillin Hypotaurin Epinephrine (PHE), bovine oocytes, *In vitro* embryo production، Syria.

[(1)]Ph.D. student, [(2)] Prof. Dept. Anim. Prod. Fac. Agric. P.O. Box 30621, Damascus Univ. Syria.
[(3)]Associate Prof. Dept. Histo., Ana. and Embryo. Fac, Med. Damascus Univ. Syria.

المقدمة

تستخدم عدة أوساط لإنضاج أجنة الأبقار وتنميتها في المختبر، ويضاف عادةً إلى هذه الأوساط السيروم البقري أو الألبومين البقري Bovine Serum Albumin (BSA)، يستخدم الوسط Tissue culture medium (TCM) لإنضاج بويضات الأبقار (Mermillod، 2002)، كما يستخدم الوسط Synthetic Oviduct Fluid (mSOF) المعدّل لإنضاج بويضات الأبقار وزرعها في المختبر، وقد طُوّر هذا الوسط اعتماداً على التحليل الكيميائي لسوائل قناة فالوب عند الأغنام وتشابهها معها (Tervit وزملاؤه، 1972). من أهم المواد التي تضاف إلى الوسط SOF وتزيد كفاءته الأحماض الأمينية، وعامل النمو (EGF) التي تحسن تطور الأجنة، وكذلك وجد Kumar وزملاؤه (2007) أن إضافة الأحماض الأمينية إلى الوسط SOF (mSOFaa) كان مفيداً في دعم تطور أجنة الجاموس حتى مرحلة التويتة والكيس الأرومي.

يضاف السيروم البقري Calf serum (CS) بنسبة 10% أو الألبومين البقري (BSA) للوسط TCM أو إلى الوسط SOF المعدل للإنضاج. وقد أشار Gandhi وزملاؤه (2000) أن إضافة السيروم للوسط SOF المعدل للإنضاج يزيد عدد الخلايا الجنينية الكلية مقارنة بالبويضات الناضجة بوجود الألبومين البقري BSA، وهذا يؤكد أهميته كوسط إنضاج في المختبر على مراحل تطور الأجنة. كما امتلكت الأجنة المزروعة في وسط SOF مع السيروم خلال الإنضاج عدداً أكبر من الخلايا الجنينية مقارنة بعدد الخلايا الذي تعطيه الأجنة الناضجة في وسط TCM مع السيروم، ما يرجح قدرة أكبر للوسط SOF في إنتاج أجنة ذات نوعية جيدة. كما أن تحرر الأجنة من غلاف الزونا Zona pellucida كان أكبر عند استخدام الوسط TCM مع السيروم للإنضاج مقارنة بالوسط SOF (Ghndhi وزملاؤه، 2000).

استخدم Wrenzycki وزملاؤه (2001) نوعين من أوساط إنضاج البويضات هما وسط زرع الأنسجة TCM-199 وسائل القنوات المبيضية الصنعي SOF، ووجدوا بأن الوسط SOF يؤمن بيئة مثالية لتطور الأجنة في الأبقار بصورة أكبر من TCM-199 قبل مرحلة انغراس الجنين.

تعدُّ تهيئة النطاف وتفاعل الجسيم الطرفي لنطاف الثدييات عاملان مهمان للإخصاب في المختبر، ويجب أن تكون أوساط إخصاب البويضات في المختبر قادرة على زيادة حركة النطاف وتهيئتها، تمهيداً للإخصاب وبداية التطور الجنيني (Izaquierdo وزملاؤه، 1998).

توجد عائلة Glycoseaminoglycans (GAG) بكثرة في الحويصلات المبيضية لأنواع حيوانية متعددة بما فيها الأبقار، وربما تتحرر من حويصلات غراف الناضجة إلى

القناة الناقلة للبويضات في وقت الإباضة، وأشهر عنصر من هذه العائلة هو الهيبارين، المعروف بقدرته على منع تجلط الدم (Ax وزملاؤه، 1984). ويقوم الهيبارين بعملية تنشيط للنطفة بارتباطه وإزالته لبروتينات البلاسما المنوية من الغشاء البلاسمي للنطفة (Therien وزملاؤه، 1995). كما يعدُّ مشجعاً لالتقاط الكالسيوم الموجود خارج الخلايا من قبل النطفة، ويساعد في الحصول على نطاف نشطة لاستخدامها في الإخصاب في المخبري (IVF) (Parrish وزملاؤه، 1994). ويعدُّ تزويد أوساط الإخصاب بالهيبارين طريقة حديثة لتنشيط نطاف الأبقار (Parrish وزملاؤه، 1988)، والماعز (Izaquierdo وزملاؤه، 1998)، والأغنام (Li وزملاؤه، 2006). وقد أشارت دراسة لـ Parrish وزملاؤه (1988) أن حضن النطاف مع الهيبارين لمدة 4 ساعات قبل مزجها مع البويضات كان كافياً لزيادة نسبة البويضات المخصبة فضلاً عن أن معدل التفاعل الأكروسومي والإخصاب كانا يعتمدان على مدة تعرض النطفة للهيبارين (Parrish وزملاؤه، 1985). وتبعاً للدراسات فإن الهيبارين ربما لا يكون المؤثر الوحيد في عمليات الإخصاب ولكنه يؤثر في عمليات تطور الجنين اللاحقة (Lu وSeidel، 2004). وفي هذا المجال كان تلاحظ زيادة في نسبة الانقسام وإنتاج الأجنة عند الأبقار والماعز عندما كانت نطافها تتهيأ وتتنشط بالهيبارين (Cox وزملاؤه، 1994).

يستخدم الوسط Tyrode Albumin Lactate Pyruvate (TALP) كوسط إخصاب لبويضات الأبقار وقد طُوّر في الفئران (Gandolphi وزملاؤه، 1996). ثم أضيف إليه العديد من عوامل تنشيط النطاف مثل الهيبارين (Ward وزملاؤه، 2003؛ Cox وزملاؤه، 1994)، أومزيج البنسلين، والهيبوتورين، والابينفرين PHE (Bavister وYanagimachi، 1977؛ Miller وزملاؤه، 1994؛ Gordon، 1990). أو الكافئيين (Younis وزملاؤه، 1991؛ Tatham وزملاؤه، 2003؛ Younis وزملاؤه، 1992).

مواد البحث وطرائقه

أجريت المقارنة بين الوسطين TCM و SOF كوسطي إنضاج وتنمية لبويضات الأبقار في المختبر، كما قورن بين عاملي التهيئة الهيبارين أو مزيج من الـ penicillin، وepinephrin، وhypotaurine (PEH) بغية معرفة تأثير كل منهما في إخصاب بويضات الأبقار وتطور الأجنة في المختبر خلال مدة الدراسة التي استمرت من 2008 إلى 2010.

مقارنة بين الوسط TCM والوسط SOF كوسطي إنضاج وتنمية لبويضات الأبقار في المختبر:

حُضّر الوسط TCM وفقاً لتوصيات الشركة الصانعة (Sigma). وأضيف إليه 100 وحدة دولية/مل بنسلين (Euroclone، EMR-185010)، و100 ميكروغرام/مل

ستربتومايسن (S-6501، Sigma)، وحُضر الوسط SOF المعدل للإنضاج حسب Gandhi وزملاؤه (2000).

وجمع 45 مبيضاً من المسلخ وحصل منها بطريقة التشطيب على 365 بويضة ذات سيتوبلاسما داكنة، ومنتظمة، ومتجانسة، ومحاطة كلياً بخلايا ركامية متراصة، ومتجانسة، وعديدة الطبقات. قسمت إلى قسمين وقد وضعت 168 بويضة في الوسط TCM و197 بويضة في الوسط SOF المعدل للإنضاج، فضلاً عن هرمون FSH بتركيز (0.05 وحدة دولية/مل)، والسيروم البقري 10% (C8056، Sigma) مدة 24 ساعة في الحاضنة (Innova Co48، UK) ضمن الشروط 39 م° وCO_2 بتركيز 5% وفي جو رطب 95%.

نُقلت البويضات الناضجة (تمدد الخلايا الركامية المحيطة بالبويضات خلال الإنضاج) بعد 24 ساعة إلى وسط الإخصاب TALP المزوّد بـ10 ميكروغرام هيبارين/مل مدة 18 ساعة، ثم نقلت 56 بويضة إلى الوسط TCM المزود بالسيروم البقري 5%(Sigma، C8056)، ونقلت 60 بويضة إلى الوسط SOF المزود بالسيروم البقري بنسبة 5%، ووضعت المجموعتان في حاضنة CO_2 بتركيز 5% حرارتها 39 م° مدة سبعة أيام. بوصفها مدة لازمة لتطور الأجنة إلى مرحلة الكيس الأرومي Blastocyst.

مقارنة بين عاملي الهيبارين و الـ PHE في تهيئة واستعداد النطاف sperm capacitation:

تألف الوسط الأول لتهيئة النطاف من الوسط TALP + الهيبارين بتركيز 10 ميكروغرام/مل، أمّا الوسط الثاني فتألف من الوسط TALP + PHE بنسلين (P-4875، Sigma)، هيبوتورين (H-1387، Sigma)، ابينفرين (E-1635، Sigma). حُضّر الهيبارين ومزيج الـ PHE وفقاً لتوصيات الشركة الصانعة وما أوصى به (Leibfried وزملاؤه، 1982).

كررت التجربة ست مرات جمع خلالها 25 مبيضاً من المسلخ، حصل منها بطريقة التشطيب على 178 بويضة، وضعت البويضات جميعها في الوسط TCM للإنضاج مدة 24 ساعة.

نقلت 56 بويضة ناضجة بعد 24 ساعة إلى وسط الإخصاب TALP المزود بـ 10 ميكروغرام هيبارين/مل، و51 بويضة ناضجة إلى وسط الإخصاب TALP المزود بعامل التهيئة PHE.

استخدمت قشات مجمدة تم الحصول عليها من مركز السائل الآزوتي والمنوي في الغزلانية التابع لوزارة الزراعة والاصلاح الزراعي من أجل الإخصاب في المختبر. أذيبت أربع قشات من السائل المنوي المجمد (0.25 مل) في كل تجربة، ووضعت كل

قشة في أنبوب مخروطي يحتوي على 1 مل من أحد وسطي التهيئة، وزع كل قسم إلى أنبوبين وأضيف إلى أنبوبين الهيبارين (10ميكروغرام/مل) بمعدل 100 ميكرولتراً/10مل من وسط التهيئة، وأضيف إلى الأنبوبين الآخرين الوسط PHE بمعدل 2 ميكرولتر لكل 50 ميكرولتر من وسط التهيئة (400 ميكرولتر/ 10مل من وسط التهيئة). وتركت الأنابيب الأربعة في حاضنة CO_2 5% حرارتها 39 م° مدة ساعة لتهيئة النطاف. سحب بعدها 900 ميكرولتر من كل أنبوب (للحصول على أكبر عدد من النطاف الحيوية والمتحركة والتي تحركت نحو طبقة السائل العلوي خلال عملية تهيئة النطاف في الحاضنة)، ووضعت محتويات كل أنبوبين مع بعضهما، ثم أجريت عملية التثفيل مدة 10 دقيقة بسرعة 2000 دورة/دقيقة، وسحبت طبقة السائل العلوية من كل أنبوب بعد التثفيل، وحسب تركيز النطاف في الرسابة المتشكلة في قعر الأنبوب، مددت الرسابة حتى الحصول على تركيز 2×10^6 نطفة/مل. ثم حضنت البويضات الناضجة والجاهزة (نحو 15-20 بويضة في 250 ميكرولتراً من الوسط TALP) للإخصاب بعد غسيلها مرتين في الوسط TCM-199. وضعت الجرعة المحسوبة للنطاف (250 ميكرولتراً) في كل حجرة من حجرات الطبق الرباعي التي تحتوي على البويضات (250 ميكرولتراً) حتى الحصول على تركيز نهائي للنطاف مقداره (1×10^6 نطفة /مل). وتركت مدة 18 ساعة في حاضنة CO_2 5% في درجة حرارة 39 م° في جو رطب. نقلت بويضات كل معاملة بعد إخصابها من وسط الإخصاب إلى الوسط SOF المزود بـ 5% من السيروم البقري لتنمية الأجنة مدة 7 أيام في الحاضنة، وغطيت حجرات الطبق الرباعي بالزيت المعدني لمنع تبخر الوسط.

التحليل الاحصائي

قورن بين الوسط TCM مع الوسط SOF، وبين الهيبارين ومزيج الـ PHE. واستخدم الموديل الخطي العام General Linear Model وفق القياسات المتكررة Repeated measurement، ودرس تأثير وسط الإنضاج أو وسط الإخصاب أو وسط التنمية في تطور الأجنة في المختبر على مستوى ($P< 0.05$)، حُلّلت البيانات إحصائياً باستخدام برنامج SAS الإصدار (6.11 لعام 1995) واستخدم اختبار Duncan لمقارنة المتوسطات.

ونظراً لعدم وجود دراسات محلية في هذا المجال، فقد هدفت هذه الدراسة إلى دراسة تأثير البيئات المختلفة (TCM-199، TALP، SOF، PHE) في إنضاج البويضات، وإخصابها، وتنميتها مخبرياً.

النتائـــج

تأثير الوسطين TCM وSOF في إنضاج أجنة الأبقار وتنميتها في المختبر:

أظهرت نتائج الدراسة (الجدول 1) أن 96 بويضة نـضجت فـي الوسـط TCM و109 بويضة في الوسط SOF، انقسمت منها 56، و60 بويضة في الوسـطين المـذكورين علـى التوالي. وصل منها 25، و23 جنيناً إلى مرحلة التويتة فيهما على التوالي، تطـور منهـا 15 جنيناً إلى مرحلة الكيس الأرومي في الوسط TCM و14 جنيناً في الوسط SOF (الجدول 1).

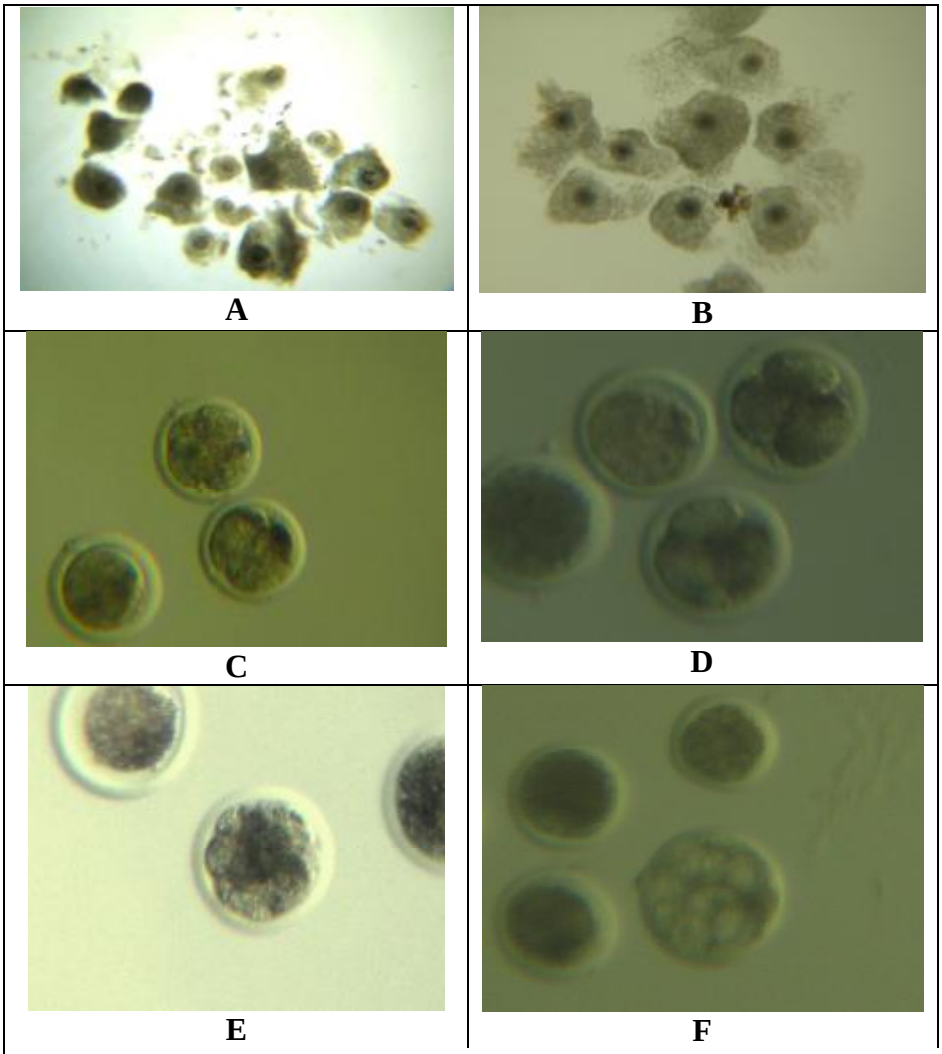
أظهرت النتائج (الجدول 1) عدم وجود فرق معنوي في تأثير وسـطي TCM وSOF في نسبة إنضاج بويضات الأبقار في المختبر، وفي نسبة الانقسام، في نسبة تشكل التويتة، وفي نسبة تشكل الكيس الأرومي.

ويبيّن الشكل (1) مراحل تطور أجنة الأبقار فـي المختبـر. إذ تتـضح البويـضات المحاطة بالخلايا الركامية (A)، والبويضات الناضجة (B)، والأجنة في مرحلـة خليتـين (C)، وفي مرحلة الأربع خلايا (D)، وفي مرحلة التويتـة (E)، وفـي مرحلـة الكـيس الأرومي (F).

الجدول (1) نسب الإنضاج وتطور الأجنة في وسطي الإنضاج TCM وSOF

نوع الوسط	عدد البويضات المحضنة(N)	نسبة الإنضاج% (N)	نسبة الانقسام% (N)	نسبة تشكل التويتة% (N)	نسبة تشكل الكيس الأرومي% (N)
TCM-199	168	^{a}5.57 ±59.42 (96)	^{a}3.93± 32.15 (56)	^{a}2.56± 15.24 (25)	^{a}0.98 ± 9.56 (15)
SOF	197	^{a}5.74 ± 54.80 (109)	^{a}1.91± 30.44 (60)	^{a}1.63 ± 12.71 (23)	^{a}0.82 ± 7.77 (14)

تشير الأحرف المتماثلة في العمود الواحد إلى عدم وجود فرق معنوي ($p< 0.05$) بين المتوسطات.



A: بويضات أبقار
B: بويضات أبقار ناضجة
C: أجنة أبقار 2-خلية
D: أجنة أبقار في مرحلة 4 خلايا
E: أجنة في مرحلة التويتة
F: أجنة في مرحلة الكيس الأرومي

الشكل (1) مراحل تطور أجنة الأبقار في المختبر.

تأثير عاملي تهيئة النطاف (الهيبارين والـ PHE) في وسط الإخصاب TALP في تطور الأجنة في المختبر:

أظهرت النتائج أن 34، و32 بويضة انقسمت في الوسطين TALP/هيبارين وPHE/TALP، على التوالي. وصل منها إلى مرحلة التويتة 16، و12 جنيناً، على التوالي، تطور منها 9 أجنة إلى مرحلة الكيس الأرومي في الوسط TALP/هيبارين و7 أجنة في الوسط PHE/ TALP (الجدول 2).

يتضح من الجدول (2) عدم وجود فرق معنوي بين الهيبارين و الـ PHE كعاملي تهيئة للنطاف في وسط الإخصاب TALP في نسبة البويضات الناضجة، ونسبة الانقسام، ونسبة تشكل التويتة، ونسبة تشكل الكيس الأرومي.

الجدول (2) نسب الإنضاج وتطور أجنة الأبقار في المختبر في وسطي عاملي التهيئة TALP/H وTALP/PHE.

نوع الوسط	عدد البويضات	نسبة الإنضاج% (N)	نسبة الانقسام% (N)	نسبة تشكل التويتة% (N)	نسبة تشكل الكيس الأرومي% (N)
TALP/الهيبارين	88	^{a}6.04 ± 65.94 (56)	^{a}3.67 ± 39.81 (34)	^{a}1.99 ± 18.79 (16)	^{a}2.68 ± 9.72 (9)
PHE/TALP	90	^{a}8.15 ± 62.69 (51)	^{a}2.70 ± 37.28 (32)	^{a}2.58 ± 15.12 (12)	^{a} 1.96 ± 7.81 (7)

تشير الأحرف المتماثلة في العمود الواحد إلى عدم وجود فرق معنوي ($p < 0.05$) بين المتوسطات.

المناقشة

1. المقارنة بين TCM وSOF كوسطي إنضاج أجنة الأبقار وتنميتها في المختبر:

تستخدم عدة أوساط لإنضاج أجنة الأبقار وتنميتها في المختبر. إذْ تعطي هذه الأوساط معدلات تطور متغيرة عندما يضاف إليها السيروم أو الألبومين البقري (Mermillod وزملاؤه، 2002).

أظهرت نتائج الدراسة (الجدول1) عدم وجود فرق معنوي بين الوسطين TCM وSOF في تأثيرهما في نسبة إنضاج بويضات الأبقار في المختبر (59.42±5.57 مقارنةً مع 54.80±5.74)، وفي انقسامها (32.15±3.93 مقارنةً مع 30.44±1.91)، وفي نسبة تشكل التويتة (15.24±2.56 مقارنةً مع 12.71±1.63)، وفي نسبة تشكل الكيس الأرومي (9.56 ±0.98مقارنةً مع 7.77±0.82). وهذا يتوافق مع ما توصل إليه Krisher وزملاؤه (1999) الذين وجدوا أن نسبة الانقسام في الوسطين SOF و TCM كانت تقريباً متشابهة (85.4±3.0 و85.2±3.7، على التوالي)، ونسبة تشكل التويتة (40.8 ± 3.0 مقارنةً مع 45.5 ± 5.3)، والكيس الأرومي (38.0 ± 3.1 مقارنة مع

45.5 ± 5.3) ولكن تلك النسب كانت أعلى من نتائج هذه الدراسة لاستخدامهم عامل النمو البشري EGF بتركيز 50 نانوغراماً/مل في وسط الإنضاج الذي عادةً يزيد من معدل تطور الأجنة. كما أكد Wrenzycki وزملاؤه (2001) عدم وجود فرق معنوي بين الوسطين TCM وSOF في نسبة الانقسام (71.1 ± 1.6 مقارنةً مع 65.4 ± 2.7)، وفي نسبة تشكل التويتة (30.8 ± 2.3 مقارنةً مع 31.5 ± 3.4)، ونسبة تشكل الكيس الأرومي (21.7± 1.8 مقارنةً مع 21.5 ± 2.0) ولكن هذه النسب كانت أيضاً أعلى مقارنة بنتائج هذه الدراسة وربما يعود ذلك لاستخدامهم غازات مختلفة (O_2، N_2، CO_2) في الحاضنة خلال عملية تنمية الأجنة بينما استخدمنا فقط غاز CO_2 في الحاضنة أثناء تنمية الأجنة. بالإضافة إلى نوعية البويضات والتي حصل عليها من مبايض أبقار قد تعاني من مشاكل تناسلية كانت سبباً في ذبحها، خاصةً وأنه يمنع ذبح الإناث السليمة في المسالخ. كما أظهرت النتائج عدم وجود فرق معنوي بين الوسطين TCM وSOF في نسبة الانقسام، وهذا يتوافق مع ما توصل له Watson وزملاؤه (2000) الذين حصلوا على نسب انقسام في الوسطين (76% مقارنةً مع 70%) ولكنهم وجدوا فرقاً معنوياً في نسبة تشكل الكيس الأرومي (28% مقارنةً مع 14%؛ P< 0.05).

وكذلك حصل Saikhuna وزملاؤه (2008) على نسبة إنضاج (M-II) في الوسط TCM (18.3±4.5)، أمّا في الوسط SOF فكانت نسبة الإنضاج (18.6± 7.6) وعلى نسبة انقسام بالنسبة إلى البويضات الناضجة IVF/IVM (SOF: 33.6 ± 1.2 بالمقارنة مع TCM: 13.7 ± 1.2) وقد تعزى الاختلافات إلى طريقة جمع البويضات، وطور الشياع، وحجم المبيض وحجم الحويصلات وأعدادها، ووجود جسم أصفر على سطح المبيض.

وكانت نتائج هذه الدراسة فيما يتعلق بنسبة انقسام البويضات المخصبة أقل مما توصل إليه Atef وSirard (2002) الذين حصلوا على نسبة انقسام (63 ± 8.5) ونسبة تشكل التويتة أوالكيس الأرومي (21.0± 1.0) نظراً إلى استخدامهم الوسط SOF المزود بـ 10% من السيروم البقري FCS في مرحلة الإنضاج. واستخدامهم الوسط $SOFC_1$ الذي يحتوي 0.8% من الـ BSA و10 ميكرومول من EDTA، أحماض أمينية أساسية، أحماض أمينية غير أساسية، 1 ميلي مول غلوتامين، 1.5 ميلي مول غلوكوز خلال مرحلة نمو الأجنة وأقل مما وجده Ganhdi وزملاؤه (2000) لاستخدامهم عامل النمو EGF في وسط الإنضاج والذي يعتقد أنه يزيد من معدل تطور الأجنة. وأقل مما حصل عليه Forouzanfar وزملاؤه (2010) لاستخدامهم الوسط المرافق Co-culture الذي يحتوي خلايا Vero cells (Kidnay epithelial cells) بتركيز 2 × 10^5/مل، التي يعتقد أنها تساعد في إزالة المواد السامة التي توجد في الوسط، أو التي تفرز من الخلايا الجنينية، أو أنها تعمل على إفراز عوامل النمو التي تساعد في تطور الأجنة في المختبر.

وهذه النتائج أقل مما وجده Izaquierdo وزملاؤه (1999) حيث حصلواعلى نسبة تشكل التويتة والكيس الأرومي 21.3% في الوسط TCM مع طبقة من خلايا قناة فالوب OEC. وأقل مما توصل إليه Keskintepe وزملاؤه (1996) لاستخدامهم الوسط المعرف SOF والمزود بالأحماض الأمينية الأساسية، والسترات، وAlchohol Polyvinyle (PVA) . وأقل مما حصل عليه Fukui وزملاؤه (1996) وGardner وزملاؤه (1997) لاستخدامهم الوسط SOF المزود بالأحماض الأمينية الأساسية وغير الأساسية وPolyvinylalcohol (PVA) إذ حصل على نسبة 30% للكيس الأرومي.

المقارنة بين عاملي التهيئة الهيبارين والـ PHE:

أظهرت نتائج الدراسة (الجدول 2) عدم وجود فرق معنوي في نسبة انقسام الأجنة المخصبة في الوسط TALP والمزود بالهيبارين أو PHE (39.81% مقارنةً مع 37.28%)، وهي أقل مما وجد Glidet وزملاؤه (1996) الذين حصلوا على نسبة انقسام (هيبارين:59.5% بالمقارنة مع PHE: 41.5%؛ P< 0.05). وأقل مما أشار إليه Izaquierdo وزملاؤه (1998) عن تأثير عاملي التهيئة الهيبارين والـ PHE في نسب تطور الأجنة حتى مرحلة التويتة والكيس الأرومي في المختبر في الماعز. تعزى هذه الاختلافات إلى اختلاف أوساط التهيئة وتراكيزها المختلفة، أو إلى استخدام سائل منوي ذي مواصفات عالية (Ahuja، 1985؛ Ball وزملاؤه، 1984؛ Leibfried وBavister، 1982)، أو إلى تحضين النطاف مدداً طويلة (Saeki وزملاؤه، 1991).

كانت نسبة تشكل التويتة في هذه الدراسة (هيبارين: 18.79% بالمقارنة مع PHE: 15.12%؛ P> 0.05)، ونسبة تشكل الكيس الأرومي (هيبارين: 9.72% بالمقارنة مع PHE: 7.81 %؛P> 0.05) (جدول 2). مماثلة لما حصل عليه Izaquierdo وزملاؤه (1998) حيث حصل على نسبة تشكل التويتة والكيس الأرومي في الهيبارين 9.1% وفي الـ PHE 12.5%. وأعلى مما حصل Glidet وزملاؤه (1996) فيما يتعلق بنسبة تشكل التويتة (هيبارين:7.3% مقارنةً مع PHE: 4.1%) ونسبة تشكل الكيس الأرومي (هيبارين:3.5% مقارنة مع PHE: 2.3%). كما كانت أقل مما حصل عليه Miller وزملاؤه (1992) وSusko-Parrish وزملاؤه (1990) الذين حصلوا على نسب انقسام مرتفعة (62%، 69%) عند استخدام عامل التهيئة الـ PHE في وسط الإخصاب TALP. بينما لم يلاحظ Long وزملاؤه (1993) وجود أي تأثير للـ PHE على نسبة انقسام البويضات المخصبة. وحصل Puglisi وزملاؤه (2004) على نسبة انقسام لا تقل عن 35% عند استخدامهم الهيبارين ومزيج الـ PHE، واستنتجوا أن اختراق النطفة للبويضة هو محصلة عوامل تهيئة النطاف، والتفاعل الأكروسومي، وارتباط النطفة مع غلاف الزونا على الغلاف الخارجي للبويضة. وأقل مما توصل إليه Lu و Seidel (2004) اللذان حصلا على نسبة انقسام وتشكل كيس أصلي قدرها 61.8 ± 6.5 و19.2

± 2.2، على التوالي، ويعزى السبب إلى استخدامهم الهيبارين بتركيز 10 ميكروغرام/مل مع الوسط Fert-CDM لتهيئة النطاف. وأقلّ من Wang وزملاؤه (2007) الذي حصل على نسب انقسام وتشكل كيس أصلي (60.4%، 13.8% على التوالي). استنتج Walters وزملاؤه (2004) أن الهيبارين عند التركيز 10 ميكروغرام/مل في وسط الإخصاب ضروري لإحداث التغيرات المرافقة لتهيئة النطاف ومن ثمّ زيادة حركيتها. كما يجب أن تمر النطفة بمرحلة التهيئة لكي تكون قادرة على الارتباط بغشاء الزونا وإحداث التفاعل الأكروسومي.

وتبعاً لـ Susko-parrish وزملاؤه (1990) فإن هناك تآزر بين مكونات الـ PHE ووجوده يقلل زمن اختراق النطفة للبويضة. كما كانت نسبة تشكل التويتة والكيس الأرومي في هذه الدراسة أقل مما وجد في الماعز. حيث حصل كل من Crozet وزملاؤه (1995) على نسبة 26%، وKeskintepe وزملاؤه (1996) على نسبة 38.9%، و Pawshe وزملاؤه (1996) على نسبة 40%.

الاستنتاجات

تبيّن نتائج هذه الدراسة إمكانية إنضاج بويضات الأبقار في المختبر باستخدام الوسط TCM والوسط SOF المزودين بالسيروم 10%. كما تؤكد إمكانية استخدام الوسط SOF المعدل للإنضاج ال,fبويضات المختبر عوضاً عن الوسط TCM الجاهز والمستورد، واستخدام الوسط SOF لتنمية الأجنة. كما يمكن استخدام الهيبارين كمنشط لحركية النطاف في المختبر مع وسط الإخصاب TALP عوضاً عن مزيج الـ PHE الذي يحتاج تحضيره إلى زمن أطول، بالإضافة إلى صعوبة تخزينه لأن مكوناته تتأكسد في الضوء.

References المراجع

Ahuja، K. K. 1985. Carbohydrate determinants involved in mammalian fertilization. Am. J. Anat.، 114:207-225.

Atef، A and M. A. Sirard. 2002. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocyte during In vitro maturation. Biol. Reprod.، 66: 901-905.

Ax، R. L.، S. M. Bushmeyer، S. K. Boehm and M. E. Bellin. 1984. Binding of the glycosaminoglycan heparin to bovine granulosa cells varies with size and estrogen content of ovarian follicles. Endocr. Res.، 10: 63-72.

Ball، G. D.، M. L. Leibfried، R. L. Ax، and N. L. First. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro. J. Dairy Sci.، 67:2775-2785

Bavister، B. D. and R. Yanagimachi. 1977. The effect of sperm extract and energy sources on the motility and acrosome reaction of Hamster spermatozoa in vitro. Biol. Reprod.، 16: 228-237.

Cox، J. F.، J. Avila، F. Saravia and A. Santa Maria. 1994. Assessment of fertilizing ability of goat spermatozoa by in vitro fertilization of cattle and sheep intact oocytes. Theriogen.، 41: 1621-1629.

Crozet، N، M. Ahmed-Ali and M. P. Dubos. 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation، fertilization and culture in vitro. J. Repro. Fertil.، 103:293-298.

Forouzanfar، M.، S. M. Hosseini، M. Hajian، F. Molavi، P. Abedi and M. H. N. Esfahani. 2010. Differential effect of medium on the ratio of ICM/TE of bovine embryos in a co-culture system. Inter. J. of Fert. and Ster.، 3 (4): 171-176.

Fukui، Y.، E. S. Lee and N. Araki. 1996. Effect of medium renewal during culture in two different culture systems on development to blastocysts from in vitro produced early bovine embryos. J. Anim. Sci.، 74:2752-2758.

Gandhi، A. P.، M. Lane، D. K. Gardner and R. L. Krisher. 2000. A single medium supports development of bovine embryos througout maturation، fertilization and culture. Human Repro.، 15(2): 395-401.

Gandolphi، F.، P. Pocar، A. M. Lucicano and D. Rieger. 1996. Effect of EGF and IGF-I during in vitro maturation of cattle oocytes on subsequent embryo development and metabolism. Theriogen.، 45: 277.

Gardner، D. K.، M. W. Lane and M. Lane. 1997. Bovine blastocyst cell number is increased by culture with EDTA for the first 72 hours of development from the zygote. Theriogen. 47:278.

Gliedt، D. W.، C. F. Rosenkrans، R. W. Rorie، and J. M. Rakes. 1996. Effects of oocyte maturation length، sperm capacitation time، and heparin on bovine embryo development. J. Dairy Sci.، 79:532-535.

Gordon، I.، K. and H. Lu. 1990. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. Theriogen.، 33: 77-87.

Izaquierdo، D.، P. Villamediana، M. J. Palomo، T. Mogas and M. T. Paramio. 1998. Effect of sperm capacitation and fertilization media on IVF and early embryo development of prepubertal goat oocytes. Theriogen. 49: 1501-1513.

Izaquierdo، D.، P. Villamediana and M. T. Paramio. 1999. Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. Theriogen. 52(5): 847. (Abstract).

Keskintepe، L.، G. C. Luvoni، M. M. Bassiony and B. G. Brackett. 1996. Procedural improvements for in vitro production of viable uterine stage caprine embryos. Small Rum. Res.، 20: 247-254.

Krisher، R. L.، M. Lane and B. D. Bavister. 1999. Developmental Competence and Metabolism of Bovine Embryos Cultured in Semi-Defined and Defined Culture Media. Biol. Reprod.، 60: 1345–1352.

Kumar، D.، P. Palta، R. S. Manik، S. K. Singal and M. S. Chauhan. 2007. Effect of culture media and serum supplementation on the development of in vitro fertilized buffalo embryos. Ind. J. Anim. Sci.، 77(8): 697-701.

Leibfried، M. L. and B. D. Bavister. 1982. Effects of epinephrine and hypotaurine on in vitro fertilization in the golden hamster. J. Repro.، Fert. 66: 87-93.

Li، F.، P. Loke، A. Healy، M. W. Lightowlers، C. G. Gauci، D. F. Purcell and D. A. Anderson. 2006. The effect of antigen targeting sequences on antibody responses to hepatitis E virus DNA vaccines in rats and sheep. Vaccin. 24: 1367-1377.

Long، C. R.، C. N. Chase، J. J. Balise، R. T. Duby and J. M. Roble. 1993. Effect of sperm removal time، sperm concentration and motility enhancers on fertilization parameters and development of Bovine embryos in vitro. Theriogen. 39: 261.

Lu، K. H.، and G. E. Jr. Seidel. 2004. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. Theriogen. 62: 819-830.

Mermillod، P. 2002. Reproduction- Gamete and embryo technology/ In Vitro fertilization. J. Repro. Fert.. 1-7.

Miller، G. F.، D. W. Gliedt، T. D. Lester، J. N. Pierson، J. M. Rakes and R. W. Rorie. 1992. Addition of Bovine oviductal epithelial cells (BOEC) and/or penicillineamine، hypotaurine and epinephrine (PHE) to bovine in vitro fertilization (IVF) medium increases the subsequent embryo cleavage rate. Theriogen. 37: 259.

Miller، G.F.، D. W. Gliedt، J. M. Rakes and R. W. Rorie. 1994. Addition of penicillamine، hypotaurine and epinephrine or bovine oviductal epithelial cells alone or in combination to bovine in vitro fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate. Theriogen. 41:689-696.

Parrish، J. J.، J. Susko-Parrish، M. A. Winer and N. L. First. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol. Repro.، 38:1171-1180.

Parrish، J. J.، J. L. Susko-Parrish، and N. L. First. 1985. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. Theriogen. 24: 537-549.

Parrish، J. J.، J. L. Susko-Parrish، C. Uguz، and N. L. First. 1994. Differences in the role of cyclic adenosine 3،5-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. Biol Repro.، 57: 1099-1108.

Pawshe، C.H.، A. Palanisamy، M. Taneja، S.K. Jain and S. M. Totey. 1996. Comparison of various maturation treatments on in vitro maturation of goat oocytes and their early embryonic development and cell numbers. Theriogen. 46:971-982.

Puglisi، R.، D. Balduzzi and A. Galli. 2004. In Vitro Sperm Penetration Speed and its Relationship with In Vivo Bull Fertility. Repro. Dom Anim.، 39: 424–428.

Saeki، K.، H. Kato، Y. Hosoi، M. Miyake، K. Utsumi and A. Iritani. 1991. Early morphological events of in vitro fertilized bovine oocytes with frozen-thawed spermatozoa. Theriogen.، 35:1051-1058.

Saikhuna، S. N.، S. Sriussadapornb، N. Thongtipc، A. Pinyopumminbc and Y. Kitiyanantad. 2008. Nuclear maturation and development of IVM/IVF canine embryos in synthetic oviductal fluid or in co-culture with buffalo rat liver cells. Theriogen.، 69(9): 1104. (Abstract).

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

Susko-Parrish، J.L.، M.B. Wheeler، R.L. Ax، N.L. First، J.J. Parrish. 1990. The effect of penicillamine، hypotaurine، epinephrine and sodium metabisulfite on bovine in vitro fertilization. Theriogen.، 33:333.

Tatham، B. G.، T. Fehan and R. Rashen. 2003. Buffalo and Cattle hybrid embryo development in decreased by caffeine treatment during in vitro fertilization. Theriogen.، 59: 709-717.

Tervit، H. R.، D. G. Whittingham، and L. E. Rowson. 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. J Repro. Fert.، 30: 493-497.

Therien، I.، G. Bleau، and P. Manjunath. 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. Biol Repro.، 52: 1372-1379.

Walters، A.H.، W.، R. G. Saacke، R. E E. Eyestone. Pearson، and F. C. Gwazdauskas. 2004. Sperm Morphology and Preparation Method Affect Bovine Embryonic Development. Journal of Andrology.، 25 (4): 554-563.

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.

Ward، F.، D. Rizos، M. P. Boland، P. Lonergan. 2003. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility. Theriogen. 59: 1575-1584.

Watson، A. J.، P. D. Sousa، A. Cavency، L. C. Barcroft، D. Natale، J. Vrquhart، and M. E. Wethusin. 2000. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels، blastocyst development، cell number، and apoptosis. Bio Reprod. 62: 355-364.

Wrenzycki، C.، D. Herrmann، L. Keskintepe، A. Martins، Jr. S. Sirisathien، B. Brakett and H. Niemann. 2001. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. Human Repro.،16 (5): 893-901.

Younis، A. I.، L Keskintepe، K. Mackie and B. G. Brackett. 1992. In vitro maturation and fertilization of Toggenburg goat oocytes.Theriogen.، 37:330.

Younis، A.، I. K. A. Zuelke، K. M. Harper، M. A. L. Oliveira and B. G. Brackett. 1991. In Vitro Fertilization of Goat Oocyte. Bio. Repro.، 44: 1177-1182.

Received	**2010/09/13**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2011/01/17**	**قبول البحث للنشر**