تأثير تقنيات مختلفة لجمع البويضات في أنتاج ونوعية البويضة من مبايض المعز المحلي

ناهض حمزة عبادي **هاشم مهدي الربيعي**

أستاذ

الكلية التقنية – المسيب/ جامعة الفرات الأوسط التقنية

البريد الالكتروني: drhashem48@yahoo.com

المستخلص

هدف البحث دراسة تأثير تقنيات مختلفة لأستحصال البويضات في إنتاج ونوعية البويضة من مبايض المعز المحلي، جُمع 180 مبيض من 90 أنثى بالغة غير حامل ذُبحت في مجازر محافظة بابل للمدة من نيسان إلى تشرين الثاني 2016 في صندوق معزول ونُقلت إلى المختبر خلال ساعتين. استُحصلت البويضات بوساطة ثلاثة تقنيات وهي تشريح المبيض (Slicing) وثقب المبيض (Puncture) وسحب الجريبة (Aspiration of follicle) ، وقُسمت البويضات إلى ثلاثة أصناف ، الصنف الأول : بويضات ذات نوعية جيدة محاطة باكثر من ثلاث طبقات من الخلايا الركمية (Cumulus cells) ، الصنف الثاني : بويضات ذات نوعية متوسطة محاطة بأقل من ثلاث طبقات من الخلايا الركمية ، الصنف الثالث: بويضات ذات نوعية رديئة عارية كلياً أو جزئياً من الخلايا الركمية. بيّنت الدراسة تفوقاً معنوياً ($P<0.05$) للعدد الكلي للبويضات المستحصلة ومعدل البويضات المستحصلة لكل مبيض استعمال تقنية تشريح المبيض (438 و7.3 ± 1.01 بالتتالي) وتقنية ثقب المبيض (384 و 6.4 ± 0.88 بالتتالي) ، مقارنة مع تقنية سحب الجريبة (234 و 3.9 ± 0.20 بالتتالي). أشارت نتائج الدراسة أيضاً تفوقاً معنوياً ($P<0.05$) للعدد الكلي للبويضات المستحصلة ومعدل البويضات المستحصلة لكل مبيض ونسب البويضات ذات النوعية الجيدة المستحصلة بتقنية تشريح المبيض (275 و 4.58 و 62.78% بالتتالي) والمستحصلة بتقنية ثقب المبيض (202 و 3.36 و 52.60% بالتتالي) مقارنة مع تقنية سحب الجريبة (110 و 1.83 و 47.00% بالتتالي) النتائج المستحصلة من هذه الدراسة توحي بأن طريقة تشريح المبيض هي التقنية المناسبة لأستحصال البيضة ذات الشكل والنوعية الجيدة.

الكلمات المفتاحية : المعز ، البويضة ، تشريح المبيض ، ثقب المبيض ، سحب الجريبة

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول

Effect of different oocytes recovery techniques on yield and quality oocyte from local caprine ovaries

NAHIDH H. AL-JIBOORI **H. M. AL-RUBAEI**
Professor
Al-Musaib Technical College/ Al-Furat Al-Awsat Technical Uuniversity
E-mail: drhashem48@yahoo.com

Abstract:

The objective of this research to study the effect of different oocytes recovery techniques on yield and quality of oocytes in local caprine ovaries. 180 ovaries were collected from adult and non-pregnant 90 females, slaughtered at abattoir of province of Babil during the period between April – November 2016, in an insulate container and transported to the laboratory within 2 hours. Oocytes were recovered by three techniques viz. slicing , puncture, and aspiration of follicle. Oocytes were categorized into three classes, first class: good quality oocytes with more than 3 layers of cumulus cells, second class: intermediate quality oocytes with less than 3 layers of cumulus cells, third class: poor quality oocytes, denuded oocytes from cumulus cells. The study showed that the total number of oocytes recovered and the number of oocytes recovered per ovary were significantly higher ($P<0.05$) in slicing (438 and 7.3±0.01 respectively) and punctures (384 and 6.4±0.88 respectively) compared to aspiration technique (243 and 3.9±0.20 respectively). The results of study also indicated that the total number of oocytes recovered, the number of oocytes recovered per ovary and the percentage of recovered oocyte for good quality oocytes were significantly higher ($P<0.05$) when using the slicing technique (275 , 4.58 and 62.87% respectively), and the puncture technique (202, 3.36 and 52.60% respectively) compared to aspiration technique (110 , 1.83 and 47.00% respectively). The results obtained suggested that the slicing method is the proper technique for recovering oocytes with good morpho-logical aspects and quality.

Key words: goat , oocyte , slicing , puncture , aspiration of follicle

المقدمة

لغرض الارتقاء بالواقع الزراعي والاستفادة القصوى من الطاقات الإنتاجية لحيوانات المزرعة فقد دعت الحاجة الى اجراء المزيد من الدراسات والبحوث العلمية في مجالات الثروة الحيوانية ومنها حيوان المعز لما يمتلكه ذلك الحيوان من صفات إنتاجية وتناسلية عالية للأرتقاء بتلك الصفات كماً ونوعاً(5). لذا اتجهت انظار الباحثين لاجراء المزيد من الدراسات المتعلقة بالتقنيات المختبرية المتعددة ومنها تقنيات استحصال البويضات من المبايض ، التي تُعد المكمل لعمليات التحسين الوراثي المتبعة للامهات والاباء، ومن خلال اجراء عمليات التلقيح الاصطناعي ، وتقنية نقل الاجنة، والمقدرة على إنضاج البويضات خارج الجسم، وتقنية الاخصاب الخارجي (2). هذه التقنيات المختبرية هي المرشح او المنقي لزيادة الإنتاج ، والحصول على نوعية البويضات

باقل التكاليف (1). ومن هذه التقنيات المختبرية التي اعتمدت في هذا البحث هي تقنيات سحب الجريبة (Aspiration of follicle) ، وتقنية ثقب المبيض (Puncture of ovary) . وتقنية تشريح المبيض Slicing of ovary ، ويمكن استحصال البويضات لإتمام واجراء تلك التقنيات المختبرية المختلفة من الحيوانات الحية أو من المجازر التي وصفت باعتبارها المصادر البديلة والرخيصة والأكثر وفرة لجمع المبايض وعلى نطاق واسع. (10). ان لنوعية البويضة المنتجة بتلك التقنيات القدرة على استئناف عمليات الأنقسام الاختزالي وتطور الاجنة والاستزراع الرحمي (23). لخلايا الركمة المبيضية (Cumulus cells) الدور الفعال في أنضاج وتجهيز غذاء وتقويم البويضات (24) ، ويمكن تقويم تلك البويضات بالاعتماد على نوعيتها وتدريجها بالاعتماد على تعدد طبقات خلايا الركمة المبيضية وتماسك السايتوبلازم ودرجة تجانسه ويكون حلقة دائرية حول البويضة (6 و25) تهدف الدراسة الحالية الى تأثير تقنيات مختلفة لجمع البويضات في أنتاج ونوعية البويضة من مبايض المعز المحلي وأختيار التقنية المناسبة لأستحصال البويضات ذات الشكل والنوعية الجيدة وبأرخص التكاليف.

المواد وطرائق العمل :

أنجزت الدراسة في مختبرات قسم تقنيات الإنتاج الحيواني في الكلية التقنية/ المسيب للمدة من نيسان إلى تشرين الثاني 2016 ، أزيلت القناة التناسلية من 90 أنثى غير حامل من المعز والتي ذُبحت في مجازر محافظة بابل، وفُحصت عيانياً وكانت طبيعية وخالية من التشوهات الخلقية، ووضعت في صندوق معزول يحتوي على المحلول الفسلجي الطبيعي بتركيز 0.9% بدرجة حرارة الغرفة، ونقلت إلى المختبر خلال ساعتين، أُزيلت المبايض من أرتباطها مع الأربطة المبيضية ونظفت من الأنسجة العالقة والأربطة، وغسلت المبايض بمحلول الملح الطبيعي لأزالة الدم الزائد وحطام الأنسجة وبعد ترتيب (Trimming) الأنسجة العالقة، غسلت المبايض عدة مرات بوساطة المحلول الملحي الطبيعي المعقم (Sterile) بدرجة حرارة 37 مئوية. بلغ عدد المبايض المستحصلة 180 مبيض، قسمت إلى ثلاثة مجاميع متساوية وحسب طريقة استحصال وجمع البويضات. عُومل كل مبيض لوحده، وجُمعت البويضات بوساطة الطرائق التالية (14) :

1. سحب الجريبة (Aspiration) : سُحبت محتويات الجريبات المرئية على سطح المبيض ذات قطر 2–8 ملم باستعمال أبرة ذات قياس 20 مرتبطة بمحقنة بلاستيكية نبيذة ذات حجم 2 و 5 ملليتر تحتوي على 2 ملليتر من الوسط الزرعي محلول دارئ الفوسفات (Phosphate Buffer Saline – BDH– England)، مع الهيبارين (Heparin– LFO–Denmark) وبنسبة 25 وحدة دولية/ ملليتر، نقل الوسط مع محتويات الجريبة إلى طبق بتري ذو حجم 35 ملم.

2. تشريح المبيض (Slicing) : وضعت المبايض في طبق بتري معقم ذات قطر 90 ملم يحتوي على 5 ملليتر من وسط محلول دارئ الفوسفات مع الهيبارين، مسكت قاعدة المبيض بوساطة الملقط وقطع وشرح كل سطح المبيض بعمق 2–3 ملم باستعمال شفرة معقمة (blade) .

3. ثقب المبيض (Puncture) : وضعت المبايض في طبق بتري معقم ذات قطر 90 ملم يحتوي على 5 ملليتر من وسط محلول دارئ الفوسفات مع الهيبارين، مسكت قاعدة المبيض المغمورة بالوسط بوساطة الملقط وثقب كل سطح المبيض بوساطة أبرة معقمة نبيذة ذات قياس 18 .

تُرك صحن بتري ساكناً لمدة 5 دقائق للسماح للبويضات بالترسيب والأستقرار في القاع، فُحصت البويضات تحت المجهر العاكس (Inverted) ، سجل العدد الكلي للبويضات، ودُرجت (Graded) على أساس عدد طبقات الخلايا الركمية (Cumulus cells) وصفات الهيولي (Ooplasma) (18):

1. بويضات جيدة (Good oocytes) : البويضة محاطة بأكثر من 3 طبقات من الخلايا الركمية مع هيولي متجانس.

2. بويضات متوسطة (Intermediate oocytes): البويضة محاطة بأقل من 3 طبقات من الخلايا الركمية مع هيولي متجانس.

3. بويضات رديئة (Poor oocytes) : البويضة عارية كلياً أو جزئياً من الخلايا الركمية مع هيولي منكمش أو غير منتظم .

النتائج والمناقشة :

تبين نتائج جدول (1) أن معدل مجموع البويضات المجمعة في هذه الدراسة بلغت 438 بويضة بتقنية تشريح المبيض و 384 بويضة بتقنية ثقب المبيض و 234 بويضة بتقنية سحب الجريبة ، من 60 مبيض لكل تقنية. تشير النتائج تفوقاً معنوياً ($P<0.05$) لتقنية تشريح وثقب المبيض في معدل عدد البويضات لكل مبيض وبلغت 7.3 ± 1.01 و6.4 ± 0.88 بيضة/مبيض بالتتالي مقارنة بتقنية سحب الجريبة (3.9 ± 0.20 بيضة/مبيض). أن تفوق تقنيتي تشريح وثقب المبيض في مجموع ومعدل عدد البويضات لكل مبيض ربما بسبب تشريح كل سطح المبيض وشمول الجريبات الصغيرة والمتوسطة قبل أن تتمدد خلايا الركمة المبيضية (11) . أن أرتفاع عدد البويضات الناتجة عن تقنيتي تشريح وثقب المبيض ربما بسبب تحرير البويضات من كل سطح الجريبات كما من عمق قشرة المبيض وأن تطبيق الضغط الزائد خلال تقنية تشريح المبيض ربما يحرر البويضات من هذه الجريبات (25). بالحقيقة أن تقنية سحب الجريبة تقترب من الجريبات الكبيرة تاركة الجريبات الصغيرة مطمورة وغير ممكن الوصول إليها، ربما هو سبب قلة أنتاج البويضات في هذه التقنية(12). تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما جاء به (11) و (14) و (25) في المعز والذين بينوا تفوق تقنية تشريح وثقب المبيض في مجموع وعدد البويضات لكل مبيض على تقنية سحب الجريبة، وتتفق مع (7) في الأغنام والذي أوضح تفوق تقنية تشريح

المبيض على تقنية سحب الجريبة، بينما على العكس لاحظ (22) بعدم وجود اختلاف معنوي بين تقنية تشريح المبيض وتقنية سحب الجريبة.

جدول 1: تأثير ثلاث تقنيات لأستحصال البويضات في عدد البويضات ومعدل أنتاج البويضات لكل مبيض في المعز المحلي (المعدل ± الخطأ القياسي)

ت	تقنية الجمع	عدد المبايض	عدد البويضات المستحصلة	معدل عدد البويضات في كل مبيض
1	تشريح المبيض Slicing	60	438	1.01±7.3 a
2	ثقب المبيض Puncture	60	384	0.88±6.4 a
3	سحب الجريبه Aspiration	60	234	3.9.20± 0 b
4	المجموع Total	180	1056	1.07±5.86

- **المتوسطات التي تحمل حروفا مختلفه ضمن العمود الواحد تختلف معنويا (P<0.05)**

بينت نتائج الجدول (2) تفوقاً معنوياً (P<0.05) ، للعدد الكلي ومعدل عدد البويضات لكل مبيض ونسب البويضات الجيده المستحصله بتقنيه تشريح المبيض وبلغت 275 و 4.58 ± 1.04 و 62.78 % بالتتالي والمستحصله بتقنيه ثقب المبيض وبلغت 202 و 3.36 ±0.08 و 52.10 % بالتتالي على عدد ومعدل البويضات لكل مبيض ونسب البويضات الجيدة (صورة 1) المستحصلة بتقنية سحب الجريبة وبلغت 110 و 1.83 ±1.02 و 47.00 % بالتتالي ، كما اشارت نتائج الجدول تفوقا معنويا (P<0.05) لعدد ومعدل عدد البويضات لكل مبيض ونسب البويضات المتوسطة (صورة 2) المستحصلة بتقنيه تشريح وثقب المبيض على المستحصلة بتقنيه سحب الجريبة . بينت نتائج الجدول ايضا انخفاظا معنويا (P<0.05) لعدد ومعدل البويضات لكل مبيض ونسب البويضات الرديئه (صورة 3 و4) المستحصلة بتقنيه تشريح المبيض وبلغت 69 و 1.15 ±0.01 و 15.75 بالتتالي والمستحصلة بتقنيه سحب الجريبة وبلغت 76 و 1.26 ± 0.03 و 32.43 بالتتالي مقارنه مع ثقب المبيض وبلغت 84 و 1.9 ±0.01 و 21.87 بالتتالي طبقا لهذه النتائج اعطت تقنيتي تشريح وثقب المبيض بويضات ذات نوعية جيدة ومتوسطة اكثر مقارنه مع تقنيه سحب الجريبه ، تتوافق ننتائج هذه الدراسة مع ما جاء به (4) و (14) و (18) و (25) وتختلف مع (10) و (15) في المعز اذ بينوا تفوق طريقه سحب الجريبة معنويا (P<0.05) على تقنية تشريح المبيض في تدرج ونوعية البويضة . تتوافق هذه الدراسة مع (7) و (9) و (21) وتختلف مع (22) في الاغنام ، وايضا تتوافق نتائج هذه الدراسه مع (17) في الابقار ومع (13) و (20) في الجاموس . ان السبب في انتاج البويضات الجيده والمتوسطه في كل مبيض بتقنيه تشريح المبيض ربما يعزى الى حقيقه انه عن طريق تشريح المبيض تتحرر البويضات من الجريبات السطحية وكذلك الجريبات الموجودة في سدى (Stroma) القشره ، في حين ان تقنيه سحب الجريبة ،

يمكن الحصول على البويضات من الجريبات السطحيه والواضحة فقط (8 و 16) . ان الاختلاف في نوعيه البويضات ربما يعزى الى بعض العوامل ومنها العمر والنمو والحاله الغذائيه (حاله الجسم) والدورة المبيضية عند وقت ذبح الحيوان وحجم والحالة الوظيفية للجريبات وطريقه الحصول على البويضات (3 و4 و9 و19 و 26).

صورة1: بويضة جيدة أكثر (3) طبقات من الركمة المبيضية.

صورة2: بويضة متوسطة أقل(3) طبقات من الركمة المبيضية.

صورة 3: بويضة رديئة عارية جزئياً من الركمة المبيضية.

صورة 4: بويضة رديئة عارية كلياً من الركمة المبيضية.

نستنتج من هذا البحث أن طريقة تشريح المبيض هي التقنية المناسبة لأستحصال أكثر عدد من البويضات ذات شكل ونوعية جيدة .

جدول 2: تأثير تقنيات الجمع في تدرج ونوعية ونسب البويضات (المعدل ± الخطأ القياسي)

ت	تقنية الجمع	عدد المبايض	تدرج وأعداد ونسب البويضات					
			جيدة	%	متوسطة	%	رديئة	%
1	تشريح المبيض Slicing	60	1.04±4.58 (275)a	62.78	0.09±1.56 (94) a	21.4	0.01±1.15 (69)b	15.75
2	ثقب المبيض Puncture	60	0.08±3.36 (202)a	52.60	0.09±1.63 (98)a	25.52	0.01±1.4 (84)a	21.87
3	سحب الجريبة Aspiration	60	1.02±1.83 (110)b	47.00	0.01±0.80 (48)b	20.51	0.03±1.26 (76)b	32.47

- المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً (P<0.05)
- الأرقام بين قوسين تدل على عدد البويضات

المصادر :

1- **Abdullah, R.B.; Liow, S.L.; Rahman, N.M.A.; Chan, W.K.; Wen-Khadijah, W.E. (2008**) Prolonging the interval from ovarian hyperstimulation to laparoscopic ovum pick-up improves oocyte yield, quality and developmental competence in goats. Theriogenology., 70:765-771.

2- **Agarcawal, K.P. (1992**)In vitro maturation of caprine oocytes. Indian journal of animal reproduction.,13:195-197

3- **Amer, H. A.; Hegab, O. and Zabbal, S.M.(2008**) Effects of ovarian morphology on oocyte from water buffalo (Bubalus bubalis) blastocysts derived from in vitro matured, in vitro fertilized oocytes and co-cultured with cumulus and oviductal cells. Theriogenology., 42: 591-600.

4- **Anna, A.A.; Hisham, M.N.; Wan Khadijah W.E. and Abdullah, R.B. (2013**) Comparative Study on Goat Oocyte Recovery Methods and Factors Affecting the Quantity and Quality of Occytes. Asian Journal of Animal and Veterinary advances., 8: 437-448.

5- **Atsan, T.; Emsen, Y.; Prak, M.; Dgdemir, V. and Diaz, C.A.G. (2007)** An economic assessment of differently managed sheep flocks in eastern Turkey Ital. J. Anim.Sci., 6:407- 414

6- **Blindon, P. and Sirard, M.A. (1995)** Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmented competence in bovine oocytes. Mol. Reprod. Dev., 41:54-62.

7- **Dadashpour D.; Zeinoaldini, N.; Kohram, H. (2012)** A novely oocyte recovery method from slaughterhouse material. Small Rumin Res., 106: 168-172.

8- **Das, G. K.; Jam, G.C.; Solanki, V. S. and Tripathi, V. N. (1996)** Efficacy of various collection methods for oocyte retrieval in buffalo. Theriogenology. 46: 1403-1411

9- **Davachi, N.D.; Shahneh, N.Z.; Kohrarn, H.; Zhandi, M.; Dashti, S.; Shamsi, H. and Moghadam, R. (2014)** In Vitro Ovine Embryo Production: the Study of Seasonal and Oocyte Recovery Method Effects. Iran Red Crescent Med, Journal., 16:182-190.

10- **Ferdous, J. (2006)** Collection, grading and evaluation of goat cumulus oocyte complexes in view of in vitro maturation, fertilization and culture. Master of Science Thesis, Department of Animal and Genetics. Bangladesh Agricultural University, Mymensingh.

11- **Hoque, S. A.M.; Kabiraj, S.K.; Yahia Khandoker, M.A.M.; Mondal, A. and Tareq, K.M.A. (2011)** Effect of collection techniques on cumulus oocyte complexes (COCs) recovery, in vitro maturation and fertilization of goat oocytes. African Journal of Biotechnology., 10: 9177-9181.

12- **Islam, M.R.; Khandoker, M.A.; Afroz, S.; Rahman, M.G.M. and Khan, R.I. (2007)** Qualitative and quantitative analysis of goat ovaries, follicles and oocytes in view of in vitro production of embryos. J. Zhejiang Univ. 8:465-469.

13- **Jamil, H.; Samad, A.; Qureshi, Z.I.; Rehman; N.U. and Lodhi, L.A. (2008**) Harvesting and evaluation of reverine buffalo follicular oocytes. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 32: 25-30.

14- **John A.; Joseph M.; Vijayakumaran, V. and Manoj, C. J. (2015)** Effect of Oocyte retrieval Techniques on Yield and Quality of Caprine Oocytes. Journal of Agriculture and Veterinary Science., 4: 50-52.

15- **Mondal, A.; Khandoker, M.A.M.Y.; Mondal, M.A.; Rahman, A.H.M.S.; Apu, A.S. and Pervage, S. (2008)** In vitro production of goat embryos. Bang. J. Anim. Sci. 37: 1-9.

16- **Pawshe, C.H.; Totey, S.M. and Jam, S.K. (1994)** A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for in vitro maturation and fertilization. Theriogenology., 42: 117—125.

17- **Rahman, M.O.M.; Goswami, P.C.; Khandoker, M.A.M.Y.; Tareq, K.M.A. and Ali, S.Z. (2004)** Collection of bovine cumulus-oocyte complexes from slaughterhouse ovaries in Bangladesh. Pak. J. Biol. Sci., 6: 2054-2057.

18- **Rahman, A. N. M. A.; Abdullah, R. B. and Wan-Khadijah, W. E. (2008)** Recovery and grading of goat oocytes with special reference to laparoscopic ovum pick-up technique. A review. Biotechnology., 7:612-622

19- **Ramsingh, L.; Sadasivarao, K. and Muralimohan, K.(2013)** Ovarian Biometrics and oocyte grading percentage of yield in local goats of Andhra Pradesh. Iosr. J. Pharma., 3: 52-59

20- **Rao, M. M. and Mahesh, Y. U. (2012)** Efficacy of different harvesting techniques on oocyte retrivel from buffalo ovaries. Buffalo Bulletin., 31: 209-213.

21- **Rodriguez, C.; Mel, L.; Alvarez, M.; Boixo, E. J.C.; Chamorro, C.A. (2006**) Ovum pick-up in sheep: a comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval. Reprod Domest Anim., 41: 106-113.

22- **Shirazi, A.; Shams-Esfandabadj, N. and Hosseini, S.M. (2005)** A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for in vitro maturation. Small Rumin. Res., 58: 283-286.

23- **Sirard, M.A.; Florman, H.M.; Leibfried – Rutledge, M.I.; Barnes, F.L.; Sims, M.L. and First, N.L. (2006)** Timing of nuclear progression and protein Synthesis Necessary for meitic maturation of bovine oocyte. S. Biol. Reprod., 40 :125-163.

24- **Sutton, M.L.; Glichirst, R.B. and Thompson, J.G. (2003)** effect of in vitro and in vivo environment to the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on the oocyte developmental competence. Hum. Rep. Up data., 6: 35-48.

25- **Wang, Z.G.; Xu, Z.R. and Vu, S.D. (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: 21-25.

26- **Zoheir, K.M.A.; Abdoon, A.S.; Mahrous, K.F.; Amer, M.A.; Zaher, M.M.; Li-Guo, Y. and El-Nahass, E.M. (2007)** Effect of season on the quality and in vitro maturation rate of Egyptian buffalo (Bubalus buhalis) oocytes. . Journal of Cell and Animal Biology, 1:29-33.