تأثير طريقة استحصال البيوض على نسبة الاستحصال والإنضاج البويضات مختبريًا في الأغنام العراقية

عبد الستار فرج مجيد*، محمد مؤيد طه** وسعد محمد ندا***
*كلية الطب البيطري/ جامعة الأنبار
**كلية الزراعة/ جامعة الأنبار
***وزارة العلوم والتكنولوجيا

الخلاصة

استعملت طريقتين السحب والتقطيع لاستحصال البويضات من مبايض الأغنام من عينات المجزرة. لدراسة الطريقة المثلى لاستحصال البويضات وتأثيرها على نسبة إنضاج البويضات في الأغنام. كانت نسبة الاستحصال عالية بطريقة التقطيع (84.60± 1.01) عند مقارنتها بطريقة السحب (67.60± 1.37). لوحظ وجود فرق معنوي (P<0.05) بين الطريقتين. كما لوحظ أن أفضل طريقة للحصول على أعلى نسبة نضوج للبويضات في طريقة السحب (40.57± 0.90) عند مقارنتها بطريقة التقطيع (37.40± 0.27). لوحظ وجود فرق معنوي (P<0.05) بين الطريقتين.

نستنتج أن طريقة استحصال البويضات من مبايض الأغنام في المجزرة يؤثر على نسبة الاستحصال ونسبة إنضاج البويضات مختبريًا.

Effect Of Oocyte Harvesting Techniques on Recovery and on In Vitro Maturation in Iraqi Sheep

A.F. Majeed*, M. M. T. Al- Jumaily and S. M. Nada*****
***College of Veterinary Medicine/ Al- Anbar University**
****College of Agriculture/ Al- Anbar University**
*****Ministry of Sciences & Technology**

Abstract

Two different methods of recovery, aspiration and slicing were used for harvesting the oocytes of ovine ovaries. The aim was to determine an efficient method for oocyte harvesting and its effect on subsequent in vitro maturation. The average percentage of oocytes recovered by methods was significantly higher ($p<0.05$) by slicing (84.60± 1.01) than by the aspiration method (67.60 ± 1.37). However, the percentage of good quality mature oocytes was higher in the aspiration method (40.57 ± 0.90) as compared with slicing methods (37.40 ± 0.27). There was a significant difference ($p<0.05$) between the two methods.

It was concluded from present work that the method of harvesting oocytes from ovaries in slaughter house effect on recovery and the maturation of the oocyte in sheep.

البحث مستل من أطروحة ماجستير للباحث الثاني

المقدمة

تعتبر عملية استحصال البيوض collection of ova من جريبات مبايض النعاج بعد ذبحها وفي أطوار مختلفة من دورة الشبق من أهم خطوات إجراء الإخصاب الخارجي الرخيصة الثمن Invitro Fertility (IVF)(1).

استخدم الباحثون العديد من الطرق لجمع البويضات من المبايض. وأكثر الطرق شيوعاً هي الحصول على بويضات ناضجة من أمهات محفزة بالهرمونات المحررة لمحفزات القند (GnRH) (2)، في حين بين آخرون أن البيوض المستحصلة من حيوانات معاملة هرمونياً اقل نضجاً من تلك التي لم تعامل (3) وقد تم استحصال البيوض عن طريق السحب بمحقنة نبيذه قياس 18 (3، 4، 5) وبالمضخة بمحقنة قياس 18(6) وعن طريق التقطيع النسيجي للمبيض Slicing (1) وبالطريقة الجراحية Lapratomy (7) وعن طريق الناظور البطني Laparoscopy (8) ولغرض معرفة تأثير طريقة استحصال البيوض عن طريق السحب بالمحقنة والاستحصال عن طريق التقطيع النسيجي للمبيض على نسبة إنضاج البويضات مختبرياً صمم هذا البحث.

المواد وطرائق العمل

أجريت الدراسة على (720) جهازاً تناسليا للنعاج البالغة والفطائم المذبوحة في مجزرة الرمادي. تم استخدام 1440 مبيض وبأطوار مختلفة من دورة الشبق وتم نقل النماذج بحاوية مبردة بالمختبر. تم استحصال البويضات من المبايض بطريقتين:

أ- طريقة السحب (Aspiration Method) صنفت جريبات المبايض طبقا لما ذكره (4) إلى مجموعتين:

كبيرة الحجم وتمتاز بقطر اكبر من 2.5 ملم، وصغيرة الحجم ذات قطر اقل من 2 ملم.

بعدها استحصلت البويضات وذلك بسحب السائل الجريبي بواسطة محقنة نبيذه قياس 18 والحقنة ذات سعة 5 مل تحتوي على 2 مل من محلول غسل البويضات بوسط (TALP) محلول (Tyrode Albumin Lactate Phosphate) مضافاً له الهيبارين لمنع حدوث تخثر السائل الجريبي ومصل دم النعاج كمصدر بروتيني و BSA والمضادات الحياتية.

بعد سحب السائل الجريبي يتم فحصه تحت المجهر في طبق بتري معقم لمشاهدة البويضات، تشطف البويضات ثلاث مرات بمحلول غسل البويضات في أطباق بتري وبدرجة حرارة 39مْ.

يتم نقل البويضات بماصة باستور من طبق إلى آخر حاوي على محلول غسل جديد ثم تنقل البويضات إلى وسط الإنضاج.

ب-طريقة التقطيع (Slicing Method).

اشتملت هذه الطريقة على تقطيع المبيض بواسطة المشرط الطبي بعد وضع المبيض في طبق بتري معقم حاوٍ على 3 مل من محلول جمع وغسل البويضات قبل الإنضاج، ثم يترك المبيض المتقطع (النسيج المبيضي) في الطبق لمدة 5- 10 دقائق لغرض استقرار البويضات في قعر الطبق. بعد انتهاء المدة تم رفع النسيج المبيضي من المحلول وغسله بمحلول جديد لاحتمال التصاق البويضات بالنسيج المبيضي ثم تفحص محتويات الطبق تحت المجهر لمشاهدة البويضات.

غسلت البويضات بمحلول الغسل (TALP) وبدرجة حرارة 39مْ لثلاث مرات بواسطة نقلها من طبق لآخر جديد يحوي محلول غسل جديد باستخدام ماصة باستور بعد ذلك نقلت البويضات إلى أوساط الإنضاج إنضاج البيوض مختبرياً حيث نقلت البيوض إلى أوساط زرعية للإنضاج TALP و TCM-199 و DPBS حيث وضعت

البويضات في أطباق بتري معقمة حاوية على 2مل من الوسط الزرعي بمعدل 6– 10 بويضات لكل طبق. وضعت أغطية أطباق بتري عليها ثم حضنت في حاضنة تجهز 5% Co_2، 39مْ درجة حرارة، 90% رطوبة لمدة 24– 26 ساعة.

بعد انتهاء مدة الحضن فحصت البويضات تحت المجهر الضوئي لمشاهدة درجة النضج التي تتميز علامته الرئيسية بوجود الجسم القطبي الأول First Polar مع ملاحظة تمدد ملحوظ للخلايا الركامية المحيطة بالبويضة وتحول لونها من الشكل المعتم إلى البراق.

حللت النتائج إحصائياً باستخدام برنامج Spss لتحليل الصفات المدروسة (9) واستخدام التحليل العشوائي الكامل CRD لمقارنة الفروق المعنوية بين المتوسطات.

النتائج والمناقشة

الجدول–1 يبين النتائج التي تم الحصول عليها في البحث. أظهرت النتائج تفوق طريقة التقطيع Slicing على طريقة السحب Aspiration وبفرق عال المعنوية ($p<0.05$) في نسبة استحصال البويضات، حيث بلغ عدد البويضات المستحصلة بطريقة التقطيع 1388 بويضة من أصل 1635 جريب (بمعدل 84% بويضة مستحصلة) في حين كانت 1268 بويضة من أصل 1924 جريب (بمعدل 66% بويضة مستحصلة) بطريقة السحب. ويعزى ذلك إلى السماح لعدد اكبر من البويضات للتحرر من المبيض في حالة تقطيعه مقارنة بسحب السائل الجريبي الذي قد يسمح لعدد من البويضات بالبقاء داخل الجريب (خاصة الجريبات الصغيرة) دون إمكانية سحبها مع السائل الجريبي (10) واتفقت النتائج مع ما نشره العديد من الباحثين (6، 11).

أما من ناحية نسبة إنضاج البويضات فقد تفوقت طريقة السحب معنوياً ($p<0.05$) على طريقة التقطيع في نسبة الإنضاج حيث تم إنضاج 545 بويضة من اصل 1268 بويضة مستحصلة (بمعدل 42% بويضة ناضجة) في طريقة السحب بينما كان عدد البويضات الناضجة في طريقة التقطيع 541 بويضة من أصل 1388 بويضة مستحصلة (بمعدل 39% بويضة ناضجة) كما موضحة في الجدول –1.

وقد اختلفت النتائج مع ما سجله Hamano and Kuwayama (11) حيث أشار إلى أن طريقة التقطيع ارتفعت معنوياً في نسبة الإنضاج على طريقة السحب وان طريقة التقطيع تعطي بويضات في الأبقار ذات نوعية جيدة تمتلك 3– 5 طبقات من الخلايا الركامية (10). وقد يعزى سبب الاختلاف إلى نوع الحيوان وعليه فان استخدام طريقة السحب أفضل من طريقة التقطيع في الدراسة الحالية لأنها رفعت نسبة إنضاج البويضات مختبرياً في الأغنام.

وقد استنتج من الدراسة أن لطريقة استحصال البويضات من المبايض في عينات المجزرة تأثير على نسبة الاستحصال ونسبة إنضاج البويضات.

جدول(1) يبين تأثير طريقة الاستحصال على نسبة البويضات المستحصلة والناضجة من مبايض النعاج العراقية (المعدل ± معامل الخطأ القياسي)

طريقة الاستحصال	النسبة المئوية للبويضات المستحصلة	النسبة المئوية للبويضات الناضجة
سحب	1.37 ±67.60a	0.90 ±40.57a
تقطيع	1.01 ±84.60b	0.27 ±37.40b

الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد تعني وجود فروق معنوية ($p<0.05$).

المصادر

1. Hafez, B. & Hafez, E. S. E., (2000). Reproduction in Farm Animals. 7th Ed. Lippincott Williams and Wilkins, A wolter kluwer Co. Philadelphia, U.S.A.
2. Shipley, C. F. B.; Buckrell, B. C.; Mylne, M. J. A.; Pollard, J. & Hunton, J. R., (2007). Artificial Insemination and Embryo Transfer in Sheep. In: Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Edited by Youngquist, R. S. and Threlfall, W. R. 2nd Ed., Saunders & Elsever Inc., pp.629- 640.
3. Guilbault, L. A.; Pothier, F.; Twagiramungu, H. & Sirard, M. A., (1998). New technologies to improve the reproductive efficiency of dairy cattle. Can. J. Anim. Sci., 78 (Suppl.): 113- 129.
4. Chang, W. T. K.; Moor, R. M. & Polge, C., (1986). In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. Theriogenology. 25: 146.
5. Al- Aubaidi, G. H. G., (1989). In vitro fertilization in sheep. Msc Thesis, Coll. Vet. Med., Baghdad University.
6. Tervit, H. R., (1997). In vitro production of cattle embryos. In: Milk composition, production and biotechnology. Ed. CAB Inter. Oxon, U.K. pp. 341-355.
7. Carolan, C.; Monaghan, P.; Gallagher, M. & Gordon, I., (1994). Effect of maturation, fertilization and culture in vitro. Theriogenology.41:1061- 1068.
8. Noakes, D. E.; Parkinson, T. J. & England, G. C. W., (2003). Arthur's veterinary reproduction and obstetrics, 8th Ed., Saunders Co.
9. Paul, R.; Kinnar, C. & Colin, D., (1994). Gray, spss for windows made simply Lawrence Erlbaum Associates.
10. Wani, N. A.; Wani, G. M.; Khan, M. Z. & Salahudin, S., (2000). Effect of oocyte harvesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. Small Rumin. Res., 36: 63- 67.
11. Hamano, S. & Kuwayama, M., (1993). In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. Theriogenology. 39: 703- 712.