ألاخصاب الخارجي في الماعز المحلي العراقي

In vitro Fertilization in Iraqi Local Goats

حازم اسماعيل عبد الباري الاحمد
مركز بحوث التقنيات الاحيائية / جامعة النهرين

Hazim I.AL-Ahmed
Biotechnology Research Center /Al-Nahrain University

المستخلص

تم الحصول على 412 بويضة اولية في دراسة الاخصاب الخارجي من عينات المجازر في اطوار مختلفة من دورة الشبق ، تم تصنيف الجريبات الموجودة على المبايض الى جريبات كبيرة الحجم (2-6) ملم وجريبات صغيرة الحجم (1-2) ملم ، تم سحب البويضات من هذه الجريبات بالاعتماد على وجود خلايا الركمة المبيضية او عدم وجودها وعلى وجود الجسم القطبي الاول ، تم انضاج البويضات المسحوبة من الجريبات الكبيرة والصغيرة في الوسط الزرعي النسيجي 199 لدراسة قابليتها على الانضاج . وبينت النتائج وجود زيادة معنوية (p<0.05) في قابلية انضاج البويضات المسحوبة من الجريبات كبيرة الحجم . تم استخدام تقنية القطرات الدقيقة من الوسط الزرعي النسيجي 199 وتقنية مزرعة الخلايا الحبيبية لانضاج البويضات وتم استحداث الاخصاب الخارجي فيها مع النطف التي تم تكيفها في وسط البراكيت . اظهرت النتائج ان اعلى نسبة لسحب البويضات واعلى نسبة للبويضات المحاطة بخلايا الركمة المبيضية كانت من الجريبات كبيرة الحجم ، وان لحجم الجريبة تأثير واضح على درجة النمو والانضاج ، وبينت النتائج عدم وجود فرق معنوي في كفاءة التقنيتين المستخدمتين في انضاج البويضات وقابليتها على الاخصاب .

Abstract

In the study of in vitro fertilization , 412 primary ova were used, these ova were collected from ovaries samples of does at different stages of oestrous cycle collected from abattoirs. These follicles were classified according to their size into large follicles (> 2-6)mm and small follicles (1-2) mm. Ova aspirated from these follicles were evaluated depending on the presence or absence of cumulus oophorus cells and on the presence of the first polar body. The aspirated ova from large and small follicles were maturated in tissue culture (medium 199) to study their ability of maturation.. The microdrops technique from tissue culture (Medium 199) and granulosa cell co-culture technique were used for the maturation of ova, also the *in vitro* fertilization was inducted in these ova with the sperm which were capacitated in Bracket Medium. The results showed that the highest rate for ova aspiration and the highest rate of ova surrounded by cumulas oophorus were from the large, follicles. The size of follicle has a significant influence on the degree of ova growth and maturation. The results showed the absence of significant differences in the efficacy of two techniques used in the ova maturation and their ability of fertilization.

المقدمة

تسهم عملية الاخصاب الخارجي في توفير اعداد كبيرة من الاجنة التي تتميز بامتلاكها بعض الصفات الوراثية الجيدة ومن مصادر رخيصة الثمن ، وإمكانية خزن هذه الاجنة لمدة طويلة وزرعها في أمهات مستقبلات بعد ان يتم تهيئتها هرمونياً لاستقبال الاجنة [1] ، وتستخدم عملية الاخصاب الخارجي في دراسة بعض الجوانب الغامضة التي يصعب التعرف عليها اثناء حدوثها داخل الجسم الحي ، ويمكن الاعتمـاد على هذه العملية في مجال الهندسـة الوراثية والاستنسال البايولوجي [3,2] والتي تحتاج الى اعداد كبيرة من الاجنة لإجراء التجارب والبحوث ، وتشارك عملية الاخصاب الخارجي في الاستفادة من اكبر عدد من البويضات الموجودة في المبيض خلال مدة حياة الحيوان، واخصابها خارجياً للحصول على عدد كبير من الاجنة من حيوان واحد يمتلك صفات وراثية جيدة ، وتُعتمد عملية الاخصاب الخارجي في تقويم خصوبة الذكور عند استعمال نطفها في مجال الاخصاب الخارجي [4] .

أشار[5] الى ان عدد الولادات الناتجة عن عملية الاخصاب الخارجي تكون محدودة وذلك لعدم وجود وسط زرعي يساعد البويضة المخصبة في انقسامها وتطورها الى مرحلة التويتة او مرحلة الكيسة الاريمية والتي يمكن ان تُنقل بالطريقة غير الجراحية الى رحم الأم المستقبلة . وأشار [6] الى ان اول ولادة لجنين معز قد تحققت في عام 1992 والناتجة عن عملية الاخصاب الخارجي .

ذكر بعض الباحثين ان البويضة مخصبة مختبرياً تتوقف في مرحلة(8-16) خلية ولاتكمل انقسامها الى مرحلة التويتةج [8,7] وان التوقف في هذه المرحلة يشير الى عجز الوسط الزرعي في تزويد الجنين بالعوامل والاشارات اللازمة لتخليق بروتينات الصدمة الحرارية [9] والاكثر تخصصاً من هذه البروتينات بروتين (68 و70) وهما من بروتينات الصدمة الحرارية والتي تساعد الجنين على الانقسام والتطور وان هذه البروتينات تعد اولى البروتينات تخلق تحت سيطرة الجنين المتكون [10] أشار [9] الى ان جنين الفئران الذي يتم إخصابه خارجياً الى مرحلة الاربع خلايا يتعرض الى نقص في بروتين 70 من بروتينات الصدمة الحرارية ومن ثم يؤثر على انقسام وتطور الجنين الى مراحل متقدمة .

المواد وطرائق العمل

1. جمع البويضات من عينات المجازر: تم جمع المبايض من اناث الماعز المذبوحة في المجزرة وهي في اطوار مختلفة من دورة الشبق ، اذ يتم جمعها في حاوية بلاستيكية تحتوي على محلول الــPBS وبدرجة حرارة 30 م ثم تم نقلها الى المختبر خلال 1-2 ساعة بعد الجمع [11] وتم اختيار الجريبات ذات الجدار نصف الشفاف والبراقة وتم الحصول على البويضات عن طريق سحب السائل الجريبي باستخدام ابرة قياس G(21) متصلة بمحقنة سعة (5) مل تحتوي على 0.5 من محلول الــ PBS وبعد ذلك تم تفريغ السائل الجريبي في طبق بتري يحتوي على كمية من محلول الــ PBS .

تم استخدام المجهر العاكس لفحص محتويات الاطباق للبحث عن البويضات الصالحة للانضاج وتم نقل هذه البويضات باستخدام الماصة الميكانيكية الدقيقة الى اطباق تحتوي على محلول الــ PBS وتم غسل هذه البويضات ثلاث مرات متتالية بنقلها الى اطباق تحتوي على محلول الــ PBS ، امتازت هذه البويضات بأنها محاطة بشكل كامل من قبل خلايا الركمة المبيضية وتمتلك هيولي محبب (Granulated cytoplasm) خالياً من الانكماش وذات نطاق شفاف واضح المعالم وخالية من الانبجاسات او التكسر في جدارها [12] .

2. انضاج البويضات مختبريا : اعتمدت طريقة [13] لانضاج بويضات المعز مختبرياً وذلك بنقلها من محلول الــ PBS الى اطباق بتري تحتوي على قطرات من الوسط الزرعي النسيجي 199 او بنقلها الى مزرعة الخلايا الحبيبية تم وضع هذه الاطباق في حاضنة CO_2 بدرجة 39م ولمدة 37 ساعة لغرض الانضاج ثم نقلت البويضات بعد انتهاء مدة الحضن الى اطباق اخرى تحتوي على محلول الــ PBS بدرجة 39م وتم فحصها تحت المجهر العاكس لملاحظة تمدد خلايا الركمة المبيضية ثم تم تعرية هذه البويضات من خلايا الركمة المبيضية عن طريق نقلها الى محلول البراكيت الحاوي على انزيم الهيالويورنديز وتم بعد ذلك اختيار البويضات الناضجة التي تمتلك جسماً قطبياً .

3. تكييف النطف مختبرياً: تم غسل النطف باستخدام وسط غسل النطف وذلك باضافة هذا الوسط الى السائل المنوي لاكمال الحجم الكلي الى 8 مل وتم تكرار عملية غسل النطف ثلاث مرات باستخدام جهاز النبذ المركزي بسرعة 200 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق في كل مرة [14] وتم التخلص من السائل العلوي وبقيت النطف متجمعة في قعر الانبوبة وتم تخفيف النطف باضافة 2 مل من وسط البراكيت الحاوي على 20% من مصل اناث المعز الشبقة وحضنت لمدة 1.5 ساعة في درجة حرارة 38.5 م وبعد انتهاء مدة الحضن تم اخذ 0.5 مل من الجزء العلوي للسائل وتخفيفه بالوسط نفسه بحيث اصبح تركيز النطف 10×10^{6} نطفة / مل وثم حضنت لمدة 4 ساعات بدرجة 38.5م .

4. عملية الاخصاب الخارجي : تم تخفيف النطف المتكيفة باستخدام وسط البراكيت للاخصاب بحيث اصبح تركيز النطف 10×10^6 نطفة / مل ثم اضيفت البويضات الناضجة الى النطف المتكيفة وبمعدل 5-10 بويضة \ 1 مل من وسط الاخصاب الحاوي على النطف المتكيفة وتم حضنها لمدة 17 ساعة من حاضنة CO_2 بدرجة حرارة 39 م وتم نقل البويضات المحضونة بعد انتهاء فترة الحضن الى محلول الـ PBS للتخلص من بقايا النطف المتعلقة بالبويضة [13] وتم فحص هذه البويضات تحت المجهر العاكس لملاحظة عملية استحداث الاخصاب الذي اعتمد على تكوين الجسم القطبي الثاني Secondary p.b وتكون طليعة النواة الذكرية والانثوية في هيولي البويضة [15] .
5. استحداث نمو وتطور البويضة المخصبة: تم تحضن البويضات المخصبة لمدة 24-28 ساعة بدرجة 39م في حاضنة CO2 في الوسط الذي استخدم لاستحداث الاخصاب ، وبعد انتهاء هذه المدة ، تم فحصها تحت المجهر العاكس لملاحظة درجة الانقسام والنمو الى خليتين او اربع خلايا [15] .

النتائج

- انضاج البويضات مختبرياً:

سجلت نتائج الدراسة الحالية وجود فرق معنوي مهم احصائياً ($P<0.01$) في درجة انضاج البويضات والتي امتازت بتكون الجسم القطبي الاول المسحوبة من الجريبات الصغيرة الحجم والجريبات الكبيرة الحجم حيث كانت نسبة الانضاج (50.68, 25.35) % على التوالي جدول (1) .

جدول (1): تأثير حجم الجريبة على درجة نمو وتطور البويضات

حجم الجريبة	عدد البويضات المحضونة	عدد البويضات المحضونة	
		العدد	%
صغيرة	47	12	25.53
كبيرة	73	37	50.68

اظهرت نتائج الدراسة عدم وجود فرق معنوي مهم احصائياً في نسبة لنضاج البويضات التي تميزت بتكون خلية التي حضنت على الوسط الزرعي النسجي 199 مزرعة الخلايا الحبيبية (44.18, 44.44) % على التوالي وكذلك اظهرت النتائج عدم وجود فرق معنوي في قابلية البويضات على الاخصاب (26.13, 28.12) % على التوالي جدول (2) .

- تكيف النطف مختبرياً:

اظهرت نتائج تكييف النطف باستخدام وسط البراكيت من حيث قابليتها على الاخصاب بأن حوالي 40% من البويضات الناضجة يتم اخصابها من قبل النطف المتكيفة بهذا الوسط .

انضاج البويضات مختبرياً واحداث الاخصاب الخارجي:

- عملية الاخصاب الخارجي:

بينت نتائج الدراسة ان نسبة البويضات المخصبة التي تم انقسامها الى مرحلة الخليتين والاربع خلايا التي تم انضاجها في الوسط الزرعي النسيجي 199 مزرعة الخلايا الحبيبية (44.44 ,40.00) % على التوالي جدول (2) .

جدول (2): نتائج طرائق انضاج البويضات مختبرياً واثرها على احداث الاخصاب الخارجي ونسبة نمو وتطور البويضة المخصبة الى مرحلة الخليتين والاربع خلايا

طريقة حضن البويضات	عدد البويضات المحضونة	البويضات الناضجة		البويضات المخصبة		البويضات التي تم انقسامها الى مرحلة الخليتين والاربع خلايا	
		العدد	%	العدد	%	العدد	%
الوسط الزرعي النسيجي – 199	72	32	44.44	9	28.12	4	44.44
مزرعة الخلايا الحبيبية	43	19	44.18	5	26.31	2	40.00

المناقشة

بينت نتائج الدراسة ان اعلى نسبة للبويضات التي تم سحبها من عينات المجازر كانت من الجريبات كبيرة الحجم 86.85%، في حين بلغت 62.22% من الجريبات صغيرة الحجم ان هذا الارتفاع في نسبة البويضات المسحوبة من الجريبات كبيرة الحجم قد يعود الى سهولة السحب من هذه الجريبات نتيجة لكبر حجمها واحتوائها على كميات كبيرة من السائل الجريبي .

أشارت نتائج الدراسة ان اعلى نسبة للبويضات المحاطة بخلايا الركمة المبيضية كانت من الجريبات كبيرة الحجم 84.7%، في حين بلغت 41.8% من الجريبات صغيرة الحجم وقد يُعزى السبب الى كبر حجم هذه الجريبات وقوة اتصال خلايا الركمة المبيضية في البويضات الموجودة داخل الجريبات كبيرة الحجم .

بينت نتائج الدراسة الحالية ان اعلى نسبة للبويضات التي تحقق انضاجها مختبرياً كانت للبويضات التي تم سحبها من الجريبات كبيرة الحجم الموجودة على المبايض التي تم جمعها من عينـات المجازر ان هذه النتيجة تتفق مع ما توصلت إليه العديد من الدراسات [16] في الخنازير ، [17,3] في المعز ، في حين كانت نتائج بعض الدراسات [18] في الابقار [19] في الاغنام ، والتي تشير الى عدم وجود فرق معنوي في نسبة انضاج البويضات المأخوذة من الجريبات كبيرة الحجم والجريبات صغيرة الحجم وهذا يختلف عن ماتوصلت إليه الدراسة الحالية ، وربما يُعزى سبب هذا الاختلاف الى وجود علاقة موجبة بين حجم الجريبة ودرجة نضوج البويضات التي تحتويها ، مما يساعد على سرعة نضوج البويضات التي تم جمعها من الجريبات كبيرة الحجم مقارنة مع البويضات التي تم جمعها من الجريبات صغيرة الحجم كما ان سرعة نضوج البويضات التي تم سحبها من الجريبات مختلفة الحجم يمكن ان تتأثر بالعديد من العوامل مثل التغذية وعمر الحيوان ومرحلة الشبق التي يتم فيها ذبح الحيوان .

أوضحت نتائج الدراسة الحالية عدم وجود فرق معنوي مهم احصائياً في عملية انضاج البويضات مختبرياً بين استخدام التقنيتين (الوسط الزرعي النسيجي 199 ومزرعة الخلايا الحبيبـة) ان هـذه النتيجـة مطابقة لنتائج العديـد من الدراســات التي استخدمت هاتيــن التقنيتين فــي إنضاج بويضات اناث المعــز والحيوانات الاخرى مختبرياً [13,3] .

بينت نتائج الدراسة ان نسبة البويضات التي تم إنضاجها مختبرياً للتقنيتين (41.47 و39.28) % على التوالي ، ان هذه النسبة اقل من النسب التي سجلتها بعض الدراسات في المعز [13,3] ان هذا الاختلاف ربما يعزى الى نوعية الاضافات مثل الهرمونات المضافة الى الوسط الزرعي المستخدم لانضاج البويضات مختبرياً كما ان طول المدة الزمنية التي تحتاجها لنقل العينات من المجازر الى المختبر ربما تؤثر على حيوية البويضات[3] او ربما يعود السبب الى مرحلة الشبق والموسم الذي تم ذبح انثى المعز فيه او الى سلالة المعز وعمرها .

بينت نتائج الدراسة الحالية ان نسبة الاخصاب الخارجي التي تم تحقيقها عند استخدام الوسط الزرعي النسيجي-199 مزرعة الخلايا الحبيبية بلغت(28.12 و26.31) % على التوالي ، ان هذه النسبة اقل من النسب التي حققتها بعض الدراسات في المعز [11,13] ان هذا الاختلاف في نسب الاخصاب الخارجي ربما يُعزى الى مكونات الوسط الزرعي المستخدم في عملية الاخصاب الخارجي .

بينت نتائج الدراسة ان عدد البويضات المخصبة التي تم انقسامها الى مرحلة الخليتين والاربع كانت (44.44 و40.00) %على التوالي للتقنيتين ان هذه النتيجة مقاربة لما حققه [19] في النعاج العراقية .

المصادر

1. Chemineau , P.; Baril , G. ; Leboeuf , B. ; Maurel , M. C. ; Roy , F. ; Pellicer – Rubio , M. ; Malpaux , B. and Cognie , Y. (1999). Implications of recent advance in reproductive physiology for reproductive management of goats. J. Reperd. Fert. Supp. 54:129-142.
2. Brackett, B. G.; Bousquet, D.; Boice, M. L.; Donawigk, W. J.; Evans, J. F. and Dressel, M. A.(1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. Biol. Report. 27: 147-158.
3. De Smedt, V. ; Crozet , N. ; Ahmed – Ali , M. ; Martino , A. and Cognie , Y. (1992). In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. Theriogenology. 37:1049-1060.

4. Fukui,Y. ; Glew , A. M. ; Gandolfi , F. and Moor , R. M. (1988). Ram – specific effects on in vitro fertilization and cleavage of sheep oocytesmatured in vitro. J. Reprod. Fert. 82:337-340.

5. First, N. L. and Parrish, J. J. (1987). In vitro fertilization of ruminants. J. Repord. Fert. (suppl.). 34:151-165.

6. Crozet, N.; De Smedt, V.; Ahmed- Ali, M. and Sevellec, C. (1993). Normal development following in vitro oocyte maturation and fertilization in the goat. Theriogenology. 39: 206. (Abst.) (Cited by Martino *et al*., 1994).

7. Newcomb, R. (1982). Egg recovery and transfer in cattle. In: Mammalian Egg Transfer . Adams , C.R. (ed.). CRC press, Boca Raton. PP:81-118. (Cited by First and Parrish, 1987).

8. Eyestone , W.H. and First, N.L. (1986). Astudy of the 8 to 16-cell developmental block in bovine embryos cultured in vitro. Theriogendogy. 25:152. (Abst.).

9. Branca, A.; Cappai, P.; Dattena, M.; Gallus, M.; Ledda, S.; Loi, P. and Naitana, S. (1990). Cervical vs intrauterine insemination of superovulated Sarda goat. I convencion de cabras lecheras Y. cametidos sudamericanos Universidad de bricham yong-escuela superior politecnica de chimborazo. Riobamba- Ecudor.

10. Bolton, V.N.; Oades, P.J. and Johnson , M.H. (1984). The relationship between cleavage , DNA 2-cell embryo. J. Embryol . Exp. Morph. 79: 139-163.

11. Cox, J. F.; Avila, J.; Saravia, f. and santa Maria, A. (1994). Assessment of fertilizing ability of goat spermatozoa by in vitro fertilization of cattle and sheep intact oocytes. Theriogenology. 41: 1621-1629.

12. Keskintepe, L.; Simplicio, A. A. and Brackett, B. G. (1998). Caprine blastocyst development after in vitro fertilization with spermatozoa frozen in different extenders. Theriogenology. 49: 1265-1274.

13. Martion, A; Mogas, T.; Palomo, M. J. and Paramio, M. T. (1994). In vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. Theriogenology, 41: 473-485.

14. Crozet, N.; De Smedt, V.; Theron, M. C.; Torres, S. and Serellec, C. (1987). In vitro fertilization with normal development in the sheep. Gamet Res. 16:159-170.(Cited by Martino *et al.* 1994).

15. Jainudeen, M. R.; Wahid, H. and Hafes, E. S. E. (2000). Ovulation induction, embryo production and transfer. In : Reproduction in Farm Animals. Hafez, E.S.E and Hafez, B. (eds.). 7^{th} Ed., Lippincott Williams and Wilkins, Awolter Kluwer Co., Philadelphia. PP: 405-430.

16. Motlik, J.; Crozet, N. and Fulka, J. (1984). Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. J. Reprod. Fert. 72: 323-328.

17. Crozet, N.; Ahmed-Ali, M. and Dubos, M. P. (1995). Development competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro J. Reprod. Fert. 103: 293-298. (Cited by Chemineau *et al*., 1996).

18. Leibfried, L. and First, N. L. (1979). Characterization of bovine follicular oocyte and their ability to mature in vitro. J. Anim. Sci. 48: 76-86.

19. العبيدي ، غسان حسين جعفر (1989) . الاخصاب الخارجي في الاغنام ، رسالة ماجستير – كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.