تأثير طريقة استحصال البيوض في نسبة الاستحصال ونسبة انضاج البويضات مختبريا لدى الأغنام العراقية

عبد الستار فرج مجيد* محمد مؤيد الجميلي** سعد محمد ندا***

الملخص

استخدمت طريقتان هما : السحب والتقطيع لاستحصال البويضات من مبايض الاغنام من عينات المجزرة. والغرض من اجراء البحث معرفة الطريقة المثلى لاستحصال البويضات وتاثيرها في نسبة انضاج البويضات في الاغنام.كانت نسبة الاستحصال عالية بطريقة التقطيع (84.60 ± 1.01) عند مقارنتها بطريقة السحب (67.60 ± 1.37) معنويا ($p<0.05$). لوحظ ان افضل طريقة للحصول على اعلى نسبة نضوج للبويضات في طريقة السحب (37.40 ± 0.09). لوحظ وجود فرق معنوي ($p<0.05$) بين الطريقتين.

وقد استنتج من البحث ان طريقة استحصال البويضات من مبايض الاغنام في المجزرة يؤثر في نسبة الاستحصال ونسبة انضاج البويضات مختبريا.

المقدمة

تعد عملية جمع البيوض **collection of ova** من جريبات مبايض النعاج بعد ذبحها وفي أطوار مختلفة من دورة الشبق من اهم خطوات اجراء الاخصاب الخارجي **Invitro Fertility** (**IVF**) **Al-Aubaidi** (**1**).

استخدم الباحثون العديد من الطرائق لجمع البويضات من المبايض. وأكثر الطرائق شيوعا هي الحصول على بويضات ناضجة من امهات محفزة بالهرمونات المحررة لمحفزات القند (**GnRH**) **Shipley** وجماعته (**10**)، في حين بين اخرون ان البيوض المستحصلة من حيوانات معاملة هرمونيا اقل نضجا من تلك التي لم تعامل حسب دراسة **Guilbault** وجماعته (**4**) وقد تم استحصال البيوض عن طريق السحب بمحقنة نبيذه قياس **18** وحسب دراسات **Guilbault** وجماعته (**4**), **Chang** وجماعته (**3**), **Al-Aubaidi** (**1**) او بالمضخة بمحقنة قياس **18** (**11**) او عن طريق التقطيع النسيجي للمبيض **Slicing** (**5**) او بالطريقة الجراحية **Lapratomy** (**2**) او عن طريق الناظور البطني **Laparoscopy** حسب ما أشار إليه **Noakes** وجماعته (**8**) ولغرض معرفة تاثير طريقة استحصال البيوض عن طريق السحب بالمحقنة والاستحصال عن طريق التقطيع النسيجي للمبيض في نسبة انضاج البويضات مختبريا صمم هذا البحث.

المواد وطرائق البحث

أجريت الدراسة على (**720**) جهازا تناسليا للنعاج البالغة والفطائم المذبوحة في مجزرة الرمادي. تم استخدام **1440** مبيضا وباطوار مختلفة من دورة الشبق وتم نقل النماذج بحاوية مبرده بالمختبر. تم استحصال البويضات من المبايض بطريقتين:

أ- طريقة السحب **(Aspiration Method)** صنفت جريبات المبايض طبقا لما ذكره **Change** وجماعته (**3**) الى مجموعتين: كبيرة الحجم وتمتاز بقطر اكبر من **2.5** ملم ؛ صغيرة الحجم ذات القطر اقل من **2** ملم.

جزء من رسالة ماجستير للباحث الثاني

* كلية الطب البيطري – جامعة الانبار – الانبار ، العراق.

** كلية الزراعة – جامعة الانبار – الانبار ، العراق

*** وزارة العلوم والتكنولوجيا – بغداد، العراق.

بعدها استحصلت البويضات بسحب السائل الجريبي بمحقنة نبيذه قياس 18 والحقنة ذات سعة 5مل تحتوي على 2مل من محلول غسل البويضات بوسط (TALP) محلول (Tyrode Albumin Lactate Phoshate) مضافا له الهيبارين لمنع حدوث تخثر السائل الجريبي ومصل دم النعاج كمصدر بروتيني وBSA والمضادات الحياتية.

بعد سحب السائل الجريبي وتم فحصة تحت المجهر في طبق بتري معقم لمشاهدة البويضات, تشطف البويضات ثلاث مرات بمحلول غسل البويضات في اطباق بتري وبدرجة حرارة 39 م°.

ثم نقلت البويضات بماصة باستور من طبق الى اخر حاوي على محلول غسل جديد وبعد الغسل نقلت البويضات الى وسط الانضاج.

ب- طريقة التقطيع (Slicing Method)

تتلخص هذه الطريقة بتقطيع المبيض باستعمال المشرط الطبي بعد وضعه في طبق بتري معقم يحتوي على 3 مل من محلو جمع وغسل البويضات قبل الانضاج , ثم ترك المبيض المتقطع (النسيج المبيضي) في طبق لمده 5 – 10 دقائق لجعل البويضات تستقر في قعر الطبق. بعد انتهاء المده تم رفع النسيج المبيضي من المحلول وغسله بمحلول جديد لاحتمال التصاق البويضات به ثم جرى فحص محتويات الطبق تحت المجهر لمشاهده البويضات.

غسلت البويضات بمحلول الغسل (TALP) وبدرجة حرارة 39 م° لثلاث مرات بواسطة نقلها من طبق الى طبق اخر جديد يحوي محلول غسل جديد باستخدام ماصة باستور بعد ذلك نقلت البويضات الى اوساط انضاج البيوض مختبريا حيث نقلت البيوض الى اوساط زرعية للانضاج TALP و199 - TCM و DPBS فوضعت البويضات في طبق بتري معقمة تحتوي على 2 مل من الوسط الزراعي بمعدل 6 – 10 بويضات لكل طبق .

وضعت أغطية أطباق بتري عليها ثم حضنت في حاضنة تجهز 5% CO2 39 م° درجة حرارة, 90% رطوبة لمدة 24 – 26 ساعة.

بعد انتهاء مده الحضن فحصت البويضات تحت المجهر الضوئي لمشاهدة درجة النضج علامته الرئيسة وجود الجسم القطبي الاول First Polar مع ملاحظة تمدد ملحوظ للخلايا الركامية المحيطة بالبويضة وتحول لونها من الشكل المعتم الى البراق.

حللت النتائج احصائيا باستخدام برنامج Spaa لتحيل الصفات المدروسة واستخدام التحلل العشوائي الكامل CRD لمقارنة الفروق المعنوية بين المتوسطات (7).

النتائج والمناقشة

اظهرت النتائج جدول (1) تفوق طريقة التقطيع Slicing على طريقة السحب Aspiration وبفرق عالي المعنوية ($p<0.05$) في نسبة استحصال البويضات, حيث بلغ عدد البويضات المستحصلة بطريقة التقطيع 1388 بويضة من اصل 1635 جريب (بمعدل 84% بويضة مستحصلة) في حين كانت 1268 بويض من اصل 1924 جريب (بمعدل 66 % بويضة مستحصلة) بطريقة السحب. ويعزى ذلك الى السماح لعدد اكبر من البويضات لتحرر من المبيض في حاله تقطيعه مقارنة بسحب السائل الجريبي الذي قد يسمح لعدد من البويضات بالبقاء داخل الجريب (خاصة الجريبات الصغيرة) دون امكانية سحبها من السائل الجريبي واتفقت النتائج معHamano و Kuwayama و Tervit (11).

اما نسبة إنضاج البويضات فقد تفوقت طريقة السحب معنويا ($p<0.05$) على طريقة التقطيع حيث تم انضاج 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 اصل **1388** بويضة مستحصلة (بمعدل **39%** بويضة ناضجة) كما موضحة في جدول (**1**).

وقد اختلفت النتائج مع ما ذكره **Hamano** و**Kuwayama** (**6**) حيث اشار الى ان طريقة التقطيع ارتفعت معنويا في نسبة الانضاج على طريقة السحب وان طريقة التقطيع تعطي بويضات في الابقار ذات نوعية جيده تمتلك **3 – 5** طبقات من الخلايا الركامية (**12**). وقد يعزي سبب الاختلاف الى نوع الحيوان . وعليه فان استخدام طريقة السحب افضل من طريقة التقطيع في الدراسة الحالية لانها رفعت نسبة انضاج البويضات مختبريا.

وقد استنتج من الددراسة ان لطريقة استحصال البويضات من المبايض في عينات المجزرة تاثيرا في نسبة الاستحصال ونسبة انضاج البويضات.

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

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

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

المصادر

1- **Al–Aubaidi, G. H. G. (1989). In vitro fertilization in sheep. M.Sc Thesis, Coll. Vet. Med., Univ. Baghdad.**

2- **Carolan, C.; P. Monaghan; M. Gallagher and I. Gordon (1994). Effect of Maturation, fertilization and culture in vitro. Theriogenology, 41:1061 – 1068.**

3- **Chang, W. T. K.; R. M. Moor and C. Polge (1986). In vitro fertilization of pig And sheep oocytes matured in vivo and in vitro. Theriogenology. 25:146.**

4- **Guilbault, L. A.; F. Pothier; H. Twagiramungu and M. A. Sirard (1998). New technologies to improve the reproductive efficiency of dairy cattle. Can. J. Anim. Sci.,78 (Suppl.):113 – 129.**

5- **Hafez, B. and E. S. E. Hafez (2000). Reproduction in farm Animals. 7th Ed. Lippincott Williams and Wilkins, A Wolter Kluwer Co. Philadelhia, U. S. A.**

6- **Hamano, S. and M. Kuwayama (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.**

7- **Lambert, R.; M. Sirard; C. Bernard and R. Beland (1986). In vitro fertilization Bovine oocyte matured in vitro and collected by laparoscopy. Theriogenology, 25:117 – 133.**

8- **Noakes, D. E.; T. J. Parkinson and G. C. W. England (2003). Arthur's Veterinary reproduction and obstetrics, 8th Ed., Saunders Co.**

9- **Paul, R.; C. Kinnar and D. Colin (1994). Gray, spss for windows made simply Lawrence Erlbaum Associates.**

10- **Shipley, C. F. B.; B. C. Buckrell; M. J. A. Mylne; J. Pollard and J. R. Hunton (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 and Elsever Inc., 629 - 640.**

11- **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.**

12- Wani, N. A.; G. M. Wani; M. Z. Khan and S. Salahudin (2000). Effect of Oocyte harvesting techniques on in vitro maturation and *in vitro* fertilization in Sheep. Small Rumin. Res., 36:63 – 67.

EFFECT OF OOCYTE HARVESTING METHOD ON THE RECOVERY AND IN VITRO MATURATION IN SHEEP

A. F. Majeed* M. M. Al - Jumaily S. M. Nada*****

ABSTRACT

Two different methods were used for harvesting the oocytes of ovine ovaries. The aim was to determined an efficient method for oocyte harvesting and its effect on subsequent in vitro maturation. The average percentage of oocytes recovered was significantly ($p<0.05$) higher by slicing (84.60 ± 1.01) than by aspiration method (67.60 ± 1.37). While 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 two methods.

It was concluded from this study that the method of harvesting oocytes from ovaries in slaughter house affect the recovery and the maturation of the oocyte in sheep.

Part of M. Sc. Thesis of the second author.

*** College of Vet. Medicine - Univ. Al – Anbar- Al – Anbar, Iraq**

**** Collage of Agric. - Univ. Al – Anbar- Al – Anbar, Iraq.**

***** Ministry of Sci. and Tec.- Baghdad, Iraq.**