Efficacy of Different Oocytes Harvesting Methods on Retrieval and Quality of Oocyte from Ovaries of Local Cows

Hashm M. AL.Rubaei[a] **Hyder M. Abd Ali**[b]

[a,b]*Al-Musaib Technical College , Al –Furat Al- Awst Technical University, 51009*

Babylon , Iraq

Drhashem48@yahoo.com

Submission date:- 3/6/2018 Acceptance date:- 23/7/2018 Publication date:- 11/12/2018

Keywords: cows, oocyte, slicing , puncture, aspiration of follicle.

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of different oocytes harvesting methods on retrieval and quality of oocyte from ovarian of local cows. The ovaries (n = 600) were collected from 300 non-pregnant cows their ages ranged between (3-10 years old), slaughtered at abattoir of Babylon province during the period between September 2017 to March 2018 . The oocytes were collected by slicing method , punture method and aspiration of follicle method and classified according to layers of cumulus cells and the homogenous of cytoplasm into three groups , first group : good quality oocytes with more than 3 layers of cumulus cells and homogenous of cytoplasm, second group : fair quality oocytes with less than 3 layers of cumulus cells and homogeneous of cytoplasm , third group : poor quality oocytes , denuded oocyte from cumulus cells with heterogeneous cytoplasm . The results showed that the total number of oocytes recovered and the number of oocytes recovered per ovary were significantly higher ($P<0.05$) by using slicing method (1639 and 8.195 ± 1.03 respectively) compared with the Puncture (923 and 4.610 ± 0.86 respectively) and aspiration of follicle method (776 and 3.880 ± 0.34 respectively). The results of study also indicated that the total number of oocytes recovered , the average number of oocyte per ovary and the percentage of good recovered by slicing method (751,3.750 ± 0.95 and 45.90 % respectively) and puncture technique (399,1.99 ± 0.03 and 43.30 % respectively) were significantly higher ($P<0.05$) compared with aspiration of follicle (299 , 1.14 ± 0.01 and 29.60 % respectively). We conclude from this study that slicing method is the appropriate and good method for oocyte recovering with ideal morphological aspect and quality.

تأثير مختلف الطرائق لجمع البويضات في استحصال ونوعية البويضة من مبايض الابقار المحلية

حيدر مالك عبد علي هاشم مهدي الربيعي

الكلية التقنية،المسيب, جامعة الفرات الاوسط التقنية – 51009 بابل , العراق

Drhashem48@yahoo.com

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية لبحث تأثير ثلاث طرائق لجمع البويضات في إستحصال ونوعية البويضة من مبايض الابقار المحلية .جُمع 600 مبيض من 300 بقرة بعمر3 – 10 سنوات غير حامل ذُبحت في مجازر محافظة بابل للمدة من أيلول 2017 لغاية أذار 2018. جُمعت البويضات بوساطة طريقة تشريح المبيض (Slicing) وطريقة ثقب المبيض (Puncture) وطريقة سحب الجريبة (Aspiriation of follicle) , وقُسمت طبقاً لعدد طبقات

Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBAS) by University of Babylon is licened under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. 2018.

الخلايا الركمية المبيضية (Cumulus cells) وتجانس الهيولي (Cytoplasm) على ثلاثة مجاميع, الاولى: بويضات جيدة محاطة بأكثر من ثلاث طبقات من الخلايا الركمية المبيضية وتجانس الهيولي, والثانية: بويضات متوسطة محاطة بأقل من ثلاث طبقات من الخلايا الركمية المبيضية وتجانس الهيولي , والثالثة : بويضات رديئة خالية من الخلايا الركمية المبيضية مع عدم تجانس الهيولي . بيّنت النتائج أرتفاعاً معنوياً ($P<0.05$) للعدد الكلي للبويضات المستحصلة ومعدل عدد البويضات لكل المبيض بأستعمال طريقة تشريح المبيض وبلغت 1639 و 8.195 ± 1.03 بالتتابع مقارنة مع طريقة ثقب المبيض وبلغت 923 و 4.610 ± 0.86 بالتتابع وطريقة سحب الجريبة وبلغت 776 و3.880 ± 0.34 بالتتابع. أشارت نتائج الدراسة ايضاً أرتفاعاً معنوياً ($P<0.05$) للعدد الكلي للبويضات ومعدل عدد البويضات لكل مبيض ونسبة البويضات الجيدة المستحصلة بطريقة تشريح المبيض وبلغت 751 و 3.750 ± 0.95 و 45.90 % بالتتابع, والمستحصلة بطريقة ثقب المبيض وبلغت 399 و 1.99 ± 0.03 و 43.30 % بالتتابع , مقارنة مع طريقة سحب الجريبة وبلغت 299 و 1.14 ± 0.01 و 29.60 % بالتتابع. يستنتج من هذه الدراسة أن طريقة تشريح المبيض هي الطريقة المناسبة والجيدة لأستحصال البويضات وبأعداد كثيرة وذات شكل ونوعية جيدة.

الكلمات الدالة: الابقار, البويضة, تشريح المبيض, ثقب المبيض, سحب الجريبة.

١- المقدمة:

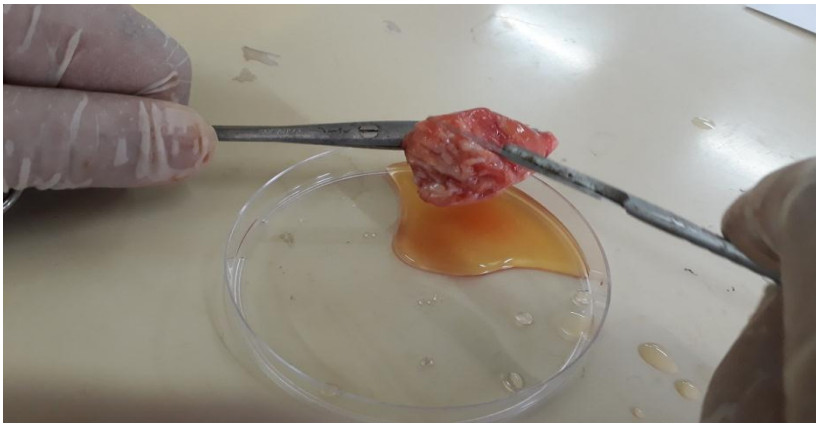
تغادر بأستمرار نسبة قليلة من الجريبات الأولية الموجودة في المبيض عند الولادة , مرحلة السكون (Resting stage) وتبدأ بالنمو , وان نسبة ضئيلة من هذه البويضات تنضج وتتحرر للاخصاب , لذا فان اغلب الجريبات مصيرها الرتق (Atresia) والموت المبرمج [١] , تنتج البقرة عادةً بويضة واحدة خلال فترة الاباضة [٢]. تشكل المبايض من المجازر مصدراً اقتصادياً للبويضات الاولية وانتاج الاجنة على نطاق واسع واقتصادي[٣]. تُعد مبايض المجازر المصدر الارخص والاوفر للحصول على البويضات الاولية للتذيات والتي تستعمل في الابحاث الفسلجية والتقنيات الاحيائية والتقنيات التناسلية [٤] . أُدخلت تقنيات مختبرية حديثة لجمع البويضات من مبايض المجازر والتي تتضمن طريقة تشريح المبيض (Silcing) وطريقة ثقب المبيض (Puncture) وطريقة سحب الجريبة (Aspiration of follicle) اذ يمكن بوساطتها الحصول على البويضات بنوعية جيدة واعداد كثيرة [٥] . ان الهدف من طرائق جمع البويضات هو زيادة عدد البويضات المستحصلة [٦]. يستند التصنيف الحالي للبويضات على شكل وعدد طبقات الخلايا الركمية المبيضية وعلى المظهر الخارجي للهيولي [٧] , وان وجود الخلايا الركمية المبيضية التي تحيط بالبويضة وتجانس الهيولي من الصفات الشكلية الاكثر شيوعاً واستعمالاً في انضاج البويضات خارج الجسم وتطور الاجنة [٨], اذ ان للخلايا الركمية المبيضية الدور الفعال في تغذية وانضاج وتقويم البويضات [٩] , ويمكن تقويم البويضات بالاعتماد على نوعيتها وتدرجها بالاعتماد على تعدد طبقات الخلايا الركمية المبيضية وتجانس السايتوبلازم بناءً على ذلك , هدفت الدراسة الحالية لتقويم تأثير ثلاث طرائق مختلفة لجمع البويضات في استحصال ونوعية البويضة واختيار التقنية التي تعطي بويضات ذات شكل ونوعية جيدة وبأقل التكاليف.

٢- المواد وطرائق العمل:

٢.١ حيوانات التجربة:

أنجزت الدراسة في مختبرات قسم تقنيات الانتاج الحيواني في الكلية التقنية / المسيب للمدة من ايلول 2017 لغاية آذار2018 أزيل الجهاز التناسلي الانثوي من 300 بقرة محلية (600 مبيض) غير حامل والتي ذُبحت في مجازر محافظة بابل وفُحصت عيانياً وكانت طبيعية وخالية من التشوهات الخلقية , ووضعت في حقيبة بلاستيكية تحتوي على المحلول الملحي الفسلجي الطبيعي بتركيز 0.9 % وبدرجة حرارة بين 35-37 مئوية [٤]. ونُقلت الى المختبر بساعتين. أُزيلت المبايض بوساطة مقص وملقط معقم ونُظفت من الانسجة العالقة والأربطة وغُسلت بمحلول الملح الفسلجي الطبيعي لأزالة الدم وحطام الانسجة العالقة ثلاث مرات بدرجة حرارة 37 مئوية. قُسمت المبايض عشوائياً على ثلاث مجاميع متساوية حسب طريقة جمع البويضات (200 مبيض لكل طريقة), وعُومل كل مبيض لوحده . جُمعت البويضات بوساطة الطرائق التالية [١٠]:

A- طريقة تشريح المبيض (Slicing): وضع المبيض في صحن بتري (Petridish) معقم ذات قطر 90 ملم ويحتوي على 5 ملليلتر من وسط محلول دارئ الفوسفات (Phosphate Buffer Sline-England) مع الهيبارين (Heparin-Denmark) وبنسبة 25 وحدة دولية/ ملليلتر لمنع تجلط السائل الجريبي (Follicle Fluid) مُسكت قاعدة المبيض بوساطة الملقط وقطع وشُرح كل سطح المبيض وبعمق 2-3 ملم بإستعمال شفرة جراحية معقمة (Scalpal Juccuya) (صورة١) .



B – طريقة ثقب المبيض (Puncture): وضع المبيض في صحن بتري ذات قطر 90 ملم ويحتوي على محلول دارئ الفوسفات مع الهيبارين, مسكت قاعدة المبيض المغمورة بالوسط بوساطة الملقط وثقب كل سطح المبيض بأبرة معقمة نبيذة ذات قياس 18 .(صورة ٢)

صورة (٢) طريقة ثقب المبيض

C – طريقة سحب الجريبة (Aspiration of follicle): سُحب السائل الجريبي من الجريبات المرئية على سطح المبيض ذات قطر 2–8 ملم بوساطة ابرة ذات قياس٢٠ (G20) مرتبطة بمحقنة بلاستيكية نبيذة ذات حجم 2 و5 مليليتر تحتوي محلول دارئ الفوسفات مع الهيبارين, وضع الوسط والمحتويات في صحن بتري ذات قطر 35 ملم (صورة ٣).

صورة (٣) طريقة سحب الجريبة

ترك صحن بتري في جميع العينات لمدة 5 دقائق للسماح للبويضات بالترسيب والأستقرار في القاع , وفُحصت البويضات تحت المجهر العاكس (Inverted) في القاع وسجل عدد البويضات, ودُرجت (Graded) طبقاً لعدد طبقات الخلايا الركمية مع تجانس الهيولي الى ثلاث مجاميع [4].

١- بويضات جيدة (Good Oocytes): البويضة محاطة بأكثر من ثلاث طبقات من الخلايا الركمية المبيضية مع تجانس الهيولي.

٢- بويضات متوسطة (Fair Oocytes): البويضة محاطة بأقل من ثلاث طبقات من الخلايا الركمية المبيضية مع تجانس الهيولي.

٣- بويضات رديئة (Poor Oocytes): البويضة عارية من الخلايا الركمية المبيضية مع عدم تجانس الهيولي وصورت البويضات مع الركمة المبيضية بوساطة كامرة (Sawyer microscope company) مرتبطة بالحاسوب.

٣- التحليل الإحصائي:

استعمل البرنامج الإحصائي SAS (Statistical Analysis System) [11] في تحليل البيانات لدراسة تأثير الطرائق المختلفة (طريقة) في الصفات المدروسة وفق تصميم عشوائي كامل (CRD)، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار Duncan [12] متعدد الحدود وأستعمل أختبار مربع كاي لمقارنة الفروق المعنوية بين النسب المئوية.

٤- النتائج والمناقشة

يتبين من نتائج الجدول 1 ارتفاعاً معنوياً ($P<0.05$) لطريقة تشريح المبيض في عدد البويضات المستحصلة (1639) ومعدل عدد البويضات لكل مبيض (8.195 ± 1.01) وبنسبة (49.10 %) على طريقة ثقب المبيض والتي بلغت 924 و 4.620 ± 0.70 و 27,68 % بالتتابع وطريقة سحب الجريبة وبلغت 775 و 3.875 ± 0.24 و23.21 بالتتابع . ان تفوق طريقة تشريح المبيض في مجموع ومعدل عدد البويضات لكل مبيض ربما بسبب تشريح كل سطح المبيض وشمول الجريبات الصغيرة والمتوسطة قبل ان تتمدد خلاياالركمة المبيضية [١٣]. أن أرتفاع عدد البويضات الناتج من طريقة تشريح المبيض أو ربما يعود السبب إلى تحرير البويضات من كل سطح الجريبة ومن عمق قشرة المبيض وأن الضغط العالي الزائد في مسك المبيض ربما يحرر البويضات من هذه الجريبات [١٤]. أن طريقة سحب الجريبة تشمل الجريبات الكبيرة تاركة الجريبات الصغيرة مطمورة وغير ممكن الحصول عليها, ربما هو سبب قلة أنتاج البويضات في هذه الطريقة [١٥] اتفقت نتائج هذه الدراسة مع ما جاء به [16] و [15], الذين بينوا تفوق طريقة تشريح المبيض تليها طريقة ثقب المبيض واخيراً طريقة سحب الجريبة في مجموع وعدد البويضات لكل مبيض , واختلفت نتائج الدراسة مع [١٧] اذ وجدوا ارتفاع معنوي لطريقة سحب الجريبة في استحصال العدد الأكبر من البويضات وانتاج النوعية الجيدة من البويضات, وكذلك اختلفت مع [18] اذ

لاحظوا ان البويضات المستحصلة بطريقة سحب الجريبة كانت اكثر من المستحصلة بطريقة تشريح المبيض, ومع [١٩] اذ بينوا ان طريقة سحب الجريبة يسمح لانتخاب اشكال مختلفة لأنتاج نوعية جيدة من البويضات من الجريبات المرئية .

جدول.(١) تأثير ثلاث طرائق لأستحصال البويضات في عدد البويضات ومعدل أنتاج البويضات لكل مبيض في الأبقار المحلية (المعدل ± الخطأ القياسي)

ت	طرائق الجمع	عدد المبايض	عدد البويضات المستحصلة	معدل عدد البويضات لكل مبيض	النسبة المئوية %
1	تشريح المبيض Slicing	200	1639	1.01± 8.195	49.11
2	ثقب المبيض Puncture	200	924	0.70 ± 4.620	27.68
3	سحب الجريبة Aspiration	200	775	0.20 ± 3.875	23.21
4	المجموع Total	600	3338	0.01± 5.563	100

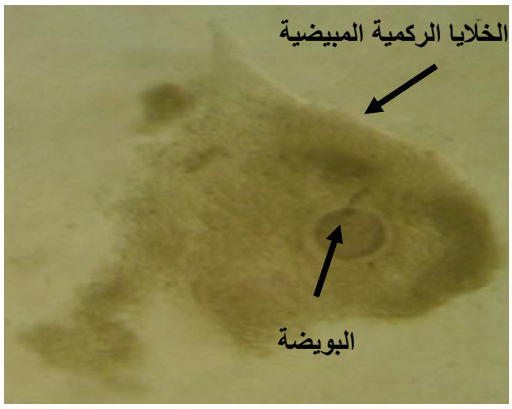
يتوضح من نتائج الجدول 2 ارتفاعاً معنوياً ($P<0.05$) لطريقة تشريح المبيض في العدد الكلي للبويضات الجيدة (948 بويضة) (صورة4), ومعدل عدد البويضات الجيدة لكل مبيض (4.745± 1.03) , ونسبة البويضات الجيدة (57.48 %) مقارنة مع طريقة ثقب المبيض وسحب الجريبة (جدول2) , كما أشارت نتائج الجدول (2) ارتفاعاً معنوياً ($P<0.05$) لعدد ومعدل عدد البويضات لكل مبيض ونسبة البويضات المتوسطة (صورة 5) المستحصلة بطريقة تشريح المبيض على المستحصلة بطريقة ثقب المبيض وطريقة سحب الجريبة , وبينت النتائج ايضاً تفوقاً معنوياً ($P < 0.05$) لعدد ومعدل البويضات لكل مبيض ونسب البويضات الرديئة (صورة 6) بطريقة سحب الجريبة مقارنة مع طريقتي تشريح وثقب المبيض ان انتاج البويضات الجيدة والمتوسطة بطريقة تشريح المبيض ربما بسبب تحرير البويضات بأعداد كثيرة من الجريبات السطحية وكذلك الجريبات الموجودة في قشرة المبيض [٤] في حين طريقة سحب الجريبة يمكن الحصول على البويضات من الجريبات السطحية الواضحة والتي يمكن ان تكون فيها الخلايا الركمية المبيضية ملتصقة بقوة مع طبقات الخلايا الحبيبية (Granulosa cells) [٢٠] , ان الاختلاف في نوعية البويضات ربما بسبب عدة عوامل مؤثرة مثل الموسم و السلالة والعمر والاختلافات التكاثرية للحيوان [١٥] , والحالة الغذائية والحجم والحالة الوظيفية للجريبات [٢١] أتفقت نتائج هذه الدراسة مع [٢٢] و [٤] و [٢٣] وأختلفت نتائج هذه الدراسة مع [٢٤] اذ لاحظوا ان طريقة سحب الجريبة مفيدة بسبب انتاجها بويضات كاملة وغير موسعة الخلايا الركمية المبيضية من الجريبات المرئية ذات قطر 2–8 ملم مع نسبة عالية من تدرج البويضات الجيدة ونسبة قليلة من حطام الانسجة وتحتاج لعدد قليل من مرات الغسل .

جدول (٢) تأثير طرائق الجمع في تدرج ونوعية ونسب البويضات (المعدل ± الخطأ القياسي)

الطرائق	عدد المبايض	تدرج واعداد ونسب البويضات المستحصلة					
		جيدة	%	متوسطة	%	رديئة	%
تشريح المبيض	200	1.03 ±4.745 A(948)	57.48	0.08±1.985 A(397)	24.22	0.03±1.47 B(294)	17.93
ثقب المبيض	200	0.03±2.52 B(504)	54.54	0.04±1.395 B(279)	30.19	a 0.03±0.705 B(141)	15.25
سحب الجريبة	200	0.01±1.68 C(336)	43.35	0.02±1.38 B(276)	35.11	0.01±0.815 A(163)	21.03

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة تختلف معنوياً ($P<0.05$)

صورة (٤) بويضة محاطة بأكثر من ثلاث طبقات من الخلايا الركمية المبيضية



صورة (٥) بويضة محاطة بأقل من ثلاث طبقات من الخلايا الركمية المبيضية

صورة (٦) بويضة خالية من الخلايا الركمية المبيضية

نستنتج من هذه الدراسة ان طريقة تشريح المبيض الطريقة المناسبة للحصول على اعداد كثيرة من البويضات وذات شكل ونوعية جيدة.

CONFLICT OF INTERESTS

There are no conflicts of interest.

المصادر

[1] **Gardner, D. K.; Michelle, L. and Andrew, J.W.** A laboratory Guide to The Mammalian Embryo. New York: Oxford University press. 2004.

[2] **Hafez, E.S.E.** Hormones, growth factors and reproduction. Reproduction in farm animals., Lea and Febiger, USA, p. 26. 1993.

[3] **Sianturi, R. G.; Thein, M.; Wahed, H. and Rosnina, Y.** Effect of collection technique on yield of bovine oocytes and the development potential of oocytes from different grades of oocytes. JITV., 7(3):188-193. 2002.

[4] **Wang, Z.; Song-dong, Y. u. and Zi-rong, X..** Effects of collection methods on recovery efficiency, maturation rate and subsequent embryonic developmental competence of Oocytes in Holstein cow., Asian Aust J. Anim Sci., 20(4):496-500. 2007

[5] **Bohlooli, B. S. and Cedden, F..** Effect of Different Harvesting Techniques on the Recovery and Quality of Bovine Cumulus Oocyte Complexes. Iranian J Applied Anim Sci., 5: 741–74. 2015.

[6] **Nowshari, M. A.** The effect of harvesting technique on efficiency of oocyte collection and different maturation media on the nuclear maturation of oocytes in camels (Camelus dromedarius). Theriogenol., 63:2471-2481. 2005.

[7] **Tetzner, T. A. D.; Saraiva, N. Z. S.; Perecin, F.; Niciura, S.C.M.; Ferreira, C. R.; Oliveira, C. S. and Garcia, J.M..** The effects of ovalbumin as a protein source during the in vitro pro-duction of bovine embryos. R. Brasilian Zootech.. 40: 2135-2141. 2011.

[8] **Gordon, I.** Laboratory production of cattle embryos. CAB International, Wallingford, UK. 2003.

[9] **Shabankareh, H.K.; Sarsaifi, K. and Mehrannia, T..** In vitro maturation of ovine oocytes using different maturation media: effect of human menopausal serum., J. Assist. Reprod. Genet., 28: 531-537. 2011.

[10] **Alves, B. G.; Alves, K. A.; Lucio, A. C.; Martins, M. C. and Silvas,T. H.** Ovarian activity and oocyte quality associated with the biochemical profil of serum and follicular fluid from girolando dairy cows postpartum., Anim Reprod Sci., 146: 89–236. 2014 **.**

[11] **SAS.** Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA. 2012.

[12] **Duncan, D.B.** Multiple Rang and Multiple F-test. Biometrics.,11:1-42. **1955.**

[13] **Das, S. K. and Santra, A.** Comparative the efficiency of different oocyte recovery methods from cattle ovaries., Indian J. Anim. Sci., 78: 277-278 . 2008.

[14] **Carolan, C. P.; Monaghan, A. Mehmood, P.; Lonergan, M.; Gallagher and Gordon, I.** Slicing of bovine ovaries as a means of oocyte recovery., J. Reprod. Fertil., 9(51):51-63. 1992.

[15] **Rehman, M. G. M.; Goswarni, P. C.; Yahia, K.; Tareq, M. A. M. and Ali, S. Z**Collection of bovine cumulus-oocyte-complex (COCs) front slaughterhouse ovaries in Fhattgladesh. Pakistan J. Biology Set., 6(24):2054-2057. . 2003.

[16] **Merton, J. S., de Roos,A. P., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P.L. and Dieleman, S.J.** Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry., Theriogenolog., 59(2):651-67. 2003.

[17] **Hamed, K. S.; Mohammad, H. S.; Hadi, H. and Gholamali, M.** In vitro developmental competence of bovine oocytes: Effect of corpus luteum and follicle size., Iratt J Reprod Med., l3(10) :615-622. 20l5.

[18] **Izquierdo, D.; Villamediana, P.; Lopez Bejar, M. and Paramio, M.T.** Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM–IVF oocytes., Theriogenology.,57:1431-1441. 2002.

[19] **Kouamo, J.; Nono Fambo, S. M. and Zoli, A. P.** Effect of the Stage of Sexual Cycle, Harvesting Technique and Season on Follicular Dynamics and Oocyte Quality of Zebu Cattle under Sudano-Sahelian Climate., Integr J Vet Biosci, 1(1) : 1–7. 2017.

[20] **Alm, H.; Torner, H.; Kanitz, W. and Roschlau, K.** Influence of oocyte recovery method, in vitro fertilization method and serum source on embryonic development of in vitro matured bovine oocytes. Arch. Tierz., 51: 224-234. 2008.

[21] **Pereira, D.C.; Dode, M.A.N. and Rump, f. R.** Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos., Theriogenology, 63 : 1131-1141. 2005.

[22] **Takagi, Y.; Mori, K.; Takahashi, T.; Sugawara, S. and Masaki, J.** Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing., J. Anim. Sci., 70:1923-1927 . 1992.

[23] **Carolan, C.; Monaghan, P.;Gallgher, M. and Gordon, I.** Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro., Theriogenology., 41: 1061-1068. 1994.

[24] **Zarcula, S.M., Cernescu, H., Godja, G. and Igna, V.** Effects of recovering bovine oocyte methods on quantity and quality of cumulus-oocyte complexes. Adv. Res. Scientifi c Area-Virtual Conf., 1: 2171-2174. 2012.