*J.Animal and Poultry Prod., Mansoura Univ., Vol.10 (1): 7 - 11, 2019*

# Effect of Zinc Chloride and Sodium Selenite Supplementation on *In Vitro* Maturation of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Oocytes and Oxidative Biomarkers in Maturation Media

**El-Moghazy, M. M. [1]; W. A. Khalil[2]and M. S. El-Rais[1]**

**[1]Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Damietta University, Damietta, Egypt.**

**[2]Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Mansoura University, Mansoura 35516, Egypt.**

# تأثير إضافة كلوريد الزنك وسيلينيت الصوديوم على كل من إنضاج بويضات الجاموس معملياً ودلالات التأكسد فى بيئة الانضاج.

**مصطفي ماهر محمد المغازي[1]، وائل أحمد خليل[2] و محمد صلاح الريس[1].**

**[1] قسم انتاج الحيوان – كلية الزراعه – جامعه دمياط.**

**[2] قسم انتاج الحيوان – كلية الزراعة – جامعه المنصورة.**

## الملخص

كان الهدف الرئيسي من هذا البحث هو دراسة تأثير إضافه كل من كلوريد الزنك وسيلينيت الصوديوم كمضادات أكسده لبيئة الانضاج المعملي لبويضات الجاموس على معدل النضج النووي، والدلالات الحيوية لعملية التأكسد. تم جمع مبايض الجاموس من المجازر وكان يتم سحب واختيار البويضات الجيدة والتي يحيط بها أكثر من أربعه طبقات من خلايا التراكم المبيضي المدمجة والتى تتميز بوجود سيتوبلازم متجانس ولونه ترابي. تم التوزيع العشوائي للبويضات التي تم إختيارها إلي أربعة معاملات تجريبيه، الأولى: تحتوي علي بيئة الإنضاج المعملي بدون أيه إضافات (المعاملة القياسية)، الثانية: بيئة الإنضاج المعملي مضاف اليها كلوريد الزنك بتركيز 1.5 ميكروجرام لكل مليلتر، الثالثة: بيئة الإنضاج مضافاً إليها سيلينيت الصوديوم بتركيز 5 ميكروجرام لكل لتر، الرابعة: بيئه الانضاج مضافاً إليها كلا من كلوريد الزنك + سيلينيت الصوديوم بتركيز 1.5 ميكروجرام لكل مليلتر، 5 ميكروجرام لكل لتر علي التوالي (المعاملة الثالثة). في كافة المعاملات التجريبية وبعد إنتهاء عمليه الإنضاج المعملي للبويضات (22-24 ساعة) كان يتم إجراء عمليه تعرية للبويضات من خلايا الركام المبيضي والتثبيت والصبغ لتقييم مرحله النضج النووي، ثم يتم جمع البيئات المستخدمة في الإنضاج لإجراء قياسات كيميائية حيوية لتقديرالسعه الكلية لمضادات الأكسدة، والمالون داى ألدهايد وبيروكسيد الهيدروجين كدلالة على عبىء الأكسدة. أوضحت النتائج أن إضافة كلوريد الزنك وسيلينيت الصوديوم إلى بيئة الإنضاج المعملي أدت إلي زيادة نسبه البويضات التي وصلت الي مرحله الطور الإستوائي الثاني (مرحلة النضج)، وكذلك زيادة السعه الكلية لمضادات الأكسدة، وإنخفاض نسبه المالون داي ألدهايد وبيروكسيد الهيدروجين في بيئة الإنضاج بصورة معنوية مقارنة مع المعاملة القياسية. وتشير تلك النتائج إلى أنه يمكن إضافة كلوريد الزنك وسيلينيت الصوديوم كمضادات أكسدة أثناء إجراء عملية الإنضاج المعملي لبويضات الجاموس مما يكون له أثر إيجابى على كفاءة تطور الأجنة اللاحق.

## المقدمة

يعتبر إنضاج البويضات الخطوة الأولى الهامة لنجاح عملية إنتاج الأجنة معملياً ونقطة إنطلاق للعديد من تطبيقات التكنولوجيا الحيوية في الحيوانات مثل الإخصاب المعملي، والاستنساخ، وإنتاج الحيوانات المحورة وراثياً، وأبحاث الخلايا الجذعية (Kakkassery *et al*., 2010) .وهناك العديد من العوامل التي تؤثر على إنضاج بويضات الجاموس معملياً مثل تركيب بيئة الاستزراع، طريقة إسترداد البويضات، نوعية البويضة، جوده البويضات وموسم جمع المبايض، وحالة المبيض وغيرها من العوامل (Mahmoud and El-Naby, 2013). وهناك العديد من الأدلة والتي تشير إلى أن بيئة وظروف الإستزراع تؤثر أيضاً على معدلات نمو الأجنة في المختبر. هذه العمليات تتضمن مستويات متعددة من الإتزان وتكون حساسة لتنظيم العوامل الداخلية والخارجية (Demyda and Genero, 2011). وتعتبر عملية إنضاج البويضات عملية طويلة ومعقدة، يحدث خلالها اكتساب البويضة المقدرة الذاتية على دعم المراحل اللاحقة من التطور للمحتوي الجيني للجنين. وتنطوي على أحداث معقدة ومتميزة ومرتبطة من النضج السيتوبلازمي والنووي. فالنضج النووي يتضمن أساساً عملية إنفصال الكروموسومات، في حين يتمثل النضج السيتوبلازمي في إعادة تنظيم وهيكلة المصفوفات، وتخزين mRNA والبروتينات وعوامل النسخ التي تعمل على عملية النضج الشامل والإخصاب والتطور الجنيني المبكر ( Ferreira *et al*., 2009).

إن معاملة الجاميطات والأجنة في البيئة المعملية عند تنفيذ تقنيات الإنجاب المساعدة يحمل خطر تعرض هذه الخلايا إلى مستويات مرتفعة من أنواع الأكسجين التفاعلية المختلفة والتي تتخطي المستويات الفسيولوجية (Agarwal *et al*., 2006). النظام المضاد للأكسدة يوازن بين تكوين أنواع الأكسجين التفاعلية المختلفة والحفاظ على الوظائف الخلوية. وتتواجد كل من مضادات الأكسدة الإنزيمية وغير الإنزيمية وخصوصاً الفيتامينات والمعادن في الحويصلات المبيضية وتحمي البويضات من التأثيرات الضارة لأنواع الأكسجين التفاعلية المختلفة. ويؤدي الإفراط في إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية المختلفة إلى العبىء التأكسدي والذي يعمل على التأثير على جودة البويضات وكذلك التبويض اللاحق (Kala *et al*., 2017). قد تؤدي المستويات المرتفعة من أنواع الأكسجين التفاعلية المختلفة والتي تتجاوز النطاق الفسيولوجي إلى التسبب في عدم استقرار عوامل تعزيز النضج، والإقلال من عوامل البقاء على قيد الحياة، و بالتالى يؤدي إلى موت مبرمج للخلايا في البويضات لعدة أنواع من الثدييات ( Aghaz and Khazaei, 2017). التدهور في جودة البويضة الناتجة من الموت المبرمج للخلايا بواسطة أنواع الأكسجين التفاعلية المختلفة يؤثر سلبياً على نتائج التقنيات الإنجابية المساعدة في العديد من أنواع الثدييات بما في ذلك البشر( Tiwari *et al*., 2016). ويمكن أن يستمر تأثير العبىء التأكسدي خلال المراحل المتأخرة من الحمل. وكذلك فمن الممكن أيضا أن يتسبب في العديد من الإضطرابات المتعلقة بالتمثيل الغذائي وذلك عن طريق إضافة مجموعة ميثيل للحمض النووي DNA أو حدوث أخطاء جينيه عند التخليق المتتالي للحمض النووي (Menezo *et al*., 2016).

في بروتوكولات نقل الأجنة، يلعب السلينيوم في صورة سلينيت الصوديوم دوراً كبيراً في حماية وظائف الخلية وتحسين إجراءات الإستزراع عن طريق آليات مختلفة، مثل الحد من إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية المختلفة وتثبيط بيروكسيد الدهون (Ebert *et al*., 2006).

كما أن الزنك يمكن أن يحسن النمو الخلوي أثناء إستزراع الأجنة معملياً، ويشكل الزنك عنصراً من الإنزيمات المضمّنة في كل من مراحل تطور البويضات والأجنة (Picco *et al*., 2010). أيضاً يعتبر الزنك كعامل مساعد للبروتينات المرتبطة بالحمض النووى DNA ( Cathomen and Joung, 2008). ويتم تحرير الزنك من الميتوكوندريا في تفاعل الأكسدة بواسطة شكل مؤكسد من الجلوتاثيون (GSH-GSSG) ( Rice *et al*., 2016).

ولذلك كان الهدف من الدراسة الحالية هو دراسة تأثير إضافة كل من كلوريد الزنك بتركيز 1.5 ميكروجرام لكل مليلتر وسيلينيت الصوديوم بتركيز 5 ميكروجرام لكل لتر او كلاهما معا لبيئة الانضاج المعملي لبويضات الجاموس على معدل نضج البويضات معملياً وكذلك الدلالات الحيوية لعملية التأكسد فى بيئة الإنضاج.

## الطرق والمواد

**التصميم التجريبي:**

استخدم عدد 454 بويضة ذات نوعية جيدة (تتميز بوجود عدد 4 طبقات أو أكثر من خلايا الركام الكاملة وسيتوبلازم محبب بصورة منتظمة وداكن اللون) في أربعه مكررات مستقلة بحيث تم تخصيص حوالى 25 بويضة لكل مكرره داخل كل معامله. وتم توزيع البويضات بصورة عشوائية على الاربع معاملات ثم إنضاجها معملياً لمدة 22-24 ساعة.

**وكانت المجموعات المعاملة كما يلي:**

(1) المجموعة القياسية: وكانت عبارة عن بيئة إنضاج بدون أي إضافات.

(2) بيئة الإنضاج المعملي مضاف اليها كلوريد الزنك بتركيز 1.5 ميكروجرام لكل مليلتر (المعاملة الاولي).

(3) بيئة الإنضاج مضافا اليها سيلينيت الصوديوم بتركيز 5 ميكروجرام لكل لتر (المعاملة الثانية).

(4) بيئة الانضاج مضاف إليها كلا من كلوريد الزنك + سيلينيت الصوديوم بتركيز (1.5 ميكروجرام لكل مليلتر، 5 ميكروجرام لكل لتر) على التوالي (المعاملة الثالثة).

فى نهاية فترة الإنضاج تم تعرية البويضات، وتثبيتها، ثم صبغها وذلك لتقييم مرحله النضج النووي. وأيضاً تم جمع بيئة الإنضاج المتبقية لقياس الدلالات الحيوية لعملية التأكسد.

**جمع المبايض والبويضات:**

تم جمع مبايض الجاموس من مجزر محلي. وكان يتم جمع المبايض من الحيوانات بعد عملية الذبح مباشرة، ويتم وضع المبايض داخل إناء معزول يحتوي على محلول ملح فسيولوجي (0.9 % كلوريد الصوديوم) دافئ درجة حرارته تتراوح بين 30-35 درجه مئوية به مضادات حيوية (100 وحدة دولية بنسلين/ ملليلتر و100 ميكروغرام استربتومايسين/ ملليلتر ). وفي المختبر كان يتم غسل المبايض ثلاث مرات بمحلول ملحي دافئ عند درجة حرارة 30 درجة مئوية به مضادات حيوية وذلك لإزالة الأنسجة الملتصقة والدم المتخثر. كان يتم سحب السائل الحويصلي من كل الحويصلات المبيضية الظاهرة على سطح المبيض والتي يتراوح قطرها ما بين 2-8 مليمتر بإستخدام إبرة مقاس 20 متصلة بسرنجة 10 ملليلتر معقمة. بعد إتمام عملية سحب السائل الحويصلي كان يتم تفريغ محتوي السرنجة ببطء في طبق بتري معقم (30 × 60 مم) للبحث عن البويضات المحاطة بالخلايا الركامية تحت الميكروسكوب (الإستريوميكروسكوبNikon SMZ645). ثم يتم إستخدام البويضات المندمجة والتي تتميز بوجود عدد 4 طبقات أو أكثر من خلايا الركام الكاملة وذات سيتوبلازم محبب بصورة منتظمة وداكن اللون في عملية الإنضاج.

**إعداد بيئة الإنضاج:**

كان يتم تحضير بيئة الإنضاج في اليوم الذي يتم فيه جمع وفحص البويضات كما يلي: بيئة زراعة الأنسجة-199 (الشركة المصرية للمستحضرات البيولوجية واللقاحات – العجوزة – مصر) مضاف إليها ألبيومين سيرم الأبقار(شركة سيجما ألدريتش، كود A6003) بمعدل 6مجم/ مللي، وعامل نمو البشرةEGF (شركة سيجما ألدريتش، كود E4127) بمعدل 10 ميكرو جرام/ مللي وجينتاميسين (شركة سيجما ألدريتش، كود G3632) بمعدل 50 ميكروجرام/مللي. ثم يتم ضبط بيئة الإنضاج إلى درجة حموضة من 7.2-7.4 والإسموزية من 280-300 ملى اوزمول/ كجم وترشيحها باستخدام فلتر مليبور 0.22 ميكرو ليتر. ثم يتم وضع 500 ميكرو ليتر من البيئة المحضرة / عين في الطبق ذو الأربع عيون المعقم 4well ووضعها في حضان ثاني اكسيد الكربون (5%) وفي درجه حرارة 38,5 درجه مئوية ورطوبة عالية (أكثر من 90%) لمدة ساعتين على الأقل قبل بدء التجربة.

**إنضاج البويضات:**

تم غسل البويضات مرتين في بيئة الانضاج. ثم بعد ذلك كان يتم زراعة حوالي 25 بويضة / عين في الطبق ذو الأربع عيون المعقم 4well ثم يتم تحضينها في حضان ثاني أكسيد الكربون (5٪) عند 38.5 درجة مئوية ورطوبة عالية لمده 22-24 ساعة.

**تثبيت البويضات والصبغ لفحص النضج النووي للبويضات:**

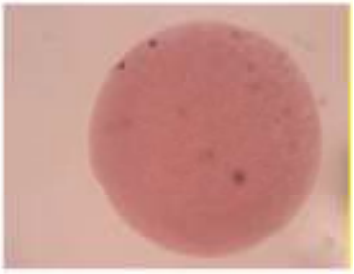
بعد الانتهاء من إنضاج البويضات (22-24 ساعة) كان يتم سحب البويضات من بيئة الانضاج ثم يتم بعد ذلك إزاله خلايا الركام المتمددة حول البويضة عن طريق نقلها الي محلول سترات الصوديوم 2,9% لمدة خمس دقائق ثم تكرار عمليه السحب والتفريغ بالماصة الميكرومترية حتى تمام التعرية. ثم كان يتم سحب عدد 15 بويضة معراه داخل قطرة من البيئة ووضعها على شريحة زجاجية. وكان يتم تغطيتها بغطاء شرائح يوضع علية شمع البرافين في الأربع أركان. ثم بعد ذلك كان يتم الضغط برفق على غطاء الشريحة تحت الميكروسكوب وذلك حتى تمام تحميل البويضات على الشريحة جيداً. كان يتم تثبيت البويضة على مرحله النضج المعينة التي حدثت لنواتها عن طريق وضع الشرائح التى عليها البويضات في محلول التثبيت وهو مخلوط طازج مكون من حامض الخليك الثلجي وكحول الإيثانول بنسبة 1:3 (حجم: حجم) لمدة 20 دقيقة. بعد ذلك كان يتم صبغ الشرائح بصبغة الأسيتو أورسين (1%) وهي عبارة عن (1% صبغه أورسين تضاف إلى 40 % حامض خليك ثلجي (وزن: حجم) وذلك لمدة 2-3 دقائق ثم تغسل بعد ذلك بالأسيتوجليسرول وهو عبارة عن ماء مقطر وحمض الخليك الثلجي وجليسيرول بنسبة 3: 1: 1 (حجم: حجم: حجم). ثم يتم فحص البويضات تحت الميكروسكوب الضوئي ذو الأطوار المتباينة (Leica DM 500) بقوه تكبير (400 مرة) لتقييم البويضات في المراحل المختلفة من النضج النووي.تم تحديدمرحلة النضج النووي (صورة من 1 إلى 6) وفقا للشكل الظاهري الخاص بالمادة النووية كما وضحها Hewitt وأخرون ( Hewitt *et al.*, 1998).

صوره (١): الحويصله الجرثومية

صوره (٢): الحويصله الجرثومية المتكسرة

صوره (٣): الطور الاستوائي الاول

صوره (٤): الطور الانفصالي الاول



صوره (٥): الطور النهائي الاول

صوره (٦): الطور الاستوائي الثاني

**صورة 1الى6. يوضح مراحل النضج النووي لبويضات الجاموس التي تم تحديدها بعد صبغ البويضات بصبغه الاسيتو أورسين بعد ازاله خلايا التراكم المبيضي.**

أ- **الحويصله الجرثومية :(GV، Germinal vesicle):** وفيها تكون الكروموسومات مغلفة بالغشاء النووي (صوره رقم 1).

ب- **الحويصله الجرثومية المتكسرة: ( Germinal vesicle breakdown،GVBD):** وفيها يبدأ غياب الغشاء النووي المرئي وتكثيف للكروماتين والذي يتميز بواسطة عنقود من مادة DNA بدون كروموسومات فردية (صوره رقم 2).

جـ - **الطور الاستوائي الأول: (M-I،Metaphase-I):** وفيها تتكاثف الكروموسومات في أزواج بدون ظهور الجسم القطبي الأول (صوره رقم 3).

د – **الطور الانفصالي الأول: (A-I،Anaphase-I):** وفيها تبدأ الكروموسومات في الإنفصال إلى مجموعتين ويظهر فيها بوضوح خيوط المغزل (صوره رقم 4).

هـ – **الطور النهائي الأول: (T-I،Telophas-I):** وفيها تنقسم الكروموسومات إلى مجموعتين (صوره رقم 5).

و- **الطور الاستوائي الثاني: (M-II،Metaphase-II):** وفيها تكون هناك مجموعة كبيرة من الكروموسومات تكون الطور الإستوائي وتبقي الكروموسومات عالية التكثيف أو يحدث طرد للجسم القطبي الأول فى منطقة البريفتللين في اتجاه الطبقة الشفافة (صوره رقم 6).

**6.2.القياسات الكيميائية الحيوية في بيئة الإنضاج:**

بعد الإنتهاء من الإنضاج المعملي للبويضات كان يتم جمع البيئة المتبقية من كل معامله وحفظها في جهاز التجميد عند درجه حرارة -20 درجه مئوية حتى القيام بالتحاليل المستهدفة. تم تقدير تركيز كل من السعه الكلية لمضادات الأكسدة (Koracevic *et al.*, 2001) والمالون داي ألدهايد (Ohkawa *et al.*, 1979) وبيروكسيد الهيدروجين(Aebi, 1984) وذلك بإستخدام مجموعه من الكيماويات التجارية إنتاج شركة(بيوديوجنوستيك - مصر) وجهاز قياس الطيف الضوئي سبيكتروفوتوميتر (Spectro UV-VIS Auto, UV-2602, Labomed, USA).وتم تنفيذ جميع الإجراءات وفقًا لتعليمات الشركة المنتجة.

**7.2.التحليل الإحصائي:-**

تم تحليل البيانات إحصائياً (الاتجاه الواحد) بإستخدام برنامج ( SAS, 2004) بواسطة الحاسب الآلي. تم المقارنة بين المتوسطات بإستخدام إختبار دانكن المتعدد الحدود (Duncan, 1955). كل بيانات النسبة المئوية تم تحويلها بـ arcsine قبل التحليل الإحصائى.

## النتائج

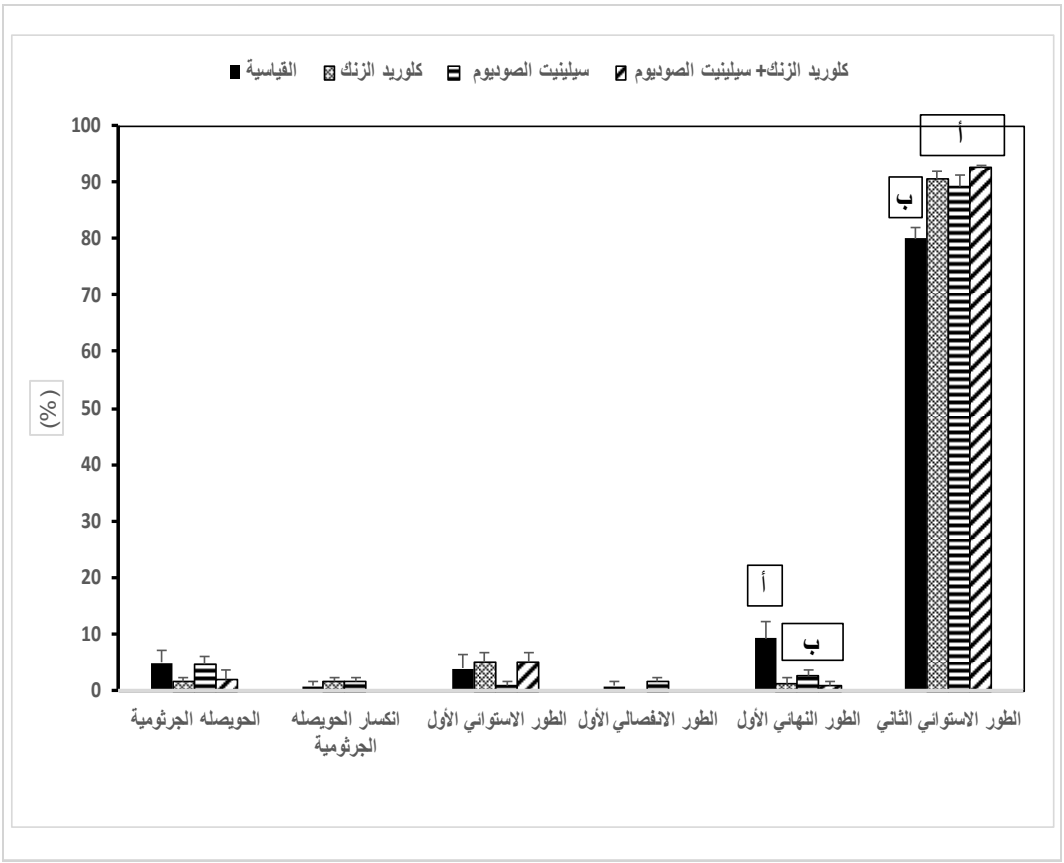
**تأثير إضافة كلوريد الزنك وسيلينيت الصوديوم إلي بيئة الإنضاج المعملي علي:**

**معدل الإنضاج المعملي للبويضات (النضج النووي):**

أظهرت النتائج في شكل رقم (1) أن نسبة البويضات التي وصلت إلى مرحلة الطور الإستوائي الثاني (مرحلة النضج) كانت أعلي بصوره معنويه في البيئة المضاف إليها مزيج من كلوريد الزنك و سيلينيت الصوديوم معاً (92.5±0.37)، وكلوريد الزنك (90.4±1.52) و سيلينيت الصوديوم (89.3±1.89) علي التوالي بالمقارنة مع المجموعة القياسية (80.0 ± 1.86). وكذلك كانت نسبة البويضات التي وصلت إلي الطور النهائي الأول أعلي معنوياً فى المجموعة القياسية (9.2±2.92) بالمقارنة بباقي المعاملات وهى كلوريد الزنك (1.3±0.84)، سيلينيت الصوديوم (2.5±1.02)، وكلوريد الزنك و سيلينيت الصوديوم (0.8±0.83).

**السعه الكلية لمضادات الأكسدة والدلالات الحيوية لعملية التأكسد في بيئة الانضاج:**

أظهرت النتائج في شكل رقم (2) أن إستزراع بويضات الجاموس في بيئة الإنضاج المعملي المضاف إليها كلوريد الزنك أو سيلينيت الصوديوم أو كليهما أدت إلي زياده معنويه في محتوي البيئة من مضادات الأكسدة الكلية وإنخفاض كل من المالون داي ألدهايد وبيروكسيد الهيدروجين بصوره معنويه والتي تم قياسها بعد 22-24 ساعه من بدء عمليه الإنضاج بالمقارنة بالبيئة القياسية.



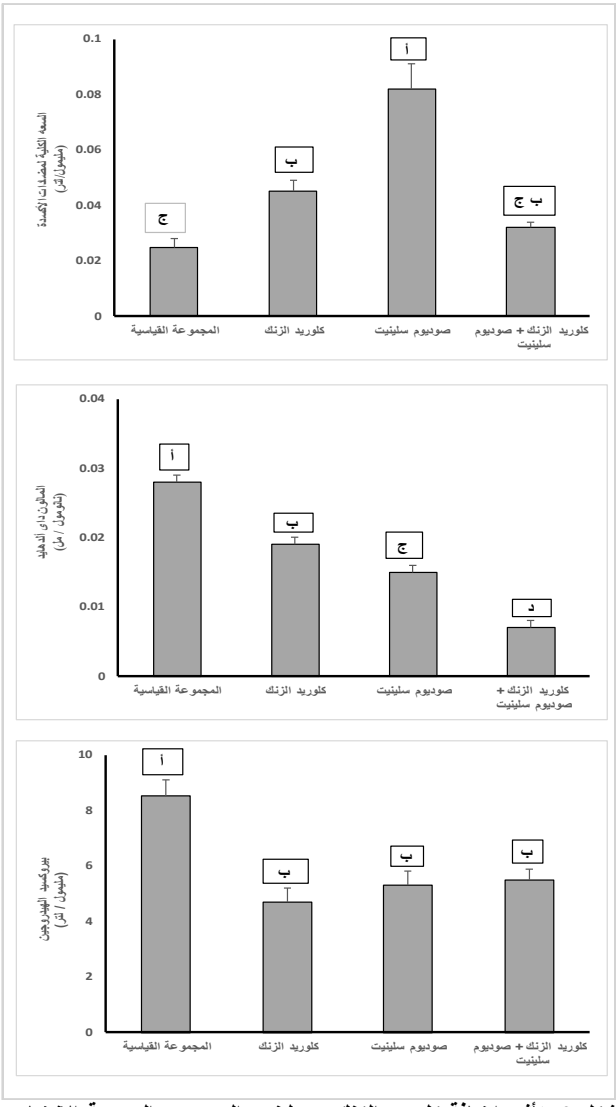

**شكل 1. تأثير إضافة كلوريد الزنك وسيلينيت الصوديوم إلي بيئة الإنضاج المعملي علي معدل الإنضاج المعملي لبويضات الجاموس (النضج النووي). الحروف الفوقية المختلفة تشير إلى إختلافات معنوية عند مستوى معنوية (≤ 0.05 ).**

2018). من ناحية أخري فان إستزراع الحويصلات في مرحلتها الأولية (pre-antral follicles) في وجود سيلينيت الصوديوم يعمل على زيادة السعة الكلية لمضادات الأكسدة داخل السائل الحويصلي وكذلك نشاط تكوين الجلوتاثيون بيروكسيداز المرتبط بالسيلينيوم (Se-GPx) والإقلال من نشاط أنواع الأكسجين التفاعلية المختلفة وبالتالي تحسين معدل تطور حويصلات الفئران معمليا (Abedelahi *et al.*, 2010).

يعتبرالزنك عنصرأساسي ذو أهميه خاصه بالنسبة للجهاز المناعي. وتظهر أهميته بشكل واضح في الإنزيمات المختلفة المشاركة في إنتاج وتحييد أنواع الأكسجين التفاعلية المختلفة التي تنتجها الخلية بشكل طبيعي. ومن المثير للإهتمام الإرتباط المباشر بين النقص في عنصرالزنك مع العبىء التأكسدي (Kloubert and Rink, 2015). ينظم الزنك إستئناف مرحلة الإنقسام الإختزالي لبويضات الثدييات عن طريق تنشيط تحوير البروتين كيناز سي و التي بدورها تؤثر على نشاط البروتين كيناز المنشط للميتوجين، وكذلك تنشيط عامل تعزيز النضج (MPF). إن نشاط البروتين كيناز سي يزيد من مستوي الزنك داخل البويضات (Zhao *et al.*, 2014). وقد تسبب إنخفاض مستوي الزنك أثناء إنضاج بويضات الأبقارمعملياً في التأثير على مستوي الجلوتاثيون داخل الخلايا وعلى سلامة الحمض النووي وموت الخلايا المبرمج لخلايا الركام المحيطة بالبويضة مع وجود آثار ضاره على تطور ونمو الأجنة في مرحلة ما قبل الإنغراس، لذا فإن التطور الأمثل للأجنة معمليا إلى مرحلة البلاستوسيست يعتمد بشكل جزئي على وجود تركيزات كافية من عنصرالزنك (Picco *et al.*, 2010). وإضافه الزنك بتركيز (10 ميكروغرام / مل) إلي بيئة الإنضاج المعملى أدي إلي تحسين نسبة إخصاب البويضات في الفئران (Barakat *et al.*, 2015). وأيضاً أدي إضافه الزنك إلي بيئة الإنضاج المعملي إلي تحسين إنضاج بويضات حيوان الياك وكذلك التطوراللاحق للأجنة من خلال زيادة نشاط تكون كلا من الجلوتاثيون وسوبرأكسيد ديسميوتاز، مما يقلل من أنواع الأكسجين التفاعلية المختلفة في البويضات (Xiong *et al.*, 2018b). وأشار Anchordoquy *et al.* إلى أن إضافه الزنك إلى بيئة الإنضاج المعملي أدت إلي: إنخفاض تلف الحمض النووي وموت الخلايا المبرمج في خلايا التراكم المبيضي، وزيادة نشاط إنزيم سوبرأكسيد ديسميوتاز في خلايا الركام، وعدم تغير نسبه تمدد خلايا الركام ومعدلات الإنقسام بعدعمليه الإخصاب المعملي، وتحسين التطور اللاحق للأجنة حتى الوصول إلي مرحله البلستوسيست وتحسين جودة البلاستوسيست وذلك في حالة وجود خلايا الركام أوعدم وجودها أثناء إنضاج البويضات معملياً (Anchordoquy *et al.*, 2014).

ولقد أدي تواجد كل من النانو سيلينيوم ونانو أكسيد الزنك خلال نضج بويضات الأبقار إلي زيادة معنوية في كل من تركيز الجلوتاثيون داخل الخلايا وكذلك سلامة الحمض النووي للخلايا الركامية. وأعتمد التطورالأمثل للأجنة بشكل جزئي علي وجود كل من النانو سيلينيوم ونانو أكسيد الزنك خلال الإنضاج المعملي (Abdel-Halim and Helmy, 2018).

**الخلاصه:** إن نتائج البحث الحاليه أثبتت أن إضافة كلوريد الزنك أو سيلينيت الصوديوم أو كليهما معاً إلى بيئة الإنضاج المعملي لبويضات الجاموس أدى إلي زياده نسبة البويضات التي وصلت إلي مرحله النضج. ويؤكد ذلك أنها أدت إلى زياده السعة الكلية لمضادات الأكسده وقللت دلالات العبىء التاكسدي في بيئه الإنضاج. وإن قدرة كلا من كلوريد الزنك وسيلينيت الصوديوم كمضادات للأكسده من الممكن أن تؤدى دور هام آخر فى حماية بويضات الجاموس أثناء الانضاج المعملى من المواد المؤكسده وبالتالي يحسن تطورها المحتمل في ظل هذه الظروف.




**شكل 2. تأثير إضافة كلوريد الزنك وسيلينيت الصوديوم إلي بيئة الإنضاج المعملي على كل من السعه الكلية لمضادات الأكسدة والدلالات الحيوية لعملية التأكسد في بيئة الانضاج. الحروف الفوقية المختلفة تشير إلى إختلافات معنوية عند مستوى معنوية (≤ 0.0001 ).**

## المناقشات

تشيرالعديد من الدراسات أن إضافه مضادات الأكسدة لبيئة الإنضاج المعملى للبويضات يعمل علي تحسين النضج السيتوبلازمي عن طريق تقليل العبىء التأكسدي خلال إنضاج البويضة حيث يعمل على زيادة تخزين الجلوتاثيون، وتسهم في زيادة حماية الجنين ضد ضرر العوامل المؤكسدة خلال مراحل نموه المبكره. لذلك فإن تحسين ظروف الاستزراع المعملى يعتبر تحدي صعب حيث لا يعتمد فقط على إختيار مضادات الأكسدة ولكن أيضا يعتمد بشكل كبير على تركيزها، ونوع وتركيب البيئة، ونوع الحيوان والتغيرات الديناميكية للمتطلبات الخاصة للبويضة بناءا على مراحل نموها (Aghaz and Khazaei, 2017).

وقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن إضافه كلا من كلوريد الزنك وسيلينيت الصوديوم أو كليهما لبيئة الانضاج أدت إلي زيادة معنويه في نسبة البويضات التي وصلت إلي الطور الإستوائي الثاني (مرحلة النضج النووى) مقارنه بالبيئة القياسية. علاوة على ذلك إرتبطت هذه التأثيرات المُحسنة بزيادة في السعة الكلية لمضادات الأكسدة، وإنخفاض دلالات الأكسدة (المالون داى ألدهيد و فوق أكسيد الهيدروجين) في بيئة الانضاج المعملى نتيجة المعاملات مقارنة بالبيئة القياسية.

عند إضافه السيلينيوم إلي بيئة الإنضاج المعملي أثناء النضج النووي لبويضات الياك (Yak) أدي ذلك إلى حدوث زيادة بصورة معنوية لنشاط الجلوتاثيون بيروكسيداز للبويضات وسلامه الحمض النووي لخلايا الركام المحيطة بالبويضة (Xiong *et al.*, 2018a). أيضاً أدي إضافة سيلينيت الصوديوم إلي زيادة في عدد نسخ الحمض النووي (DNA) للميتوكندريا الخاص بالبويضات عن طريق خفض نسبه العبىء التأكسدي وإرتبط ذلك أيضاً بزيادة كفاءة تطور البويضات فى الفئران ( Ghorbanmehr *et al.*,

## REFERENCES

Abdel-Halim, B. and Helmy, N. A. (2018). Effect of nano-selenium and nano-zinc particles during *in vitro* maturation on the developmental competence of bovine oocytes. Animal Production Science, 58: 2021-2028.

Abedelahi, A., Salehnia, M., Allameh, A. and Davoodi, D. (2010). Sodium selenite improves the *in vitro* follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxide activity. Human reproduction, 25: 977-985.

Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. In Methods in enzymology, Vol. 105 Elsevier, pp. 121-126.

Agarwal, A., Said, T. M., Bedaiwy, M. A., Banerjee, J. and Alvarez, J. G. (2006). Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. Fertility and sterility, 86: 503-512.

Aghaz, F. and Khazaei, M. (2017). Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during *in vitro* maturation of oocytes: a Review. Int. J. Fertil. Steril., 11: 63-70.

Kloubert, V. and Rink, L. (2015). Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells. Food and function, 6: 3195-3204.

Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V., Andrejevic, S. and Cosic, V. (2001). Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. Journal of clinical pathology, 54: 356-361.

Mahmoud, K. G. M. and El-Naby, A. (2013). Factors affecting buffalo oocyte maturation. Global Vet., 11: 497-510.

Menezo, Y. J., Silvestris, E., Dale, B. and Elder, K. (2016). Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. Reproductive biomedicine online, 33: 668-683.

Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical biochemistry, 95: 351-358.

Picco, S., Anchordoquy, J., De Matos, D., Anchordoquy, J., Seoane, A., Mattioli, G., Errecalde, A. and Furnus, C. (2010) Effect of increasing zinc sulphate concentration during in vitro maturation of bovine oocytes. Theriogenology, 74: 1141-1148.

Rice, J. M., Zweifach, A. and Lynes, M. A. (2016). Metallothionein regulates intracellular zinc signaling during CD4+ T cell activation. BMC immunology, 17: 13.

SAS (2004). SAS/STAT User's Guide. Version 7. SAS Institute Inc. Cary. North Carolina.

Tiwari, M., Prasad, S., Tripathi, A., Pandey, A. N., Singh, A. K., Shrivastav, T. G. and Chaube, S. K. (2016). Involvement of reactive oxygen species in meiotic cell cycle regulation and apoptosis in mammalian oocytes. Reactive Oxygen Species, 1: 110-116.

Xiong, X., Lan, D., Li, J., Lin, Y. and Li, M. (2018a) Selenium supplementation during *in vitro* maturation enhances meiosis and developmental capacity of yak oocytes. Animal Science Journal, 89: 298-306.

Xiong, X., Lan, D., Li, J., Lin, Y. and Zi, X. (2018b). Effects of zinc supplementation during *in vitro* maturation on meiotic maturation of oocytes and developmental capacity in yak. Biological Trace Element Research, 185: 89-97.

Zhao, M. H., Kwon, J. W., Liang, S., Kim, S. H., Li, Y. H., Oh, J. S., Kim, N. H. and Cui, X. S. (2014). Zinc regulates meiotic resumption in porcine oocytes via a protein kinase C-related pathway. PloS one, 9: 1-8.

Anchordoquy, J. M., Anchordoquy, J. P., Sirini, M. A., Picco, S. J., Peral-García, P. and Furnus, C. C. (2014). The importance of having zinc during *in vitro* maturation of cattle cumulus–oocyte complex: role of cumulus cells. Reproduction in Domestic Animals, 49: 865-874.

Barakat, I. A., Al-Shammari, J. O., Khandeal, S. A. and Al-Eisa, N. A. (2015). Influence of Media Supplementation with Zinc and/or Thymoquinone on *in vitro* Fertilization and Mouse Oocytes Development. Pakistan Journal of Zoology, 47: 1133-1140.

Cathomen, T. and Joung, J. K. (2008). Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. Molecular Therapy, 16: 1200-1207.

Demyda, S. and Genero, E. (2011). Developmental competence of *in vivo* and *in vitro* matured oocytes: a review. Biotechnology and Molecular Biology Reviews, 6: 155-165.

Duncan, D. B. (1955). Multiple Range and Multiple "F" Test. Biometrics, 11: 1-42.

Ebert, R., Ulmer, M., Zeck, S., Meissner-Weigl, J., Schneider, D., Stopper, H., Schupp, N., Kassem, M. and Jakob, F. (2006). Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells *in vitro*. Stem cells, 24: 1226-1235.

Ferreira, E., Vireque, A., Adona, P., Meirelles, F., Ferriani, R. and Navarro, P. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition ofdevelopmental competence. Theriogenology, 71: 836-848.

Ghorbanmehr, N., Salehnia, M. and Amoushahi, M. (2018). The effects of sodium selenite on mitochondrial DNA copy number and reactive oxygen species levels of *in vitro* matured mouse oocytes. Cell J., 20: 396-402.

Hewitt, D., Watson, P. and England, G. (1998). Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. Theriogenology, 49: 1083-1101.

Kakkassery, M. P., Vijayakumaran, V. and Sreekumaran, T. (2010): Effect ofcumulus oocyte complex morphology on *in vitro* maturation of bovine oocytes. J. Vet. Anim. Sci., 41: 12-17.

Kala, M., Shaikh, M. V. and Nivsarkar, M. (2017). Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. Reproductive medicine and biology, 16: 28-35.

# Effect Of Zinc Chloride and Sodium Selenite Supplementation on *In Vitro* Maturation of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Oocytes and Oxidative Biomarkers in Maturation Media

**El-Moghazy, M. M. [1]; W. A. Khalil[2]and M. S. El-Rais[1]**

**[1]Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Damietta University, Damietta, Egypt.**

**[2]Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Mansoura University, Mansoura 35516, Egypt.**

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of zinc chloride and/or sodium selenite supplementation as antioxidants to maturation media of buffalo oocytes on *in vitro* maturation (IVM) rate and oxidative biomarkers in maturation media. Ovaries from slaughterhouse were aspirated and good quality cumulus oocyte complexes (COCs) with ≥4 layers of compact cumulus cells and evenly granulated dark ooplasm were selected. COCs were randomly allocated to one of four treatment groups: (1) control maturation media (basic media; C), or (2) basic media supplemented with ZnCl (1.5µg/ml; T1), (3) $Na_2SeO_3$ (5µg/L; T2), and (4) ZnCl + Na2SeO3 (1.5µg/ml +5µg/L, respectively; T3). Oocytes were matured *in vitro* for 22-24 h at 38.5 °C, 5% $CO_2$ and high humidity. After 22-24 h oocytes were denuded, fixed, and stained to assess the stage of nuclear maturation. The spent media were collected for biochemical assays of total antioxidant capacity (TAC), malondialdehyde and hydrogen peroxide. The results demonstrated that supplementation maturation media with zinc chloride or/and sodium selenite during IVM increased the proportion of oocytes reaching the metaphase II stage at 22-24 h, increased total antioxidant capacity and decreased the malondialdehyde and hydrogen peroxide in maturation media compared to the control group ($P< 0.05$). These results suggest that zinc chloride and/or sodium selenite supplementation as antioxidants during IVM of buffalo oocytes can be used to increase the oocyte development competence.

**Keywords:** buffalo, *in vitro* maturation, $Na_2SeO_3$, oocytes, ZnCl