J. Animal and Poultry Prod., Mansoura Univ., Vol. 5 (4): 211 - 220,2014

EFFECT OF MATURATION MEDIA SUPPLEMENTED WITH RETINOL OR ASCORBIC ACID OR α-TOCOPHEROL ON CUMULUS CELL EXPANSION AND *IN VITRO* NUCLEAR MATURATION OF BUFFALO OOCYTES.

Khalil, W.A.; M.A. El-Harairy; A.E. Abdel-Khalek; and Z.M.R.K. Palani.
Animal Production Dept., Faculty of Agric., Mansoura Univ.

تأثير بيئة الأنضاج المضاف اليها الريتينول أو حمض الأسكوربيك أو ألفا توكوفيرول على معدل تمدد خلايا التراكم المبيضى والنضج النووى معملياً لبويضات الجاموس

وائـل أحمـد خليـل، مصـطفي عبـد الحلـيم الحرايـري، عبـد الخـالق السـيد عبـد الخـالق و زيرك محمد رستم خان بالاني.
قسم إنتاج الحيوان – كلية الزراعة – جامعة المنصورة.

الملخص

أجري هذا البحث بهدف دراسة تأثير إضافة كل من الريتينول (١٠ ميكرومول/مل) أو حمض الاسكوربيك (١٠٠ ميكرومول/مل) أو α-توكوفيرول (١٠٠ ميكرومول/مل) كمضادات أكسدة غير إنزيمية إلى بيئة الإنضاج المعملى لبويضات الجاموس على الأنضاج المعملى لبويضات الجاموس بقياس معدل تمدد حلايا التراكم المبيضى ومعدل الإنضاج النووى. تم جمع البويضات من مبايض الجاموس المذبوحة فى المجازروإستزراع البويضات الجيدة والمقبولة فى بيئة الإنضاج المعملى (بيئة زراعة الأنسجة-١٩٩) مضافاً إليها الفيتامينات بالتركيزات المذكورة لمدة ٢٢ ساعة فى حضانة ثانى أكسيد الكربون على درجة حرارة ٣٨,٥°م و٥% ثانى أكسيد كربون وأكثر من ٩٥% رطوبه. بعد عملية الإنضاج تم تقييم معدل تمدد خلايا التراكم المبيضى وكذلك معدل الإنضاج النووى للبويضات. تشير النتائج إلى تحسن التمدد الكلى لخلايا التراكم المبيضى حيث كان أعلى تحسن فى البيئه المضاف اليها α توكوفيرول، حمض الأسكوربيك والريتينول (٧٧,٢، ٦٩,٤ و٦٩,٢%، على التوالى) مقارنة بالبيئه القياسية (٦٠,٢%) ولم تكن الفروق معنويه. أيضا كان أعلى معدل انضاج نووى (مجموع كل من البويضات التى وصلت إلى الطور الإنفصالى الأول والطور النهائى الأول والطور الإستوائى الثانى) معنوياً للبيئات المضاف اليها الريتينول، α-توكوفيرول والأسكوربيك (٨٣,٤٨, ٨٢,٢٣ و٨١,٩٤%، على التوالي) مقارنة بالبيئه القياسية ٦٨,٤٦%.

نستخلص من هذه النتائج أن إضافة كل من الريتينول أوحمض الأسكوربيك أو α-توكوفيرول كمضادات أكسدة غير إنزيمية إلى بيئة الإنضاج المعملي تحسن من معدل تمدد خلايا التراكم المبيضى وتزيد معدل الإنضاج النووى معملياً لبويضات الجاموس. إضافة الرتينول أعطت أحسن معدل إنضاج معملى لبويضات الجاموس.

الكلمات المفتاحية: الجاموس، البويضات، الإنضاج المعملى، مضادات الأكسده غير الإنزيمية.

مقدمة

تعتبر عملية الإنضاج المعملي خطوه هامه لنجاح عملية الإخصاب معمليا لبويضات الجاموس ومن العوامل التى تؤثر عليها إضافات البيئة، الموسم، حجم الحويصلات، طريقة الجمع، جودة البويضات، وجود خلايا التراكم المبيضى، حالة المبيض وطول مدة الإنضاج (Mahmoud and Al-Shimaa, 2013).

يعتبر الإجهاد الناتج عن الأكسدة أكبر مشكلة تواجه عملية الإخصاب المعملى Guerin *et al.,* (2001) وقدعرف بعض الباحثين (Feugang *et al.,* 2004) الإجهاد الناتج عن الاكسده على أنه ناتج من عدم التوازن بين إنتاج الشوارد الحرة المتضمنة للأوكسجين Reactive oxygen species (ROS) ومضادات الأكسده الخلويه. وتشمل هذه الشوارد الحرة المتضمنة للأوكسجين أيون فوق الأوكسيد (O_2^-) وفوق أكسيد الهيدروجين (H_2O_2) وأيونات الهيدروكسيل (OH^-) و تعتبر تلك المواد عقبة رئيسية أمام تطور الأجنه (Guerin *et al.,* 2001) حيث أنها تكون شديدة التفاعل مع جزيئات الخلايا المعقدة مثل الدهون والبروتينات والحمض النووي (DNA) وتسبب سلسله من تعطيل الوظائف مثل عدم تنشيط

الإنزيمات (Halliwell and Gutteridge, 1989) وشذوذ الميتوكندريا (Kowaltowski, 1999 and Vercesi) وتجزئة الحمض النووي (Lopes *et al.,* 1998).

توجد أليات الدفاع ضد الشوارد الحره تشمل مضادات أكسده غير إنزيميه مثل الجلوتاثيون وفيتامين ج (حمض الأسكوربيك) وفيتامين هـ (ألفا توكوفيرول) فيتامين أ (الريتينول) والبيروفات والتبورين والهيبوتورين بينما تشمل مضادات الأكسدة الإنزيمية الكتاليز وسوبر أوكسيد ديسميوتاز والجلوتاثيون بيروكسيداز (Guerin *et al.* 2001).

يعتبر فيتامين هـ مضاد أكسده طبيعى، حيث يوجد فيتامينى أ& هـ بكميات معنويه في المبيض أو السائل الحويصلى (Schweigert and Zucker, 1988). فيتامين هـ يثبط تخليق NADPH oxidase من أيونات فوق الاكسيد وتحمى مضادات الأكسدة الذائبة فى الدهون (فيتامين هـ & أ) غشاء الخلية من الإجهاد الناتج عن الأكسدة (Pascoe *et al.,* 1987). ويعتبر فيتامين (أ) أحد المكونات الغذائية الدقيقة المهمة فى تناسل الأبقار (Gomez et *al.,* 2004). ويلعب دوراً فى منع الإجهاد الناتج عن الأكسدة داخل الخلايا (Ahlemeyer *et al.,* 2001). وتعتبر الريتونيدات منظمات للنمو الخلوى والتمايز الجنينى للعديد من الخلايا وهى مهمه لإنتاج هرمونات المبيض الإسترويديه ونضج البويضات والتطور الجنينى المبكر (Thiyagarajan and Valivittan, 2009). كما يعتبر حمض الأسكوربيك من أهم مضادات الأكسدة التى توجد خارج الخلية (Warren *et al.,* 2000) وهو مضاد أكسدة قوى ومباشر وعامل حماية ضد الضرر الناتج من الأكسدة الداخلية للـ DNA (Fraga *et al.,* 1991).

لذلك كان الهدف من هذا البحث هو دراسة تأثير إضافة كل من الريتينول أو حمض الاسكوربيك أو α-توكوفيرول كمضادات أكسدة غير إنزيمية إلى بيئة الإنضاج المعملى على كل من معدل تمدد خلايا التراكم المبيضى ومعدل الإنضاج النووى لبويضات الجاموس معملياً.

الطرق والمواد

أجريت هذه الدراسة في مختبر الفسيولوجي والتكنولوجيا الحيوية بقسم انتاج الحيوان بكلية الزراعة جامعة المنصورة في الفترة من شهر أكتوبر(تشرين أول) ٢٠١٣ حتى شهر فبراير (شباط) ٢٠١٤.

جمع المبايض:

تم جمع المبايض من كل من المجازر الاليه بمحافظات القاهرة و المنوفية (شبين الكوم) وكانت المبايض طبيعية بينما كانت الحالة التناسلية للحيوانات المذبوحة (من حيث مرحلة دورة الشياع) غير معروفه. كان يتم جمع المبايض بعد الذبح مباشرة وتوضع في محلول فسيولوجي (٠,٩ % كلوريد الصوديوم) على درجة حرارة ٣٠ درجة مئوية ثم نقلها من المجازر الى المختبر في خلال ٥-٦ ساعات.

غسل المبايض:

بعد نقل المبايض الى المختبر تم إزالة الأجزاء الزائدة من النسيج الضام حول المبيض وغسلها مرتين في محلول فسيولوجى دافئ وذلك لإزالة الدم المتجلط والأنسجة الزائدة ثم غسلها بكحول الايثايل (٧٠%) لعدة ثواني لإزالة أي تلوث على سطح المبيض ثم غسلها مرة أخيرة بمحلول فسيولوجي (٠,٩% كلوريد الصوديوم).

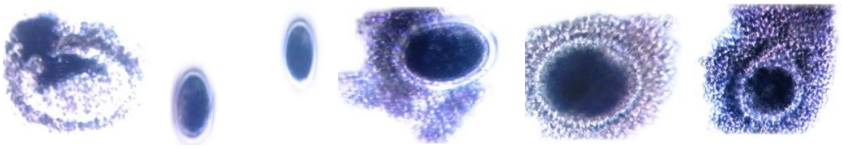
جمع البويضات:

تم سحب السائل الحويصلي من الحويصلات المرئية على سطح المبيض ذات القطر من (٢ – ٨ مم) باستخدام إبرة قطرها (٢٠ مم) متصلة بسرنجة ١٠ مل معقمة تحتوي على ١ مل من بيئة الجمع (بيئة زراعة الانسجة ١٩٩ مضاف إليها ٦مجم/مل ألبيومين سيرم الأبقار و٥٠ ميكروجرام/مل جنتاميسين) . بعد عملية السحب كان يتم تفريغ محتويات السرنجة ببطئ في طبق بتري معقم (٦٠ مم) وذلك لإجراء عملية البحث عن البويضات تحت الميكرسكوب الخاص بذلك وهو الإستريوميكرسكوب لتقدير العدد وتصنيف البويضات.

تقييم وتصنيف البويضات:

بعد جمع البويضات مباشرة تم غسلها ثلاث مرات في بيئة الجمع وتقييمها تحت الميكرسكوب المجسم بقوة تكبير (X١٠٠) ثم تصنيفها على حسب عدد خلايا التراكم المبيضي المحيطة بها وكذلك على أساس جودة السيتوبلازم الى خمس درجات: البويضات المندمجة (الجيده): محاطة بـ ٥ طبقات أو أكثر من خلايا التراكم المبيضي وذات سيتوبلازم متماثل ومتجانس ولونه ترابي (صوره ١). البويضات الأقل إندمجاً (مقبوله):

محاطـة بــ١-٤ طبقـات مـن خلايـا التـراكم المبيضـي وذات سـيتوبلازم متجـانس ولونـه ترابـي (صـوره ٢). البويضـات المعـراة جزئيـاً: عليهـا جـزء عـاري مـن خلايـا التـراكم المبيضـي ومحاطـة جزئيـا بخلايـا التـركم المبيضـي (صـوره ٣). البويضـات المعـراة كليـاً: غيـر محاطـة بـأي طبقـه مـن طبقـات خلايـا التـراكم المبيضـي ومحاطـة فقـط بالطبقـة الشـفافة (صـوره ٤). البويضـات المضـمحلة : وهـى ذات سـيتوبلازم بـه أمـاكن مظلمـة أو السيتوبلازم منكمش أو به فراغات (صـوره٥). وتعتبر البويضـات المعـراه والمضـمحله غيـر صـالحه للإنضـاج المعملى لذلك يتم إستبعادها.



صوره (١): بويضات مندمجة | **صوره (٢): بويضات أقل اندماجا** | **صوره (٣): بويضات معراة جزئياً** | **صوره (٤): بويضات معراة كلياً** | **صوره (٥): بويضات مضمحلة**

إنضاج البويضات:

كان يتم إعداد بيئة الإنضاج في اليوم الذي يتم فيه جمع البويضات ويوضح الجدول (١) تركيب البيئة المستخدمة في الإنضاج المعملى. كان يتم ضبط البيئة على درجة حموضة pH من ٧,٢ الى ٧,٤ وترشيحها عن طريق فلتر قطره ٠,٢٢ ميكروميتر.

بعد جمع وتقييم وتصنيف البويضات تم اختيار البويضات الجيدة والمقبولة (المندمجة والأقل إندماجاً) وغسلها مرة واحدة في بيئة الانضاج المعملي ثم نقلها الى بيئة الإنضاج المعملي في حضانة ثاني اوكسيد الكربون على درجة حرارة ٣٨,٥ م° و٥% CO_2 واكثر من ٩٥% رطوبة وذلك لتحضينها لمدة ٢٢ ساعة.

جدول (١): تركيب بيئة الأنضاج المعملى.

محتويات البيئة	التركيز	الشركة المنتجة
بيئة زراعة الأنسجة-١٩٩	١٠ مل	Egyp. Orgn. Biol. Prod, Vacc.
البيومين سيرم الأبقار	٦مجم/ مل	Sigma Chemi. Co.
صوديوم بيروفات	٢٠ مليمول (نهائى)	Sigma Chemi. Co.
رمون التطور الحويصلى FSH	٥ ميكرو جرام/ مل	Follitropin; Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada
هرمون الأم الحامل HCG	١٠ وحدة دولية/ مل	Egyptian Int. pharmaceutical Industries Co.
هرمون الإستراديول-β١٧	١ ميكرو جرام/ مل	Sigma Chemi. Co.
جنتاميسين (مضاد حيوي)	٥٠ ميكرو جرام/ مل	Sigma Chemi. Co.

المعاملات التجريبية:

تـم تجهيـز ٤ انـواع مـن البيئـات المسـتخدمة فـي الانضـاج (٤ معـاملات) كالاتي:المعاملـة الأولـى (القياسية): بيئة الإنضاج بدون أى إضافات. المعاملة الثانية: بيئة الإنضاج مضاف إليها فيتامن أ (الريتينول) بتركيز ١٠ ميكرومول. المعاملة الثالثة: بيئة الإنضاج مضاف إليها فيتامين ج (حمض الأسكوربيك) بتركيز ١٠٠ ميكرومـول. المعاملـة الرابعـة: بيئـة الإنضـاج مضـاف إليهـا فيتـامين هـ (توكـوفيرول) بتركيـز ١٠٠ ميكرومول.

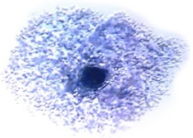
تصنيف البويضات بعد الانضاج حسب درجة تمدد خلايا التركم المبيضي (الأنضاج الستوبلازمى):

تم حساب النسبه المؤيه للبويضات للتصنيفات التاليه:

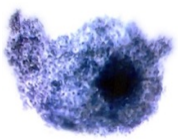
بويضات التمدد الكلى: وفيها يحدث تفكك لكل خلايا التراكم المبيضى (صوره ٦).

بويضات التمدد الجزئى: وفيها يحدث تفكك للطبقات الخارجية من خلايا التراكم المبيضى (صوره ٧).

بويضات بدون تمدد خلايا التراكم المبيضي: (صوره ٨).



صوره رقم (٦): بويضات التمدد الكلى لخلايا التراكم المبيضى



صوره رقم (٧): بويضات التمدد الجزئى لخلايا التراكم المبيضى

صوره رقم (٨): بويضات بدون تمدد لخلايا التراكم المبيضي

تثبيت البويضات وعملية الصبغ:

في نهاية عملية الانضاج المعملي تم إزالة البويضات من بيئة الانضاج وإزالة خلايا التراكم المبيضي من حول البويضة وذلك عن طريق تكرار عملية السحب والطرد. تم سحب من ٥–١٠ بويضات ووضعها على شريحة زجاجية نظيفة ثم تغطيتها بغطاء شرائح يوضع عليه شمع برافين في الاربع اركان. وبعد ذلك كان يتم الضغط على غطاء الشريحة تحت الميكرسكوب وذلك حتى يتم تثبيت البويضات جيدا. كانت تتم عملية التثبيت بوضع الشريحة في مخلوط طازج مكون من حامض الخليك الثلجي وكحول الايثانول بنسبة ٣:١ (حجم : حجم) لمدة ٢٤- ٤٨ ساعة. بعد ذلك يتم صبغ الشرائح بصبغة الاسيتو أورسين (١%) عبارة عن (١% صبغة أورسين تضاف الى ٤٠% حامض خليك ثلجي (وزن : حجم) وذلك لعدة دقائق (٢-٣ دقائق) ثم تغسل بعد ذلك بالاسيتوجليسرول وهو عبارة عن ماء مقطر وحمض الخليك الثلجي وجليسرول بنسبة ١:١:٣ (حجم:حجم:حجم) ثم تفحص تحت المكروسكوب الضوئي بقوة تكبير(X٤٠٠) لتقييم البويضات فى المراحل المختلفة من الإنضاج النووى كالأتى:

الحويصلة الجرثومية (Germinal vesicle, GV):

وفيها تكون الكروموسومات مغلفة بالغشاء النووي.

الحويصلة الجرثومية المتكسرة (Germinal vesicle breakdown, GVBD):

وفيها يبدأ غياب الغشاء النووي المرئي وتكثيف للكروماتين والذي يميز بواسطة عنقود من مادة DNA بدون كروموسومات فردية.

الطور الاستوائي الأول (Metaphase-I, M-I):

وفيها تتكاثف الكروموسومات في أزواج بدون ظهور الجسم القطبي الأول (صوره ٩).

الطور الانفصالي الاول (Anaphase-I, A-I):

وفيها تبدأ الكرموسومات فى الإنفصال إلى مجموعتين مع ظهور خيوط المغزل (صوره ١٠).

الطور النهائي الاول (Telophase-I, T-I):

وفيها تنقسم الكروموسومات إلى مجموعتين (صوره ١١).

الطور الاستوائي الثاني (Metaphase-II, M-II):

وفيه تكون هناك مجموعة كبيرة من الكروموسومات تُكون الطور الاستوائي وتبقي الكروموسومات عالية التكثيف أو يحدث طرد للجسم القطبي الأول في اتجاه الطبقة الشفافة (صوره ١٢).

بويضات مضمحله (Degenerated):

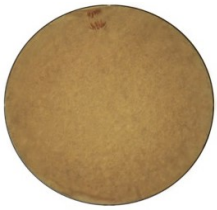
وفيها يكون الكروماتين متحوصل أو متبعثر أو عالي التكثيف.

التحليل الأحصائى:

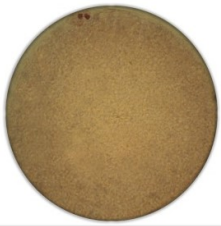
تم تحليل البيانات إحصائيا باستخدام برنامج **(SAS 2004)** باستخدام الحاسب الالي لدراسة التأثير الناتج عن إضافة الفيتامينات المختلفة إلى بيئة الإنضاج المعملى على كل من معدل تمدد خلايا التراكم المبيضى والإنضاج النووي لبويضات الجاموس. تم مقارنة الفروق المعنوية باستخدام اختبار دانكن المتعدد

الحدود (**Duncan, 1955**). ايضا تم تحويل النتائج المتحصل عليها في صورة نسب مئوية عن طريق جداول الاركاسين ثم اعادتها مرة اخرى الى اصلها في الجداول المقدمة.

صوره (٩): الطور الاستوائي الاول



صوره (١٠): الطور الانفصالي الاول



صوره (١١): الطور النهائي الاول

صوره (١٢): الطور الاستوائي الثاني

النتائج

تأثير إضافة الفيتامينات على:

١- معدل تمدد خلايا التراكم المبيضى لبويضات الجاموس:

يوضح الجدول رقم (٢) تأثير إضافة الفيتامينات (الريتينول أو حمض الأسكوربيك أوα توكوفيرول) إلى بيئة الإنضاج المعملي على معدل تمدد خلايا التراكم المبيضى لبويضات الجاموس. تظهر النتائج أنه لم يكن هناك فروق معنوية بين المعاملات فى تمدد خلايا التراكم المبيضى، ولكن تشير النتائج إلى أن التمدد الكلى لخلايا التراكم المبيضى كان أعلى فى البيئه المضاف اليها α-توكوفيرول، حمض الأسكوربيك والريتينول (٧٧,٢، ٦٩,٤ و٦٩,٢%، على التوالى) مقارنة بالبيئه القياسية (٦٠,٢%).

جدول (٢): تـأثير إضافة الفيتامينات الى بيئه الأنضاج المعملى على معدل تمدد خلايا التراكم المبيضى لبويضات الجاموس.

المعاملة	بيئة الأنضاج المعملى				الخطأ المعياري (±)
	القياسية	الريتينول	حمض الأسكوربيك	توكوفيرول	
عدد البويضات	١٠١	١١٥	١٠٦	٨٦	-
النسبه المؤيه للبويضات (%):					
بويضات ذات تمدد كلى	٦٠,٢	٦٩,٢	٦٩,٤	٧٧,٢	٤,٨
بويضات تمدد جزئى	٢٢,٧	١٦,٦	١٧,٣	١٥,٣	٣,٣
بويضات غير متمددة	١٧,١	١٤,٣	١٣,٣	٧,٦	٣,٧
تمدد كلى+ تمدد جزئى	٨٢,٩	٨٥,٧	٨٦,٧	٩٢,٥	٣,٧

٢- الإنضاج النووى لبويضات الجاموس:

يوضح الجدول رقم (٣) تـأثير إضـافة الفيتامينـات (الريتينـول أو حمض الأسكوربيك أوα توكوفيرول) إلـى بيئـة الإنضـاج المعملـي علـى معدل الإنضـاج النـووى لبويضـات الجـاموس. يتضـح مـن النتـائج عدم وجـود فـروق معنويـة بـين المعـاملات فـى نسـبة البويضـات التـى وصـلت لمراحـل (الحويصـلة الجرثوميـة، إنكسـار الحويصـلة الجرثوميـة، الطـور الإسـتوائى الأول، الطـور الأنفصـالى الأول والطـور النهـائى الأول)، بينمـا كـان هناك فروق معنويه فى البويضات التى وصلت إلى مرحلة الطور الإستوائى الثانى حيث أعطت البيئـه المضـاف اليها الريتينول أعلى نسبه مئويه للبويضات التى وصلت الـى مرحلـة الطـور الإستوائى الثـانى معنويـا عن بـاقى البيئـات (التوكـوفيرول، الأسـكوربيك والقياسـية). أيضـاً كـان هنـاك فـروق معنويـة فـى كـل مـن مجمـوع النسـب المئويه للبويضات التى وصلت إلى مرحلة الطور النهائى الأول والطور الإستوائى الثـانى ومجموع البويضـات التـى وصـلت إلـى الطـور الإنفصـالى الأول والطـور النهـائى الأول والطـور الإسـتوائى الثـانى حيث كانـت أعلـى معنوياً فى البيئات المضاف اليها الريتينول، α-توكوفيرول والأسكوربيك عن البيئه القياسية.

جدول (٣): تـأثير إضـافة الفيتامينـات إلـى بيئـة الإنضـاج المعملـى علـى الإنضـاج النـووى لبويضـات الجـاموس معمليا.

المعاملة	بيئة الأنضاج المعملى				الخطأ المعياري(±)
	القياسية	الريتينول	حمض لأسكوربيك	توكوفيرول	
العدد الكلى للبويضات	١٤١	١٣٠	١٢٢	١٠٠	
النسبه المئويه للبويضات (%):					
الحويصلة الجرثومية	٣,١٤	١,٠٥	٠,٠٠	١,٣٤	١,٢٦
إنكسار الحويصلة الجرثومية	٥,٨٣	٢,٢٣	١,٩٠	٣,٥٦	٢,٤٥
الطور الإستوائى الأول	٢٢,٥٧	١٣,٢٧	١٥,٨٧	١٣,١٦	٤,١١
الطور الأنفصالى الأول (١)	٢,٠٠	٤,٢٣	٤,٢٧	٢,٦٦	٢,١٤
الطور النهائى الأول (٢)	٧,٠٣	١,٧٠	٦,٠١	٦,٩٠	٢,٦٦
الطور الإستوائى الثانى (٣)	٥٩,٤٦ب	٧٧,٥٧أ	٧١,٩١ب	٧٢,٤٠ب	٤,٦٦
٢+ ٣	٦٦,٤٧ب	٧٩,٢٧أ	٧٧,٩٣أ	٧٩,٢٨أ	٤,١٢
١+ ٢+ ٣	٦٨,٤٦ب	٨٣,٤٨أ	٨٢,٢٣أ	٨١,٩٤أ	٣,٦٦

الحروف الفوقية المختلفة أب ضمن نفس الصف تشير إلى إختلافات معنوية عند مستوى معنوية (≤ ٠,٠٥).

المناقشة

تم تقييم تأثير إضافة الريتينول أو حمض الاسكوربيك أوα-توكوفيرول كمضادات أكسدة غير إنزيمية إلى بيئة الإنضاج المعملى على كل من معدل تمدد خلايا التراكم المبيضى ومعدل الإنضاج المعملى لبويضات الجاموس. أثبتت الدراسه الحاليه ان كل الإضافات المستخدمه لها تاثير مفيد على إنضاج البويضات معملياً والتى تم جمعها من مبايض اناث الجاموس المذبوحه بالمجازر فى شكل زياده غير معنويه فى معدل تمدد خلايا التراكم المبيضى وزياده معنويه فى معدل الانضاج النووى (النسبه المؤيه للبويضات التى وصلت مرحلة الطور الاستوائى الثانى). مثل هذه النتائج تتفق مع كثير من الباحثين. فى هذا المجال وجد (*et al.*, 2008 Mlclea) أن إضافة ٢٠ مليمول من الفا توكوفيرول الى بيئة الإنضاج المعملي أدت الى زيادة معنوية في معدل الإنضاج المعملي لبويضات الخنازير. ايضا وجد (Tao *et al.*, 2010) ان إضافة ٥٠ أو ١٠٠ ميكرومول من توكوفيرول سهل من النضج السيتوبلازمى لبويضات الخنازير المعراة كلياً. بالاضافه الى ذلك فإن (Kitagawa *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2006) وجدوا أن إضافة فيتامين هـ بتركيز ١٠٠

ميكرومول إلى بيئة الإنضاج المعملى لبويضات الخنازير قللت من عمليات الاكسدة وزادت فى معدلات تكوين البلاستوسيست عند الزراعة تحت تحت ظروف إستزراع ٢٠% أوكسجين أو تحت ظروف إستزراع ٥% أوكسجين، على التوالى.

وفى اتجاه متوافق مع النتائج المتحصل عليها فى الدراسه المقدمه وجد (Vahedi *et al.*, 2009) أن إضافة transretion acid (T-RA) بتركيزات (٠,٠, ٠,٢٥، ٠,٥، ١ ميكرومول) الى بيئة الانضاج المعملي لبويضات الابقار على كل من تمدد خلايا التراكم المبيضي ومعدل الانضاج المعملي لم تؤثر معنويا على تمدد خلايا التراكم المبيضي، بينما ادت اضافة واحد ميكرومول من T-RA الى زيادة معنوية في معدل الانضاج المعملي مقارنة بالمجموعة القياسية. ايضا فى الجاموس وجد Cajuday *et al.* (2012) أن اضافة الريتينول بتركيزات (١، ٣ و ٥ ميكرومول) تزيد معدل تمدد خلايا التراكم المبيضي معنويا في المجموعات المعاملة بحمض الريتونك (٨٠,٦٧، ٨٠ و٨٦%)، على التوالي بالمقارنة بالمجموعة القياسية (٧٢,٠٢٤%). كان معدل البويضات التي وصلت الى مرحلة النضج (الطور الإستوائى الثاني) اعلى معنويا في المجموعة المعاملة بـ ٥ ميكرومول من حمض الريتونك (٨٤,٤٧%) بالمقارنة بالمجموعة القياسية (٦٧,٩٧%). ايضا ادت المعاملة بـ٥ مايكرو مول حمض الريتونك الى تحسن معنوي في نسبة البويضات التي وصلت الى مرحلة البلاستوسيست بالمقارنة بالمجموعة القياسية.

بالإضافه الى ذلك درس Hu *et al.*, 2012) تأثير إضافة فيتامين ج بتركيزات (٠، ٢,٥، ٥، ١٠، ٢٠ و٤٠ ميكروجرام/مل) إلى بيئة الإنضاج على ROS وعمليات الإخصاب والتطور المعملي لأجنة الخنازير. ووجدوا أن نسبة الشوارد الحره (ROS) قلت معنويا في المعاملات المضاف إليها فيتامين ج بالمقارنة بالمجموعة القياسية وكان معدل تكوين البلاستوسيت وعدد الخلايا الموجودة في كل جنين أعلى معنويا في المجموعات المضاف إليها فيتامين ج بالمقارنة مع المجموعة القياسية. وكانت أفضل إضافة هى ٢٠ ميكروجرام/مل. كان الموت المبرمج للخلايا (Apoptosis) أقل في المجموعات المضاف إليها فيتامين ج بالمقارنة بالمجموعة القياسية. وإستخلص الباحثون أن إضافة فيتامين ج أدت إلى تحسين في التطور المعملي لأجنة الخنازير نتيجة لتقليل مستوى ROS. كذلك درس Ullah *et al.*, 2006) تاثير إضافة حمض الاسكوربيك بتركيز٢٥٠ ميكرومول الى بيئة الإنضاج المعملى لبويضات الجاموس المندمجة والمعراة. وجد هؤلاء الباحثين ان نسبة البويضات المعراة وصلت الى نسبة معدل انضاج معملي أعلى بالمقارنة بالمجموعة القياسية. كانت النسبة المؤيه للبويضات المضمحلة عالية معنوية في مجموعة البويضات المعراة مقارنة بالمجموعة القياسية (٢١,٤ مقابل ٧,٤ %). واستخلص من هذا النتائج ان اضافة حمض الاسكوربيك ادت الى زيادة معدل الانضاج المعملي للبويضات المعراة وايضا وجود خلايا التراكم المبيضي يحمي البويضات من الاضمحلال. أيضاً أدت اضافة ٢٠ ميكرومول من الفا توكوفيرول و٢٥٠ ميكرومول حمض الاسكوربيك إلى بيئة الانضاج المعملي لبويضات الخنازير إلى نسبة عالية من تمدد خلايا التراكم المبيضي بالمقارنة بالمجموعة القياسية. كذلك وجد (Mlclea *et al.*, 2012) أن إضافة الفا توكوفيرول أدت الى تاثير مفيد على كل من حيوية البويضة وتطورها الى مرحلة الطور الإستوائي الثاني وحسنت معنوياً من تطور نسبة عالية من الاجنة الى مرحلة الموريولا.

إضافة 9cis RA (9cis-Retinoic Acid) بتركيز (٥ و٥٠ نانومول) إلى بيئة الانضاج المعملي لبويضات الأبقار زاد من وصول البويضات إلى مرحلة البلاستوسيست بالمقارنة بالمجموعه القياسية (١٨,٧ و١٩,٢ مقابل ١٠,٥% على التوالى) ، بينما اضافة 9cis RA بتركيز ٥ نانومول الى بيئة الانضاج لم يكن له تأثير ايجابي على حيوية البلاستوسيست بعد عملية التجميد السريع (Gomez *et al*., 2003).

على العكس من النتائج السابقه فى الأبحاث المرجعيه أو فى البحث المقدم فقد وجد بعض الباحثين نتائج معاكسه. فى هذا الإتجاه وجد (Thiyagarajan and Valivittan, 2009) أن إضافة فيتامين هـ بتركيز (١٠٠ ميكرومول) إلى بيئة الإنضاج المعملى لبويضات الجاموس أطال فترة الإستزراع ولم تؤدى إلى إختلافات معنويه فى معدل الإنقسامات أو نسبة البلاستوسيست وذلك تحت ظروف إستزراع ٥% أوكسجين. ايضاً (Natarajan *et al.*, 2010) لم يجد أي تاثير معنوي لإضافة حمض الاسكوربيك بتركيزات (٠، ٥٠، ١٠٠، ٢٠٠، ٤٠٠ و ٥٠٠ ميكرومول) الى بيئة الإنضاج المعملي لبويضات الأغنام على معدل إنضاج البويضات او تطور الاجنة. بالاضافه الى ذلك وجد (Dalvit *et al.*, 2005) أن إضافة فيتامين هـ مع أو فيتامين ج إلى بيئة الإنضاج لم يكن له تأثير معنوي على معدل الإنضاج المعملي لبويضات الأبقار، ولكن تركيز فيتامين هـ الموجود طبيعيا داخل البويضات المندمجة إنخفض بمقدار النصف خلال عملية الإنضاج المعملي وعند إضافة فيتامين ج إلى بيئة الإنضاج بقيت نسبة فيتامين هـ ثابتة. أيضاً كانت تحتوي البويضات المنضجة معمليا مع فيتامين هـ والمنضجة مع فيتامين ج على كميات كبيرة من فيتامين هـ.

الخلاصة

نستخلص من هذه النتائج أن إضافة كل من الريتينول أوحمض الأسكوربيك أو α-توكوفيرول كمضادات أكسدة غير إنزيمية إلى بيئة الإنضاج المعملي يحسن من معدل تمدد خلايا التراكم المبيضى ويزيد معدل الإنضاج المعملي لبويضات الجاموس. وأن إضافة الرتينول أعطت أحسن معدل إنضاج معملى لبويضات الجاموس.

REFERENCES

Ahlemeyer, B; Bauerbach, E; Plath, M; Steuber, M; Heers, C; Tegtmeier, F. and Krieglstein, J. (2001). Retinoic acid reduces apoptosis and oxidative stress by preservation of SOD protein level. Free. Radic. Biol. Med., 30: 1067-1077.

Cajuday, L. A; Herrera, A. A. and Duran, D. H. (2012). Effect of retinoic acid on the development of Water buffalo embryos *in vitro*. Philipp. J. Vet. Anim. Sci., 38: 107-116.

Dalvit, G; Llanes, S. P; Descalzo, A; Insani, M; Beconi, M. and Cetica, P. (2005). Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte *in vitro* maturation. Reprod. Dom. Anim., 40: 93–97.

Duncan,D.B.(1955). Multiple range and multiple“F”test. Biometrics, 11: 1-42.

Feugang, J. M; Roover, R. D; Moens, A; Léonard, S; Dessy, F. and Donnay, I. (2004). Addition of β-mercaptoethanol or Trolox® at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. Theriogenology, 61: 71-90.

Fraga, C.G; Motchnik, P.A; Shigenaga, M.K; Helbock, H.J; Jacob, R.A. and Ames, B.N. (1991). Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88:11003–11006.

Gomez, E; Roriguez, A; Goyache, F; Diez, C; Joseroyo, L; Moreira, P.N; Caamano, J.S; Moran, E. and Gutierrez-ada, A. (2004). Retinoid-dependent mRNA expression and poly-(A) contents in bovine oocytes meiotically arrested and/or matured *in vitro*. J. Reprod. Dev., 69: 101-108.

Gomez, E; Royo, L; Duque, P; Carneiro, G; Hidalgo, C;Goyache, F; Lorenzo, P. L; Alvarez, I; Facal. N. and Diez, C. (2003). 9-cis-Retinoic Acid During In Vitro Maturation Improves Development of the Bovine Oocyte and Increases Midkine but Not IGF-I Expression in Cumulus-Granulosa Cells.Molecular Reproduction and Development,66:247–255.

Guerin, P; El-Mouatassim, S; and Menezo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum. Reprod. Update, 7:175-189.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1989). The chemistry of oxygen radicals and other derived species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. Free radicals in biology and medicine. 2nd edition. Oxford: Clarendon Press; pp 22–85.

Hu, J; Cheng, D; Gao, X; Bao, J; Ma, X. and Wang, H. (2012). Vitamin C enhances the *in vitro* development of porcine pre-implantation embryos by reducing oxidative stress. Reprod. Dom. Anim., 47: 873–879.

Jeong, Y. W; Park, S. W; Hossein, M. S; Kim, S; Kim, J. H; Lee, S. H; Kang, S. K; Lee, B. C. and Hwang, W. S. (2006). Antiapoptotic and embryotrophic effects of α-tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. Theriogenology, 66:2104-2112.

Kitagawa,Y; Suzuki, K; Yoneda, A. and Watanabe, T. (2004). Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. Theriogenology, 62:1186–1197.

Kowaltowski, A. J. and Vercesi, A. E. (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. Free. Radic. Biol. Med., 26: 463-471.

Lopes, S; Jurisicova, A; Sun, J. G. and Casper, R. F. (1998). Reactive oxygen species: Potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. Hum. Reprod., 13: 896-900.

Mahmoud, K.Gh.M. and Al-Shimaa Al-H.H. El-Naby (2013). Factors affecting buffalo oocytes maturation. Global Veterinaria, 11: 497-510.

Mlclea, l; Pacala, N; Zahan, M; Orlovshl, D; CÂRLEA, L. and Mlclea, V. (2012). Alpha-Tocopherol and ascorbic acid combinations have a positive effect on the maturation of pig oocytes. Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies, 69: 269-276.

Mlclea, l; Zahan, M; Andrea, H; Mlclea, V. and Roman, I. (2008). The effect of several α-tocopherol concentrations on swine oocyte maturation. Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies, 65: 366-370.

Natarajan, R; Bhawani, S.M; and Munuswamy, D. (2010). Effect of α-tocopherol supplementation on in vitro maturation of sheep oocytes and *in vitro* development of preimplantation sheep embryos to the blastocyst stage. J. Assist. Reprod. Genet.,27: 483–490.

Pascoe, G; Olafs dottier, F. and Read, D. (1987). Vitamin E protection against chemical induced cell injury: Maintenanceof cellular protein thiols as a cytoprotective mechanism. Arch. Biochem. Biophys., 256: 150-158.

SAS (2004). SAS/Stat. User's Guide Static's, Ver., 6.06 4th Ed. SAS Institute Inc. Cary, NC.

Schweigert, F.J. and Zucker, H. (1988). Concentrations of vitamin A, β-carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality. J. Reprod. Fert., 82: 575-579.

Tao, Y; Chen, H; Tian, N. N; Huo, D. T; Li, G; Zhang, Y. H; Liu, Y; Fang, F.G; Ding, J. P. and Zhang, X. R. (2010). Effects of L-ascorbic acid, α-tocopherol and co-culture on *in vitro* developmental potential of porcine cumulus cells free oocytes. Reprod. Dom. Anim., 45: 19–25.

Thiyagarajan, B. and Valivittan, K. (2009). Ameliorating effect of vitamin E on *in vitro* development of preimplantation buffalo embryos. J. Assist. Reprod. Genet., 26:217–225.

Ullah, L; Jalali, S; Khan, H; Shami, S. A. and Kiyani, M. M. (2006). Effect of L-ascorbic Acid on Ravi Buffal Oocytes During *in vitro* Maturation. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9: 2369-2394.

Vahedi, V; Zeinoaldini, S; Kohram, H. and Farahavar, A. (2009). Retinoic acid effects on nuclear maturation of bovine oocytes *in vitro*. Afr. J. Biotechnol., 8: 3974-3978.

Warren, S; Patel, S. and Kapron, C.M. (2000). The effect of vitamin E exposure on cadmium toxicity in mouse embryo cells *in vitro*. Toxicology, 142: 119-126.

EFFECT OF MATURATION MEDIA SUPPLEMENTED WITH RETINOL OR ASCORBIC ACID OR α-TOCOPHEROL ON CUMULUS CELL EXPANSION AND *IN VITRO* NUCLEAR MATURATION OF BUFFALO OOCYTES.

Khalil, W.A.; M.A. El-Harairy; A.E. Abdel-Khalek; and Z.M.R.K. Al-Palani.
Animal Production Dept., Faculty of Agric., Mansoura Univ.

ABSTRACT

The main objective of this study was to evaluate the effect of supplementing maturation media with, retinol (10 µmol/ml), ascorbic acid (100 µmol/ml) and α-tocopherol (100 µmol/ml), on cumulus cell expansion and *in vitro* nuclear maturation of buffalo oocytes. Oocytes were collected from ovaries taken from slaughterhouses. Only compact oocytes were used for *in vitro* maturation by TCM-199 medium supplemented with different vitamin levels for 22 h in CO_2 incubator at 38.5 °C, 5% CO_2 and 95% humidity. Maturation rate was determined in terms of degree of expansion of cumulus cells and oocytes at metaphase-II (nuclear maturation). Results revealed that all supplements yielded higher percentages of oocytes showing full expansion of cumulus cells (77.2, 69.4 and 69.2% for tocopherol, ascorbic acid and retinol, respectively) as compared to control medium (60.2%), but the differences were not significant. Maturation rate in term of percentage of oocytes arrested at anaphase-I, telophase-I and metaphase-II was significantly higher for media supplemented with retinol, tocopherol and ascorbic acid, being 83.5, 82.2 and 81.94% as compared to 68.54% in control medium, respectively.

Conclusively, the present results may suggest that the supplementation of maturation medium (TCM-199) with retinol, ascorbic acid and α-tocopherol as a non enzymatic antioxidants had a beneficial effect on the cumulus cell expansion and nuclear maturation of buffalo oocytes. Retinol supplementation yielded the best results.

Keywords: Buffalo oocytes, *in vitro* maturation, non enzymatic antioxidants.

قام بتحكيم البحث

أ.د / أحمد ذكى محرز — **كلية الزراعة – جامعة المنصورة**
أ.د / علاء فؤاد الدين محرز — **مركز البحوث الزراعية**