Arab Gulf J. Scient. Res. **13**(2), pp 421-433(1995)

An Evaluated Study for *In vitro* Maturation (IVM) and Fertilization (IVF) of Cattle Ova in Saudi Arabia

Al-Himaidi, A.R.,Al-Furaiji,M.M.[1] and Subh, A.M.

Zoology Department, College of Science, King Saud University, P.O. Box 2455, Riyadh 11451
[1]Department of Animal Science and Production, College of Agriculture, King Saud University, P.O. Box 2460, Riyadh 11451, Saudi Arabia

ABSTRACT. This study was conducted to explore the possibility of making use of ova collected from slaughtered cows from local abattoirs. The recovered ova was cultured *in vitro* in artificial media for *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF).

The ova collected was 115 from 31 ovaries, over a period of about 3 months. After maturation (IVM), 20 ova were fertilized. Of these, 45% reached the two cell stage, 20% reached the four cell stage, 15% reached the 8 cell stage and 20% reached the morula stage. These low rates of the developed embryos are comparable to many studies conducted elsewhere (30%).

The study indicated that such methods could be advantageous in getting hold of cows embryos with very little cost especially for the studies that do not require a large number of embryos.

Sirard, M., Lambert, R., Menard, D. and **Bedoya, M.** (1985) Pregnancies after *in vitro* fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus. *J. Reprod. Fert.* **75:** 551-559.

(Received 14/07/1994;
in revised form 08/01/1995)

References

Aoyagi, Y., Fukui, Y., Iwazumi, Y., Urakawa, M. and **Ono, H.** (1990) Effect of culture systems on development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology* **34**(4): 749-759.

Bondioli, K. and **Wright, R.** (1993) *In vitro* Fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated *in vitro*. *J. Anim. Sci.* **57:** 1001-1005.

Brackett, B., Bousquet, B., Boice, M., Donawick, W., Evans, J. and **Dressel, M.** (1982) Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod.* **27**(1): 147-158.

Camous, S., Heyman, Y., Mezion, W. and **Menezo, Y.** (1984) Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos culture with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert*, **72:** 479-485.

Eyestone, W., Northey, D. and **Leibfried - Rutledge, M.** (1985) Culture of cell bovine embryos in the sheep oviduct. *Biol. Reprod.* **32:** 100 Abstr.

Eyestone, W. and **First, N.** (1986) A study of the 8-to 16 - cell block in bovine embryo culture *in vitro*. *Theriogenology.* 25(1): 152. Abst.

Eyestone, W., Vignieri, J. and **First, N.** (1987), Co-culture of early bovine embryo with oviductal epithelium. *Theriogenology.* **27:** 22. Abstr.

Eyestone, W. and **First, N.** (1989) Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.* **85:** 715-720.

Fayrer-Hosken, R. and **Caudle, A.** (1990) Bovine *in vitro* fertilization will the technique be practical. *Embryo Transfer Newsletter* **5**(2): 1-5.

Gordon, I. (1990) *In vitro* maturation (IVM) and fertilization (IVF) of cattle Ova. *Embryo transfer Newsletter.* **8**(3): 6-11.

Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y. and **Ogawa, K.** (1988) Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes *J. Reprod Fert.* **83:** 753-758.

Hanada, A., Shloya, Y. and **Suzuki, T.** (1986) Birth of calves from nonsurgical transfer of blastocyst originated from *in vitro* fertilized oocyted matured *in vivo.* Abst of 78 *Annual Meeting of Jap. Soc. of Zootechnical Sci.* 1-35, 18 Abst.

Heyman, Y., Menezo, Y., Chesne, P., Camous, S. and **Garnier, V.** (1987) *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development up to hatched blastocysts *in vitro* *Jap. J. Anim. Reprod.* **33:** 173-179.

Iritani, A. and **Niwa, K.** (1977) Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture, *J. Reprod. Fert.* **50:** 119-121.

Lu, H., Gordon, I., Gallagher, H. and **McGovern, H.** (1987) Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro. Vet. Rec.* **121:** 259-260.

Nakao, H. and **Nakatsuji, N.** (1990) Effects of co-culture, medium components and gas phase on *in vitro* culture of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology* **33** (3): 591-600.

Parrish, J., Susko-Parrish, J., Leibfried-Rutledge, M., Crister, E., Eyestone, W. and **First, N.** (1986) Bovine *in vitro* fertilization with frozen - thawed semen. *Theriogenology* **25**(3): 591-600.

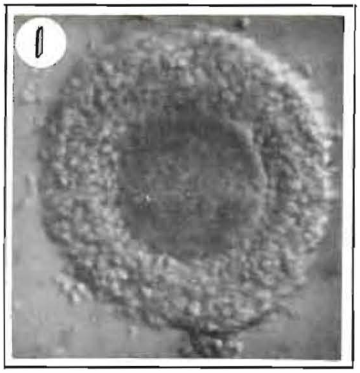
كالتي استخدمها كل من (Camous *et al.* 1984) أو (Nakao and Nakatsuji 1990) ومعاونيهم أو إتباع الأسلوب والمعدل من تجربة (Aoyagi *et al* . 1990) الذي اتبعناه هنا في هذه التجربة .

شكر وتقدير :

يتوجه المؤلفون بجزيل الشكر والتقدير إلى إدارة ومركز البحوث بكلية العلوم للمساهمة في تمويل مشروع هذا البحث وبالعرفان للمشرفين والعاملين في المسلخ المركزي بمدينة الرياض لتزويدهم لنا بمبايض الابقار ، وكذلك القائمين على مركز الخرج الزراعي (بنك الاصول الوراثية) التابع لوزارة الزراعة بمنطقة الخرج لتبرعهم لنا بالحيوانات المنوية المجمدة .

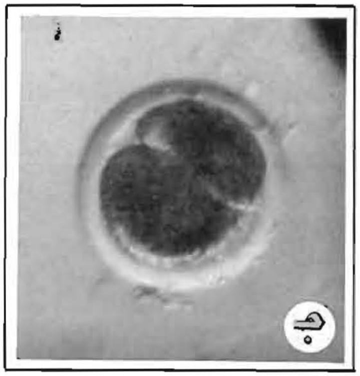
تاريخ استلام البحث : ١٤/ ٧/ ١٩٩٤م

تاريخ إعداده النهائي للنشر : ٨/ ١/ ١٩٩٥م

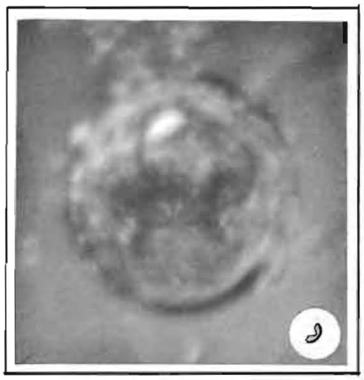


أ- بويضة محاطة بخلايا حويصلية (بعد استخراجها من البيض) .

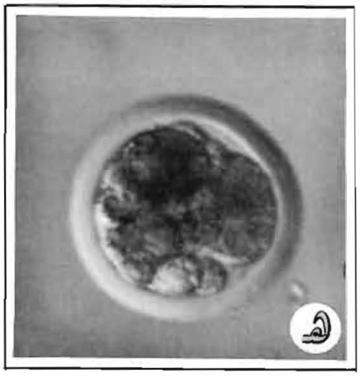
ب- بويضة مخصبة (بعد ازالة الخلايا الحويصلية عنها) .



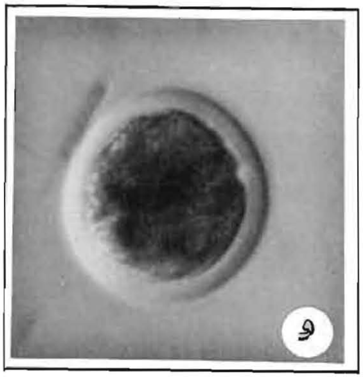
ج- جنين في طور الخليتين .



د- جنين في طور أربعة خلايا .



هـ- جنين في طور ثمانية خلايا .



و- جنين في طور التّوتيّة .

شكل رقم (١) : مجموعة من الصور توضح مراحل نمو بويضات أبقار تم تنميتها وإخصابها خارجياً . (× ٩٢)

المناقشـة

لقد أوضح (Fayrer-Hosken and Caudle 1990) في مقالتهم «الاخصاب الصناعي الخارجي في الابقار هل هي تقنية عملية» . العوامل التي تتحكم في هذه التقنية ومراحلها المختلفه وما يكتنفها من صعوبات كالتي مرت بنا خلال هذه التجربة . وعلى الرغم من قلة عدد البويضات التي تحصلنا عليها (٧ لكل بقرة) مقارنة بالمعدل الذي تحصل عليه شركة اوفاماس المحدوده ، وهو ١٠ بويضات من كل مبيض وينمو منها ٣ أجنة (Gordon 1990) مقارنة بمعدل الأجنة التي نمت لدينا ٢٥ ,١ اذا ما تم الاخذ في الاعتبار عدد المبايض التي يتم جمعها اسبوعياً في الشركة المذكورة أعلاه ما يقارب ١٠٠٠ مبيض . ويرجع ذلك لعدة أسباب منها ان عدد إناث الابقار التي تذبح في مسالخ المملكة قليلة جداً . وكذلك تمنع القوانين ذبح الاناث التي تكون في سن الانتاج كما أن الاناث التي تصل للمسلخ تعتبر إناث غير مرغوب فيها من الناحية الإنتاجية والتي قد تؤثر على نوعية البويضات المجموعة من هذه الإناث . كما أن معظم هذه البويضات وخاصة الصغيرة منها تكون غير جاهزة من الناحية الفسيولوجية للاخصاب . إلا ان تقنية تنمية البويضات المأخوذة من المبايض وأخصابها صناعياً تبقى من الوسائل الهامة والمفيدة في المجال التجريبي والبحثي للحصول على الأجنة لدراسة العوامل المختلفة التي تؤثر عليها ولايتوقف ذلك على الأبقار بل كذلك الأغنام وعلى الأخص في الجمال في مسالخ المملكة العربية السعودية والتي تعتبر من الماشية التي تصل إلى المسلخ بأعداد أكبر من غيرها الأمر الذي يجعلها مجال خصب لمثل هذا النوع من الدراسات إلا أنها لا تصلح للدراسات التي تتطلب أعداد كبيرة من الأجنة .

كما تجدر الإشارة إلى أنه يمكن التغلب على عملية تخطي مرحلة التوقف التي تحصل لأجنة الأبقار عند مرحلة طور الثمانية خلايا ولا تتعدها إلى التُّوتيّه

جدول رقم (٢) : يوضح عدد المبايض والبويضات التي تم جمعها وعدد البويضات المخصبة ومراحل النمو التي وصلت إليها الأجنة .

مجموع المبايض من ١٦ بقره	مجموع البويضات	عدد البويضات المخصبة	عدد الاجنة ومراحل نموها المختلفة				
			طور الخليتين	طور ٤ خلايا	طور ٨ خلايا	طور ١٦ خلية	طور تُوتيه
٣١	١١٥	٢٠	٩	٤	٣	-	٤

معدل البويضات المخصبة لكل بقره هو ٢٥ ,١ بويضة وبنسبة ٤ ,١٧٪ لمجموع البويضات المتحصل عليها . أما نسبة الأجنة النامية لكل البويضات المخصبة فهي ٤٥٪ لطور الخليتين و ٢٠٪ لطور أربع خلايا و١٥٪ لطور ثمان خلايا و٢٠٪ لطور التُوتيّه . وشكل رقم (١) يوضح مراحل النمو المختلفة لهذه البويضات المخصبة .

جدول رقم (١) : يوضح المكونات لمركبات بيئة تنمية البويضات ، الاخصاب ، تنمية الأجنة (لكل ١٠٠مل) .

المادة (لكل ١٠٠ مل)	بيئة تنمية بويضات المبايض	بيئة الاخصاب	بيئة تنمية الأجنـة
١- البيئة TCM-199	١, ٤٧ جرام	١, ٤٧ جرام	١, ٤٧ جرام
٢- كربونات الصوديوم $NaHCO_3$	٠, ٢ جرام	٠, ٢ جرام	٠, ٢ جرام
٣- مصل دم العجل ١٠٪ Fetal Calf Serum (FCS)	١٠ مل	--	١٠ مل
٤- مضاد حيوي Streptomycin	١ ميكروجرام	١ ميكروجرام	١ ميكروجرام
٥- بنسلين Pencillin	١ ميكروجرام	١ ميكروجرام	١ ميكروجرام
٦- هرمون المكون للجسم الأصفر LH	١٠٠ مل جرام	--	--
٧- هرمون الاستروجين (١ميكروجرام/ ١ مل)	١٠٠ مل جرام	--	--
٨- أنزيم الهيالروناديز	--	١٠ ملجرام/ ١مل	--

النتائج

لقد تم الحصول على عدد ٣١ مبيض من ١٦ بقره ذبحت بشكل متفرق على مدى ٣ أشهر وتم استخراج ١١٥ بويضه منها (بمعدل ٧ بويضات من كل بقره) . كان عدد البويضات التي أخصبت هو ٢٠ بويضه (جدول رقم ٢) .

قطرة بويضة واحدة على الأقل مزالة عنها الخلايا الحويصلية (كما في الخطوة رقم ٧ في أولاً) للاخصاب ، ثم وضعت في الحضان لمدة (ساعة تقريباً) .

٣- جمعت البويضات من بيئة الاخصاب وغسلت في بيئة جديدة (لا تحتوي على الهرمونات السابقة) ثم وزعت في البيئة على شكل قطرات في طبق بتري وغطيت بالزيت المعدني ، ووضعت في حضان درجة حرارته ٣٩°م .

٤- جرى مراقبة نمو وتطور البويضات وسجلت الملاحظات عنها كل ٦-١٢ ساعة يومياً .

٥- تم تغيير البيئة كل ٢٤ ساعة وذلك بنقل الأجنة إلى بيئة معقمة ومحضرة حديثاً .

ثالثاً : تحضير البيئة :

الجدول (١) يوضح مكونات البيئات المستخدمة لتنمية البويضات من المبايض وبيئة الاخصاب ثم بيئة تنمية البويضات المخصبة أو الأجنه .

تضاف المواد ١ ، ٤ ، ٥ المكونة للبيئة لـ١٠٠ مل ماء مقطر خالي من الأيونات ومعقم وتقسم إلى خمس مجموعات (٢٠ مل) كبيئة خام . ثم تضاف في يوم التجربة المكونات الأخرى لكل بيئة على حده والوزن المناسب للكمية (خمسها) ماعدا مصل دم العجل فهو يضاف بعد ترشيح البيئة وتهويتها لمدة ٣ دقائق بهواء يحتوي على (٩٥٪ هواء + ٥٪ ثاني أكسيد الكربون) ثم يضاف المصل بعد ذلك ويترك ليذوب بنفسه ثم يقاس الاس الهيدروجيني للبيئة . هرمون الاستروجين يتم تذويبه في كحول ١٠٠٪ (١٠ ميكروجرام/ ١مل كحول) .

٧- بعد انفصال الخلايا الحويصلية عن البويضات تم غسلها بواسطة محلول البيئة (TCM-199) لمدة ٣ مرات ثم نقلت إلى قطرات من البيئة في طبق بتري ثم تم تغطيتها بالزيت المعدني (Mineral Oil, Fisher USA) ووضعت في الحضان لحين تجهيز النطف الذكرية .

ثانيا : تجهيز النطف الذكرية واخصاب البويضات :

تم الحصول على أنابيب الحيوانات المنوية المجمدة في سائل النيتروجين -١٩٦°م (٥ × ١٠^٧/ مل تركيز وسعتها ٥ ,٠ مل) من مركز الثروة الحيوانية (بنك الأصول الوراثية) التابع لوزارة الزراعة بالخرج .

١- تمت تدفئة النطف الذكرية وذلك بوضعها في حمام مائي درجة حرارته ٣٧°م ثم خفف محلول النطف كالآتي :

أ- أضيف إلى محلول النطف ٥ ,٠ مل من محلول بيئة (TCM-199) وذلك للتخفيف الأول وكخطوة للغسيل .

ب- أخذ ٥ ,٠ مل من محلول السائل المنوي المخفف في (أ) ووضع مع ٥ ,٠ من محلول بيئة (TCM-199) مرة اخرى .

جـ- نقل ٥ ,٠ مل من محلول بيئة في (ب) إلى الجهاز التناسلي لأنثى فأر معملي [تم عمل حمل كاذب لها لكي تقوم بعملية لزيادة القدرة الاخصابية للحيوانات المنوية وذلك بوضعها مع ذكر مخصي] .

د- سحب سائل محلول النطف من الجهاز التناسلي للأنثى (بواسطة نفس الأنبوبة التي تم النقل فيها) بحيث لايقل عن ٢ ,٠ مل بعد ٥-١٠ دقيقة .

٢- اخذت ١٠ ميكرومل من السائل المنوي المخفف والمزاد قدرته الاخصابية في (د) وضع في قطره من البيئة (٥٠٠ ميكرومل (TCM-199)) تحتوي كل

السعودية (رغم قلتها مقارنة بالماشية الأخرى كالأغنام والجمال) ومدى امكانية انتاج الأجنة من البويضات المستخرجة .

المواد المستخدمة وطريقة العمل

(الطريقة معدلة من (Aoyagi *et al.* 1990) ومعاونيه) .

أولاً : تجهيز البويضات وتنميتها :

١- تم جمع مبايض من ١٦ بقره (ذبحت في أوقات متفرقة في مسلخ الرياض المركزي) ثم وضعت المبايض في محلول ملحي معقم (٩ ,٠ كلوريد الصوديوم) ودرجة حرارته ٣٨°م ثم نقلت للمعمل خلال ساعتين .

٢- بعدها تم جمع البويضات من المبايض بواسطة حقنة (حجمها ١٠ مل ومقاس ابرتها ١٨) تحتوي على محلول بيئة ٢-٣مل (TCM-199, Sigma, USA) .

٣- تم غسلها بواسطة محلول البيئة ثلاث مرات .

٤- وضعت بعد ذلك البويضات في محلول البيئة السابقة في طبق بتري صغير مضاف إليه هرموني الاستروجين (Estrogen) والهرمون المكون للجسم الأصفر (LH) Luteinzing Hormone (١ ميكرو مل/ مل) لكي تكمل الانقسام الاختزالي الثاني وتصبح مهيأة للاخصاب فيما بعد مع مراعاة الاس الهيدروجني للبيئة بحيث يتراوح بين ٢ ,٧ - ٤ ,٧ = pH .

٥- وضع الطبق الذي يحتوي على البويضات في حضان درجة حرارته ٣٩°م ومزود بتهوئة (٩٥٪ هواء + ٥٪ ثاني أكسيد الكربون) وترك لمدة ٢٢-٢٤ ساعة .

٦- ازيلت الخلايا الحويصلية من حول البويضات بوضعها في محلول بيئة يحتوي على انزيم الهيالرونديز لمدة ٢-٣ دقائق ثم وضعت في قطرة من البيئة .

أول مرة تم فيها تنمية لبويضات من مبايض الابقار واخصابها خارجيا كان بـواسـطـة (Iritani and Niwa 1977) ومعاونه ، ثـم تبعهـم بعد ذلك الـباحـث (Sirard *et al.* 1985) والـبـاحـث (Hanada *et al.* 1986) ومـعـاونـوه حـيـث استطاعـوا ان يـحصلوا على ذرية من هذه البـويضـات بإستخدام قناة بيض الأرنب كـوسيط لتنمية البويضات إلى مرحلة طور التُّوتيّه ثـم نقلهـا إلى بقرة مستقبلة حتى مرحلة الولاده ، إذ أن المعلومات المتوفرة حَتى الآن تشير إلى أن أجنة الابقار التي تنمى في البيئات الصناعية تتوقف عند مرحلة طور «ثمانية خلايا ولا تتعداها فتسمى بمرحلة التوقف ، كما سماها كل من .Brackett *et al*) 1982, Bondioli and Wright 1993, Camous *et al.* 1984) ومعاونيهم .

هناك دراسات عديده حول تنمية بويضات من مبايض الابقار في بيئات مختلفه لـلتغلب على عملية التوقف هذه ، مثل الدراسات التي أجراها الباحث (Eyestone *et al.* 1985, 1987) وذلك بإضافة خلايا طلائية من قناة البيض للبيئة التي نميت فيها أجنة تم الحصول عليها من أبقار ، أو إضافة خلايا النسيج الغذائي لاجنة أبقار أخرى إلى البيئة كالدراسة التي أجراها (Heyman *et al.* 1987) ومعاونوه كان لها الأثر في تخطى مرحلة التوقف هذه .

كما تم الحصول على ذرية من أجنة نميت في بيئة تحتوي على الخلايا الـركـاميـة (Cells of Cumulus oophorus) وهـي في المراحل الأولية للتفلج بواسطة الباحث (Goto *et al.* 1988) ومعاونيه أو بتغير مكونات للبيئة أخرى متعددة مثل تركيز الهواء والخلايا الركامية والطلائية والتي أجراها الباحث (Nakao and Nakatsuji 1990) و (Aoyagi *et al.* 1990) و معاونيهم بإستخدام قناة بيض الاغنام (Parrish *et al.* 1986) ومعاونوه و (Eyestone *et al.* 1985) ومعاونوه (Lu *et al.* 1987) ومعاونوه .

تهدف هذه التجربة إلى معرفة مدى امكانية استغلال مثل هذه التقنية في الاستفادة من مبايض الأبقار التي تذبح في المسالخ المحلية في المملكة العربية

دراسة تقييميه لتنمية بويضات من مبايض الابقار واخصابها خارجيا في المملكة العربية السعودية*

أحمد راشد الحميدي و منصور محمد الفريجي[1] و أيمن محمود صبح

قسم علم الحيوان - كلية العلوم - جامعة الملك سعود - ص .ب (٢٤٥٥) - الرياض ١١٤٥١

[1] قسم الانتاج الحيواني - كلية الزراعة - جامعة الملك سعود

ص .ب (٢٤٦٠)- الرياض ١١٤٥١ - المملكة العربية السعودية

الملخص : تتلخص هذه الدراسة في معرفة مدى إمكانية الاستفادة من مبايض الابقار التي تذبح في المسالخ المحلية واستخراج البويضات منها وتنميتها واخصابها خارجياً في بيئة صناعية لاجراء التجارب عليها . فقد تم جمع ١١٥ بويضة من ٣١ مبيض (على مدى ٣ أشهر تقريباً) فبعد تنميتها اخصبت ٢٠ بويضه منها ، وصلت ٤٥٪ منها إلى طور الخليتين ، ٢٠٪ طور أربعة خلايا ، ١٥٪ طور ثمانية خلايا ، ٢٠٪ نمت إلى طور التُّوتيهَ . فعلى الرغم من قلة عدد الاجنة النامية إلا أنها تقارب المعدل العام لمثل هذه التجارب (٣٠٪) ، كما أنها تمثل رافداً مهماً لعملية الحصول على أجنة الابقار وبتكاليف أقل خصوصاً للتجارب التي لا تتطلب عدد كبير من الأجنة .

المقدمة :

ان الإخصاب الصناعي الخارجي In Vitro Fertilization (IVF) تطور بشكل سريع ولايستفاد منه في برامج علاج العقم ونقل الاجنة فحسب بل يستخدم في مجال الهندسة الوراثية ، الأمر الذي أدى إلى قيام شركات لإنتاج أجنة أبقار ذات مواصفات وراثية معينة (Gordon 1990) .

* هذا البحث تم دعمه من مركز البحوث بكلية العلوم - جامعة الملك سعود برقم ١٤١٢/ Zool. /١٢