*Iraqi J. Biotech.,Vol. 4 , No.1:30-50 , 2005*

# التأثير الفسيولوجي للهرمونات الموجهة للقند في استحداث افراط الأباضة وانضاج البويضات واخصابها خارج الجسم في الفئران

**صلاح مهدي محسن  محمد باقر محمد رشاد فخر الدين  فريال عبد المناف المهداوي**

**قسم الاخصاب الخارجي ونقل الاجنة / مركزبحوث التقنيات الاحيائية / جامعة النهرين**

**قسم علوم الحياة / كلية العلوم/ جامعة بغداد**

**استلم بتاريخ 2004/3/5  قبل بتاريخ 2005/1/18**

**الخلاصة**

يعد اختيار برنامج مناسب لأفراط الاباضة وعملية انضاج البويضات خارج الجسم باستخدام الأوساط الزرعية من أهم الاسس لنجاح تقنيات الاخصاب المساعد سواء للأغراض الطبية أو الاقتصادية أو البحثية. لذلك صممت هذه الدراسة لغرض: 1- تحديد أفضل برنامج لأفراط الاباضة في الفئران. 2- تحديد تأثير استخدام الأوساط الزرعية على انضاج البويضات واخصابها خارج الجسم والتطور الجنيني اللاحق في الفئران. استخدمت (420) أنثى فأر، وقسمت الى سبعة مجاميع حقنت بثلاث جرع متعددة هي 10 و 15 و 30 وحدة دولية من هرمون مصل دم الفرس الحامل ( Pregnant Mare Serum Gonadotropin; PMSG) أو الهرمون الاياسي البشري ( Human Menopausal Gonadotropin; HMG) . أما مجموعة السيطرة حقنت حيواناتها بـ (0.2) مللتر من المحلول الفسيولوجي المعقم. كذلك تم اجراء تزاوج طبيعي مع ذكور طبيعية لمائة أنثى، حقنت 50 أنثى فأر منها فقط بالهرمونات لاحداث افراط الاباضة. حضنت (995) بويضة في الوسطين الزرعيين (TCM-199) و (RPMI-1640) لغرض انضاجها خارج الجسم لفترة لاتقل عن (8) ساعات. وفيما بعد حضنت البويضات المنضجة باستخدام الوسطين الزرعيين السابقين في الوسط الزرعي (MEM) وبوجود نطف نشيطة لغرض الأخصاب الخارجي لفترة (24) ساعة. سجلت نتائج برامج افراط الاباضة المتعددة وكذلك معدل عدد الولادات والنسب المئوية لانضاج البويضات واخصابها خارج الجسم.

بينت نتائج الدراسة الحالية ان حقن هرمون (PMSG) لاحداث افراط الاباضة أفضل من هرمون (HMG). كذلك أعطت برامج افراط الاباضة باستخدام الجرعة 10



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

وحدات دولية نتائجاً أفضل مقارنة مع استخدام الجرعتين (15 و 30 وحدة دولية). أشارت نتائج البحث الى وجود فروقات لم تصل درجة المعنوية احصائياً في معدل عدد الولادات بين مجموعتي الاناث المعاملة بالهرمونات عن غير المعاملة (ذات دورة طبيعية). كما اظهرت نتائج الدراسة الحالية عدم وجود فروقات معنوية في معدل انضاج البويضات المحضنة باستخدام الوسطين الزرعيين (TCM-199) و (RPMI-1640), في حين اظهر الوسط الزرعي (MEM) امكانية وكفاءة لأخصاب البويضات خارج الجسم ولكن النتائج لم ترتقي الى وجود فروقات احصائية بين مجموعتي البويضات المنضجة في الوسطين الزرعيين السابقين. نستنتج من نتائج هذه الدراسة ان حقن 10 وحدات دولية من هرمون (PMSG) في الفئران كافية لاحداث افراط الاباضة وبكفاءة عالية. كذلك أهمية استخدام الوسط الزرعي (MEM) لاخصاب البويضات خارج الجسم والمنضجة باستخدام الوسطين الزرعيين (TCM-199) و (RPMI-1640).



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

*Iraqi J. Biotech.,Vol. 4 , No.1:30-50 , 2005*

# THE PHYSIOLOGICAL EFFECT OF GONADOTROPINS FOR INDUCTION OF SUPEROVULATION AND IN VITRO OOCYTE MATURATION AND FERTILIZATION IN MICE

**Salah M.Muhsen** **Muhamed Baqir M-R. Fakhrildin** **Ferial A-M.**
**Dept.of IVF-ET/ Center for Biotechnological Research/ Al-Nahrain University**
**Dept. of Biology/ College of Science/ University of Baghdad**

**Received 3/5/2004** **Accepted 18/1/2005**

## ABSTRACT

**It was considered that the selection of appropriate superovulation program and *in vitro* maturation (IVM) by using culture media has important steps for successful of assisted reproductive techniques for medical or economical or research purposes. Therefore, this study was designed to: 1- Determination the best superovulation program in mice, and 2- Determination the effect of using of culture media on IVM and *in vitro* fertilization (IVF) and embryonic development later in mice.**

**Four hundred and twenty females were divided into seven groups and injected with (10 or 15 or 30) IU dose of either pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) or human menopausal gonadotropin (hMG), in addition to control group was injected with 0.2 ml of normal saline. Also, natural mating was achieved for fifty superovulated and fifty non superovulated females. Furthermore, nine hundred and ninety five oocytes were incubated within TCM-199 and RPMI-1640 for IVM. Then, matured oocytes and active spermatozoa were incubated within MEM for IVF. Results of superovulation programs, number of births, percentages of IVM and IVF were registered.**

**Results of the present study appeared that the injection of PMSG has results better than the hMG. Also, injection of dose 10 IU has results better than the doses 15 IU and 30 IU. Non significant differences in the number of births between superovulated and non superovulated females were reported. Also, insignificant differences in IVM between TCM-199 and RPMI-1640 were noticed. It was observed that the MEM has good ability for IVF. From the results of this study, it was concluded that the injection of 10 IU of PMSG**



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**for female mouse was effective to induce superovulaton. Also, the importance to use culture medium MEM for IVF of oocytes matured *in vitro* using culture media TCM-199 and RPMI-1640.**

**keywords: Fertilization , Superovulation Program, Gonadotropins.**

**المقدمة**



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

تُعد الاباضة من الفعاليات الوظيفية المعقدة والتي تُنظم بوساطة الهرمونات المفرزة من تحت المهاد (Hypothalamus) والتي تقوم بأفراز الهرمون المحرر لهرمونات الموجهة للقند ( Gonadotropin Releasing Hormone; GnRH) والتي تؤثر على الجزء الأمامي للغدة النخامية ( Anterior pituitary gland) حيث يقوم بافراز كل من الهرمون المحفز للجريبات (Follicle Stimulating Hormone; FSH) والهرمون المصفر ( Luteinizing Hormone; LH)(2،1). لذلك استخدمت هرمونات موجهة للقند خارجية المنشأ (Exogenous gonadotropin hormones) لتحفيز المبايض وزيادة قدرتها على انتاج اكبر عدد من البويضات بما يفوق عدد البويضات التي يحررها المبيض خلال الدورة التكاثرية الطبيعية(3).

و أصبح بالأمكان تطبيق برامج افراط اباضة عديدة في الحيوانات المختبرية والحقلية لمضاعفة اعداد البويضات للأغراض الأقتصادية والبحثية ولمعالجة العديد من حالات العقم وذلك باستخدام الهرمونات الموجهة للقند خارجية المنشأ(4) . وتعتمد كفاءة افراط الأباضة على الخواص البيولوجية و الكيميائية لمستحضرات الهرمونات الموجهة للقند الخارجية والتي هي غالباً ما يكون لها فعل مشابه لهرموني (FSH) و (LH), بالأضافة الى ذلك يتوقف نجاح عملية افراط الأباضة على عدة عوامل متمثلة بعمر الحيوان (Age) والأستجابة الفردية (Individual response) ونسيلة الحيوان (Animal breed) والتغذية (Feeding) ودرجة نقاوتها (Purity) ومصادرها اضافة الى وقت المعاملة الهرمونية(6،5). كما أشارت الدراسات الى وجود متغيرات فردية في الأستجابة لبرامج افراط الأباضة منها الحالة الفسلجية للأنثى والجانب الوراثي ونصف العمر البيولوجي (Biological half life) للهرمونات المستخدم وتكرار الحقن واخيراً الحالة الوظيفية للمبايض اثناء تطبيق برنامج افراط الأباضة (7).

وتعد عملية انضاج البويضات (Oocyte maturation) استمراراً لنمو وتطور البويضة باتجاه اكمال الأنقسام الأختزالي الأول لتتوقف البويضة في الطور الأستوائي الثاني حيث تكون جاهزة للأخصاب من قبل النطفة(4) . لذلك تُعد عملية انضاج البويضات خارج الجسم من الخطوات المهمة لنجاح تقنية الأخصاب الخارجي ( *In vitro* fertilization; IVF). ويتم انضاج البويضات خارج الجسم باساليب عديدة منها استخدام اوساط زرعية مختلفة تحتوي على العديد من العوامل البيولوجية والهرمونات وعوامل النمو والأحماض الأمينية(12،8). بالاضافة الى استخدام أوساط زرعية ساندة (Co-culture media) وذلك لأحتوائها على أنواع من الخلايا الجسمية مثل الخلايا الظهارية لقناة البيض (Oviductal epithelial cells) أو الخلايا الحبيبية (Granulosa cells)



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

أو الركامية (Cumulus cells) والتي تساعد البويضات على النضوج والنمو والأنقسام والوصول الى مراحل متقدمة من النمو الجنيني(13،14) وتركز أغلب الدراسات البحثية والتطبيقية على اضافة هرمونات سواء ستيرويدية او غير ستيرويدية تساهم في تحفيز العمليات الكيميائية الحياتية (Biochemical activities) المؤدية الى اتمام نضج البويضات(15،17). في حين اثبتت اضافة السائل الجريبي (Follicular fluid) أو سائل قناة البيض (Oviductal fluid) الى الأوساط الزرعية ازدياداً في معدلات انضاج البويضات خارج الجسم(18). وقد قام العديد من الباحثين باضافة مصل جنين العجول او الأبقار الى الأوساط الزرعية لزيادة نسبة البويضات الناضجة وتحسين معدلات الأخصاب الخارجي(19،20)، ونمو وتطور الأجنة خارج الجسم(21،22). لذلك هدف البحث الى تقييم معدل عدد البويضات عند تطبيق عدة برامج لأفراط الأباضة باستخدام نوعين من الهرمونات الخارجية الموجهة للقند وبثلاث جرع هرمونية بتراكيز مختلفة، كذلك اجراء مقارنة بين معدل عدد الولادات للأناث المعاملة هرمونياً لأحداث افراط الأباضة ومعدل عدد ولادات الأناث غير المعاملة هرمونياً، وأخيراً تقييم مختلف نتائج أنضاج البويضات واخصابها خارج الجسم باستخدام وسطين زرعيين مختلفين.

**المواد وطرائق العمل**

أولاً: برامج استحداث افراط الاباضة

1- الحيوانات: شملت الدراسة (420 ) انثى و(100) ذكر من الفئران البيضاء ( Albino strain) بعمر (7-8) اسابيع وبوزن (24-27) غرام. وضعت الفئران في غرفة مكيفة بدرجة حرارة (22-25) درجة مئوية مع تأمين نظام اضاءة يستمر لفترة 14 ساعة يومياً. وضعت الفئران في اقفاص بلاستيكية ذات ابعاد (24 X50 X17 ) سم مغطاة باغطية معدنية مشبكة. زودت الفئران بالماء والعليقة بحسب المراد (ad libitum). كما يتم غسل الارضية مرتين أسبوعياً باستخدام الصابون والمعقمات، وتعقم الاقفاص باستخدام كحول أثيلي (تركيز 70 %) طيلة فترة الدراسة.

2- المسحات المهبلية: عملت المسحات المهبلية لجميع الأناث الداخلة في هذه الدراسة ولدورتي شبق (Estrous cycle) متتاليتين وذلك للتأكد من كفاءة وسلامة الجهاز التناسلي الأنثوي. حيث تم مسح بطانة المهبل بوساطة ناقل معدني (Loop) معقم تم غمره في محلول فسيولوجي. وضعت المسحات المهبلية على شرائح زجاجية نظيفة وتركت لتجف, ثم صبغت بصبغة المثيلين الزرقاء (Methylene blue stain) لمدة ثلاث دقائق وغسلت الشرائح بعدها وفحصت تحت المجهر الضوئي بقوة تكبير (100X)(23) .



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

3- تصميم التجربة: قُسم العمل في هذه التجربة الى جزئين لدراسة تأثير حقن الهرمونات الموجهة للقند خارجية المنشأ على:

أ- افراط الأباضة: استخدمت في هذه التجربة (420 ) أنثى من الفئران وزعت الى سبعة مجاميع (كل مجموعة تضم 60 أنثى) عشوائياً اعتماداً على نوع الهرمون المستخدم وكمية الجرعة التي حقنت داخل البريتون (Intraperitoneal injection) وكما موضح في جدول (1).

ب- معدل عدد الولادات: شملت هذه التجربة (100) أنثى لغرض اجراء مقارنة بين معدلي عدد ولادات الأناث التي خضعت لبرنامج افراط الأباضة وولادات الأناث ذات الدورة الطبيعية (غير المحفزة هرمونياً ) وكما يلي:

1- المجموعة الاولى: ضمت هذه المجموعة (50) أنثى خضعت لبرنامج افراط اباضة يتكون من حقن (10) وحدات دولية داخل البريتون من هرمون (PMSG) وبعد مرور (48) ساعة, يتم حقن (10) وحدات دولية داخل البريتون من هرمون (hCG) ووضعها مع الذكور لغرض التزاوج.

2- المجموعة الثانية: ضمت هذه المجموعة (50) أنثى ذات دورة طبيعية (غير محفزة هرمونياً) وتركت للتزاوج مع الذكور.

جدول (1): يبين أعداد أناث الفئران مقسمة الى مجاميع اعتماداً على نوع الهرمون المستخدم وكمية الجرعة التي حقنت بها الاناث

| المجاميع | هرمون (PMSG; IU) | | | | هرمون (hMG; IU) | | | بعد مرور (48) ساعة من القيام بالحقنة الاولى، يتم حقن فئران المجاميع السبعة بـ (10) وحدات دولية من هرمون (hCG) لاحداث الاباضة |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 10 | 15 | 30 | | 10 | 15 | 30 | |
| 1- | 60 | | | | | | | |
| 2- | | 60 | | | | | | |
| 3- | | | 60 | | | | | |
| 4- | | | | | 60 | | | |
| 5- | | | | | | 60 | | |
| 6- | | | | | | | 60 | |
| 7- | مجموعة السيطرة حيث حُقنت اناث (60) الفئران بـ (0.2) مل من المحلول الفسيولوجي المعقم | | | | | | | |

4- جمع البويضات: تم الحصول على الجهاز التناسلي الأنثوي من قتل الحيوانات بطريقة خلع العنق (Cervical dislocation) بعد مرور (16-18) ساعة من حقن



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جرعة (hCG). وبعد التخلص من بقايا الدم والشحوم يتم غسل الجهاز التناسلي الأنثوي بالمحلول المحلي الفسيولوجي المعقم لمرتين, ويتم جمع البويضات بعد فصل وعزل قناة البيض (Oviduct) في وسط الغسل ( Flushing medium, Medi-Cult, Denmark) باحدى الطريقتين:

أ- غسل قناتي البيض (Flushing of oviducts): بعد فتح لفات قناة البيض بعد تقطيع الألياف الرابطة بين لفات القناة, غسلت قناتي البيض بـ (1) مل من وسط الغسل باستخدام محاقن نبيذة بقياس (28-G ) وبعدها جمعت البويضات.

ب- تقطيع قناتي البيض (Slicing of oviducts): يتم جمع البويضات بعد تقطيع قناتي البيض الى قطع صغيرة جداً عديدة باستخدام الماصة الميكانيكية الدقيقة. يتم غسل البويضات لمرتين متتاليتين قبل نقلها الى الوسط الزرعي لتفحص بالمجهر العاكس (Inverted microscope)(24) .

ثانياً: انضاج البويضات واخصابها خارج الجسم

1- حيوانات التجربة: شملت الدراسة (100) أنثى و (100) ذكر من الفئران البيضاء (Albino strain) بعمر (7-8) أسابيع.

2- تصميم التجربة: شملت الدراسة حقن (100) أنثى بالهرمونات لاحداث افراط الاباضة (Superovulation). حيث حقنت الاناث بـ (10) وحدات دولية من هرمون (Pregnant mare serum gonadotropin; PMSG)، وبعد مرور (48) ساعة حقنت نفس الاناث بـ (10) وحدات دولية من هرمون ( Human chorionic gonadotropin; hCG). جمعت البويضات بعد مرور (16-18) ساعة من الحقنة الاخيرة(25) . أختيرت البويضات الصالحة للانضاج والتي تكون محاطة بالركام المبيضي وذات سايتوبلازم شفاف وخال عن الانكماش ونطاق شفاف ( Zona pellucida) واضح المعالم خال من التكسر(26). كما أستعمل الوسطين الزرعيين (TCM-199 و RPMI-1640) لانضاج البويضات خارج الجسم بوجود (5 %) من غاز ($CO_2$) وبدرجة حرارة (37) مئوية لمدة لاتقل عن (8) ساعات(27،28) . وفيما بعد تم أخصاب البويضات الناضجة وذلك بحضن (8-10) بويضة مع نطف نشيطة (تركيز 1 مليون نطفة / مل) في الوسط الزرعي ( Minimum Essential Medium; MEM, Sigma, USA) والذي يتم تغطيته بزيت البرافين (Paraffin oil, Medi-Cult, Denmark) في أطباق (4-well Petri dish) خاصة بوجود (5 %) من غاز ($CO_2$) وبدرجة حرارة (37) مئوية لمدة (24) ساعة (29). وبعد انتهاء مدة الحضن تنقل البويضات بعد غسلها للتخلص من بقايا النطف الى الوسط الزرعي (MEM) مرة اخرى. حيث يتم فحصها باستخدام المجهر العاكس لملاحظة



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

حدوث الاخصاب والتطور الحاصل في انقسام الاجنة باستمرار عملية الحضن(30) . سجلت نتائج انضاج البويضات واخصابها خارج الجسم باستخدام الوسطين المذكورين سابقاً.

ثالثاً: التحليل الاحصائي

باستخدام البرنامج الاحصائي الجاهز (SPSS) تم استخراج المعدل والخطأ القياسي لكافة النتائج الأولية لهذه الدراسة بتطبيق الطرق الأحصائية التقليدية، وفيما بعد استخدمت التحليلات الأحصائية وهي فحص (Student *t*- test), وفحص تحليل التباين (Analysis of variance; ANOVA) وفحص مربع كاي (Chi-Square test) اعتماداً على نوع التجربة ونتائجها.

## النتائج والمناقشة

أولاً: برامج استحداث افراط الاباضة

اشارت نتائج الدراسة الحالية الى أن برامج افراط الأباضة باستخدام هرمون (PMSG) اكثر كفاءة مقارنة عند حقن هرمون (hMG), حيث أوضحت نتائج التحليل الأحصائي حصول ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في معدل عدد البويضات التي تم الحصول عليها من الأناث المعاملة بالجرع (10 و 15 و 30 وحدة دولية) من هرمون (PMSG) (18.53 $\pm$ 1.07 و 17.36 $\pm$ 1.16 و 13.53 $\pm$ 0.88) مقارنة مع نفس الجرع من هرمون (hMG) (13.73 $\pm$ 1.12 و 14.38 $\pm$ 0.74 و 12.18 $\pm$ 0.57) على التوالي (شكل 1). كما بينت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدل عدد البويضات لمجموعة السيطرة مقارنة بمجاميع الحيوانات المعاملة الأخرى. وهذه النتائج متقاربة مع العديد من الدراسات(31،33) .

كما اشارت نتائج هذه الدراسة الى وجود ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في معدل عدد البويضات عند حقن هرمون (PMSG) بالجرعتين (10 و 15) وحدة دولية مقارنة مع الجرعة (30) وحدة دولية لنفس الهرمون (شكل 1). في حين اظهرت الدراسة انعدام الفرق المعنوي لمعدل عدد البويضات بين مجاميع الجرع (10 و 15 و 30) وحدة دولية لهرمون (hMG). وقد وجد الباحثين ان هرمون (PMSG) يسبب افراط الأباضة بواسطة انقاذ الجريبات المبيضية ذات الغار (Antral follicles) من التحلل بما يسمح بوصولها الى مرحلة الأباضة وقد فسرت امكانية هرمون (PMSG) على منع تحلل الجريبات من خلال اما تنبيه و تحفيز افراز الأستروجين الجريبي أو زيادة مستقبلات هرمون (LH) الذي يساعد على وصول الجريبات المبيضية الى مرحلة



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

النضوج التام وتحفيزها على افراز الاستروجين الذي يساهم بدور مهم في انضاج البويضات (34). وقد تعود كفاءة هرمون (PMSG) في احداث افراط الأباضة الى طول عمر النصف (26 ساعة) لهذا الهرمون حيث يعطي فرصة افضل لنمو اكبر عدد من الجريبات على مبايض الحيوانات المعاملة بهذا الهرمون وبالتالي زيادة عدد البويضات الجاهزة للاباضة مقارنة مع طول عمر النصف (3.3 ساعة) لهورمون (hMG)(35). وقد يعزى الأختلاف في استجابة مبايض الفئران لكل من هرموني (PMSG) و (hMG) الى اختلاف الخواص الكيميائية والبايولوجية ودرجة النقاوة ومصادرها وعمرها النصفي لهذه المستحضرات الهرمونية (7).

بينت نتائج التحليل الأحصائي عدم وجود فرق معنوي بين معدل عدد الولادات للفئران التي تزاوجت طبيعياً والفئران التي تزاوجت بعد معاملتها بهرمون (PMSG) لأحداث افراط الأباضة وقد بلغ معدل الولادات ($6.66 \pm 0.39$) و ($6.49 \pm 0.37$) على التوالي (شكل 2). وقد جاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة مع ما توصل اليه الباحثين (36), حيث أشاروا ان حقن الهرمونات خارجية المنشأ لأحداث افراط الأباضة قد يؤدي الى حدوث تشوهات في الخلايا البيضية وبالتالي انخفاض عدد الولادات نتيجة ارتفاع مستوى الهرمونات الستيرويدية (37،38). وهناك اسباباً عديدة تكمن وراء عدم الحصول على زيادة في معدل عدد الولادات في الأناث المحفزة مبايضها هرمونياً مقارنة مع الأناث ذات الدورة الطبيعية (غير محفزة هرمونياً ) منها حصول الأباضة المبكرة نتيجة حقن هرمون (PMSG) الذي يملك نشاطاً هرمونياً مشابه لهرموني (FSH) و (LH) بحيث يكون تأثير هرمون (LH) كافياً لحصول الأباضة المبكرة, وهذا يتفق مع ما توصل اليه الباحثين لعملية الأباضة المبكرة(39), أو ارتفاع نسبة الأجنة المفقودة في الأناث المعاملة هرمونياً مقارنة مع مجموعة السيطرة(40). كما قد يكون استخدام هرمونات افراط الأباضة سبباً لانخفاض مستوى هرمون البروجستيرون وبالتالي يؤدي الى انخفاض في كفاءة الرحم لأستقبال الأجنة(41). كما ان عدم كفاية جرعة هرمون (hCG) خارجي المنشأ وهرمون (LH) داخلي المنشأ قد يكن سبباً في عدم اطلاق جميع البويضات من الجريبات المبيضية التي استجابت لهرمون (PMSG). وهذا يشير الى عدم حدوث الأباضة في جميع الجريبات وبالتالي اخصاب عدد قليل من البويضات وبنتيجة الحال انخفاض عدد الولادات. لقد جاءت هذه النتائج متقاربة مع العديد من الدراسات التي جرت لزيادة عدد الولادات في الحيوانات المختبرية باحداث افراط الأباضة حيث كانت نتائج تلك المحاولات غير مشجعة نظراً لكثرة الوفيات قبل الولادة والأجهاض وازدياد الشذوذ الكروموسومي وتشوه الأجنة, وكذلك الحمل المضاعف (Multipregnancy) مما يؤدي الى عسر الولادة حيث ان ازدحام الرحم (Crowded uterus) في بعض الحيوانات كالفئران يؤدي الى صعوبة في الولادة وبالتالي يُعد الحصول على ولادات حية أمراً صعب(42،43) .

ثانياً: انضاج البويضات واخصابها خارج الجسم



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جمعت في هذه الدراسة (995) بويضة من (100) أنثى خضعت لبرنامج افراط الأباضة. اذ اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان استخدام الوسطين الزرعيين (TCM-199) و (RPMI-1640) لانضاج البويضات خارج الجسم قد أعطت نتائج جيدة حيث بلغت نسبة الأنضاج (69.36 % و 66.25 %) على التوالي، وبينت نتائج التحليل الأحصائي عدم وجود فرق معنوي في معدل انضاج هذين الوسطين الزرعيين (جدول 2). ان نسبة الأنضاج في وسط (TCM-199) توافقت مع ما توصل اليه عدداً من الباحثين [44-46]، حيث كانت نسب الأنضاج (71 % و 64 % و 78 %) على التوالي. ان النتائج المتقاربة لأنضاج البويضات خارج الجسم لهذين الوسطين يدل على كفاءتهما من خلال احتواء تركيبتهما الكيميائية على العديد من الأحماض الأمينية ومصادر الطاقة مثل الكلوكوز والبايروفيت اضافة الى العديد من العناصر والأملاح الضرورية لاتمام نضج البويضات.

كانت نسبة الأخصاب الكلي للبويضات التي تم انضاجها في الوسط الزرعي (TCM-199) (79.20 %) (جدول 1), وشملت هذه النسبة على (41.02 %) من البويضات الملقحة طبيعياً والتي تطورت الى مراحل جنينية تتضمن (2 و 4 و 8) خلايا حيث بلغت نسبتها (60.41 % و 27.08 % و 12.51 %) على التوالي (جدول 3)، وكانت نسبة (38.17 %) من البويضات الملقحة والشاذة مظهرياً. في حين اعطت البويضات التي تم انضاجها في الوسط الزرعي (RPMI-1640) نسبة اخصاب خارجي كلي (75.92 %) (جدول 1)، وكانت منها نسبة (39.81 %) من البويضات الملقحة طبيعياً والتي تطورت الى مراحل جنينية تتضمن (2 و4 و 8) خلايا حيث بلغت نسبتها (56.58 % و 30.23 % و 13.17 %) على التوالي, في حين كانت نسبة البويضات الملقحة الشاذة مظهرياً هي (36.11 %) (جدول 3).

بينت نتائج الأخصاب الخارجي ظهور نسبة من البويضات الشاذة مظهرياً. وقد يعود السبب في ذلك الى أسباب عديدة منها ارتفاع درجة الحرارة اثناء فترة الحضن والتي تؤثر بصورة سلبية على فعاليات ووظائف البويضات من خلال تأثيرها على النشاط الأنزيمي وهذه بدورها تؤثر على عملية تخليق البروتينات اللازمة لنمو وتطور الأجنة الى المراحل المتقدمة [47]. كذلك يؤدي ارتفاع درجة الحرارة الى انخفاض ذوبان غاز ($CO_2$) في الوسط الزرعي بالتالي زيادة حموضة الوسط الزرعي حيث يؤثر هذا العامل على فعالية النظام الأنزيمي والفعاليات الحيوية والبنائية للبويضات [48]. كما تؤدي زيادة حموضة الوسط الزرعي الى حصول حالة الأخصاب بنطف متعددة (Polysperm) مما يؤدي الى حدوث تشوهات في الأجنة النامية(49). لقد اكد الباحثين حدوث نسبة من التشوهات الجنينية الناتجة من بويضات مخصبة خارج الجسم يعود الى عدم اكتمال نضوج البويضات تماما(14) .

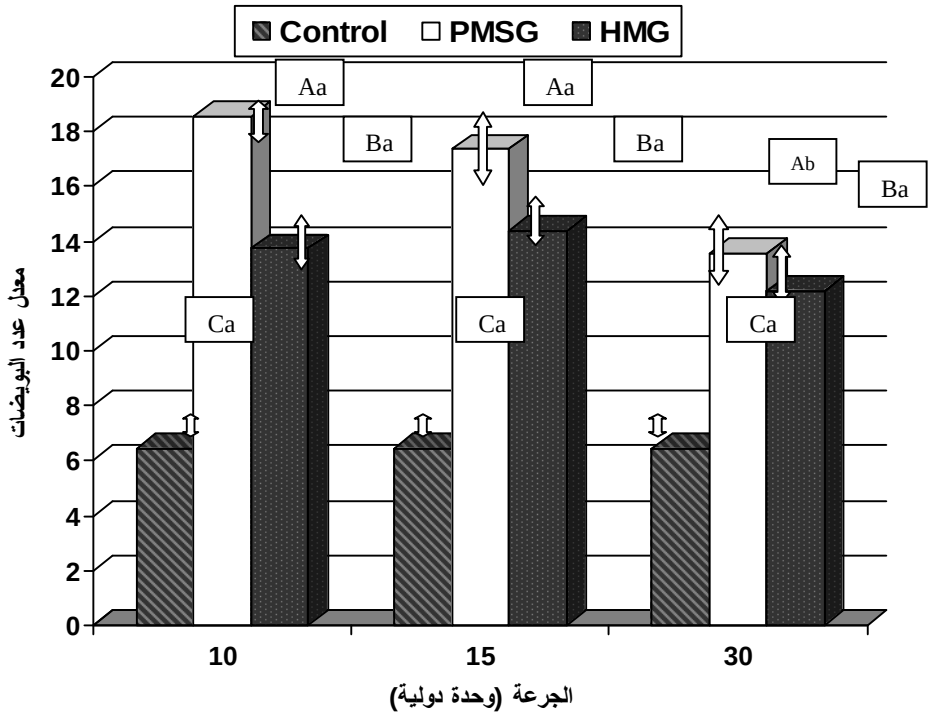


PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

نستنتج من هذه الدراسة ان هرمون (PMSG) اظهر كفاءة اكثر من هرمون (hMG), كذلك اعطت الجرعة (10) وحدات دولية من هرمون (PMSG) أفضل النتائج مقارنة مع الجرع (15 و 30) وحدة دولية. كما تشير النتائج الى امكانية انضاج البويضات خارج الجسم باستخدام الوسطين الزرعيين (TCM-199) و (RPMI-1640).



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com




شكل (1): معدل عدد البويضات لفئران* مجموعة السيطرة والمعاملة بثلاث جرع من هرمون (PMSG) وهرمون (hMG)

*: كل مجموعة تحوي (60) انثى فأر.

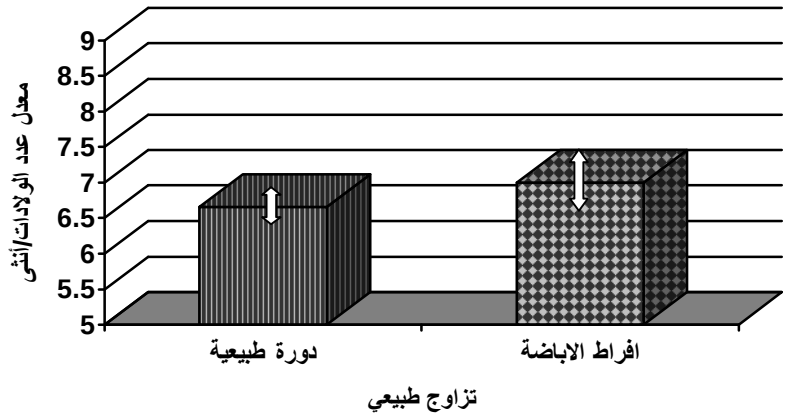
*: الأحرف الكبيرة للمقارنة بين مجاميع نوعي الهرمون والسيطرة لنفس الجرعة.

*: الأحرف الصغيرة للمقارنة بين الجرعات الهرمونية الثلاثة لنفس الهرمون.

*: الأحرف المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P<0.05$).



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com




شكل (2): معدل عدد الولادات الناتجة من فئران* ذات دورة طبيعية (غير محفزة هرمونياً) واخرى محفزة هرمونياً باستخدام 10 وحدات دولية من هرمون (PMSG) لاحداث افراط الاباضة

* كل مجموعة تحوي (50) انثى فأر.



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول (2): يوضح عدد البويضات المحضنة في الوسطين الزرعيين (TCM-199 و RPMI-1640) والنسب المئوية لانضاج واخصاب البويضات وتطور الأجنة خارج الجسم في الفئران

| الوسط الزرعي المستخدم | عدد البويضات المحضنة | البويضات الناضجة خارج الجسم | | البويضات المخصبة* خارج الجسم | | تطور الاجنة خارج الجسم | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | طبيعي | | شاذ | |
| | | العدد | (%) | العدد | (%) | العدد | (%) | العدد | (%) |
| **TCM-199** | **506** | **351** | **69.36** | **278** | **79.20** | **144** | **41.02** | **134** | **38.17** |
| **RPMI-1640** | **489** | **324** | **66.25** | **246** | **75.92** | **129** | **39.81** | **117** | **36.11** |
| **الكلي** | **995** | **675** | **67.84** | **524** | **77.63** | **273** | **40.44** | **251** | **37.18** |

* وسط الاخصاب المستخدم (MEM).



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول (3): يوضح اعداد والنسب المئوية لمراحل التطور الجنيني خارج الجسم الناتجة من بويضات مخصبة تم انضاجها في الوسطين الزرعيين (TCM-199 و RPMI-1640) مسبقاً

| الوسط الزرعي المستخدم | عدد الاجنة الكلي | التطور الجنيني خارج الجسم | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | مرحلة الخليتين | | مرحلة الاربع خلايا | | مرحلة الثمان خلايا | |
| | | العدد | (%) | العدد | (%) | العدد | (%) |
| TCM-199 | 144 | 87 | 60.41 | 39 | 27.08 | 18 | 12.50 |
| RPMI-1640 | 129 | 73 | 56.58 | 39 | 30.23 | 17 | 13.17 |
| الكلي | 273 | 160 | 58.60 | 78 | 28.58 | 35 | 12.82 |



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

## المصادر

1. Guyton, AC. (1981). Reproductive and hormonal functions of the male and the pineal gland. In: Textbook of medical physiology. Guyton, AC. (ed.). W. B. Saunders Company. Pp: 992-1004.
2. Hafez, ESE.; Jainudeen, MR. and Rosnina, Y. (2000). Hormones, growth factors and reproduction. In: Reproduction in Farm Animals. Hafez, ESE. and Hafez, B. (eds.). 7th edition. Lippincott Williams and Wilkins, Awolte Kluwer Co., Philadelphia, USA. Pp: 110-139.
3. Cognie, Y. (1999). State of the ART in sheep – goat embryo transfer. Theriogenology. 61: 105-116.
4. Reiss, H. (1998). Reproductive medicine from A-Z. Brinsden, P.; Hartshorne, G.; Hirsh, A.; Owen, E. and Reiss, M. (eds.). Oxford Medical Publications. Oxford Medical Press, Oxford, UK. p: 94.
5. Betteridge, KJ. (1981). An historical look at embryo transfer. J. Reprod. Fert. 62: 1-13.
6. Lauria, A.; Genazzani, AR.; Oliva, O.; Inaudi, PI.; Cremonesi, F.; Monittola, C. and Aureli, G. (1982). Clinical and endocrinological investigations in superovulation induced in heifers by human menopausal gonadotropin. J. Reprod. Fert. 66: 219-225.
7. Armstrong, DT. and Leung, PCK. (1990). The physiological basis of superovulation. Smin. Reprod. Endocr. 8: 219-231.
8. Warnes, GM.; Moor, RM. and Johnson, MH. (1977). Changes in protein synthesis during maturation of sheep oocytes *in vivo* and *in vitro*. J. Repord. Fert. 49: 331-335.
9. Stagimiller, RB. and Moor, RM. (1984). Effect of follicle cells on the maturation and development competence of ovine oocyte matures outside the follicle. Gamete Res. 9: 221-229.
10. Trounson, A. and Caro, A. (1984). Research in human *in vitro* fertilization and embryo transfer. Br., Med. J. 285: 244.
11. Sokoloski, JE. and Walf, DP. (1989). Laboratory conditions for human *in vitro* fertilization in: Human Fertilization *in vitro*. Wolf, DP. and Quigley, MM. (eds.). Plenum Press New York, USA. Pp: 128.
12. Choi, YH.; Love, CC.; Varner, DO.; Thompson, JA. and Hinrichs, K. (2001). Activation of cumulus free equine oocytes: Effect of maturation medium, Calcium ionophore concentration and duration of cycloheximide exposure. J. Reprod. Fert. 122: 177-183.



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

13. Moor, RM. (1983). Contact, Signalling and Cooperation between follicle cells and dictyate oocyte in mammals. In: Current problems in germ cell differentiation. Mclaren, A. and Wylie, CC. (eds.). University Press, Cambridge. Pp: 307-326.
14. Moor, RM. and Gandolfi, F. (1987). Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs. J. Repord. Fert. Suppl. 34: 55-69.
15. Gran, DG. and Moor, RM. (1980). The development of oocytes and ovarian follicles of mammals. Sci. Prog. Oxf. 66: 371-383.
16. Crosby, IM.; Osborn, JC. and Moor, RM. (1981). Follicle cell regulation of protein synthesis and development competence in sheep oocytes. J. Reprod. Fert. 62: 575-582.
17. Dekel, N. and Shalgi, R. (1987). Fertilization *in vitro* of rat oocytes undergoing maturation in response to GnRH analogue. J. Reprod. Fert. 80: 531-535.
18.Hafez, ESE. and Hafez, B. (2000). Folliculogenesis, Egg Maturation and Ovulation. In: Reproduction in Farm Animals. Hafez, ESE. and Hafez, B. (eds.). 7th Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Awolter Kluwer Co., Philadelphia. pp: 68-81.
19. Robert, CM.; Anita, MH.; Paul, GM. and Jeffrey, B. (1991). Influence of growth factor in defined culture medium on *in vitro* development of mouse embryos. Fert. Steril. 1: 194-198.
20. Crozet, N.; Ahmed-Ali, M. and Dubos, MP. (2000). Development competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. J. Reprod. Fert. 103: 298.
21. Leung, PCS.; Gronow, MT.; Kellow, GN.; Lopata, A.; Speirs, AL.; McBain, JC.; du Plessis, YP. and Johanston, I. (1984). Serum supplement in human *in vitro* fertilization and embryo development. Fert. Steril. 41: 36.
22. Ball, GD.; Coulam CB.; Field, CS.; Harms, RW.; Thie, JT. and Byers, AP. (1985). Effect of serum source on human fertilization and embryonic growth parameters *in vitro*. Fert. Steril. 44: 75.
23. Husman, GL. (1967). Animal tissue techniques. 2nd ed. W. H. Freeman and company San Francesco and London. 560-569.



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

24. Madan, ML.; Singla, SK.; Chauhan, MS. and Manik, RS. (1994). *In vitro* production and transfer of oocytes in bffaloes. Theriogenology. 14: 139-143.
25. Al-Chalabi, SMM. (2003). Materials and Methods. In: Physiological effect of gonadotropin for induction of superovulation and *in vitro* maturation and fertilization of oocytes in mice. M. Sc. Thesis, College of Science, University of Baghdad. Pp: 35-47.
26. Keskintepe, L.; Simpicio, AA. and Breckett, BG. (1998). Carpine blastocyst development after *in vitro* fertilization with spermatozoa frozen in different extenders. Theriogenology. 49:1265-1274.
27. Fulka, J. and Okolski, A. (1981). Culture of horse oocytes *in vitro*. J. Reprod. Fert. 61: 213-215.
28. Obsorn, I. (1993). Oocyte retrival and maturation. In: Handbook of *in vitro* fertilization. Trounson, A. and Gardner, D. (eds.). CRC Press Boca Raton, FL., U.S.A. 2nd ed. Pp: 17-32.
29. Brain, D. and Kay, E. (1997). Sperm-oocyte interaction. In: *In vitro* fertilization. Brain, D. and Kay, E. (eds.). Cambridge University Press. Pp: 19-44.
30. Jainudeen, MR.; Wahid, H. and Hafez, ESE. (2000). Ovulation induction, embryo production and transfer. In: Reproduction in Farm Animals. Hafez, ESE. and Hafez, B. (eds.). 7th Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Awolter Kluwer Co., Philadelphia. pp: 405-430.
31. Hirshfield, AN. (1986). Effect of low dose of pregnant mare serum gonadotropin on follicular recruitment and atresia in cycling rats. Biol. Reprod. 35: 113-118.
32. Santalo, J.; Esto AM. and Egozcue, J. (1986). The chromosome complement of first-cleavage mouse embryos after *in vitro* fertilization. J. IVF-ET. 3: 99-105.
33. Sato, F. and Marrs, RP. (1986). The effect of pregnant mare serum gonadotropin on mouse embryos fertilized *in vivo* or *in vitro*. J. IVF-ET. 3: 353-357.
34. Brow, RH. and Tsafriri, A. (1980). Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. J. Reprod. Fert. 59: 267-272.
35. Armstrong, DT.; Pfitzner, AP.; Warnes, GM.; Ralph, MM. and Seamark, RF. (1983). Endocrine responses of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. J. Reprod. Fert. 67: 395-401.



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

36. Beaumont, DM. and Smith, AF. (1975). Embryonic mortality during the pre- and post-implantation periods of pregnancy in mature mice after superovulation. J. Reprod. Fert. 45: 437-448.
37. Miller, BG. and Armstrong, DT. (1981). Superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotropin caused delayed implantation and infertility in immature rats. Biol. Reprod. 25: 253-260.
38. Yun, YW.; Yuen, BH. and Moon, YS. (1988). Effects of anti – androgen flutamide on oocyte quality and embryo development in rats superovulated with pregnant mare serum gonadotropin. Biol. Reprod. 39: 279-286.
39. Yun, YW.; Yuen, BH. and Moon, YS. (1987). Effects of superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotropin on oocyte quality and ovulatory and steroid hormone responses in rats. Gamete Res. 16: 109-120.
40. Opavsky, MA. and Armstrong, DT. (1989). Effect of luteinizing hormone on superovulatory and steroidogenic responses of rat ovaries to infusion with follicule stimulating hormone. Biol. Reprod. 40: 15-25.
41. Kossoy, LR.; Hill, GA.; Gettys, TW.; Brodie, BL.; Herbert, CM. and Wentz, AC. (1989). Results of *in vitro* fertilization in normal ovulatory women treated with pure FSH analysis of the estradiol response. Hum. Reprod. 4: 754-756.
42. Mizoguchi, H. and Dukelow, WR. (1981). Fertilizability of ova from young or old hamsters after spontaneous or induced ovulation. Fert. Steril. 35: 79-83.
43. Theuring, F. and Hansman, T. (1986). Chromosomal abnormalities caused by hormonal treatment with LH-RH and gonadotropins. Hum. Reprod. 1: 41-42.
44. Fukui, Y.; Fukushima, M.; Terawaki, Y. and Ono, H. (1982). Effect of gonadotropins, Steroids and cultur media on bovine oocyte maturation *in vitro*. Theriogenology 81: 161-174.
45. Liehman, P.; Greve, T. and Xu, KP. (1986). Nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocyte cultured with FSH and hCG. Acta. Vit. Scand. 27: 566-574.
46. Sato, E.; Matsun, M. and Miyamoto, H. (1990). Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro* improvement of meiotic competence by



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

dibutyryl cyclic adenosine 3, 5 – monophosphate. J. Anim. Sci. 68: 1182-1187.

47. Baumgrtner, AB. and Chrisman, CL. (1987). Embryonic mortality caused by maternal heat stress during mouse oocytes maturation. Anim. Reprod Sci. 14: 309-316.
48. Al- Katanani, YM. and Hansen, DJ. (2002). Induced thermotolerance in bovine tow-cell embryo and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. Mol. Reprod. Deve. 62: 147-180.
49. Verbessem, D.; Camu, F.; Devroey, P. and Steirteghem, A. (1988). Pneumoperitoneum induced pH changes in follicular and Douglas fluids during labroscopic oocyte retrival in human. Hum. Reprod. 6: 751-754.



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com