J. Animal and Poultry Prod., Mansoura Univ., Vol.9 (2): 95 - 102, 2018

Effect of Maturation Media Supplemented with Hyaluronic Acid, Hayl$_2$, or Both on Cumulus Cell Expansion and *In Vitro* Nuclear Maturation of Buffalo Oocytes.

El-Harairy, M. A.[1]; W. A. Khalil[1]; N. A. Shalaby[1]; W. F. A. Marei[2] and A. E. Mowafy[1]

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

[2]Department of Theriogenology, faculty of veterinary medicine, Cairo University, Giza 12211, Egypt.

تأثير بيئة الإنضاج المضاف اليها حمض الهيالورينيك - إنزيم الهييالوروندييز اوكليهما على معدل تمدد الخلايا الركامية والنضج النووي لبويضات الجاموس معملياً

مصطفي عبد الحليم الحرايري[١]، وائل أحمد خليل[١]، ناظم عبد الرحمن شلبي[١]، وليد فوزي عبد العزيز مرعى[٢] وأحمد السيد أحمد إبراهيم موافي[١]

[١]قسم إنتاج الحيوان – كلية الزراعة – جامعة المنصورة.

[٢]قسم التوليد والتلقيح الاصطناعي – كلية الطب البيطري – جامعة القاهرة.

الملخص

يعتبر حمض الهيالورينيك عنصرا هاماً ومكوناً رئيسياً من مكونات المصفوفات خارج الخلية، ويلعب دورا هاماً وحاسماً في تمدد الخلايا الركامية حول البويضة. في الأنواع المختلفة من الحيوانات يتم التعبير عن الجينات والبروتينات المشاركة في تخليق حمض الهيالورينيك ومستقبلاتها CD44 في تجمعات البويضات (COCs) وتزداد نسبتها أثناء عملية الإنضاج. إنزيمات الهييالوروندييز ($Hyal_2$) تعمل علي تحلل جزيئات حمض الهيالورينيك إلى شظايا صغيرة من حمض الهيالورينيك النشطة بيولوجيا. ولذلك كان الهدف الرئيسي لهذه الدراسة هو التحقيق في آثار الحجم الجزيئي وتركيز حمض الهيالورينيك على نضج بويضات الجاموس معملياً وكذلك تمدد الخلايا الركامية، وذلك عن طريق دراسة تأثير إضافة كل من حمض الهيالورينيك (٠.٥ مليجرام/مللي)، أو إنزيم الهييالوروندييز ($Hyal_2$) (٣٠٠ وحده دولية/مللي)، أو كليهما كإضافات إلى بيئة الإنضاج المعملي على كل من معدل تمدد الخلايا الركامية ومعدل الإنضاج المعملي لبويضات الجاموس.حيث تم جمع البويضات من مبايض الجاموس المذبوحة من المجازر واستزراع البويضات الجيدة والمقبولة في بيئة الإنضاج المعملي (بيئة زراعة الأنسجة-١٩٩) مضافاً إليها المعاملات بالتركيزات المذكورة لمدة ٢٢-٢٤ ساعة في حضان ثاني أكسيد الكربون على درجة حرارة ٣٨.٥°مئوية وثاني أكسيد كربون ٥% وأكثر من ٩٥% رطوبة. وبعد عملية الإنضاج تم تقييم معدل تمدد الخلايا الركامية وكذلك معدل النضج النووي للبويضات.تشير النتائج إلى قيام إنزيم الهييالوروندييز $Hyal_2$ بتثبيط توسع الخلايا الركامية دون التأثير على النضج النووي للبويضات. لم تؤثر المعاملة بحمض الهيالورينيك علي تحسن للتمدد الكلي للخلايا الركامية ولكنة حسن من معدل النضج النووي، وأنخفض التمدد الكلي للخلايا الركامية بصوره معنويه عند المعاملة بـإنزيم الهييالوروندييز $Hyal_2$ بالمقارنه بالمجموعة القياسية والمعاملة بحمض الهيالورينيك، وعند إضافة مكمل خارجي من حمض الهيالورينيك بتركيز (٠.٥ مليجرام / مللي) إلى بيئة الإنضاج المضاف إليها إنزيم الهييالوروندييز $Hyal_2$ (٣٠٠ وحده دولية /مل) لم يؤثر على معدل تمدد الخلايا الركامية للبويضات.أيضا كان أعلى معدل إنضاج نووي (البويضات التي وصلت إلى الطور الاستوائي الثاني) معنوياً للبيئات المضاف اليها حمض الهيالورينيك ومزيج من حمض الهيالورينيك و($Hyal_2$) كذلك $Hyal_2$ على التوالي مقارنة بالبيئة القياسية.نستخلص من هذه النتائج أن إضافة حمض الهيالورينيك كإضافات غير إنزيمية إلى بيئة الإنضاج المعملي لم يؤثر على معدل تمدد الخلايا الركامية،ولكنة يزيد من معدل الإنضاج المعملي لبويضات الجاموس، وأنه لا يوجد إرتباط بين كل من تمدد الخلايا الركامية والنضج النووي لبويضات الجاموس المنضجة معملياً.

الكلمات المفتاحية: الجاموس، البويضات، الإنضاج المعملي، حمض الهيالورينيك، إنزيم الهييالوروندييز.

المقدمة

يشكل الجاموس جزءاً مهماً جداً لا يمكن إغفاله من الاقتصاد الزراعي حيث يمثل الحيوان الأول في إنتاج اللبن في مصر. إلا أن الجاموس لديه قدرة منخفضه على التكاثر، وقد يرجع ذلك إلى إنخفاض العدد الإجمالي للحويصلات المبيضية على سطح المبيض (Agrawal and Tommer, 1998). وقد أصبح ضعف القدرة التناسلية للجاموس المتمثلة في تأخر الوصول للنضج الجنسي، وزيادة العمر عند أول ولادة، وموسمية التناسل، وطول الفترة ما بين ولادتين، والتبويض الصامت، وانخفاض عدد البويضات وإنخفاض الاستجابة للتبويض المتعدد من العوامل التي تعيق التحسين الوراثي لهذا النوع من الحيوانات (Nandi *et al.,* 2002). وقد بذلت جهود عديده لزيادة القدرة التناسلية لهذا الحيوان باستخدام التقنية الحيوية (Madan *et al.,* 1994). ومن هذه التقنيات الحديثة في التناسل التلقيح الصناعي، إنضاج البويضات وإخصابها معملياً، إنتاج وإستزراع الأجنة معملياً، نقل الأجنة والاستنساخ وغيرها من التطبيقات الحديثة (Choudhary *et al.,* 2016). ولسنوات عديدة، كان هناك إهتمام كبير في تطبيق التقنيات التناسلية الحديثة في الجاموس، سواءً بالنسبة للأغراض البحثية أو لأغراض تحسين الإنتاجية. ومع التوسع في عملية إنتاج الجاموس من الناحية التجارية تم محاولة استخدام نفس التقنيات الحديثة للتناسل المستخدمة في الأبقار (الإخصاب المعملي) وتطبيقها في الجاموس. وعلى الرغم من أوجه التشابه الكبيرة فيما بين الأبقار والجاموس، والتي سهلت من عملية التطبيق المباشر لهذه التقنيات على الجاموس، (إلا أن الإختلافات الهامة في علم الأحياء وكذلك التربية بين الجاموس والماشية أعطت إمكانيات محدودة من التطبيق والنجاح). وتعتبر تقنية الإخصاب المعملي هي عامل رئيسي في الإنتاج التجاري للأجنة ونقل الاجنة، وتتيح إستخدام تلك التقنية الفرصة لتنفيذ برامج جديدة وحديثة في نطاق تربية الحيوانات وإنتاجها (Abd-Allah, 2015).

حالياً تعتبر تقنية الإخصاب المعملي تقنية يتم إجرائها على نطاق واسع، ولكن معدلات نجاحها لا تزال منخفضة، إلا أن عدد مرات إجرائها وكذلك عدد الحيوانات التي عوملت بها استمرت في الارتفاع على مدى السنوات القليلة الماضية (Hfea, 2010). وتعتبر تقنية الإخصاب المعملي هي تقنية متعددة الخطوات تشمل إنضاج البويضات، وإخصاب البويضات وزرع الأجنة معملياً (Li *et al.,* 2006).

وتعتبر عملية الإنضاج المعملي من أهم الخطوات اللازمة لنجاح عملية الإخصاب لبويضات الجاموس معملياً، ومن العوامل التي تؤثر عليها موسم التناسل، إضافات البيئة سواء لبيئة الإنضاج أو لبيئة الإخصاب المعملي، حجم الحويصلات، طريقة جمع البويضات، جودة البويضات، وجود الخلايا الركامية، حالة المبيض وطول فترة الإنضاج المعملي (Mahmoud and AL-Shimaa, 2013). وتتضمن عمليه الانضاج المعملي للبويضات جمع البويضات الجيدة والصالحة للإنضاج من المبايض المجمعة من المجازر أو من الحيوانات الحية، ثم إجراء عمليه الإنضاج معملياً بهدف إنتاج أجنه حية قابله للإستزراع، وتم إجراء أول عمليه ولادة عجل بتقنيه الإخصاب المعملي في العام ١٩٨١ (Brackett *et al.,*1982).

تلعب بيئات الإنضاج والبروتينات والهرمونات المكملة دورا هاماً في عمليتي الإنضاج المعملي وكذلك الإخصاب والعمليات التي تليها وفي تطور الأجنة. وتعتبر عمليه إنضاج البويضات عملية طويلة ومعقدة، يحدث خلالها إكتساب 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 (Motlagh *et al.,* 2008).

وتعتبر الخلايا الركامية فريدة ومميزة لبويضات الثدييات (Bedford and Kim,1993) وتتكون مصفوفات الخلايا الركامية من كتلة من الخلايا الحبيبية التي تحيط بالبويضة ويحدث لها تمدد بعد عملية التبويض ويتم ذلك بسبب تفكك خليط البروتيوجليكان (proteoglycan)، ويعتبر المكون الكربوهيدراتي الرئيسي في هذا الخليط هو حمض الهيالورينيك طبقاً لكل من (Ball *et al.,* 1982) و (Salustri *et al.,* 1999). وأكد (Das *et al.,* 1997) على أن وجود الخلايا الركامية مهمة جداً في عملية إنضاج البويضات في مرحلتيها النضج النووي والنضج السيتوبلازمي. بينما اقترح (Kim *et al.,* 1997) أن وجود مصفوفات الخلايا الركامية أو الخلايا التاجية (Corna radita) خلال عملية الإنضاج لم تكن ذات أهمية بالنسبة للإنضاج النووي للبويضات، ووجود الخلايا التاجية خلال عملية إنضاج البويضات معملياً أطال من الفترة اللازمة لإنضاج البويضات معملياً. ووجد (Chian *et al.,*1995) أن الخلايا الركامية تعمل علي تحسين عملية الإخصاب عن طريق تسهيل التصاق الحيوانات المنوية النشطة بسطح الطبقة الشفافة. كما لاحظ (Nandi *et al.,* 2002) أن تمدد الخلايا الركامية يعتمد بدرجة كبيرة على البيئة المستخدمة في عملية الإنضاج وكذلك نوعية الإضافات المضافة لتلك البيئة، وكان أعلي معدل تمدد يحدث خلال ٢٢-٢٤ ساعة من الاستزراع في بيئة الإنضاج المعملي.

وجد (Lazzari *et al.,* 2010) أن إستزراع الأجنة المُنتجة عن طريق الإخصاب المعملي في قناة البيض معملياً يؤدي إلي تحسين في تطورها إلى مرحلة الكيس الأريمي (البلاستوسيست). وقد أرجع (Salustri *et al.,* 1989) ذلك إلى العوامل الداعمة الموجودة في سوائل قناة البيض ومن بينها حمض الهيالورينيك وعلى الرغم من صورتها السائلة إلا إنها غير موجودة في بيئات الإخصاب المعملي الروتينية.

يعرف حمض الهيالورينيك بالهيالورونان وأيضاً بالهيالورونات، هو عضو أنيوني عالي الوزن الجزيئي، ضمن مجموعة تعرف بالجليكوساميونجليكان، والتي تشكل مكونات المصفوفات خارج الخلية في جميع أنسجة الحيوانات، وهناك بعض الجليكوساميونجليكان الأخري تشمل كبريتات الديرماتين، كبريتات الهيبارين وسلفات الكوندروتين. ويعتبر حمض الهيالورينيك هو أبسط أنواع الجليكوساميونجليكان ولدية العديد من الخصائص الفريدة التي تميزه عن الجليكوساميونجليكان الأخري وهي: (١) أنه ليس من السلفات، بل هو من السكريات الخطية المتعددة فيتكون من الآلاف من الوحدات المتكررة من d-glucuronic acid وN-acetyl glucosamine بالتناوب بتشكيل يصل إلى أكثر من ٢٥٠٠٠ من المركبات السكرية الثنائية مع وزن جزيئي أكبر من ١٠ مليون دالتون (Laurent, 1998)، (٢) يتم تصنيعه في الغشاء البلازمي بدلاً من جهاز جولجي (Prehm, 1984)، (٣) يتم قذفه وخروجه عبر سطح الخلية إلى مصفوفات التراكم الخارجية حيث يتم تصنيعه خارج جدار الخلية (Tammi *et al.,* 2002) ، (٤) لا يقتصر وجود حمض الهيالورينيك ضمن المصفوفات الخارجية للخلايا ولكن تم اكتشاف وجوده أيضاً في داخل الخلايا (Contreras-Ruiz *et al.,* 2011). ويعتبر حمض الهيالورينيك عنصر رئيسي من مكونات مصفوفات الخلايا الركامية خارج البويضة في الفقاريات. كما تم إكتشاف وجوده داخل الحويصلات المبيضية، وقناة المبيض وسوائل الرحم الأساسية. وهو يلعب دور هام في تنظيم العديد من العمليات التناسلية مثل التبويض طبقاً لـ (Salustri et al., 1989)، والإخصاب طبقاً لـ (Shimada *et al.,* 2008)، وتطور الأجنة طبقاً لـ (Camenisch *et al.,* 2000). ولقد وجد حمض الهيالورينيك في أجزاء من الجهاز التناسلي ومنها قناة البيض، الرحم وعنق الرحم في الإنسان (Afify *et al.,* 2006)، في الأغنام (Perry *et al.,* 2012 وRaheem *et al.* 2013)، وأيضا أنتج من قبل الخلايا الركامية والخلايا الحبيبية للحويصلات المبيضية في الخنازير (Kimura *et al.,* 2002)، وفي الأبقار (Schoenfelder and Einspanier, 2003)، وفي الأغنام (Chavoshinejad *et al.,* 2014).

ويشمل النظام الحيوي لحمض الهيالورينيك كل من الإنزيمات المؤلفة hyaluronan synthases (HAS) والإنزيمات المكسرة (hyaluronidases، HYALs) ومستقبلات حمض الهيالورينيك. ويتم تكوين حمض الهيالورينيك عن طريق انزيم توليف حمض الهيالورينيك HA synthase enzymes (HAS) (Itano and Kimata, 2002)، ويتم ذلك على الوجه السيتوبلازمي الداخلي للغشاء البلازمي للخلية. وطبقاً لـ (Prehm,1984) فإنه يتم توليف حمض الهيالورينيك من قبل ثلاثة أنواع من الإنزيمات الغشائية المختلفة ذات الصلة تسمي هيالورونان سينثاسيس (HAS1-3) ، حيث يوجد في الثدييات ثلاثة أنواع مختلفة منه طبقا لـ (Crater and van de Rijn, 1995) و (Dougherty and van de Rijn, 1993) والتي تنتج أحجام مختلفة من حمض الهيالورينيك ذات وظائف بيولوجية متنوعة طبقا لكل من (Itano *et al.,* 1999) و(Stern *et al.,* 2006) و (Itano and Kimata, 2002) و (Stern, 2005)، حيث يحدد الوظائف المختلفة لحمض الهيالورينيك حجم البوليمر (الحجم الجزيئي) وكذلك الموقع وتركيز الحمض نفسه (Stern *et al.,* 2006).

وطبقاً لـ (Csoka *et al.,* 1999) يتم ذلك أساساً عن طريق التحلل الإنزيمي بواسطة الهيالورونديز، وهناك ٦ أشكال في الجينوم البشري من الإنزيمات المكسرة لحمض الهيالورينيك $HYAL_1$ و$HYAL_2$ و$HYAL_3$ و$HYAL_4$ و$HYALP_1$ وPH_{20}.

وتعتبر الإنزيمات $Hyal_1$ و$Hyal_2$ هي الإنزيمات الأساسية المحطمة لحمض الهيالورينيك، وهدم الخلايا الجسمية، في حين أن صورته PH-20 متوفرة في الحيوانات المنوية (Bastow *et al.,* 2008).

Hyal2 هو إنزيم glycosylphosphatidylinositol anchored ملتصق علي السطح الخارجي للغشاء البلازمي ووجد بالعديد من الأنسجة (Lepperdinger *et al.,* 2001). والصورة Hyal2 من الإنزيم لدية قدرة محددة في العمل على جزيئات الهيالورينيك عالية الوزن الجزيئي لتقوم بتكسيرها إلى شظايا حوالي ٢٠ كيلو دالتون (حوالي ٥٠ سكر ثنائي) (Stern *et al.,* 2006).

يتفاعل حمض الهيالورينيك مع الخلايا من خلال مستقبلاتها والتي تشمل كل من: (١) CD44 طبقا لـ (Aruffo *et al.,* 1990)، و (٢) RHAMM (Receptor for Hyaluronan Mediated Motility) طبقا لـ (Turley *et al.,* 2002). كما تم الكشف عن ذلك في أجنه كل من الأبقار عن طريق (Furnus *et al.,* 2003)، وفي الأغنام (Matsumoto *et al.,* 2004)، وفي الإنسان (Campbell *et al.,* 1995).

وقد تم الكشف عن مستقبلات حمض الهيالورينيك على سطح الخلية CD44 في أجزاء مختلفة من الجهاز التناسلي وذلك في الأبقار (Bergqvist *et al.,* 2005)، وفي الأغنام (Perry *et al.,* 2010) وفي إناث الخيل (Rodriguez *et al.,* 2011) وفي الإنسان (López *et al.,* 2013)، وذلك في ظل الظروف الفسيولوجية العادية.

وفي الوقت الراهن فإن دور حمض الهيالورينيك في بيولوجيا التناسل والتطبيقات الإكلينيكية تكتسب إهتماماً متزايداً. وقد أظهرت عدة تقارير بحثية مهمه دور حمض الهيالورينيك، فهو يعمل علي تمدد الخلايا الركامية أثناء التبويض كما أظهر (Salustri *et al.,* 1989) في الفئران، والحث على إتساع عنق الرحم أثناء الولادة كما أظهر كل من (El Maradny *et al.,* 1997) في الأرانب وكذلك (Straach *et al.,* 2005) في الفئران. وأظهرت الدراسات أيضا بأن الجزيئات الصغيرة الحجم من حمض الهيالورينيك (٢٠ كيلو دالتون) والتي نتجت عن طريق معاملة أجنه الأبقار المستزرعه بـ Hyal2 تسبب في زيادة عدد الأجنة الواصلة لمرحلة الكيس الأريمي (البلاستوسيست) وكذلك زيادة عدد الخلايا بها، ولكن ألغي هذا الأثر عن طريق تثبيط CD-44 (Marei *et al.,* 2013).

في الأونه الأخيرة جذب حمض الهيالورينيك مزيداً من الاهتمام لأن إضافته إلى بيئة الإنضاج أظهرت فائدة في الإخصاب المعملي ونقل الأجنة في كل من الأبقار (Palasz *et al.,* 2006)، والفئران (Choudhary *et al.*, 2007) والأغنام (Dattena *et al.,* 2007)، والإنسان (Hazlett *et al.,* 2008; Hambiliki *et al.,* 2010; Nakagawa *et al.,* 2012).

لذلك كان الهدف من هذا البحث هو دراسة تأثير إضافة حمض الهيالورينيك -إنزيم الهيالورونديز اوكليهما إلى بيئة الإنضاج المعملي على كل من معدل تمدد الخلايا الركامية ومعدل الإنضاج النووي لبويضات الجاموس معملياً.

الطرق والمواد

تم إجراء تلك الدراسة في معمل الفسيولوجي والتكنولوجيا الحيوية، بقسم إنتاج الحيوان، كلية الزراعة، جامعة المنصورة، جمهورية مصر العربية.

جمع المبايض:

تم جمع عدد ٣٠٠ مبيض من مبايض الجاموس المحلي من مجزري شبين الكوم والبتانون بمحافظه المنوفية، والذي يبعد مسافة ١٢٠ كم من المعمل، الحالة والتاريخ التناسلي للحيوانات المذبوحة غير معلومة. وكان يتم جمع المبايض من الحيوانات بعد عملية الذبح مباشرة، ويتم وضع المبايض داخل إناء معزول (thermos) يحتوي على محلول ملح فسيولوجي (٠.٩ % كلوريد الصوديوم) دافئ درجة حرارته تتراوح بين ٣٠-٣٥ درجه مئوية، ثم يتم نقلها إلى المختبر في خلال ٥-٦ ساعات من عملية الذبح.

غسل المبايض:

بعد نقل المبايض والوصول الى المختبر كان يتم إزالة الأجزاء الزائدة من النسيج الضام حول المبيض وغسل المبايض مرتين في محلول ملح فسيولوجي دافئ وذلك لإزالة الدم المتجلط ثم غسلها بكحول الإيثايل (٧٠%) لإزالة أي تلوث على سطح المبيض ثم غسلها مرة أخيرة بمحلول فسيولوجي.

جمع البويضات:

كان يتم جمع البويضات من كافة الحويصلات المبيضية المرئية علي سطح المبيض ذات القطر من ٢-٨ مم، باستخدام طريقة السحب عن طريق سحب السائل الحويصلي من داخل الحويصلات المبيضية بإستخدام إبرة مقاس ٢٠ متصلة بسرنجة ١٠ مللي معقمة تحتوي على ١ مللي من بيئة الجمع والتي تتكون من (بيئة زراعة الأنسجة TCM-199 مضاف اليها ٦ مليجرام / مللي ألبومين سيرم الأبقار و٥٠ ميكرو جرام/مللي جنتاميسين). ثم بعد انتهاء عملية السحب كان يتم تفريغ السائل الحويصلي ببطيء في طبق بيتري معقم قطر (٦٠ مم) وذلك لإجراء عملية البحث عن البويضات داخل السائل الحويصلي تحت الإستريوميكروسكوب (Nikon SMZ 645).

بيئة الإنضاج:

كان يتم إعداد بيئة الإنضاج في اليوم الذي يتم فيه جمع البويضات وكانت توضع بالحضان قبل وضع البويضات بها لمدة ساعتين على الأقل. ويوضح الجدول رقم (١) تركيب بيئة الإنضاج المستخدمة في الإنضاج المعملي. وكان يتم ضبط البيئة على درجة حموضة pH من ٧.٢ إلى ٧.٤ وترشيحها عن طريق فلتر معقم قطر مسامه٠.٢٢ ميكروميتر.'

جدول ١. تركيب بيئة الإنضاج المعملي:

محتويات البيئة	التركيز	الشركة المنتجة
بيئة زراعة الأنسجة-١٩٩ (TCM-199)	١٠ مللي	الشركة المصرية للمستحضرات البيولوجية واللقاحات (العجوزة-مصر) (Egyptian Organization for Biological Product and vaccine, Agoza)
ألبيومين سيرم الأبقار	٦مجم/ مللي	Sigma-Aldrich, A6003
Epidermal Growth Factor	١٠ ميكرو جرام/ مللي	Sigma-Aldrich, E4127
جنتاميسين (مضاد حيوي)	٥٠ ميكرو جرام/ مللي	Sigma-Aldrich, G3632

إنضاج البويضات:

بعد الانتهاء من جمع البويضات يتم إختيار البويضات ذات المواصفات الجيدة والمقبولة (المندمجة كلياً أو جزئياً للخلايا الركامية)، ثم يتم غسلها مرة واحدة في بيئة الإنضاج المعملي، ثم يتم نقلها إلى بيئة الإنضاج المعملي في طبق ذو أربع عيون 4well، ثم يتم تحضينها في حضان ثاني أكسيد الكربون على درجة حرارة ٣٨.٥ درجه مئوية و٥% ثاني أكسيد كربون وأكثر من ٩٥% رطوبة وذلك لمدة ٢٢-٢٤ ساعة.

المعاملات التجريبية:

كانت المعاملات التجريبية كالتالي:

١.المعاملة الأولى (القياسية): كانت عبارة عن بيئة الإنضاج بدون أي إضافات.

٢. المعاملة الثانية: كانت عبارة عن بيئة الإنضاج مضاف إليها حمض الهيالورينيك (Sigma, H7630) بتركيز ٠.٥ ميليجرام / مللي بيئة إنضاج.

٣.المعاملة الثالثة: وكانت عبارة عن بيئة الإنضاج مضاف إليها العامل المكسر لحمض الهيالورينيك $Hyal_2$ (Sigma -H2126) بتركيز ٣٠٠ وحده دولية/ مللي بيئة إنضاج.

٤. المعاملة الرابعة: وكانت عبارة عن بيئة الإنضاج مضاف إليها العامل المكسر لحمض الهيالورينيك Hyal 2 بتركيز ٣٠٠ وحده دولية + حمض الهيالورينيك بتركيز ٠.٥ مليجرام / مللي بيئة إنضاج.

تصنيف البويضات بعد الإنضاج حسب درجة تمدد الخلايا الركامية (النضج السيتوبلازمي):

تم حساب النسبة المئوية للبويضات تبعاً للتصنيفات التالية:

١. بويضات ذات تمدد كلي: وفيها يحدث تفكك لكل الخلايا الركامية (صوره رقم ١).

٢. بويضات ذات تمدد جزئي: وفيها يحدث تفكك للطبقات الخارجية من الخلايا الركامية (صوره رقم ٢).

٣. بويضات بدون تمدد الخلايا الركامية: (صوره رقم ٣).

صوره ١. التمدد الكلى للخلايا الركامية

صوره ٢. التمدد الجزئي للخلايا الركامية

صوره ٣. بويضات بدون تمدد للخلايا الركامية

تثبيت البويضات وعملية الصبغ:

في نهاية عملية الإنضاج المعملي كان يتم إزالة البويضات من بيئة الإنضاج وإزالة الخلايا الركامية من حول البويضة، وذلك عن طريق تكرار عمليه السحب والطرد باستخدام الماصة الميكرومترية، ثم يتم سحب من ٥-١٠ بويضات ووضعها على شريحة زجاجيه نظيفة 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 تثبيت البويضات جيداً. وكانت تتم عملية التثبيت بوضع الشريحة في مخلوط طازج مكون من حامض الخليك الثلجي وكحول الإيثانول بنسبة ١:٣ (حجم: حجم) لمدة ٢٠ دقيقة. بعد ذلك كان يتم صبغ الشرائح بصبغة الأسيتو أورسين (١%) عبارة عن (١% صبغه أورسين تضاف إلى ٤٠ % حامض خليك ثلجي (وزن: حجم) وذلك لمدة ٢-٣ دقائق ثم تغسل بعد ذلك بالأسيتوجليسرول وهو عبارة عن ماء مقطر وحمض الخليك الثلجي وجليسيرول بنسبة ٣: ١: ١ (حجم: حجم: حجم). ثم يتم فحص البويضات تحت الميكروسكوب الضوئي (Leica DM 500) بقوه تكبير (٤٠٠ مرة) لتقييم البويضات في المراحل المختلفة من الإنضاج النووي كالآتي:

أ- **الحويصله الجرثومية (GV، Germinal vesicle):** وفيها تكون الكروموسومات مغلفة بالغشاء النووي. (صورة رقم ٤).

ب - **الحويصله الجرثومية المتكسرة (GVBD،breakdown Germinal vesicle):** وفيها يبدأ غياب الغشاء النووي المرئي وتكثيف للكروماتين والذي يميز بواسطة عنقود من مادة DNA بدون كروموسومات فردية. (صورة رقم ٥).

جـ - **الطور الاستوائي الأول (M-I،Metaphase-I):** وفيها تتكاثف الكروموسومات في أزواج بدون ظهور الجسم القطبي الأول (بويضات قبل النضج مباشرة) (صورة رقم ٦).

د – **الطور الانفصالي الأول (A-I،Anaphase-I):** وفيها تبدأ الكروموسومات في الانفصال إلى مجموعتين ويظهر فيها بوضوح خيوط المغزل (صورة رقم ٧).

هـ – **الطور النهائي الأول (T-I،Telophas-I):** وفيها تقسم الكروموسومات إلى مجموعتين (صورة رقم ٨).

و – **الطور الاستوائي الثاني (M-II،Metaphase-II):** وفيها تكون هناك مجموعة كبيرة من الكروموسومات تكون الطور الاستوائي وتبقي الكروموسومات عالية التكثيف أو يحدث طرد للجسم القطبي الأول في اتجاه الطبقة الشفافة (منطقة البريفاتلين) (صورة رقم ٩).

التحليل الإحصائي:

تم تحليل البيانات إحصائيا بإستخدام برنامج (SAS, 2004) بإستخدام الحاسب الآلي لدراسة التأثير الناتج عن إضافة المعاملات إلى بيئة الإنضاج المعملي على كل من معدل تمدد الخلايا الركامية والإنضاج النووي لبويضات الجاموس معملياً. تم مقارنة المتوسطات بإستخدام إختبار دانكن المتعدد الحدود (Duncan, 1955). أيضا تم تحويل النتائج المتحصل عليها في صورة نسب مئوية عن طريق جداول الأركاسين ثم أعادتها مرة أخرى إلى أصلها في الجداول المقدمة.

صوره ٤. الحويصله الجرثومية

صوره ٥. انكسار الحويصله الجرثومية

صوره ٦. الطور الاستوائي الاول

صوره ٧. الطور الانفصالي الاول

صوره ٨. الطور النهائي الاول

صوره ٩. الطور الاستوائي الثاني

النتائج

تأثير إضافة حمض الهيالورينيك أو العامل المكسر لحمض الهيالورينيك Hyal2 أو كليهما على معدل تمدد الخلايا الركامية لبويضات الجاموس:

يوضح الجدول رقم (٢) تأثير إضافة حمض الهيالورينيك، أو العامل المكسر لحمض الهيالورينيك $Hyal_2$ أو كليهما إلى بيئة الإنضاج المعملي على معدل تمدد الخلايا الركامية لبويضات الجاموس. تظهر النتائج أن هناك فروق معنوية (جدول رقم ٢) بين المعاملات في تمدد الخلايا الركامية، حيث أظهرت النتائج أن التمدد الكلي للخلايا الركامية لبويضات الجاموس كانت أقل معنوياً عند المعاملة بإنزيم الهيبالورونديز $Hyal_2$ (١.٤%) مقارنة بكل من البيئة القياسية (٨٦.٩%) والمعاملة بحمض الهيالورينيك (٨٦%). كما أظهرت النتائج أيضاً أن نسبة البويضات غير المتمددة كانت أعلي معنوياً في المجموعات المعاملة بإنزيم الهيبالورونديز $Hyal_2$ مقارنة بالبيئة القياسية) ٠.٠%) والمعاملة بحمض الهيالورينيك (٦.٣%). كما أوضحت النتائج أنه عند استخدام مصدر خارجي إضافي لحمض الهيالورينيك ٠.٥ مليجرام / مللي مع المعاملة بـ ٣٠٠ وحده دولية من إنزيم الهيبالورونديز $Hyal_2$ لم يؤثر على النسبة المئوية للبويضات التي حدث لها تمدد كلي حيث كانت نسبتها أقل معنوياً (١.٨%)، وكانت نسبة البويضات غير المتمددة أعلي معنوياً (٨٧.٩%) مقارنة بكل من البيئة القياسية والمعاملة بحمض الهيالورينيك.

جدول ٢. تـأثير إضافة حمض الهيالورينيك أو العامل المكسر لحمض الهيالورينيك Hyal2 أو كليهما على معدل تمدد الخلايا الركامية لبويضات الجاموس.

المعاملات	العدد الكلي للبويضات	% للبويضات ذات التمدد الكلى	% للبويضات ذات التمدد الجزئي	% للبويضات غير المتمددة
القياسية	٩١	٠.٥٤±٨٦.٩ أ	٠.٥٤±١٣.١ أب	٠.٠٠±٠٠.٠ د
حمض الهيالورينيك (٠,٥ ميليجرام / مللي)	٩٦	١.٢٧±٨٦.٠ أ	١.٣٥±٧.٧ ج	٠.٢٣±٦.٣ ج
إنزيم الهيبالورونديز (٣٠٠ وحده دولية/مللي)	٨٥	١.٣٩±١.٤ ب	١.٤٩±١٥.٠ أ	٠.٧٥±٨٣.٦ ب
حمض الهيالورينيك + إنزيم الهيبالورونديز	٩٩	١.٧٩±١.٨ ب	١.٥٣±١٠.٣ ب ج	١.٣٣±٨٧.٩ أ
قيمة الاحتمالية		٠.٠٠٠١	٠.٠٠٩	٠.٠٠٠١

الحروف الفوقية المختلفة أ، ب، ج، د ضمن نفس العمود تشير إلى اختلافات معنوية.

تأثير إضافة حمض الهيالورينيك أو العامل المكسر لحمض الهيالورينيك $Hyal_2$ أو كليهما على معدل الإنضاج النووي لبويضات الجاموس:

يوضح الجدول رقم (٣) تأثير إضافة حمض الهيالورينيك، أو العامل المكسر لحمض الهيالورينيك $Hyal_2$ أو كليهما إلى بيئة الإنضاج المعملي على معدل الإنضاج النووي لبويضات الجاموس. يتضح من النتائج عدم وجود فروق معنويه (جدول رقم ٣) بين المعاملات في نسبة البويضات التي في المراحل (الحويصله الجرثومية، أو إنكسار الحويصله الجرثومية، أو الطور الاستوائي الأول، أو الطور الانفصالي الأول والطور النهائي الأول). بينما كان هناك فروق معنويه في البويضات التي وصلت إلى مرحلة الطور الاستوائي الثاني (مرحلة النضج) حيث كانت

البيئات المضاف إليها إنزيم الهيبالورونديز $Hyal_2$ بتركيز (٣٠٠ وحده دولية / مللي)، حمض الهيالورينيك بتركيز (٠.٥مليجرام / مللي) ومزيج من حمض الهيالورينيك (٠.٥مليجرام / مللي) + $Hyal_2$ (٣٠٠ وحده دولية / مللي) أعلى معنوياً في نسبة البويضات المنضجه بالمقارنة بالبيئة القياسية. كما أظهرت النتائج أيضا أنه عند استخدام مصدر خارجي إضافي لحمض الهيالورينيك ٠.٥ مليجرام / مللي مع المعاملة بـ ٣٠٠ وحده دولية من إنزيم الهيبالورونديز ($Hyal_2$) لم يؤثر بصوره معنويه على نسبة البويضات التي وصلت الي مرحلة الطور الاستوائي الثاني مقارنة بالبيئة المعاملة بحمض الهيالورينيك.

جدول ٣. تأثير إضافة حمض الهيالورينيك أو العامل المكسر لحمض الهيالورينيك Hyal2 أو كليهما على معدل الإنضاج النووي لبويضات الجاموس.

المعاملات	العدد الكلي للبويضات	الحويصله الجرثومية	انكسار الحويصله الجرثومية	الطور الاستوائي الأول	الطور الانفصالي الأول	الطور النهائي الأول	الطور الاستوائي الثاني
القياسية	٨٠	٠.٠٠±٠.٠	٢.٢٦±٣.٨	٣.١٥±٧.٢	٠.٠٠±٠.٠	٢.٢٧±٦.٤	٠.٩٥±٨٢.٥ ب
حمض الهيالورينيك (٠,٥ ميليجرام / مللي)	٩٣	٠.٠٠±٠.٠	٠.٠٠±٠.٠	١.٥٩±٢.٤	٠.٠٠±٠.٠	١.٤٦±٣.٩	١١.١٦±٩٣.٦ أ
إنزيم الهيبالورونديز (٣٠٠ وحده دولية/مللي)	٨٣	٠.٠٠±٠.٠	١.٠٩±١.٩	١.٦٤±٤.٤	٠.٠٠±٠.٠	١.٣٧±٢.٧	١.٣٥±٩١.٠ أ
حمض الهيالورينيك + إنزيم الهيبالورونديز	٩٠	٠.٠٠±٠.٠	٠.٠٠±٠.٠	١.٢٧±٢.١	١.٣٢±١.٣	١.٨±٤.٣	١.٠٢±٩٢.٢ أ
قيمة الاحتمالية		٠.٠٠	٠.١٤٧	٠.٣١٤	٠.٤٢٦	٠.٥٧٢	٠.٠٠٠١

الحروف الفوقية المختلفة أ، ب ضمن نفس العمود تشير إلى اختلافات معنوية.

المناقشة

لقد تم في هذه الدراسة تقييم دور حمض الهيالورينيك أثناء عملية الإنضاج المعملي لبويضات الجاموس على كل من معدل تمدد الخلايا الركامية ومعدل النضج النووي باستخدام حمض الهيالورينيك أو إنزيم الهيبالورونديز ($Hyal_2$) أو كليهما معاً.

لقد أظهرت الدراسة الحالية أن إضافة حمض الهيالورينيك لم يؤثر بصوره معنوية على معدل تمدد الخلايا الركامية ولكنه أثر على معدلات النضج النووي للبويضات (النسبة المئوية للبويضات التي وصلت لمرحلة الطور الاستوائي الثاني) والتي تم جمعها من مبايض اناث الجاموس المذبوحة بالمجازر. وتتوافق تلك النتائج مع نتائج (Marei *et al.,* 2012) والذي قام بدراسة تأثير إضافة مستويات مختلفة من تركيز حمض الهيالورينيك (صفر، ٠.١، ٠.٥ و ١) مليجرام / مللي إلى بيئة الإنضاج المعملي لبويضات الأبقار على كل من تمدد خلايا التراكم المبيضي والنضج النووي، والتي أظهرت انه لم يكن هناك أي فروق معنوية بين التركيزات المختلفة لحمض الهيالورينيك علي تمدد خلايا التراكم المبيضي بالمقارنه بالمجموعة القياسية، وكذلك لم تكن هناك أي فروق معنوية في نسبة البويضات المنضجه والتي وصلت لمرحله الطور الاستوائي الثاني بالمقارنه بالمجموعة القياسية، ولكن وجد أن تركيز ٠.٥ مليجرام / ملل أدى لوصول أكبر نسبة من البويضات لمرحلة الطور الاستوائي الثاني بينما وجد أن المعاملة بتركيز ١ مليجرام / مللي أدي ألي انخفاض عدد البويضات التي وصلت لمرحله الطور الاستوائي الثاني بصوره معنوية بالمقارنة مع المعاملة بتركيز ٠.٥ مليجرام / مللي. تمدد الخلايا الركامية يعتمد على توليف وترتيب المصفوفات خارج الخلية (Salustri *et al.,* 1999) والتي تتألف من كتلة من الخلايا الحبيبية التي تحيط بالبويضة ويحدث لها تمدد بعد عملية التبويض ويتم ذلك بسبب تفكك خليط البروتيوجليكان (proteoglycan)، والذي يعتبر المكون الكربوهيدراتي الرئيسي في هذا الخليط هو حمض الهيالورينيك طبقاً لكل من(Ball *et al.,* 1982) و (Salustri *et al.,* 1999). وأشارت كثير من الدراسات (Kultti *et al.,* 2009و(Gutnisky *et al.,* 2007) و(Kosaki *et al.,*1999) و(Nakamura *et al.,* 2007) و (Rilla *et al.,* 2004) أنه بجانب إعتبار حمض الهيالورينيك العنصر الرئيسي المكون للمصفوفة خارج الخلية والمطلوبة لتوسيع الخلايا الركامية، فإنه يعتبر ضرورياً للنضج النووي البويضة.

أظهرت النتائج الحالية التي تم الحصول عليها من هذه الدراسة عن طريق معاملة البويضات بإنزيم الهيبالورونديز ($Hyal_2$) كمعاملة منفردة أو في وجود إضافة خارجية من حمض الهيالورينيك في بيئة الإنضاج حدوث تثبيط كبير في تمدد مصفوفات الخلايا الركامية ولكنها أدت إلى زيادة معدل النضج النووي للبويضات مقارنة بالمجموعة القياسية. حيث تتوافق تلك النتائج مع نتائج (Marei *et al.,* 2012) في البحث الذي التي قام فيه بدراسة تأثير إضافة العامل المكسر لحمض الهيالورينيك ($Hyal_2$) كمعاملة منفردة بتركيز ٣٠٠ وحدة دولية أو إضافته بتركيز ٣٠٠ وحدة دولية في وجود حمض الهيالورينيك بتركيز ٠.٥ مليجرام/مللي إلى بيئة الإنضاج المعملي لبويضات الأبقار على كل من معدل تمدد خلايا التراكم المبيضي والنضج النووي. أظهرت النتائج أن استخدام $Hyal_2$ في وجود حمض الهيالورينيك أو عدم وجودة منع تماماً توسع وتمدد خلايا التراكم المبيضي. ومع ذلك لم تؤثر المعاملة بـ $Hyal_2$ بأي معنوية على النضج النووي للبويضات مقارنة بالمجموعة القياسية. يقع إنزيم الهيبالورونديز $Hyal_2$ عادة على سطح الخلية، وهو بالغ الأهمية بالنسبة لتكسير الأجزاء الكبيرة من حمض الهيالورينيك إلى شظايا ذات وزن جزيئي صغير في متوسط ٢٠-٥٠ كيلو دالتون (Lepperdinger *et al.,*1998) و (Duterme *et al.,* 2009).

ويمكن تفسير التأثير المثبط لإنزيم الهيبالورونديز $Hyal_2$ على تمدد مصفوفات الخلايا الركامية ، بأن تأثير إنزيم الهيبالورونديز $Hyal_2$ المكسر يعمل علي تكسر الأجزاء الكبيرة المرتفعة في الوزن الجزيئي من حمض الهيالورينيك والتي تنتجها الخلايا الركامية إلى أجزاء أصغر ، ولكن هذه الشظايا الصغيرة الناتجة نشطة بيولوجياً ويمكن أن تدعم معدلات نضج البويضة الطبيعية، وهذا يفسر عدم تأثيرها علي معدل النضج النووي للبويضة، تكسير حمض الهيالورينيك من قبل إنزيم الهيبالورونديز $Hyal_2$ إلى شظايا أصغر يسبب إعاقة التفاعل بين حمض الهيالورينيك ومستقبلاته CD44 ، وهذا التفاعل يبدأ بإرسال الإشارات الخلوية عن طريق CD44 (Ohno-Nakahara *et al.,* 2004). ويتم التعبير عن CD44 في الخلايا الركامية عند التقاطع بين الخلايا الركامية والبويضات (Kimura *et al.,* 2002) و (Furnus *et al.,* 2003). تتابع إرسال الإشارات عن طريق CD44 يمكن أن يزيد من فسفرة MAP kinases (A mitogen-activated protein kinase) و Akt (Sohara *et al.,* 2001)، وكلاهما من الجزيئات الهامة المنظمة لنضج البويضة. MAP kinase مطلوب لتنشيط العامل المحفز للإنضاج (MPF) وتكسر الحويصله الجرثومية عند بدء نضج البويضة، ويدخل في تنظيم ميكانيكية الأنيبيات الدقيقة، وتكوين خيوط المغزل و إستمرار البقاء في مرحلة الطور الإستوائي الثاني بعد النضج النووي (Tian *et al.,* 2002). AKT يحفز الإنتقال من الطور الإستوائي الأول إلي الطور الإستوائي الثاني (Tomek and Smiljakovic. 2005).

ومن المعروف أن تمدد الخلايا الركامية يكون مطلوباً لإعداد الظروف الملائمة من أجل التبويض الفعال، بالرغم من أن أهميتها بالنسبة للنضج النووي لبويضات الأبقار يعد أمراً مثيراً للجدل. وقد أُقترح مسبقاً أن توسع الخلايا الركامية مطلوب لإعاقة ميكانيكية مناطق الاتصال (gap junction) بين البويضات والخلايا الركامية المحيطة والتي تعطل نقل عوامل تثبيط الإنقسام الاختزالي، مثل cAMP إلى البويضة التي تشرع في النضج النووي (Zhang *et al.,* 2007). في المقابل، أظهرت بعض الدراسات أن تثبيط التواصل (gap junction) بين الخلايا الركامية خطوه مطلوبة مسبقاً كمرحلة أولية لتبعثر الخلايا الركامية قبل التمدد (Chen *et al.,* 1990). وتثبيط إعاقة التواصل بين الخلايا (gap junction) بواسطة cytochalasin B والذي بدورة يمنع توسع الخلايا الركامية وتراكم بروتين المصفوفات الخارجية (Sutovský *et al.,* 1995).

Chain, R.C; Okuda, K. and Niwa, K. (1995). Influence of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine oocytes derived from in vitro maturation. J. Anim. Reprod. Sci., 38: 37- 48.

Chavoshinejad, R; Marei, W.F; Hartshorne, G.M .and Fouladi-Nashta, A.A. (2014). Localisation and endocrine control of hyaluronan synthase (HAS2), HAS3 and CD44 expression in sheep granulosa cells. Reproduction, Fertility and Development, 28:765–775.

Chen, L; Wert, S.E; Hendrix, E.M; Russell, P.T; Cannon, M .and Larsen, W.J. (1990). Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. Mol Reprod Dev; 26:236–247.

Choudhary, K. K; Kavya, K. M; Jerome, A. and Sharma, R. K. (2016). Advances in reproductive biotechnologies. Vet World, 9(4): 388-395.

Choudhary, M; Zhang ,X; Stojkovic, P; Hyslop, L; Anyfantis ,G; Herbert, M; Murdoch, A.P; Stojkovic, M .and Lako, M.(2007). Putative role of hyaluronan and its related genes, HAS2 and RHAMM, in human early preimplantation embryogenesis and embryonic stem cell characterization. Stem Cells, 25: 3045–3057.

Contreras-Ruiz, L; de la Fuente, M; Párraga, J.E; López-García, A; Fernández, I; Seijo, B; Sánchez, A; Calonge, M. and Diebold, Y. (2011). Intracellular trafficking of hyaluronic acid-chitosan oligomerbased. Molecular Vision, 17: 279–290.

Crater, D.L .and van de Rijn, I. (1995). Hyaluronic acid synthesis operon (has) expression in-group A streptococci. J Biol Chem., 270: 18452–18458.

Csoka, A.B; Scherer, S.W .and Stern, R. (1999). Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31. Genomics, 60: 356–361.

Das, S. K; Chauhan, M. S; Palta, P. and Tomer, O. S. (1997). Influence of cumulus cells on in vitro maturation of denuded buffalo oocytes. Vet. Rec., 141: 522- 523.

Dattena, M; Mara, L; Bin, T.A .and Cappai, P. (2007). Lambing rate using vitrified blastocysts is improved by culture with BSA and hyaluronan. Molecular Reproduction and Development, 74: 42–47.

Dougherty, B.A .and van de Rijn, I. (1993).Molecular characterization of hasB from an operon required for hyaluronic acid synthesis in-group A streptococci. Demonstration of UDP-glucose dehydrogenase activity. J Biol Chem, 268:7118 –7124.

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

Duterme, C; Mertens-Strijthagen, J; Tammi, M .and Flamion, B. (2009).Two novel functions of hyaluronidase-2 (Hyal2) are formation of the glycocalyx and control of CD44-ERM interactions. J Biol Chem; 284:33495–33508.

El Maradny, E; Kanayama, N; Kobayashi, H; Hossain, B; Khatun ,S; Liping, S; Kobayashi, T. and Terao, T. (1997). The role of hyaluronic acid as a mediator and regulator of cervical ripening. Human Reproduction, 12: 1080–1088.

Furnus, C.C; Valcarcel, A; Dulout, F.N .and Errecalde, A.L. (2003). The hyaluronic acid receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and early stage embryos. Theriogenology, 60:1633–1644.

في هذه الدراسة، واستنادا إلى حقيقة أن تثبيط توسع الخلايا الركامية من قبل إنزيم الهيبالوروندييز $Hyal_2$ لم يؤثر على النضج النووي للبويضة، فإن ذلك يوفر دليلاً واضحا على عدم إرتباط تمدد الخلايا الركامية والنضج النووي للبويضات في الجاموس.

وفي الختام، فإن إنتاج حمض الهيالورينيك بواسطة الخلايا الركامية خلال النضج أمر ضروري ليس فقط لتوسيع الخلايا الركامية، ولكن أيضاً للنضج النووي للبويضات. وهذا التأثير لا يعتمد على حجم جزيئات حمض الهيالورينيك.

الخلاصة

نستخلص من هذه النتائج أن إضافة حمض الهيالورينيك كإضافات غير إنزيمية إلى بيئة الإنضاج المعملي لم يؤثر على معدل تمدد الخلايا الركامية، ولكن أدي إلي زيادة معدل الإنضاج المعملي لبويضات الجاموس بينما إضافة إنزيم الهيبالوروندييز ($Hyal_2$) كإضافات إنزيمية إلى بيئة الإنضاج المعملي منع تماماً توسع وتمدد خلايا التراكم المبيضي ولكنها أدت إلى زيادة معدل النضج النووي للبويضات، وأنه لا يوجد ارتباط بين كل من تمدد الخلايا الركامية والنضج النووي لبويضات الجاموس المنضجة معملياً تحت نفس الظروف التجريبية.

REFERENCES

Abd-Allah, S.M. (2015). In Vito Fertilization in Buffaloes: A Review. Journal of Buffalo Science, 4:11-14.

Afify, A.M; Craig, S .and Paulino, A.F. (2006). Temporal variation in the distribution of hyaluronic acid, CD44s, and CD44v6 in the human endometrium across the menstrual cycle. Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology, 14: 328–333.

Agrawal, S.K. and Tommer, O.S. (1998). Reproductive technologies in Buffalo. Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar, Barielly, UP, India. p37.

Aruffo, A; Stamenkovic, I; Melnick, M; Underhill, C.B .and Seed, B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. Cell, 61:1303–1313.

Ball, G.D; Bellin, M.E; Ax, R.L. and First N.L. (1982). Glycosaminoglycans in bovine cumulus- oocyte complexes. Morphology and chemistry. Mol. Cell. Endocrinol, 28: 113- 122.

Bastow, E.R; Byers, S; Golub, S.B; Clarkin, C.E; Pitsillides, A.A. and Fosang, A.J. (2008). Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. Cell Mol LifeSci, 65:395–413.

Bedford, J.M. and Kim, H.H. (1993). Cumulus oophorus as a sperm-sequestering device in vivo. J. Exp. Zoo., 265: 321- 328.

Bergqvist, A.S; Yokoo, M; Bage, R; Sato, E. and Rodriguez-Martinez, H. (2005). Detection of the hyaluronan receptor CD44 in the bovine oviductal epithelium. Journal of Reproduction and Development, 51: 445–453.

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

Camenisch ,T.D; Spicer ,A.P; Brehm-Gibson ,T; Biesterfeldt, J; Augustine ,M.L; Calabro ,A. J.r; Kubalak ,S; Klewer ,S.E. and McDonald, J.A. (2000). Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. J Clin Invest, 106:349–360.

Campbell, S; Swann, H.R; Aplin, J.D; Seif, M.W; Kimber, S.J. and Elstein, M. (1995). CD44 is expressed throughout pre-implantation human embryo development. Human Reproduction, 10:425–430.

López, J; Valdez-Morales, F.J; Benítez-Bribiesca, L; Cerbón, M. and Carrancá, A.G. (2013). Normal and cancer stem cells of the human female reproductive system. Reproductive Biology and Endocrinology, 11:53.

Madan, M.L; Chauhan, M.S; Singla, S.K. and Manik, R.S. (1994). Pregnancies established from water buffalo (Bubalus bubalis) blastocysts derived from in vitro matured in vitro fertilized oocytes and co-cultured with cumulus and oviductal cells. Theriogenology, 42: 591- 600.

Mahmoud, K. Gh. M .and Al-Shimaa Al-H. H. El-Naby. (2013). Factors Affecting Buffalo Oocytes Maturation. Global Veterinaria, 11 (5): 497-510.

Marei, W.F; Ghafari, F .and Fouladi-Nashta, A.A. (2012). Role of hyaluronic acid in maturation and further early embryo development of bovine oocytes. Theriogenology, 78: 670–677.

Marei, W.F; Salavati, M .and Fouladi-Nashta, A.A. (2013). Critical role of hyaluronidase-2 during preimplantation embryo development. Molecular Human Reproduction, 19: 590–599.

Matsumoto, H; Daikoku, T; Wang, H; Sato, E .and Dey, S.K. (2004). Differential expression of ezrin /radixin/moesin (ERM) and ERM-associated adhesion molecules in the blastocyst and uterus suggests their functions during implantation. Biology of Reproduction, 70: 729–736.

Motlagh, M.K; Shahneh, A.Z; Daliri, M; Kohram, H. and Gharagozlou, F. (2008). In vitro maturation of sheep oocytes in different concentrations of mare serum. African J. Biotechnol., 7(18): 3380-3382.

Nakagawa, K; Takahashi, C; Nishi, Y; Jyuen, H; Sugiyama, R .and Kuribayashi, Y. (2012). Hyaluronan-enriched transfer medium improves outcome in patients with multiple embryo transfer failures. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 29: 679–685.

Nakamura, R; Kuwabara, H; Yoneda, M; Yoshihara, S; Ishikawa, T; Miura, T; et al .(2007). Suppression of matrix metalloproteinase-9 by 4-methylumbelliferone. Cell Biol Int; 31:1022–1026.

Nandi, S; Ravindranatha, B.M; Gupta P.S.P. and Sarma, P.V. (2002). Timing in sequential changes in cumulus cells and first polar body extrusion during in vitro maturation of buffalo oocytes. Theriogenology, 57: 1151- 1159.

Ohno-Nakahara, M; Honda, K; Tanimoto, K; Tanaka, N; Doi, T; Suzuki, A; et al. (2004). Induction of CD44 and MMP expression by hyaluronidase treatment of articular chondrocytes. J Biochem; 135:567–675.

Palasz, A.T; Rodriguez-Martinez, H; Beltran-Brena, P; Perez-Garnelo, S; Martinez, M.F; Gutierrez-Adan, A. and De la Fuente, J. (2006). Effects of hyaluronan, BSA, and serum on bovine embryo in vitro development, ultrastructure, and gene expression patterns. Molecular Reproduction and Development, 73: 1503–1511.

Perry, K; Haresign, W; Wathes, D.C. and Khalid, M. (2010). Hyaluronan (HA) content, the ratio of HA fragments and the expression of CD44 in the ovine cervix vary with the stage of the oestrous cycle. Reproduction, 140: 133–141.

Perry, K; Haresign, W; Wathes, D.C; Pitsillides, A.A. and Khalid, M. (2012). Cervical expression of hyaluronan synthases varies with the stage of the estrous cycle in the ewe. Theriogenology, 77: 1100–1110.

Prehm, P. (1984). Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. Biochemical Journal, 220: 597–600.

Gutnisky, C; Dalvit, G.C; Pintos, L.N; Thompson, J.G; Beconi, M.T .and Cetica, P.D. (2007). Influence of hyaluronic acid synthesis and cumulus mucification on bovine oocyte in vitro maturation, fertilisation and embryo development. Reprod Fertil Dev, 19:488 – 497.

Hambiliki, F; Ljunger, E; Karlström, P-O .and Stavreus-Evers, A. (2010). Hyaluronan-enriched transfer medium in cleavage-stage frozen-thawed embryo transfers increases implantation rate without improvement of delivery rate. Fertility and Sterility, 94:1669–1673.

Hazlett, W.D; Meyer, L.R; Nasta, T.E; Mangan, P.A .and Karande, V.C. (2008). Impact of EmbryoGlue as the embryo transfer medium. Fertility and Sterility, 90: 214–216.

Hfea. (2010). Fertility Facts and Figures 2008. The Human Fertilisation and Embryology Authority.

Itano, N. and Kimata, K. (2002). Mammalian hyaluronan synthases. IUBMB Life; 54:195–199.

Itano, N; Sawai, T; Yoshida, M; Lenas, P; Yamada, Y; Imagawa, M; Shinomura, T; Hamaguchi, M; Yoshida, Y; Ohnuki, Y. et al. (1999). Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. Journal of Biological Chemistry, 274: 25085–25092.

Kim, K.S; Minami, N; Yamada, M. and Utsumi, K. (1997). Follicular cells affect the fertilizability and development of bovine oocytes in vitro. J. Reprod. Fertil. Dev., 9: 763- 766.

Kimura, N; Konno, Y; Miyoshi, K; Matsumoto, H .and Sato, E. (2002). Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. Biology of Reproduction, 66: 707–717.

Kosaki, R; Watanabe, K .and Yamaguchi, Y. (1999). Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity. Cancer Res, 59:1141–1145.

Kultti, A; Pasonen-Seppänen, S; Jauhiainen, M; Rilla, K.J; Kärnä, R; Pyöriä, E; et al.(2009). 4-methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3. Exp Cell Res, 315:1914 –1923.

Laurent, T.C. (1998). The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives, Wenner-Gren international series. London: Portland Press.

Lazzari, G; Colleoni, S; Lagutina, I; Crotti, G; Turini, P; Tessaro, I; Brunetti, D; Duchi, R .and Galli, C. (2010). Short-term and long-term effects of embryo culture in the surrogate sheep oviduct versus in vitro culture for different domestic species. Theriogenology, 73:748–757.

Lepperdinger, G; Mullegger, J .and Kreil, G. (2001). Hyal2 – less active, but more versatile? Matrix Biology, 20: 509–514.

Lepperdinger, G; Strobl, B .and Kreil, G. (1998). HYAL2; a human gene expressed in many cells; encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. J Biol Chem; 273: 22466 –22470.

Li, Z; Sun, X; Chen, J; Liu, X; Wisely, S.M; Zhou, Q; Renard, J.P.M; Leno, G.H. and Engelhardt, J.F. (2006). Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. Dev Biol; 293(2): 439-448.

Sohara, Y; Ishiguro, N; Machida, K; Kurata, H; Thant, A.A; Senga, T; et al.(2001). Hyaluronan activates cell motility of v-Src-transformed cells via Ras-mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase-Akt in a tumor-specific manner. Mol Biol Cell; 12:1859–1868.

Stern, R. (2005). Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology. Pathol Biol, 53:372– 82.

Stern, R; Asari A.A. and Sugahara K.N. (2006). Hyaluronan fragments: an information-rich system. Eur J Cell Biol, 85:699 –715.

Straach, K.J; Shelton, J.M; Richardson, J.A; Hascall, V.C. and Mahendroo, M.S. (2005). Regulation of hyaluronan expression during cervical ripening. Glycobiology, 15: 55–65.

Sutovský, P; Fléchon, J.E .and Pavlok, A. (1995). F-actin is involved in control of bovine cumulus expansion. Mol Reprod Dev; 41:521–529.

Tammi, M.I; Day, A.J. and Turley, E.A. (2002). Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. Journal of Biological Chemistry, 277: 4581–4584.

Tian, X.C; Lonergan, P; Jeong, B.S; Evans, A.C. and Yang, X. (2002). Association of MPF; MAPK; and nuclear progression dynamics during activation of young and aged bovine oocytes. Mol Reprod Dev; 62:132– 138.

Tomek, W .and Smiljakovic, T. (2005). Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to metaphase II transition in bovine oocytes. Reproduction; 130:423–430.

Turley, E.A; Noble, P.W. and Bourguignon, L.Y. (2002). Signaling properties of hyaluronan receptors. Journal of Biological Chemistry, 277: 4589–4592.

Zhang, M; Xia, G; Zhou, B .and Wang, C. (2007). Gonadotropin-controlled mammal oocyte meiotic resumption. Front Biosci; 12: 282–296.

Raheem, K.A; Marei, W.F; Mifsud, K; Khalid, M; Wathes, D.C .and Fouladi- Nashta, A.A. (2013). Regulation of the hyaluronan system in ovine endometrium by ovarian steroids. Reproduction, 145: 491–504.

Rilla, K; Pasonen-Seppänen, S; Rieppo, J; Tammi, M .and Tammi, R. (2004).The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone prevents keratinocyte activation and epidermal hyper proliferation induced by epidermal growth factor. J Invest Dermatol, 123:708 –714.

Rodriguez, H.I; Stewart, A.J; Wolfe, D.F; Caldwell, F.J; Harrie, M. and Whitley, E.M. (2011). Immunolocalization of the hyaluronan receptor CD44 in the reproductive tract of the mare. Theriogenology, 75: 276–286.

Salustri, A; Camioni, A.D; Giacomo, M; Fulop, C. and Hascall V.C. (1999). Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicle. Hum. Reprod. Update, 5: 293-301.

Salustri, A; Yanagishita, M. and Hascall, V.C. (1989). Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. Journal of Biological Chemistry, 264: 13840–13847.

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

Schoenfelder, M. and Einspanier, R. (2003). Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. Biology of Reproduction, 69: 269–277.

Shimada, M; Yanai, Y; Okazaki, T; Noma, N; Kawashima, I; Mori, T. and Richards, J.S. (2008). Hyaluronan fragments generated by sperm-secreted hyaluronidase stimulate cytokine/chemokine production via the TLR2 and TLR4 pathway in cumulus cells of ovulated COCs, which may enhance fertilization. Development, 135:2001–2011.

Effect of Maturation Media Supplemented with Hyaluronic Acid, Hayl$_2$, or Both on Cumulus Cell Expansion and *In Vitro* Nuclear Maturation of Buffalo Oocytes.

El-Harairy, M. A.[1]; W. A. Khalil[1]; N. A. Shalaby[1]; W. F. A. Marei[2] and A. E. Mowafy[1]

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

[2]Department of Theriogenology, faculty of veterinary medicine, Cairo University, Giza 12211, Egypt.

ABSTRACT

Hyaluronic acid (HA), is an important component of the extracellular matrix, plays a crucial role for cumulus cell expansion. Genes and proteins involved in HA synthesis and its receptor (CD44) expressed in cumulus oocyte complexes (COCs) in different animal species and increased during maturation. Hyaluronidase enzymes (Hyal) degrade HA into smaller biologically active HA fragments. The main objective of this study was to investigate the effects of the molecular size and concentration of HA on cumulus cells expansion and *in vitro* nuclear maturation of buffalo oocytes, Studying the effect of addition of HA (0.5 mg/mL), Hyal2 (300 U/mL), or a combination of HA + Hyal-2. In oocyte maturation media, on cumulus cell expansion and *in vitro* nuclear maturation of buffalo oocytes. Oocytes collected from ovaries of slaughter animal. Only compacted oocytes were implanted *in vitro* maturation (TCM-199 medium supplemented with different treatments) for 22 h in CO2 incubator at 38.5 °C, 5% CO2 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 $Hyal_2$ inhibited cumulus cell expansion without affecting oocyte nuclear maturation. Oocytes full expansion of cumulus cells in treatment was not affected by Hyaluronic acid (HA) treatment, while it significantly decreased ($P<0.05$) by Hyaluronidase enzyme (Hyal2) treatment as compared to control medium. As a combination both treatment had no effect in the rate of cumulus cells expansion. Maturation rate, in term of percentage of oocytes arrested at metaphase-II was significantly ($P<0.05$) higher for media supplemented with Hyaluronic acid (HA) and a combination of (HA+ Hyal2) and (Hyal2), respectively, compared to control medium.Conclusively, the present results may suggest that supplementation of maturation medium (TCM-199) with Hyaluronic acid (HA) did not effect on the cumulus cell expansion, but had a beneficial effect on Increasing rate of nuclear maturation of buffalo oocytes. There is no relationship between cumulus cells expansion and nuclear maturation of *in vitro* matured buffalo oocyte.

Keywords: Buffalo, oocytes, *in vitro* maturation, Hyaluronic acid, Hyaluronidase enzyme.