تأثير اللبتين على انضاج بويضات الأرانب معملياً

رسالة ماجستير
فيالعلوم الزراعية
(انتاج دواجن)

مقدمة من

أحمد مصطفى امام بدوي

بكالوريوس العلوم الزراعية (انتاج حيواني)- كلية الزراعة – جامعة القاهرة؛٢٠٠٣

لجنة الإشراف

الدكتور/ نجوى عبد الهادي أحمد
أستاذ فسيولوجيا الدواجن– كلية الزراعة – جامعةالقاهرة

الدكتور/ جمال محمد كامل
مدرس فسيولوجيا الدواجن - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

الدكتور/ سهيرأحمد حسين
رئيس بحوث – معهد بحوث الانتاج الحيواني– مركز البحوث الزراعية

تأثير اللبتين على انضاج بويضات الأرانب معملياً

رسالة الماجستير
فيالعلوم الزراعية
(انتاج الدواجن)

مقدمة من

أحمد مصطفى امام بدوي

بكالوريوس العلوم الزراعية (انتاج حيواني)- كلية الزراعة – جامعة القاهرة؛٢٠٠٣

لجنة إجازة الرسالة:

د. أحمد أبو السعود رضوان .....
أستاذ فسيولوجيا الدواجن-- كلية الزراعة – جامعة بنها

د.أحمد عبد الطيف الفار .....
أستاذ مساعد فسيولوجيا الدواجن-- كلية الزراعة – جامعةالقاهرة

د. نجوى عبد الهادي أحمد .....
أستاذ فسيولوجيا الدواجن-- كلية الزراعة – جامعةالقاهرة

تأثير اللبتين على انضاج بويضات الأرانب معملياً

رسالة مقدمة من

أحمد مصطفى امام بدوي

بكالوريوس العلوم الزراعية (انتاج حيواني)- كلية الزراعة – جامعة القاهرة؛٢٠٠٣

للحصول على

درجة الماجستير

في

العلوم الزراعية
(انتاج دواجن)

قســـــم الانتاج الحيواني
كليـــــة الزراعـــة
جـامعــة القــاهرة
مصـــــــر

٢٠١٠

استمارة معلومات الرسائل التى تمت مناقشتها

الكلية / المعهد : الزراعة **القسم** الانتاج الحيواني

١ - **الدرجة العلمية :** ماجستير [✓] دكتوراه [ ]

٢ - بيانات الرسالة :

عنوان الرسالة باللغة العربية :

تأثير اللبتين على انضاج بويضات الأرانب معملياً

عنوان الرسالة باللغة الأجنبية :

Effect of Leptin on *in vitro* Oocytes Maturation in Rabbits

التخصص الدقيق :

تاريخ المناقشة : ٢٠١٠/٢/١١

٣ - بيانات الطالب :

الاسم : احمد مصطفى امام الجنسية : مصرى النوع : ذكر

العنوان :٤٥٩ب شارع الاهرام–الجيزة تليفون: ٠١٢٣٨٥٨٩٧٤

جهة العمل : معهد بحوث الانتاج الحيوانى رقم الفاكس :

البريد الإلكترونى : aimam2009@yahoo.com

٤ - المشرفون على الرسالة :

الاسم	القسم	الكلية /معهد	الجامعة / مركز
أ.د / نجوى عبد الهادي أحمد	**إنتاج حيوانى**	**الزراعة**	**القاهرة**
د / جمال محمد كامل محيسن	**إنتاج حيوانى**	**الزراعة**	**القاهرة**
أ.د / سهير أحمد حسين	**التكنولوجيا الحيوية**	**معهد الإنتاج الحيواني**	**مركز البحوث الزراعية**

٥ - مستخلص الرسالة (Abstract)

٥ - ١ باللغة العربية : بشرط ألا يزيد عن ٧ أسطر

استخدمت في هذه الدراسة عدد ٥١ أم ناضجة من امهات الارانب وتم الحصول منها على البويضات مكتملة الكيوملس وتم تقسيمها عشوائيا الى ٦ مجموعات رئيسية : المجموعة الضابطة، المجموعة المضاف اليها BSA (١٠%) أو هرمون اللبتين بتركيزات ٥،١٠،٢٠،١٠٠ نانو جرام /مل. تم ايضا تحضين البويضات المكتملة في طبقات الكيوملس بالإضافة الى مستويات مختلفة من هرمون اللبتين على أزمنة مختلفة ٦، ١٢، ١٨، ٢٤ ساعة كذلك تم تجربة انضاج أنواع مختلفة من البويضات (قليلة الجودة في التحضين عن البويضات الكاملة في طبقات الكيوملس) وهم المفككة في الكيوملس، شبه الخالية من طبقات الكيوملس، الخالية كاملة في طبقات الكيوملس في بيئة انضاج مختلفة في الاضافات (المجموعة الضابطة، مجموعة ال١٠% من ال BSA ، مجموعة ال٢٠ نانو جرام /ملل لبتين).

الكلمات داله (أرانب، بويضات، انضاج خارجي،مستويات مختلفة، لبتين)

٥ - ٢ باللغة الأجنبية : بشرط ألا يزيد عن ٧ أسطر

This study aimed to investigate the effect of leptin supplementation at different levels in IVM medium on oocyte maturation in rabbits. The cumulus-oocyte complexes (COC's) were recovered from 51 multiparous rabbit and randomly allocated into 6 groups: control group, basic medium supplemented with 10% BSA or leptin at 5, 10, 20 and 100 ng/ml. Rabbit oocytes were cultured for 24 h and the number of matured ocytes was recorded. COC's were checked at 6, 12, 18 and 24 h during the incubation time. Also, Expanded Oocyte Cumulus cells (EOC's), Partially Denuded oocytes(PDO's) and Denuded Oocytes (DO's) were cultured in control group,10% of BSA or in medium supplemented with 20 ng/ml leptin.

(Key Words: rabbit, oocyte, in vitro maturation, different levels, leptin)

٦ – **<u>أهم النتائج التطبيقية التى تم التوصل إليها</u> :**

(لا تزيد عن سطرين لكل منها)

٦ – ١ اعطى هرمون اللبتين مستوى قياسي في انضاج البويضات اذا ما قورن بالمصدر البروتيني التقليدي المضاف الى بيئة انضاج البويضات BSA و المجموعة الضابطة.

٦ – ٢ اعطى تركيز هرمون اللبتين عند مستوى ال٢٠ نانوجرام/ملل افضل نسبة انضاج اذا ما قورنت بالمستويات الاخرى (٥، ١٠، ١٠٠ نانوجرام/ملل).

٦ – ٣ اعطت مجموعات اللبتين زمن أسرع في انضاج مجموعات البويضات من المجموعة الضابطة

٦ –٤ اعطى هرمون اللبتين مستوى قياسي في انضاج البويضات غير الطبيعة اذا ما قورن بالمصدر البروتيني التقليدي المضاف الى بيئة انضاج البويضات BSA والمجموعة الضابطة.

٧ – ما هى الجهات التى يمكن أن تستفيد من هذا البحث :

(اذكر هذه الجهات مع شرح أهمية البحث لهذه الجهة بما لا يزيد عن أربعة سطور لكل جهة)

٧ – ١ الجهات البحثية (أقسام التكنولوجيا الحيوية والانتاج الحيواني بكليات الزراعة والمعاهد والمراكز البحثية):

حيث تعتبر هذه النتائج نواه للبحث على سبل تطويرالوسائل المتبعة للحفاظ على المصادر الوراثية في مجال تكنولوجيا التناسل.

٨ – هل توجد علاقة قائمة بإحدى هذا الجهات : **نعم** ☑ **لا** ☐

فى حالة نعم اذكر هذه الجهات :

٨ – ١ معهد بحوث الانتاج الحيواني والدواجن

ما هى طبيعة العلاقة :

مشروع بحثى ☐

تعاون أكاديمى ☑

مشروع ممول من جهة ثالثة ☐ (اذكر ما هى :)

أخرى ☐ (تذكر)

٩ - <u>هل توافق على التعاون مع جهات مستفيدة من خلال الجامعة :</u>

لا ☐ **(لماذا)**

نعم ☑

(أ) لتطبيق البحث : ☐

(ب) لاستكمال البحث : ☑

(ج) أخرى ☐ **(تذكر)**

١٠ - <u>هل تم نشر بحوث مستخرجة من الرسالة فى مجلات أو مؤتمرات علمية</u>

(تذكر مع جهة النشر و المكان و التاريخ)

١٠ - ١ تم نشر ورقة بحثية في المؤتمر الاول لعلوم الارانب بكلية الزراعة جامعة القاهرة (٢٩-٣٠/ اكتوبر/٢٠٠٨) مطبوعة في كتاب المؤتمر (الصفحات من:١٢٤ إلى:١٣١).

١١ - <u>هل سبق التقدم لتسجيل براءات اختراع</u> (تذكر مع الجهة و المكان و التاريخ)

لا

١٢ - <u>هل توافق على إعطاء البيانات المذكورة فى هذه الاستمارة لجهات أخرى</u>

نعم ☑ لا ☐

توقيع الطالب : توقيع المشرفين :

أحمد مصطفى امام **-أ.د / نجوى عبد الهادي أحمد**

..... **- د / جمال محمد كامل محيسن**

..... **- أ.د / سهير أحمد حسين**

.....

وكيل الكلية (المعهد) للدراسات العليا و البحوث : التاريخ

CONTENT

	Page
INTRODUCTION	**1**
REVIEW OF LITERATURE	**4**
***In vitro* maturation …**	**4**
1. The Historical background	**4**
2. Oocyte Recovery	**6**
a. Dissection technique	**6**
b. Aspiration technique	**7**
c. Ovary slicing technique	**8**
d. Transillumination- aspiration ovary (TAO)	**9**
3. Oocyte Maturation	**9**
a. Cytoplasmic maturation	**11**
1. Morphological and ultrastructural changes	**11**
2. Mitochondria	**11**
3. Golgi	**12**
b. Nuclear maturation	**13**
4. Oocyte metabolism	**15**
5. IVM medium	**20**
a. Type of Media	**20**
1. Simple Media	**20**
2. Complex Media	**21**
b. Media constituents	**21**
1. Amino acids	**21**
2. Vitamins	**21**
3. Ions (constitutions of media salts)	**21**
4. Carbohydrate	**21**
5. Serum	**22**
6. Hormones	**22**
7. Antibiotic	**22**
8. Other constituents	**22**
6. Factors affecting oocyte in vitro maturation	**23**
a. Animal Age	**23**

b. Follicle/oocyte size……….……...…………………… 23
c. Oocyte quality……………..…..…………..………….. 24
d. Factors of media………..…..……..……….………... 25
Leptin ………………………….....………...…………... **29**
1. Metabolic regulation ……………….….……….… **31**
2. Reproduction role of leptin ………………….…… **32**
MATERIALS AND METHODS………….........……. **36**
RESULTS AND DISCUSSION…………..……..…..… **41**
1.Effect of BSA and leptin on *in vitro* oocytes maturation in rabbits……………….….…….….…. **41**
2. Effect of leptin on *in vitro* oocyte maturation during the incubation time……………………….……… **47**
3. Effect of BSA and leptin on *in vitro* maturation of abnormal oocytes in rabbits……………………….…… **50**
SUMMARY... **59**
REFERENCES... **63**
ARABIC SUMMARY…………………………….…….

LIST OF TABLES

No.	Title	Page
1	Historical background on production of the first new born of different species after *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF) and embryo transfer (ET).……...……	**5**
2	Effect of BSA and leptin on *in vitro* maturation rate at different stages of rabbit oocytes. ……..…	**42**
3	Effect of BSA and leptin on expanded oocytes of *in vitro* maturation stages in rabbits …….	**51**
4	Effect of BSA and leptin on partially denuded oocytes of *in vitro* maturation stages in rabbits. ……	**53**
5	Effect of BSA and leptin on denuded oocytes of *in vitro* maturation stages in rabbits.……...……	**54**

LIST OF FIGURES

No.	Title	Page
1	The relationship between glucose metabolism and oocyte potential ……...…….	19
2	Leptin structure…….……...…..…..	30
3	Leptin Function …….……...	31
4	Types of oosytes : COC's, ECO's, PDC's and DC's.……...……...	40
5	Rate of oocytes after culture in IVM medium supplemented with BSA or leptin…….	43
6	The stages of maturation……...	46
7	*In vitro* maturation rate of rabbit oocytes as affected by leptin supplementation during the incubation times……..……	49
8	Representative images of oocytes after culture in IVM medium supplemented with 100 ng/ml leptin..	50
9	Effect of BSA and Leptin on maturation rates of abnormal oocytes and COC's oocytes in rabbit...……..	55
10	Maturedation and Degeneratation rates of oocyte categories supplemented with 20ng/ml leptin…...…	57

Treatments	No.of oocytes	Incubation Times			
		6 h	12 h	18 h	24 h
Control	92	0.00 ^{c}± 0.062 (0)*	0^{c} ± 0.062 (0)*	36.96^{b}±0.052 (34)*	63.04^{a}±0.049 (58)*
Leptin (5ng)	93	0.00 ^{c}± 0.061 (0)*	26.64^{b}± 0.051 (16)*	52.23^{a}± 0.050 (50)*	21.33^{a}±0.052 (27)*
Leptin (10ng)	96	0.00 ^{c} ± 0.062 (0)*	32.50^{b}± 0.050 (31)*	46.25^{a}± 0.048 (44)*	21.33^{b}±0.051 (21)*
Leptin (20ng)	95	0.00 ^{c} ±0.063 (0)*	47.25^{a}±0.047 (45)*	34.06^{b}±0.049 (32)*	18.69^{b}±0.049 (18)*
Leptin (100ng)	94	47.56^{a}±0.048 (45)*	31.70^{b}±0.049 (30)*	19.51^{c}±0.051 (3)*	1.23^{d}±0.055 (1)*

Value with different letters (a, b, c and d) in the same column are significantly different ($p<0.05$).

* Number of oocytes between brackets.

REVIEW OF LITERETURE

In vitro maturation

1. The Historical background

Much of understanding about the mechanisms that control oocyte maturation is derived from *in vitro* studies on oocyte. The initial experiment in this point was mentioned by Pincus and Enzmann (1935) when they compared between *in vitro* and *in vivo* oocyte maturation. The first attempt to use *in vitro* maturation (IVM) of oocytes was reported in 1977 when fertilization was achieved by using rabbit's oviduct to capacitate the bull sperm (Iritani and Niwa, 1977). After ten years, Lu *et al*. (1987) reported that it was possible to obtain advanced embryo for transfer by using granulose cell from preovulatory follicles and co-culturing these cells with immature oocyte for 24 h. This procedure resulted in a good developmental competence after *in vitro* fertilization (IVF) and incubation in sheep oviduct. A historical background on the first successful attempts of IVM, IVF and embryo transfer in different species was summarized in Table (1).

Since the production of successfully new born in different species, it was reported that IVM and IVF techniques have been used to obtain some information on developmental mechanisms of the embryo (Bavister *et al*., 1992). In the last two decades, these techniques and other in vitro studies were utilized for purposes of mass production in research and transfer.

Table 1. Historical background on production of the first new born of different species after *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF) and embryo transfer (ET).

Author	Animal	Procedure		
		IVM rate (%)	IVF rate (%)	ET rate (%)
Adams (1956)	Rabbit	34.60	19.70	-
Yanagimachi and Cheng (1964)	Hamster	40.00	31.00	-
Wittingham(1968)	Mice	54.12	33.33	-
Toyoda and Cheng (1974)	Rat	65.30	88.70	21.00
Steptoe and Edwards(1976)	Human	61.00	41.12	-
Brackett *et al*. (1982)	Cattle	69.60	49.13	-
Cheng *et al*. (1986)	Pig	67.00	52.45	-
	Sheep	60.00	48.32	-
Johanston *et al*. (1989)	Cat	54.00	56.00	35.00
Younis *et al*. (1991)	Goat	-	62.00	39.50
Palmer *et al*. (1991)	Horse	-	41.00	18.00
Suzuki *et al*. (1992)	Buffalo	-	67.30	-