ABSTRACT

In Vitro Maturation and Fertilization of She-camel Oocytes Using Different Media and during Breeding and Non-breeding Seasons Leptin Hormone Supplementation

The present work carried out to investigate (1) the effect of breeding and non-breeding seasons either in the right or left ovary on the ovarian activity of dromedary camels, (number of corpora lutea, number of follicles, ovarian weight), as well as follicular fluids components and ovarian histological. (2) The effect of two maturation media, TCM199 and MEM and three types of serum, FDCS, BSA and ESS on *in vitro* maturation of camel oocytes in different season. (3) The effect of addition of leptin hormone to maturation media on maturation and fertilization of camel oocytes. Ovary weight and number of corpora lutea of dromedary she-camel increased insignificant during breeding season as compared with non-breeding season. While number of follicles of dromedary she-camels during breeding season was high significant ($P<0.001$) higher than the non-breeding. Sodium concentration decreased significant ($P<0.05$) during breeding season as compared with non-breeding season. Calcium concentration, Potassium concentration and ALT enzyme increased insignificant during breeding season as compared with non-breeding season. Total phosphorus concentration, AST enzyme and oestradiol-17β hormone increased significant during breeding season as compared with non-breeding season. The histological examination show more ovarian follicle at primary, secondary and mature follicles in breeding season compared to non-breeding season. The total number of oocytes and cumulus oocytes complexes (COC'S), recovery rate and partially denude cumulus oocytes of dromedary she-camel in the breeding seasons were significantly higher than the non-breeding season. While, degenerated cumulus oocytes and denude cumulus oocytes in the non-breeding seasons were significantly higher than the breeding season. Our results revealed highly significant ($P<0.001$) increase in maturation rate of oocytes at metaphase II stage during breeding season than the non-breeding season. Using TCM medium results in the highest distribution of metaphase II as compared with MEM medium. The maturation rate was significantly higher ($P<0.001$) with FDCS at M II-stage (40.8%) than that with BSA and ESS (33.4% and 30% respectively). The supplementation of leptin hormone to maturation media significantly increased the maturation rate of camel oocytes as compared control groups. Our results revealed also there were no significant difference between control groups (TCM-199 alone) and (TCM-199 supplemented with 20ng/ml leptin) in the proportion of developed embryos to morula stages and blastocyst production.

المستخلص

إنضاج وإخصاب بويضات النوق معمليا باستخدام بيئات مختلفه مع إضافة هرمون اللبتين خلال موسمي النشاط والخمول الجنسي

أجريت هذه الدراسة على النوق العربية لدراسة تأثير موسمي النشاط والخمول الجنسي على النشاط المبيضي (وزن المبيض، عدد الأجسام الصفراء، عدد الحويصلات المبيضية، معدل استرداد البويضات وعدد البويضات وجودتها) و مكونات السائل الحويصلي (الصوديوم، الكالسيوم، البوتاسيوم، الفوسفور الكلي، إنزيم AST، ALT وهرمون الاستراديول-١٧ بيتا) والحالة الهستولوجية في كلا من المبيض الأيمن والأيسر وكذلك تأثير نوعين من بيئة الإستزراع سواء بيئة زراعة الأنسجة-١٩٩ (TCM-199) أو بيئة أقل اساسيات (MEM) و ثلاثة أنواع من المصل وهي مصل جنين الجمال (FDCS)، مصل سيرم الأغنام (ESS) و ألبيومين مصل الأبقار (BSA) على الإنضاج المعملي لبويضات إناث الجمال وحيدة السنام. وأخيرا لدراسة تأثير هرمون اللبتين على الإنضاج والإخصاب المعملي لبويضات النوق. أظهرت الدراسة زيادة وزن المبيض و عدد الأجسام الصفراء بدرجة غير معنوية أثناء موسم النشاط الجنسي وذلك بالمقارنة بموسم الخمول الجنسي، زيادة عدد الحويصلات المبيضية، معدل الاسترداد وعدد البويضات عالية الجودة بدرجة معنوية (عند مستوى ٠.٠٠١) أثناء موسم النشاط الجنسي. زاد متوسط عدد البويضات المعراه جزئيا والمعراة تماما والغير صالحه أثناء موسم الخمول الجنسي عالي بدرجة معنوية (عند مستوى ٠.٠٠١، ٠.٠٠١ و٠.٠٠١ على الترتيب)، ولم تكن هناك فروق معنوية في عدد البويضات المعراه جزئيا والمعراة تماما والغير صالحه في كل من المبيض الأيسر و الأيمن. زاد تركيز الصوديوم معنويا (عند مستوى ٠.٠٥) في السائل الحويصلي أثناء موسم الخمول الجنسي. كذلك زاد تركيز الفوسفور الكلي والبوتاسيوم و إنزيم AST وهرمون الاستراديول-١٧ بيتا معنويا و زاد ايضا نشاط إنزيمALT وتركيز الكالسيوم ولكن بدرجه غير معنوية أثناء موسم النشاط الجنسي. أوضحت الحاله التشريحية زيادة في النشاط المبيضي أثناء موسم النشاط الجنسي وذلك بالمقارنة بموسم الخمول الجنسي، كذلك زاد النشاط المبيضي في الجانب الأيسر وذلك بالمقارنه بالجانب الأيمن. أثناء موسم النشاط الجنسي زاد معدل الإنضاج المعملي للبويضات التي وصلت لمرحلة metaphase II معنويا (عند مستوى ٠.٠٠١) ، زاد معدل الإنضاج المعملي للبويضات التي وصلت لمرحلة metaphase II معنويا (عند مستوى ٠.٠٠١) مع استخدام بيئة زراعة الأنسجة-١٩٩ (TCM) وذلك بالمقارنه ببيئة أقل اساسيات (MEM)، زاد معدل الإنضاج المعملي للبويضات التي وصلت لمرحلة metaphase II معنويا (عند مستوى ٠.٠٠١) مع استخدام مصل جنين الجمال (FDCS) وذلك بالمقارنه مصل سيرم الأغنام (ESS) ومصل البيومين مصل الأبقار (BSA). إضافة هرمون اللبتين بتركيز ٢٠ نانوجرام / ملي إلى بيئة الإنضاج زاد من معدل الإنضاج المعملي للبويضات التي وصلت لمرحلة metaphase II معنويا (عند مستوى ٠.٠٠١) و ذلك بالمقارنه بمجموعة الكنترول وباقي التركيزات. لم يكن هناك تغيير معنوى فى نسبة الإخصاب عند إضافة هرمون اللبتين بتركيز ٢٠ نانوجرام / ملي إلى بيئة الإنضاج وذلك بالمقارنه ببيئة الإنضاج الخليه من هرمون اللبتين.

CONTENTS

	Page
REVIEW OFLITRATURE……...	**6**
1. Effect Of Season On……...	**7**
1.1. Ovarian activity…….....	**7**
1.1.1. ovarian weight……..	**7**
1.1.2. number of corpora lutea (CLs)……	**8**
1.1.3. number of follicles …….	**9**
1.2. Follicular fluid (FF) components ……..……	**11**
1.2.1. minerals concentration ……..	**11**
1.2.1.1. sodium concentration …….....	**11**
1.2.1.2. calcium concentration …….....	**12**
1.2.1.3. total phosphorus concentration ……..	**13**
1.2.1.4. potassium concentration ……..	**14**
1.2.2. enzymatic activities……	**15**
1.2.2.1. aspartate-aminotransferase enzyme activity (AST)…….	**15**
1.2.2.2. alanine-aminotransferase enzyme activity (ALT)……	**17**
1.2.3. oestradiol-17ß concentration (pg/ml)……	**19**
1.3. Histological status in the ovary……..	**20**
1.4. Oocyte production …….....	**23**
2. Oocytes Maturation …….	**26**
2.1. Factors affecting in vitro maturation ……..	**27**
2.1.1. effect of maturation medium on in vitro maturation of oocytes	**27**
2.1.2. effect of serum type on the in vitro maturation of oocytes ……	**29**
2.1.3. effect of hormones on oocyte maturation ……	**32**
2.1.4. effect of season of the year ……	**36**
2.1.5. other additive ……..	**37**
21.1.5.1. leptin hormone ……..	**37**
3. In Vitro Fertilization ……	**40**
4. Use of epididymal spermatozoa for in vitro fertilization (IVF)…….	**40**
4.1. Factors affecting *in vitro* fertilization ……	**42**
4.1.1. capacitating Substance ……..	**42**
3.2.1. a. heparin ……	**42**
3.2.1. b. calcium Ionophore ……...	**43**
3.2.1. c. caffeine ……..……	**43**
4.1.2. sperm concentration ……..……	**44**
MTERIALS AND METHODS…….	**45**
1. Ovaries Collection ……..	**49**
2. Ovaries Assessment ……..……...	**49**
3. Preparation of Harvesting Medium …….……	**49**
4. Procedures……	**50**
1. Ovarian weight (g)……..……	**50**
2. Number of corpora lutea and follicles …….	**50**
3.Follicular fluid preparation ……...	**50**
4. Biochemical analysis of follicular fluid ……..	**50**
5.Histological changes in the ovaries ……..	**51**
6. Oocytes Collection……..	**52**
6.1. Slicing techniques ……..	**52**
6.2. Oocytes yield and recovery rate……...	**53**
6.3. Oocyte categories……	**53**
7. *In Vitro* Maturation of Camel Oocytes ……	**55**

7.1. Maturation medium …… 55
7.2. Maturation media with leptin hormone……... 55
7.3. Mineral oil ……. 57
7.4. Oocytes maturation……...…… 57
7.5. Oocytes fixation and staining for examination…… 57
7.6. Criteria of maturation……... 58
8. IN *Vitro* Fertilization…….. 59
8.1. Epididymal camel spermatozoa collection……. 59
8.2.Testes collection and transportation……. 59
8.3. Method of sperm recovery from the epididymis…… 59
8.4. Sperm capacitation…….. 61
8.4.1. Preparation of IVF-TALP Media…… 61
8.4.2. capacitation substances…… 61
8.4.3. *in vitro* sperm capacitation…….. 61
8.4.5. *in vitro* development……. 62
8.4.6. in vitro fertilization (IVF)…… 62
8.4.6. assessment of embryo development …… 63
9. Statistical Analysis …… 63
RESULTS AND DISCUSSION…… 64
1. Experiment1.Effect of Season of the Year……..... 66
11. .Ovarian activity ……..... 66
1.1.1. ovary weight …… 66
1.1.2. number of corpora lutea …… 69
1.1.3. number of follicles …….. 72
1.2. Follicular fluid components …… 75
1.2.1. minerals concentration ……. 75
1.2.1.1. sodium concentration ……. 75
1.2.1.2. calcium concentration …… 76
1.2.1.3. total phosphorus concentration …… 77
1.2.1.4. potassium concentration ……. 79
1.2.2. enzymatic activity ……. 82
1.2.2.1. aspartate-aminotransferase……. 82
1.2.2.2. alanine-aminotransferase……. 83
1.2.3. oestradiol-17ß concentration (pg/ml)……... 86
1.3. Histological structure of camel ovary …….. 89
1.4. Effect of season on oocytes production……. 94
2. In Vitro Maturation of Camel Oocytes ……. 100
2.1. Effect of season……. 100
2.2. Effect of media……. 103
2.3. Effect of type serum …… 106
2.4. Effect of interaction …… 110
2.5. Effect of interaction among reproductive season and type of media…… 110
2.5.1. Effect of interaction between season and type of serum … 112
2.5.2. Effect of interaction between type of media and type of serum …… 114
2.5.3. Effect of interaction among season, type of medium and type of serum ……. 116
2.5. Effect of leptin hormone addition to maturation medium on maturation rate of camel oocytes …… 119
2.6. Effect of leptin hormone on fertilization rate of mature camel oocytes …... 126
SUMMARY AND CONCLUSION…….. 131
REFERENCES…….. 144
ARABIC SUMMARY……... 176

LIST OF ABBREVIATIONS

FDCS	fetal dromedary camel
BSA	Bovine serum albumin
ESS	estrus sheep serum
CL	Corpora lutea
CO2	Carbon dioxide
COC	Cumulus-oocyte complex
COCs	Cumulus-oocyte complexes
AST	Aspartate-aminotransferase
ALT	Alanine-aminotransferase
E-17β	Oestradiol 17β
E2	Oestradiol
FSH	Follicle stimulating hormone
G	Gram
GCC	Granulose cell culture
GV	Germinal vesicle
GVBD	Germinal vesicle breakdown
H	Hour(s)
IU	International unit
IVF	*In vitro* fertilization
IVM	*In vitro* maturation
LH	Luteinizing hormone
Mg	Milligram
M-I	Metaphase-I
M-II	Metaphase-II
Ml	Milliliter

Mm	Millimeter
mM	Millimolar
Ng	Nanogram
NSS	Normal physiological saline solution
TCM	Tissue Culture Medium
MEM	Minimum Essential Medium
PBS	Phosphate buffered saline
pFF	Porcine follicular fluid
SE	Standard error
vs	Versus
%	Percentage
°C	Degree Celsius
µg	Microgram
µl	Micro liter
µm	Micrometer
THI	temperature-humidity index